

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PNEUMOLOGIA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES TOLL-SÍMILE E SUA RELAÇÃO COM
CITOCINAS POTENCIALMENTE ENVOLVIDAS EM LESÃO DE REPERFUSÃO
DURANTE A FASE INICAL DO TRANSPLANTE PULMONAR EM HUMANOS**

TESE DE DOUTORADO

CRISTIANO FEIJÓ ANDRADE

Orientadores

Prof. Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso

Prof. Dr. José da Silva Moreira

Orientadores no Exterior

Prof. Mingyao Liu

Prof. Shaf Keshavjee

Porto Alegre - 2003

**EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES TOLL-SÍMILE E SUA
RELAÇÃO COM CITOCINAS POTENCIALMENTE ENVOLVIDAS EM
LESÃO DE REPERFUSÃO DURANTE A FASE INICIAL DO
TRANSPLANTE PULMONAR EM HUMANOS**

CRISTIANO FEIJÓ ANDRADE

Orientadores

Prof. Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso

Professor Adjunto do Depto. de Cirurgia, Disciplina de Cirurgia Torácica da Fundação Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre – RS

Prof. Dr. José da Silva Moreira

Professor Adjunto do Depto. de Medicina Interna – Pneumologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Mingyao Liu

Professor Associado do Depto. de Cirurgia, Disciplina de Cirurgia Torácica, Universidade de Toronto – Canadá

Prof. Shaf Keshavjee

Professor Titular do Depto. de Cirurgia, Disciplina de Cirurgia Torácica, Universidade de Toronto – Canadá

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina. Área de Concentração: Pneumologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Medicina - Pneumologia

Porto Alegre

2003

FICHA CATALOGRÁFICA**F553e** Andrade, Cristiano Feijó

Expressão gênica dos receptores toll-símile e sua relação com citocinas potencialmente envolvidas em lesão de reperfusão durante a fase inicial do transplante pulmonar em humanos/ Cristiano Feijó Andrade; orient. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso, Mingyao Liu, Shaf Keshavjee.

86 f., il.color., tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia, Porto Alegre, BR-RS, 2003.

1.Imunidade. 2.Citocina. 3.Transplante de Pulmão. I. Cardoso, Paulo Francisco Guerreiro. II. Moreira, José da Silva. III. Liu, Mingyao. IV. Keshavjee, Shaf. V Título.

NLM: QW540

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Ernesto e Ruth pelo apoio, dedicação e carinho em todas as horas e nos momentos mais difíceis. Aos meus irmãos Ernesto e Rubens, pelo momentos de amizade e convivência.

Aos meus avós Acelino e Esther Feijó por seu carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso, meu orientador, pessoa exemplar por sua dedicação pela pesquisa, postura profissional, amizade, confiança e apoio total e irrestrito a este trabalho.

Ao Dr. José Carlos Felicetti, pela amizade, confiança, convívio e ensinamentos que foram (e são) muito importantes para minha prática diária em cirurgia torácica.

Ao Dr. Mingyao Liu, pesquisador da Universidade de Toronto, pela sua incansável procura pelo saber e amor incontestável a pesquisa que contagia a todos que com ele trabalham.

Ao Dr. Shaf Keshavjee, chefe do Serviço de Cirurgia Torácica da Universidade de Toronto, pela oportunidade de poder participar e conviver com grandes pesquisadores no Laboratório de Cirurgia Torácica do Toronto General Hospital.

Ao Dr. José da Silva Moreira, pelo seu empenho e incansável trabalho frente ao programa de pós-graduação em pneumologia, sempre apoiando e incentivando os alunos deste curso.

Ao Sr. Marco Aurélio, secretário da pós-graduação em Pneumologia, pelo seu dinamismo, competência profissional e principalmente amizade.

Aos meus colegas de laboratório Bing Zang, Jing Xu, Xiahuo Hui Bai, Monika Lodyga, Melanie Tsang, Cláudia dos Santos, Hiroiuki Kaneda, André Dutly pela convivência e pela ajuda durante meu “Fellowship”.

A estimada Dra. Adriane M. Ramos pela sua incansável ajuda na revisão desta tese.

RESUMO

Introdução: Imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra microorganismos invasores, a qual é mediada por moléculas específicas que reconhecem patógenos, chamadas receptores toll-símile (TLRs). Os TLRs são também capazes de reconhecer ligantes endógenos, tais como conteúdos de células necróticas e proteínas de choque térmico (HSP), resultando na produção de citocinas e ativação do sistema imune adquirido. A função exata dos TLRs ainda é pouco entendida em transplante de órgãos. No entanto, tem sido sugerido que eles podem estar envolvidos na rejeição aguda ou crônica e atuar na resposta do enxerto a lesão por isquemia e reperfusão. **Objetivo:** Examinar as alterações na expressão gênica dos TLRs durante a fase inicial do transplante pulmonar em humanos e sua relação com citocinas potencialmente envolvidas na lesão por isquemia e reperfusão em transplante de órgãos. **Métodos:** Foram analisadas biópsias pulmonares de 14 pacientes submetidos a transplante pulmonar (LTx). Estas amostras foram coletadas no final do período de isquemia fria (TIF, n=14), no final do período de isquemia quente (TIQ, n=13), 1 hora (n=12) e 2 horas (n=8) após a reperfusão do enxerto. RNA total foi isolado a partir de tecido pulmonar e os níveis de RNA mensageiro (mRNA) dos TLRs (1-10) bem como citocinas (IL-8, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-1 β) e proteína de choque térmico 70 (HSP70) foram medidos por reação em cadeia pela polimerase em tempo real. **Resultados:** Foi detectada a expressão de mRNA de todos TLRs em tecido pulmonar. Nas amostras no TIF, os níveis de mRNA dos TLRs apresentaram-se com diferentes expressões gênicas. Os níveis de expressão dos TLRs, com exceção para o TLR3, estavam altamente correlacionados entre si no TIF e com os níveis de mRNA de IFN- γ , IL-10 e IL-1 β e menos significativamente com os níveis de IL-6 e IL-8. Houve diminuição dos níveis de mRNA na grande maioria dos TLRs após reperfusão, o que foi diferente para a maioria das citocinas e HSP70, que apresentaram tendência a aumentar após transplante. A expressão gênica de TLR4 apresentou-se correlacionada com os níveis de IL-8 e IL-1 β antes e após transplante ($P<0.05$). Pulmões de doadores que foram intubados por períodos acima de 72 horas (n=5) apresentaram níveis mais elevados de TLR2 e TLR10 ($P<0.05$). **Conclusão:** Pela primeira vez, foi demonstrado que a expressão dos TLRs altera-se durante o período de isquemia e reperfusão em transplante pulmonar em humanos. O tempo de intubação dos doadores pulmonares pode influenciar a expressão de receptores Toll-símile específicos. A correlação entre TLR4 e IL-8/IL-1 β sugere que os TLRs pulmonares podem ter alguma função na resposta precoce do enxerto.

Palavras chave: isquemia, pulmão, citocinas, imunidade, transplante.

ABSTRACT

Introduction: Innate immunity is the first line of host defense against invading microorganisms, which is mediated by specific pathogen recognition molecules called Toll-like receptors (TLRs). TLRs can also recognize endogenous ligands, such as contents of necrotic cells and heat shock proteins (HSP), resulting in cytokine production and activation of adaptive immune system. The exact role of the Toll-like receptors and their signalling pathways is still poorly understood in organ transplantation. However, it is suggested that they may be involved in either chronic or acute organ rejection and may play a role in graft response to ischemia reperfusion injury. **Objective:** To examine the changes in gene expression of TLRs during the early phase of human lung transplantation and their relationship with cytokines potentially involved in ischemia reperfusion injury in organ transplantation. **Methods:** We analyzed lung biopsies from 14 patients submitted to lung transplantation (LTx). Biopsies were collected at the end of the cold ischemic time (CIT, n=14), end of warm ischemic time (WIT, n=13), and after 1h (n=12) and 2h (n=8) of reperfusion. Total RNA was isolated from lung tissues, and messenger RNA (mRNA) levels of TLRs (TLR 1-10) as well as cytokines (IL-8, IL-6, IL-10, IFN- γ and IL-1 β) and heat shock protein 70 (HSP70) were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. **Results:** We observed mRNA expression of all TLRs in lung tissue. In the CIT samples, TLR mRNAs levels were differentially expressed in donor samples. In the CIT samples, the expression levels of TLRs, except for TLR3, were highly correlated with each other and with mRNA levels of IFN- γ , IL-10 and IL-1 β , and less significantly correlated with IL-6 and IL-8. After reperfusion, expression of almost all TLR mRNAs decreased to lower levels what was different for most of the cytokines and HSP70, which trended to increase after LTx. TLR4 gene expression was closely correlated with IL-8 and IL-1 β levels prior to and after LTx ($P<0.01$). Lungs from donors who were intubated longer than 72 h (n=5) expressed higher levels of TLR2 and TLR10 ($P<0.05$). **Conclusion:** For the first time, we showed that the expression of TLRs is altered during ischemia-reperfusion period of human lung transplantation. The donor length of intubation may influence the expression of specific TLRs. Correlation between TLR4 and IL-8/IL-1 β suggests that pulmonary TLRs may play a role in early graft response.

Key words: ischemia, lung, cytokines, immunity, transplantation

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Receptores Toll de Drosófila e os receptores Toll-símile em humano 5
- FIGURA 2 Expressão gênica dos receptores Toll-símile em dois diferentes tipos células 9
- FIGURA 3 Transdução de sinal pelos receptores Toll-símile.. 10
- FIGURA 4 Representação esquemática do complexo formado para a identificação de LPS e sua semelhança com a IL-1R 13
- FIGURA 5 Estimulação da produção de TLR4 após adição de LPS 14
- FIGURA 6 Resposta inflamatória de células alveolares epiteliais tipo II na presença de patógenos 17
- FIGURA 7 Regulação do desenvolvimento de células T auxiliares por TLRs em células apresentadoras de antígenos19
- FIGURA 8 Representação esquemática do provável mecanismo da ação dos receptores Toll-símile durante a fase de isquemia e reperfusão27

FIGURA 9	Reação em cadeia pela polimerase	40
FIGURA 10	Análise do produto da reação da PCR	41
FIGURA 11	Diferentes termocicladores utilizados em PCR em tempo real	42
FIGURA 12	Reação da PCR com sondas TaqMan®	43
FIGURA 13	Reação da PCR com SYBR® Green I	45
FIGURA 14	Sondas “Scorpion®”	46
FIGURA 15	Curva de amplificação e curva padrão de uma reação de PCR em tempo real	48
FIGURA 16	Expressão gênica dos receptores Toll-símile em TIF	56
FIGURA 17	Níveis dos receptores Toll-símile após transplante.....	56
FIGURA 18	Tempo de intubação dos doadores e expressão dos receptores Toll-símile	58
FIGURA 19	Correlação entre a expressão gênica de IFN- γ e IL-10 com os níveis dos receptores Toll-símile	60

FIGURA 20 Correlação entre os níveis de expressão gênica entre TLR4 com IL-1 β e IL-8.....	61
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Dados clínicos dos doadores pulmonares51

TABELA 2 Dados clínicos dos receptores pulmonares52

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Receptores Toll-símile e seus principais ligantes.....	8
QUADRO 2	“Primers” utilizados nas reações da PCR com suas respectivas concentrações.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

α -Gal - alfa galactose (Gal) 1-3 Gal beta 1-4 GlcNAc-R

APC – células apresentadoras de antígenos

BCG – bacilo de Calmette & Guérin

cDNA - DNA complementar

CpG-DNA – deoxi-citidilato-fosfatase-deoxi-ganilato DNA

Ct – ciclo de limiar (“treshold cicle”)

CXCR4 - receptor 4 de quimocina

DSG - 15-deoxyspergualin

DNA - ácido desoxirribonucléico

dsRNA - RNA dupla-hélice

GDF5 - fator 5 de diferenciação/crescimento

GPI – glicosilfosfatidilinositol

HMBS – hidroximetilbilane sintase

HSP – proteína de choque térmico (“heat shock protein”)

HSP60 – proteína de choque térmico 60

HSP70 – proteína de choque térmico 70

HSP90 - proteína de choque térmico 90

IFN- α - interferon alfa

IFN- β - interferon beta

IFN- γ - interferon gama

IL - interleucina

IL-1 β -interleucina 1 beta

IL-4 - interleucina 4

IL-6 - interleucina 6

IL-8 - interleucina 8

IL-10 - interleucina 10

IL-13 - interleucina 13

iNOS - óxido nítrico sintetase induzível

I/R- isquemia e reperfusão

IRAK - receptor da IL-1 associado a quinase

JNK - quinase c-Jun NH2-terminal

KIR – inibidor do receptor “killer”

LBP - proteína de ligação do LPS (“LPS-binding protein”)

LPS - lipopolissacarídeo

LTx - transplante pulmonar

Mal - adaptador MyD88-símile

MAPK - proteína quinase p38 associada ao mitógeno

MyD88 – “myeloid differentiation primary response gene 88”

mRNA - RNA mensageiro

NF- κ B - fator nuclear kappa B

NCBI - Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (“National Center for Biothechnology Information”)

ODNs - desoxinucleotídeos sintéticos

PBMC - células mononucleares de sangue periférico

PAMP - padrões moleculares associados a patógenos

PMN – Polimorfonucleares

PO – pós-operatório

poli(I:C) - ácido polinosínico-policitidínico

PRRs - receptores que reconhecem patógenos

RANTES - “regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted”

RNA - Ácido ribonucléico

ScvR - receptores “scavenger”

TIR - Toll/IL-1 receptor

TIRAP - domínio TIR que contém uma proteína adaptadora

Th1 - linfócito T auxiliar tipo 1

Th2 - linfócito T auxiliar tipo 2

TLR – receptor toll-símile (“Toll-like receptor”)

TLR1 - receptor toll-símile 1

TLR2 - receptor toll-símile 2

TLR3 - receptor toll-símile 3

TLR4 - receptor toll-símile 4

TLR5 - receptor toll-símile 5

TLR6 - receptor toll-símile 6

TLR7 - receptor toll-símile 7

TLR8 - receptor toll-símile 8

TLR9 - receptor toll-símile 9

TLR10 - receptor toll-símile 10

TGF- β - fator de transformação beta

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TRAF6 - fator 6 associado ao receptor de TNF

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE QUADROS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 - RECEPTORES TOLL-SÍMILE	4
3.1.1 – Histórico dos TLRs	4
3.1.2 - Reconhecimento de antígenos através do sistema imune inato	5
3.1.3 - Função dos TLRs	6
3.1.4 - Reconhecimento dos PAMP pelos TLRs	7
3.1.5 - TLR1, TLR2, TLR6	11
3.1.6 –TLR4	11
3.1.7 –TLR3	14
3.1.8 - TLR5	15
3.1.9 - TLR7, TLR8, TLR9 e TLR10	15
3.2 - IMUNIDADE INATA E TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS	16
3.2.1 - Componentes do sistema imune inato	16
3.2.2 - Modo de ação do sistema imune inato	18
3.2.3 - O papel das células T na rejeição em transplante de órgãos	20
3.2.4 - O papel das células T na resposta imune	21
3.2.5 - Migração das células dendríticas	22

3.2.6 - Xenotransplante e imunidade inata	22
3.2.7 - Imunidade em isquemia e reperfusão de órgãos	23
3.2.8 - Papel dos receptores Toll-símile em transplante de órgãos	25
3.3 - CITOCINAS EM TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS	30
3.3.1 - Interleucina 8	31
3.3.2 – Interleucina 18 e 12	32
3.3.3 – Interleucina 10	33
3.3.4 - Interleucina 6	33
3.3.5 – Interleucina 1 Beta	34
3.3.6 - Interferon Gama	35
3.3.7 - Fator de Necrose Tumoral Alfa	36
3.4 - PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70	36
3.5 - REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL	38
3.5.1 - PCR Tradicional	38
3.5.2 - PCR em tempo real	41
3.5.2.1 - Análise da reação da PCR em tempo real	46
3.5.2.2 - Desenho dos “Primers” e Sondas	48
3.5.2.3 - Efeito da restrição dos reagentes	49
3.5.2.4 - Métodos de quantificação	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
5. RESULTADOS	55
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o transplante pulmonar é a terapia de escolha para pacientes com doença pulmonar em estágio terminal. Aproximadamente 15.000 transplantes já foram realizados no mundo com uma média de 1.000 transplantes anualmente (TRULOCK *et al.*, 2003). No Brasil este tipo de procedimento ainda é restrito a poucos centros especializados, no entanto o número de transplantes tem aumentado progressivamente nos últimos 3 anos (WWW.SAUDE.GOV.BR/TRANSPLANTES). Apesar da melhora dos cuidados pós operatórios, ainda são observadas várias complicações, como a lesão por isquemia e reperfusão, rejeição e infecção, as quais podem ocasionar comprometimento do enxerto resultando em evolução difícil ou mesmo morte (ZANDER *et al.*, 2001). Muito recentemente, tem sido sugerido que o sistema imune inato atua como figura importante na resposta do enxerto durante o transplante de órgãos, tanto no processo de rejeição (FOX-MARSH & HARRISON, 2002; GOLDSTEIN *et al.*, 2003) como na lesão por isquemia e reperfusão após transplante (FONDEVILA *et al.*, 2003).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo contra microorganismos invasores. Esta resposta instantânea é mediada por macrófagos e leucócitos polimorfonucleares que são recrutados para dentro dos tecidos lesados em resposta a determinados patógenos ou estímulos. Estas células, devido à presença de receptores que reconhecem patógenos (PRRs), são capazes de identificar, em diferentes microorganismos, classes específicas de moléculas, conhecidas com padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (TAKEDA *et al.*, 2003). Em humanos uma forma especial de PRRs são proteínas transmembrana chamadas "Toll-like receptors" ou receptores toll-símile (TLRs).

Estes receptores após o reconhecimento de antígenos específicos desencadeiam uma série de reações que culminam com a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) no interior do núcleo celular, resultando em ativação de citocinas. Ao mesmo tempo em que acontece o contato com os patógenos, ocorre estimulação da produção de linfócitos T pelo sistema imune adaptativo, o qual é responsável pelo o mecanismo antígeno-específico de defesa do hospedeiro que compreende a resposta imune celular e mediada por anticorpos (MEDZHITOV *et al.*, 1997a).

Evidências recentes sugerem que os TLRs são capazes de reconhecer não somente PAMP, mas também certos componentes endógenos, como por exemplo

proteínas de choque térmico (“heat shock”) (OHASHI *et al.*, 2000), heparan sulfato (JOHNSON *et al.*, 2002) e conteúdos de células necróticas (LI *et al.*, 2001). Além disto, estímulos inflamatórios como lesão térmica (PATERSON *et al.*, 2003) e lesão de isquemia e reperfusão em transplante de órgãos (FONDEVILA *et al.*, 2003) também têm sido relacionados com ativação dos TLRs.

A lesão de reperfusão compreende uma série de fenômenos que decorrem da recirculação do sangue (reperfusão) em um órgão cuja circulação sangüínea foi interrompida temporariamente (isquemia). O produto final desta seqüência de eventos será a alteração da permeabilidade capilar cuja graduação será diretamente proporcional ao grau do dano isquêmico o qual, por sua vez, pode variar do edema intersticial até a ruptura vascular com hemorragia (ANDRADE, 2001). Este processo resulta em recrutamento de neutrófilos e produção de mediadores inflamatórios que irão repercutir diretamente na viabilidade do enxerto (DE PERROT *et al.*, 2003b). Entre estes mediadores, encontram-se as citocinas pró e anti-inflamatórias que têm sido utilizadas como marcadores da viabilidade dos enxertos após isquemia e reperfusão de órgãos (DE PERROT *et al.*, 2002).

Os TLRs estão presentes em tecido pulmonar em diferentes níveis de expressões gênicas (ZAREMBER & GODWSKI, 2002). Entretanto, sua regulação e expressão em pulmões transplantados jamais foram descritas bem como a sua relação com citocinas potencialmente envolvidas na resposta do enxerto pulmonar na fase inicial do transplante.

Com o objetivo de verificar a expressão gênica dos TLRs durante a fase inicial do transplante pulmonar, foi utilizada uma nova técnica de amplificação de DNA, chamada de reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real ou “real-time PCR”. Através deste método foram também analisadas as expressões gênicas de citocinas implicadas durante o processo inicial de reperfusão do enxerto. Adicionalmente, foi analisada a expressão gênica da proteína de choque térmico 70 (HSP70) como um potencial marcador da gravidade da lesão de isquemia e reperfusão (AOE *et al.*, 1997) e por esta proteína estar envolvida na ativação de TLRs (ASEA *et al.*, 2002; DYBDAHL *et al.*, 2002).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Descrever a expressão dos 10 diferentes receptores Toll-símile em tecido pulmonar de pacientes submetidos a transplante de pulmão.

Objetivo específico

Descrever o padrão de expressão dos receptores toll-símile antes e após transplante pulmonar.

Detectar a presença de correlação entre os níveis de expressão dos TLRs e citocinas importantes na resposta inflamatória do transplante pulmonar bem como com HSP70.

Comparar os dados clínicos dos doadores pulmonares com a expressão gênica dos TLRs, citocinas e HSP70.

3. REVISÃO DA LITERATURA

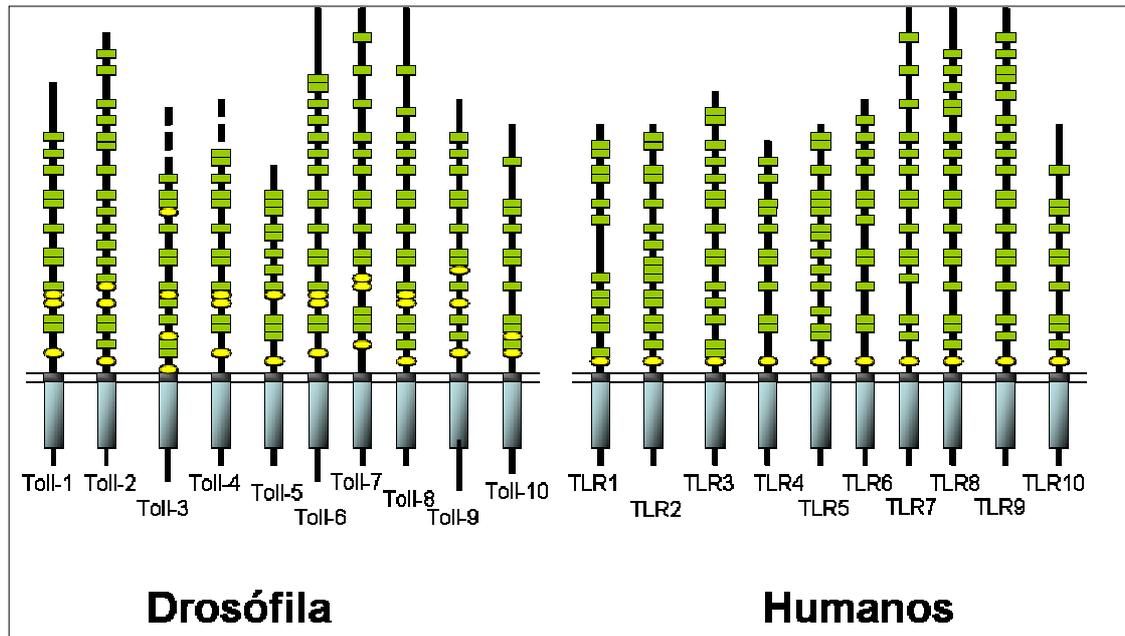
3.1 – RECEPTORES TOLL-SÍMILE

3.1.1 - Histórico dos TLRs

A defesa do organismo contra diferentes patógenos depende do sistema imune. Este sistema em mamíferos consiste em imunidade inata e adaptativa. A imunidade adquirida é um sistema altamente sofisticado que é mediado pelos linfócitos B e T e está presente somente em vertebrados. Em contraste, o sistema imune inato, que foi descrito há mais de um século, é um sistema filogeneticamente conservado que está presente em quase todos os organismos multicelulares (TAKEDA *et al.*, 2001). Recentemente, uma proteína transmembrana chamada Toll, originalmente identificada como um receptor necessário para o estabelecimento da polaridade dorso-ventral no embrião de *Drosófila* (HASHIMOTO *et al.*, 1988), foi também identificada como crucial na defesa desta mosca contra fungos e outros microorganismos (LEMAITRE *et al.*, 1996).

Prosseguindo a identificação dos Tolls como receptores essenciais no reconhecimento da imunidade inata em *Drosófila*, uma extensa pesquisa através da base de dados do Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (“National Center for Biotechnology Information – NCBI) levou à descoberta de um homólogo de Toll em humanos (MEDZHITOV *et al.*, 1997a). Este homólogo humano de Toll, atualmente conhecido como TLR4 foi demonstrado estar envolvido na expressão gênica de citocinas inflamatórias e moléculas co-estimulatórias (MEDZHITOV *et al.*, 1997a). Subseqüentes estudos identificaram várias proteínas que estavam estruturalmente relacionadas ao TLR4 (LIEN *et al.*, 2002). Atualmente, a família dos TLRs consiste de pelo menos 10 membros (TLR1-10) (figura 1). No entanto, evidências tem sugerido que mais membros desta família poderão ser descritos em breve (TAKEDA *et al.*, 2003).

Figura 1: Receptores Toll de Drosófila e os receptores toll-símile em humanos



Legenda: Receptores Toll de Drosófilas e os receptores Toll-símile em humanos são proteínas transmembranaras com várias semelhanças nos domínios intra e extracelulares

3.1.2 - Reconhecimento de antígenos através do sistema imune inato

Durante muitos anos o sistema imune inato foi considerado como um rudimento evolucionário cuja única função era conter a infecção até que o “verdadeiro” sistema imune, o adquirido, pudesse ser induzido. No entanto, evidências recentes sugerem que o sistema imune inato é também essencial para a ativação do sistema imune adquirido e esta indução conduz a uma resposta específica, dependendo do tipo de receptor que identificou determinado padrão molecular associado a patógeno (PAMP)(MEDZHITOV & JANEWAY, 1997a).

O reconhecimento de antígenos pelo sistema imune inato é mediado por um diversificado grupo de receptores que pertencem a diferentes famílias de proteínas. Alguns destes receptores (PRRs) reconhecem patógenos diretamente (ex: CD14, DEC205, colectinas), enquanto outros (ex: receptores do complemento e TLRs) reconhecem os produtos gerados pelos antígenos através dos PAMP. Quando ocorre o reconhecimento dos PAMP direta ou indiretamente, esta interação resultará em liberação de um “sinal de alerta” para a presença de determinado patógeno,

resultando na estimulação e migração de receptores específicos para aquele determinado ligante (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997b).

O reconhecimento dos PAMPs não somente permite que a resposta imune inata discrimine entre substâncias próprias do indivíduo (“self”) e substâncias estranhas (“non-self”), mas também entre inócuo próprio e não-próprio associado ao patógeno. Por exemplo, uma resposta imune a um antígeno inócuo “non-self” poderia ser deletéria para os organismos hospedeiros, principalmente se o antígeno fosse persistente no ambiente. Do mesmo modo, antígenos artificiais “non-self” não são reconhecidos pelo sistema imune e são normalmente não imunogênicos a menos que eles sejam designados para simular atividade dos PAMPs. Sendo assim, os organismos hospedeiros apresentam um arsenal de receptores que podem reconhecer padrões específicos em diferentes patógenos e referenciar-se a eles, como PRRs (MEDZHITOV *et al.*, 1997).

3.1.3 - Função dos TLRs

A função dos TLRs está fundamentada na identificação de estruturas moleculares que são essenciais para a sobrevivência dos microorganismos, que são compartilhadas por um grande grupo de patógenos e que não estão sujeitas à variabilidade como por exemplo, mutações que poderiam afetar estes componentes mas que, no entanto, seriam letais para os micróbios.

A estrutura geral dos lipopolissacarídeos (LPS) é compartilhada por todas as bactérias gram-negativas, portanto, um receptor capaz de reconhecer uma estrutura conservada como o lipídio A do LPS estaria hábil a detectar a presença de qualquer bactéria gram-negativa. Este exemplo ilustra uma característica importante da imunidade inata, na qual os alvos de reconhecimento representam padrões moleculares, ao invés de estruturas particulares (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997b). Na verdade, todos os produtos microbianos conhecidos que possuem atividade imunoestimulatória representam estruturas invariáveis compartilhadas por grandes grupos de microorganismos e estes são absolutamente essenciais para a sobrevivência dos micróbios: o ácido teicóico e o LPS são respectivamente componentes comuns de bactérias gram-positivas e gram-negativas, o RNA de dupla hélice é uma “assinatura” estrutural de vários vírus RNA, e os mananos são componentes conservados de parede celular das leveduras. Nenhum destes componentes são

produzidos pelo organismo, e todos eles são essenciais para a fisiologia e sobrevivência dos respectivos microorganismos (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997b).

3.1.4 - Reconhecimento dos PAMP pelos TLRs

A porção citoplasmática dos TLRs mostra uma alta similaridade com aquela dos receptores da família da interleucina-1 (IL-1) e por isso seu domínio citoplasmático é chamado de Toll/IL-1R (TIR). Apesar desta similaridade, a porção extracelular de ambos receptores é estruturalmente diferente.

Cada TLR está relacionado a identificação de estruturas específicas na membrana celular de diferente patógenos (quadro 1). Os TLRs podem ser encontrados em vários diferentes tipos de células do organismo apresentando diferentes expressões gênicas (figura 2) (MUZIO *et al.*, 2000; HORNUNG *et al.*, 2002), bem como em diferentes tecidos (ABREU *et al.*, 2001; ZAREMBER & GODOWSKI, 2002).

Quando os TLRs reconhecem um patógeno ocorre o desencadeamento de uma via ou cascata de sinalização resultando na ativação de vários genes que participam deste processo (figura 3). Este sinal chegará ao núcleo celular, resultando na ativação de citocinas e também do sistema imune adquirido através da estimulação dos linfócitos T. Esta via é homóloga àquela do receptor da IL-1 devido a semelhança entre seus domínios intracelulares (figura 4). Então, após a identificação do patógeno na superfície celular, a porção citoplasmática dos TLRs (TIR) interage com uma proteína adaptadora chamada MyD88, que quando estimulada recruta o receptor da IL-1 associado a quinase (IRAK). IRAK é ativado por fosforilação recrutando o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF 6) que resulta na ativação de dois caminhos distintos de sinalização: o primeiro envolve uma quinase c-Jun NH₂-terminal (JNK) e a proteína quinase p38 associada ao mitógeno (MAPK) e o segundo envolve a família Rel do fator de transcrição κ -B (NF κ -B) (AKIRA *et al.*, 2001).

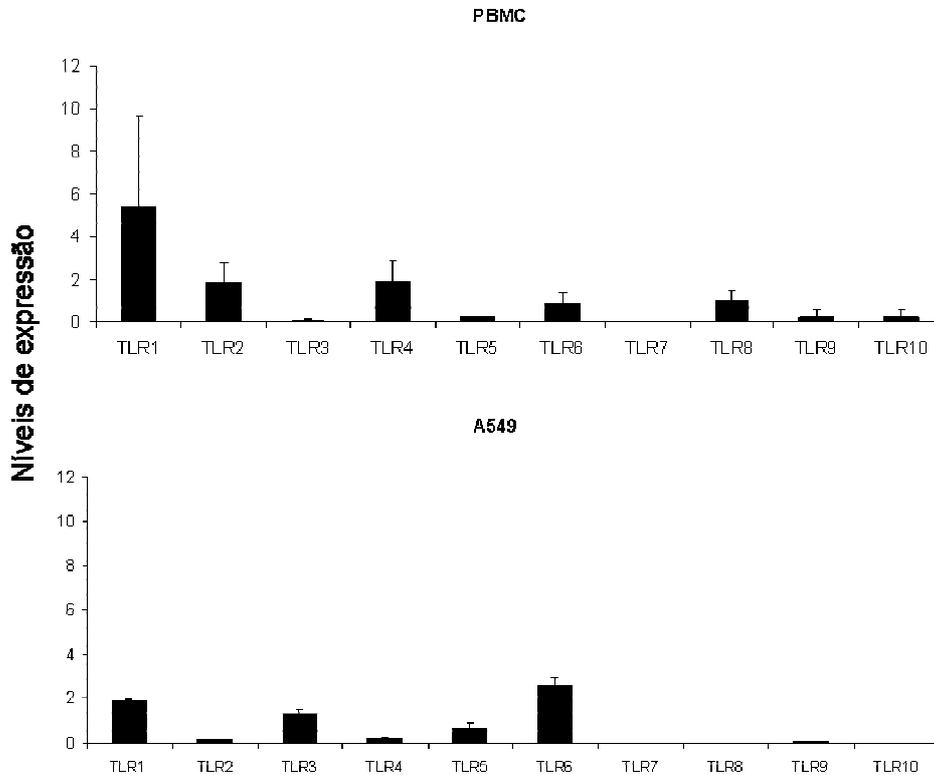
A proteína adaptadora MyD88 é essencial para a produção de citocinas inflamatórias em resposta a componentes microbianos. Entretanto, quando esta é bloqueada, ainda ocorre a resposta inflamatória através de uma via alternativa, que é mais lenta quando comparada com a via normal. Evidências sugerem que esta via é ativada através de uma molécula adaptadora chamada: domínio TIR que contém

uma proteína adaptadora (TIRAP) juntamente com o adaptador MyD88-símile (Mal) – (TIRAP/Mal) (TAKEDA *et al.*, 2003).

Quadro 1: Receptores Toll-símile e seus principais ligantes.

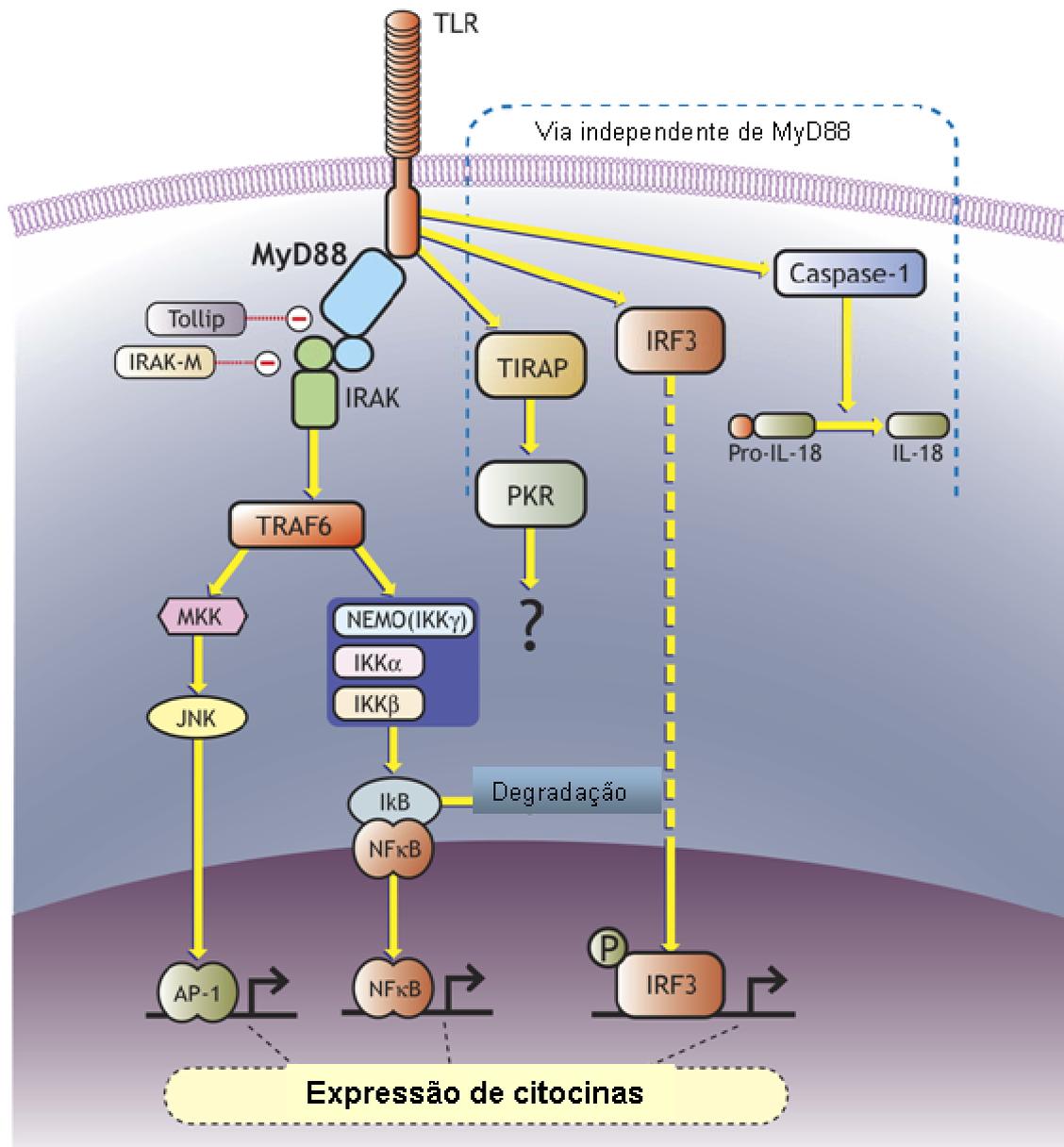
Receptores	Patógeno/PAMP
TLR1 (com TLR2)	Produtos bacterianos com LPS
TLR2	Bactérias gram-positivas Peptidoglicano Ácido lipoteicóico Zimosan Micobactérias Parede celular do BCG Lipoarabinomanan Fator solúvel de tuberculose Outros glicolipídeos bacterianos Espiroquetas Glicoproteínas da <i>Prevotella intermedia</i> Âncoras GPI de <i>Trypanosoma cruzi</i> LPS de <i>Leptospira interrogans</i> Modulina (solúvel em fenol) <i>Neisseria meningitidis</i> deficiente em LPS Proteína de choque térmico 60 (HSP60) Células necróticas
TLR3	Poli(I:C) RNA de dupla hélice (vírus)
TLR4	Bactérias gram-negativas Lipídio A do LPS Análogo acíclico sintético do lipídio A <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Parede celular do BCG Outros glicolipídeos bacterianos Taxol Proteína F do vírus sincicial respiratório <i>Cryptococcus neoformans</i> Hifa de <i>Aspergillus fumigatus</i> HSP60 e HSP70 Fibronectina A Ácidos graxos saturados
TLR5	Flagelina de bactérias flageladas
TLR6 (com TLR2)	Peptidoglicano de bactérias gram-positivas Modulina (solúvel em fenol) Fator solúvel de tuberculose (Pam3 Cys)
TLR9	DNA Bacteriano, CpG DNA

Figura 2: Expressão gênica dos receptores Toll-símile em dois diferentes tipos de células.



Legenda: Valores relativos da expressão dos TLRs em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e em cultura de células epiteliais alveolares (A549) utilizando PCR em tempo real. Os valores relativos foram normalizados com HMBS (hidroxi metilbilane sintase) (Andrade *et al*, dados não publicados).

Figura 3: Transdução de sinal pelos receptores toll-símile



Legenda: Representação esquemática da transdução do sinal desde o reconhecimento de determinado PAMP pelos TLRs até a translocação do fator kappa B para o núcleo celular, o qual estimula a produção de citocinas. (Para maiores detalhes, ver texto sobre o reconhecimento dos PAMP pelos TLRs).

A seguir estão descritos os dez TLRs com suas respectivas funções:

3.1.5 - TLR1, TLR2, TLR6

O TLR2 reconhece componentes de uma grande variedade de microorganismos. Estes incluem lipoproteínas de patógenos, tais como bactérias gram-negativas, *Mycoplasma*, Espiroquetas e *Shigella* (ALIPRANTIS *et al.*, 2001; NISHIGUCHI *et al.*, 2001; KIRSCHNING *et al.*, 2002), peptidoglicano e ácido lipoteicóico de bactérias gram-positivas (ECHCHANNAOUI *et al.*, 2002; KIRSCHNING & SCHUMANN, 2002), lipoarabinoman encontrado em micobactérias (MEANS *et al.*, 2001), glicosonil fosfolipídios de *Trypanosoma Cruzi* (CAMPOS *et al.*, 2001), modulina solúvel em fenol de *Staphylococcus epidermidis* (HAJJAR *et al.*, 2001), zimosan de fungos (UNDERHILL, 2003), glicolipídios de *Treponema maltophilum* (OPITZ *et al.*, 2001) e porinas que constituem a membrana externa de *Neisseria* (MASSARI *et al.*, 2002).

Assim como o TLR4, o TLR2 também reconhece LPS, no entanto este último reconhece LPS atípicos, os quais não são identificados por TLR4 (HIRSCHFELD *et al.*, 2001; NETEA *et al.*, 2002). Embora, para que ocorra o reconhecimento de determinados PAMP, o TLR2 necessita interagir com outros dois TLRs: TLR1 e TLR6, os quais têm estruturas e seqüências genéticas muito semelhantes além de domínios TIR com 90% de similaridade com o TLR2 (TAKEUCHI *et al.*, 1999). Por exemplo, ocorre associação entre TLR2 e TLR6 na detecção de padrões específicos de peptidoglicano ou modulinas secretadas por *Staphylococcus aureus* (OZINSKY *et al.*, 2000; HAJJAR *et al.*, 2001) bem como cooperação entre TLR1 e TLR2 quando em resposta a componentes da *Neisseria meningitidis* (WYLLIE *et al.*, 2000).

3.1.6 - TLR4

O TLR4 é essencial para o reconhecimento de lipopolissacarídeo (figura 5). O LPS é o principal componente da membrana externa das bactérias gram-negativas. Ele é um composto glicolipídico formado por um polissacarídeo hidrofílico e um domínio hidrofóbico, conhecido como lipídio A, o qual é responsável pela atividade biológica do LPS. Um complexo formado por LPS e uma proteína sérica chamada proteína de ligação do LPS (LBP) inicia a ativação de sinais através de uma proteína

de superfície chamada CD14 em monócitos e células mielóides. No entanto, o CD14 não possui domínio intracelular havendo a necessidade de uma proteína transmembrana para transmitir os sinais através do citoplasma até o núcleo onde ocorre a estimulação da produção de citocinas. Esta proteína transmembrana é o TLR4 que juntamente com outra proteína que se liga com a porção extracelular do TLR4, chamada MD-2, aumenta a resposta celular ao LPS (SHIMAZU *et al.*, 1999) (figura 4). Uma outra proteína de superfície que é expressada em linfócitos B conhecida como RP105 e que foi descrita por Miyake *et al.* em 1995 (MIYAKE *et al.*, 1995) apresenta estrutura semelhante aos TLRs na porção extracelular e funcionalmente se associa a TLR4 no reconhecimento de LPS (OGATA *et al.*, 2000).

Além do LPS, TLR4 também pode identificar uma grande variedade de estruturas moleculares, tais como taxol, o qual é uma droga utilizada como quimioterápico no tratamento de pacientes com câncer (KAWASAKI *et al.*, 2001). A associação do TLR4 e CD14 está relacionada com a identificação da proteína F do vírus sincicial respiratório (KURT-JONES *et al.*, 2000; HAYNES *et al.*, 2001).

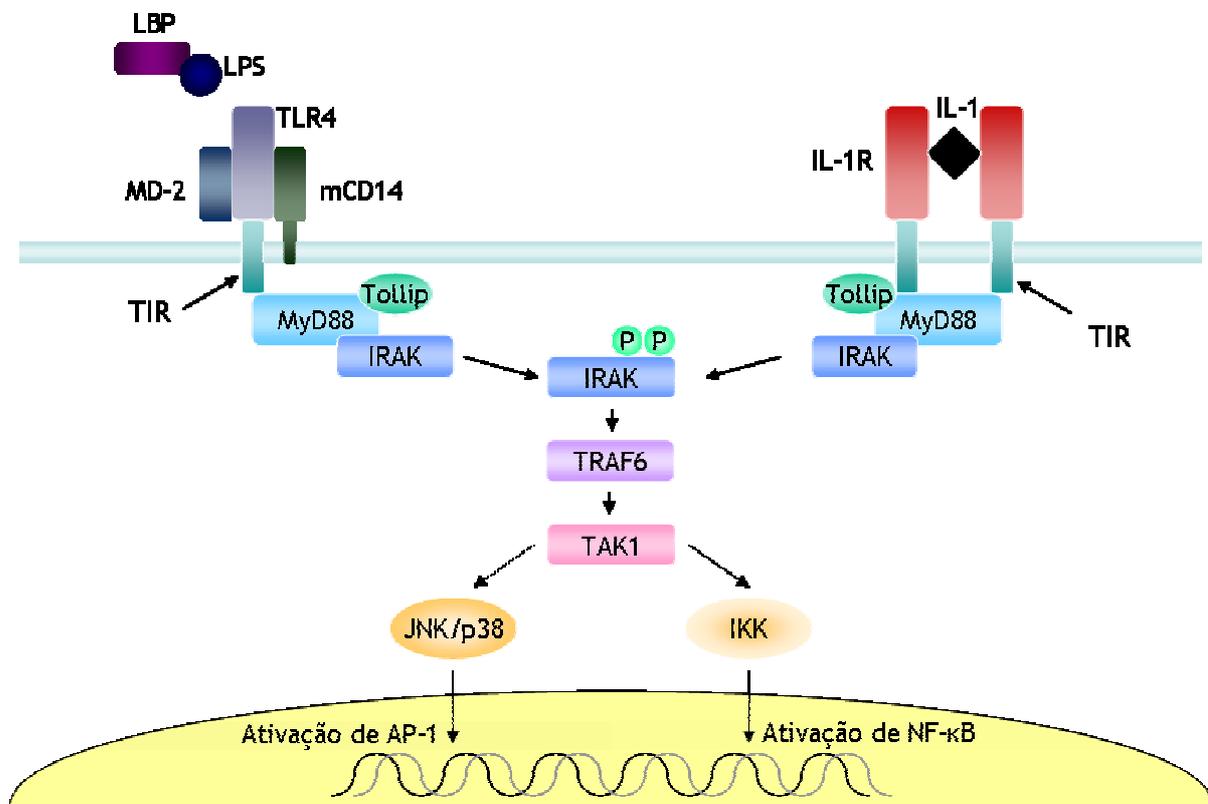
Evidências recentes têm sugerido que TLR4 também é capaz de identificar moléculas endógenas. Um exemplo são as proteínas “heat shock” (OHASHI *et al.*, 2000), as quais são altamente conservadas entre os organismos desde bactérias a mamíferos. Uma grande variedade de estímulos, tais como aquecimento, radiação ultravioleta, infecção viral e bacteriana induzem o aumento da síntese das proteínas “heat shock”. Estas proteínas, são liberadas por células necróticas em determinadas condições patológicas e induzem a produção de células dendríticas (BASU *et al.*, 2000). Isto sugere que o sistema imune não somente identifica “self” de “non-self”, mas também responde a antígenos associados a “sinais de perigo” liberados por células necróticas ou submetidas a estresse (MATZINGER, 1998) .

Outros ligantes endógenos que também são reconhecidos por TLR4 são componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina (OKAMURA *et al.*, 2001), ácido hialurônico (TERMEER *et al.*, 2002) e sulfato de heparan (JOHNSON *et al.*, 2002) os quais são produzidos em resposta a lesão tecidual e têm uma importante função no remodelamento dos tecidos, através da contenção do agente causador da lesão, bem como no processo de fechamento e cicatrização das diferentes lesões.

Ainda é controverso se o TLR4 é capaz de identificar ligantes diretamente ou não, alguns grupos têm proposto que o reconhecimento de LPS por TLR4 envolve contato direto enquanto outros têm sugerido que LPS liga-se a uma proteína

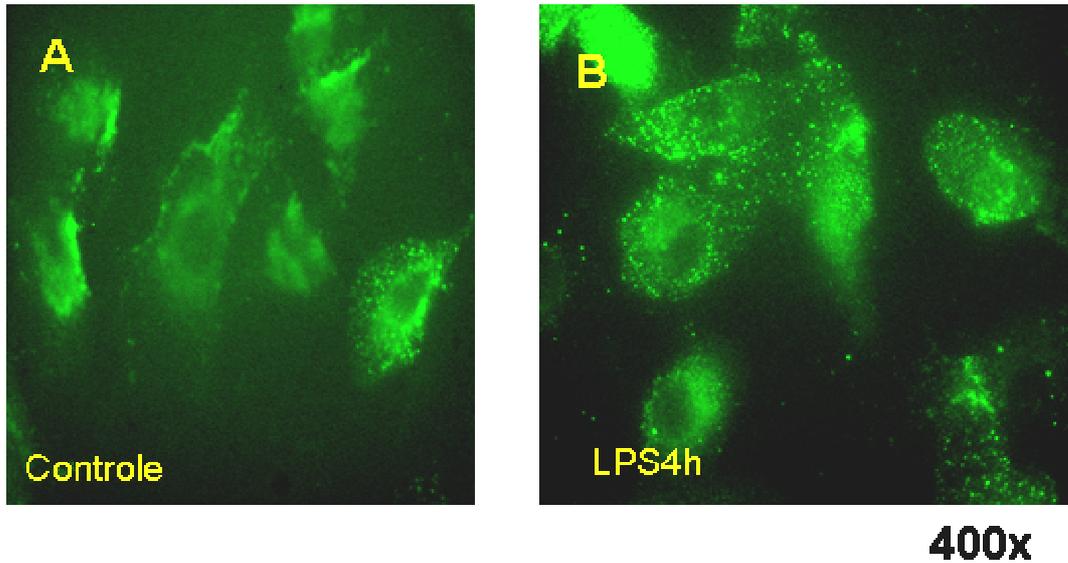
chamada MD-2 e este complexo de alguma maneira estimula TLR4 em estudos *in vitro* (SHIMAZU *et al.*, 1999). Recentemente, também vem sendo estudada uma via independente de reconhecimento de LPS sem a necessidade de TLR4. Esta via alternativa para o reconhecimento do LPS envolve a presença de HSP70, HSP90, receptor 4 de quimocina (CXCR4) e fator de diferenciação 5 (GDF5) (TRIANATAFILOU *et al.*, 2002)

Figura 4: Representação esquemática do complexo formado para a identificação de LPS e sua semelhança com a IL-1R



Legenda: Complexo formado com MD-2, LBP, CD14 e TLR4 para o reconhecimento do LPS cujo sinal é transmitido pelo domínio intracelular TIR, o qual é muito semelhante ao domínio intracelular do receptor para interleucina 1 (canto superior direito)

Figura 5: Estimulação da produção de TLR4 após adição de LPS



Legenda: imunofluorescência demonstrando células alveolares epiteliais humanas (A549) que receberam 1 μ g de LPS. **(A)** células sem tratamento, com presença de TLR4 na sua superfície (pontos brilhantes). **(B)** Células tratadas com LPS por 4h apresentaram um aumento da produção de TLR4 na sua superfície.(Andrade *et al*, dados não publicados).

3.1.7 - TLR3

O TLR3 reconhece RNA dupla-hélice (dsRNA) o qual é produto da replicação viral em células infectadas, e induz a produção de interferons tipo I (IFN- α e - β). DsRNAs exercem vários efeitos fisiológicos incluindo atividades antivirais e imuno estimulatórias, além de induzirem a transcrição de alguns genes estimulados por IFN, promovendo a maturação de células dendríticas. Quando ocorre destruição celular por vírus, o dsRNA é identificado por TLR3 expresso na superfície celular de diferentes tipos de células. No entanto, para o estudo da função do TLR3 tem sido utilizado um dsRNA sintético chamado ácido polinosinico-policitidinico [poli(I:C)], que possui atividade muito semelhante daquela do dsRNA viral (ALEXOPOULOU *et al.*, 2001).

3.1.8 - TLR5

Este TLR é responsável pela identificação da flagelina a qual é a principal proteína componente do flagelo (HAYASHI *et al.*, 2001). O flagelo é uma longa estrutura filamentosa que se estende para fora da célula e funciona como propulsor sendo encontrado tanto em bactérias Gram-negativas como positivas.

3.1.9 - TLR7, TLR8, TLR9 e TLR10

O TLR9 é responsável pelo reconhecimento de dinucleotídeos CG não metilados de DNA bacterianos (CpG DNA). O DNA bacteriano é bem conhecido como estimulador de resposta imune e esta atividade imunoestimulatória é atribuída à presença de CpG não metilados, os quais não estão presentes no DNA de vertebrados. Estes CpG são reconhecidos pelo TLR9 na superfície celular estimulando a maturação de células dendríticas, a produção de macrófagos e células NK bem como um aumento na expressão gênica do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II, CD40, CD80, CD86, os quais são marcadores de superfície de células dendríticas maduras (ASHKAR *et al.*, 2002). O uso de oligodesoxinucleotídeos sintéticos (ODNs) que contêm CpG não metilados, em modelos animais mostrou que estes componentes também ativam células imunes e estimulam potentes respostas por parte do sistema imune Th1, o qual protege o organismo contra uma variedade de doenças de natureza imunológica. Por isso, o CpG DNA pode ser clinicamente útil como um adjuvante em uma grande variedade de vacinas contra doenças infecciosas, câncer e doenças alérgicas (WAGNER, 2002)

Os TLR7 e TLR8 são altamente homólogos ao TLR9 (CHUANG *et al.*, 2000). Embora os ligantes naturais para TLR7 e TLR8 permaneçam ainda não identificados, recentes evidências sugerem que estes TLRs podem estar relacionados ao reconhecimento de estruturas semelhantes aos ácidos nucleicos em microorganismos (HEMMI *et al.*, 2002) ou mesmo partículas virais (MIETTINEN *et al.*, 2001).

O TLR10 é encontrado principalmente em células de tecidos linfóides e tecido pulmonar, no entanto até o momento nenhum ligante específico para este TLR foi encontrado (CHUANG *et al.*, 2001).

3.2 - IMUNIDADE INATA E TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra microorganismos potencialmente patogênicos. Este sistema filogeneticamente preservado entre diferentes espécies consegue discriminar “self” e “non-self”, ou seja consegue discernir e identificar estruturas estranhas ao organismo e atacá-las imediatamente após o contato. Recentes evidências sugerem que este sistema é essencial para a geração de uma resposta adquirida efetiva (FOX-MARSH & HARRISON, 2002). Isto porque os receptores de células T e B estão arranjados ao acaso, não sendo capazes de discriminar se um determinado antígeno está associado a um patógeno potencialmente danoso ao organismo. Então, quando ocorre o primeiro contato com um antígeno desconhecido, estas células ficam dependentes dos sinais providos pelo sistema inato, que irá fornecer a informação necessária para uma resposta efetiva, além de poderem discernir entre diferentes patógenos já que estes podem desencadear respostas distintas.

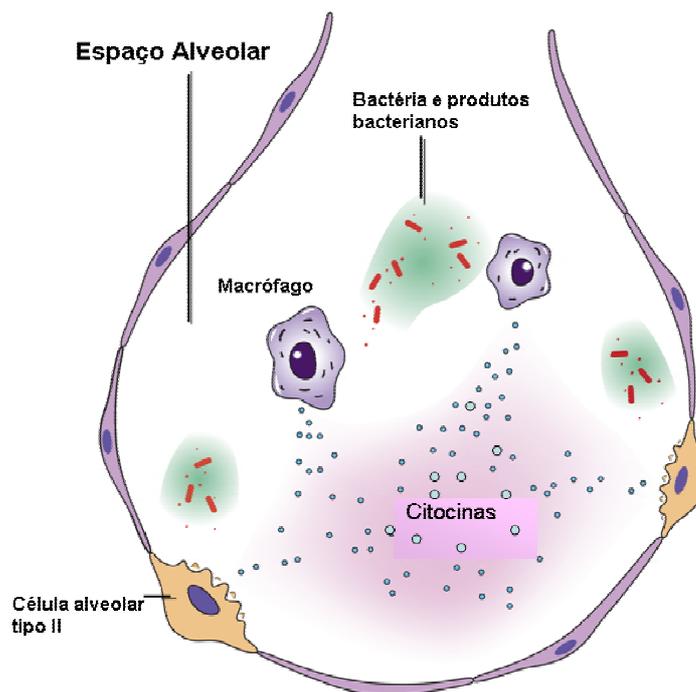
3.2.1 - Componentes do sistema imune inato

Os mais especializados componentes celulares da resposta inata incluem: macrófagos, neutrófilos, células NK, células dendríticas, mastócitos e basófilos (ABRAHAM *et al.*, 1998; FOX-MARSH & HARRISON, 2002). As células epiteliais por serem geralmente as primeiras a entrar em contato com patógenos, também possuem uma importante função na resposta imune inata. Como por exemplo as células alveolares epiteliais que quando em contato com microorganismos desencadeiam uma série de eventos culminando com a apresentação de antígenos por macrófagos e neutrófilos alveolares resultando na produção de citocinas (figura 6) Outros componentes celulares que fazem parte da sistema imune inato, são os chamados componentes solúveis, que incluem moléculas do sistema de complemento, proteína C reativa (DU CLOS, 2000), lecitinas, colectinas, defensinas, lisozimas, fosfolipase A2, serprocidinas e lactoferrinas ligadas ao ferro que são importantes no reconhecimento de patógenos (KAISER *et al.*, 2000; GADJEVA *et al.*, 2001; TRAVIS *et al.*, 2001).

Os antígenos ou ligantes encontrados na parede celular dos diferentes microorganismos são chamados de padrões moleculares associados a patógenos, e

são reconhecidos por receptores específicos, entre os quais estão incluídos os TLRs (TAKEDA *et al.*, 2003,) os receptores "scavenger" (ScvR)(GORDON, 1998), os receptores de manose de macrófagos (FRASER *et al.*, 1998) e receptores de β -glycan, (STAHL, 1992). Estes distintos padrões moleculares apresentados pelos patógenos são freqüentemente constituídos por lipídios e carboidratos, presumivelmente porque eles são os maiores componentes das membranas celulares dos microorganismos. Os mais bem conhecidos PAMP incluem, lipopolissacarídeo, ácido teicóico, RNA de dupla hélice e dinucleotídeos CpG não metilados que são comuns em DNA bacteriano (AKIRA *et al.*, 2001).

Figura 6: Resposta inflamatória de células alveolares epiteliais tipo II, na presença de patógenos

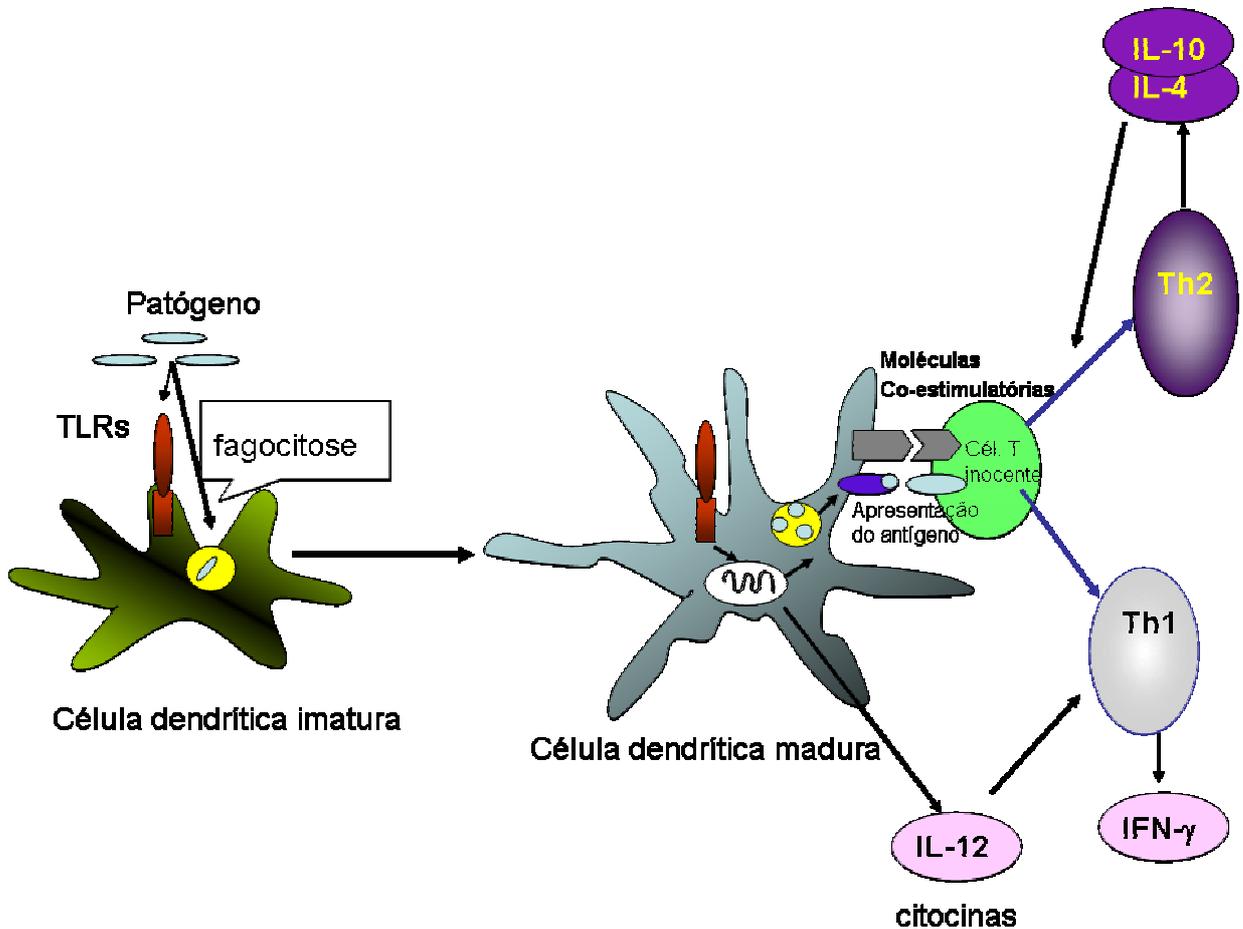


Legenda: Quando ocorre a presença de patógenos no interior dos alvéolos, células alveolares tipo II auxiliam os macrófagos alveolares no combate aos microorganismos patogênicos (ver texto)

3.2.2 - Modo de ação do sistema imune inato

Um modo bem estabelecido de como a imunidade inata desencadeia ou auxilia na resposta adquirida é através da produção de citocinas. Quando células apresentadoras de antígenos (ex: células dendríticas e macrófagos) entram em contato com bactérias, ocorre a produção de IL-12, IL-23 e IL-27. Estas citocinas, principalmente IL-12, são importantes na diferenciação de células T virgens (“naive”) em linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) e também na estimulação da produção de interferon gama (IFN- γ) por linfócitos T CD4 (DABBAGH *et al.*, 2003). Durante este processo de apresentação do antígeno, aquela célula T virgem que se diferenciou em célula Th1 também pode se diferenciar em célula Th2 a qual esta relacionada à produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e que também é responsável pela resposta imunidade humoral (AKIRA *et al.*, 2001). Recentes evidências sugerem que os TLRs estão relacionados com a ativação de células Th1, enquanto as células Th2 parecem ser estimuladas por outros mecanismos ainda desconhecidos. Estas observações surgiram através do uso de camundongos com a ausência da proteína adaptadora MyD88, onde a produção de células Th1 pôde ser diminuída assim como a produção de IFN- γ . A produção de IL-4 e outras citocinas anti-inflamatórias não sofreram alteração, sugerindo que a ativação das células Th2 (figura 7) poderia ser independente da ativação dos TLRs (SCHNARE *et al.*, 2001).

Figura 7: Regulação do desenvolvimento de células T auxiliares por TLRs em células apresentadoras de antígenos.



Legenda: Através do reconhecimento de patógenos pelos TLRs as células dendríticas imaturas sofrem maturação e induzem a produção de citocinas como IL-12 e IL-18. Estas citocinas funcionam com “instrutores” e direcionam as células T virgens (“naive”) a diferenciarem-se em células Th1. Os patógenos também podem ser capturados por outras maneiras como fagocitose ou endocitose, sendo estes processados e apresentados a células T como antígenos ligados ao complexo de histocompatibilidade principal.

Para a expansão de clones de células T antígenos-específicos, a apresentação do antígeno necessita de um concomitante aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras na superfície das células APC. Este aumento da expressão também pode ser desencadeado pelos TLRs que irão induzir a produção de células Th1. Permanece ainda sem explicação se os TLRs das APC estão envolvidos na resposta imune das células Th2.

3.2.3 - O papel das células T na rejeição em transplante de órgãos

A rejeição de enxertos alogênicos em órgãos e tecidos ocorre porque o genoma dos mamíferos contém vários locos polimórficos que codificam uma grande variedade de antígenos (KRENSKY *et al.*, 1990). Pessoas que não expressam um determinado alelo de qualquer um destes locos irão reconhecer a proteína codificada por aquele alelo como “estranho” e irão iniciar uma vigorosa resposta imune que resultará em rejeição do enxerto. Os mais importantes genes estão agrupados dentro do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), que em humanos é conhecido como o complexo HLA. As moléculas do MHC são expressas na superfície das células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos e células dendríticas. Sua função é ligar-se a fragmentos de peptídeos derivados de microorganismos invasores e apresentá-los às células T, que os reconhecem através de seus receptores de antígenos. Este primeiro passo do reconhecimento inicia a resposta imune mediada por células T.

Órgãos transplantados expressam as moléculas do MHC do doador, resultando em dois caminhos para o reconhecimento dos antígenos (SAYEGH *et al.*, 1994). No caminho direto, as células T dos receptores reconhecem as moléculas do MHC alogênico (MHC estranho) expressas nas células dos doadores. Um vez que as células T normalmente reconhecem peptídeos estranhos ligando-se às moléculas do MHC de seu próprio corpo (MHC próprio), é sugerido que isto ocorra através do caminho direto, quando as células T reconhecem moléculas intactas de MHC alogênicos, por causa de seu mimetismo – isto é, MHC alogênicos assemelham-se ao MHC próprio mais o peptídeo estranho (LECHLER *et al.*, 1990). Na via indireta, os peptídeos derivados do catabolismo das moléculas do MHC do doador são apresentados pelo MHC próprio nas células apresentadoras de antígenos dos receptores, de uma maneira semelhante ao processo normal de apresentação de antígeno bacteriano ou viral. O caminho direto pode ser responsável pelo vigor da resposta imune na rejeição aguda, enquanto que o caminho indireto pode apresentar papel dominante na rejeição crônica (CIUBOTARIU *et al.*, 1998).

Células T expressam glicoproteínas CD4 ou CD8 em sua superfície (KRENSKY *et al.*, 1990). Células CD4, são chamadas células T auxiliar e são as mais importantes para o início da rejeição do enxerto (KRIEGER *et al.*, 1996). Elas são responsáveis pela produção da maioria das citocinas que são necessárias para

estimular o sistema imune (KRENSKY *et al.*, 1990). Estas citocinas atuam de uma maneira autócrina sobre as células CD4 e de maneira parácrina sobre as outras células, tais como CD8 (a maioria dos quais são linfócitos T citotóxicos), macrófagos e células B. Embora células CD8 possam produzir pequena quantidade de citocinas, sua principal contribuição para a rejeição do enxerto é através da lise direta das células dos doadores. Ambos, macrófagos e células CD4 contribuem para a rejeição do enxerto através da resposta tipo hipersensibilidade tardia, a qual envolve a produção de mediadores solúveis tais como o fator de necrose tumoral e espécies reativas de oxigênio. Esta resposta é suficiente para causar perda do enxerto ainda na ausência de CD8 (KRIEGER *et al.*, 1996). Embora células B não participem diretamente da rejeição aguda quando o receptor não foi previamente exposto aos aloantígenos em questão, anticorpos produzidos depois da sensibilização (ex: transfusão sanguínea ou transplante prévio) são causas de rejeição hiper-aguda ou rejeição acelerada. Reações de hipersensibilidade do tipo tardia e aloanticorpos podem atuar no processo de rejeição crônica.

3.2.4 - O papel das células T na resposta imune.

Inicialmente as células T virgens devem determinar se o antígeno está presente e se ele apresenta alguma ameaça para o organismo. Esta informação é fornecida pelas células dendríticas localizadas em órgãos linfóides secundários, que captam e aprisionam os antígenos produzidos em algum lugar no organismo. Então, estas células T migram para estes tecidos linfóides, em um processo conhecido como “homing” (BUTCHER & PICKER, 1996). O encontro com um antígeno induz a produção de clones de células T, produzindo aproximadamente 1000 vezes mais descendentes com atividade antigênica idêntica (figura 7). Por fim estes linfócitos ativados adquirem suas funções e partem para os locais da inflamação onde eles interagem com células parenquimatosas e entram em contato com antígenos e também com leucócitos, tais como eosinófilos, mastócitos e basófilos (em reações alérgicas induzidas por células T tipo 2) ou macrófagos e neutrófilos (em reações inflamatórias mediadas por células T tipo 1). Outras células efetoras orquestram a resposta humoral através das células B nos órgãos linfóides. A maioria das células efetoras morre após o antígeno ser destruído, no entanto algumas poucas células que sobreviveram ao entrarem em contato com o antígeno desenvolvem memória

imunológica permanecendo por longo tempo como fator de proteção. Diferentes grupos de células de memória permanecem em estado de alerta em órgãos linfóides e “patrulham” tecidos periféricos a fim de fornecer uma rápida resposta sempre que o antígeno retornar (SALLUSTO *et al.*, 1999).

Para os linfócitos T chegarem aos tecidos eles devem aderir ao endotélio dos capilares, no entanto o fluxo sanguíneo é muito forte sendo necessário o auxílio de moléculas de adesão, que formam ligações estáveis com seus receptores nas paredes vasculares.

3.2.5 - Migração das células dendríticas

O retorno para “casa” em qualquer órgão linfóide permanece “virgem” ao menos que linfócitos encontrem o antígeno em determinadas situações. As células dendríticas são imprescindíveis neste aspecto. Subgrupos de monócitos voltam para os tecidos e se diferenciam nas chamadas células dendríticas imaturas. Ambos os tipos de células expressam receptores para quimocinas inflamatórias e outros quimioatratantes que são liberados durante as infecções.

Células dendríticas imaturas “patrulham” os tecidos e engolfam microorganismos, células mortas e restos celulares. Quando expostas a estímulos inflamatórios, elas trafegam para os linfonodos locais através dos vasos linfáticos aferentes, são submetidas a maturação, perdem seus receptores para quimocinas inflamatórias e aumentam a regulação da expressão dos receptores para quimocinas linfocitárias. Estas alterações permitem que as células dendríticas maduras encontrem o seu caminho para a área de células T nos linfonodos. Enquanto em trânsito, as células dendríticas também preparam todo o aparato para a apresentação do antígeno, ao mesmo tempo em que, ocorre a produção de quimocinas que atraem as células T, que estarão esperando a chegada das células dendríticas nos linfonodos (VON ANDRIAN *et al.*, 2000).

3.2.6 - Xenotransplante e imunidade inata

Um grande estímulo para a ativação de vários componentes do sistema imune inato em células xenogênicas quando comparado com células alogênicas está provavelmente relacionado ao nível aumentado da disparidade de carboidratos e

lipídios entre as células de diferentes espécies. Por exemplo, a principal diferença celular entre carboidratos em humanos e outras espécies é a presença da alfa galactose (Gal) 1-3 Gal beta 1-4 GlcNAc-R (α -Gal) na superfície celular. A presença deste carboidrato tem sido identificada como a base para a rejeição hiper-aguda de xenoenxertos de células de porcos em humanos ou órgãos de macacos em humanos (GALILI, 2001). Isto porque ocorre a produção de anticorpos mesmo antes do transplante (SATAKE *et al.*, 1994) sendo estes anticorpos largamente direcionados contra a α -Gal. Este carboidrato está relacionado a antígenos dos grupos sanguíneos A e B e constitui aproximadamente 1% da imunoglobulina G (IgG) circulante no sangue humano (GALILI *et al.*, 1995; GALILI, 2001). A fonte antigênica para a produção constante de anticorpos específicos contra α -Gal parece ser a presença de epítomos (antígenos protéicos) da alfa-galactosil símile encontrado em muitas bactérias da flora gastrointestinal (GALILI, 2001).

Em modelo de xenotransplante utilizando células de porco injetadas intraperitonealmente em camundongos, foi observado uma estimulação de PRRs, com aumento da expressão de vários genes, incluindo TLRs, proteína ligante de lipídio A, CD14, galectinas, receptor para o inibidor “killer” (KIR), p91, receptores para macrófagos “scavenger” e macrófagos lecitina tipo-C (FOX-MARSH & HARRISON, 2002). Este modelo foi utilizado porque células xenogênicas atuam como um grande estímulo para a produção de resposta imune, sugerindo que a rejeição a xenoenxertos depende de interações bidirecionais entre imunidade inata e adquirida. Esta resposta é dependente de macrófagos e neutrófilos que estimulam a produção de células T e, no caso de ausência destas células apresentadoras de antígenos, a produção de linfócitos T será interrompida. Este trabalho sugere que a resposta inata por parte dos macrófagos e neutrófilos aumenta consideravelmente a infiltração de células T e por isso ocorre a rejeição a xenoenxertos.

3.2.7 - Imunidade em isquemia e reperfusão de órgãos

O dano em vários órgãos, principalmente pulmão e fígado, causado por isquemia e reperfusão, representa um processo contínuo que culmina em lesão e conseqüentemente comprometimento da função do órgão, resultando na perda do enxerto. Este processo é desencadeado quando órgãos são transitoriamente

privados de oxigênio e posteriormente re-oxigenados podendo ocorrer em um grande número de quadros clínicos, como aqueles associados com estados de baixa perfusão (fluxo), diversos procedimentos cirúrgicos, ou durante a obtenção de órgãos para transplante (ANDRADE, 2001; FONDEVILA *et al.*, 2003).

Em transplante hepático a lesão por isquemia e reperfusão é responsável por mais de 10% de falência precoce do enxerto (HOWARD *et al.*, 1990), enquanto em transplante pulmonar esta síndrome representa cerca de 10 a 15% das mortes precoces (CHRISTIE *et al.*, 1998; CHRISTIE *et al.*, 2003). Em ambos casos esta síndrome pode resultar no aumento da incidência de rejeição tanto aguda quanto crônica, afetando o prognóstico dos pacientes transplantados (FONDEVILA *et al.*, 2003; PALMER *et al.*, 2003). Entretanto, até o presente momento não existe tratamento para prevenir lesão por isquemia e reperfusão. Extensos esforços em pesquisa têm sido investidos para o melhor entendimento desta síndrome. Embora reperfusão em si, seja bem tolerada após curtos períodos de isquemia fria, esta se torna crítica para a manifestação de injúria que se apresenta durante um profundo e prolongado período de hipotermia, pois pode causar alteração do citoesqueleto e organelas celulares e romper as membranas, resultando em desequilíbrio do gradiente de potencial elétrico, levando a redistribuição de íons (FONDEVILA *et al.*, 2003).

A lesão de I/R no endotélio, afeta o delicado balanço que mantém a homeostase da microcirculação. Os leucócitos PMN exacerbam os distúrbios microcirculatórios e a migração para os tecidos lesados. Uma vez que ocorre o extravasamento e migração, há pouca dúvida sobre as capacidades destrutivas dos leucócitos PMN (FONDEVILA *et al.*, 2003).

Evidências clínicas de transplantes cadavéricos demonstram uma contribuição importante de isquemia e reperfusão para a disfunção precoce do enxerto e rejeição aguda bem como no resultado a longo prazo (LAND, 1994; TAKADA *et al.*, 1997). Em adição, evidências acumuladas em modelos experimentais em animais indicam que a disfunção crônica do enxerto é mediada por mecanismos dependentes bem como independentes de aloantígenos, com a isquemia e reperfusão do enxerto sendo um importante fator independente do antígeno (TAKADA *et al.*, 1997). Os mecanismos de como a isquemia contribui precoce, bem como tardiamente com a disfunção do enxerto permanecem ainda não esclarecidos. Tem sido sugerido que a lesão isquêmica aumenta a imunogenicidade do enxerto (TAKADA *et al.*, 1997),

principalmente por causa do aumento da produção dos antígenos de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Como o MHC classe II sozinho não é suficiente para causar ativação total de células T, o aumento da produção da molécula coestimulatória B7 é essencial na regulação deste aumento da imunogenicidade (TAKADA *et al.*, 1997).

Órgãos isquêmicos são infiltrados por células T CD4, monócitos e macrófagos que secretam citocinas, quimioatratores e fatores de crescimento. Citocinas, tais como o IFN- γ e TNF- α , são potentes indutores de expressão de antígeno classe II do MHC (HALLORAN *et al.*, 1989) enquanto a citocina RANTES (“regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted”) facilita o acúmulo de células T e macrófagos por efeitos quimiotáticos diretos ou por regulação da expressão dos produtos de macrófagos (SCHALL *et al.*, 1990). A citocina IL-6 derivada de macrófagos e a iNOS (óxido nítrico sintetase induzível) estão relacionadas ao desenvolvimento de disfunção crônica do enxerto (RUSSELL *et al.*, 1995a; RUSSELL *et al.*, 1995b), enquanto que o TGF- β (fator de crescimento tumoral beta) é considerado ter um papel na fase tardia de fibrose no rim (SHARMA *et al.*, 1996). Todas estas moléculas observadas na fase inicial do transplante podem ser relevantes ao desenvolvimento tardio da disfunção do enxerto.

Em resumo, a lesão primária não específica (como a lesão por isquemia e reperfusão) ao órgão doado, induz a eventos de dois sistemas imunológicos de defesa distintos: (1) um mais amplo, comandado pela resposta inata, resultando em (2) um definitivo sistema adquirido do hospedeiro que leva a uma lesão específica do enxerto (rejeição). Na verdade, I/R pode criar um ambiente de inflamação que opera como um sinal de perigo em transplante de órgãos e em analogia com a inflamação em infecções induzidas por antígeno, pode iniciar o estado da imunidade inata pela ativação dos TLRs. As alterações no ambiente podem levar a degradação de potenciais agonistas, tais como heparan sulfato, proteoglicano, que podem iniciar a ativação dos TLRs através das células dendríticas.

3.2.8 - Papel dos receptores toll-símile em transplante de órgãos

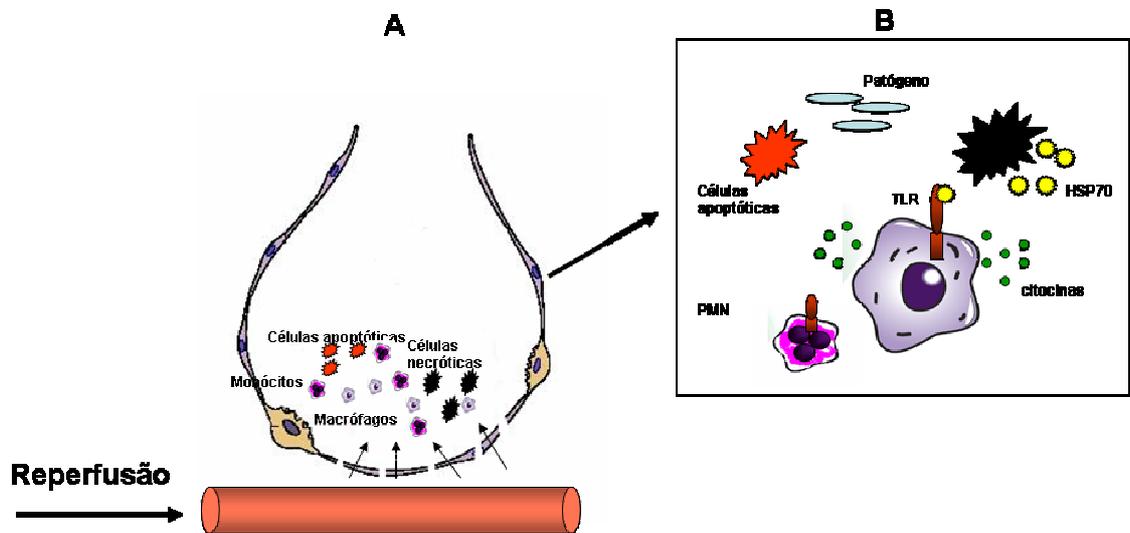
A função dos TLRs em transplante de órgãos ainda está para ser definida. No entanto, recentes evidências têm auxiliado a entender como estes receptores poderiam agir no quadro de transplante de órgãos. Isto deve-se ao fato de que além

de reconhecerem PAMP de diferentes microorganismos, os TLRs são também capazes de identificar ligantes endógenos tais como proteínas “heat shock” (ASEA *et al.*, 2002; VABULAS *et al.*, 2002), conteúdo de células necróticas (LI *et al.*, 2001) e sulfato de heparan (JOHNSON *et al.*, 2002). A presença de células apoptóticas *per se*, não ativaria a resposta imune inata através dos TLRs, no entanto quando existe a associação com infecção, ocorre uma produção muito maior de citocinas do que aquela que aconteceria no caso em que somente determinado patógeno estivesse envolvido (LUCAS *et al.*, 2003). Estas observações são importantes porque em transplante de órgãos a presença de apoptose ou morte celular programada, pode ocorrer em altas percentagens, como no caso de transplante pulmonar onde até 30% de células apoptóticas podem ser observadas após 2 horas de reperfusão em pacientes com boa função pulmonar e bom prognóstico (FISCHER *et al.*, 2000).

Em quadro de lesão por isquemia e reperfusão, a presença de infecção também parece estar associada a uma ativação da expressão dos TLRs, como observado em modelo de transplante hepático em ratos. Nesse modelo, após 6 horas de reperfusão houve um aumento da concentração de LPS circulante, bem como um aumento da expressão de TLR2 (TSOULFAS *et al.*, 2002). Este trabalho sugere que microorganismos podem contaminar aloenxertos e estimular os TLRs utilizando os tradicionais PRRs e PAMP.

A lesão por isquemia e reperfusão tem sido sugerida como um ativador do sistema imune inato em transplante de órgãos (FONDEVILA *et al.*, 2003) (figura 8). Esta hipótese foi confirmada por He *et al.* em 2002, que utilizando camundongos com ausência de células B e T (chamados camundongos alinfóides) em modelo de transplante cardíaco, observaram que mesmo sem a presença de imunidade adquirida havia uma robusta resposta pelo sistema imune inato que foi comprovada pela ativação de várias citocinas inflamatórias (HE *et al.*, 2002). Os mesmos autores também sugerem que a presença de estresse ou resposta a lesão por isquemia e reperfusão durante transplante pode ser suficiente para produzir um resposta inata na ausência de infecção (HE *et al.*, 2002). Posteriormente, utilizando o mesmo modelo, estes autores (HE *et al.*, 2003) verificaram que sete dias após o transplante ocorria um aumento das citocinas inflamatórias produzidas pelo sistema imune adquirido e uma diminuição daquelas produzidas pelo sistema inato, sugerindo que este último seria responsável pela indução da imunidade adquirida.

Figura 8: Representação esquemática do provável mecanismo da ação dos receptores Toll-símile durante a fase de isquemia e reperfusão



Legenda: Na fase inicial do transplante de órgãos (ex: pulmão), **(A)** durante a reperfusão do enxerto, pode ocorrer a destruição da membrana alvéolo capilar e extravasamento de monócitos e outras células apresentadoras de antígenos no interior dos alvéolos. **(B)** Entretanto, pode haver a presença de células apoptóticas e conteúdo de células necróticas no interior dos alvéolos, bem como no espaço intersticial, os quais juntamente com a presença de patógenos e outros ligantes endógenos podem ser reconhecidos pelos TLRs e aumentar a produção de citocinas.

Outra evidência que colabora com a teoria de que o sistema imune inato pode ser ativado durante a fase de reperfusão do enxerto é o trabalho realizado por Hutchings et al (2003) em modelo de transplante renal em macacos. Neste trabalho foi testada uma nova droga imunossupressora chamada 15-deoxyspergualin (DSG), a qual inibe a translocação do NF- κ B ativado para o núcleo, através da via de sinalização das proteínas de choque térmico (HSP). Esta droga administrada 5 horas antes da reperfusão, diminuiu os níveis citoplasmáticos da HSP70 e Relb e resultou em uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12 e INF- γ) na fase inicial de reperfusão do enxerto. Setenta e seis por cento dos animais que receberam esta droga não apresentaram qualquer episódio de rejeição e estavam com enxertos funcionantes após 4 anos, sem qualquer tratamento imunossupressor adicional (HUTCHINGS *et al.*, 2003).

Quadros de rejeição aguda ou crônica apresentam um impacto significativo na viabilidade do enxerto e sobrevida dos pacientes transplantados (SAYEGH *et al.*, 1998). Clinicamente, a rejeição crônica é manifestada por disfunção gradual e progressiva do enxerto levando a falência do órgão. Em enxertos renais e cardíacos a principal manifestação patológica da rejeição crônica é arteriosclerose e em pulmões é a bronquiolite obliterante (SAYEGH & TURKA, 1998)

O papel dos TLRs na rejeição do enxerto foi bem caracterizado em modelo de transplante de pele em camundongos, onde Goldstein *et al.* (2003) demonstraram que utilizando camundongos com ausência da proteína adaptadora MyD88, estes animais eram incapazes de rejeitar aloenxertos que apresentavam apenas diferença no complexo menor de histocompatibilidade, o qual está relacionado com a presença do cromossomo Y (GOLDSTEIN *et al.*, 2003). Adicionalmente, foi demonstrado que a resposta a rejeição poderia ser restaurada pela infusão de células esplênicas de camundongos normais ou pelo fornecimento de células apresentadoras de antígenos do doador. Estes mesmos autores apresentaram evidências de que a incapacidade de rejeitar aloenxertos naqueles camundongos mutantes estava associada a um número reduzido de células dendríticas imaturas nos linfonodos de drenagem dos aloenxertos durante as duas primeiras semanas do transplante e com o impedimento da geração de células T anti-enxerto. Adicionalmente, camundongos mutantes apresentaram uma interrupção da imunidade Th1 em direção ao aloenxerto. Este estudo fornece evidências que a imunidade adquirida é controlada pela imunidade inata e demonstra que a via de sinalização dos TLRs, IL-1 e IL-18 através de MyD88 é crítica para a rejeição de aloenxertos incompatíveis com o cromossomo Y, indicando que os TLRs podem ser ativados por ligantes endógenos e não somente pelos tradicionais PAMPs. No entanto, este trabalho não indica qual o ligante do aloenxerto que estaria envolvido com a rejeição (GOLDSTEIN *et al.*, 2003).

Com o objetivo fornecer evidências de que a imunidade inata poderia ter alguma função na rejeição aguda após transplante pulmonar, Palmer *et al.* (2003) quantificaram a expressão de dois diferentes polimorfismos de TLR4 em amostras sanguíneas de 147 receptores e doadores. Estes autores sugerem que a identificação de diferentes heterozigotos de TLR4 antes do transplante poderia ser um fator preditivo do risco para rejeição aguda após transplante pulmonar, permitindo uma melhor individualização dos regimes imunossupressores após

transplante. Uma redução da imunossupressão em pacientes com diferentes polimorfismos de TLR4 poderia ser possível e desejável devido aos efeitos tóxicos da maioria das medicações imunossupressoras (PALMER *et al.*, 2003).

3.3 - CITOCINAS EM TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS

As citocinas são pequenas proteínas com pesos moleculares variando entre 8 a 40.000 daltons. Originalmente chamadas de linfocinas ou monocinas para indicar a sua fonte celular, tornou-se claro que o termo citocina é a melhor descrição já que quase todas as células nucleadas são capazes de sintetizar estas proteínas e também responder a elas. A maioria das citocinas estão primariamente envolvidas na resposta do hospedeiro a infecções ou doenças e menos comumente com os mecanismos homeostáticos (DINARELLO, 2000b).

Existem atualmente 18 citocinas com o nome de interleucinas (IL). Outras citocinas preservam o seu nome inicial de acordo com sua descrição biológica original, com por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). As citocinas podem ser divididas em dois grupos segundo as suas propriedades inflamatórias: (1) citocinas pró-inflamatórias, e (2) anti-inflamatórias, as quais suprimem a atividade das primeiras. Por exemplo, IL-4, IL-10 e IL-13 são potentes ativadores de linfócitos B e também potentes agentes anti-inflamatórios. Elas são chamadas citocinas anti-inflamatórias pela sua capacidade de suprimir os genes para citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, TNF- α e as quimocinas (DINARELLO, 2000b).

O interferon-gama (IFN- γ) é um outro exemplo de citocinas de natureza pleiotrópica. Assim como IFN- α e β , IFN- γ possui atividade antiviral e é um potente ativador da via que leva a produção de células T. Entretanto, o IFN- γ é considerado uma citocina pró-inflamatória porque aumenta a atividade do TNF- α e induz a produção de óxido nítrico.

Citocinas pró-inflamatórias podem ser induzidas rapidamente por lesão de isquemia e reperfusão, como observado em estudos clínicos e experimentais de transplante de órgãos sólidos tais como rim (LEMAY *et al.*, 2000), fígado (GERLACH *et al.*, 1999), coração (OZ *et al.*, 1995) e pulmão (SERRICK *et al.*, 1995). Em transplante pulmonar em humanos, De Perrot *et al.* (2002) mediram os níveis protéicos das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-10, IL-12, e IL-18, em tecido pulmonar de dezoito doadores durante o período de armazenamento e após reperfusão. Neste trabalho foi observada uma diminuição nos níveis protéicos de todas as citocinas após reperfusão, com exceção para IL-8 cujos níveis estavam significativamente aumentados no período pós transplante (DE PERROT *et al.*, 2002). Parâmetros dos

doadores incluindo tensão de oxigênio, causa da morte cerebral, tabagismo, cultura positiva em lavado bronco-alveolar (LBA) e tempo em ventilação mecânica não tiveram influência nos níveis de expressão de citocinas. Entretanto a idade do doador estava inversamente correlacionada com os níveis de IL-10 após reperfusão. Como a IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória, os seus baixos níveis em pulmões de doadores mais velhos poderiam explicar porque esta população estaria mais suscetível a lesão de isquemia de reperfusão e a níveis mais elevados de mortalidade (TRULOCK *et al.*, 2003).

A seguir serão apresentadas e discutidas as principais interleucinas e citocinas potencialmente envolvidas em lesão de isquemia e reperfusão após transplante.

3.3.1 - Interleucina 8

A IL-8 é uma potente quimocina ativadora de neutrófilos promovendo a adesão, migração e degranulação de neutrófilos (HARADA *et al.*, 1994; FISHER *et al.*, 2001). Os neutrófilos têm sido implicados na patogênese da lesão de isquemia de reperfusão após transplante pulmonar e estão primariamente envolvidos na resposta inflamatória tardia que ocorre poucas horas após reperfusão (MCCORD, 1985; CLAVIEN *et al.*, 1992). Em transplante pulmonar os níveis aumentados de IL-8 logo após reperfusão poderiam atuar como um recrutador de neutrófilos resultando em lesão pulmonar secundária pelo acúmulo destas células. Fisher *et al.* (2001) demonstraram que receptores de transplante pulmonar que morreram de disfunção precoce do enxerto tinham níveis significativamente altos de IL-8 no LBA antes da retirada dos órgãos (FISHER *et al.*, 2001).

A importância da IL-8 também tem sido demonstrada em pacientes com SDRA (MILLER *et al.*, 1996) e transplante hepático clínico (MUELLER *et al.*, 1996a). Mueller *et al.* (1996a) demonstraram que os níveis de IL-8, em transplante hepático em humanos, alcançaram seu pico após 2 horas de reperfusão em sangue periférico e rapidamente diminuíram depois deste período. Além disso, os níveis de IL-8 nas veias hepáticas efluentes imediatamente após da reperfusão e na circulação sistêmica 2h e 24h após reperfusão estavam correlacionados com a severidade da lesão por reperfusão (MUELLER *et al.*, 1996a). Em outro estudo, Sekido *et al.* (1993) realizando a administração de anticorpo anti-IL-8 no início do período de reperfusão

reduziram a injúria pulmonar e a infiltração de neutrófilos marcadamente 3 horas após a reperusão em modelo de isquemia pulmonar quente em coelhos (SEKIDO *et al.*, 1993).

3.3. 2 – Interleucina 18 e 12

As IL-18 e IL-12 são duas citocinas envolvidas na resposta a infecções bacterianas (BOHN *et al.*, 1998). A IL-18 é uma citocina indutora de IFN- γ e da resposta por células Th1, sendo considerada uma citocina pró-inflamatória por vários motivos: em vários modelos animais, anticorpos que neutralizam IL-18 endógeno reduzem a severidade de doença e a letalidade por endotoxinas. Mesmo em modelos que são independentes de IFN- γ a neutralização de IL-18 prolonga a sobrevivência e o anti IL-18 protege o fígado contra a injúria celular causada por toxinas ou ativada por células T; em modelos de metástases de melanoma o bloqueio da IL-18 reduz a aderência de células malignas prevenindo um aumento da expressão gênica da molécula de adesão endotelial 1 (BOHN *et al.*, 1998).

IL-18 and IL-12 atuam sinergicamente para estimular células T e NK a produzirem IFN- γ , no entanto quando ocorre a neutralização da IL-18 não ocorre a indução de IFN- γ por IL-12. Em modelos de artrite, injúria pulmonar ou doença inflamatória intestinal a neutralização da IL-18 revela o importante papel desta citocina como mediador da resposta inflamatória (DINARELLO, 2000a).

Lentsch *et al.* (1999) e Daemen *et al.* (1999) demonstraram em modelo de isquemia quente em camundongos que as interleucinas 12 e 18 poderiam também estar envolvidas na lesão por isquemia de reperusão em fígado e rim induzindo a liberação de TNF- α e IFN- γ pelo aumento do MHC classe I e II (DAEMEN *et al.*, 1999; LENTSCH *et al.*, 1999). De Perrot *et al.* (2002) observaram que os níveis destas duas citocinas estavam significativamente elevados antes da reperusão quando comparadas com o período pós-transplante pulmonar. IL-18 apresentou correlação positiva com a extensão do tempo de isquemia (DE PERROT *et al.*, 2002). Uma vez que tempos de isquemia mais prolongados são capazes induzir a expressão do MHC classe II (QAYUMI *et al.*, 1998) este achado sugere que o tempo de isquemia fria poderia influenciar rejeição aguda e subsequente disfunção crônica do aloenxerto através da liberação de IL-18.

3.3.3 - Interleucina-10

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica e sua principal função é limitar e terminar a resposta inflamatória. A IL-10 inibe a ativação e função de células T efetoras das células T, monócitos e macrófagos, tem efeito sobre a maioria das células hematopoiéticas e inibe por exemplo a síntese das quimocinas CC e CXC, produção de óxido nítrico e expressão de moléculas do MHC de classe II. Adicionalmente, a IL-10 regula o crescimento e diferenciação de células B, “natural killers”, células T citotóxicas e “auxiliares”, inibindo também a produção de outras citocinas inflamatórias por monócitos e macrófagos (BOEHLER, 2002).

No cenário de transplante pulmonar, a IL-10 apresenta duas importantes funções: (1) inibição da resposta inflamatória e; (2) inibição da resposta imune mediada por células T aloreativas, que resulta na inibição do desenvolvimento de células Th1, na inibição da função efetora das células Th1, desvio na resposta imune em direção a subpopulação do tipo Th2 e desenvolvimento de subpopulações de células T reguladoras que produzem IL-10. Durante isquemia e reperfusão IL-10 pode ser administrada com o objetivo de prevenir a resposta inflamatória (DE PERROT *et al.*, 2003a). Em caso de rejeição aguda, a IL-10 seria direcionada para combater a resposta imune mediada por células T, e em quadros de bronquiolite obliterante a IL-10 provavelmente deveria reduzir as respostas inflamatórias e àquela mediada por células T. Entretanto, de Perrot et al (2002) não encontraram liberação significativa de IL-10 após a reperfusão como encontrado em transplante hepático (MUELLER *et al.*, 1996b). Todavia, os níveis de IL-10 estavam correlacionados negativamente com doadores pulmonares acima de 55 anos (DE PERROT *et al.*, 2002).

3.3.4 - Interleucina 6

A IL-6 é produzida por uma grande variedade de células, incluindo as células B e T, macrófagos, fibroblastos e também células tumorais em resposta a vários estímulos (HIRANO *et al.*, 1990). Suas principais funções biológicas estão relacionadas à indução da maturação final de células B, estimulação da produção de proteínas de fase aguda, diferenciação de células T citotóxicas, supressão da

eritropoese, inibição da secreção de albumina e proliferação vascular (HIRANO *et al.*, 1990).

A IL-6 é, normalmente, considerada uma citocina pró-inflamatória, no entanto ela apresenta também funções anti-inflamatórias. As concentrações de IL-6 estão elevadas no sangue de pacientes vítimas de trauma (BIFFL *et al.*, 1996), em quadros de endotoxemia, inflamação aguda ou crônica, infecções ou doenças metastáticas ou por qualquer agente que desencadeia a resposta do hospedeiro (HIRANO *et al.*, 1990).

A IL-6 é uma citocina que atua na fase aguda do transplante de órgãos e com efeitos biológicos pleiotrópicos (HIRANO *et al.*, 1990). Esta citocina tem função importante na defesa do hospedeiro, hematopoiese e inflamação (HIRANO *et al.*, 1990). A IL-6 apresenta potentes propriedades anti-inflamatórias, particularmente na prevenção de lesões relacionadas com endotoxemia (ULICH *et al.*, 1991; BARTON *et al.*, 1993). Em modelo de endotoxemia em ratos, a IL-6 recombinante apresentou efeitos significantes na prevenção na infiltração de neutrófilos e redução de outros fatores inflamatórios (ULICH *et al.*, 1991). Camargo Jr *et al.*, em modelo de isquemia quente, em fígado através do clampeamento da vasculatura hepática demonstram que a administração da IL-6 recombinante protege o fígado de ratos e camundongos após reperfusão, o que foi comprovado por análise histológica, enzimas hepáticas e diminuição dos níveis de TNF- α (CAMARGO *et al.*, 1997).

Em transplante pulmonar os níveis protéicos da IL-6 juntamente com IL-1 β , TNF- α , e IL-8 estavam elevados no primeiro dia após transplante em pacientes com falência do enxerto (MAL *et al.*, 1998). Níveis elevados desta interleucina também estão correlacionados com o surgimento de bronquiolite obliterante em pacientes que foram submetidos a transplante pulmonar (SCHOLMA *et al.*, 2000)

3.3.5 – Interleucina-1beta

A família das citocinas IL-1 consiste de 2 agonistas IL-1 α e IL-1 β e um antagonista o receptor de interleucina-1 antagonista (IL-1Ra) (DINARELLO, 1998). Os agonistas IL-1 são codificados por dois diferentes genes que produzem as proteínas IL-1 α e IL-1 β . A IL-1 α esta associada predominantemente a membrana celular, enquanto a IL-1 β é secretada. Elas são produzidas por uma variedade de

células e ambas citocinas ligam-se ao receptor Tipo I de IL-1 (IL-1R) nas células alvo apresentando funções biológicas semelhantes (DINARELLO, 1998). A transmissão do sinal das IL-1 é basicamente a mesma dos TLRs, ou seja, é através da proteína adaptadora MyD88 até transdução do sinal para o interior do núcleo e produção de citocinas através de NF κ -B (STRIETER *et al.*, 2002). Esta citocina, juntamente com IL-6 tem sido associada como preditor de um prognóstico reservado em pacientes submetidos a ventilação mecânica com síndrome da distrição respiratória aguda (MEDURI *et al.*, 1995).

Em lesão por isquemia e reperfusão a IL-1 β , juntamente com TNF- α , IL-6 e IL-8 são conhecidas como citocinas de fase aguda e normalmente estão aumentadas após reperfusão de órgãos (LAND, 1998).

3.3.6 - Interferon Gama

O INF- γ é uma citocina produzida principalmente por células T ativadas e células NK que apresentam efeitos complexos nas células imunes e não imunes. O INF- γ apresenta um importante papel na resposta inflamatória, normalmente atuando em sinergismo com outras citocinas, tais como IL-1 β e TNF- α . Uma característica importante é que o IFN- γ tem a capacidade de induzir a expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) em muitos tecidos, tornando-se isto particularmente relevante em transplante de órgãos. O IFN- γ apresenta um papel protetor na rejeição aguda em modelo de xenotransplante cardíaco e na reperfusão de enxertos vascularizados. Estes achados foram observados em modelo de transplante xenogênico em camundongos onde a ausência de IFN- γ provocou uma resposta aguda mais rápida e efetiva (WANG *et al.*, 2000). Esses resultados, que foram também observados em modelo alogênico de transplante cardíaco e renal em camundongos (HALLORAN *et al.*, 2001). A falta de IFN- γ reduz, grandemente, a indução do MHC em aloenxertos sendo possível que este esteja indiretamente relacionado com o efeito protetor do IFN- γ . No entanto, o INF- γ também promove alterações na vasculatura do enxerto no curso tardio dos órgãos transplantados, demonstrando que esta citocina apresenta efeitos diversos e contraditórios na sobrevivência do aloenxerto, atuando tanto no sistema imune bem como diretamente

no enxerto, sendo que a intensidade desta última depende do tipo de enxerto e o tempo após transplante (HIDALGO *et al.*, 2002).

3.3.7 - Fator de necrose tumoral alfa

O TNF- α apresenta uma função crítica na resistência dos hospedeiros a infecções e crescimento de tumores malignos, agindo como imunoestimulantes e também como mediadores da resposta inflamatória. Muitas das ações produzidas pelo TNF- α são funcionalmente semelhantes à da IL-1. Por outro lado, um excesso na produção de TNF tem sido relacionado com várias condições patológicas, que incluem caquexia, choque séptico causado por infecção por bactérias Gram negativas, doenças auto imunes e septicemia meningocócica (EIGLER *et al.*, 1997).

O TNF- α é produzido principalmente por monócitos e macrófagos, mas também pode ser liberado por linfócitos e mastócitos. Ele, juntamente com outras citocinas, promove o recrutamento de PMNs do compartimento vascular para o interior de órgãos que estão sendo submetidos a qualquer tipo de lesão (MONTON *et al.*, 1998). Esta citocina é liberada durante a fase inicial de reperfusão do enxerto durante transplante de órgãos (LAND, 1998; MAL *et al.*, 1998) estando também relacionada com a rejeição aguda (AZZAWI *et al.*, 1999) e crônica (PEREZ-VERDIA *et al.*, 2001) em transplante cardíaco e a formação de bronquiolite obliterante em transplante pulmonar (ALHO *et al.*, 2003).

3.4 - PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70

As proteínas “heat shock” são moléculas altamente conservadas entre os diferentes organismos desde bactérias até mamíferos. Cada HSP está localizada em um compartimento celular específico, por exemplo: HSP28, HSP70 e HSP90 são encontradas no núcleo e citoplasma, enquanto HSP60 e um subgrupo de HSP70 na mitocôndria. Elas são consideradas intracelulares por não apresentarem domínios através da membrana plasmática, no entanto a presença de estresse celular, tais como choque térmico, radiação ultra-violeta, infecção viral e bacteriana resulta na translocação das HSP para a membrana plasmática (GALLUCCI *et al.*, 2001).

A principal função das HSP é transportar proteínas malformadas ou aberrantes evitando associações incorretas com outras proteínas, atuando assim no modelamento e proteção proteica. Adicionalmente, elas ativam macrófagos e células dendríticas estimulando a secreção de citocinas pró-inflamatórias (XIE *et al.*, 1999) e a expressão de moléculas co-estimuladoras (GALLUCCI & MATZINGER, 2001). Estas moléculas podem representar um tipo de “sinal de alerta” endógeno, isto porque elas são liberadas ou produzidas por células que estão sendo submetidas a algum tipo de lesão ou por células necróticas que uma vez rompida a sua membrana plasmática extravasam vários tipos de conteúdos celulares e entre eles as HSP que seriam responsáveis pela resposta inflamatória (TAKEDA *et al.*, 2003).

As HSP70 também têm sido muito estudadas como protetoras da lesão por isquemia e reperfusão em células de músculo cardíaco (KAWANA *et al.*, 2000; TANONAKA *et al.*, 2003), isto porque um aumento da expressão destas moléculas aumentaria a resistência celular. Esta idéia também foi comprovada em modelo de transplante pulmonar em ratos onde a HSP70 diminuiu os efeitos da lesão por reperfusão (HIRATSUKA *et al.*, 1998). Os mesmos autores, tentando provar que HSP70 era importante na proteção do enxerto após transplante, utilizaram terapia gênica com adenovirus e HSP70 injetados 24 horas antes do transplante e verificaram que os pulmões dos animais que receberam HSP70 apresentavam níveis inferiores de citocinas pró-inflamatórias (HIRATSUKA *et al.*, 1999). Em modelo hepático de perfusão isolada, os níveis de mRNA para a de HSP70 estavam relacionados com a severidade da lesão hipóxia/isquemia-reperfusão, quando diferentes tempos de isquemia foram testados, sugerindo que esta proteína pode ser um marcador da lesão celular naquele modelo (AOE *et al.*, 1997)

Em transplante hepático em humanos a HSP70 foi sugerida como um potencial marcador de rejeição aguda. Os níveis de HSP70 mRNA em tempo de isquemia fria foram menores em pacientes que apresentaram rejeição aguda nos primeiros 30 dias do que em pacientes sem rejeição, sendo sugerido neste trabalho que HSP70 possa ser utilizada como um fator preditor de rejeição hepática. Isto talvez porque níveis elevados de HSP70 no período de isquemia fria poderiam proteger os órgãos do dano causado pela isquemia e reperfusão (FLOHE *et al.*, 1998). Em transplante pulmonar a expressão de proteínas “heat shock” 40 e 70 apresentava-se aumentada em pacientes durante episódios de rejeição, com redução destes níveis após a resolução do quadro (RIZZO *et al.*, 1998).

3.5 - REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (“REAL-TIME PCR”)

3.5.1 - PCR Tradicional

O fundamento central que faz com que a PCR seja tão útil em biologia molecular baseia-se no fato de que todo organismo vivo possui seqüências de nucleotídeos no DNA que são únicas e específicas para cada espécie. A técnica explora a função natural da enzima chamada de Taq- polimerase, extraída da bactéria *Thermus aquaticus*. Através da PCR é possível obter-se cópias de uma parte do material genético em quantidade suficiente que permita detectar e analisar a seqüência que é alvo do estudo. Às vezes referida como “fotocópia molecular”, a PCR pode amplificar qualquer seqüência específica de DNA, a partir de amostras de diferentes materiais biológicos como sangue, urina e outros fluidos corporais, cabelo e cortes de tecidos (biópsias frescas ou em blocos de parafina). Amostras de microorganismos, células animais ou vegetais, alguns deles com milhares, possivelmente até milhões, de anos de idade podem, também, ser detectadas.

Para a execução da técnica da PCR é preciso que se tenha conhecimento prévio da seqüência do ácido nucléico que se deseja amplificar, dita “seqüência alvo.” A partir disto, desenham-se dois iniciadores (“primers”) para dar partida ao processo de síntese em um local específico. Um “primer” serve para ligar-se a seqüência alvo de uma das fitas e o outro na fita de sentido inverso. O “primer” é uma pequena seqüência de nucleotídeos que hibridiza no início da seqüência alvo que se quer amplificar e da qual ele é complementar. Ao reconhecer o “primer,” a polimerase sintetiza uma cópia complementar, obedecendo à informação contida na seqüência de DNA que será replicada. A PCR precisa ainda de desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP; dTTP; dGTP; dCTP) que são quatro componente químicos diferentes que atuam como se fossem tijolos na construção da molécula de DNA.

O primeiro passo para a realização de uma PCR é a coleta da amostra biológica. Para tanto, é importante levar em consideração o que se deseja pesquisar.

O segundo passo consiste em extrair o DNA do material coletado. Esta extração segue um critério de metodologia básico, que varia dependendo da

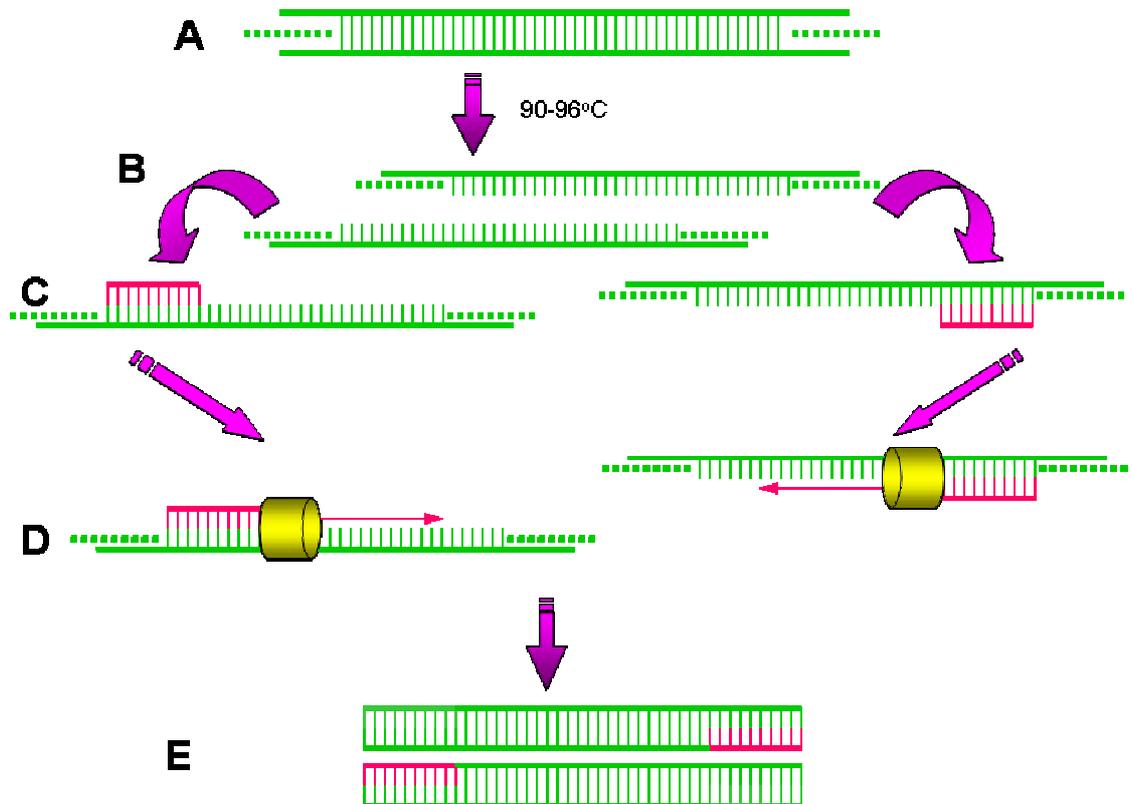
amostra utilizada. Basicamente utilizam-se substâncias que rompem as membranas celulares e nucleares como o fenol-clorofórmio, capazes de desnaturar e retirar as proteínas liberando somente o DNA. A adição posterior de etanol, então, fará com que o material genético precipite no tubo que posteriormente será solubilizado em tampão apropriado para o uso na reação.

O terceiro passo consiste em preparar a mistura de reação, a qual contém as substâncias necessárias para fazer novas cópias de DNA no processo da PCR.

O quarto passo consiste na reação em si que é feita em uma máquina especial, chamada de termociclador, que aquece e resfria rapidamente o tubo em vários ciclos consecutivos para amplificar o DNA (figura 9).

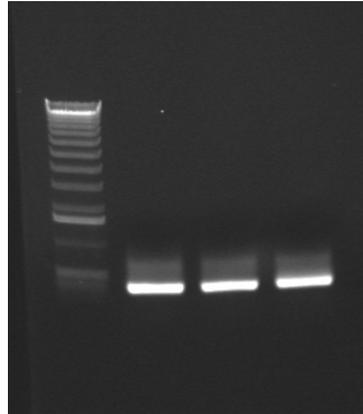
O passo final é a análise do produto de reação. Esta pode ser feita através de gel de poliacrilamida posteriormente corado pela prata ou em gel de agarose, corado por brometo de etídio. Em qualquer uma delas, o material amplificado é visualizado como uma banda, a ser analisada de acordo com o seu peso molecular (figura 10).

Figura 9: Reação em cadeia pela polimerase



Legenda: Primeiramente, **(A)** o DNA dupla fita sofre aquecimento a 90-96°C para que o DNA seja **(B)** denaturado (separação das fitas). Em seguida, **(C)** a temperatura diminui para permitir a hibridização ou anelamento; nesta fase, os “primers” se ligam, especificamente, às suas seqüências complementares no DNA. A seguir **(D)** inicia-se a síntese da nova fita pela polimerase, resultando **(E)** na formação de uma nova cópia. Após diversos ciclos (geralmente em torno de 30 ciclos) o DNA estará amplificado em milhões de cópias.

Figura 10: Análise do produto da reação da PCR



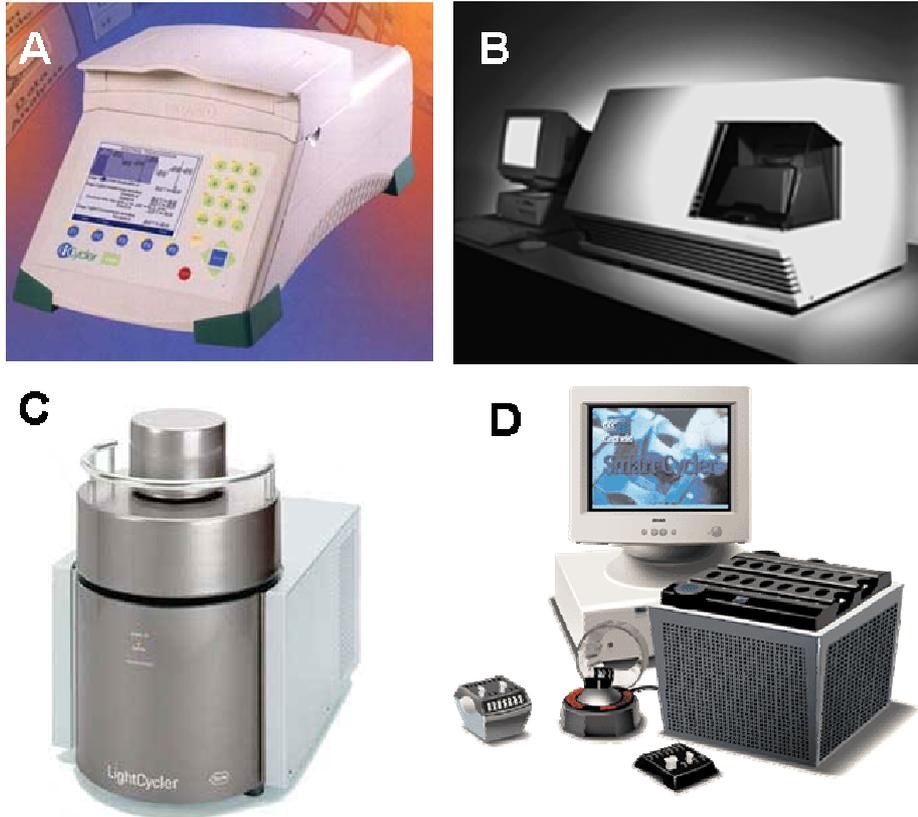
Legenda: Gel de agarose a 5% corado com brometo de etídio demonstrando a presença de 3 bandas, representando o gene “housekeeping” β -actina. A coluna da esquerda indica o peso molecular aproximado de cada produto da PCR.

3.5.2 - PCR em tempo real

A PCR em tempo real é uma técnica que está se tornando mais prevalente em laboratórios de biologia molecular. Esta nova técnica de monitorar o progresso de uma reação da PCR revolucionou completamente o modo de como abordamos a quantificação de DNA e RNA baseado na PCR. Diferente da PCR tradicional, a reação de amplificação é monitorada ao mesmo tempo em que ela ocorre, economizando tempo por reduzir a necessidade de análise subsequente. O monitoramento em tempo real também fornece uma representação mais acurada da quantidade de material inicial quando comparado com o PCR tradicional (BUSTIN, 2000). A capacidade de obter dados quantitativos a partir desta tecnologia faz esta aplicável para análise de DNA, genótipos ou ainda para estudos da expressão de diferentes genes (RAMOS-PAYAN *et al.*, 2003).

A técnica da PCR em tempo real é fundamentada na detecção e quantificação de uma cor (ou relator) fluorescente, a qual emite um sinal quando liga-se à seqüência de DNA que está sendo amplificada (“amplicon”), sendo esta detectada por um feixe de laser de termociclador que está conectado a um computador (figura 11).

Figura 11 : Diferentes termocicladores utilizados na PCR em tempo real



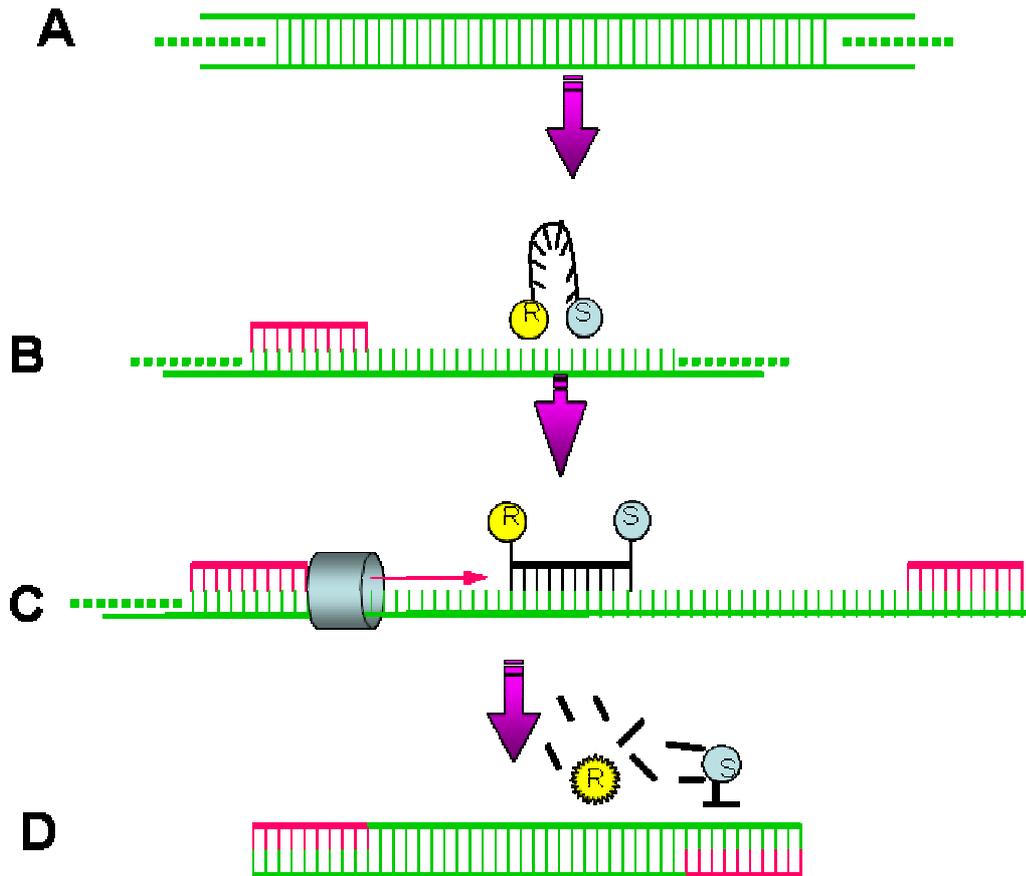
Legenda: **(A)** iCycler (Bio-Rad); **(B)** PRISM 7700, 7900HT (Applied Biosystems); **(C)** Light Cycler (Roche); **(D)** Smart Cycler (Cepheid)

Existem dois métodos para a detecção quantitativa de uma seqüência de DNA: sondas fluorescentes e agentes que ligam-se ao DNA de dupla hélice. As sondas fluorescentes, consistem de sondas TaqMan[®] (HEID *et al.*, 1996) e alertas ou faróis moleculares (“molecular beacons”) e mais recentemente escorpiões (“Scorpions[®]”).

Sondas TaqMan[®] são oligonucleotídeos mais extensos que os “primers” (com uma temperatura de denaturação 10^oC mais alta) que contém uma cor fluorescente normalmente na base 5’ e um supressor (“quencher”) na base 3’. As sondas TaqMan[®] são desenhadas para ligarem-se a uma região interna da região a ser amplificada pela PCR (figura 12). Quando ligada às seqüências complementares, a cor fluorescente das sondas TaqMan[®] é excitada transferindo energia para aquele supressor ligado a ela, o qual impede a liberação do sinal de fluorescência. Neste mesmo ciclo em que a polimerase está realizando a duplicação do molde (“template”) ela cliva a sonda, fazendo com que a sonda TaqMan[®] excitada seja

liberada da seqüência da qual ela estava ligada, liberando sinal de fluorescência, já que não existe mais a presença do supressor do sinal (BUSTIN, 2002). Uma vez terminada a atividade do supressor, o relator inicia a emitir fluorescência que aumenta a cada ciclo proporcionalmente a taxa de clivagem da sonda.

Figura 12: Reação da PCR com sondas TaqMan®



Legenda: **(A)** a dupla fita de DNA é denaturada após aquecimento. **(B)** os “primers” e a sonda Taqman® ligam-se a seqüência complementar do DNA. A cor de fluorescência da sonda Taqman® (repórter – R) nesta fase é inibida pelo supressor (S). Na fase seguinte **(C)** quando a polimerase inicia a síntese da cópia do DNA a sonda Taqman® ligada a seqüência é excitada **(D)** e quando termina a formação da cópia de DNA a fluorescência é liberada e emite sinal que é detectado pelo termociclador (ver texto).

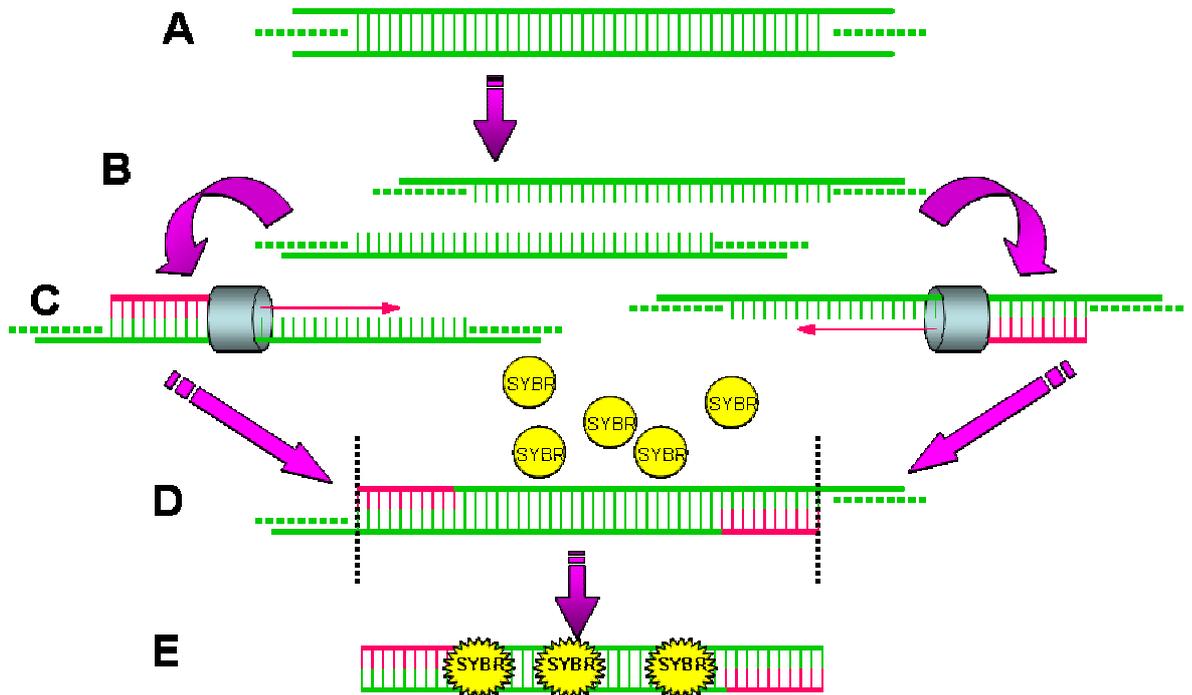
As “molecular beacons” também contêm fluoróforos em uma extremidade, os quais podem ser de vários tipos: FAM, TAMRA, TET e ROX e como supressor universal é utilizado o DABCYL na outra extremidade (TYAGI *et al.*, 1996). Elas são

desenhadas de modo que possuam a forma de um grampo de cabelo (“hairpin”) enquanto livres na solução da PCR, com o objetivo de trazer juntas a cor de fluorescência e o supressor para que não ocorra a transferência de energia quando estas são excitadas. Elas são desenhadas para terem dois braços com seqüências complementares que formam um tronco ou híbrido muito estável. A proximidade entre o fluoróforo e o supressor inibe a emissão de fluorescência. No entanto quando a “molecular beacon” hibridiza o alvo durante o período de anelamento ou hibridização, a cor de fluorescência é separada do supressor e inicia a emitir sinal de fluorescência.

As “molecular beacons” permanecem intactas durante a PCR e devem ligar-se novamente ao alvo a cada ciclo para a emissão do sinal de fluorescência. Este sinal estará correlacionado a quantidade do produto efetivo da PCR. Tanto as sondas TaqMan[®] como as “molecular beacons” permitem a detecção de múltiplas espécies de DNA (“multiplex”) pelo uso de diferentes sondas/“beacons” com diferentes cores de fluorescência (comprimentos de onda).

Uma alternativa mais barata que as sondas moleculares é a utilização de fluoróforos que ligam-se ao DNA de dupla hélice e são capazes de quantificar a produção dos “amplicons” (incluindo a amplificação de produtos não específicos e a ligação entre “primers”), sendo o SYBR[®] Green I o fluoróforo mais utilizado e com excelentes resultados (RAMOS-PAYAN *et al.*, 2003) (figura 13). No entanto este apresenta algumas desvantagens, pois liga-se a qualquer DNA de dupla hélice e não pode ser utilizado em PCR multiplex. Entretanto estes problemas podem ser minimizados através de um cuidadoso desenho dos “primers”, os quais devem conter pelo menos um base na região de um íntron e também pela observação da curva de amplificação durante a reação da PCR com o objetivo de identificar a amplificação de produtos não específicos, através das diferentes temperaturas de anelamento.

Figura 13 : Reação da PCR com SYBR® Green I



Legenda: **(A)** O DNA dupla fita é separado em **(B)** duas fitas; **(C)** a polimerase inicia a síntese do DNA; **(D)** a cor de fluorescência (SYBR) que encontra-se inativa **(E)** liga-se cópia do DNA de dupla fita e inicia a emitir sinal fluorescência.

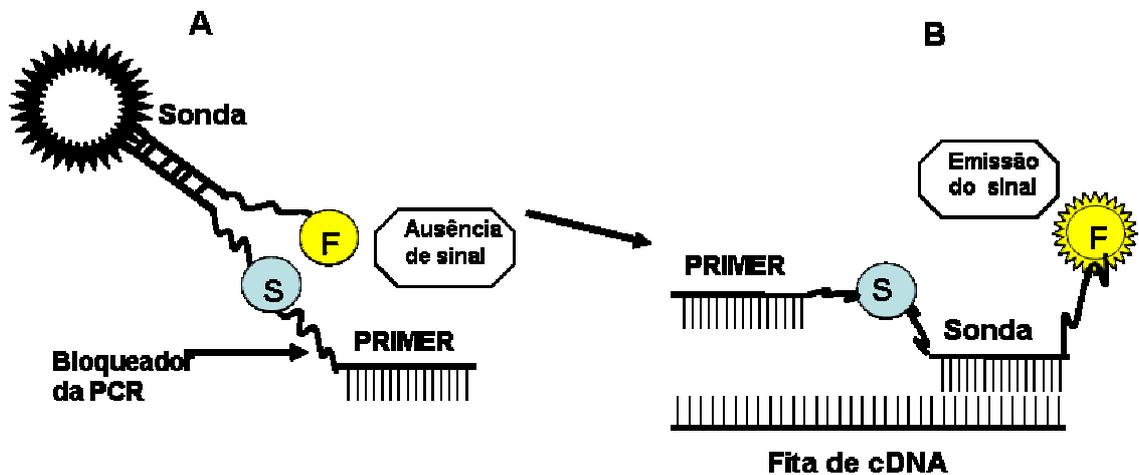
Outra fluorescência utilizada na PCR em tempo real são os “Scorpions®”, que são moléculas com dupla função contendo os “primers” para a PCR, que estão unidos por ligação covalente a uma sonda (figura 14). Estas moléculas também contém uma sonda que emite fluorescência (“fluorophor”) que interage com um supressor que reduz a fluorescência. Quando estas moléculas são utilizadas em uma reação de PCR a sonda de fluorescência e o supressor são separados, levando a um aumento da emissão de luz no tubo onde a reação está ocorrendo. Os benefícios dos “Scorpions®” provém do fato que os componentes da sonda são fisicamente associados com os dois “primers”, isto significa que a reação leva a geração de um sinal que possui arranjo uni-molecular em contraste com os outros métodos que apresentam um arranjo de colisão entre duas moléculas, tais como TaqMan® ou “molecular bacons” (WHITCOMBE *et al.*, 1999).

Os benefícios de um arranjo uni-molecular são: a reação é efetivamente instantânea e ocorre antes de qualquer competição ou reações colaterais tais como uma re-união do “amplicon” ou um alvo inapropriado dobrado. Então esta técnica

pode levar a sinais mais fortes, sondas mais confiáveis, encurtar o tempo da reação e melhorar a discriminação dos produtos da PCR.

A presença do “bloqueador” é um elemento essencial da invenção do “Scorpion[®]”, o qual bloqueia a Taq DNA polimerase sendo esta incapaz de ler através da seqüência dos “primers” dos “Scorpions[®]” impedido que ocorra a cópia da região da sonda. Caso isto acontecesse haveria a geração de um sinal que não seria específico para aquele determinado alvo. Isto também impede a produção de dímeros de primers inespecíficos e quaisquer reações. (figura 14).

Figura 14 : Sondas “Scorpion[®]”



Legenda: **(A)** modelo esquemático da sonda “Scorpion”, mostrando que o “primer” apresenta-se unido a sonda, não havendo emissão de sinal porque o supressor (S) inibe a cor de fluorescência (F). A presença do Bloqueador da PCR impede que ocorra ligação entre a sonda e o “primer”. **(B)** Emissão do sinal de fluorescência quando a sonda e “primer” ligam-se a seqüência complementar.

3.5.2.1 - Análise da reação da PCR em tempo real

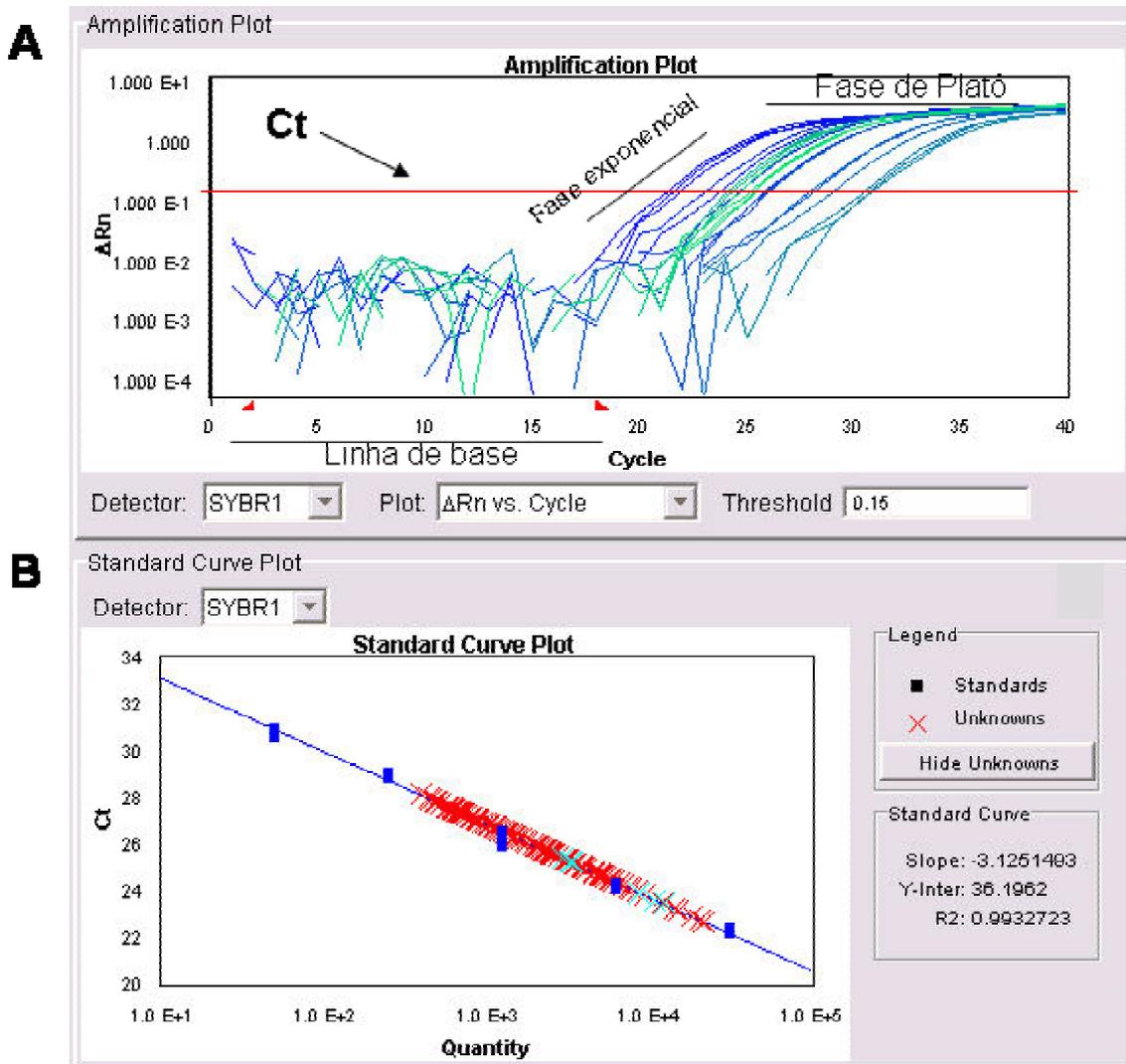
Através de um programa de computador que é conectado ao termociclador é possível observar as reações a cada ciclo durante a amplificação de um produto da PCR. Sendo também possível verificar quando este produto é detectado pela primeira vez, diferentemente da PCR tradicional na qual o produto acumulado é visualizado após um número pré-fixado de ciclos somente no final da reação. Quanto maior o número inicial de cópias de um seguimento de ácido nucléico de interesse,

mais precocemente será obtido o aumento significativo da fluorescência. Um gráfico de amplificação é caracterizado por uma curva de amplificação que mostra o sinal de fluorescência versus o número de ciclos (figura 15A). No número inicial de ciclos da PCR, ocorre pouca alteração no sinal de fluorescência. Este define a linha de base para o gráfico de amplificação (figura 15A). Um aumento no sinal de fluorescência acima da linha de base indica a detecção do produto acumulado do PCR. Um limiar pré-fixado, ou ponto em que o estímulo é suficiente para ser identificado pode ser selecionado acima da linha de base. O parâmetro Ct (“threshold cycle” ou ciclo de limiar) é definido como o número fracionário de ciclos em que o sinal de fluorescência ultrapassa um limiar pré-fixado (figura 15A).

A quantificação do produto de determinado gene de interesse em uma determinada amostra é acompanhada pela medida do Ct e utilizando uma curva padrão que é baseada no número inicial de cópias de determinado gene com quantidade controlada (figura 15B). Sendo assim, todo o processo para o cálculo dos Cts, preparação da curva padrão e determinação do número inicial de cópias para um gene desconhecido é o princípio básico da PCR em tempo real.

Quanto maior a quantidade de DNA alvo a ser amplificado, mais cedo ocorrerá a detecção do produto acumulado durante o processo da PCR e menor será o valor do Ct. Os valores do Ct são bastante reproduzíveis quando a reação é realizada em réplicas, isto porque o limiar é escolhido para ser na fase exponencial da PCR. Na fase exponencial, os componentes da reação não estão restritos ou ainda estão em quantidades suficientes para manter a amplificação com as reações em réplicas exibindo resultados uniformes e reproduzíveis (figura 15A).

Figura 15: Curva de amplificação e curva padrão de uma reação de PCR em tempo real



Legenda: **(A)** gráfico de amplificação de diferentes concentrações de DNA genômico realizados em tréplicas com ciclo de limiar (Ct) ajustado manualmente representando em qual ciclo a amplificação é estatisticamente significativa. **(B)** gráfico da curva padrão construído a partir de diluições seriadas de cDNA de concentração conhecida.

3.5.2.2 - Desenho dos “Primers” e Sondas

O desenho de “primers” e sondas para a PCR em tempo real deve seguir algumas regras específicas para este tipo de reação. No entanto, este trabalho é facilitado pela presença de diferentes programas de computadores que são capazes

desenhar “primers” com todos os requerimentos necessários para a PCR quantitativa. Alguns destes programas podem ser acessados gratuitamente através da Internet como o Primer3[®] software (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) enquanto outros são fornecidos por diferentes companhias como o Primer Express[®] 1.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.5.2.3 -Efeito da restrição dos reagentes

As fases iniciais da PCR são caracterizadas por um aumento exponencial de amplificação do DNA alvo. À medida que a reação ocorre os seus componentes se tornam limitados e a taxa de amplificação do alvo diminui até que este alcance um platô e ocorre pouco ou nenhum aumento no produto do PCR (figura 15A). A sensibilidade da detecção do sinal de fluorescência por parte da máquina de PCR em tempo real permite que o ciclo de limiar seja observado quando a amplificação do PCR esta ainda na fase exponencial.

Esta é a principal razão porque o Ct é a medida mais confiável do número inicial de cópias do que a medida no ponto final da quantidade de produto acumulado.

Durante a fase exponencial, nenhum dos componentes da reação estão limitados, como resultado os valores do Ct são bastante reproduzíveis para reações com o mesmo número inicial de cópias. Isto tem levado a um aumento da precisão na quantificação do DNA e RNA.

3.5.2.4 -Métodos de quantificação

A técnica da PCR em tempo real permite dois tipos de quantificação dos produtos da amplificação. A primeira seria uma **quantificação absoluta**, que é baseada no número inicial de cópias de DNA. Para isto ser realizado é necessário que seja construída uma curva padrão (“standard curve”) com quantidades conhecidas de uma determinada molécula.

O DNA de plasmídeo ou RNA transcrito in vitro são comumente utilizados para o preparo de padrões absolutos. No entanto para definir o exato número de cópias as concentrações destas moléculas são necessariamente medidas por densidade

óptica e estas devem ser convertidas para o número de cópias utilizando o peso molecular do DNA ou RNA.

Geralmente não é possível utilizar DNA genômico como padrão para quantificação absoluta de RNA, porque não existe controle para a eficiência durante o processo da transcriptase reversa.

Outro método de quantificação na PCR em tempo real é a **quantificação relativa**, a qual é mais fácil que a absoluta, porque a quantidade é expressada em relação a uma determinada amostra padrão (calibrador). Para todas as amostras do experimento, a quantidade do DNA alvo é determinada a partir da curva padrão e dividida pela quantidade do calibrador. Então o calibrador se torna 1x a amostra e todas as outras quantidades são expressadas como n-vezes a diferença relativa com o calibrador. Uma vez que a quantidade da amostra é dividida pela quantidade do calibrador a unidade da curva padrão torna-se irrelevante. Então, tudo o que é necessário para o padrão é que suas diluições relativas sejam conhecidas.

Para quantificação relativa, qualquer estoque de RNA ou DNA contendo o alvo apropriado pode ser utilizado como padrão. É importante que a solução de estoque de RNA ou DNA seja exatamente diluída, mas as unidades utilizadas para expressar a diluição são irrelevantes. É possível utilizar DNA para a curva padrão para quantificação relativa de RNA. Fazendo isto é considerado que a eficiência da reação da transcriptase reversa dos alvos seja a mesma em todas as amostras, mas o valor exato desta eficiência deve ser conhecido.

Para a quantificação de uma determinada molécula, curvas padrões são preparadas para o alvo de interesse e para a referência endógena, como por exemplo RNA ribossômico. Para cada amostra do experimento, a quantidade do alvo é determinada pela curva padrão apropriada e esta quantidade é dividida pela quantidade da referência endógena para obter um valor normalizado do alvo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Foram estudados 14 pacientes consecutivos submetidos a transplante pulmonar bilateral entre maio de 1999 a setembro de 2000. As características dos receptores e doadores estão respectivamente apresentadas nas tabelas 1 e 2. O procedimento de retirada dos pulmões e a cirurgia dos receptores foram realizadas de acordo com protocolo padrão do grupo de transplante pulmonar do Toronto General Hospital (MCRAE, 2000). O tempo total de isquemia foi dividido em tempo de isquemia fria (TIF) e tempo de isquemia quente (TIQ). O TIF foi calculado como o intervalo a partir do início da perfusão através da artéria pulmonar com solução de preservação pulmonar no momento da retirada dos órgãos até o pulmão ser colocado na cavidade pleural. O TIQ corresponde ao período de implante do pulmão. Este trabalho foi revisado e aprovado pelo comitê de ética do Toronto General Hospital.

Tabela 1: Dados clínicos dos doadores pulmonares.

Características dos Doadores	
Idade	18-63 anos (mediana – 34,5 anos)
Sexo	7 feminino 7 masculino
Causa da morte	Hemorragia intra craniana (n=11) Traumatismo craniano (n=2) Anóxia cerebral (n=1)
Tempo em ventilação mecânica	12-103 horas (mediana 43,7horas)
Tabagismo	> 20 maço/ano (n=2) < 20 maço/ano (n=4) Sem história de tabagismo (n=8)
cultura de LBA	positiva: 11 pacientes (G+=6, G-=5) negativa: 3 pacientes
PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	331-562 (mediana 451,5)

Legenda: G+- Gram-positiva; G- - Gram-negativa

Tabela 2: Dados clínicos dos receptores pulmonares

Características dos receptores	
Idade	27-68 anos (mediana - 51 anos)
Sexo	5 feminino 9 masculino
Diagnóstico	Enfisema (n=3) Hipertensão pulmonar primária (n =4) Fibrose pulmonar (n =2) Fibrose cística (n =1) Deficiência de alfa-1 anti-tripsina (n =2) Síndrome de Eisenmenger (n=1) Esclerodermia (n=1)

Biópsias pulmonares

As amostras de tecido pulmonar foram coletadas em 4 diferentes períodos, os quais corresponderiam ao final do TIF (n=14), final do TIQ (n=13), 1 hora (n=12) e 2 horas (n=8) após a reperfusão do enxerto. A primeira biópsia foi realizada no pulmão direito ou esquerdo no final do primeiro TIF enquanto as outras amostras foram realizadas seqüencialmente sempre no primeiro pulmão transplantado. Não houve nenhum problema adverso devido ao processo repetitivo das biópsias. Todas as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Isolamento do RNA e Reação de transcriptase-reversa

RNA total foi isolado de tecido pulmonar através de kit extrator de RNA (RNeasy Mini Kit; QIAGEN), de acordo com as instruções do fornecedor. DNA complementar (cDNA) foi sintetizado do RNA total, através de MultiScribe[®] Transcriptase Reversa e “random hexamers” provenientes do kit de reação: Taqman[®] Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA). A reação total (20 µl) para transcriptase reversa continha 2,0 µl de 10×TaqMan RT Buffer, 4,4µl de 25 mM Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 4,0 µl de 2,5 mM de mistura de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 1,0µl de 50 µM de “random hexamers”, 0,4µl de 20 U/µl de inibidor de RNase, 0,5µl de 50 U/µl de MultiScribe[®] Transcriptase Reversa, 7,7µl de H₂O livre de RNase e 500ng de RNA total.

A mistura total foi incubada a 25°C por 10 min, a 48°C por 30 min para a transcrição e 95°C por 5 min para inativação da transcriptase reversa. As reações finais foram diluídas em 60µl de água livre de RNase e armazenadas a -20°C.

PCR em tempo real

A reação total de PCR (10µl) continha 4 µl of cDNA (122,8 ng), 1µl de 10x PCR tampão, 0,6µl de 25 mM of MgCl₂, 0,2 µl de dNTPu, 0,2µl de mistura de iniciadores (“primers”) sense e antisense em diferentes concentrações (quadro 2), 0,1µl de HotStar Taq[®] DNA Polymerase (Qiagen, Mississauga, Ontario), 3,4µl de água destilada esterilizada, 0,3µl de SYBR Green I[®] e 0,2µl de cor para referência interna ROX[®] (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Cada reação incluía uma curva padrão com diluição em série de uma concentração conhecida de DNA genômico. Presença de dímeros de iniciadores era controlada através de misturas sem a presença de cDNA. Todas as reações foram realizadas em trélicas. Os níveis de expressão gênica dos TLRs (1-10), IL-8, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-1 β e HSP70 foram normalizados com RNA ribossômico 18s (rRNA). As condições para PCR incluíram: 50°C por 2 min, 95°C por 15 min, a seguir 40 ciclos de 95°C por 15 sec (denaturação), 60°C por 60 sec (hibridização ou anelamento) e um período de extensão 72°C por 30 segundos (ABI Prism[®] 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Desenho dos iniciadores (“primers”)

Iniciadores para os TLRs, citocinas e HSP70 foram desenhados utilizando o programa Primer Express[®] 1.5 (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA) (quadro 2). Iniciadores para os TLRs foram adquiridos através de Operon (Qiagen, Mississauga, Ontario) e os iniciadores para as citocinas foram comprados na ATGC Corp. (Toronto, Ontario, Canada).

Análise estatística

Os resultados foram comparados por correlação de variáveis múltiplas entre os valores dos níveis de expressão dos TLRs com citocinas e HSP70 em todos os diferentes tempos das biópsias. Os grupos com os diferentes tempos de coleta das amostras foram comparados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Análise de variância (ANOVA) foi realizada para correlação entre dados clínicos e os níveis de expressão dos TLRs, citocinas e HSP70. Teste não paramétrico de Sperman e regressão linear simples foram utilizados para comparação entre TLRs, citocinas, dados clínicos e HSP70. Teste “t” de student foi utilizado avaliar as diferenças entre os níveis de expressão dos diferentes TLRs com o tempo de intubação dos doadores. Os valores de *P* menores que 0.05 foram considerados como significativos. Os resultados são expressos como media ± erro padrão (SEM) ou como mediana - intervalo de variação. O programa JMP5[®] The Statistical Discovery Software[®] (SAS Institute Inc, Campus Drive Cary, NC) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

Quadro 2: “Primers” utilizados nas reações da PCR com suas respectivas concentrações

Símbolo	Número para acesso (Genbank)	"Primer" (3'-5')	concen. (µM)	"Primer" (5'-3')	concen. (µM)
TLR1	NM_003263	CAAGTGAAAAATATTCCTCCTGTTGA	0.61	TGCGACCCGAAGGTATATATTTTTTA	0.66
TLR2	NM_003264	TCTGCAAGCTGCGGAAGATAAT	0.64	GCAGCTCTCAGATTACCCAAAA	0.57
TLR3	NM_003265	TTTCGGGCCAGCT TTCAG	0.71	TTTCACACGTGCAATCAAAGG	0.69
TLR4	NM_003266	GGACTGGGTAAGGAATGAGCTAGTA	0.42	CACACCGGAATAAAGTCTCTGT	0.53
TLR5	NM_003268	TTTGAGGGACTTTCTCATCTTCAAG	0.73	GAGGCTTAGTCCCCTTAATGCA	0.74
TLR6	NM_006068	GGATGATGGTGAATAGTACAGTCGTAA	0.53	CAGTTCCCCAGATGAAACATTG	0.67
TLR7	NM_016562	AAGCCCTTTCAGAAGTCCAAGTT	0.73	GGTGAAGCTTGCAGGTTTGT	0.67
TLR8	NM_138636	CGGATCTGTAAGAGCTCCATCCT	0.58	TCAAGACCACATTTCTCAGAGTTTG	0.78
TLR9	NM_017442	TGAAGACTTCAGGCCCAACTG	0.66	TGCACGGTCACCAGGTTGT	0.63
TLR10	NM_030956	CCCACCAGGTATCATAAACTGAAA	0.63	CGAAGTTTGCCAGAAAAG	0.58
IL-6	NM_000600	GCTGCAGGACATGACAACCTCA	0.41	TGAGGTGCCCATGCTACATTT	0.54
IL-8	NM_000584	CAGGAATTGAATGGGTTTGC	0.50	AGCAGACTAGGGTTGCCAGA	0.48
IL-10	NM_000572	AAGCCTGACCACGCTTCTA	0.51	GCTCCCTGGTTTCTCTTCT	0.44
IL-1β	NM_000576	GCACGATGCACCTGTACGAT	0.51	AGACATACCAAGCTTTTTTGT	0.47
Hsp70	NM_005345	AGGCCGACAAGAAGAAGGTGCT	0.45	TGGTACAGTCCGCTGATGATGG	0.53
INF-γ	NM_000619	ACTGTCGCCAGCAGCTAAAAC	0.57	TCAAATATTGCAGGCAGGACAA	0.57
rRNA 18S	M10098	GTAACCCGTTGAACCCCAT	0.52	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	0.43

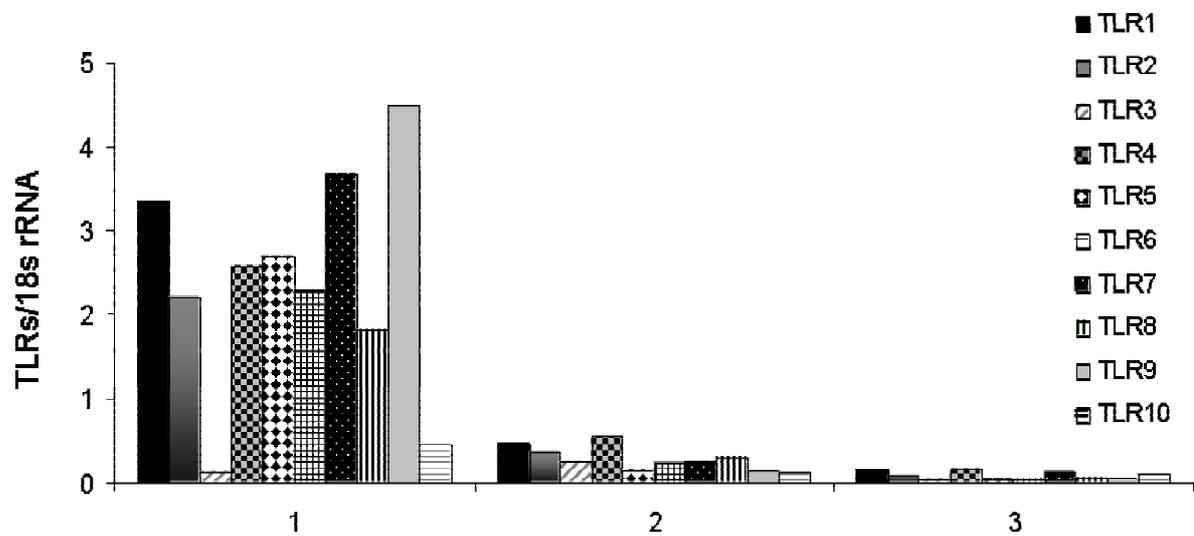
5. RESULTADOS

Expressão gênica dos receptores Toll-símile em tecido pulmonar

Como realizado em estudos anteriores (DE PERROT *et al.*, 2002), o período de isquemia fria foi utilizado como a primeira amostra a ser estudada. Os níveis dos TLRs no TIF apresentaram-se com diferentes expressões gênicas entre os pacientes, no entanto estes níveis seguiram um mesmo padrão para cada paciente, com exceção para o TLR3, o qual apresentou níveis inferiores quando comparado com os demais TLRs no TIF, como observado na figura 16, onde são apresentados os resultados de 3 pacientes com diferentes expressões gênicas no TIF. No entanto os níveis de TLR3 no período de isquemia quente não foram diferentes dos demais TLRs ($r > 0.90$, $P < 0,0001$).

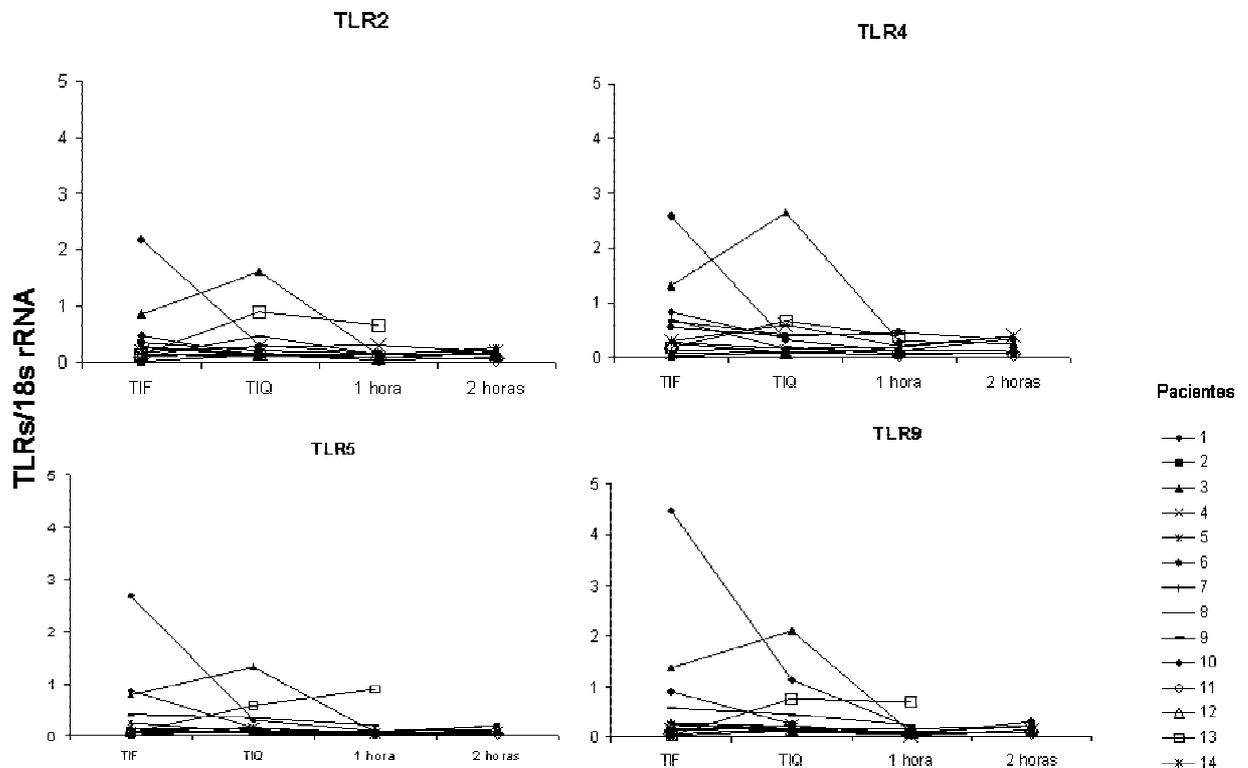
Após transplante, os níveis dos TLRs diminuíram quando comparados com os valores pré transplante (figura 17), passando cada TLR a apresentar diferente expressão gênica e comportamentos individuais. Os níveis de cada TLRs em 1h e 2h foram variáveis bem como a correlação entre seus valores (figura 17).

Figura 16 : Expressão gênica dos receptores Toll-símile em TIF



Legenda: Representação dos níveis relativos de expressão de todos os TLRs em 3 diferentes pacientes, mostrando a grande variabilidade observada entre os pacientes.

Figura 17 : Níveis dos receptores Toll-símile após transplante



Legenda: Representação dos níveis relativos de expressão de 4 TLRs (TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9) nos 4 tempos analisados em 14 pacientes. Os demais TLRs apresentam resultados semelhantes.

Dados Clínicos e expressão dos TLRs

Os níveis dos TLRs pré transplante foram comparados com os dados clínicos dos doadores, com o objetivo de verificar se algum fator dos doadores poderia influenciar a expressão dos TLRs antes do transplante.

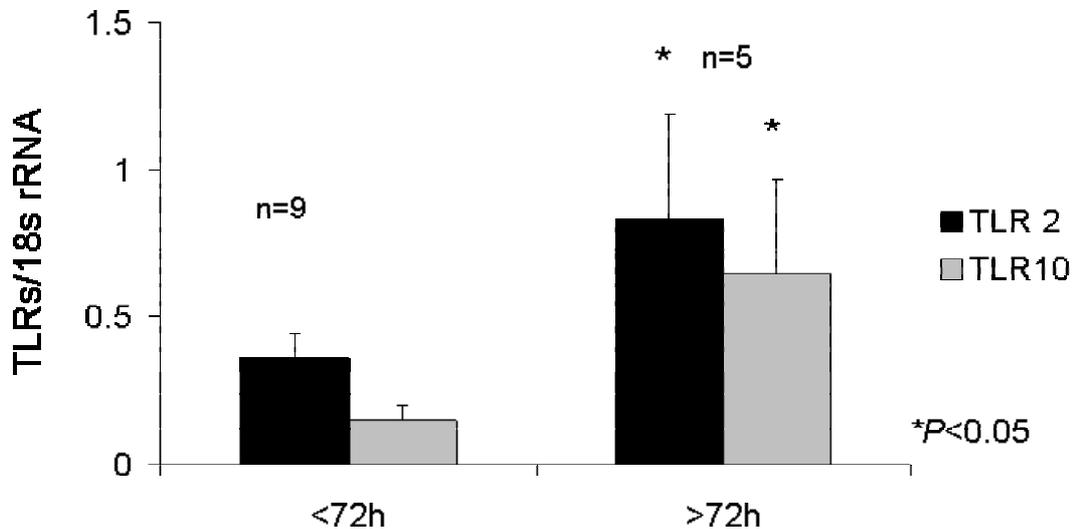
Doadores que foram intubados por períodos maiores que 72 horas (n=5) apresentaram níveis mais elevados de TLR2 e TLR10 quando comparados com os pacientes que foram intubados por períodos inferiores a 72 horas ($P<0.05$) (figura 18).

Não foi observada correlação entre o tempo de armazenamento e a expressão dos TLRs, já que quanto mais longo o período de isquemia maior o estresse celular e conseqüentemente mais intensa seria a lesão por isquemia e reperfusão (tempo médio de isquemia fria 180 min [52-275 min]). A presença de cultura positiva (n=11) no LBA também não influenciou a expressão dos TLRs. Causa da morte (trauma ou hemorragia intracerebral), história de tabagismo e idade do doador (>50 anos) não apresentaram correlação com a expressão dos TLRs antes do transplante.

Os níveis de TLR4 após transplante (1h e 2h) estavam correlacionados com receptores mais velhos (≥ 55 anos) quando comparados com pacientes mais novos ($P<0.05$). Não foi encontrada nenhuma correlação entre prognóstico, sexo, ou doença de base dos receptores, com os níveis de qualquer TLR após reperfusão.

Cinco pacientes morreram dentro de 30 dias após cirurgia sendo que dois foram devido a lesão de isquemia e reperfusão. O terceiro paciente apresentou acidente vascular cerebral morrendo no terceiro dia pós operatório (PO). Outro receptor morreu no 9º dia PO por infecção generalizada e o quinto paciente apresentou episódio de arritmia com parada cardíaca no 12º dia PO, apesar de uma excelente evolução pós operatória

Figura 18: Tempo de intubação dos doadores e expressão dos receptores Toll-símile 2 e 10.



Expressão gênica das citocinas e HSP70

A diferença entre a expressão gênica das citocinas no TIF apresentou grande variação entre os pacientes. Foi observado que os níveis de IL-8, IL-6 e IL-1 β apresentaram padrões semelhantes entre si ($r>0.95$, $P>0,001$), o qual foi diferente para IFN- γ , IL-10 e HSP70. Sendo que estes últimos apresentaram forte correlação entre si ($r>.99$, $P>0.0001$).

Após reperfusão houve uma tendência ao aumento das citocinas no entanto os valores pré transplante foram superiores aos observado pós transplante. Entretanto, os valores para HSP 70 aumentaram significativamente quando comparados com os valores pré transplante ($P>0.05$). Através do teste de Wilcoxon, o HSP70 foi o único gene cuja expressão apresentava um aumentado estatisticamente significativo após transplante($P>0.05$).

Após reperfusão os níveis de HSP70 de IL8 e IL-6 estavam correlacionados entre si ($r>0.9$, $P<0.001$). Enquanto IFN- γ e IL-10 também apresentaram correlação entre si ($r>0.98$, $P<0.001$). Após transplante, os níveis de expressão de IL-1 β apresentaram padrão diferente dos outros genes.

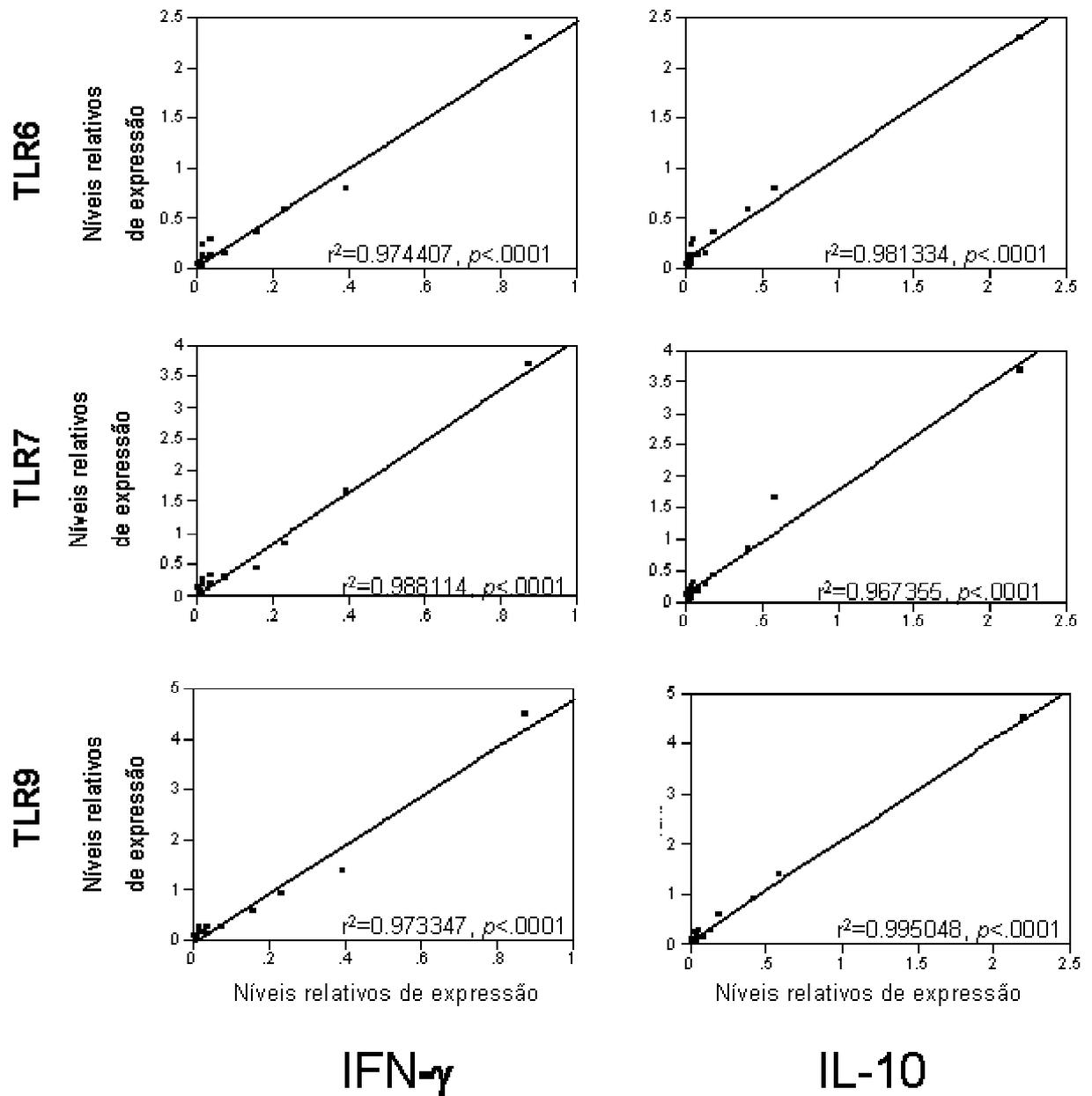
Dados clínicos, níveis de citocinas e HSP70

Foram comparados os dados clínicos dos doadores com a expressão da citocinas no TIF com objetivo de verificar se as condições dos doadores pré transplante poderiam influenciar na expressão da citocinas. Foi observado que os níveis de IFN- γ , ($r^2= 0.440743$, $P=0,0096$) estavam correlacionados com o tempo de intubação dos doadores assim como os níveis de IL-10 ($r^2=0.401677$, $P=0,0149$) e HSP70 ($r^2=0.465623$, $P=0.0072$). Os níveis de HSP70, uma hora após reperfusão apresentaram correlação negativa com a sobrevida dos pacientes ($r^2=-0.350434$, $P=0.0426$)

Correlação entre os níveis de mRNA de citocinas e HSP70 com TLRs.

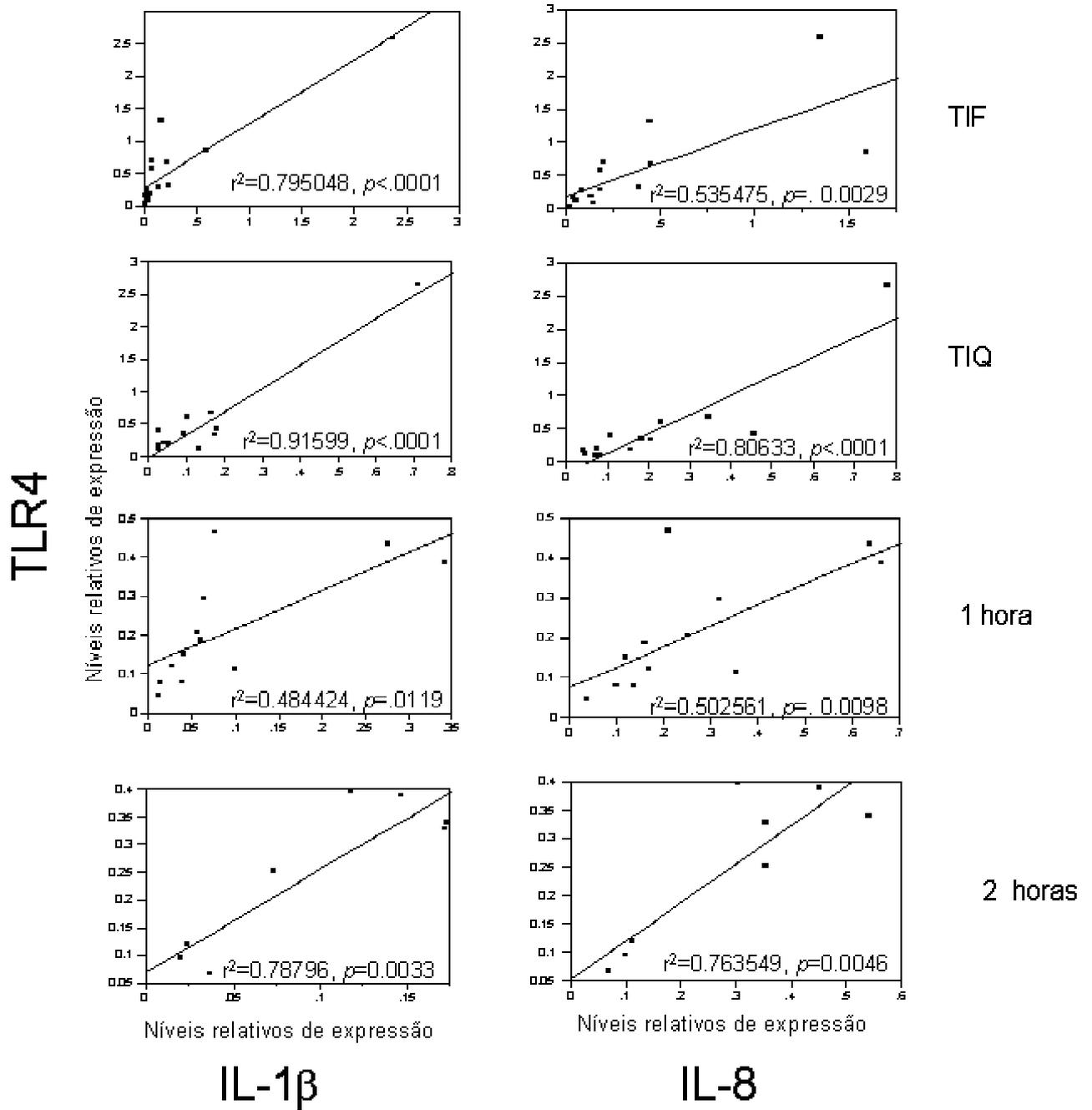
Os níveis de todos os TLRs com exceção para TLR3 apresentaram forte correlação com os níveis de IFN- γ , IL-10, IL-1 β e HSP70 no TIF ($r>0.95$; $P<0.001$) (figura 19). Entretanto estes valores não foram tão altos quando comparados com IL-6 ($r<0.66$) e IL-8 ($r<0.79$). Após a reperfusão dos enxertos pulmonares, houve correlação entre os TLRs 5, 6, 7, 8, 9 e 10 com os níveis de IFN- γ e IL-10 ($r>0.90$, $P>0.001$). TLR4 foi o único TLR que apresentou correlação com IL-1 β e IL-8 nos quatro diferentes períodos estudados (figura 20).

Figura 19 : Correlação entre a expressão gênica de IFN- γ e IL-10 com os níveis dos TLRs



Legenda: TLR6, TLR7 e TLR9 são apresentados como exemplos representativos da correlação entre TLRs com IFN- γ e IL-10

Figura 20 : Correlação entre os níveis de expressão gênica entre TLR4 com IL-1 β e IL-8



6. DISCUSSÃO

O transplante pulmonar em humanos é uma categoria única de transplante de órgãos sólidos, isto porque o pulmão está em direto contato com o ambiente e por conseguinte continuamente exposto a uma variedade de partículas aéreas e microorganismos. Por isso, uma cuidadosa avaliação na seleção dos doadores refletirá no sucesso do procedimento e resultados a longo prazo. Apesar dos vários parâmetros que tentam determinar a função e viabilidade dos pulmões dos doadores, muitas complicações podem ocorrer, tais como lesão por isquemia e reperfusão, rejeição de infecção. Recentemente, respostas por imunidade inata, mais especificamente a expressão e função de receptores celulares transmembrana chamados “Toll-like receptors” tem sido envolvida nestes três aspectos no cenário de transplante de órgãos (FONDEVILA *et al.*, 2003; GOLDSTEIN *et al.*, 2003; TAKEDA *et al.*, 2003).

No presente estudo foi confirmada a presença dos 10 receptores Toll-símile em tecido pulmonar. Entretanto, as amostras do tempo de isquemia fria provavelmente não refletem os níveis normais dos TLRs em tecido pulmonar, já que não foram coletadas antes da perfusão com a solução de preservação no momento da retirada dos órgãos para transplante. Estas biópsias coletadas no final do período de armazenamento hipotérmico refletem as expressões gênicas resultantes das alterações ocorridas pelo órgão durante todo o processo pré transplante. No entanto não existe nenhum estudo que confirme se as expressões gênicas dos TLRs antes da retirada de órgãos são semelhantes àquelas observadas no final do período de isquemia hipotérmica. Contudo, tempos prolongados de isquemia fria poderiam ser responsáveis por uma maior incidência de complicações pós transplante, no entanto esta afirmação, que foi demonstrada em modelos animais (SERRICK *et al.*, 1997) não foi confirmada em vários estudos clínicos, mostrando que tempos superiores a 6 horas ou mesmo superiores a 11 horas de armazenamento hipotérmico, não têm influência significativa na redução da sobrevida ou no aumento das complicações em pacientes transplantados pulmonares (ORENS *et al.*, 2003). No presente estudo, o período médio de isquemia hipotérmica foi de 180 minutos o que corresponde a um período isquêmico moderado (2-4h) e provavelmente com pouco impacto na expressão gênica dos TLRs.

As amostras no TIF representaram os níveis de expressão dos TLR nos doadores pulmonares, os quais apresentaram uma grande variação entre os diferentes indivíduos, sugerindo que estes níveis são específicos para cada pessoa, não havendo um padrão definido para a sua distribuição ou níveis de expressão. No entanto, o TLR3 foi o único TLR que apresentou-se quase homogeneamente com baixos níveis nas amostras do período de isquemia fria e permaneceu sem alteração significativa nos outros tempos estudados.

O achado de que TLR3 apresentou baixa expressão gênica na grande maioria dos pacientes, poderia estar baseado no fato de que o período de isquemia fria não teria influência na expressão deste gene ou mesmo que ele poderia não ser ativado por qualquer fator envolvido durante o processo de reperfusão, uma vez que este TLR em particular está relacionado ao reconhecimento de RNA viral de dupla hélice (TAKEDA *et al.*, 2003).

A diminuição dos níveis de mRNA dos TLRs após o período de isquemia foi observado na grande maioria dos pacientes. Isto deve-se ao fato de que os níveis de expressão dos TLRs foram muito diferentes e mais elevados nos tempos de isquemia fria e quente do que no período pós reperfusão, onde os níveis permaneceram baixos. No entanto, a resposta esperada seria um aumento da expressão dos TLRs após a reperfusão pois neste fase ocorre a recirculação do sangue com a presença de componentes sangüíneos do receptor no órgão transplantado. Este processo refletiria também em ativação tanto das células de defesa do enxerto como das do receptor, sugerindo um aumento da expressão de vários genes (FONDEVILA *et al.*, 2003). No entanto, em modelo de isquemia e reperfusão em rins de camundongos, mRNA para TLR2 e TLR4 não foram detectáveis após 1 e 6 horas utilizando PCR tradicional quando comparados com camundongos normais, sendo que estes níveis retornaram ao normal após 24 horas e começaram a aumentar significativamente em 3 e 5 dias (WOLFS *et al.*, 2002). Estes achados em modelo experimental não têm o objetivo de explicar os resultados do presente estudo, mas fornecem evidências de que este fenômeno de redução dos níveis dos TLRs pode ocorrer em outras situações de isquemia e reperfusão, como transplante pulmonar. Em adição a isto, Yamane *et al* em modelo de transplante pulmonar em ratos utilizando a técnica de “microarray”, na qual são detectados a expressão de aproximadamente 8.000 genes, observaram que os níveis de mRNA de dezenas de genes estavam reduzidos após 2 horas de

reperfusão em pulmões submetidos a diferentes períodos de isquemia fria. Em análise preliminar destes dados, a expressão de dois TLRs presentes apresentou-se reduzida após transplante.

Vários estudos têm sugerido que as diferentes condições dos doadores, como idade (>45 anos) (DE PERROT *et al.*, 2002; CHRISTIE *et al.*, 2003) e causa da morte (TAKADA *et al.*, 1998) (trauma ou não traumático) podem influenciar na liberação de citocinas antes do transplante e esta liberação pode repercutir após transplante através de uma maior probabilidade de episódios precoces de rejeição aguda (WILHELM *et al.*, 1999; KUSAKA *et al.*, 2000; PRATSCHKE *et al.*, 2000). Em um estudo realizado com 500 pacientes submetidos a transplante pulmonar a causa da morte não influenciou nos resultados a curto prazo, no entanto foi observado uma incidência maior de episódios mais graves de rejeição aguda precoce, e subsequente desenvolvimento de bronquiolite obliterante em pacientes que receberam órgãos de doadores que haviam sofrido lesão cerebral por trauma (CICCONE *et al.*, 2002).

O tempo de intubação maior que dois dias é um fator de risco independente para pneumonia associada ao ventilador e a taxa de aumento desta condição tem sido estimada em 1 a 3% por dia de intubação em ventilação mecânica (TORRES *et al.*, 1999). Tempos mais prolongados de ventilação mecânica não significam estar diretamente relacionados com uma pobre função do enxerto após transplante, (BHORADE *et al.*, 2000; ORENS *et al.*, 2003). O tempo de intubação não tem sido associado com produção elevada de citocinas em amostras no período de isquemia fria (DE PERROT *et al.*, 2002). Entretanto, no presente estudo foi verificado que a expressão de dois TLRs, TLR2 e TLR10, estava associada a doadores que foram submetidos a ventilação mecânica por períodos superiores a 72 horas. Sendo que o TLR2 está envolvido em infecções por bactérias gram-positivas e o TLR10 ainda encontra-se sem ligante definitivo. O aumento da expressão destes receptores poderia estar relacionada a outros fatores que não somente o tempo de intubação, isto porque, tanto durante o período pós como pré retirada, vários fatores podem influenciar na função do enxerto, sugerindo que o ambiente onde estão os doadores pode ser decisivo para a expressão de alguns TLRs, mas não de todos. A sensibilidade de TLRs a estresse produzido por ventilação mecânica ainda não tem sido estudada, no entanto, estudos preliminares (ANDRADE *et al.*, 2003) revelaram

que estes receptores podem ter alguma resposta a estresse mecânico, principalmente o TLR10.

Um aumento da expressão das citocinas IL-10 e IFN- γ bem como HSP70 também estava associado ao tempo de intubação, refletindo que quanto maior o tempo de intubação maior a expressão destas citocinas. No entanto, estas observações podem ser específicas desta série, e necessitam ser confirmados por séries maiores ou em diferentes pacientes. Contudo, este achado sugere que talvez o tempo de intubação também possa refletir em um aumento das citocinas. Lesão por ventilação mecânica tem sido associada a aumento de citocinas, no entanto este aumento ocorre quando existe associação de outro fator, como por exemplo infecção, podendo levar a disfunção de múltiplos órgãos (IMAI *et al.*, 2003). A presença de HSP70 tem sido relacionada com aumento da sua expressão em ratos ventilados com altos volume (COPLAND *et al.*, 2003), o que no caso não se enquadra com o nosso estudo pois todos os doadores receberam os procedimentos padrões de ventilação, no entanto esta proteína quando estimulada antes de transplante pulmonar em ratos, parece proteger os pulmões enxertados (HIRATSUKA *et al.*, 1998), tanto que esta tem sido utilizada em terapia genética para melhorar a função do enxerto após transplante pulmonar em ratos (HIRATSUKA *et al.*, 1999).

Os níveis de HSP70 apresentaram-se significativamente aumentados após transplante, sugerindo que o quadro de isquemia e reperfusão por si pode ativar a expressão deste gen, achado este que já foi demonstrado por outros autores (POCKLEY, 2001). Proteínas “heat shock” são moléculas citoprotetoras e sua indução no período peri e imediato após transplante é provavelmente uma resposta protetora para a manutenção da integridade celular e tecidual (POCKLEY, 2001). Isto encontra-se baseado em relatos onde HSPs atenuam a lesão por isquemia e reperfusão (HIRATSUKA *et al.*, 1998) e que elas protegem as células endoteliais de necrose mediada por neutrófilos (WANG *et al.*, 1995) e uma variedade de tipos celulares contra lesão oxidativa (KAWANA *et al.*, 2000). Em adição, os níveis de expressão mais baixos de HSP70 em biópsias antes e após transplante de fígado estão associados a episódios precoces de rejeição (FLOHE *et al.*, 1998).

Em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea, o pico dos níveis protéicos de HSP70 ocorreu nos primeiros 30 minutos após cirurgia, permaneceram estáveis até 5 horas e diminuíram a níveis basais em 19 horas após

cirurgia (DYBDAHL *et al.*, 2002). Estes achados demonstram que a ativação das HSP pode ocorrer em situação clínica que resulte em isquemia e reperfusão cardíaca. Entretanto as amostras que foram analisadas refletem os níveis de HSP em sangue periférico, não revelando qual seria o órgão responsável pelo aumento da expressão de HSP70 (DYBDAHL *et al.*, 2002). No presente estudo, o aumento dos níveis de mRNA foi observado logo na primeira hora após transplante em tecido pulmonar submetido a reperfusão e estes estavam correlacionados negativamente com a sobrevida dos pacientes envolvidos no estudo. Este achado difere do estudo de Flohe et al (1998) onde níveis mais elevados de HSP em biópsias de fígado pré-transplante hepático estão relacionadas a um fator protetor em relação à presença de episódios precoces de rejeição aguda (FLOHE *et al.*, 1998). No entanto níveis elevados de HSP70 que ocorrem na resposta aguda, podem repercutir na viabilidade de órgãos transplantados tanto a curto como a longo prazo, uma vez que estas moléculas são funcionalmente ativas e podem diretamente influenciar uma grande variedade de diferentes células. A liberação das HSPs pode influenciar respostas inflamatórias agudas, como por exemplo, os membros da família das HSP60 podem induzir a expressão de moléculas de adesão e secreção de citocinas por células endoteliais vasculares humanas e macrófagos, conseqüentemente aumentando a adesão de neutrófilos e monócitos (POCKLEY, 2003).

O prognóstico a longo prazo dos aloenxertos pode ser resultado da estimulação da imunidade humoral pelas HSP, isto porque durante o transplante ocorre a ativação de linfócitos T periféricos e proliferação de células que infiltram o enxerto em resposta às HSP (MOLITERNO *et al.*, 1995), fazendo com que ocorra a formação de anticorpos contra HSP. Sendo assim, estes anticorpos podem reconhecer HSP como patógenos, como por exemplo quando estas moléculas são liberadas em condições de estresse celular (SCHETT *et al.*, 1995). Anticorpos circulantes contra HSP podem ser encontrados em indivíduos normais (POCKLEY *et al.*, 1998) e níveis elevados têm sido observados em doença vascular, hipertensão limítrofe, artrite reumatóide, diabetes (POCKLEY, 2001) e também em pacientes com pobre prognóstico após transplante cardíaco (LATIF *et al.*, 1995; LATIF *et al.*, 1997).

Os TLRs estão envolvidos na estimulação de células Th1, resultando na produção de citocinas, a qual pode ser representada pela produção de interferon gama (TAKEDA *et al.*, 2003). Esta afirmação pôde ser comprovada *in vivo*, em

estudo de isquemia e reperfusão em rins de camundongos tratados com anticorpos inibidores de IFN- γ após 5 dias, onde foi observado uma diminuição dos níveis de mRNA de TLR4, sugerindo que TLR4 estaria envolvido na produção de IFN- γ , no entanto isto não foi totalmente confirmado com TLR2 onde houve apenas uma diminuição parcial da expressão deste gene quando tentado o bloqueio do interferon. No entanto, este trabalho não fornece evidências a respeito da associação entre IFN- γ e TLRs no início da fase de reperfusão pois a expressão de TLR4 não foi detectada dentro das primeiras horas após reperfusão (WOLFS *et al.*, 2002).

No presente estudo foi observada uma associação entre IL-10 e IFN- γ , bem como com a expressão da maioria dos TLRs. A relação entre IL-10 e IFN- γ poderia ser explicada pelas propriedades anti-inflamatórias da IL-10, que neste caso estaria envolvida na proteção celular com o objetivo de regular a produção de citocinas, que no presente estudo, apresentou forte correlação com os níveis de IFN- γ . Além disso, esta citocina é produzida por linfócitos Th2, significando que tanto células Th1 e Th2 podem estar presentes durante o processo de reperfusão. Pode ser sugerido que o IFN- γ seria mediado pelos TLRs, e a IL-10 seria responsável tanto pela resposta a produção de IFN- γ bem como pela resposta às outras citocinas. Parece pouco provável que os níveis da IL-10 em associação com os TLRs parecem ser improváveis que sejam determinados pela produção de qualquer TLR, já que estudos experimentais de transplante de pele em animais sugerem que a estimulação de citocinas dependentes de células Th2 não parece estar relacionada a aos TLRs (GOLDSTEIN *et al.*, 2003). A correlação entre IL-1 β e TLRs no período de isquemia fria poderia ser explicada pois ambos compartilham a mesma via de sinalização, no entanto isto não se confirma após transplante onde os TLRs e IL-1 β apresentaram níveis distintos.

A associação entre a HSP70 e TLRs encontrada no TIF não foi observada durante os outros tempos estudados, no entanto um estudo com monócitos de pacientes submetidos a circulação extracorpórea revelou que estas células quando tratadas com HSP70, estimulavam TLR4 resultando na produção de IL-6 (DYBDAHL *et al.*, 2002). Em outro trabalho, a associação entre HSP70 exógeno mostrou ser responsável pela ativação de TLR4 (ASEA *et al.*, 2002). No entanto, no presente estudo esta associação não ocorreu após reperfusão, provavelmente pela presença de um mecanismo diferente neste tipo de injúria.

A fase de isquemia e reperfusão do enxerto apresenta-se como um complexo mecanismo que resulta na liberação de citocinas inflamatórias (IL-8, IL-6, IFN- γ , TNF α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10, IL-4). A expressão destas citocinas é variável de acordo com o tipo de órgão envolvido no transplante (LAND, 1998; GERLACH *et al.*, 1999; DE PERROT *et al.*, 2003b) e também devido às condições tanto dos doadores como dos receptores. Normalmente estas citocinas envolvidas na resposta inicial da fase de reperfusão, são chamadas citocinas efetoras de liberação precoce ou citocinas da fase aguda, que no caso de transplante pulmonar podem ser medidas tanto na corrente sanguínea (MAL *et al.*, 1998), lavado broncoalveolar (FISHER *et al.*, 2001) e tecido pulmonar (DE PERROT *et al.*, 2002). Muitas destas citocinas têm sido relacionadas com o prognóstico de pacientes transplantados, no entanto a IL-8 é considerada uma importante interleucina na resposta da fase aguda e também um marcador do prognóstico em transplante pulmonar, devido ao fato que elevados níveis de IL-8, em doadores, tem sido correlacionados com falência precoce do enxerto (FISHER *et al.*, 2001; DE PERROT *et al.*, 2002), refletindo em pobre prognóstico.

A ativação de citocinas por TLRs tem sido extensamente revisada (AKIRA, 2003) bem como a ativação de diferentes citocinas pelos TLRs, principalmente TLR4 (TAKEDA *et al.*, 2003). No presente trabalho, somente o TLR4 estava correlacionado com a expressão de IL-8 e IL-1 β . Esta associação com IL-1 β , poderia ser explicada pois ambos, TLR4 e IL-1 β , apresentam a mesma via de sinalização. Contudo, esta mesma via é compartilhada com os outros TLRs, nos quais essa associação não foi observada. Apesar de estudos *in vitro* demonstrarem que TLR4 estimula a produção de IL-8 (MEDZHITOV *et al.*, 1997a), no presente trabalho não podemos afirmar se isto realmente acontece no quadro de reperfusão do enxerto em transplante pulmonar, pois para confirmar esta observação, experimentos adicionais tanto *in vivo* como *in vitro* seriam necessários. No entanto, pode ser afirmado que ambos genes atuaram juntos tanto no período pré como pós transplante. Adicionalmente, baseado em outros estudos que demonstram que a IL-8 é um importante fator no prognóstico de pacientes transplantados pulmonares (DE PERROT *et al.*, 2002) e que os níveis sanguíneos de diferentes polimorfismos de TLR4 em doadores e receptores de enxerto pulmonar podem estar relacionados ao surgimento do primeiro episódio de bronquiolite obliterante (PALMER *et al.*, 2003). A observação da associação entre IL-

8 e TLR4 na presente série pode ser uma importante informação para estudos futuros com o objetivo de verificar se a ativação do TLR4 resulta na produção de IL-8.

Na presente série, apesar do número elevado de culturas positivas encontradas no lavado bronco-alveolar, tanto para bactérias Gram-positivas, como negativas, não houve correlação com qualquer TLR, pois estes receptores foram inicialmente descritos no reconhecimento de ligantes específicos de diferentes patógenos (MEDZHITOV *et al.*, 2000). Estes achados sugerem que em quadro de transplante pulmonar clínico a presença isolada de cultura positiva nos pulmões de doadores, sem a associação com outras anormalidades clínicas ou laboratoriais, poderia não estar envolvida com a expressão dos TLRs no período de isquemia fria. No entanto, em estudos com transplante hepático em ratos a presença de níveis elevados de LPS foram concomitantes com o aumento dos níveis de TLR2 após 6 horas de reperfusão (TSOULFAS *et al.*, 2002).

Este trabalho apresenta algumas limitações, primeiramente quanto ao número da amostra (14 pacientes) e também pelo diferente número de biópsias coletadas nos diferentes períodos. No entanto, este número parece ser suficiente quando são comparadas as expressões de diferentes genes em um mesmo paciente, apesar de um número maior de biópsias ser sempre desejável. Além disso, em situações clínicas devido a imprevistos durante os diferentes procedimentos cirúrgicos, pode ocorrer a falta de alguma amostra. Outro fator que limitou a coleta de biópsias após 2 horas foi que muitas vezes neste período a cavidade torácica já encontrava-se fechada.

Este trabalho também não tem por objetivo determinar uma relação de causa e efeito entre TLR, citocinas e HSP70. Para que isto seja realizado, experimentos mais elaborados através do estudo das vias de sinalização dos diferentes genes deveria ser realizado, tanto por meio de modelos animais bem como em estudos *in vitro*. Este trabalho visa observar e buscar compreender como a fase inicial de reperfusão em transplante pulmonar pode alterar a expressão gênica de citocinas importantes na resposta inflamatória do enxerto e como estas estão relacionadas no contexto da expressão gênica dos TLRs e HSP70.

7. CONCLUSÕES

Pela primeira vez, foi demonstrado que a expressão dos TLRs alterou-se durante o período de isquemia e reperfusão em transplante pulmonar em humanos.

A correlação entre TLR4 e IL-8/IL-1 β sugere que os TLRs pulmonares podem apresentar função na resposta precoce do enxerto.

O tempo de intubação dos doadores pulmonares pode influenciar a expressão de receptores Toll-símile específicos

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, S. N. AROCK, M. Mast cells and basophils in innate immunity. Semin Immunol, v.10, n.5, Oct, p.373-81. 1998.
- ABREU, M. T.; VORA, P.; FAURE, E.; THOMAS, L. S.; ARNOLD, E. T. ARDITI, M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. J Immunol, v.167, n.3, Aug 1, p.1609-16. 2001.
- AKIRA, S. Mammalian Toll-like receptors. Curr Opin Immunol, v.15, n.2, Apr, p.238. 2003.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol, v.2, n.8, Aug, p.675-80. 2001.
- ALEXOPOULOU, L.; HOLT, A. C.; MEDZHITOV, R. FLAVELL, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. Nature, v.413, n.6857, Oct 18, p.732-8. 2001.
- ALHO, H. S.; MAASILTA, P. K.; HARJULA, A. L.; HAMMAINEN, P.; SALMINEN, J. SALMINEN, U. S. Tumor necrosis factor-alpha in a porcine bronchial model of obliterative bronchiolitis. Transplantation, v.76, n.3, Aug 15, p.516-23. 2003.
- ALIPRANTIS, A. O.; WEISS, D. S.; RADOLF, J. D. ZYCHLINSKY, A. Release of Toll-like receptor-2-activating bacterial lipoproteins in Shigella flexneri culture supernatants. Infect Immun, v.69, n.10, Oct, p.6248-55. 2001.
- ANDRADE, C. Impacto da ventilação líquida parcial com perfluorocarbono após a reperfusão do enxerto em modelo canino de transplante pulmonar unilateral esquerdo. (Dissertação de Mestrado). Pneumologia, UFRGS, Porto Alegre, 2001. 89 p.
- ANDRADE, C. F.; BAI, X. H.; TSANG, M.; SANTOS, C. C.; DER, S.; KESHAVJEE, S. LIU, M. Expression and regulation of Toll-like receptors in human alveolar epithelial cells. Third Annual Research Day in Respiratory and Respiratory Physiology. Toronto: University Press, 2003. p.
- AOE, T.; INABA, H.; KON, S.; IMAI, M.; AONO, M.; MIZUGUCHI, T.; SAITO, T. NISHINO, T. Heat shock protein 70 messenger RNA reflects the severity of ischemia/hypoxia-reperfusion injury in the perfused rat liver. Crit Care Med, v.25, n.2, Feb, p.324-9. 1997.
- ASEA, A.; REHLI, M.; KABINGU, E.; BOCH, J. A.; BARE, O.; AURON, P. E.; STEVENSON, M. A. CALDERWOOD, S. K. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. J Biol Chem, v.277, n.17, Apr 26, p.15028-34. 2002.

ASHKAR, A. A. ROSENTHAL, K. L. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. Curr Mol Med, v.2, n.6, Sep, p.545-56. 2002.

AZZAWI, M.; HASLETON, P. S. HUTCHINSON, I. V. TNF-alpha in acute cardiac transplant rejection. Cytokines Cell Mol Ther, v.5, n.1, Mar, p.41-9. 1999.

BARTON, B. E. JACKSON, J. V. Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. Infect Immun, v.61, n.4, Apr, p.1496-9. 1993.

BASU, S.; BINDER, R. J.; SUTO, R.; ANDERSON, K. M. SRIVASTAVA, P. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. Int Immunol, v.12, n.11, Nov, p.1539-46. 2000.

BHORADE, S. M.; VIGNESWARAN, W.; MCCABE, M. A. GARRITY, E. R. Liberalization of donor criteria may expand the donor pool without adverse consequence in lung transplantation. The Journal of Heart and Lung Transplantation, v.19, n.12 SU -, 2000/12, p.1199-204. 2000.

BIFFL, W. L.; MOORE, E. E.; MOORE, F. A. PETERSON, V. M. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? Ann Surg, v.224, n.5, Nov, p.647-64. 1996.

BOEHLER, A. The role of interleukin-10 in lung transplantation. Transpl Immunol, v.9, n.2-4, May, p.121-4. 2002.

BOHN, E.; SING, A.; ZUMBIHL, R.; BIELFELDT, C.; OKAMURA, H.; KURIMOTO, M.; HEESEMANN, J. AUTENRIETH, I. B. IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. J Immunol, v.160, n.1, Jan 1, p.299-307. 1998.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol, v.25, n.2, Oct, p.169-93. 2000.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol, v.29, n.1, Aug, p.23-39. 2002.

BUTCHER, E. C. PICKER, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. Science, v.272, n.5258, Apr 5, p.60-6. 1996.

CAMARGO, C. A., JR.; MADDEN, J. F.; GAO, W.; SELVAN, R. S. CLAVIEN, P. A. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. Hepatology, v.26, n.6, Dec, p.1513-20. 1997.

CAMPOS, M. A.; ALMEIDA, I. C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E. P.; PROCOPIO, D. O.; TRAVASSOS, L. R.; SMITH, J. A.; GOLENBOCK, D. T. GAZZINELLI, R. T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J Immunol, v.167, n.1, Jul 1, p.416-23. 2001.

CHRISTIE, J. D.; BAVARIA, J. E.; PALEVSKY, H. I.; LITZKY, L.; BLUMENTHAL, N. P.; KAISER, L. R. KOTLOFF, R. M. Primary graft failure following lung transplantation. Chest, v.114, n.1, Jul, p.51-60. 1998.

CHRISTIE, J. D.; KOTLOFF, R. M.; POCHETTINO, A.; ARCASOY, S. M.; ROSENGARD, B. R.; LANDIS, J. R. KIMMEL, S. E. Clinical risk factors for primary graft failure following lung transplantation. Chest, v.124, n.4, Oct, p.1232-41. 2003.

CHUANG, T. ULEVITCH, R. J. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. Biochim Biophys Acta, v.1518, n.1-2, Mar 19, p.157-61. 2001.

CHUANG, T. H. ULEVITCH, R. J. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. Eur Cytokine Netw, v.11, n.3, Sep, p.372-8. 2000.

CICCONE, A. M.; STEWART, K. C.; MEYERS, B. F.; GUTHRIE, T. J.; BATTAFARANO, R. J.; TRULOCK, E. P.; COOPER, J. D. PATTERSON, G. A. Does donor cause of death affect the outcome of lung transplantation? J Thorac Cardiovasc Surg, v.123, n.3, Mar, p.429-34; discussion 34-6. 2002.

CIUBOTARIU, R.; LIU, Z.; COLOVAI, A. I.; HO, E.; ITESCU, S.; RAVALLI, S.; HARDY, M. A.; CORTESINI, R.; ROSE, E. A. SUCIU-FOCA, N. Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts. J Clin Invest, v.101, n.2, Jan 15, 1998, p.398-405. 1998.

CLAVIEN, P. A.; HARVEY, P. R. STRASBERG, S. M. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. Transplantation, v.53, n.5, May, p.957-78. 1992.

COPLAND, I. B.; KAVANAGH, B. P.; ENGELBERTS, D.; MCKERLIE, C.; BELIK, J. POST, M. Early changes in lung gene expression due to high tidal volume. Am J Respir Crit Care Med, v.168, n.9, Nov 1, p.1051-9. 2003.

DABBAGH, K. LEWIS, D. B. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. Curr Opin Infect Dis, v.16, n.3, Jun, p.199-204. 2003.

DAEMEN, M. A.; VAN'T VEER, C.; WOLFS, T. G. BUURMAN, W. A. Ischemia/reperfusion-induced IFN-gamma up-regulation: involvement of IL-12 and IL-18. J Immunol, v.162, n.9, May 1, p.5506-10. 1999.

DE PERROT, M.; FISCHER, S.; LIU, M.; IMAI, Y.; MARTINS, S.; SAKIYAMA, S.; TABATA, T.; BAI, X. H.; WADDELL, T. K.; DAVIDSON, B. L. KESHAVJEE, S. Impact of human interleukin-10 on vector-induced inflammation and early graft function in rat lung transplantation. Am J Respir Cell Mol Biol, v.28, n.5, May, p.616-25. 2003a.

DE PERROT, M.; LIU, M.; WADDELL, T. K. KESHAVJEE, S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. Am J Respir Crit Care Med, v.167, n.4, February 15, 2003, p.490-511. 2003b.

DE PERROT, M.; SEKINE, Y.; FISCHER, S.; WADDELL, T. K.; MCRAE, K.; LIU, M.; WIGLE, D. A. KESHAVJEE, S. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med, v.165, n.2, Jan 15, p.211-5. 2002.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. Ann N Y Acad Sci, v.856, Sep 29, p.1-11. 1998.

DINARELLO, C. A. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. Eur Cytokine Netw, v.11, n.3, Sep, p.483-6. 2000a.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. Chest, v.118, n.2, Aug, p.503-8. 2000b.

DU CLOS, T. W. Function of C-reactive protein. Ann Med, v.32, p.274-8. 2000.

DYBDAHL, B.; WAHBA, A.; LIEN, E.; FLO, T. H.; WAAGE, A.; QURESHI, N.; SELLEVOLD, O. F.; ESPEVIK, T. SUNDAN, A. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. Circulation, v.105, n.6, Feb 12, p.685-90. 2002.

ECHCHANNAOUI, H.; FREI, K.; SCHNELL, C.; LEIB, S. L.; ZIMMERLI, W. LANDMANN, R. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. J Infect Dis, v.186, n.6, Sep 15, p.798-806. 2002.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G. ENDRES, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. Immunology Today, v.18, n.10 SU -, 1997/10, p.487-92. 1997.

FISCHER, S.; CASSIVI, S. D.; XAVIER, A. M.; CARDELLA, J. A.; CUTZ, E.; EDWARDS, V.; LIU, M. KESHAVJEE, S. Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation. Ann Surg, v.231, n.3, Mar, p.424-31. 2000.

FISHER, A. J.; DONNELLY, S. C.; HIRANI, N.; HASLETT, C.; STRIETER, R. M.; DARK, J. H. CORRIS, P. A. Elevated levels of interleukin-8 in donor lungs is associated with early graft failure after lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med, v.163, n.1, Jan, p.259-65. 2001.

FLOHE, S.; SPEIDEL, N.; FLACH, R.; LANGE, R.; ERHARD, J. SCHADE, F. U. Expression of HSP 70 as a potential prognostic marker for acute rejection in human liver transplantation. Transpl Int, v.11, n.2, p.89-94. 1998.

FONDEVILA, C.; BUSUTTIL, R. W. KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. Exp Mol Pathol, v.74, n.2, Apr, p.86-93. 2003.

FOX-MARSH, A. HARRISON, L. C. Emerging evidence that molecules expressed by mammalian tissue grafts are recognized by the innate immune system. J Leukoc Biol, v.71, n.3, Mar, p.401-9. 2002.

FRASER, I. P.; KOZIEL, H. EZEKOWITZ, R. A. B. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. Seminars in Immunology, v.10, n.5, 1998/10, p.363-72. 1998.

GADJEVA, M.; THIEL, S. JENSENIUS, J. C. The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response. Curr. Opin. Immunol., v.13, p.74-8. 2001.

GALILI, U. The alpha-gal epitope (Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. Biochimie, v.83, n.7, Jul, p.557-63. 2001.

GALILI, U.; TIBELL, A.; SAMUELSSON, B.; RYDBERG, L. GROTH, C. G. Increased anti-Gal activity in diabetic patients transplanted with fetal porcine islet cell clusters. Transplantation, v.59, n.11, Jun 15, p.1549-56. 1995.

GALLUCCI, S. MATZINGER, P. Danger signals: SOS to the immune system. Curr Opin Immunol, v.13, n.1, Feb, p.114-9. 2001.

GERLACH, J.; JORRES, A.; NOHR, R.; ZEILINGER, K.; SPATKOWSKI, G. NEUHAUS, P. Local liberation of cytokines during liver preservation. Transpl Int, v.12, n.4, p.261-5. 1999.

GOLDSTEIN, D. R.; TESAR, B. M.; AKIRA, S. LAKKIS, F. G. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. J Clin Invest, v.111, n.10, May, p.1571-8. 2003.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. Res. Immunol, v.149, n.7-8, p.685-8. 1998.

HAJJAR, A. M.; O'MAHONY, D. S.; OZINSKY, A.; UNDERHILL, D. M.; ADEREM, A.; KLEBANOFF, S. J. WILSON, C. B. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. J Immunol, v.166, n.1, Jan 1, p.15-9. 2001.

HALLORAN, P.; URMSON, J.; VAN DER MEIDE, P. AUTENRIED, P. Regulation of MHC expression in vivo. II. IFN-alpha/beta inducers and recombinant IFN-alpha modulate MHC antigen expression in mouse tissues. J Immunol, v.142, n.12, June 15, 1989, p.4241-7. 1989.

HALLORAN, P. F.; MILLER, L. W.; URMSON, J.; RAMASSAR, V.; ZHU, L.-F.; KNETEMAN, N. M.; SOLEZ, K. AFROUZIAN, M. IFN-gamma alters the pathology of

graft rejection: Protection from early necrosis. J Immunol, v.166, n.12, June 15, 2001, p.7072-81. 2001.

HARADA, A.; SEKIDO, N.; AKAHOSHI, T.; WADA, T.; MUKAIDA, N. MATSUSHIMA, K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. J Leukoc Biol, v.56, n.5, Nov, p.559-64. 1994.

HASHIMOTO, C.; HUDSON, K. L. ANDERSON, K. V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell, v.52, n.2, Jan 29, p.269-79. 1988.

HAYASHI, F.; SMITH, K. D.; OZINSKY, A.; HAWN, T. R.; YI, E. C.; GOODLETT, D. R.; ENG, J. K.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D. M. ADEREM, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature, v.410, n.6832, Apr 26, p.1099-103. 2001.

HAYNES, L. M.; MOORE, D. D.; KURT-JONES, E. A.; FINBERG, R. W.; ANDERSON, L. J. TRIPP, R. A. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. J Virol, v.75, n.22, Nov, p.10730-7. 2001.

HE, H.; STONE, J. R. PERKINS, D. L. Analysis of robust innate immune response after transplantation in the absence of adaptive immunity. Transplantation, v.73, n.6, Mar 27, p.853-61. 2002.

HE, H.; STONE, J. R. PERKINS, D. L. Analysis of differential immune responses induced by innate and adaptive immunity following transplantation. Immunology, v.109, n.2, Jun, p.185-96. 2003.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J. WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. Genome Res, v.6, n.10, Oct, p.986-94. 1996.

HEMMI, H.; KAISHO, T.; TAKEUCHI, O.; SATO, S.; SANJO, H.; HOSHINO, K.; HORIUCHI, T.; TOMIZAWA, H.; TAKEDA, K. AKIRA, S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. Nat Immunol, v.3, n.2, Feb, p.196-200. 2002.

HIDALGO, L. G. HALLORAN, P. F. Role of IFN-gamma in allograft rejection. Crit Rev Immunol, v.22, n.4, p.317-49. 2002.

HIRANO, T.; AKIRA, S.; TAGA, T. KISHIMOTO, T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. Immunol Today, v.11, n.12, Dec, p.443-9. 1990.

HIRATSUKA, M.; MORA, B. N.; YANO, M.; MOHANAKUMAR, T. PATTERSON, G. A. Gene transfer of heat shock protein 70 protects lung grafts from ischemia-reperfusion injury. Ann Thorac Surg, v.67, n.5, May, p.1421-7. 1999.

HIRATSUKA, M.; YANO, M.; MORA, B. N.; NAGAIHIRO, I.; COOPER, J. D. PATTERSON, G. A. Heat shock pretreatment protects pulmonary isografts from subsequent ischemia-reperfusion injury. J Heart Lung Transplant, v.17, n.12, Dec, p.1238-46. 1998.

HIRSCHFELD, M.; WEIS, J. J.; TOSHCHAKOV, V.; SALKOWSKI, C. A.; CODY, M. J.; WARD, D. C.; QURESHI, N.; MICHALEK, S. M. VOGEL, S. N. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. Infect Immun, v.69, n.3, Mar, p.1477-82. 2001.

HORNUNG, V.; ROTHENFUSSER, S.; BRITSCH, S.; KRUG, A.; JAHRSDORFER, B.; GIESE, T.; ENDRES, S. HARTMANN, G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. J Immunol, v.168, n.9, May 1, p.4531-7. 2002.

HOWARD, T. K.; KLINTMALM, G. B.; COFER, J. B.; HUSBERG, B. S.; GOLDSTEIN, R. M. GONWA, T. A. The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient. Transplantation, v.49, n.1, Jan, p.103-7. 1990.

HUTCHINGS, A.; WU, J.; ASIEDU, C.; HUBBARD, W.; ECKHOFF, D.; CONTRERAS, J.; THOMAS, F. T.; NEVILLE, D. THOMAS, J. M. The immune decision toward allograft tolerance in non-human primates requires early inhibition of innate immunity and induction of immune regulation. Transpl Immunol, v.11, n.3-4, Jul-Sep, p.335-44. 2003.

IMAI, Y.; PARODO, J.; KAJIKAWA, O.; DE PERROT, M.; FISCHER, S.; EDWARDS, V.; CUTZ, E.; LIU, M.; KESHAVJEE, S.; MARTIN, T. R.; MARSHALL, J. C.; RANIERI, V. M. SLUTSKY, A. S. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. Jama, v.289, n.16, Apr 23-30, p.2104-12. 2003.

JOHNSON, G. B.; BRUNN, G. J.; KODAIRA, Y. PLATT, J. L. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. J Immunol, v.168, n.10, May 15, p.5233-9. 2002.

KAISER, V. DIAMOND, G. Expression of mammalian defensin genes. J. Leukoc. Biol., v.68, p.779-84. 2000.

KAWANA, K.; MIYAMOTO, Y.; TANONAKA, K.; HAN-NO, Y.; YOSHIDA, H.; TAKAHASHI, M. TAKEO, S. Cytoprotective mechanism of heat shock protein 70 against hypoxia/reoxygenation injury. J Mol Cell Cardiol, v.32, n.12, Dec, p.2229-37. 2000.

KAWASAKI, K.; AKASHI, S.; SHIMAZU, R.; YOSHIDA, T.; MIYAKE, K. NISHIJIMA, M. Involvement of TLR4/MD-2 complex in species-specific lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. J Endotoxin Res, v.7, n.3, p.232-6. 2001.

KIRSCHNING, C. J. SCHUMANN, R. R. TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. Curr Top Microbiol Immunol, v.270, p.121-44. 2002.

KRENSKY, A. M.; WEISS, A.; CRABTREE, G.; DAVIS, M. M. PARHAM, P. T. lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. N Engl J Med, n.322, p.510-7. 1990.

KRIEGER, N.; YIN, D. FATHMAN, C. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allojection. J. Exp. Med., v.184, n.5, November 1, 1996, p.2013-8. 1996.

KURT-JONES, E. A.; POPOVA, L.; KWINN, L.; HAYNES, L. M.; JONES, L. P.; TRIPP, R. A.; WALSH, E. E.; FREEMAN, M. W.; GOLENBOCK, D. T.; ANDERSON, L. J. FINBERG, R. W. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. Nat Immunol, v.1, n.5, Nov, p.398-401. 2000.

KUSAKA, M.; PRATSCHKE, J.; WILHELM, M. J.; ZIAI, F.; ZANDI-NEJAD, K.; MACKENZIE, H. S.; HANCOCK, W. W. TILNEY, N. L. Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death. Transplantation, v.69, n.3, Feb 15, p.405-10. 2000.

LAND, W. The potential impact of the reperfusion injury on acute and chronic rejection events following organ transplantation. Transplant Proc, v.26, n.6, Dec, p.3169-71. 1994.

LAND, W. Postischemic reperfusion injury and cytokines. Transplant Proc, v.30, n.8, Dec, p.4237-8. 1998.

LATIF, N.; ROSE, M. L.; YACOUB, M. H. DUNN, M. J. Association of pretransplantation antiheart antibodies with clinical course after heart transplantation. J Heart Lung Transplant, v.14, n.1 Pt 1, Jan-Feb, p.119-26. 1995.

LATIF, N.; YACOUB, M. H. DUNN, M. J. Association of pretransplant anti-heart antibodies against human heat shock protein 60 with clinical course following cardiac transplantation. Transplant Proc, v.29, n.1-2, Feb-Mar, p.1039-40. 1997.

LECHLER, R. I.; LOMBARDI, G.; RICHARD BATCHELOR, J.; REINSMOEN, N. BACH, F. H. The molecular basis of alloreactivity. Immunology Today, v.11, p.83-8. 1990.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M. HOFFMANN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell, v.86, n.6, Sep 20, p.973-83. 1996.

LEMAY, S.; RABB, H.; POSTLER, G. SINGH, A. K. Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia-reperfusion injury. Transplantation, v.69, n.5, Mar 15, p.959-63. 2000.

LENTSCH, A. B.; YOSHIDOME, H.; KATO, A.; WARNER, R. L.; CHEADLE, W. G.; WARD, P. A. EDWARDS, M. J. Requirement for interleukin-12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. Hepatology, v.30, n.6, Dec, p.1448-53. 1999.

LI, M.; CARPIO, D. F.; ZHENG, Y.; BRUZZO, P.; SINGH, V.; OUAZ, F.; MEDZHITOV, R. M. BEG, A. A. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. J Immunol, v.166, n.12, Jun 15, p.7128-35. 2001.

LIEN, E. INGALLS, R. R. Toll-like receptors. Crit Care Med, v.30, n.1 Suppl, Jan, p.S1-11. 2002.

LIEN, E.; MEANS, T. K.; HEINE, H.; YOSHIMURA, A.; KUSUMOTO, S.; FUKASE, K.; FENTON, M. J.; OIKAWA, M.; QURESHI, N.; MONKS, B.; FINBERG, R. W.; INGALLS, R. R. GOLENBOCK, D. T. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. J Clin Invest, v.105, n.4, Feb, p.497-504. 2000.

LUCAS, M.; STUART, L. M.; SAVILL, J. LACY-HULBERT, A. Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion. J Immunol, v.171, n.5, Sep 1, p.2610-5. 2003.

MAL, H.; DEHOUX, M.; SLEIMAN, C.; BOCZKOWSKI, J.; LESECHE, G.; PARIENTE, R. FOURNIER, M. Early release of proinflammatory cytokines after lung transplantation. Chest, v.113, n.3, March 1, 1998, p.645-51. 1998.

MASSARI, P.; HENNEKE, P.; HO, Y.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D. T. WETZLER, L. M. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. J Immunol, v.168, n.4, Feb 15, p.1533-7. 2002.

MATZINGER, P. An innate sense of danger. Seminars in Immunology, v.10, n.5, 1998/10, p.399-415. 1998.

MCCORD, J. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. New Engl J Med, v.312, p.159-63. 1985.

MCRAE, K. M. Pulmonary transplantation. Curr Opin Anaesthesiol, n.13, p.53-9. 2000.

MEANS, T. K.; JONES, B. W.; SCHROMM, A. B.; SHURTLEFF, B. A.; SMITH, J. A.; KEANE, J.; GOLENBOCK, D. T.; VOGEL, S. N. FENTON, M. J. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses. J Immunol, v.166, n.6, Mar 15, p.4074-82. 2001.

MEDURI, G.; HEADLEY, S.; KOHLER, G.; STENTZ, F.; TOLLEY, E.; UMBERGER, R. LEEPER, K. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. Chest, v.107, n.4, April 1, 1995, p.1062-73. 1995.

MEDZHITOV, R. JANEWAY, C., JR. The Toll receptor family and microbial recognition. Trends Microbiol, v.8, n.10, Oct, p.452-6. 2000.

MEDZHITOV, R. JANEWAY, C. A., JR. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Current Opinion in Immunology, v.9, n.1, p.4-9. 1997a.

MEDZHITOV, R. JANEWAY, C. A., JR. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell, v.91, n.3, Oct 31, p.295-8. 1997b.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P. JANEWAY, C. A., JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature, v.388, n.6640, Jul 24, p.394-7. 1997a.

MIETTINEN, M.; SARENEVA, T.; JULKUNEN, I. MATIKAINEN, S. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. Genes Immun, v.2, n.6, Oct, p.349-55. 2001.

MILLER, E. J.; COHEN, A. B. MATTHAY, M. A. Increased interleukin-8 concentrations in the pulmonary edema fluid of patients with acute respiratory distress syndrome from sepsis. Crit Care Med, v.24, n.9, Sep, p.1448-54. 1996.

MIYAKE, K.; YAMASHITA, Y.; OGATA, M.; SUDO, T. KIMOTO, M. RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. J Immunol, v.154, n.7, Apr 1, p.3333-40. 1995.

MOLITERNO, R.; WOAN, M.; BENTLEJEWSKI, C.; QIAN, J.; ZEEVI, A.; PHAM, S.; GRIFFITH, B. P. DUQUESNOY, R. J. Heat shock protein-induced T-lymphocyte propagation from endomyocardial biopsies in heart transplantation. J Heart Lung Transplant, v.14, n.2, Mar-Apr, p.329-37. 1995.

MONTON, C. TORRES, A. Lung inflammatory response in pneumonia. Monaldi Arch Chest Dis, v.53, n.1, Feb, p.56-63. 1998.

MUELLER, A. R.; PLATZ, K. P.; HAAK, M.; UNDI, H.; MULLER, C.; KOTTGEN, E.; WEIDEMANN, H. NEUHAUS, P. The release of cytokines, adhesion molecules, and extracellular matrix parameters during and after reperfusion in human liver transplantation. Transplantation, v.62, n.8, Oct 27, p.1118-26. 1996a.

MUELLER, A. R.; PLATZ, K. P.; WIEHE, I.; MONTICELLI, F.; LIERATH, J.; KEITEL, M.; STREICH, R.; BECHSTEIN, W. O. NEUHAUS, P. Cytokine pattern in patients with infections after liver transplantation. Transpl Int, v.9 Suppl 1, p.S126-31. 1996b.

MUZIO, M.; BOSISIO, D.; POLENTARUTTI, N.; D'AMICO, G.; STOPPACCIARO, A.; MANCINELLI, R.; VAN'T VEER, C.; PENTON-ROL, G.; RUCO, L. P.; ALLAVENA, P. MANTOVANI, A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. J Immunol, v.164, n.11, Jun 1, p.5998-6004. 2000.

NETEA, M. G.; VAN DEUREN, M.; KULLBERG, B. J.; CAVAILLON, J. M. VAN DER MEER, J. W. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? Trends Immunol, v.23, n.3, Mar, p.135-9. 2002.

NISHIGUCHI, M.; MATSUMOTO, M.; TAKAO, T.; HOSHINO, M.; SHIMONISHI, Y.; TSUJI, S.; BEGUM, N. A.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; TOYOSHIMA, K. SEYA, T. Mycoplasma fermentans lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. J Immunol, v.166, n.4, Feb 15, p.2610-6. 2001.

OGATA, H.; SU, I.; MIYAKE, K.; NAGAI, Y.; AKASHI, S.; MECKLENBRAUKER, I.; RAJEWSKY, K.; KIMOTO, M. TARAKHOVSKY, A. The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. J Exp Med, v.192, n.1, Jul 3, p.23-9. 2000.

OHASHI, K.; BURKART, V.; FLOHE, S. KOLB, H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. J Immunol, v.164, n.2, Jan 15, p.558-61. 2000.

OKAMURA, Y.; WATARI, M.; JERUD, E. S.; YOUNG, D. W.; ISHIZAKA, S. T.; ROSE, J.; CHOW, J. C. STRAUSS, J. F., 3RD. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. J Biol Chem, v.276, n.13, Mar 30, p.10229-33. 2001.

OPITZ, B.; SCHRODER, N. W.; SPREITZER, I.; MICHELSEN, K. S.; KIRSCHNING, C. J.; HALLATSCHEK, W.; ZHRINGER, U.; HARTUNG, T.; GOBEL, U. B. SCHUMANN, R. R. Toll-like receptor-2 mediates Treponema glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. J Biol Chem, v.276, n.25, Jun 22, p.22041-7. 2001.

ORENS, J. B.; BOEHLER, A.; DE PERROT, M.; ESTENNE, M.; GLANVILLE, A. R.; KESHAVJEE, S.; KOTLOFF, R.; MORTON, J.; STUDER, S. M.; VAN RAEMDONCK, D.; WADDEL, T. SNELL, G. I. A review of lung transplant donor acceptability criteria. J Heart Lung Transplant, v.22, n.11, Nov, p.1183-200. 2003.

OZ, M. C.; LIAO, H.; NAKA, Y.; SELDOMRIDGE, A.; BECKER, D. N.; MICHLER, R. E.; SMITH, C. R.; ROSE, E. A.; STERN, D. M. PINSKY, D. J. Ischemia-induced interleukin-8 release after human heart transplantation. A potential role for endothelial cells. Circulation, v.92, n.9 Suppl, Nov 1, p.11428-32. 1995.

OZINSKY, A.; SMITH, K. D.; HUME, D. UNDERHILL, D. M. Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. J Endotoxin Res, v.6, n.5, p.393-6. 2000.

PALMER, S. M.; BURCH, L. H.; DAVIS, R. D.; HERCZYK, W. F.; HOWELL, D. N.; REINSMOEN, N. L. SCHWARTZ, D. A. The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med, v.168, n.6, Sep 15, p.628-32. 2003.

PATERSON, H. M.; MURPHY, T. J.; PURCELL, E. J.; SHELLEY, O.; KRIYNOVICH, S. J.; LIEN, E.; MANNICK, J. A. LEDERER, J. A. Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. J Immunol, v.171, n.3, Aug 1, p.1473-83. 2003.

PEREZ-VERDIA, A.; STETSON, S. J.; MCREE, S.; MAZUR, W.; KOERNER, M. M. TORRE-AMIONE, G. The effect of cytokines on cardiac allograft function: tumor necrosis factor alpha a mediator of chronic injury. Heart Fail Rev, v.6, n.2, Mar, p.137-41. 2001.

POCKLEY, A. G. Heat shock proteins, anti-heat shock protein reactivity and allograft rejection. Transplantation, v.71, n.11, Jun 15, p.1503-7. 2001.

POCKLEY, A. G. Heat shock proteins as regulators of the immune response. Lancet, v.362, n.9382, Aug 9, p.469-76. 2003.

POCKLEY, A. G.; SHEPHERD, J. CORTON, J. M. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. Immunol Invest, v.27, n.6, Dec, p.367-77. 1998.

PRATSCHKE, J.; WILHELM, M. J.; KUSAKA, M.; BEATO, F.; MILFORD, E. L.; HANCOCK, W. W. TILNEY, N. L. Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors. Ann Surg, v.232, n.2, Aug, p.263-71. 2000.

QAYUMI, A. K.; NIKBAKHT-SANGARI, M. N.; GODIN, D. V.; ENGLISH, J. C.; HORLEY, K. J.; KEOWN, P. A.; LIM, S. P.; ANSLEY, D. M. KOEHLE, M. S. The relationship of ischemia-reperfusion injury of transplanted lung and the up-regulation of major histocompatibility complex II on host peripheral lymphocytes. J Thorac Cardiovasc Surg, v.115, n.5, May, p.978-89. 1998.

RAMOS-PAYAN, R.; AGUILAR-MEDINA, M.; ESTRADA-PARRA, S.; GONZALEZ, Y. M. J. A.; FAVILA-CASTILLO, L.; MONROY-OSTRIA, A. ESTRADA-GARCIA, I. C. Quantification of cytokine gene expression using an economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR Green I. Scand J Immunol, v.57, n.5, May, p.439-45. 2003.

RIZZO, M.; ALEVY, Y. G.; SUNDARESAN, S.; LYNCH, J.; TRULOCK, E. P.; COOPER, J. D.; PATTERSON, G. A. MOHANAKUMAR, T. Increased expression of HDJ-2 (heat shock protein 40) and heat shock protein 70 in biopsy specimens of transplanted human lungs. J Heart Lung Transplant, v.17, n.3, Mar, p.241-9. 1998.

RUSSELL, M. E.; WALLACE, A. F.; HANCOCK, W. W.; SAYEGH, M. H.; ADAMS, D. H.; SIBINGA, N. E. S.; WYNER, L. R. KARNOVSKY, M. J. Upregulation of cytokines associated with macrophage activation in the Lewis-F344 rat transplantation model of chronic cardiac rejection. Transplantation, n.59, p.572-8. 1995a.

RUSSELL, M. E.; WALLACE, A. F.; WYNER, L. R.; NEWELL, J. B. KARNOVSKY, M. J. Upregulation and Modulation of Inducible Nitric Oxide Synthase in Rat Cardiac Allografts With Chronic Rejection and Transplant Arteriosclerosis. Circulation, v.92, n.3, August 1, 1995, p.457-64. 1995b.

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; FORSTER, R.; LIPP, M. LANZAVECCHIA, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature, v.401, n.6754, Oct 14, p.708-12. 1999.

SATAKE, M.; KAWAGISHI, N.; KUMAGI-BRAESCH, M.; SAMUELSSON, B. E.; RYDBERG, L.; TIBELL, A.; ANDERSSON, A.; KORSGREN, O.; GROTH, C. G. MOLLER, E. Specificity of human xenoantibodies formed in response to fetal porcine isletlike cell clusters. Transplant Proc, v.26, n.3, p.1122. 1994.

SAYEGH, M. H. TURKA, L. A. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. N Engl J Med, v.338, n.25, Jun 18, p.1813-21. 1998.

SAYEGH, M. H.; WATSCHINGER, B. CARPENTER, C. B. Mechanisms of T cell recognition of alloantigen: the role of peptides. Transplantation, n.57, p.1295-302. 1994.

SCHALL, T. J.; BACON, K.; TOY, K. J. GOEDEL, D. V. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. Nature, n.347,, p.669 - 71. 1990.

SCHETT, G.; XU, Q.; AMBERGER, A.; VAN DER ZEE, R.; RECHEIS, H.; WILLEIT, J. WICK, G. Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. J Clin Invest, v.96, n.6, Dec, p.2569-77. 1995.

SCHNARE, M.; BARTON, G. M.; HOLT, A. C.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. MEDZHITOV, R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. Nat Immunol, v.2, n.10, Oct, p.947-50. 2001.

SCHOLMA, J.; SLEBOS, D.-J.; MARIKE BOEZEN, H.; VAN DEN BERG, J. W. K.; VAN DER BIJ, W.; DE BOER, W. J.; KOETER, G. H.; TIMENS, W.; KAUFFMAN, H. F. POSTMA, D. S. Eosinophilic granulocytes and interleukin-6 level in bronchoalveolar lavage fluid are associated with the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med, v.162, n.6, December 1, 2000, p.2221-5. 2000.

SEKIDO, N.; MUKAIDA, N.; HARADA, A.; NAKANISHI, I.; WATANABE, Y. MATSUSHIMA, K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. Nature, v.365, n.6447, Oct 14, p.654-7. 1993.

SERRICK, C.; GIAID, A.; REIS, A. SHENNIB, H. Prolonged ischemia is associated with more pronounced rejection in the lung allograft. Ann Thorac Surg, v.63, n.1, Jan, p.202-8. 1997.

SERRICK, C.; LA FRANCESCA, S.; GIAID, A. SHENNIB, H. Cytokine interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma release after ischemia/reperfusion injury in a novel lung autograft animal model. Am J Respir Crit Care Med, v.152, n.1, Jul, p.277-82. 1995.

SHARMA, V. K.; BOLOGA, R. M.; XU, G. P.; LI, B.; MOURADIAN, J.; WANG, J.; SERUR, D. RAO, V. Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. Kidney Int, v.5, n.49, p.1297-303. 1996.

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K. KIMOTO, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med, v.189, n.11, Jun 7, p.1777-82. 1999.

STAHL, P. D. The mannose receptor and other macrophage lectins. Current Opinion in Immunology, v.4, n.1, 1992/2, p.49-52. 1992.

STRIETER, R. M.; BELPERIO, J. A. KEANE, M. P. Cytokines in innate host defense in the lung. J Clin Invest, v.109, n.6, March 15, 2002, p.699-705. 2002.

TAKADA, M.; CHANDRAKER, A.; NADEAU, K. C.; SAYEGH, M. H. TILNEY, N. L. The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia/reperfusion injury. J Clin Invest, v.100, n.5, Sep 1, p.1199-203. 1997.

TAKADA, M.; NADEAU, K. C.; HANCOCK, W. W.; MACKENZIE, H. S.; SHAW, G. D.; WAAGA, A. M.; CHANDRAKER, A.; SAYEGH, M. H. TILNEY, N. L. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. Transplantation, v.65, n.12, Jun 27, p.1533-42. 1998.

TAKEDA, K. AKIRA, S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. Genes Cells, v.6, n.9, Sep, p.733-42. 2001.

TAKEDA, K.; KAISHO, T. AKIRA, S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol, v.21, p.335-76. 2003.

TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; SANJO, H.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J.; JENKINS, N. A.; TAKEDA, K. AKIRA, S. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. Gene, v.231, n.1-2, Apr 29, p.59-65. 1999.

TANONAKA, K.; TOGA, W.; TAKAHASHI, M.; KAWANA, K.; MIYAMOTO, Y.; YOSHIDA, H. TAKEO, S. Hsp70 attenuates hypoxia/reoxygenation-induced activation of poly(ADP-ribose) synthetase in the nucleus of adult rat cardiomyocytes. Mol Cell Biochem, v.248, n.1-2, Jun, p.149-55. 2003.

TERMEER, C.; BENEDIX, F.; SLEEMAN, J.; FIEBER, C.; VOITH, U.; AHRENS, T.; MIYAKE, K.; FREUDENBERG, M.; GALANOS, C. SIMON, J. C. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. J Exp Med, v.195, n.1, Jan 7, p.99-111. 2002.

TORRES, A.; EL-EBIARY, M. RANO, A. Respiratory infectious complications in the intensive care unit. Clin Chest Med, v.20, n.2, Jun, p.287-301, viii. 1999.

TRAVIS, S. M.; SINGH, P. K. WELSH, M. J. Antimicrobial peptides and proteins in the innate defense of the airway surface. Current Opinion in Immunology, v.13, n.1, 2001/2/1, p.89-95. 2001.

TRIANTAFILOU, M.; MIYAKE, K.; GOLENBOCK, D. T. TRIANTAFILOU, K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. J Cell Sci, v.115, n.Pt 12, Jun 15, p.2603-11. 2002.

TRULOCK, E. P.; EDWARDS, L. B.; TAYLOR, D. O.; BOUCEK, M. M.; MOHACSI, P. J.; KECK, B. M. HERTZ, M. I. The registry of the international society for heart and lung transplantation: twentieth official adult lung and heart-lung transplant report--2003. The Journal of Heart and Lung Transplantation, v.22, n.6, p.625-35. 2003.

TSOULFAS, G.; TAKAHASHI, Y.; GANSTER, R. W.; YAGNIK, G.; GUO, Z.; FUNG, J. J.; MURASE, N. GELLER, D. A. Activation of the lipopolysaccharide signaling

pathway in hepatic transplantation preservation injury. Transplantation, v.74, n.1, Jul 15, p.7-13. 2002.

TYAGI, S. KRAMER, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nat Biotechnol, v.14, n.3, Mar, p.303-8. 1996.

ULICH, T. R.; YIN, S.; GUO, K.; YI, E. S.; REMICK, D. DEL CASTILLO, J. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. Am J Pathol, v.138, n.5, May, p.1097-101. 1991.

UNDERHILL, D. M. Macrophage recognition of zymosan particles. J Endotoxin Res, v.9, n.3, p.176-80. 2003.

VABULAS, R. M.; WAGNER, H. SCHILD, H. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. Curr Top Microbiol Immunol, v.270, p.169-84. 2002.

VON ANDRIAN, U. H. MACKAY, C. R. T-Cell Function and Migration -- Two Sides of the Same Coin. N Engl J Med, v.343, n.14, October 5, 2000, p.1020-34. 2000.

WAGNER, H. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. Curr Opin Microbiol, v.5, n.1, Feb, p.62-9. 2002.

WANG, H.; DEVRIES, M. E.; DENG, S.; KHANDAKER, M. H.; PICKERING, J. G.; CHOW, L. H.; GARCIA, B.; KELVIN, D. J. ZHONG, R. The axis of interleukin 12 and gamma interferon regulates acute vascular xenogeneic rejection. Nat Med, v.6, n.5, May, p.549-55. 2000.

WANG, J. H.; REDMOND, H. P.; WATSON, R. W.; CONDRON, C. BOUCHIER-HAYES, D. Induction of heat shock protein 72 prevents neutrophil-mediated human endothelial cell necrosis. Arch Surg, v.130, n.12, Dec, p.1260-5. 1995.

WHITCOMBE, D.; THEAKER, J.; GUY, S. P.; BROWN, T. LITTLE, S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nat Biotechnol, v.17, n.8, Aug, p.804-7. 1999.

WILHELM, M. J.; PRATSCHKE, J.; KUSAKA, M.; HANCOCK, W. W. TILNEY, N. L. Donor brain death affects tempo and intensity of acute rejection of rat chronic allografts. Transplant Proc, v.31, n.1-2, Feb-Mar, p.1008-9. 1999.

WOLFS, T. G.; BUURMAN, W. A.; VAN SCHADEWIJK, A.; DE VRIES, B.; DAEMEN, M. A.; HIEMSTRA, P. S. VAN 'T VEER, C. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. J Immunol, v.168, n.3, Feb 1, p.1286-93. 2002.

WWW.SAUDE.GOV.BR/TRANSPLANTES. Sistema Nacional de Transplantes. 2003 2003.

WYLLIE, D. H.; KISS-TOTH, E.; VISINTIN, A.; SMITH, S. C.; BOUSSOUF, S.; SEGAL, D. M.; DUFF, G. W. DOWER, S. K. Evidence for an accessory protein

function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. J Immunol, v.165, n.12, Dec 15, p.7125-32. 2000.

XIE, Y.; CAHILL, C. M.; ASEA, A.; AURON, P. E. CALDERWOOD, S. K. Heat shock proteins and regulation of cytokine expression. Infect Dis Obstet Gynecol, v.7, n.1-2, p.26-30. 1999.

ZANDER, D. S.; BAZ, M. A.; VISNER, G. A.; STAPLES, E. D.; DONNELLY, W. H.; FARO, A. SCORNIK, J. C. Analysis of early deaths after isolated lung transplantation. Chest, v.120, n.1, July 1, 2001, p.225-32. 2001.

ZAREMBER, K. A. GODOWSKI, P. J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. J Immunol, v.168, n.2, Jan 15, p.554-61. 2002.