Mauro Fantini Nogueira Martins

PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS B-1 NA REJEIÇÃO DE ALOENXERTOS NO CAMUNDONGO

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências pelo programa de pós-graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

São Paulo

2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Mauro Fantini Nogueira Martins

PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS B-1 NA REJEIÇÃO DE ALOENXERTOS NO CAMUNDONGO

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências pelo programa de pós-graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Mario Mariano

São Paulo

2009

Martins, Mauro Fantini Nogueira
Participação de células B-1 na rejeição de aloenxertos no camundongo. / Mauro Fantini Nogueira Martins .-- São Paulo, 2009.
xiv, 97 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Título em inglês: Participation of B-1 cells in the rejection of allografts in mice.

1. Células B-1. 2. Rejeição de Enxerto. 3. Inflamação. 4. Mastócitos. 5. Linfócitos T.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Clara Lúcia Barbieri Mestriner

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

Aos meus pais, Luiz Antônio e Maria Cezira,

Pela devoção e torcida. Pela constante confiança e incentivo. Pela admiração que têm pelo filho. Por darem infinitos motivos para serem admirados.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Mariano, agradeço demais por ser um cientista romântico, daqueles que enxergam a ciência com o olhar de uma criança sapeca que sabe que não pode tocar no bule quente, mas que mesmo assim vai fazê-lo. Agradeço também por não ter nenhuma vergonha em falar o tão temido 'não sei', até porque esse 'não sei' sempre levou a um 'quero saber'. Agradeço pela agradável convivência durante todo esse tempo. Agradeço por me incentivar nos momentos de frustração e de me deixar livre nos momentos de empolgação. Agradeço pelos muitos ensinamentos, como aquele do 'bolo da vovó'.

Aos meus amigos de laboratório, por toda ajuda prática e intelectual, fundamentais para a conclusão deste trabalho. Também, por todas as brincadeiras tontas, que ajudaram a criar um clima extremamente leve e descontraído. Obrigado Ana Flávia, Anuska, Bia, Caru, Lipe, Fernanda, Gennaro, Helena, Heloísa, Luiz, Maiko, Nanci, Ricardo, Ronni e Thalita.

À Camile, pelo amor. Em consequência disso, pela compreensão, pelo companheirismo, pelo cuidado e pela amizade.

Aos meus amigos de turma, em especial ao Diogo, Eloi, Ricardo e Roberta, que sempre torceram por mim e com quem sempre pude contar.

Aos meus amigos do C.E.B., irmãos para toda hora, por algumas discussões científicas agradáveis e por muitíssimas outras sem qualquer relação com ciência.

Ao Cauê, Felice, Leonardo e Julieta, que souberam entender minhas ausências, mesmo sem entender direito.

Aos pós-graduandos e estagiários dos outros laboratórios da Disciplina, por toda ajuda, seja em forma de tubo emprestado ou de crítica construtiva. Em especial à Juliana Mussalem, que nos acolheu tão bem quando passamos uma temporada em seu laboratório e que sempre prestou auxílio, sem hesitar, ao vivo ou por telefone.

Aos professores da Disciplina de Imunologia, Profa. Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro, Profa. Dra. Zulma Fernandes Peixinho, Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis, Profa. Dra. Ana Flávia Popi, Prof. Dr. José Daniel Lopes, Profa. Dra. Ieda Maria Longo Maugéri, Prof. Dr. Alexandre Basso e Prof. Dr. Joel Machado Júnior, pelas sugestões, críticas e diferentes pontos de vista, que tanto enriqueceram este trabalho.

A todos os funcionários da Disciplina de Imunologia, pelo trabalho essencial para esta e tantas outras pesquisas. Agradecimento especial ao Geová Pereira dos Santos, que diariamente resolvia muitos quebra-cabeças relacionados ao biotério, vários deles criados por mim.

À Profa. Dr. Verônica Porto Carreiro de Vasconcelos Coelho por críticas e sugestões pertinentes e por me encaminhar a Luiz Roberto Mundel, que me forneceu valiosa orientação técnica quanto aos transplantes de pele.

À FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro e pela confiança no projeto.

Ao Hector, que ao me ver chegar nos dias em que os experimentos tinham sido totalmente fracassados, parecia abanar o seu rabinho mais intensamente.

‘O bobo, por não se ocupar com ambições, tem tempo para ver, ouvir, tocar no mundo.
O bobo é capaz de ficar sentado quase sem se mexer por duas horas. Se perguntado por que não faz alguma coisa, responde: "Estou fazendo, estou pensando."
Ser bobo às vezes oferece um mundo de saída porque os espertos só se lembram de sair por meio da esperteza, e o bobo tem originalidade, espontaneamente lhe vem a idéia.’

Clarice Lispector

Sumário

Dedicatória..... iv
Agradecimentos..... v
Lista de Figuras..... x
Lista de Tabelas..... xi
Lista de abreviaturas..... xii
Resumo..... xiv
1. INTRODUÇÃO..... 1
2. OBJETIVOS..... 23
3. MÉTODOS..... 24
3.1. Animais..... 24
3.2. Soluções..... 24
3.3. Enxertos de pele e de coração..... 25
3.4. Cultura de células peritoneais aderentes..... 28
3.5. Análise fenotípica..... 29
3.6. Isolamento das células que infiltraram o enxerto..... 29
3.7. Ensaio de rastreamento de células B-1..... 30
3.8. Transferência adotiva..... 31
3.9. Processamento histológico..... 31
3.10. Contagem de mastócitos em cortes histológicos..... 31
3.11. Análise estatística..... 32
4. RESULTADOS..... 33
4.1. Porcentagem de células B-1 no sobrenadante de cultura de células peritoneais aderentes..... 33
4.2. Grupo BALB/Xid+B-1 possui porcentagens de células B-1 peritoneais semelhantes às do grupo BALB/c..... 34
4.3. A ausência de células B-1 atrasa a rejeição de aloenxertos de pele e coração..... 35
4.4. A população de células B-1 peritoneais responde ao estímulo alogênico de pele..... 42

4.5. Células B-1 infiltram o enxerto alogênico de pele..... 45

4.6. Na ausência de células B-1, há um aumento do infiltrado de mastócitos e uma diminuição do infiltrado de células T no aloenxerto de pele..... 47

4.7. A transferência adotiva de células B-1 reduz a proporção de mastócitos infiltrantes no enxerto..... 49

4.8. A transferência adotiva de células B-1 restaura os níveis de células T $CD8^+$ infiltrantes em aloenxertos de pele, mas não de T $CD4^+$..... 50

4.9. Na ausência de células B-1, há um aumento do infiltrado de mastócitos e no aloenxerto cardíaco..... 51

4.10. Células B-1 de camundongos que já entraram em contato com aloenxertos de pele não são capazes de modificar a cinética de rejeição em outros receptores..... 53

4.11. A ausência de células B-1 não interfere na cinética de rejeição de segunda instância, no modelo de aloenxertos de pele..... 56

5. DISCUSSÃO..... 58

6. CONCLUSÕES..... 75

7. REFERÊNCIAS..... 76

Abstract

Apêndice

Bibliografia Consultada

Lista de Figuras

Figura 1. Aspecto dos transplantes de pele e cardíacos..... 27

Figura 2. Porcentagem de células B-1 no sobrenadante de cultura de células peritoneais aderentes..... 32

Figura 3. Porcentagem de células B-1 na cavidade peritoneal dos diferentes grupos experimentais..... 34

Figura 4. Sobrevida dos enxertos de pele e coração em receptores com e sem células B-1..... 37

Figura 5. Alterações na população de células B-1 peritoneais apos transplante de pele..... 43

Figura 6. Identificação de células B-1 infiltrantes no enxerto de pele..... 45

Figura 7. Composição do infiltrado inflamatório na pele transplantada para camundongos com e sem células B-1..... 47

Figura 8. Efeito da transferência de células B-1 sobre o infiltrado inflamatório em enxertos de pele..... 49

Figura 9. Efeito da transferência de células B-1 sobre o infiltrado inflamatório em enxertos cardíacos..... 51

Figura 10. Efeito da transferência de células B-1 pré-sensibilizadas na rejeição de aloenxertos de pele..... 52

Figura 11. Sobrevida dos segundos enxertos de pele na presença e ausência de células B-1..... 54

Lista de Tabelas

Tabela 1. Escala de pontos para definição da rejeição dos enxertos cardíacos heterotópicos..... 26

Tabela 2. Diferentes quantidades de células de cultura transferidas para reconstituir o peritônio de camundongos BALB/Xid 34

Lista de Abreviaturas

APC	Aloficocianina
BSA	Albumina Bovina Sérica
CD	Cluster of differentiation
Células NK	Células Natural Killer
CFSE	Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Éster
Cy	Cychrome
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HEPES	N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG2a	Imunoglobulina G2a
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
KLH	Hemocianina do molusco *Keyhole limpet*
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
PBS	Tampão Fosfato-salino
PE	Ficoeritrina
Rag	Genes Ativadores da Recombinação
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCID	Imunodeficiência Severa e Combinada

SPF	Livre de patógenos específicos
TCR	Receptor de antígenos da célula T
TGF-β	Fator de Transformação do Crescimento - β
Th_1	Célula T helper 1
Th_2	Célula T helper 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral - α
Treg	Célula T reguladora
Tx	Transplante
Xid	Imunodeficiência ligada ao cromossomo X

Resumo

Na ausência de estímulo antigênico, células B-1 são importantes produtoras de anticorpos naturais em camundongos e humanos e são consideradas como a primeira linha de defesa contra patógenos. Por causa disso, o papel dessas células em respostas imunes mediadas por células T é comumente negligenciado. No entanto recentemente foram descritas participações de células B-1 nas hipersensibilidades tardia e imediata. O presente trabalho verificou o papel de células B-1 na rejeição aguda de aloenxertos no camundongo, um processo orquestrado por células T. Para tal, foram transplantados coração e pele alogênicos para camundongos selvagens e camundongos deficientes em células B-1. A cinética de rejeição, as células infiltrantes no enxerto e a migração de células B-1 foram analisadas. Foi observado um atraso na cinética de rejeição do camundongo deficiente em células B-1, quando comparado com o camundongo selvagem. A transferência adotiva de células B-1 eliminou tal atraso. A sobrevida estendida do enxerto foi concomitante com menos células T $CD8^+$ e mais mastócitos infiltrantes no enxerto. Células B-1 foram encontradas infiltrando o enxerto poucos dias após os transplantes. Os resultados deste trabalho mostram que há uma participação de células B-1 na rejeição aguda de aloenxertos e colaboram para o entendimento da biologia dessas células.

1. INTRODUÇÃO

As funções biológicas das células B-1 nas imunidades inata e adaptativa ainda são questão de debate. Apesar de as primeiras descrições de células B-1 datarem do início dos anos 80 ([1-3]) uma caracterização morfológica mais detalhada sobre essas células foi publicada apenas em 2003 ([4]). Esse fato representa bem o quão espalhados e desconectados estão os dados sobre o assunto.

O fato de que células B-1 possuem imunoglobulinas de superfície, e também as secretam, torna inevitável a comparação entre essas células e linfócitos B convencionais, também chamados de B-2. Uma importante discussão nesse cenário trata da origem de cada uma dessas células. A primeira hipótese formada foi a de que células B-1 e B-2 são originadas de precursores distintos, que, em algum ponto temporal antes do rearranjo de imunoglobulinas, já estão comprometidos com uma ou outra linhagem celular. Essa hipótese se baseia em experimentos de transferência celular em que células do fígado fetal e do omento fetal eram capazes de reconstituir preferencialmente células B-1 em camundongos irradiados. Por outro lado, células da medula óssea adulta geravam principalmente células B-2. Assim, células B-1 seriam uma linhagem fetal, enquanto que células B-2, adulta ([5;6]). A segunda hipótese foi a que células B-1 e B-2 têm precursores comuns que, dependendo do estímulo que recebem, se diferenciam em uma ou outra célula. Nessa hipótese, células B em processo de maturação, com o nome proposto de B-0, com repertórios de anticorpos diferentes se diferenciariam em linhagens diferentes. Células B-1, então, seriam formadas pela exposição a

antígenos timo-independentes que fossem reconhecidos por suas imunoglobulinas de superfície ([7]).

De fato, o repertório de anticorpos de células B-1 é distinto do de células B-2. As primeiras secretam IgM de baixa especificidade, com grande reatividade com antígenos próprios e alta proporção de expressão de cadeias leves lambda ([8]). Pela primeira hipótese de desenvolvimento, a diferença entre os repertórios de anticorpos estaria definida antes da formação de células maduras e seria uma consequência dos comprometimentos distintos de cada progenitor. Já pela segunda hipótese, a diferença nos repertórios seria a causa, ao invés da consequência, da formação de células distintas ([7]).

Recentemente, essa discussão pendeu para o lado da hipótese dos precursores distintos, uma vez que foi identificado um precursor na medula óssea que reconstitui principalmente células B-1 em camundongos SCID e que é diferente do precursor de células B-2 ([9]). Células B-1, que representam a principal população de células B das cavidades peritoneal e pleural no camundongo ([10]), diferem dos linfócitos B convencionais em vários outros aspectos.

Primeiramente, há diferenças entre os marcadores de superfície de cada uma dessas células. Células B-1 e B convencionais possuem marcadores comuns como CD19, IgM, IgD e B220, mas diferem quanto à expressão de CD23, presente em células B-2, mas ausente em células B-1. Também se destaca a presença de CD11b (Mac-1) em células B-1, um marcador típico de macrófagos, que está ausente em células B-2 ([5]). Por fim, as células B-1 podem ainda ser subdividas em B-1a, que expressam o marcador CD5, e B-1b,

que não o fazem ([11]). Uma discussão sobre diferenças funcionais entre células B-1a e B-1b será feita mais adiante.

A identificação de células B-1 e suas subpopulações por meio de diferentes perfis de expressão de marcadores de superfície traz estas duas questões aos pesquisadores dessa área: uma de caráter mais prático, ligada à concepção e execução de experimentos e outra de caráter mais teórico, ligada a modelos e hipóteses sobre a origem e funções destas células.

A primeira questão está ligada ao fato de que, até o momento, não há um marcador específico para células B-1. Esse fato toma grande importância quando consideramos que muitos dos experimentos que visam identificar células B-1 se baseiam na técnica de citometria de fluxo. Assim, dependendo de quão detalhista é a pergunta do experimento sendo realizado, o pesquisador se vê obrigado a analisar de dois a quatro, ou até mais, marcadores de superfície por vez. Na prática, isso demanda mais reagentes, material de consumo, animais de experimentação e, consequentemente, mais recursos financeiros. É importante, pois, a busca por um marcador de superfície específico e representativo de células B-1.

Ainda versando sobre essa primeira questão, é preciso levar em consideração que, além de não possuírem um marcador específico, nem sempre as células B-1 apresentam *uma única combinação de vários marcadores*. Já foi descrito que células B-1 têm a capacidade de se diferenciarem em fagócitos mononucleares *in vitro* ([12]) e que esses fagócitos perdem a expressão de CD19 e B220, presentes no estágio anterior. Há relatos também de que células B-1, quando ativadas, migram da cavidade peritoneal para o baço, onde perdem a expressão de CD11b ([13;14]). Células com várias

características de células B-1, porém CD11b$^-$, também foram encontradas na própria cavidade peritoneal de camundongos e foram denominadas de “B-1c” por Hastings e colaboradores ([15]). Essa classificação, entretanto, é contestada por Ghosn e colaboradores, que a consideram imprudente ([16]).

A segunda questão, invariavelmente ligada à primeira, é conseguir interpretar qual o significado biológico dessas diferenças fenotípicas em células B-1. Como afirmou Hardy, “a expressão de uma proteína de superfície em particular provavelmente não fornecerá um indicador absoluto e não ambíguo sobre a inclusão da célula em uma subpopulação funcional” ([11]). De fato, muitos estudos recentes se utlizam de técnicas avançadas de separação celular e geram dados sobre o fenótipo das células pesquisadas, que em geral não são acompanhados de relatos a respeito da função das mesmas. Quando diferentes autores tentam conectar o fenótipo à função, não é rara a criação de hipóteses que se contradizem. A expressão da proteína CD11b por exemplo, como citado no parágrafo anterior, já foi considerada como critério para o estabelecimento de uma nova nomenclatura para as subpopulações de células B-1, com a proposta da célula B-1c ([15]). A mesma proteína, por outro lado, foi descrita como um marcador que distingue diferentes estágios no desenvolvimento de células B-1, tanto B-1a, quanto B-1b ([16]).

Um estudo muito interessante que une a caracterização fenotípica à origem e função das células B-1 foi publicado por Popi e colaboradores ([17]). O estudo aborda a diferenciação *in vitro* de células B-1b peritoneais em células com características fagocíticas, morfologicamente semelhantes a macrófagos. Essa diferenciação já havia sido descrita em nosso laboratório ([12]). Popi e colaboradores mostram claramente que células B-1, antes da diferenciação,

expressam tanto marcadores de superfície associados à linhagem linfoide (CD19 e B220) quanto à mieloide (CD11b e F4/80). Já no próximo estágio da diferenciação, chamado de “fagócito derivado de células B-1”, os marcadores linfoides são perdidos e apenas os mieloides são mantidos. O mesmo acontece com fatores de transcrição associados às duas linhagens celulares. Assim, células B-1 peritoneais apresentam uma expressão promíscua de marcadores de superfície e fatores de transcrição. À luz desses relatos, os autores se perguntam se essas células são completamente maduras ou se são apenas um estágio no desenvolvimento do fagócito descrito. Já foi descrito em nosso laboratório que células B-1 migram da cavidade peritoneal para um foco inflamatório inespecífico, onde adquirem a morfologia similar a macrófagos mononucleares, provavelmente se diferenciando no fagócito derivado de células B-1 ([12]). Como células B-1 perderam características linfoides para se tornarem células “mais mieloides”, os autores discutem ainda se seria possível uma diferenciação para outro rumo, para uma célula “mais linfoide”. De fato, há relatos que, após um estímulo antigênico, células B-1 peritoneais migram para o baço, onde se tornam secretoras de anticorpos e perdem a expressão de CD11b ([13;14;18]).

Em vista dessas discussões, qualquer protocolo de identificação de células B-1 por meio de uma combinação definida de marcadores de superfície terá vantagens e desvantagens, dependendo do ponto de vista. No presente trabalho, de maneira geral, células B-1 da cavidade peritoneal foram identificadas de uma maneira mais “clássica”, como células $CD19^+/CD11b^+$. A análise de células B-1 que migraram da cavidade peritoneal para outro local foi feita por meio de marcação com corante fluorescente, para evitar resultados

falso negativos gerados pela perda de alguma proteína de superfície durante o processo de ativação/migração.

No aspecto morfológico, também foram relatadas diferenças entre células B-1 e B-2. As primeiras são peculiares por possuírem projeções da membrana plasmática, núcleo lobulado com pontes de cromatina e baixa proporção núcleo/citoplasma, características muito diferentes de células B-2 ([4]). Segundo Mariano, em comunicação pessoal, essas grandes diferenças morfológicas fortalecem ainda mais a hipótese de que células B-1 e B-2 são linhagens diferentes, diminuindo, assim, a crença em uma possível diferenciação de células B-1 em B-2, ou vice-versa.

A quantidade de células B-1 nas cavidades peritoneal e pleural do indivíduo adulto parece ser mantida por autorrenovação. Uma importante citocina que teria papel de fator de crescimento autócrino é a IL-10, produzida em grande quantidade por células B-1 ([19]). Realmente, a administração contínua de anti-IL-10 leva à depleção seletiva de células B-1, mas não B-2, na cavidade peritoneal ([20]). Essa grande produção de IL-10 levanta a questão sobre um possível papel supressor de células B-1. Instigados por essa questão, Popi e colaboradores mostraram que, quando células B-1 e macrófagos são cocultivados, as primeiras regulam negativamente a atividade fagocítica dos últimos, via IL-10 ([21]). Considerando que macrófagos são importantes elementos no dano tecidual gerado durante a rejeição aguda de aloenxertos, é coerente a hipótese de que células B-1 pudessem prolongar a sobrevida de um órgão transplantado, pela inibição da atividade de macrófagos.

A subdivisão das células B-1 em B-1a e B-1b foi feita em 1991 com base na expressão da proteína CD5 na superfície de algumas células (B-1a) e não na de outras (B-1b) ([22]), mas diferenças funcionais entre as duas subpopulações só foram descritas recentemente. A resolução da bacteremia em um modelo de infecção por *Borrelia hermsii* é coincidente com a expansão da população de células B-1b, mas não B-1a, na cavidade peritoneal de camundongos infectados ([23]). Nesse modelo, células B-1b secretam IgM específica para *Borrelia hermsii* e geram uma proteção surpreendentemente duradoura ao camundongo, de maneira independente de células T. Células B-1a são dispensáveis para tal processo ([24]).

Haas e colaboradores verificaram que as células B-1 peritoneais de camundongos transgênicos que superexpressavam a proteína CD19 eram quase que exclusivamente do subtipo B-1a. Já em camundongos deficientes em CD19, células B-1b predominavam na cavidade peritoneal. Essa diferença já mostra que cada subpopulação tem requisitos diferentes para o seu desenvolvimento. Além disso, ao infectar os dois camundongos citados, os autores mostram que células B-1a e B-1b participam de maneiras distintas na resposta imune humoral contra *Streptococcus pneumoniae*. Os anticorpos provenientes de B-1a foram secretados de forma natural, independente de estímulo, enquanto que os produzidos por B-1b foram dependentes de imunização prévia. Assim, células B-1a parecem participar da imunidade humoral natural, enquanto que B-1b, da adaptativa ([25]). Esse fato foi interpretado por outros autores como uma divisão de trabalho das células B-1, culminando em uma maior especialização das duas subpopulações ([26]).

Outra diferença entre células B-1a e B-1b se refere à já citada diferenciação em células fagocíticas. Almeida e colaboradores mostraram que o sobrenadante de uma cultura de células peritoneais aderentes é predominantemente composto por células B-1b e que estas, quando recultivadas, aderem à superfície da placa de cultura e diferenciam-se em fagócitos ([12]). O mesmo não acontece com células B-1a ([17]). Em contrapartida, Borrello e Phipps mostraram que células B-1 $CD5^+$ (B-1a) do baço são capazes de se diferenciar em células com características de macrófagos, se cultivadas com fibroblastos ([27;28]).

Essa nomenclatura dos subtipos de células B-1 pode causar certa confusão, porque, como as poucas descrições de diferenças funcionais entre B-1a e B-1b foram feitas muito tempo após a descrição fenotípica, por vários anos a distinção entre elas foi considerada irrelevante. Por isso, muitos trabalhos até meados dos anos 2000 descreveram características de 'células B-1' apenas, sem a preocupação com seus subtipos.

No presente trabalho, camundongos com deficiência em células B-1 receberam transferência de células coletadas do sobrenadante da cultura descrita por Almeida e colaboradores, portanto células B-1b. A seção de resultados deste trabalho descreverá algumas semelhanças entre dois grupos experimentais: o de camundongos selvagens e o de camundongos deficientes em células B-1, mas reconstituídos com células B-1b. Ainda, serão descritas diferenças entre esses dois grupos e o grupo de camundongos deficientes em células B-1, sem qualquer reconstituição. Como os camundongos selvagens possuem tanto células B-1a quanto B-1b e como não foi feita a transferência seletiva de células B-1a para camundongos deficientes em células B-1, seria

impreciso atribuir as diferenças à ação exclusiva de células B-1b. Portanto, o presente trabalho utilizará a nomenclatura geral de 'células B-1', sem a distinção dos subtipos, a não ser que especificado no texto.

Talvez a característica funcional mais descrita de células B-1 seja a sua produção de anticorpos naturais do isotipo M. Em camundongos e humanos, ambos neonatos, são coincidentes a presença de anticorpos naturais, a presença de células B-1 e a baixa quantidade de células B-2, indicando que os anticorpos seriam secretados por células B-1 ([5]). Estudos com camundongos deficientes em células B-1 mostram também que linhagens com frequências normais dessas células possuem títulos elevados de IgM natural, enquanto que baixas frequências de células B-1 levam a uma diminuição nos títulos de IgM. Assim, células B-1 seriam as principais, se não únicas, fontes de IgM natural sérica ([8]).

Baumgarth e colaboradores mostraram que camundongos não infectados possuem anticorpos IgM naturais contra o vírus influenza e que esses anticorpos são secretados principalmente por células B-1. Quando os camundongos sofrem infecção, aumenta a produção de anticorpos IgG2a, estes derivados de células B-2 ([29]). Foi proposto então que os anticorpos provenientes de células B-1 garantiriam a primeira 'linha de defesa' contra infecções, mas não seriam capazes de controlar grandes cargas virais, situação que demandaria a presença de anticorpos mais específicos e de outros isotipos, como os derivados de células B-2 ([30]). Por causa desses dados, Baumgarth, Tung e Herzenberg propõem um sistema imune que evoluiu em camadas. Nele, uma camada mais baixa seria a de células B-1, composta por mecanismos mais antigos, mais simples, independentes de estímulo

antigênico. A camada de cima, evolutivamente mais recente, seria composta por células B-2, que tiveram o “luxo” de surgir em um ambiente em que a camada inferior já fornecia uma defesa básica contra patógenos. Assim, a produção constitutiva de anticorpos naturais por células B-1 permitiria que células B-2 pudessem ter uma resposta mais lenta, porém mais eficiente, de alta afinidade ([31]). Um dado que apoia a teoria de que células B-1 fariam parte de uma camada mais antiga do sistema imune é a descrição de células B com habilidade fagocítica em peixes teleósteos da espécie *Onchorhyncus mykiss* ([32]). A presença dessas células em vertebrados primitivos leva à comparação inevitável com o fagócito derivado de células B-1, descrito em nosso laboratório e com a célula B/macrófago, descrita por Borrello e Phipps.

Como uma grande quantidade de IgM produzida por células B-1 é autorreativa, a relação entre essas células e autoimunidade já foi descrita ([33]). O desenvolvimento preferencial de células B-1 em um modelo de camundongo ‘motheaten’ transgênico leva a uma inflamação autoimune generalizada ([34]). Ainda, a depleção de células B-1 em camundongos New Zealand Black, que têm tendência a desenvolver doenças autoimunes, diminuiu os títulos de autoanticorpos contra eritrócitos, bem como amenizou a anemia hemolítica autoimune ([35]).

Por causa da grande produção de anticorpos naturais, células B-1 são geralmente associadas à imunidade humoral inata e, em vista disso, a participação dessas células em respostas mediadas por células T é comumente negligenciada. Recentemente, todavia, alguns pesquisadores associaram células B-1 a processos classicamente atribuídos a células T.

Em nosso laboratório, De Lorenzo e colaboradores utilizaram um modelo clássico de imunização e desafio com ovalbumina, que estimula uma resposta de perfil Th_2. Os autores mostraram que, na presença de células B-1, tanto o edema de pata induzido pelo desafio antigênico, quanto a resposta humoral do camundongo eram menores do que na ausência de células B-1. Os autores concluem que células B-1 têm um papel supressor na reação de hipersensibilidade estudada ([36]). Já foi demonstrado também que células B-1 expressam MHC de classe II, CD80, CD86 e que induzem, *in vitro,* a proliferação de células T sensibilizadas com gp43, uma glicoproteína presente no fungo *Paracoccidioides brasiliensis.* Assim, células B-1 foram caracterizadas como células apresentadoras de antígeno ([37]), fato que lhes confere uma grande possibilidade de interação com células T e, consequentemente, com a imunidade adaptativa.

Szczepanik e colaboradores estudaram um modelo de hipersensibilidade tardia em que camundongos eram imunizados com KLH e então desafiados na orelha, com o mesmo antígeno protéico, 4 dias depois. Vinte e quatro horas após o desafio, era observado um edema na orelha, considerado pelos autores como o compontente “clássico” de 24 horas da hipersensibilidade tardia, o qual conta com a migração de células T efetoras para o sítio do desafio. Além desse componente, os autores descreveram outro componente que acontecia mais precocemente ao desafio, com a formação de um edema apenas 2 horas após o desafio. Foi demonstrado que o componente de 2 horas era necessário para que ocorresse o componente clássico de 24 horas e que a ocorrência do primeiro componente era mediada por células B-1. Os autores mostraram que células B-1 ativadas na imunização secretavam anticorpos IgM antígeno-

específicos. No momento do desafio, esses anticorpos provavelmente formavam imunecomplexos com o antígeno, ativando o sistema complemento e induzindo a liberação de mediadores vasoativos por mastócitos. Esse fato, que ocorre duas horas após o desafio, alteraria a permeabilidade do tecido vascular local, facilitando a migração de células T para o local, 24 horas após o desafio. Em resumo, células B-1 seriam as iniciadoras do processo que facilita a infiltração de células T no sítio de inflamação ([38]).

É interessante notar que no trabalho acima descrito, os anticorpos IgM antígeno-específicos secretados por células B-1 não existiam antes da imunização. Isso indica que eles não fazem parte do grupo de anticorpos naturais secretados por essas células. Assim, a participação de células B-1 no processo de iniciação da hipersensibilidade tardia não se encaixa na hipótese da primeira 'linha de defesa'.

Em um modelo semelhante, o mesmo grupo de autores mostrou que ativação de células B-1 ocorre de maneira surpreendentemente rápida. Apenas uma hora após a imunização cutânea com trinitrofenil-cloreto, células B-1 peritoneais migram para o baço, onde iniciam a secreção de IgM, que será fundamental para o recrutamento de células T já descrito ([18]).

Sobre esses últimos achados, Baumgarth, Tung e Herzenberg afirmam que "essa participação de células B-1 introduz um novo papel para células B naquela que foi por muito tempo considerada uma resposta puramente de células T" ([31]). Com base nesse raciocínio, o presente trabalho parte da seguinte pergunta: haveria outros fenômenos associados principalmente às células T que contam com a participação de células B-1? Decidiu-se, pois,

estudar a participação de células B-1 na rejeição aguda de aloenxertos no camundongo.

Transplantes realizados entre indivíduos da mesma espécie, mas geneticamente diferentes (alotransplantes ou aloenxertos), são comumente rejeitados por mecanismos imunes dependentes de células T ([39]). Em alotransplantes sem a utilização de tratamento imunossupressor, que é o caso do presente trabalho, denomina-se de rejeição aguda às manifestações clínicas da resposta imune que levam à disfunção do órgão transplantado.

Um órgão transplantado quase sempre passa por momentos de isquemia, quando é retirado do doador, seguidos pela reperfusão sanguínea, quando é colocado no receptor. Esse processo de isquemia-reperfusão é um importante iniciador dos danos celulares sofridos pelo órgão transplantado e tem importante participação de elementos da imunidade inata. Prolongados períodos de hipóxia resultam em múltiplas mudanças metabólicas e ultraestruturais nas células do parênquima do órgão, como a diminuição de adenosina trifosfato, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, acifidicação, desorganização do citoesqueleto e alteração no potencial de membrana. Essas modificações comumente levam à necrose.

Nas células endoteliais, a isquemia induz a expressão de genes de moléculas de adesão e citocinas proinflamatórias. Quando o sangue atinge novamente o órgão - a reperfusão - leucócitos do doador, especialmente neutrófilos, rolam pelo endotélio vascular, aderem a ele e passam pelo espaço interendotelial, para atingir o espaço extravascular do órgão. Lá, os neutrófilos ativados liberam espécies reativas de oxigênio e proteases, levando ao dano tecidual. Eles também secretam citocinas inflamatórias e quimiocinas, que

facilitarão a chegada de mais células inflamatórias, como células do sistema mononuclear fagocítico ([40]). Macrófagos, por sua vez, podem ser ativados, via receptores *toll-like*, por proteínas de choque térmico ou lipoproteínas alteradas, provenientes de células danificadas durante a isquemia-reperfusão ([41]). Todos esses processos levam o órgão transplantado a um dano inicial que é importante para o seguimento do processo de rejeição.

Nesse ambiente inflamatório, a presença de citocinas, como TNF-α, e o aumento de fragmentos celulares derivados de processos necróticos ou apoptóticos, são estímulos suficientes para a maturação de células dendríticas presentes no enxerto. Células dendríticas residentes do doador e células dendríticas do receptor que infiltraram o órgão transplantado podem internalizar células apoptóticas ou necróticas e serem induzidas a perder alguns receptores de quimiocina e a expressar outros novos, levando à saída dessas células do órgão transplantado, em direção a órgãos linfoides secundários ([42]). Esse tráfego de células dendríticas é de suma importância para a ativação de células da imunidade adaptativa, que mediarão a rejeição do aloenxerto. A importância dessa migração em direção aos linfonodos foi estudada por Barker e Bllingham, que mostraram que enxertos de pele tinham uma sobrevida maior quando os vasos linfáticos aferentes dos linfonodos drenantes eram cortados, impedindo assim o 'reflexo imunológico' ([43]). Portanto, após a isquemia-reperfusão, células dendríticas migram para os órgãos linfoides secundários, para apresentar antígenos derivados do enxerto para células T alorreativas.

Aceita-se que o início da resposta imune adaptativa a aloenxertos se dá pelo reconhecimento de antígenos do MHC do doador por células T do

receptor. Esse reconhecimento ocorre por duas vias distintas, mas não mutuamente excludentes: a via direta e a via indireta ([44]).

A via direta do alorreconhecimento tem seu início dependente da estimulação de células T do receptor por células apresentadoras de antígeno do doador. Nessa situação, células apresentadoras de antígeno ativam células T $CD4^+$ do receptor diretamente, por meio de moléculas de MHC classe II em suas superfícies. Analogamente, células T $CD8^+$ são ativadas por moléculas de MHC classe I na superfície de células apresentadoras de antígeno do doador ([44]). Experimentos que reforçam a hipótese de que células dendríticas do doador têm grande importância na iniciação da resposta aloimune foram descritos por Lechler e Batchelor. Os autores hipotetizaram que leucócitos passageiros provenientes do órgão transplantado seriam fundamentais para a ativação de células T do receptor. Para testar essa hipótese, os autores utilizaram um modelo animal de aloenxertos em que rins transplantados e depletados de leucócitos passageiros têm a sobrevida muito estendida, quando comparados com rins que não sofreram tal depleção. Quando o rato receptor dos rins recebeu injeção de células dendríticas do doador, os rins foram rejeitados muito mais rapidamente. O mesmo não aconteceu quando a injeção foi de linfócitos T ou B, mostrando a importância das células dendríticas do doador na imunogenicidade do órgão transplantado ([45]).

Outro experimento que mostra a importância da via direta de alorreconhecimento foi realizado por Pietra e colaboradores. Eles usaram camundongos $Rag1^{-/-}$ deficientes em MHC classe II como receptores de aloenxertos cardíacos provenientes de camundongos BALB/c. Quando os receptores recebiam células T $CD4^+$, o enxerto era rejeitado, mostrando que

células T $CD4^+$ podem desencadear a rejeição ao serem ativadas diretamente por MHC classe II do doador, uma vez que os receptores eram deficientes em tal molécula ([46]).

Assim, a restrição de reconhecer apenas moléculas de MHC próprias, que é garantida durante a seleção positiva de linfócitos T no timo, parece não ser absoluta. Complexos 'MHC alogênico + peptídeo' na superfície de células do doador são capazes de ativar linfócitos T do receptor, pois compartilham semelhanças estruturais com complexos 'MHC próprio + peptídeo' ([39]). Ainda, linfócitos T podem reconhecer moléculas de MHC alogênico diretamente de maneira dependente ou independente do peptídeo que se encontra na fenda ([44]). O reconhecimento direto é consequência, portanto, de uma reatividade cruzada do TCR. Especula-se que essa reatividade cruzada seja uma característica inerente e necessária da maioria dos TCRs, já que, ao longo da vida de um linfócito, a célula irá interagir com complexos 'MHC próprio + peptídeo próprio', no timo e também com 'MHC próprio + peptídeo externo', na periferia ([47]).

A via indireta de alorreconhecimento é mais representativa de como a célula T geralmente reconhece um antígeno. Nessa via, células T reconhecem antígenos do doador que foram internalizados, processados e apresentados em MHC próprio por uma célula apresentadora de antígenos do receptor. Já foi demonstrado que camundongos depletados de células T $CD8^+$ são capazes de rejeitar aloenxertos de pele de doadores deficientes em MHC classe II. Nesse caso, a via direta de reconhecimento por células T $CD4^+$ não é possível, pois a pele transplantada não possui MHC classe II. Além disso, a via direta de reconhecimento por células T $CD8^+$ também é excluída, pois estas foram

eliminadas do receptor. Isso indica, então, que a rejeição foi mediada por células T $CD4^+$ e que elas reconheceram antígenos do doador apresentados por células apresentadoras de antígeno do receptor, constituindo, assim, uma forte evidência *in vivo* da via indireta de alorreconhecimento ([48]). Nessa via, moléculas de MHC do doador podem ser processadas e apresentadas em moléculas de MHC do receptor para células T alorreativas. Outros antígenos além dos derivados de moléculas de MHC, como por exemplo proteínas codificadas pelo cromossomo Y, também podem servir como fonte de peptídeos para a via indireta de reconhecimento. Esses são conhecidos como antígenos secundários de histocompatibilidade ([44]).

Ao longo do tempo, há uma diminuição natural de células apresentadoras de antígeno derivadas do doador, enquanto que células apresentadoras de antígeno do receptor continuamente internalizam, processam e apresentam antígenos provenientes do aloenxerto. Por causa disso, considera-se que a via direta tenha uma importância maior no período precoce pós-transplante, enquanto a via indireta teria maior participação em rejeições crônicas ([44]).

Após a ativação de células T alorreativas e a migração destas para o local do enxerto, uma série de mecanismos redundantes é responsável pelo processo de rejeição aguda do aloenxerto. Linfócitos T $CD8^+$ são importantes mediadores da rejeição e danificam diretamente as células alogênicas. Estudos que identificaram a expressão de genes relacionados a moléculas citotóxicas, como perforina e granzima B, em aloenxertos renais em processo de rejeição, apoiam a importância das células T $CD8^+$ ([49]). Células T $CD4^+$, além de

ajudarem a expansão de clones de células T $CD8^+$ por meio da secreção de IL-2, também estimulam a ativação de macrófagos, pela secreção de interferon-γ.

Macrófagos ativados, por sua vez, têm importante papel no dano tecidual na rejeição aguda e o seu papel pode ser múltiplo: fagocitose de restos celulares; processamento e apresentação de antígenos; secreção de citocinas inflamatórias, como IL-1 e TNF-α e produção de metabólitos tóxicos como espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico ([41]). De fato, macrófagos compõem de 40 a 60% do infiltrado inflamatório em transplantes renais humanos em processo de rejeição ([50]) e a depleção de macrófagos pela administração de clodronato, em ratos, levou a uma atenuação de parâmetros de rejeição renal aguda, como glomerulite e apoptose de células tubulares ([51]).

Devido à participação de células T e macrófagos, Peter Medawar foi um dos primeiros autores a comparar o processo de rejeição de aloenxertos com uma resposta de hipersensibilidade tardia ([52]), processo no qual já foi descrita a participação de células B-1 ([38]).

Apesar de essa resposta semelhante à hipersensiblidade tardia, com um perfil Th_1, ser a mais bem descrita no processo de rejeição, outras vias já foram documentadas. Em uma combinação de transplante de pele de um camundongo bm12 para um C57BL/6, a rejeição é caracterizada por um intenso infiltrado eosinofílico e aumento de mRNA de IL-4 e IL-5 dentro do enxerto, o que confere a essa resposta um perfil Th_2. Quando o transplante foi realizado em camundongos C57BL/6 deficientes em IL-4, alguns camundongos não rejeitaram o enxerto, enquanto que outros sim. A análise histológica dos aloenxertos rejeitados mostrou a ausência de eosinófilos e um denso infiltrado neutrofílico ([53]). Maier e colaboradores também mostraram que células NK são

capazes de mediar a rejeição de aloenxertos cardíacos em camundongos deficientes no coestimulador de células T, CD28 ([54]). Em camundongos imunocompetentes, porém, células NK parecem não ser necessárias ou suficientes para desencadear a rejeição ([55]).

O sistema imune, portanto, tem mecanismos redundantes que levam à rejeição de aloenxertos e cada um desses mecanismos mostra-se mais importante quando os outros mecanismos estão ausentes.

Embora o mecanismo de ação não seja totalmente entendido, já foi descrita a participação de células Treg como importantes elementos na indução de tolerância ao enxerto. Hara e colaboradores utilizaram um protocolo de depleção de células T $CD4^+$ em conjunto com a administração de células do doador, para induzir tolerância a aloenxertos cardíacos em camundongos. Desses camundongos tolerantes foram coletadas células Treg do baço e linfonodo, que foram transferidas juntamente com células T $CD4^+$ para um camundongo deficiente em células T. Este, quando recebeu aloenxertos de pele, não os rejeitou, ao contrário dos camundongos que receberam apenas células T $CD4^+$. Ainda, quando células Treg foram transferidas juntamente com um anticorpo anti-IL-10, o enxerto de pele foi rejeitado, mostrando que IL-10 é necessária para indução de tolerância por células Treg ([56]). Há estudos também que mostram a presença de células Treg em enxertos sendo tolerados ([57]), bem como uma diminuição gradativa delas em enxertos sendo rejeitados ([58]).

Outro estudo mostrou, surpreendentemente, que mastócitos são essenciais para a manutenção de tolerância a aloenxertos de pele em camundongos que receberam tratamento que incluiu a administração de anti-

CD154 e a infusão de células do doador. Nesse estudo, enxertos tolerados continham mais mastócitos e células Treg infiltrantes e menos mRNA de granzima B e perforina do que enxertos em processo de rejeição. Além disso, camundongos deficientes em mastócitos eram incapazes de tolerar o enxerto. Os autores verificaram que, ao ativar células Treg *in vitro*, há uma grande secreção de IL-9, que serve como fator de crescimento para mastócitos. Em experimentos *in vivo*, os autores mostraram que camundongos $Rag^{-/-}$ que receberam células T $CD8^{+}$ não rejeitaram um aloenxerto quando receberam também a injeção de Treg. Entretanto, se os camundongos receberem também tratamento com anti-IL-9, a rejeição aconteceu e foi coincidente com a diminuição de mastócitos na pele ([59]).

Apesar de mastócitos já terem sido associados ao processo de rejeição, devido à sua presença no infiltrado inflamatório de transplantes de fígado em processo de rejeição ([60]), outros autores também encontraram papéis supressores dessas células. Grimbaldeston e colaboradores mostraram que, em um modelo de hipersensibilidade de contato, a lesão cutânea é severamente atenuada na presença de IL-10 secretada por mastócitos, enquanto que camundongos deficientes em mastócitos apresentaram lesões com grande infiltrado inflamatório e áreas necróticas ([61]).

Algumas associações entre células B-1 e a rejeição de transplantes já foram feitas, mas nunca com foco na *rejeição aguda de aloenxertos*.

Estudos anteriores documentaram que camundongos deficientes em α1,3Galactosil transferase secretam, assim como humanos, IgM natural contra um epítopo dessa molécula, que é amplamente expressa em células de porcos. Esses anticorpos são derivados de células B-1 ([14]). Sugere-se fortemente que

esses anticorpos mediariam a rejeição hiperaguda em transplantes de tecidos porcinos para receptores primatas, bem como em outros modelos de xenotransplantes ([62]). Seguindo o mesmo raciocínio, já foi demonstrado que células B-1 humanas produzem anticorpos contra antígenos polissacarídicos que determinam o grupo sanguíneo A ([63]), fato este que gera um grande obstáculo para o transplante entre indivíduos com diferenças no grupo ABO. Tanto xenotransplantes quanto transplantes com incompatibilidade no grupo ABO são rejeitados por mecanismos que envolvem principalmente anticorpos naturais, ativação do sistema complemento e lesão das células endoteliais do órgão transplantado ([62]). Já na rejeição aguda de aloenxertos em indivíduos imunocompetentes, células B e anticorpos são geralmente considerados apenas como testemunhas do processo de rejeição, e não como importantes participantes. Assim, embora existam trabalhos relacionando células B-1 e a disfunção de transplantes, os métodos utilizados focaram na rejeição hiperaguda, com importante participação de anticorpos naturais. Portanto, mesmo com a inclusão das células B-1 nesse novo cenário de rejeição de enxertos, a visão geral sobre essas células continua aquela já descrita anteriormente, como uma camada mais antiga do sistema imune que constitui "a primeira linha de defesa".

Com o intuito de testar se células B-1 são capazes de influenciar a rejeição aguda de aloenxertos mediada por células T, o presente trabalho se baseou em transplantes de fragmentos de pele e de coração para receptores com incompatibilidade quanto aos genes do MHC. Os receptores utilizados foram camundongos selvagens ou com imunodeficiência ligada ao cromossomo X (Xid). A deficiência dos camundongos Xid é causada por uma

mutação pontual no gene da enzima tirosina cinase de Bruton, que leva a uma troca de arginina por cisteína, na posição 28. Isso resulta em uma leve redução do número de células B-2 e uma severa deficiência no número de células B-1 ([64]).

2. OBJETIVOS

Verificar se há e qual é a participação de células B-1 na rejeição aguda de aloenxertos no camundongo.

Objetivos específicos

- Testar se a presença de células B-1 influencia na sobrevida de aloenxertos;

- Testar se a população de células B-1 responde ao estímulo dado pelo aloenxerto;

- Testar se o infiltrado inflamatório no aloenxerto contém células B-1;

- Testar se a composição do infiltrado inflamatório sofre interferências de células B-1.

3. MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos fêmeos das linhagens BALB/c, BALB/Xid (H-2^d) e C57BL/6 (H-2^b) foram comprados do CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais – UNIFESP) e mantidos no biotério da Disciplina de Imunologia, em gaiolas com 4 a 8 animais, em condições SPF. Ração e água foram fornecidas à vontade e a iluminação foi controlada com ciclos de claro e escuro. Com exceção dos recém-nascidos usados como doadores de corações, todos os outros camundongos usados tinham 6 semanas de vida no momento do transplante.

Os camundongos BALB/Xid, apesar da deficiência em células B-1 descrita na literatura, não possui características fenotípicas especiais, nem desenvolve patologias preferenciais, sendo, portanto, indistinguíveis de camundongos BALB/c, a olho nu.

3.2 Soluções

PBS – 80 g de NaCl, 0,4 g de KCl, 4,66 g de Na_2HPO_4, diluídos em quantidade suficiente para 1 litro de solução.

PBS-BSA - PBS suplementado com 1% de albumina bovina sérica.

PBS – EDTA – PBS suplementado com 1% de EDTA.

RPMI – Meio RPMI (Sigma, Saint Louis, MO) em pó suficiente para 1L, segundo instruções do farbricante, 1 g NaHCO3, 5,96g de HEPES, 50 mg de garamicina, diluídos em quantidade suficiente para 1 litro de solução.

R10 – RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de L-glutamina 100 mM e 0,1% de β-mercaptoetanol.

3.3 Enxertos de pele e de coração

Para todos os transplantes, os receptores foram camundongos BALB/c ou BALB/Xid e os doadores foram C57BL/6, no caso de transplantes alogênicos, ou BALB/c, no caso dos isogênicos.

Os enxertos de pele foram realizados conforme previamente descrito por Billingham e Medawar ([65]). O camundongo doador foi anestesiado por inalação de vapor de éter e sacrificado por deslocamento cervical para retirada da pele. Um fragmento de 1 cm^2 de pele da cauda do doador foi retirado e mantido em solução salina (0.9%) gelada. O camundongo receptor foi anestesiado com injeção intraperitoneal de 70-90 µl de uma mistura de cloridrato de quetamina a 10% (Dopalen, Vetbrands), xilazina a 2% (Rompun, Bayern HealthCare) e PBS, na proporção de 3:6:11, respectivamente. Após a anestesia, o camundongo teve suas patas fixadas por fita adesiva a uma superfície plana e foi depilado na parte dorsal. O dorso foi então limpo com auxílio de um pedaço de gaze embebida em álcool 70%. Antes da retirada da pele do receptor, um carimbo de 1 cm^2 foi aplicado ao dorso do camundongo, de modo a padronizar o tamanho da área a ser cortada. Com auxílio de pinça e tesoura, a área marcada foi retirada.

A pele do doador, mantida em salina, foi então transplantada para a região dorsal do receptor e ajustada para cobrir perfeitamente a área sem pele. Nenhuma sutura foi feita e o enxerto foi protegido com gaze e fita adesiva por 5 dias, para auxiliar o processo de cicatrização. Nos experimentos que mediram

a sobrevida do órgão, os enxertos foram observados diariamente e a rejeição foi definida quando a pele transplantada atingia uma diminuição de área de 80% da área original, acompanhada de endurecimento, formação de crosta e aspecto escamoso. A área da pele foi mediada diariamente com o auxílio de uma régua.

Os transplantes cardíacos heterotópicos foram realizados de acordo com o método já descrito na literatura ([66;67]) e revisado por Fey e colaboradores ([68]). Um camundongo recém-nascido foi anestesiado por hipotermia para a retirada do coração ([69]). O coração foi extraído e cortado com um bisturi longitudinalmente em duas partes, que foram colocadas em uma placa de Petri contendo solução salina gelada. O camundongo receptor foi anestesiado seguindo o mesmo protocolo descrito para os transplantes de pele e uma pequena incisão de 5 mm foi feita na base da parte externa de sua orelha, com um bisturi. Partindo da incisão, uma bolsa subcutânea foi sutilmente aberta com uma agulha hipodérmica de aço e uma das metades do coração foi então inserida nesta bolsa. Uma leve pressão feita com uma pinça foi suficiente para fechar a incisão, sem que houvesse a necessidade de suturas ou substâncias adesivas. Por esse método é possível usar um doador para dois receptores.

Cada enxerto foi diariamente observado, por no mínimo 30 segundos e no máximo 2 minutos, sem a necessidade de anestesiar o receptor. A observação foi feita colocando-se a orelha do camundongo contra uma fonte luminosa próxima, com o intuito de aumentar o contraste visual entre o órgão transplantado e o tecido adjacente do receptor. Como a atividade contrátil das células musculares cardíacas é uma característica que indica o sucesso da técnica de transplante, apenas aqueles corações que exibiram contratilidade

durante algum tempo foram levados em conta para os dados do estudo. Para definir a rejeição do enxerto, foi criada uma escala de aspectos macroscópicos que abrangeu quatro aspectos: atividade contrátil (indicativo da função cardíaca), pigmentação do enxerto (indicativo de fluxo sanguíneo), perda de tamanho do enxerto e perda de forma definida do enxerto (indicativo de dano

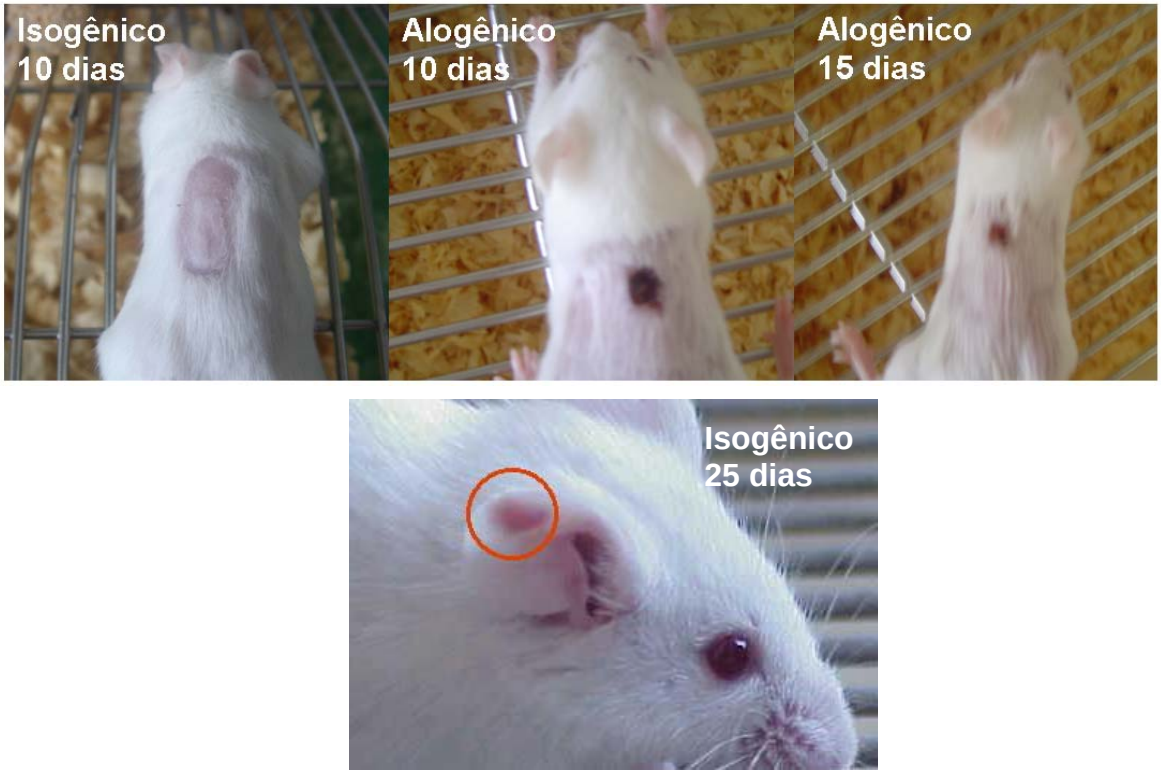
Pontos **(quanto menos pontos, mais avançada está a rejeição)**	Atividade contrátil	Irrigação sanguínea	Tamanho do órgão em relação ao tamanho original	Forma definida do órgão
+ + + + +	Sim	Intensa	100%	Sim
+ + + +	Não	Intensa	100%	Sim
+ + +	Não	Regular	70-50%	Sim
+ +	Não	Fraca	50-20%	Não
+	Não	Muito fraca	10-0%	Não

tecidual). A tabela 1 resume essa escala e a Figura 1 mostra o aspecto dos transplantes cardíacos e de pele.

Tabela 1 – Escala de pontos para definição da rejeição dos enxertos cardíacos heterotópicos

Escala de pontos para definição da rejeição do enxerto cardíaco heterotópico. Os corações foram diariamente monitorados e os pontos atribuídos a cada indivíduo. O observador era cego quanto aos grupos e quanto à pontuação de cada indivíduo, no dia anterior.

Figura 1 – Aspecto dos transplantes de pele e cardíacos



Aspecto dos transplantes de pele. As fotos superiores mostram camundongos BALB/c que receberam transplantes de pele isogênicos (primeira foto) ou alogênicos (segunda e terceira fotos). Nos transplantes alogênicos, ao longo do tempo a pele torna-se menor, com mais espessa e com crosta quebradiça. A foto inferior mostra o aspecto de um camundongo BALB/c que recebeu enxerto cardíaco isogênico.

3.4 Cultura de células peritoneais aderentes

A cultura foi baseada na descrição de Almeida e colaboradores ([12]), com poucas modificações. Células foram coletadas da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c por meio de lavagem com 8 mL de meio de cultura RPMI 1640. A suspensão celular ($5x10^5$ células/mL) foi mantida por 40 minutos a 37ºC em uma placa de Petri para estimular a aderência das células ao vidro ou ao plástico. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado meio R10 às células aderentes. Estas foram então cultivadas por 5 dias em estufa a 37ºC, em uma atmosfera de 5 % de CO_2. No quinto dia, as células que se desprenderam da placa, e que agora eram encontradas no

sobrenadante, foram coletadas para experimentação. Para a obtenção de 10^7 células no sobrenadante, foi necessária a lavagem de peritônios de 8 a 10 camundongos.

3.5 Análise fenotípica

As amostras obtidas a partir de células que infiltraram o enxerto, cultura de células peritoneais aderentes ou lavado peritoneal *ex vivo* foram analisadas por citometria de fluxo. A concentração foi ajustada para 10^7 células/mL em PBS-BSA. Para todas as marcações de células foram utilizados anticorpos feitos em ratos e específicos para moléculas de camundongos. Receptores do fragmento Fc de imunoglobulina foram bloqueados usando anticorpo anti-CD16/CD32 (1 μL/10^6 células) e as células foram marcadas com diferentes combinações de anticorpos acoplados a fluorocromos. Os anticorpos utilizados foram: anti-CD19-FITC, anti-CD117-PE, anti-CD5-Cy, anti-CD11b-APC, anti-CD23-PE, anti-CD4-Cy e anti-CD8-Cy (todos de BD-Pharmingen, San Diego, CA, EUA) (1 μL/10^6 células). As células foram então lavadas duas vezes com PBS-BSA e ressuspendidas em PBS para análise por citometria de fluxo. As amostras foram passadas em um FACS-Calibur e os dados foram analisados pelo programa de computador CellQuest (ambos da BD Biosciences, Mountain View, CA, EUA).

3.6 Isolamento das células que infiltraram o enxerto

As células que infiltraram o enxerto foram isoladas segundo protocolo já descrito na literatura ([70]). Em diferentes dias após o transplante de pele, o enxerto foi retirado do dorso do receptor e imerso em meio de cultura RPMI

1640, para que fosse cortado em pequenos pedaços com um bisturi. Os pequenos fragmentos foram então digeridos por 2 horas em solução de meio RPMI contendo enzimas Liberase (30 U/mL) e DNAse I (200U/mL) (ambos da Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EUA). A amostra foi em seguida lavada e posta para nova digestão em uma solução de tripsina 0,2% (Seção de Culturas Celulares, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil). As duas digestões enzimáticas foram realizadas a 37ºC em constante agitação. A amostra foi lavada duas vezes com meio R10 e as células foram mantidas por 15 minutos em PBS-EDTA à temperatura ambiente. Para separar as células infiltrantes de outros fragmentos maiores derivados da pele, a solução foi filtrada por meio de passagem por uma malha de tecido organza. A suspensão celular resultante foi analisada por citometria de fluxo.

3.7 Ensaio de rastreamento de células B-1

Para verificar a migração de células B-1 para o local do enxerto, foi utilizado carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester (CFSE, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). Células foram obtidas a partir de culturas de células peritoneais aderentes e diluídas em 10 mL de PBS, em uma concentração máxima de 10^6 células/mL. Dois µL de CFSE a uma concentração de 5 mM foram adicionados à suspensão celular. As células foram mantidas a 37ºC, por 10 minutos. A marcação celular foi interrompida pela adição de meio R10. As células foram lavadas por duas vezes e a concentração foi ajustada para $5x10^6$ células/mL de PBS estéril. A transferência adotiva foi realizada conforme descrito abaixo.

3.8 Transferência adotiva

A quantidade de $5x10^5$ células obtidas a partir de culturas de células peritoneais aderentes foi diluída em 100 µL de PBS estéril. Essa suspensão foi injetada por via intraperitoneal em camundongos BALB/Xid, para a formação do grupo experimental BALB/Xid+B-1. A transferência adotiva também foi realizada utilizando células marcadas com CFSE e receptores BALB/c. Em ambos os casos, 7 dias após receberem a transferência adotiva, os camundongos receberam transplantes de pele ou cardíacos. O grupo controle foi injetado apenas com PBS estéril.

3.9 Processamento histológico

Enxertos de pele foram retirados dos receptores em diferentes dias pós-transplante, fixados em formalina 12% em água destilada e enviados para Histotech Lâminas Didáticas Ltda, para processamento histológico. As secções foram coradas por hematoxilina e eosina.

Enxertos cardíacos foram retirados dos receptores 14 e 22 dias pós-transplante, fixados em formalina 12% e enviados para Histotech Lâminas Didáticas Ltda, para processamento histológico. As secções foram coradas por três diferentes métodos hematoxilina e eosina, hematoxilina férrica e azul de toluidina.

3.10 Contagem de mastócitos em lâminas histológicas

Os cortes foram corados com azul de toluidina. Mastócitos foram definidos como células com coloração roxo-azulada. A contagem de células foi

feita utilizando-se o aumento de 400x e os resultados foram expressos em número de mastócitos/campo microscópico.

3.11 Análise estatística

As curvas de sobrevida foram analisadas por meio do teste *logrank*. As frequências da população peritoneal de células B-1 foram comparadas pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *a posteriori* de Dunnet, para a comparação com o grupo isogênico. As frequências das células que infiltraram o enxerto foram comparadas pelo teste *t* de Student bicaudal para os grupos BALB/c *vs* BALB/Xid, em cada dia. Todos os outros dados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *a posteriori* de Bonferroni. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que tiveram $p<0,05$.

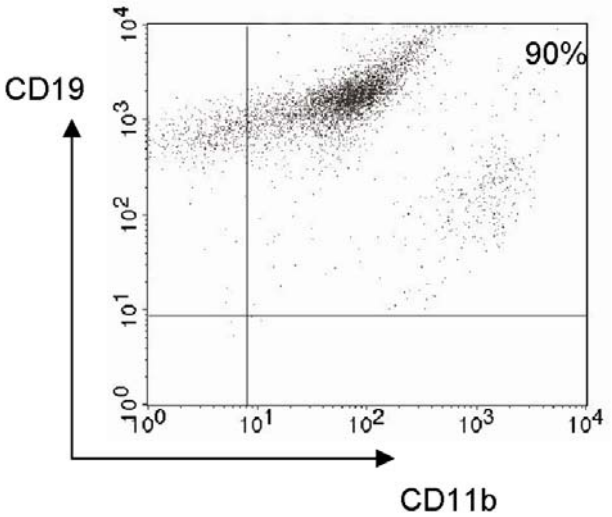
4. RESULTADOS

4.1 Porcentagem de células B-1 no sobrenadante de cultura de células peritoneais aderentes

Em vários experimentos descritos nesta seção de Resultados foram utilizados três grupos experimentais: BALB/c (camundongos selvagens), BALB/Xid (camundongos deficientes em células B-1) e BALB/Xid+B-1 (camundongos deficientes em células B-1, mas que receberam células B-1 de cultura).

Para a formação do grupo BALB/Xid+B-1, células peritoneais aderentes de camundongos BALB/c foram cultivadas por 5 dias e o sobrenadante dessa cultura foi utilizado para a transferência adotiva. A Figura 2 mostra uma análise de citometria de fluxo do sobrenadante da cultura com alta porcentagem de células B-1 ($CD19^+/CD11b^+$). Estas ainda eram $CD23^-$ e $CD5^-$ (não exibido), portanto células B-1b.

Figura 2 – Porcentagem de células B-1 no sobrenadante de cultura de células peritoneais aderentes



Porcentagem de células B-1 no sobrenadante de cultura de células peritoneais aderentes. A cultura foi mantida por 5 dias, a 37ºC e forneceu um sobrenadante com 90% de células $CD19^+$ $CD11b^+$ $CD23^-$ $CD5^-$. Esse sobrenadante foi utilizado para os experimentos de transferência celular.

4.2 Grupo BALB/Xid+B-1 possui porcentagens de células B-1 peritoneais semelhantes às do grupo BALB/c

Com o intuito de padronizar a quantidade ideal de células de cultura a ser transferida para camundongos BALB/Xid, vários protocolos de reconstituição foram testados, com várias quantidades de células injetadas. Sete dias após receberem a transferência de células B-1, os camundongos BALB/Xid+B-1 foram sacrificados para análise da porcentagem de células B-1 peritoneais por citometria de fluxo. Assim como exibido na Tabela 2, foram testadas quantidades de $5x10^5$ a $4x10^6$ células injetadas por via intraperitoneal. Não houve uma relação linear entre a quantidade de células injetadas e a porcentagem de células B-1 no peritônio do camundongo receptor. A quantidade de $5x10^5$ células foi a que surpreendentemente gerou uma porcentagem de células B-1 peritoneais mais próxima daquela do camundongo selvagem. Além disso, o fato de ser o menor número de células testado possibilita a utilização de menor número de animais doadores de células para os experimentos de transferência. A quantidade de $5x10^5$ células de cultura foi, então, a escolhida para a formação do grupo BALB/Xid+B-1. Quantidades menores que $5x10^5$ não foram testadas.

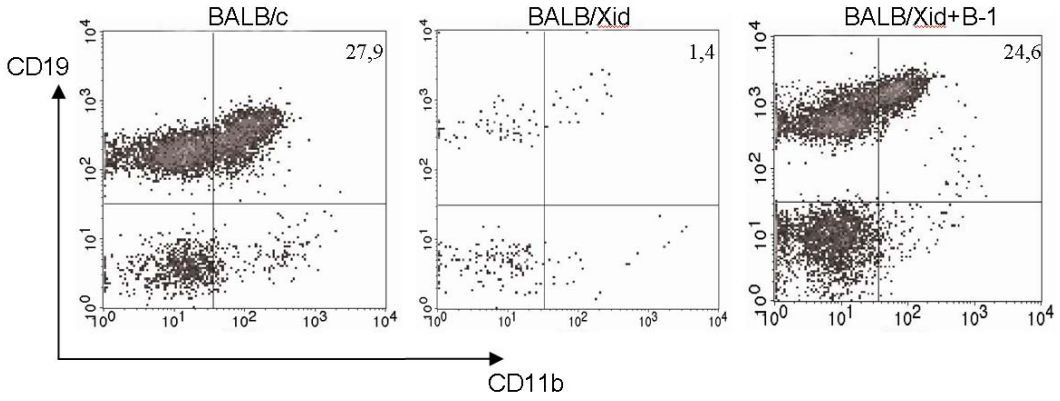
A Figura 3 mostra a análise das cavidades peritoneais dos três grupos experimentais: BALB/c, BALB/Xid e BALB/Xid+B-1. As porcentagens similares entre o primeiro e o terceiro grupo levam à conclusão de que o protocolo de transferência celular foi bem sucedido.

Tabela 2 – Diferentes quantidades de células de cultura transferidas para reconstituir o peritônio de camundongos BALB/Xid

Quantidade de células de cultura transferidas	**Linhagem do camundongo receptor da transferência**	**% de células B-1 no peritônio 7 dias após após a transferência** (n=2 animais por grupo)
--	BALB/c	27,9 ± 0,6
--	BALB/Xid	1,4 ± 0,3
$5x\ 10^5$	BALB/Xid	24,6 ± 0,6
$1x10^6$	BALB/Xid	14,5 ± 1,0
$2x10^6$	BALB/Xid	23,6 ± 3,5
$3x10^6$	BALB/Xid	16,6 ± 5,5
$4x10^6$	BALB/Xid	19,9 ± 4,7

Diferentes quantidades de células de cultura transferidas para reconstituir o peritônio de camundongos BALB/Xid. Foram utilizadas suspensões coletadas do sobrenadante de culturas de células peritoneais aderentes para injeção intraperitoneal em camundongos BALB/Xid. Os camundongos BALB/c e BALB/Xid controle receberam apenas a injeção intraperitoneal de PBS. Sete dias após a transferência, a porcentagem de células $CD19^+$ $CD11b^+$ foi analisada em amostras de células peritoneais *ex vivo*.

Figura 3 – Porcentagem de células B-1 na cavidade peritoneal dos diferentes grupos experimentais



Porcentagem de células B-1 na cavidade peritoneal dos diferentes grupos experimentais. Células peritoneais dos grupos BALB/c, BALB/Xid e BALB/Xid+B-1 foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos mostram a porcentagem de células $CD19^+$ $CD11b^+$ no peritônio.

4.3 A ausência de células B-1 atrasa a rejeição de aloenxertos de pele e coração

Para verificar se células B-1 participam do processo de rejeição, a sobrevida de aloenxertos em camundongos nos grupos BALB/c, BALB/Xid e BALB/Xid+B-1 foi acompanhada.

A rejeição tanto da pele (Figura 4A) quanto do coração (Figura 4B) foi atrasada quando o camundongo não possuía células B-1. Quanto aos transplantes de pele os grupos BALB/c e BALB/Xid+B-1 apresentaram a mesma sobrevida média - tempo passado até que metade dos transplantes tenham sido rejeitados – de 13 dias, enquanto que o grupo BALB/Xid apresentou sobrevida média de 15 dias. No caso dos transplantes cardíacos, a sobrevida média dos grupos BALB/c, BALB/Xid e BALB/Xid+B-1 foi, respectivamente, 20, 27 e 21,5 dias. Esses resultados sugerem que a ausência de células B-1 no receptor leva a um atraso na rejeição do aloenxerto.

Apesar de a ausência de células B-1 ter retardado a perda do aloenxerto, ela não foi capaz de evitar a rejeição por completo e tornar o camundongo BALB/Xid tolerante. Além disso, a diferença entre as curvas de sobrevida dos grupos com células B-1 e o grupo BALB/Xid aumentou quando os animais receberam enxertos cardíacos, que são transplantes menos imunogênicos que os de pele. Esses dados sugerem que células B-1 desempenham um papel de coadjuvante, ao invés de essencial, na aceleração da rejeição de aloenxertos.

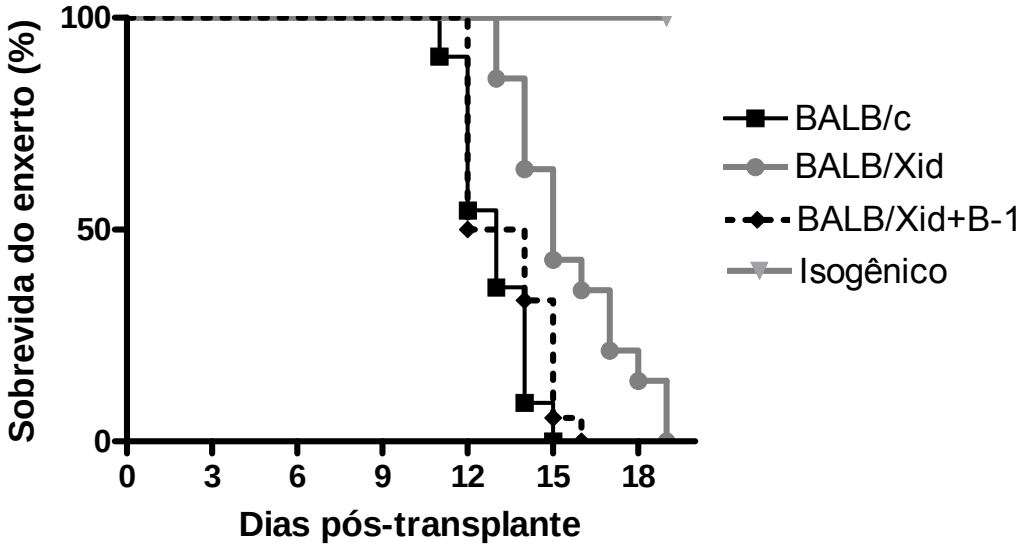
Os cortes histológicos dos enxertos cardíacos mostram que o transplante isogênico teve suas fibras musculares preservadas (Figura 4C e D) e, por isso, mostrou atividade contrátil por tempo indeterminado (tempo máximo

observado = 300 dias). Já nos transplantes alogênicos no dia 14 pós-transplante, não foi possível observar as fibras musculares organizadas como no caso dos transplantes isogênicos. Enxertos cardíacos alogênicos transplantados para receptores BALB/c (Figura 4E e F) e BALB/Xid+B-1 (Figura 4I e J) apresentaram áreas de necrose e tecido cicatricial, com sutil infiltrado inflamatório. Já em receptores BALB/Xid (Figura4G e H), pôde-se observar um intenso infiltrado inflamatório e algumas fibras musculares ainda não danificadas.

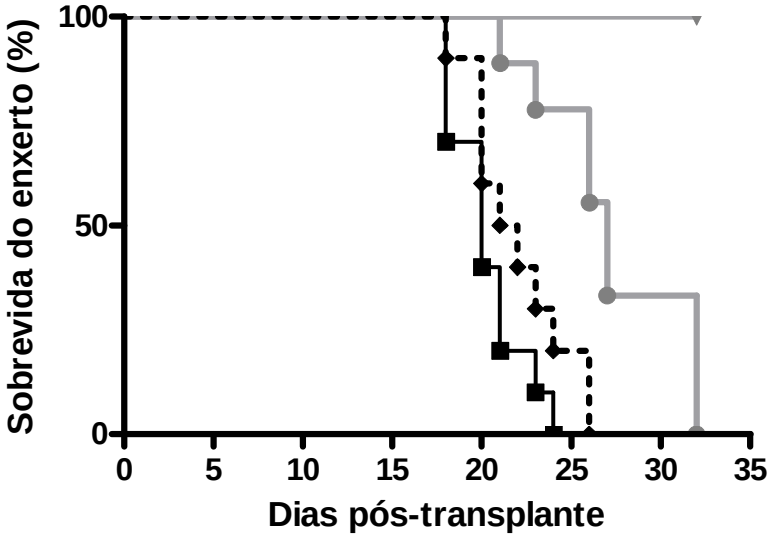
Os cortes histológicos dos transplantes de pele mostram que enxertos alogênicos em receptores BALB/c (Figura 4M) e BALB/Xid (Figura 4N) apresentaram um proeminente infiltrado inflamatório, ausente nos transplantes isogênicos (Figura 4K e L). Não houve diferenças claras entre os cortes histológicos de aloenxertos de pele em camundongos BALB/c e BALB/Xid.

Figura 4A e B – Sobrevida dos enxertos de pele e coração em receptores com e sem células B-1

A

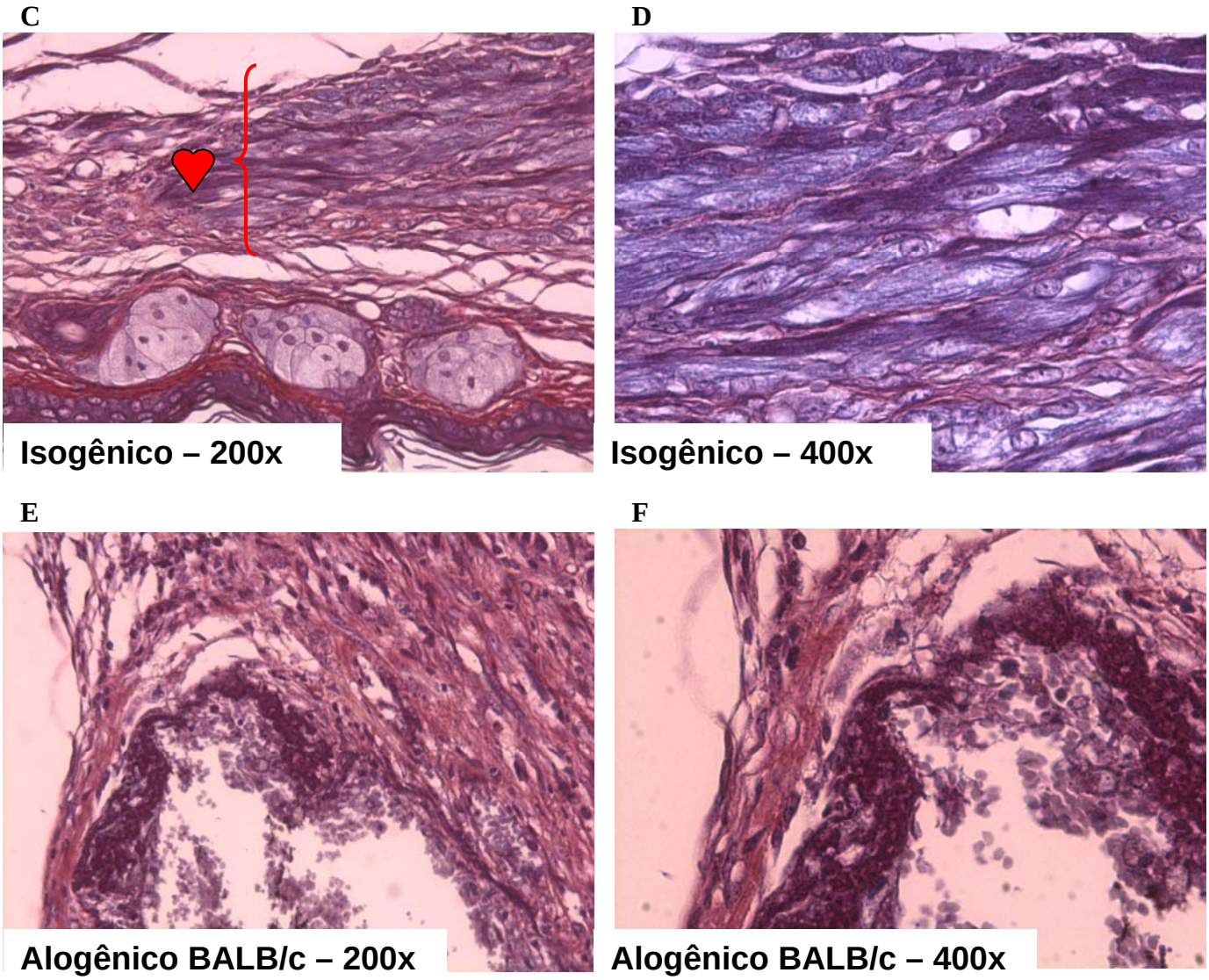


B



Sobrevida dos enxertos de pele e coração em receptores com e sem células B-1**. (A)** e **(B)** são representativos de 3 experimentos independentes. **(A)** A sobrevida de enxertos de pele isogênicos e alogênicos foi acompanhada diariamente. p=0,0005 para BALB/c (linha preta, n=11) *vs* BALB/Xid (linha cinza, n=14) e p=0.0035 para BALB/Xid *vs* BALB/Xid+B-1 (linha pontilhada, n=18). **(B)** A sobrevida de enxertos cardíacos isogênicos e alogênicos foi acompanhada diariamente. p=0,0002 para BALB/c (n=10) *vs* BALB/Xid (n=9) e p=0.0024 para BALB/Xid *vs* BALB/Xid+B-1 (n=10).

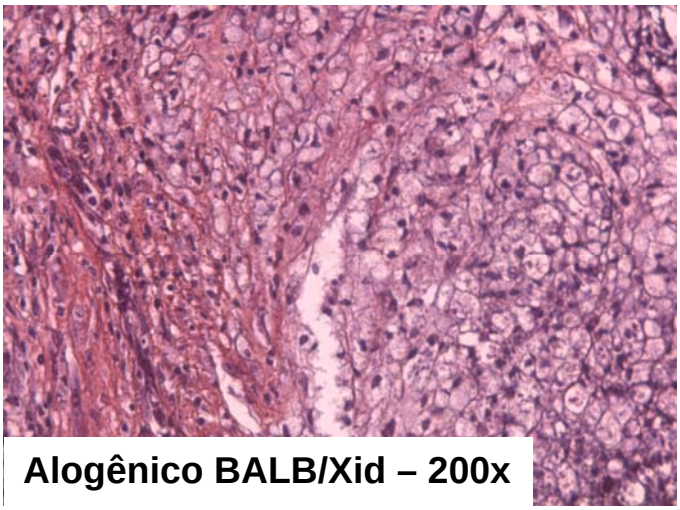
Figura 4C, D, E e F – Sobrevida dos enxertos cardíacos em receptores com e sem células B-1



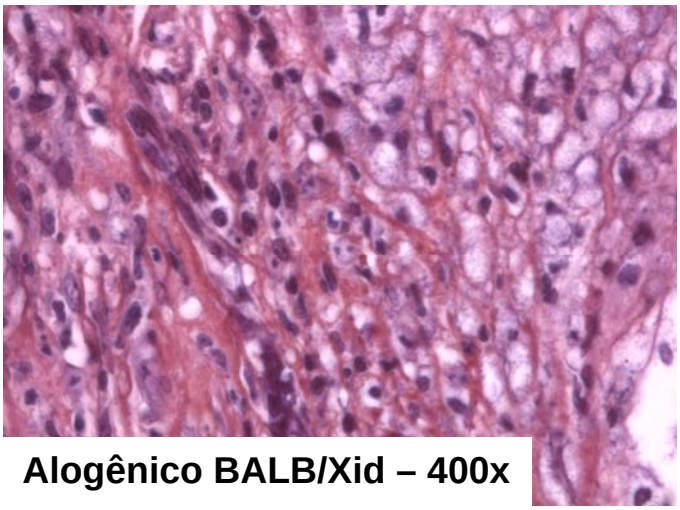
Sobrevida dos enxertos de pele e coração em receptores com e sem células B-1**.** Enxertos cardíacos heterotópicos foram retirados no dia 14 pós-transplante para processamento histológico. As secções foram coradas com hematoxilina férrica. **(C)** e **(D)** Transplante isogênico em um receptor BALB/c nos aumentos de 200x e 400x respectivamente. A chave em **(C)** mostra a extensão do órgão transplantado, que está localizado em uma bolsa subcutânea na orelha do camundongo. **(E)** e **(F)** Transplante alogênico em receptor BALB/c nos aumentos de 200x e 400x respectivamente.

Figura 4G, H, I e J – Sobrevida dos enxertos cardíacos em receptores com e sem células B-1

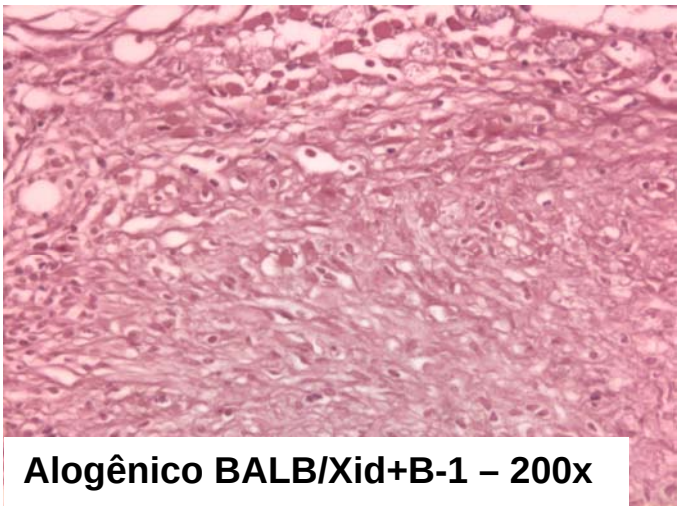
G



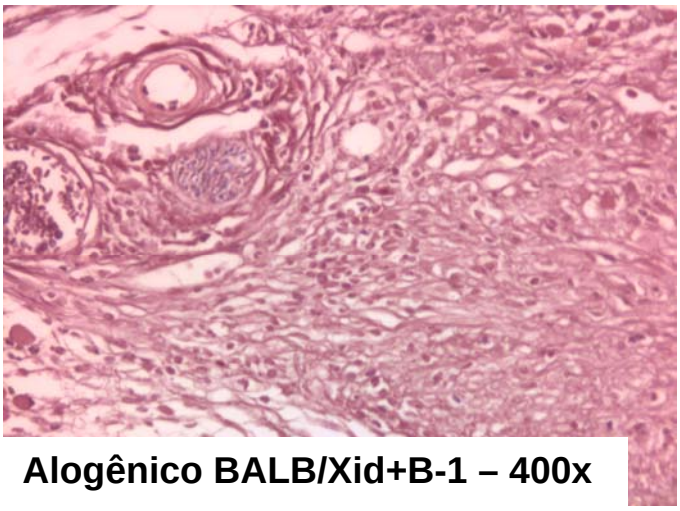
H



I

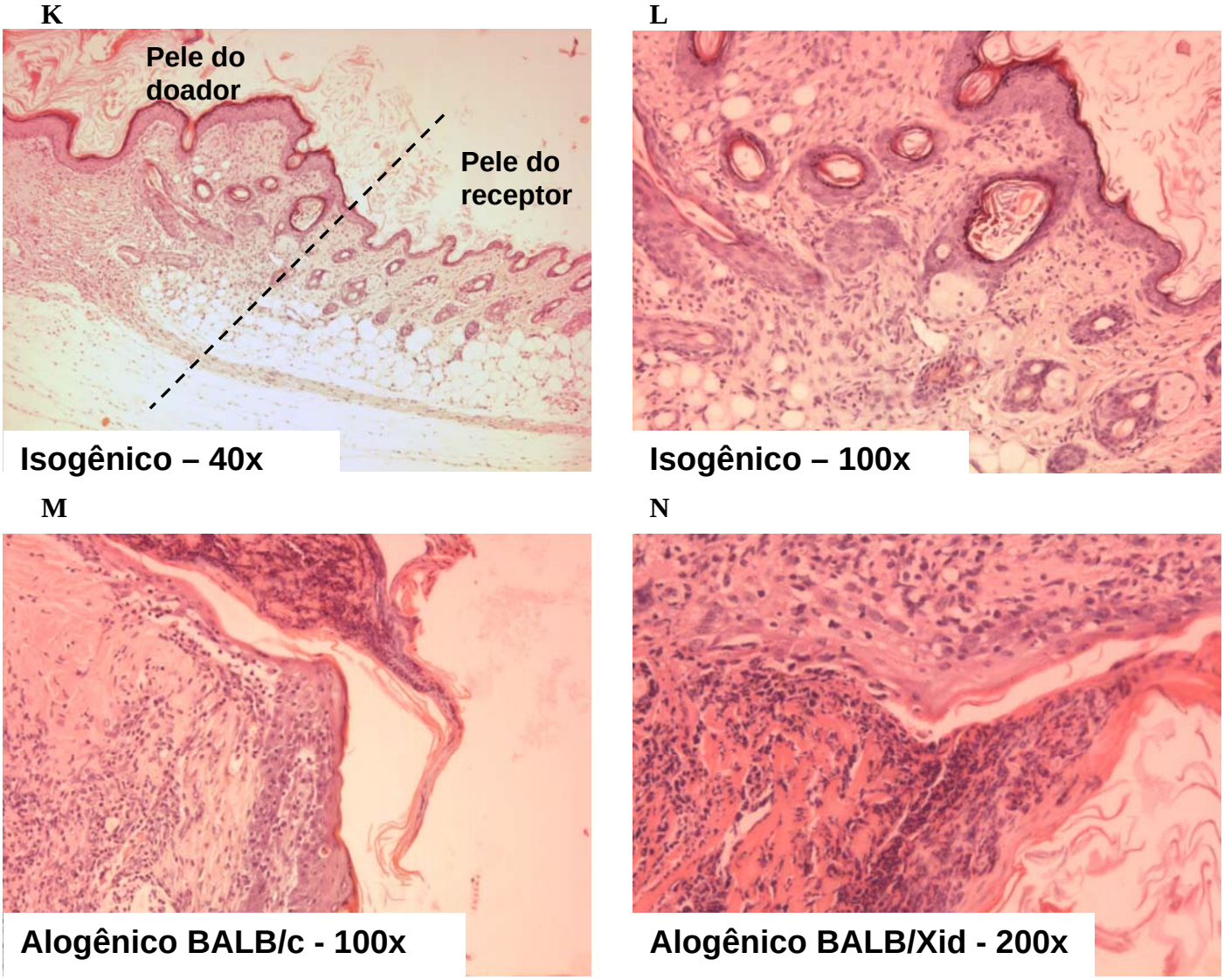


J



Sobrevida dos enxertos de pele e coração em receptores com e sem células B-1**.** Enxertos cardíacos heterotópicos foram retirados no dia 14 pós-transplante para processamento histológico. As secções foram coradas com hematoxilina férrica. **(G)** e **(D)** Transplante alogênico em um receptor BALB/Xid nos aumentos de 200x e 400x respectivamente. **(I)** e **(J)** Transplante alogênico em receptor BALB/Xid+B-1 nos aumentos de 200x e 400x, respectivamente.

Figura 4K, L, M e N – Sobrevida dos enxertos de pele em receptores com e sem células B-1



Sobrevida dos enxertos de pele e coração em receptores com e sem células B-1**.** Enxertos de pele foram retirados no dia 10 pós-transplante para processamento histológico. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina. **(K)** e **(L)** Transplante isogênico em um receptor BALB/c nos aumentos de 40x e 100x respectivamente. A linha tracejada em **(K)** representa a junção entre a pele original do receptor e a pele transplantada do doador. **(M)** Transplante alogênico em receptor BALB/c no aumento de 100x. **(N)** Transplante alogênico em receptor BALB/Xid no aumento de 200x

4.4 A população de células B-1 peritoneais responde ao estímulo alogênico de pele

Uma vez que foram encontrados indícios da participação de células B-1 na rejeição de enxertos, testou-se um possível efeito do recebimento de um enxerto de pele sobre a população de células B-1 peritoneais.

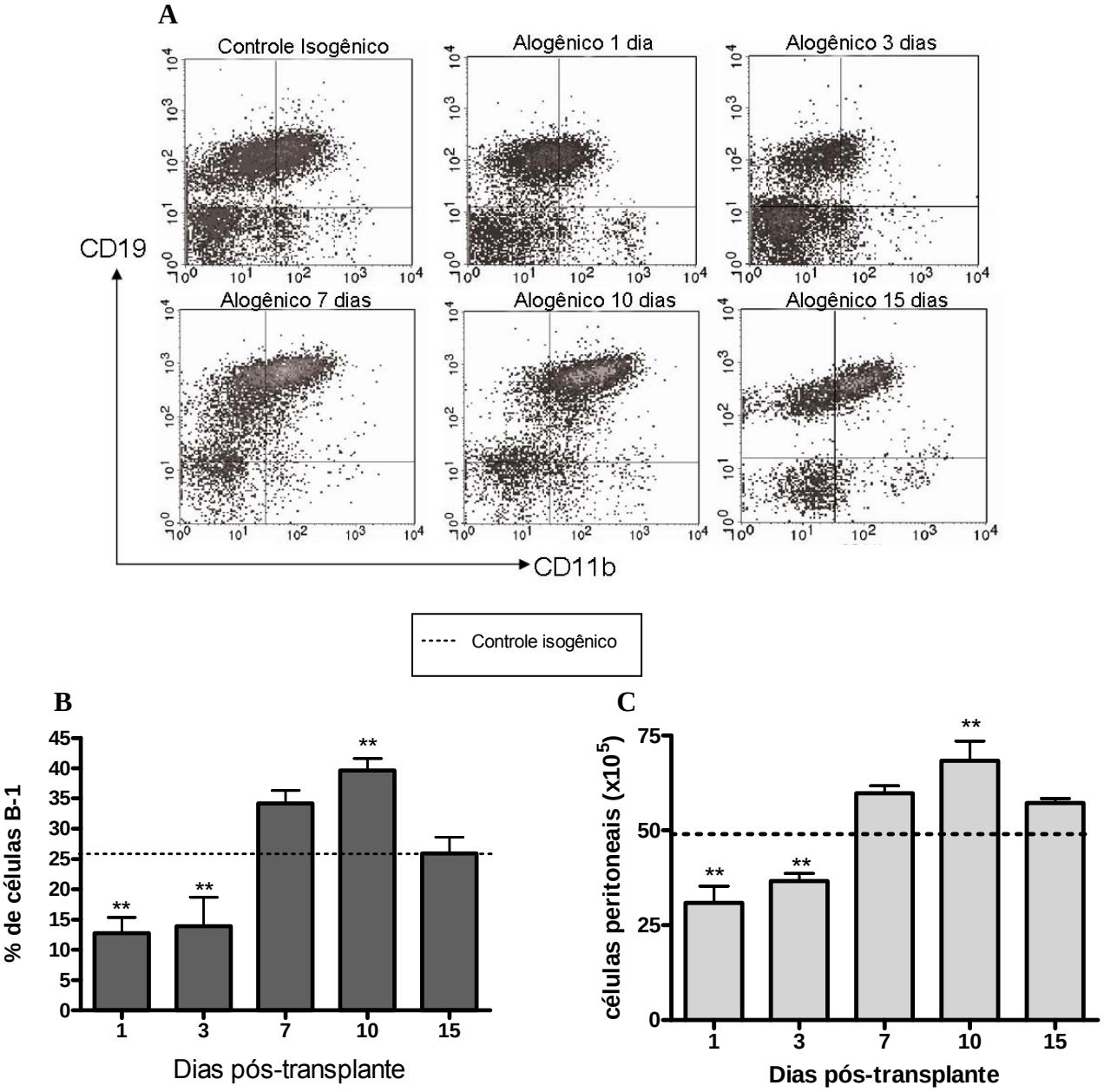
Alterações no número de células B-1 peritoneais foram descritas após alguns estímulos. Já foi demonstrado em camundongos que células B-1 participam da resolução da infecção por *Borrelia hermsii*, uma bactéria causadora de febre recidivante, e que a cura do primeiro pico de bacteremia coincide com um aumento na frequência de células B-1 na cavidade peritoneal ([23]). Resultados similares foram descritos utilizando-se camundongos TCRα *knockout*, que possuem uma tendência de desenvolver doenças inflamatórias autoimunes, quando colocados em condições SPF. Nesses camundongos, a supressão de colite crônica foi correlacionada com alterações na população de células B-1 peritoneais ([71]). Em ambos os casos, a frequência de células B-1 foi alterada após um estímulo – infecção ou condições SPF – fato interpretado como ativação celular.

Camundongos BALB/c receberam enxertos de pele e foram sacrificados em diferentes dias para análise da população de células B-1 peritoneais. Enxertos de pele isogênicos não provocaram nenhuma alteração significativa na frequência de células B-1 ($CD11b^+/CD19^+$) da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, quando comparados com camundongos não manipulados (Figura 5A, primeiro gráfico e Figura 5B e C, linha pontilhada, em comparação com Figura 3, gráfico BALB/c). Diferentemente dos transplante isogênicos, os aloenxertos de pele induziram significativas alterações na

população de células B-1 peritoneais. Primeiro observou-se uma redução de células B-1 nos dias 1 e 3 pós-transplante. Em seguida, no dia 10, a população mostrou-se aumentada, até que foi reduzida a níveis normais no dia 15 (Figura 5). As mudanças observadas na frequência de células B-1 refletem alterações no número absoluto dessas células e não foram causadas por alterações no número de outros tipos celulares residentes no peritônio (Figura 5C).

Esses dados apóiam a ideia de que células B-1 de fato participam do processo de rejeição de aloenxertos, haja vista que a população de células B-1 peritoneais é rapidamente afetada pelo estímulo alogênico. Além disso, no dia 15 pós-transplante, o número de células B-1 retorna a níveis observados em camundongos que receberam apenas enxertos isogênicos. Segundo os experimentos de sobrevida feitos em BALB/c, no dia 15 considera-se o transplante como rejeitado (sobrevida média de 13 dias, Figura 4A). Em outras palavras, o número de células B-1 retorna ao normal quando o estímulo alogênico é severamente diminuído.

Figura 5 – Alterações na população de células B-1 peritoneais após transplante de pele



Alterações na população de células B-1 peritoneais após transplante de pele. **(A)** Células peritoneais de camundongos transplantados foram coletadas nos tempos indicados e a frequência de células B-1 ($CD19^+$ $CD11b^+$) foi analisada. Cada gráfico é representativo de 4 camundongos e mostra dados gerados a partir de leitura de 10.000 eventos. **(B)** Média e desvio padrão da frequência de células B-1 peritoneais (n=4 por dia). A frequência de células B-1 peritoneais nos camundongos que receberam transplantes isogênicos se manteve constante durante todo o período de observação e não diferiu daquela de camundongos não manipulados (dados não mostrados). A linha pontilhada representa a média da frequência de células B-1 peritoneais em camundongos que receberam transplantes isogênicos, no dia 1 pós-transplante (média = 21,86%, DP = 3,18%). ** indica $p<0,01$ para os grupos de transplantes alogênicos nos dias 1, 3 e 10, todos em comparação com o grupo de transplantes isogênicos (linha pontilhada). Continua na próxima página.

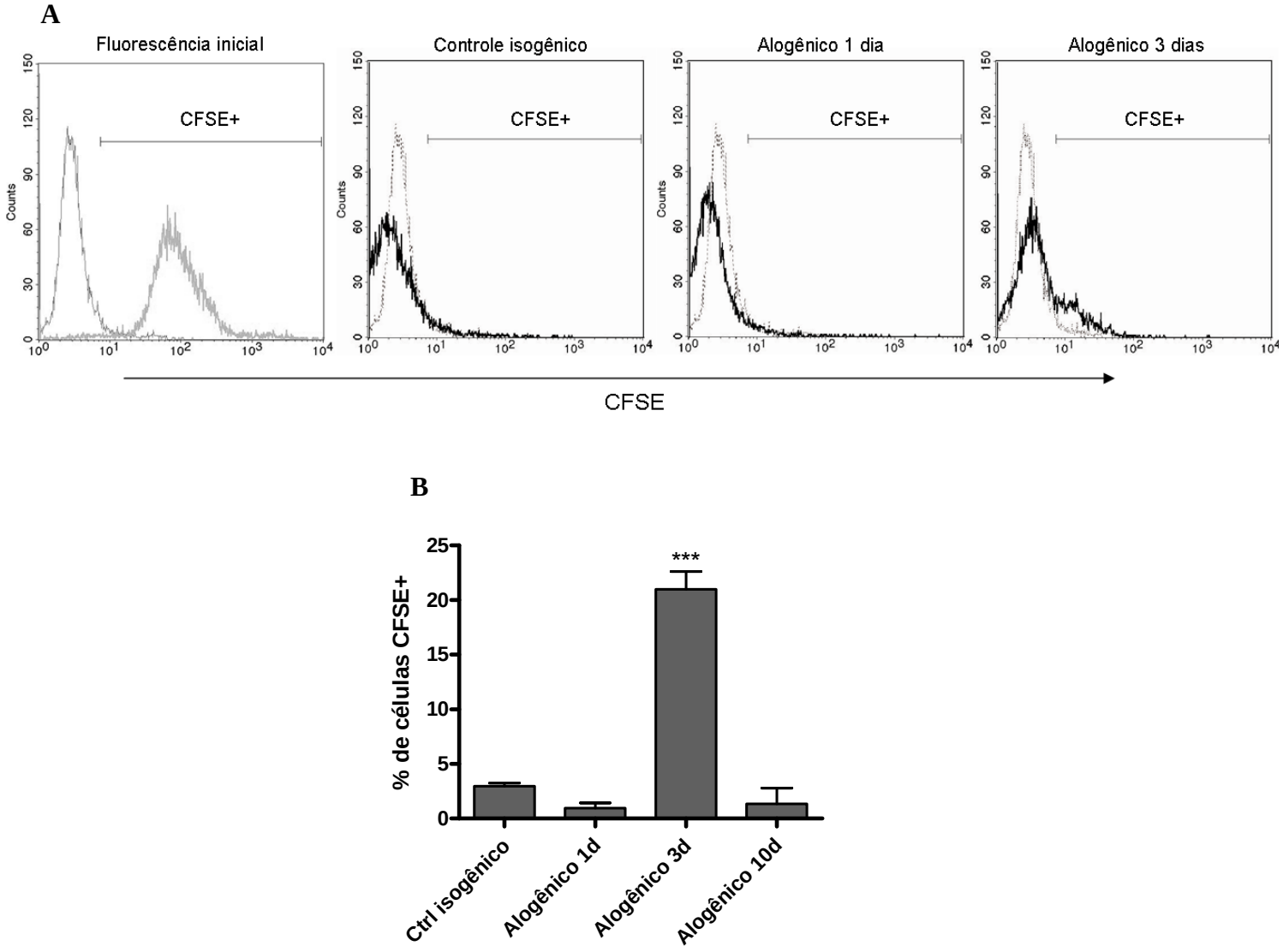
(Continuação da legenda da Figura 5) **(C)** Média e desvio padrão do número de células B-1 peritoneais (n=4 por dia). A linha pontilhada representa a média do número de células B-1 em camundongos que receberam transplantes isogênicos, no dia 1 pós-transplante (média = 50,4, DP = 5,2). ** indica p<0,01 para os grupos de transplantes alogênicos nos dias 1, 3 e 10, todos em comparação com o grupo de transplantes isogênicos (linha pontilhada).

4.5 Células B-1 infiltram o enxerto alogênico de pele

Os resultados descritos até agora sugerem a participação de células B-1 na rejeição de aloenxertos e mostram que a ausências delas leva a um atraso na rejeição. Decidiu-se, então, verificar se células B-1, de maneira semelhante a outras células, são capazes de infiltrar o enxerto em processo de rejeição. Para isso, sobrenadantes de cultura de células peritoneais aderentes foram utilizadas, já que foi constatada uma alta proporção de células B-1 nessa fração (Figura 2). As células foram marcadas com CFSE e transferidas por via intraperitoneal para camundongos BALB/c. Uma semana após a injeção, os camundongos receberam enxertos de pele, que foram coletados em diferentes dias, para digestão e análise das células que os haviam infiltrado.

As suspensões celulares derivadas de enxertos isogênicos não continham células fluorescentes em nenhum dos dias observadas (Figura 6A, segundo histograma). A ausência de células fluorescentes também foi constatada em suspensões derivadas de aloenxertos no dia 1 pós-transplante (Figura 6A, terceiro histograma). No entanto, foram encontradas células $CFSE^+$ entre as células que infiltraram o aloenxerto, no dia 3 (Figura 6A, quarto histograma). Como as células B-1 foram injetadas via intraperitoneal, a presença de células fluorescentes no enxerto mostra que células B-1 são capazes de deixar a cavidade peritoneal e infiltrar um órgão em processo de rejeição. Contudo, a presença de células $CFSE^+$ no enxerto não foi duradoura, uma vez que elas não foram detectadas no dia 10 pós-transplante (Figura 6B).

Figura 6 – Identificação de células B-1 infiltrantes no enxerto de pele



Identificação de células B-1 infiltrantes no enxerto. **(A)** Células B-1 marcadas com CFSE e transferidas para camundongos BALB/c. Estes receberam transplantes de pele que foram coletados nos dias indicados para análise do infiltrado inflamatório, por citometria de fluxo. A fluorescência inicial das células marcadas está ilustrada no primeiro histograma (linha cinza grossa). Cada um dos outros três histogramas é representativo de quatro animais diferentes e mostra as células não marcadas (linha cinza fina) e as células infiltrantes em cada grupo (linha preta grossa). **(B)** Porcentagem de eventos $CFSE^+$ nas células infiltrantes do enxerto. Médias e desvio padrão estão mostrados (n=4 por dia). *** indica $p<0,001$ para Alogênico 3d *vs* qualquer outro grupo.

4.6 Na ausência de células B-1, há um aumento do infiltrado de mastócitos e uma diminuição do infiltrado de células T no aloenxerto de pele

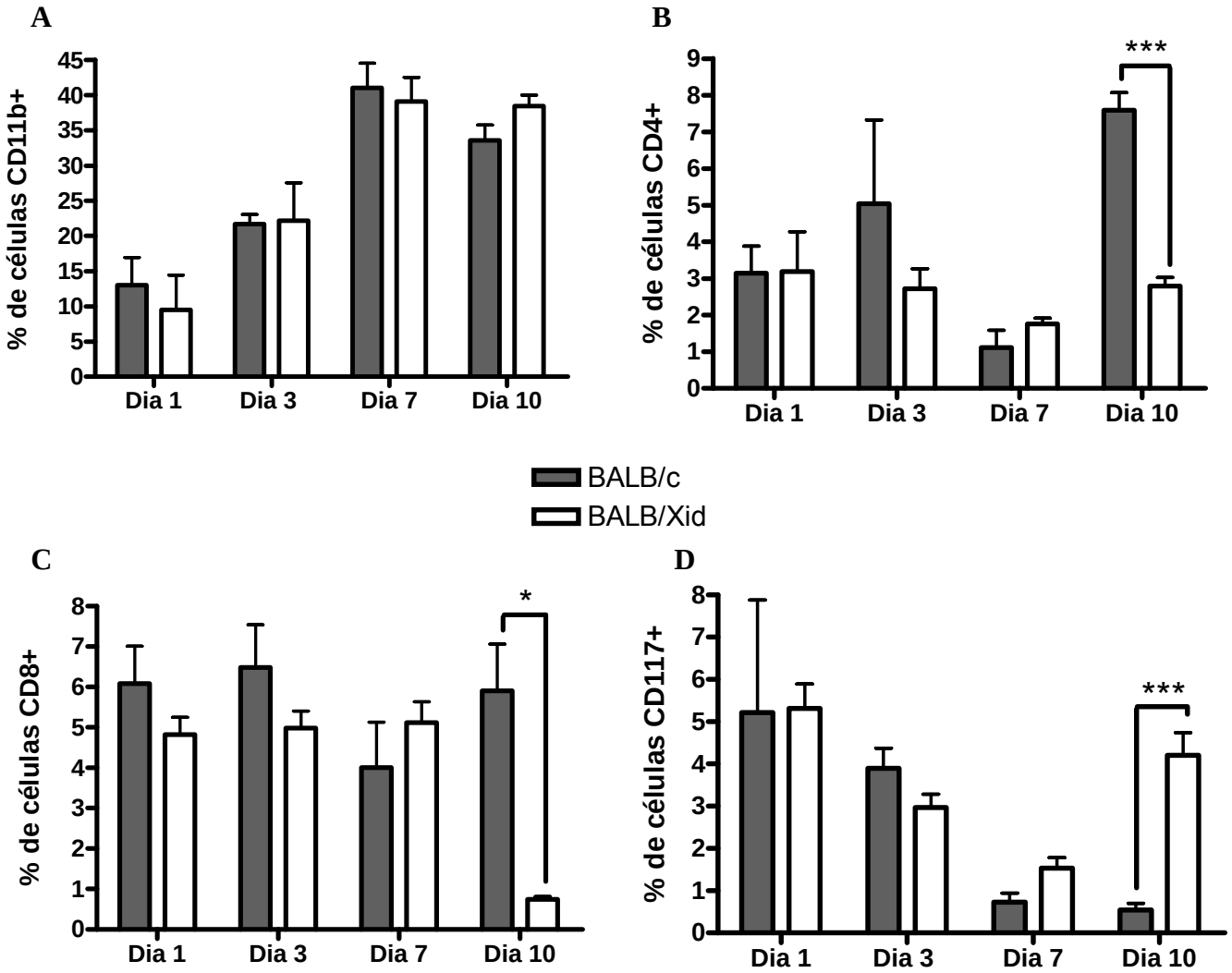
Há muitos dados na literatura que correlacionam os tipos de células que infiltram o enxerto com o destino deste – será tolerado ou rejeitado ([57;59;72]).

Criou-se a hipótese, então, de que as diferenças de sobrevida de aloenxertos observadas entre os grupos BALB/c e BALB/Xid (Figura 4) eram causadas por possíveis diferenças no infiltrado inflamatório nesses dois grupos. Para testar essa hipótese, camundongos dos dois grupos receberam aloenxertos de pele, que foram coletados em diferentes dias para digestão. As células que infiltraram o enxerto foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos e foram analisadas por citometria de fluxo.

Não houve diferenças na quantidade de macrófagos infiltrantes (eventos de grande tamanho e $CD11b^+$) entre BALB/c e BALB/Xid em nenhum dia observado (Figura 7A). Contudo peles enxertadas em camundongos BALB/c, no dia 10 pós-transplante, continham um número diminuído tanto de células T $CD4^+$ (Figura 7B) quanto de T $CD8^+$ (Figura 7C), quando comparadas com peles em camundongos BALB/Xid. Interessantemente, no mesmo dia, havia mais mastócitos ($CD117^+$) infiltrando aloenxertos de pele em BALB/Xid do que em BALB/c (Figura 7D).

Uma menor infiltração de células T em camundongos BALB/Xid é coerente com a maior sobrevida dos enxertos de pele apresentada por esse grupo (Figura 4A). Também é coerente uma maior presença de mastócitos, visto que estes foram recentemente associados a processo imunossupressores na rejeição de aloenxertos de pele ([59]).

Figura 7 – Composição do infiltrado inflamatório na pele transplantada para camundongos com e sem células B-1



Composição do infiltrado inflamatório na pele transplantada para camundongos com e sem células B-1. **(A)**, **(B)**, **(C)** e **(D)** Aloenxertos foram coletados nos dias indicados para digestão. As células infiltrantes no enxerto foram marcadas com anticorpos específicos e analisadas por citometria de fluxo (n=4 animais por barra). **(A)** Macrófagos foram definidos como células de maior tamanho, $CD11b^+$. **(B)** Células T $CD4^+$ foram definidas como células $CD4^+$ dentro do *gate* de linfócitos. *** indica p<0,001 para BALB/c *vs* BALB/Xid. **(C)** Células T $CD8^+$ foram definidas como células $CD8^+$ dentro do *gate* de linfócitos. * indica p<0,05 para BALB/c *vs* BALB/Xid. **(D)** Mastócitos foram definidos como células $CD117^+$. *** indica p<0,001 para BALB/c *vs* BALB/Xid.

4.7 A transferência adotiva de células B-1 reduz a proporção de mastócitos infiltrantes no enxerto

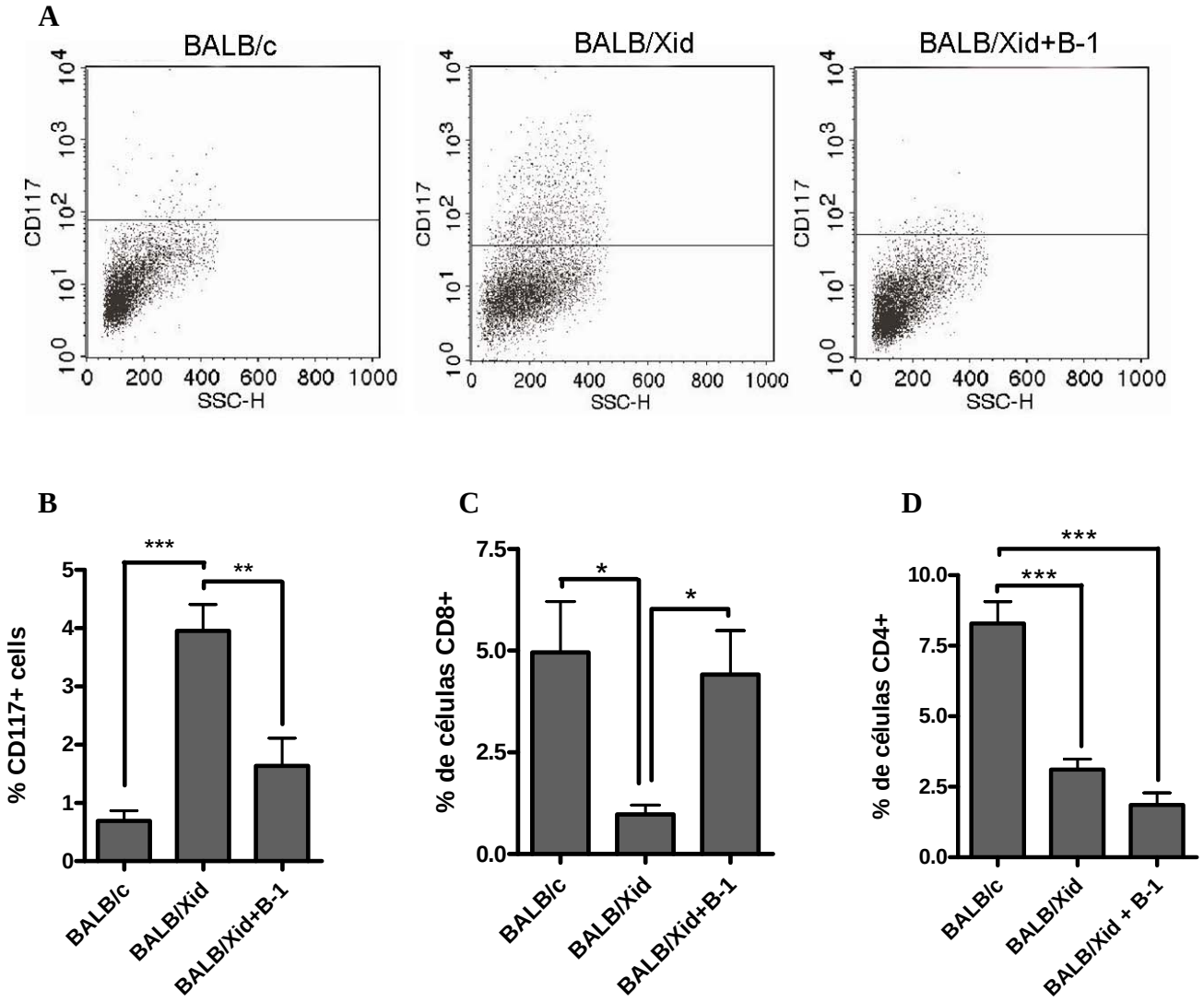
Para confirmar se a presença células B-1 de fato interfere no infiltrado inflamatório em aloenxertos de pele, células B-1 de camundongos BALB/c foram cultivadas e injetadas em camundongos BALB/Xid. Uma semana após a injeção, camundongos BALB/Xid+B-1 receberam aloenxertos de pele.

Para os experimentos com o grupo BALB/Xid+B-1, foi escolhido o dia 10 pós-transplante como o dia para análise do infiltrado inflamatório, uma vez que foi o dia em foram encontradas diferenças significativas entre BALB/c e BALB/Xid (Figura 7A, B e C). Interessantemente, o grupo BALB/Xid+B-1 apresentou significativamente menos mastócitos que o grupo BALB/Xid e não se mostrou diferente do grupo BALB/c (Figura 8A e B). Há, portanto, uma correlação entre a presença de células B-1 na cavidade peritoneal do receptor e a infiltração de mastócitos no aloenxerto de pele.

4.8 A transferência adotiva de células B-1 restaura os níveis de células T CD8$^+$ infiltrantes em aloenxertos de pele, mas não de T CD4$^+$

A frequência de células T infiltrantes no grupo BALB/Xid+B-1 também foi analisada, no dia 10 pós-transplante. De maneira similar aos mastócitos, a quantidade de células T CD8$^+$ infiltrantes no grupo BALB/Xid+B-1 não diferiu da observada no grupo BALB/c (Figura 8C), mostrando novamente que a transferência de células B-1 foi capaz de alterar a composição do infiltrado inflamatório. Tal alteração, entretanto, não foi observada em células T CD4$^+$ infiltrantes, cujos níveis permaneceram os mesmos tanto em BALB/Xid+B-1 como em BALB/Xid (Figura 8D).

Figura 8 – Efeito da transferência de células B-1 sobre o infiltrado inflamatório em enxertos de pele



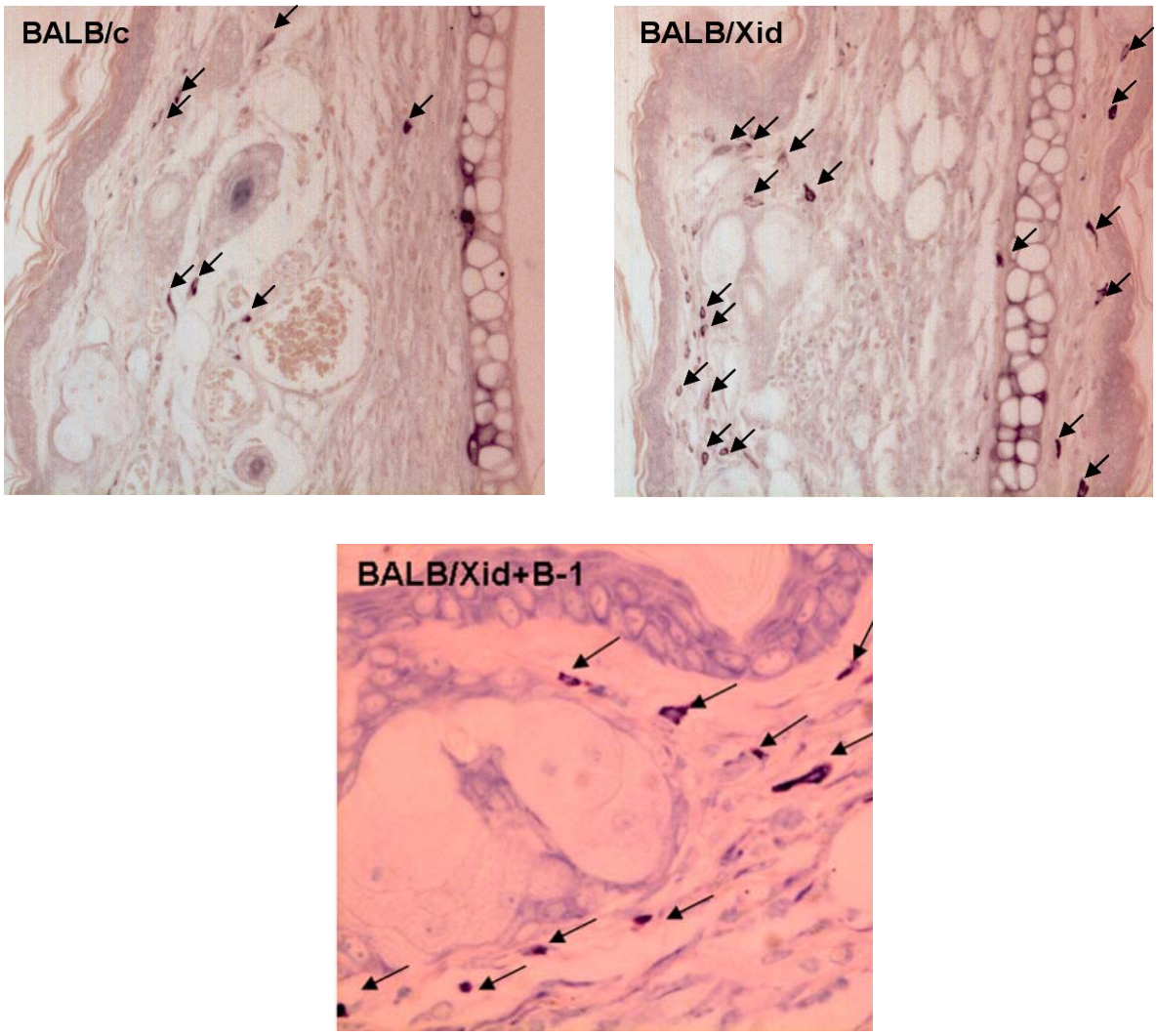
Efeito da transferência de células B-1 sobre o infiltrado inflamatório em enxertos de pele. **(A)**, **(B)**, **(C)** e **(D)** Células infiltrantes no enxerto de pele foram isoladas no dia 10 pós transplante. As células foram marcadas com anticorpos específicos e analisadas por citometria de fluxo. **(A)** Cada gráfico mostra mastócitos ($CD117^+$) infiltrantes e é representativo de 5 animais diferentes. **(B)**, **(C)** e **(D)** Porcentagem de mastócitos, células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ infiltrantes no enxerto de pele. Médias e desvio padrão estão mostrados (n=5 por grupo). * indica $p<0,05$; ** indica $p<0,01$ e *** indica $p<0,001$.

4.9 Na ausência de células B-1, há um aumento do infiltrado de mastócitos no aloenxerto cardíaco

A infiltração de mastócitos também foi avaliada no modelo de transplante cardíaco heterotópico. Como as metades de coração transplantadas eram muito pequenas para serem digeridas e ainda fornecerem uma quantidade adequada de células para a análise por citometria de fluxo, outro método foi utilizado. Secções feitas a partir das metades de coração foram coradas com azul de toluidina e os mastócitos foram contados pela visualização em um microscópio óptico. A contagem de mastócitos foi maior no grupo BALB/Xid nos dias 14 (Figura 9A e B) e 22 (Figura 9C) pós-transplante, quando comparado com os grupos BALB/c e BALB/Xid+B-1. Esses achados estão de acordo com o que foi observado na infiltração de mastócitos em aloenxertos de pele.

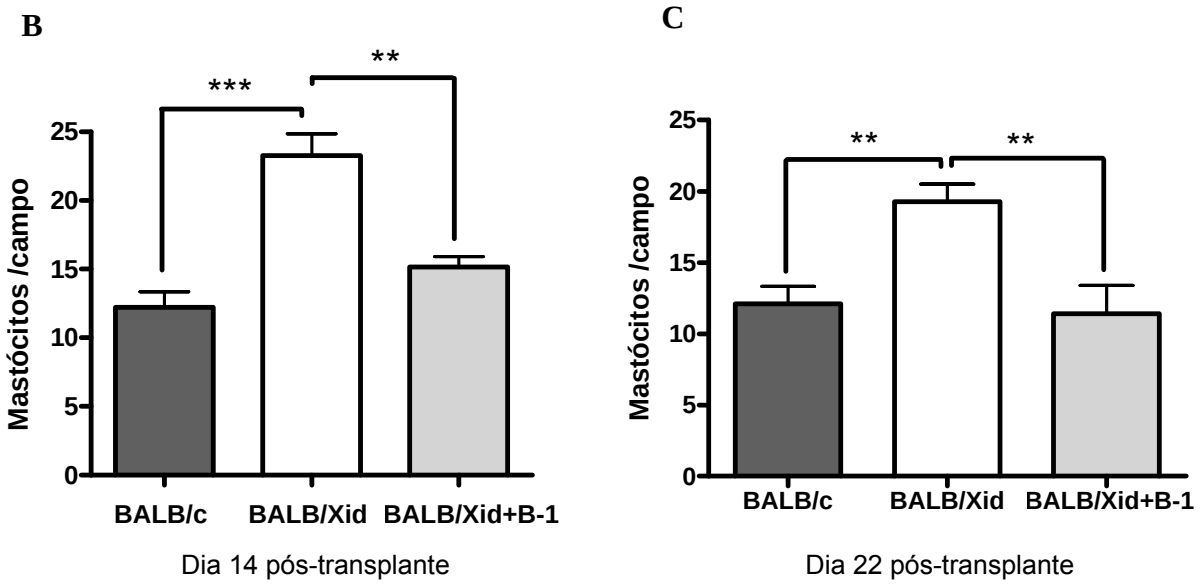
Figura 9A - Efeito da transferência de células B-1 sobre o infiltrado inflamatório em enxertos cardíacos

A



Efeito da transferência de células B-1 sobre o infiltrado inflamatório em enxertos cardíacos. **(A)** Aloenxertos cardíacos heterotópicos foram retirados no dia 14 pós-transplante e processados para histologia. As secções foram coradas com azul de toluidina e observadas ao microscópio óptico. Mastócitos foram definidos como células roxo-azuladas (setas) e foram contados por campo visível. O aumento é de 400x.

Figura 9B e C - Efeito da transferência de células B-1 sobre o infiltrado inflamatório em enxertos cardíacos



Efeito da transferência de células B-1 sobre o infiltrado inflamatório em enxertos cardíacos. **(B)** e **(C)** Aloenxertos cardíacos heterotópicos foram retirados nos dias 14 (B) e 22 (C) pós-transplante e processados para histologia. As secções foram coradas com azul de toluidina e observadas ao microscópio óptico. Mastócitos foram definidos como células roxo-azuladas e foram contados por campo visível, em um aumento de 400x. Cada secção forneceu de 4 a 8 campos visíveis. Os gráficos mostram médias e desvio padrão da contagem de mastócitos (n = 5 por grupo). ** indica p<0,01 e *** indica p<0,001.

4.10 Células B-1 de camundongos que já entraram em contato com aloenxertos de pele não são capazes de modificar a cinética de rejeição em outros receptores

Até o momento, os resultados indicam que células B-1 participam do processo de rejeição aguda de aloenxertos e que a presença dessas células interfere no infiltrado inflamatório no enxerto.

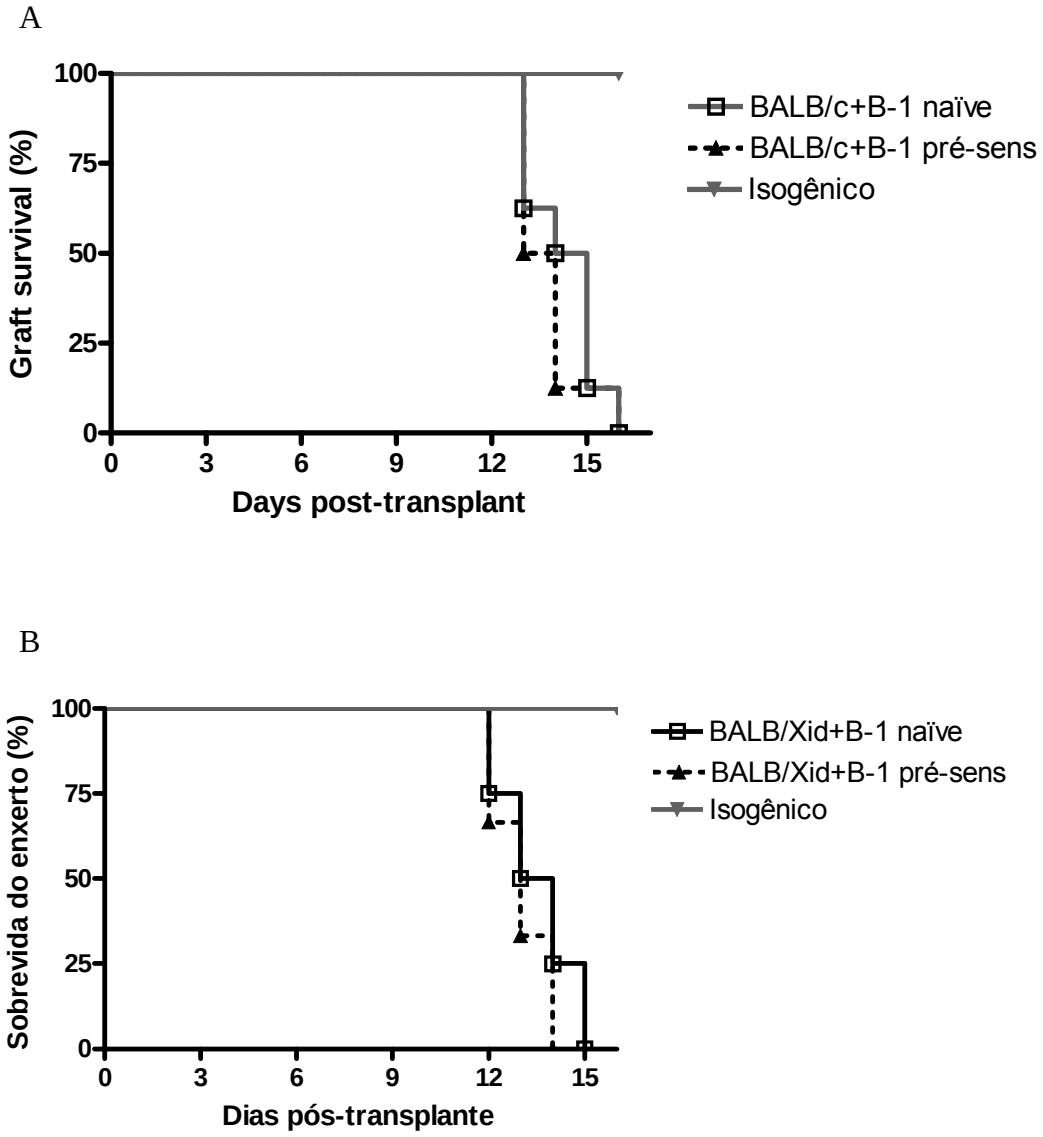
Foi demonstrado, em nosso laboratório, que células B-1 possuem um papel supressor e interferem na cinética de inflamação da pata de um camundongo imunizado e desafiado com ovalbumina. Nesse caso,

camundongos BALB/Xid tinham menor edema de pata quando recebiam células B-1 provenientes de camundongos previamente sensibilizados, em comparação com aqueles que recebiam células B-1 "*naïve*"([36]).

Para verificar se um fenômeno semelhante acontecia também no modelo do presente trabalho, camundongos BALB/c receberam aloenxertos de pele e foram acompanhados diariamente. Dezesseis dias pós-transplante, quando todos os enxertos já tinham sido rejeitados, células peritoneais dos camundongos foram coletadas e colocadas em cultura. O sobrenadante da cultura de células peritoneais aderentes, que continha células B-1 (Figura 2), foi transferido para outros camundongos BALB/c, que, sete dias depois, receberam transplantes de pele. A cinética de rejeição desse grupo de camundongos foi comparada com a de camundongos BALB/c que receberam células B-1 de camundongos não transplantados. Não houve diferença entre as curvas de sobrevida (Figura 10A), que, além de semelhantes entre si, eram semelhantes à curva de camundongos BALB/c que não receberam qualquer transferência celular (Figura 4A).

Como o experimento anterior foi feito em receptores BALB/c, é possível que a ação de células B-1 pré-sensibilizadas tivesse sido mascarada por células B-1 *naïve* presentes na cavidade peritoneal do camundongo receptor. Para contornar esse problema, o mesmo experimento foi realizado, agora com receptores BALB/Xid. Da mesma maneira, camundongos BALB/Xid que receberam células B-1 pré-sensibilizadas tiveram uma cinética de rejeição semelhante àqueles que receberam células B-1 *naïve* (Figura 10B).

Figura 10 – Efeito da transferência de células B-1 pré-sensibilizadas na rejeição de aloenxertos de pele



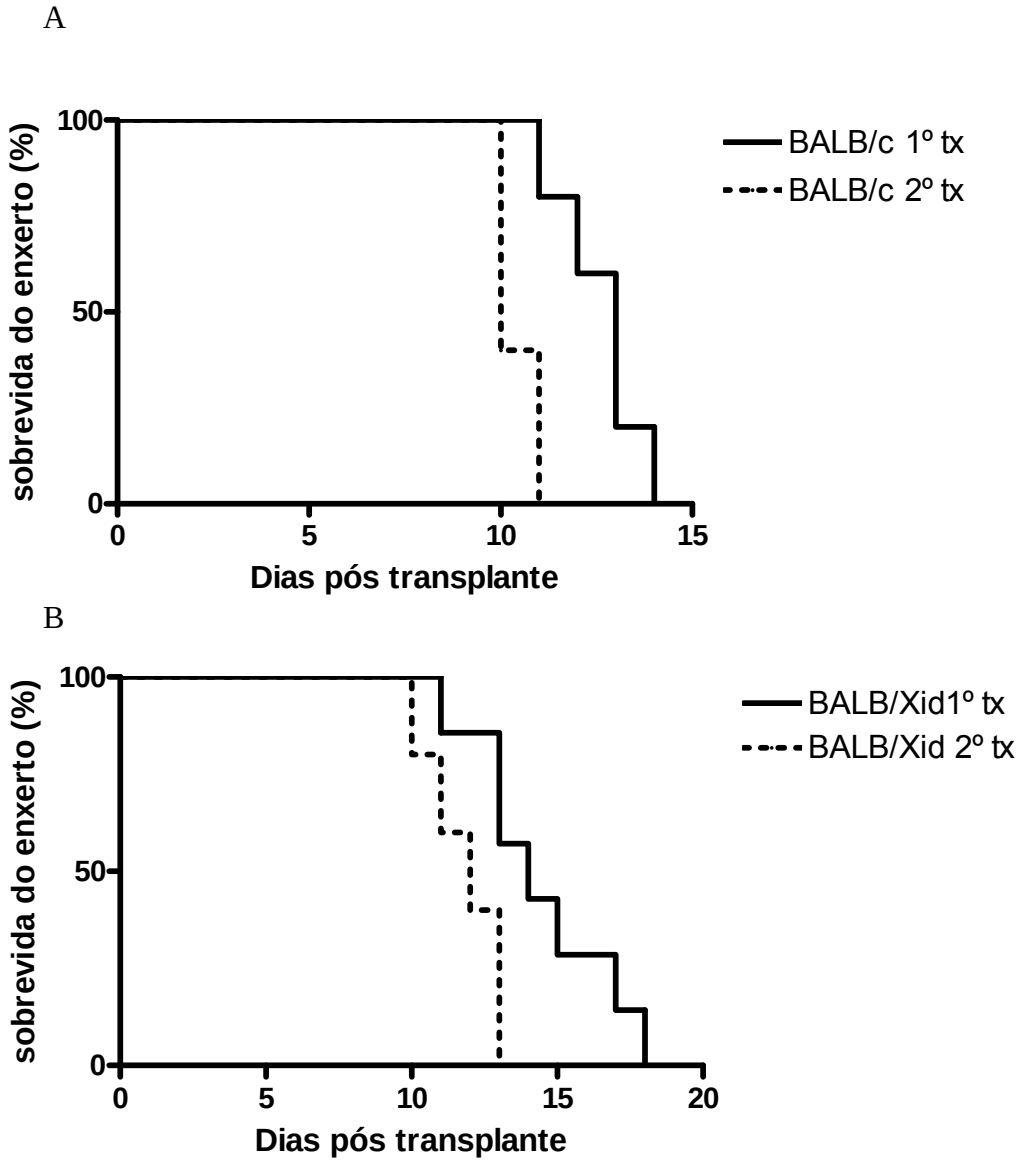
Efeito da transferência de células B-1 pré-sensibilizadas na rejeição de aloenxertos de pele. **(A)** e **(B)** Células peritoneais foram coletadas de camundongos BALB/c, 16 dias após o recebimento de um aloenxerto de pele e foram colocadas em cultura. O sobrenadante da cultura foi utilizado utilizado para transferência celular para camundongos BALB/c **(A)** ou BALB/Xid **(B)**, que 7 dias depois receberam transplante alogênico de pele. A sobrevida do transplante foi acompanhada diariamente. **(A)** p=0,4164 para BALB/c+B-1 *naïve* (linha contínua, n=8 animais) *vs* BALB/c+B-1 pré-sens (linha pontilhada, n=9 animais). **(B)** p=0,3219 para BALB/Xid+B-1 *naïve* (linha contínua, n=8 animais) *vs* BALB/Xid+B-1 pré-sens (linha pontilhada, n=8 animais).

4.11 A ausência de células B-1 não interfere na cinética de rejeição de segunda instância, no modelo de aloenxertos de pele

A rejeição de aloenxertos é um processo dependente de células T. Um indivíduo que receber um segundo aloenxerto do mesmo doador rejeitará o órgão mais rapidamente que da primeira vez, por causa da presença de células T de memória, que serão mais rapidamente ativadas que células T *naïve*.

Foi testada, então, a capacidade de camundongos BALB/Xid de rejeitarem um segundo aloenxerto de pele vindo de doadores da mesma linhagem. Para isso, camundongos BALB/c e BALB/Xid receberam aloenxertos de pele de doadores C57BL/6. Depois de rejeitados tais enxertos, os receptores receberam novos enxertos, também de doadores C57BL/6. Assim como os receptores BALB/c (Figura 11A), os camundongos BALB/Xid rejeitaram os segundos enxertos mais rapidamente que os primeiros (Figura 11B), levando à conclusão de que a ausência de células B-1 não acarretou alterações significativas nesse processo dependente de memória imunológica.

Figura 11 – Sobrevida dos segundos enxertos de pele na presença e ausência de células B-1



Sobrevida dos segundos enxertos de pele na presença e ausência de células B-1. **(A)** e **(B)** Camundongos que já haviam rejeitado um aloenxerto de pele receberam um novo aloenxerto. A sobrevida do segundo enxerto foi acompanhada diariamente e comparada com a sobrevida do primeiro. **(A)** p=0,008 para BALB/c 1º tx (linha contínua, n=10 animais) *vs* BALB/c 2º tx (n=7 animais). **(B)** p=0,0275 para BALB/Xid 1º tx (linha contínua, n=7 animais) *vs* BALB/Xid 2º tx (linha pontilhada, n=10 animais).

5. DISCUSSÃO

O papel das células B-1 nas respostas imunes inata e adaptativa é controverso. Por muitos anos, células B-1 têm sido consideradas como a primeira linha de defesa contra patógenos, devido à habilidade de secretar anticorpos naturais ([31]). Portanto células B-1 são comumente associadas à imunidade humoral inata e a participação delas em respostas imunes mediadas por células T é frequentemente subestimada. No entanto algumas pesquisas recentes demonstraram conexões entre células B-1 e reações imunes classicamente atribuídas a células T, como hipersensibilidades imediata ([36]) e tardia ([18;38]).

No presente trabalho, avaliou-se a participação de células B-1 na rejeição aguda de aloenxertos, um fenômeno principalmente orquestrado por células T. Mostrou-se que camundongos deficientes em células B-1 demoram mais para rejeitar aloenxertos do que camundongos selvagens. Além disso, foi demonstrado que a população de células B-1 peritoneais responde ao estímulo alogênico e que essas células são capazes de infiltrar enxertos em processo de rejeição aguda. Por fim, observou-se que a densidade de células que infiltram o enxerto é alterada segundo a presença ou ausência de células B-1.

O fato, até então desconhecido, de que aloenxertos cardíacos e de pele tinham suas sobrevidas prolongadas quando transplantados em camundongos BALB/Xid indica que células B-1 são sinérgicas a outros elementos do sistema imune que colaboram para a eliminação do tecido transplantado. Essa hipótese foi confirmada, pois o grupo BALB/Xid+B-1 exibiu cinéticas de sobrevida do aloenxerto similares às do grupo BALB/c (Figura 4A e B).

Tendo em mente esses dados de sobrevida, parece paradoxal que, nos aloenxertos cardíacos, o grupo BALB/Xid tenha apresentado um infiltrado inflamatório mais intenso (Figura 4G e H) que os grupos BALB/c (Figura 4E e F) e BALB/Xid+B-1 (Figura 4I e J). Entretanto é possível interpretar que o grupo BALB/Xid está mais atrasado na fase efetora da resposta imune alogênica e que os outros dois grupos já passaram por uma fase de intensa inflamação mais precocemente. De fato, as fibras musculares dos corações transplantados se mostraram muito mais danificadas, no dia 14 pós-transplante, nos grupos BALB/c e BALB/Xid+B-1 do que no grupo BALB/Xid (Figura 4 e dados não mostrados). Um fenômeno similar foi descrito por Oliveira e colaboradores, em nosso laboratório, que mostraram que camundongos BALB/Xid demoravam mais tempo para cicatrizar um ferimento superficial embora apresentassem um infiltrado neutrofílico maior que camundongos BALB/c ([73]). Esse fato causa uma certa estranheza, pois neutrófilos são considerados importantes participantes no processo de cicatrização tecidual. Assim, é possível interpretar que o grupo BALB/c também apresentou uma infiltração neutrofílica, porém em períodos mais precoces.

Anteriormente ao experimento de sobrevida, havia duas hipóteses básicas para a participação de células B-1 na rejeição aguda de aloenxertos, se é que havia essa participação: ou os camundongos BALB/Xid teriam um atraso na rejeição, em comparação com camundongos BALB/c, ou então teriam uma aceleração. Em nosso laboratório, acreditava-se que a segunda hipótese seria a verdadeira. Isso porque alguns trabalhos do nosso laboratório mostravam propriedades anti-inflamatórias de células B-1.

Foi descrito por Popi e colaboradores que macrófagos derivados de camundongos BALB/Xid liberavam mais NO e H_2O_2 do que macrófagos de BALB/c. Além disso, macrófagos apresentaram menor atividade fagocítica quando cocultivados com células B-1, fato que foi relacionado com a ação da IL-10 secretada pela última. Os autores especulam que, como células B-1 têm a capacidade de migrar para um foco inflamatório, seria possível que elas agissem no local, diminuindo o dano tecidual gerado por macrófagos ativados, em uma lesão *in vivo* ([21]).

Em outro trabalho, De Lorenzo e colaboradores mostraram que células B-1, apesar de apresentarem antígenos, são ineficientes como estimuladoras da proliferação de células T *in vitro*. Esta ineficiência pode estar relacionada com a baixa expressão de moléculas coestimuladoras, como CD86. Ainda, células B-1 apresentaram características tolerogênicas, pois, quando injetadas em camundongos BALB/Xid, os tornaram menos responsivos, em termos de mecanismos humorais e celulares, à imunização com ovalbumina ([36]). Além disso, Oliveira e colaboradores mostraram que células B-1 participam do processo de cicatrização no camundongo, modulando a fase inflamatória desse processo. Essa modulação seria via secreção de IL-10, pois células B-1 deficientes nesta citocina se mostraram incapazes de controlar a inflamação gerada pelo trauma mecânico ([73]).

Se transferidos para experimentos de rejeição de enxertos, os fenômenos descritos nos parágrafos anteriores levam ao pensamento lógico de que células B-1 ajudariam a atrasar a rejeição, devido às ações inibitórias sobre macrófagos e linfócitos T. Entretanto o que se observou no presente trabalho foi justamente o contrário. Esse fato, aliado à morfologia variável ([12]) e

à expressão promíscua de marcadores de superfície ([17]), fortalece a ideia de que células B-1 são extremamente versáteis e possuem uma ampla gama de respostas.

O fato de que, mesmo na ausência de células B-1, os aloenxertos de pele e coração foram rejeitados (Figura 4), indica que essas células, assim como outros mecanismos redundantes do sistema imune, são dispensáveis para o processo de rejeição aguda, pelo menos em indivíduos imunocompetentes. A rejeição aguda é uma complexa e vigorosa resposta imune com a participação de muitos mecanismos efetores, que podem mascarar a participação de células B-1. Talvez experimentos com transplantes entre indivíduos com disparidade apenas quanto a antígenos menores de histocompatibilidade pudessem dar mais ênfase aos efeitos da presença ou ausência de células B-1 no receptor.

Ainda sobre os dados de sobrevida, a Figura 10 mostra a sobrevida de aloenxertos em receptores que receberam células B-1 de indivíduos que já haviam respondido contra aloantígenos presentes na pele de um doador C57BL/6. O fato de receberem células pré-sensibilizadas ou *naïve* não acarretou em diferenças significativas quanto à sobrevida do enxerto, seja em receptores BALB/c (Figura 10A), ou em BALB/Xid (Figura 10B). De Lorenzo e colaboradores mostraram que células B-1 pré-sensibilizadas com ovalbumina e transferidas para camundongos BALB/Xid tinham efeito supressor maior do que células B-1 *naïve* ([36]), mostrando que células B-1 são capazes de “aprender” novos comportamentos e transferí-los para outros receptores. Resultados semelhantes foram descritos por Alugupalli e colaboradores que mostraram que, após imunização, células B-1b de longa vida secretavam anticorpos

específicos contra antígenos da bactéria *Borrelia hermsii* ([24]), assemelhando-se ao mecanismo de memória humoral observado em linfócitos B-2, apesar do mecanismo descrito em células B-1 ser timo-independente. No presente trabalho, características como as descritas por Alugupalli e De Lorenzo não foram constatadas. Novamente, é possível que o fenômeno exista, mas que esteja mascarado no modelo utilizado neste trabalho. Talvez em experimentos que contassem com a transferência de células B-1 pré-sensibilizadas para camundongos com imunodeficiências mais severas, como SCID, os resultados fossem diferentes. Outro aspecto desse experimento é que, como essa característica de "memória" de células B-1 ainda é pouco conhecida, não se sabe quais parâmetros experimentais facilitariam ou dificultariam o aparecimento dela. Por exemplo, talvez o número de células transferidas tenha sido insuficiente, embora adequado para a transferência de células "*naïve*". O dia em que as células foram coletadas do primeiro receptor pode não ter sido adequado também.

O experimento ilustrado na Figura 11 mostra que a ausência de células B-1 não afetou de maneira significativa a cinética de rejeição do segundo aloenxerto de pele. O resultado obtido já era esperado, por causa do possível mascaramento do papel de células B-1 por outros mecanismos do sistema imune, como já discutido acima. Esses mecanismos, no caso da rejeição de segunda instância, seriam ainda mais eficientes e rápidos, e uma possível participação de células B-1 provavelmente não seria detectada.

No presente trabalho, foi mostrado que células B-1 da cavidade peritoneal respondem a um estímulo alogênico na pele, por meio de variações no número de células $CD11b^+/CD19^+$ (Figura 5). Outros autores já observaram

que esse tipo de resposta envolvendo células B-1 pode ocorrer após vários estímulos. Algumas linhagens de camundongos apresentam aumento da porcentagem de células B-1 peritoneais após infecção por *Schistosoma mansoni* ([74]). Dados em nosso laboratório mostram que a injeção de células tumorais na pata de camundongos também afeta a frequência de células B-1 no peritônio (Palos, comunicação pessoal). Alugupalli e colaboradores observaram que a expansão de células B-1 peritoneais coincide com a resolução da bacteremia de *Borrelia hermsii* ([23]) e que a persistência de tal expansão é correlacionada com uma resistência duradoura à reinfecção ([24]). Portanto a frequência de células B-1 na cavidade peritoneal parece refletir o estado de ativação dessas células em resposta a estímulos sistêmicos (bacteremia) ou localizados (células tumorais na pata).

Nos dias 1 e 3 após o estímulo alogênico, houve uma diminuição no número de células B-1 na cavidade peritoneal dos receptores (Figura 5). Algumas hipóteses a respeito do destino das células ausentes no peritônio podem ser levantadas: (I) as células morreram, por algum mecanismo desconhecido; (II) as células perderam pelo menos um dos marcadores de superfície utilizados para identificação de células B-1 no experimento; ou (III) as células deixaram a cavidade peritoneal e migraram para outro local. Até o momento não há dados neste modelo de transplantes que confirmem ou excluam qualquer uma das três hipóteses. Baseando-se nos seguintes dados de outros autores, é possível crer mais na hipótese III. Já foi demonstrado que apenas 1 hora após um estímulo cutâneo com trinitrofenil-cloreto, células B-1 saem da cavidade peritoneal e migram para o baço, onde secretarão anticorpos responsáveis pela iniciação do processo de hipersensibilidade de

contato ([18]). Outros autores também descreveram processos similares de migração de células B-1 para o baço ([14]). Em nosso laboratório, já foi descrita a migração de células B-1 para focos inflamatórios na pele, induzidos por implantação de lamínula de vidro ([12;75]) ou por trauma mecânico ([73]). No presente trabalho foi demonstrado que células B-1 migraram da cavidade peritoneal para o aloenxerto no dia 3 pós-transplante (Figura 6). É possível que essa migração seja responsável, pelo menos em parte, pela diminuição de células B-1 peritoneais nos primeiros dias após o transplante. Experimentos preliminares foram realizados com o intuito de procurar células B-1 nos dias 1 e 3 pós transplante, em órgãos linfoides secundários (dados não mostrados), porém nenhuma alteração no número de células B-1 nesses órgãos foi encontrada. Entretanto o experimento se baseou na identificação por marcadores de superfície e, como os marcadores de células B-1 podem variar segundo o ambiente, é possível que o resultado seja um falso-negativo e experimentos mais adequados de rastreamento celular se fazem necessários.

Seguindo a linha de raciocínio iniciada anteriormente, de que a expansão de células B-1 no peritônio é um reflexo da ativação dessa população, o dia 10 pós-transplante seria o dia com maior ativação. No presente estudo, os resultados mostraram que a acumulação de células B-1 na cavidade peritoneal no dia 10 pós-transplante (Figura 5) foi simultânea às diferenças observadas quanto ao infiltrado inflamatório no enxerto (Figura 7). Isso pode indicar que, para que o infiltrado inflamatório no aloenxerto seja afetado, é necessária a expansão de células B-1 peritoneais. Seria interessante testar se as células B-1 peritoneais de diferentes dias pós-transplante possuem diferenças funcionais. Por exemplo, será que células B-1 do dia 10 pós-

transplante seriam capazes de transferir algum tipo de “memória”, em um experimento semelhante ao da Figura 10?

A autolimitação da resposta de células B-1 foi observada quando a frequência delas retornou a níveis normais no dia 15 (Figura 5), um dia em que o enxerto não é mais visível. Interessantemente, essas alterações no número de células B-1 peritoneais ocorreram apenas após transplantes de pele alogênicos, enquanto que transplantes isogênicos não estimularam a proliferação de células B-1. Pode ser, então, que a expansão de células B-1 seja estimulada por aloantígenos específicos do enxerto, ou então seja induzida por sinais inflamatórios inespecíficos, como citocinas, independentemente da natureza do antígeno. Com base apenas nos resultados obtidos até o momento, qualquer uma das duas hipóteses pode ser verdadeira, até mesmo de maneira simultânea, ou seja, a proliferação de células B-1 dependeria tanto do antígeno quanto de sinais inespecíficos.

Confirmando a participação de células B-1 na rejeição de aloenxertos, células B-1 marcadas com CFSE foram encontradas em enxertos de pele 3 dias após o transplante (Figura 6). Essa capacidade de migração da cavidade peritoneal para um foco inflamatório havia sido descrita anteriormente em nosso laboratório ([12;73;75]). Um dado interessante é que a quantidade de CFSE por célula infiltrante foi mais baixa do que a quantidade inicial (Figura 6, primeiro e quarto histogramas). Isso indica que as células que migraram para o enxerto sofreram divisões. No protocolo utilizado, as células fluorescentes foram encontradas 10 dias após sua injeção no receptor (o transplante é feito 7 dias após a injeção e as células foram encontradas 3 dias após o transplante). É possível que as células precisem se dividir para então migrar para o local do

enxerto, ou pode ser que a divisão seja um fenômeno natural, independente do estímulo alogênico. Mesmo que essa dúvida ainda não seja solucionada, esse é mais um dado para o pouco entendido processo de migração de células B-1.

No momento, o significado biológico da presença de células B-1 no enxerto é apenas fruto de especulação. É possível que elas sejam responsáveis pela “limpeza” de células apoptóticas e restos celulares por meio de fagocitose, como foi sugerido por Novaes e Brito, em comunicação pessoal. Outra possibilidade é que elas atuem no local como células apresentadoras de antígeno ([37]) para células T alorreativas previamente ativadas, amplificando, assim, os sinais indutores de inflamação.

No dia 10 pós-transplante, não foram encontradas células B-1 $CFSE^+$ infiltrantes no enxerto. Pouco se sabe sobre o destino e as funções de células B-1 que deixam a cavidade peritoneal para um foco inflamatório. Nesse caso, as células podem ter morrido no local do enxerto, apesar de que uma diluição do CFSE a níveis indetectáveis não pode ser descartada.

Do mesmo jeito que vários tipos de respostas imunes, é provável que a participação das células B-1 na rejeição aguda de aloenxertos seja baseada em mecanismos de ação diferentes e redundantes. Seguindo esse raciocínio, células B-1, além de migrarem para o local do enxerto, poderiam também agir a partir de sítios distantes do local do transplante, por meio de fatores solúveis. De fato, foi o que propuseram Szczepanik e colaboradores, quando descobriram que células B-1 têm um papel na fase precoce da hipersensibilidade tardia induzida por proteínas. Os autores mostraram que anticorpos IgM, específicos para o antígeno e derivados de células B-1, formam imunecomplexos que ativam o sistema complemento, sensibilizando

mastócitos, fato que medeia o recrutamento de células T para o local do desafio ([38]).

Como a hipersensibilidade tardia e a rejeição aguda de aloenxertos compartilham várias características, levantou-se a hipótese de que células B-1 poderiam influenciar o recrutamento de células inflamatórias na infiltração do órgão transplantado. Interessantemente, no dia 10 pós-transplante, as peles enxertadas em camundongos BALB/Xid tinham menos células T $CD4^+$ e $CD8^+$ do que as enxertadas em BALB/c (Figura 7B e C). Além disso, o grupo BALB/Xid exibiu uma quantidade aumentada de mastócitos infiltrantes, tanto nos transplantes de pele (Figura 7D) quanto de coração (Figura 9). Os altos números de mastócitos e baixos números de linfócitos T coincidiram com uma sobrevida estendida observada no grupo BALB/Xid (Figura 4A e B).

Esses resultados são corroborados pela pesquisa de Lu e colaboradores, que usaram um protocolo para tornar camundongos tolerantes a transplantes alogênicos, baseado na injeção de células do doador, juntamente com a administração de anti-CD154. Os autores mostraram que mastócitos são essenciais para que aloenxertos de pele sejam aceitos em camundongos que passaram por tal tratamento tolerizante. Nos aloenxertos tolerados, foi descrito um aumento tanto na expressão de genes relacionados a mastócitos, quanto na densidade de mastócitos, quando comparados a aloenxertos em processo de rejeição. Também foi observado que a ausência de mastócitos era coincidente com o aumento de células T $CD4^+$ dentro do enxerto ([59]). Apesar de o presente trabalho não utilizar um protocolo que induza a tolerância, os resultados aqui obtidos são, de certa forma, semelhantes aos publicados por Lu e colaboradores. No presente modelo, transplantes que

levaram mais tempo para serem rejeitados (BALB/Xid) continham uma densidade maior de mastócitos. A comparação entre os dois trabalhos levanta uma questão interessante: será que um tratamento que induza a tolerância a aloenxertos, como o utilizado por Lu e colaboradores, seria mais eficiente se aplicado em camundongos BALB/Xid do que em BALB/c?

Essa inesperada participação anti-inflamatória de mastócitos também foi documentada por Grimbaldeston e colaboradores em um modelo de hipersensibilidade de contato. Os pesquisadores utilizaram uma combinação de camundongos deficientes em mastócitos e mastócitos deficientes em IL-10 para provar que a IL-10 derivada de mastócitos é capaz de limitar o dano tecidual à pele e a infiltração de leucócitos, incluindo linfócitos T $CD8^+$, no sítio de desafio com um hapteno ([61]).

Com base nos resultados obtidos com os grupos BALB/c e BALB/Xid (Figura 7D e Figura 9), é tentador considerar que células B-1 poderiam exercer controle sobre a infiltração de mastócitos nos enxertos em processo de rejeição. Já foi descrito, no entanto, que mastócitos derivados de camundongos "*btk* null" ou Xid apresentam mais lentidão na morte por apoptose em culturas privadas de IL-3, do que mastócitos de animais selvagens. Esse fato sugere que a Btk regula o processo de apoptose ([76]). Seria então possível que as diferenças nos infiltrados de mastócitos observados entre BALB/c e BALB/Xid resultaram, na verdade, de uma maior capacidade de sobrevivência inerente aos mastócitos derivados de BALB/Xid. Se isso fosse verdadeiro, a interferência de células B-1 na infiltração de mastócitos seria, provavelmente, irrelevante.

Para sanar essa dúvida, células B-1 de cultura foram transferidas para camundongos BALB/Xid que, 7 dias depois, receberam transplantes de pele. De maneira impressionante, a reconstituição de células B-1 causou uma significativa diminuição na densidade de mastócitos infiltrantes no dia 10 pós-transplante (Figura 8A e B), mostrando que, na presença de células B-1, mastócitos deficientes em Btk ainda são capazes de infiltrar o órgão transplantado. O mesmo fenômeno ocorreu no modelo de transplantes cardíacos heterotópicos nos dias 14 e 22 (Figura 9). A baixa quantidade de mastócitos nos aloenxertos de pele no grupo BALB/Xid+B-1 foi acompanhada por altos números de células T $CD8^+$ mas não $CD4^+$ (Figura 8C e D).

Os resultados do presente trabalho mostram que, na ausência de células B-1 no receptor, há mais mastócitos e menos células T $CD8^+$ infiltrantes no enxerto. Contudo, apenas com base nesses dados, é impossível dizer se a grande quantidade de mastócitos é causa da pouca quantidade de células T, ou se é consequência. Como já foi descrito que mastócitos podem interferir na migração de células T para um sítio de inflamação ([38;59]) e que células B-1 é que dão o estímulo para mastócitos agirem de tal maneira ([18;38]) a seguir serão propostas especulações de mecanismos a respeito de um modelo que se baseia na seguinte linha de ação: 'células B-1→ mastócitos → células T'.

A participação de mastócitos na rejeição aguda de aloenxertos é controversa, pois há relatos que apoiam várias hipóteses. Já foi documentado em um modelo de transplantes cardíacos em ratos, um aumento de mastócitos infiltrantes no aloenxerto em rejeição, concomitante a uma diminuição de mastócitos residentes ([77]). Por outro lado, nenhuma alteração no número de mastócitos foi encontrada quando outro grupo de pesquisadores analisou

corações em processo de rejeição, em um modelo muito similar ao anterior ([78]). Por fim, o trabalho de Lu e colaboradores, descrito anteriormente, demonstra um papel supressor de mastócitos no processo de rejeição em um modelo de transplantes de pele em camundongos ([59]).

A razão dos dados contrastantes a respeito de mastócitos pode estar relacionada com a grande plasticidade inerente a essas células. A população de mastócitos não é homogênea em um indivíduo, sendo distinguidos em roedores os mastócitos de mucosa e os de tecido conectivo. Ainda, além da liberação de histamina, prostaglandinas e outros fatores envolvidos na fase efetora da reação alérgica mediada por IgE, mastócitos podem secretar uma ampla variedade de produtos, como por exemplo IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10 e IL-13 ([79]). Portanto, é muito provável que o tipo de estímulo, a espécie estudada e o modelo experimental interfiram na ação resultante dos mastócitos, em determinado cenário fisiopatológico.

Tendo isso em mente, a comparação mais próxima dos resultados obtidos no presente trabalho é com os resultados de Lu e colaboradores, por dois motivos básicos: ambos se valeram de transplantes de pele em camundongos e encontraram mais mastócitos em grupos que levaram mais tempo para rejeitar os enxertos alogênicos. No trabalho de Lu e colaboradores, foi demonstrado que a presença de mastócitos no enxerto era essencial para a manutenção da tolerância, por um mecanismo ainda desconhecido dos autores. Foi demonstrado também que células Treg ativadas *in vitro* secretam altas quantidades de IL-9 e que células Treg secretoras de IL-9 infiltravam *in vivo* o aloenxerto de pele sendo tolerado. Essa presença local de IL-9, que é um fator de crescimento de mastócitos, parece ser importante para a presença

de mastócitos do aloenxerto, pois a administração de anti-IL-9 a um camundongo diminuiu a quantidade de mastócitos na pele, bem como quebrou a tolerância ao transplante alogênico ([59]).

No presente trabalho foram verificadas posições antagônicas entre células B-1 no indivíduo receptor e mastócitos infiltrantes no enxerto, já que quando uma está presente (BALB/c e BALB/Xid+B-1), o outro está diminuído e quando uma está ausente (BALB/Xid), o outro está aumentado (Figura 8A e B e Figura 9). É possível especular que a competição por fatores de crescimento comuns às duas células, como IL-9, poderia explicar tal fenômeno. De fato, Vink e colaboradores mostraram que células B-1 possuem o receptor para IL-9, que camundongos transgênicos que superexpressam essa proteína têm mais células B-1 peritoneais e que a administração diária de IL-9 leva a uma expansão seletiva de células B-1 na cavidade peritoneal de camundongos normais ([80]). Assim, na ausência de células B-1, seria mais fácil a acumulação de mastócitos no órgão transplantado. Se células B-1 realmente levam alguma vantagem em relação a mastócitos na competição por fatores de crescimento, isso poderia estar relacionado com o acúmulo dessas células na cavidade peritoneal no dia 10 pós-transplante, concomitante à baixa quantidade de mastócitos observada no enxerto. Não pode ser descartada, também, a possibilidade de células B-1 regularem negativamente a atividade de mastócitos, por mecanismos ainda desconhecidos.

No trabalho de Lu e colaboradores, não foi possível demonstrar o mecanismo pelo qual mastócitos ajudariam a diminuir o número de células T infiltrantes no enxerto, preservando, assim, o tecido transplantado. Os autores especulam que mastócitos poderiam secretar fator de transformação do TGF- β

ou outro fator imunossupressor ([59]). De fato, Grimbaldeston e colaboradores mostraram que mastócitos são a fonte principal de IL-10 secretada na pele, em um modelo de hipersensibilidade de contato. A presença de mastócitos secretores de IL-10 nesse caso é fundamental para o controle do dano tecidual causado pela reação inflamatória. Quando Grimbaldeston e colaboradores discutem o artigo de Lu e colaboradores, eles relembram que os últimos encontraram altos níveis de mRNA de IL-10 nos transplantes de pele sendo tolerados, mas não puderam definir a fonte de tais ácidos nucléicos. Os primeiros sugerem, então, que essa fonte seja composta por mastócitos ([61]).

Assim, é possível especular um modelo em que poucos dias após o recebimento de um transplante alogênico, há uma diminuição do número de células B-1 na cavidade peritoneal do receptor, que pode estar relacionada com a migração dessas células para outros locais, incluindo o local do enxerto. Alguns dias depois (dia 10 pós-transplante, neste trabalho), há um acúmulo de células B-1 na cavidade peritoneal, concomitante a uma baixa densidade de mastócitos infiltrantes no enxerto. Juntamente, há uma grande infiltração de células T $CD8^+$, que auxiliam no dano ao tecido alogênico. Após a eliminação do órgão transplantado, os números de células B-1 no peritônio retornam ao nível normal. Na ausência de células B-1, mais mastócitos e menos células T $CD8^+$ infiltram o enxerto, que tem sua sobrevida estendida.

A transferência de células B-1 para camundongos BALB/Xid afetou o infiltrado inflamatório de células T $CD8^+$, mas não de células T $CD4^+$. Já foi documentado que camundongos BALB/Xid tendem a montar respostas de células T de maneira diferente que camundongos BALB/c quando infectados com um tipo de filária. Nesse modelo, o controle da filaremia é feito por células

T $CD4^+$ e a resistência à infecção está relacionada a um padrão de citocinas Th_2. Em camundongos BALB/Xid, há uma menor produção de IL-4, IL-5 e IL-10 e o camundongo tem mais vermes que os BALB/c ([81]). Também foi descrito que o perfil de citocinas de camundongos BALB/Xid em uma resposta contra *Leishmania major* é predominantemente Th_1, fato que lhe confere resistência ao parasito, em comparação a camundongos BALB/c ([82]). Apesar de os autores sugerirem que essas diferenças entre as linhagens são consequência da presença ou falta de células B-1, nenhuma evidência direta foi demonstrada. Aliás, Babai e colaboradores mostram que a depleção de células B-1 em camundongos BALB/c não confere resistência à infecção por *Leishmania major* ([83]).

Assim, as citadas disparidades podem, na realidade, ser causadas pelo micro ambiente deficiente em Btk, de uma maneira que independe de células B-1. Essa parece ser a explicação para o que se observa no presente trabalho quando se trata de células T $CD4^+$ infiltrantes nos grupos BALB/Xid e BALB/Xid+B-1.

Embora não haja dados a respeito na literatura, não se pode descartar também que a infiltração de células T $CD4^+$ no aloenxerto sofra interferência de células B-1a. Lembrando que, neste trabalho, a suspensão celular usada para reconstituição continha principalmente células B-1b, chegamos à conclusão que tanto o grupo BALB/Xid, quanto o grupo BALB/Xid+B-1, são deficientes em células B-1a.

O presente trabalho apresentou fatos novos a respeito da participação de células B-1 na rejeição aguda de aloenxertos e, seguindo o curso inevitável da ciência, gera várias questões a serem respondidas. A utilização de modelos

de transplante entre indivíduos com mais similaridades quanto a antígenos de histocompatibilidade pode deixar mais claro o papel de células B-1 na rejeição? Qual a função de células B-1 que migram para o foco inflamatório? Qual o destino dessas células que migraram, após a resolução da inflamação? Células B-1 migram para outros locais, além do foco inflamatório? Quais os mecanismos responsáveis pelas diferenças no infiltrado inflamatório de BALB/c e BALB/Xid? A expansão de células B-1 peritoneais é necessária para que haja essas diferenças? Como é esta relação 'células B-1→ mastócitos → células T'? Qual o efeito da transferência apenas de células B-1a para camundongos BALB/Xid?

Em conjunto, os resultados obtidos contribuem para o entendimento da biologia de células B-1 e fortalecem a ideia de que essas versáteis células, além de seu papel já bem descrito na imunidade humoral dependente de anticorpos naturais, também participam em importantes respostas mediadas por células T, como a rejeição aguda de aloenxertos ou as hipersensibilidades imediata e tardia.

6. CONCLUSÕES

- Células B-1 participam da rejeição aguda de aloenxertos, afetando a sobrevida do enxerto e o infiltrado inflamatório.

- A ausência de células B-1 leva a um atraso na rejeição de aloenxertos.

- No modelo estudado, células B-1 parecem ter papel coadjuvante na rejeição, uma vez que aceleram o processo, mas não são necessárias para que este aconteça.

- A população de células B-1 peritoneais responde ao estímulo alogênico por meio de proliferação e provável migração.

- Células B-1 são capazes de infiltrar o aloenxerto em processo de rejeição, poucos dias após o transplante.

- O infiltrado inflamatório no enxerto é alterado segundo a presença ou ausência de células B-1 no receptor do transplante

7. REFERÊNCIAS

(1) Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR, Herzenberg LA. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodefective, and autoimmune mice. J Exp Med 1983; 157(1):202-218.

(2) Manohar V, Brown E, Leiserson WM, Chused TM. Expression of Lyt-1 by a subset of B lymphocytes. J Immunol 1982; 129(2):532-538.

(3) Caligaris-Cappio F, Gobbi M, Bofill M, Janossy G. Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med 1982; 155(2):623-628.

(4) Abrahao TB, Freymuller E, Mortara RA, Lopes JD, Mariano M. Morphological characterization of mouse B-1 cells. Immunobiology 2003; 208(4):401-411.

(5) Kantor AB, Herzenberg LA. Origin of murine B cell lineages. Annu Rev Immunol 1993; 11:501-538.

(6) Hardy RR, Hayakawa K. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. Adv Immunol 1994; 55:297-339.

(7) Haughton G, Arnold LW, Whitmore AC, Clarke SH. B-1 cells are made, not born. Immunol Today 1993; 14(2):84-87.

(8) Herzenberg LA, Stall AM, Lalor PA, Sidman C, Moore WA, Parks DR et al. The Ly-1 B cell lineage. Immunol Rev 1986; 93:81-102.

(9) Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. Nat Immunol 2006; 7(3):293-301.

(10) Hayakawa K, Hardy RR, Herzenberg LA. Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. Eur J Immunol 1986; 16(4):450-456.

(11) Hardy RR. B-1 B cell development. J Immunol 2006; 177(5):2749-2754.

(12) Almeida SR, Aroeira LS, Frymuller E, Dias MA, Bogsan CS, Lopes JD et al. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. Int Immunol 2001; 13(9):1193-1201.

(13) Ohdan H, Swenson KG, Kruger Gray HS, Yang YG, Xu Y, Thall AD et al. Mac-1-negative B-1b phenotype of natural antibody-producing cells, including those responding to Gal alpha 1,3Gal epitopes in alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient mice. J Immunol 2000; 165(10):5518-5529.

(14) Kawahara T, Ohdan H, Zhao G, Yang YG, Sykes M. Peritoneal cavity B cells are precursors of splenic IgM natural antibody-producing cells. J Immunol 2003; 171(10):5406-5414.

(15) Hastings WD, Gurdak SM, Tumang JR, Rothstein TL. CD5+/Mac-1-peritoneal B cells: a novel B cell subset that exhibits characteristics of B-1 cells. Immunol Lett 2006; 105(1):90-96.

(16) Ghosn EE, Yang Y, Tung J, Herzenberg LA, Herzenberg LA. CD11b expression distinguishes sequential stages of peritoneal B-1 development. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(13):5195-5200.

(17) Popi AF, Motta FL, Mortara RA, Schenkman S, Lopes JD, Mariano M. Co-ordinated expression of lymphoid and myeloid specific transcription factors during B-1b cell differentiation into mononuclear phagocytes in vitro. Immunology 2009; 126(1):114-122.

(18) Itakura A, Szczepanik M, Campos RA, Paliwal V, Majewska M, Matsuda H et al. An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity. J Immunol 2005; 175(11):7170-7178.

(19) O'Garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G, Howard M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. Eur J Immunol 1992; 22(3):711-717.

(20) Ishida H, Hastings R, Kearney J, Howard M. Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. J Exp Med 1992; 175(5):1213-1220.

(21) Popi AF, Lopes JD, Mariano M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. Immunology 2004; 113(3):348-354.

(22) Kantor A. A new nomenclature for B cells. Immunol Today 1991; 12(11):388.

(23) Alugupalli KR, Gerstein RM, Chen J, Szomolanyi-Tsuda E, Woodland RT, Leong JM. The resolution of relapsing fever borreliosis requires IgM and is concurrent with expansion of B1b lymphocytes. J Immunol 2003; 170(7):3819-3827.

(24) Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. Immunity 2004; 21(3):379-390.

(25) Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to S. pneumoniae. Immunity 2005; 23(1):7-18.

(26) Alugupalli KR, Gerstein RM. Divide and conquer: division of labor by B-1 B cells. Immunity 2005; 23(1):1-2.

(27) Borrello MA, Phipps RP. Fibroblasts support outgrowth of splenocytes simultaneously expressing B lymphocyte and macrophage characteristics. J Immunol 1995; 155(9):4155-4161.

(28) Borrello MA, Phipps RP. The B/macrophage cell: an elusive link between CD5+ B lymphocytes and macrophages. Immunol Today 1996; 17(10):471-475.

(29) Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown L, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(5):2250-2255.

(30) Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA, Chen J. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. J Exp Med 2000; 192(2):271-280.

(31) Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. Springer Semin Immunopathol 2005; 26(4):347-362.

(32) Li J, Barreda DR, Zhang YA, Boshra H, Gelman AE, Lapatra S et al. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. Nat Immunol 2006; 7(10):1116-1124.

(33) Duan B, Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity. Autoimmun Rev 2006; 5(6):403-408.

(34) Pao LI, Lam KP, Henderson JM, Kutok JL, Alimzhanov M, Nitschke L et al. B cell-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase Shp1 promotes B-1a cell development and causes systemic autoimmunity. Immunity 2007; 27(1):35-48.

(35) Murakami M, Yoshioka H, Shirai T, Tsubata T, Honjo T. Prevention of autoimmune symptoms in autoimmune-prone mice by elimination of B-1 cells. Int Immunol 1995; 7(5):877-882.

(36) De Lorenzo BH, Brito RR, Godoy LC, Lopes JD, Mariano M. Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction. Immunol Lett 2007; 114(2):110-118.

(37) Vigna AF, Godoy LC, Rogerio dA, Mariano M, Lopes JD. Characterization of B-1b cells as antigen presenting cells in the immune response to gp43 from Paracoccidioides brasiliensis in vitro. Immunol Lett 2002; 83(1):61-66.

(38) Szczepanik M, Akahira-Azuma M, Bryniarski K, Tsuji RF, Kawikova I, Ptak W et al. B-1 B cells mediate required early T cell recruitment to elicit protein-induced delayed-type hypersensitivity. J Immunol 2003; 171(11):6225-6235.

(39) Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 5th edition ed. Saunders, 2003.

(40) Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull 2004; 70:71-86.

(41) Wyburn KR, Jose MD, Wu H, Atkins RC, Chadban SJ. The role of macrophages in allograft rejection. Transplantation 2005; 80(12):1641-1647.

(42) Lechler R, Ng WF, Steinman RM. Dendritic cells in transplantation--friend or foe? Immunity 2001; 14(4):357-368.

(43) Barker CF, Billingham RE. The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. J Exp Med 1968; 128(1):197-221.

(44) Bharat A, Mohanakumar T. Allopeptides and the alloimmune response. Cell Immunol 2007; 248(1):31-43.

(45) Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. J Exp Med 1982; 155(1):31-41.

(46) Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, Rizeq M, Gill RG. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. J Clin Invest 2000; 106(8):1003-1010.

(47) Whitelegg A, Barber LD. The structural basis of T-cell allorecognition. Tissue Antigens 2004; 63(2):101-108.

(48) Auchincloss H, Jr., Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(8):3373-3377.

(49) Kamoun M. Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. Clin Biochem 2001; 34(1):29-34.

(50) Hancock WW, Thomson NM, Atkins RC. Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts. Transplantation 1983; 35(5):458-463.

(51) Jose MD, Ikezumi Y, van Rooijen N, Atkins RC, Chadban SJ. Macrophages act as effectors of tissue damage in acute renal allograft rejection. Transplantation 2003; 76(7):1015-1022.

(52) BRENT L, BROWN J, MEDAWAR PB. Skin transplantation immunity in relation to hypersensitivity. Lancet 1958; 2(7046):561-564.

(53) Surquin M, Le Moine A, Flamand V, Rombaut K, Demoor FX, Salmon I et al. IL-4 deficiency prevents eosinophilic rejection and uncovers a role for neutrophils in the rejection of MHC class II disparate skin grafts. Transplantation 2005; 80(10):1485-1492.

(54) Maier S, Tertilt C, Chambron N, Gerauer K, Huser N, Heidecke CD et al. Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28-/- mice. Nat Med 2001; 7(5):557-562.

(55) Alegre ML, Florquin S, Goldman M. Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: time for reassessment. Curr Opin Immunol 2007; 19(5):563-568.

(56) Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR et al. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. J Immunol 2001; 166(6):3789-3796.

(57) Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. J Exp Med 2002; 195(12):1641-1646.

(58) Wang S, Jiang J, Guan Q, Lan Z, Wang H, Nguan CY et al. Reduction of Foxp3-expressing regulatory T cell infiltrates during the progression of renal allograft rejection in a mouse model. Transpl Immunol 2008; 19(2):93-102.

(59) Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. Nature 2006; 442(7106):997-1002.

(60) El Refaie AM, Burt AD. Mast cells and c-Kit expression in liver allograft rejection. Histopathology 2005; 47(4):375-381.

(61) Grimbaldeston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsai M, Galli SJ. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. Nat Immunol 2007; 8(10):1095-1104.

(62) Cramer DV. Natural antibodies and the host immune responses to xenografts. Xenotransplantation 2000; 7(2):83-92.

(63) Zhou W, Ohdan H, Tanaka Y, Hara H, Tokita D, Onoe T et al. NOD/SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes can be a model for investigating B cells responding to blood group A carbohydrate determinant. Transpl Immunol 2003; 12(1):9-18.

(64) Khan WN, Alt FW, Gerstein RM, Malynn BA, Larsson I, Rathbun G et al. Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. Immunity 1995; 3(3):283-299.

(65) Billingham RE, Medawar P.B. The technique of free skin grafting in mammals. J Exp Med 1951; 28:385-402.

(66) dos Santos RR, Rossi MA, Laus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with Trypanosoma cruzi. J Exp Med 1992; 175(1):29-39.

(67) Rossi MA. Chronic hemodynamic unloading regulates the morphologic development of newborn mouse hearts transplanted into the ear of isogeneic adult mice. Am J Pathol 1992; 141(1):183-191.

(68) Fey TA, Krause RA, Hsieh GC, Andrews JM, Bretheim PT, Morgan SJ et al. Improved methods for transplanting split-heart neonatal cardiac grafts into the ear pinna of mice and rats. J Pharmacol Toxicol Methods 1998; 39(1):9-17.

(69) Danneman PJ, Mandrell TD. Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats. Lab Anim Sci 1997; 47(4):386-395.

(70) Jiankuo M, Xingbing W, Baojun H, Xiongwin W, Zhuoya L, Ping X et al. Peptide nucleic acid antisense prolongs skin allograft survival by means of blockade of CXCR3 expression directing T cells into graft. J Immunol 2003; 170(3):1556-1565.

(71) Shimomura Y, Mizoguchi E, Sugimoto K, Kibe R, Benno Y, Mizoguchi A et al. Regulatory role of B-1 B cells in chronic colitis. Int Immunol 2008; 20(6):729-737.

(72) Tilney NL, Garovoy MR, Busch GJ, Strom TB, Graves MJ, Carpenter CB. Rejected human renal allografts: recovery and characteristics of infiltrating cells and antibody. Transplantation 1979; 28(5):421-426.

(73) Oliveira HC, Popi AF, Bachi AL, Nonogaki S, Lopes JD, Mariano M. B-1 cells modulate the kinetics of wound-healing process in mice. Immunobiology 2009.

(74) Velupillai P, Secor WE, Horauf AM, Harn DA. B-1 cell (CD5+B220+) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylactosamine sugars. J Immunol 1997; 158(1):338-344.

(75) Bogsan CS, Novaes e Brito RR, Palos MC, Mortara RA, Almeida SR, Lopes JD et al. B-1 cells are pivotal for in vivo inflammatory giant cell formation. Int J Exp Pathol 2005; 86(4):257-265.

(76) Kawakami Y, Miura T, Bissonnette R, Hata D, Khan WN, Kitamura T et al. Bruton's tyrosine kinase regulates apoptosis and JNK/SAPK kinase activity. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(8):3938-3942.

(77) Zweifel M, Hirsiger H, Matozan K, Welle M, Schaffner T, Mohacsi P. Mast cells in ongoing acute rejection: increase in number and expression of a different phenotype in rat heart transplants. Transplantation 2002; 73(11):1707-1716.

(78) Koskinen PK, Kovanen PT, Lindstedt KA, Lemstrom KB. Mast cells in acute and chronic rejection of rat cardiac allografts--a major source of basic fibroblast growth factor. Transplantation 2001; 71(12):1741-1747.

(79) Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. Nat Immunol 2005; 6(2):135-142.

(80) Vink A, Warnier G, Brombacher F, Renauld JC. Interleukin 9-induced in vivo expansion of the B-1 lymphocyte population. J Exp Med 1999; 189(9):1413-1423.

(81) Al Qaoud KM, Fleischer B, Hoerauf A. The Xid defect imparts susceptibility to experimental murine filariosis--association with a lack of antibody and IL-10 production by B cells in response to phosphorylcholine. Int Immunol 1998; 10(1):17-25.

(82) Hoerauf A, Solbach W, Lohoff M, Rollinghoff M. The Xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. Int Immunol 1994; 6(8):1117-1124.

(83) Babai B, Louzir H, Cazenave PA, Dellagi K. Depletion of peritoneal CD5+ B cells has no effect on the course of Leishmania major infection in susceptible and resistant mice. Clin Exp Immunol 1999; 117(1):123-129.

Abstract

B-1 B cells are important producers of natural antibodies in mice and humans and, therefore, are considered as the first line of defense against pathogens. Because of that, their role in T-cell mediated immune responses is commonly underrated. However, recent studies have described the participation of B-1 cells in immediate and delayed-type hypersensitivity. The present work assessed the role of B-1 cells in the rejection of allografts in mice, an immune reaction mainly orchestrated by T cells. We have transplanted allogeneic skin and heart to wild-type and B-1 cell-deficient mice, and followed rejection kinetics. Skin graft-infiltrating cells were analyzed by flow cytometry. We observed a delay in rejection kinetics of B-1 cell-deficient mice when compared to wild-type mice. Adoptive transfer of B-1 cells into B-1 cell-deficient mice abrogated this delay. The longer survival observed in the absence of B-1 cells correlated with less CD8+ T cells infiltrating the grafts, as well as with more mast cells. Collectively, our results show the participation of B-1 cells in the allograft rejection process in mice, thus collaborating to the understanding of B-1 cell biology.

Apêndice

Correspondência de aceite do artigo científico

Ms. Ref. No.: IMBIO-D-09-00062R1
Title: B-1 cell participation in T-cell-mediated alloimmune response
Immunobiology

Dear Mr. Mauro F Nogueira-Martins,

Thank you for re-submitting your revised manuscript to Immunobiology for publication.
I am pleased to inform you that your paper has been accepted.

Once again, I would like to thank you for your interest in the journal and hope you will continue to support it.

Regards,

Wilhelm J. Schwaeble
Editor-in-Chief
Immunobiology

Apêndice

Artigo científico formatado e não corrigido

Title: B-1 cell participation in T-cell-mediated alloimmune response

Running title: B-1 cells and T-cell-mediated alloimmunity

Authors: Mauro F Nogueira-Martins and Mario Mariano

Discipline of Immunology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology

Universidade Federal de São Paulo, Brazil

Author addresses: *Mauro F Nogueira-Martins*, Rua Dr. Bacelar, 730, apto 104, São Paulo, SP, Brazil, 04026-001; *Mario Mariano*, Rua Botucatu, 862, 4º andar, São Paulo, SP, Brazil, 04023-900

Address for correspondence: Professor Mario Mariano, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 862, 4º andar, São Paulo, SP, Brazil, 04023-900, Phone: +55 11 5576-4529, Fax: +55-11-5572-3328, e-mail: mariomu@uol.com.br

Keywords: alloimmunity, B-1 cells, graft-infiltrating cells, mast cells, transplant rejection

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Immunobiology ▮ (▮▮▮▮) ▮▮▮–▮▮▮

Immunobiology

www.elsevier.de/imbio

B-1 cell participation in T-cell-mediated alloimmune response

Mauro F. Nogueira-Martins[1], Mario Mariano*

Discipline of Immunology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology Universidade Federal de São Paulo, Brazil

Received 15 April 2009; received in revised form 21 May 2009; accepted 22 May 2009

Abstract

Q1 B-1 and B cells are important producers of natural antibodies in mice and humans and, therefore, are considered as the first line of defense against pathogens. Because of that, their role in T-cell-mediated immune responses is commonly underrated. However, recent studies have described the participation of B-1 cells in immediate and delayed-type hypersensitivity. The present work assessed the role of B-1 cells in the rejection of allografts in mice, an immune reaction mainly orchestrated by T cells. We have transplanted allogeneic skin and heart to wild-type and B-1-cell-deficient mice, and followed rejection kinetics. Skin graft-infiltrating cells were analyzed by flow cytometry.

We observed a delay in rejection kinetics of B-1-cell-deficient mice when compared to wild-type mice. Adoptive transfer of B-1 cells into B-1-cell-deficient mice abrogated this delay. The longer survival observed in the absence of B-1 cells correlated with less $CD8^+$ T cells infiltrating the grafts, as well as with more mast cells. Collectively, our results show the participation of B-1 cells in the allograft rejection process in mice and collaborate to the understanding of B-1 cell biology.

© 2009 Published by Elsevier GmbH.

Keywords: Alloimmunity; B-1 cells; Graft-infiltrating cells; Mast cells; Transplant rejection

UNCORRECTED PROOF

Introduction

The biological functions of B-1 cells in innate and adaptive immunity are issue of debate. Although descriptions of B-1 cells date from the early 1980s (Hayakawa et al. 1983; Manohar et al. 1982), a more detailed morphological characterization of these cells was only published in 2003 (Abrahao et al. 2003). This fact is representative of how scattered and disconnected is the information about these cells. B-1 cells, which represent the main B-cell population of peritoneal and pleural cavities in mice (Hayakawa et al. 1986), differ from conventional B lymphocytes (B-2) in respect to many features such as surface markers, antibody repertoire, developmental pathways and B-cell receptor signaling (Hayakawa and Hardy 2000). B-1b cells are Q2 known to express CD11b, CD19, CD45 and immunoglobulin M (IgM), whereas B-1a cells also express CD5. Besides the difference in CD5 expression, B-1a and B-1b cells have also distinct functions in the immune system Q3 (Alugupalli et al. 2004; Choi and Baumgarth 2008).

It is well known that B-1 cells are the major producers of natural self-reactive IgM (Herzenberg et al. 1986) and, because of that, they have been linked to early

Abbreviations: DTH, delayed-type hypersensitivity; EDTA, ethylenediamine tetracetic acid; FACS, fluorescence-activated cell sorter; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; Xid, X-linked immunodeficient.

*Corresponding author at: Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 862, 4° andar, São Paulo, SP 04023-900, Brazil. Tel.: +55 11 5576 4529; fax: +55 11 5572 3328.

E-mail address: mariomu@uol.com.br (M. Mariano).

[1]Rua Dr. Bacelar, 730, apto 104, São Paulo, SP 04026-001, Brazil.

0171-2985/$ - see front matter © 2009 Published by Elsevier GmbH.
doi:10.1016/j.imbio.2009.05.007

innate resistance to infection (Baumgarth et al. 2005) and autoimmunity (Murakami et al. 1995). Therefore, B-1 cells are commonly thought as part of innate, T-cell-independent humoral immunity. However, it has recently been described by others (Szczepanik et al. 2003) and our laboratory (De Lorenzo et al. 2007) that B-1 cells also participate in T-cell-mediated immune reactions such as immediate and delayed-type hypersensitivity (DTH).

Transplant rejection share some features of DTH, such as tissue damage elicited by T cell-activated macrophages. In view of that, the present work assessed the role of B-1 cells in the rejection of allografts, a phenomenon mainly orchestrated by T cells. Previous studies have documented that mouse B-1 cells secrete natural IgM against the carbohydrate epitope α1,3 Gal transferase, which is largely expressed in pig cells (Kawahara et al. 2003). It is strongly suggested that these antibodies would mediate hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation, as well as in other Q4 xenografts (Cramer 2000). Following the same path, human B-1 cells have also been shown to produce natural antibodies against blood group A carbohydrate determinant (Zhou et al. 2003), a fact that poses a barrier to ABO-incompatible transplantation. Both xeno and ABO-incompatible transplantation rejections, as opposed to allograft rejection, are mediated by natural antibodies and complement activation (Cramer 2000). Thus, although B-1 cells have been linked to transplant rejection, their described mechanisms of action remain based on naturally existing antibodies.

In order to assess if B-1 cells can influence T-cell-mediated allograft rejection, we transplanted major histocompatibility complex-incompatible skin and heart to wild-type and X-linked immunodeficient (Xid) mice. The Xid deficiency in mice is caused by a mutation in Bruton's tyrosine kinase (Btk), which results in a lack of B-1 cells (Khan et al. 1995).

In the present work, Xid mice took longer to reject allografts and this delay was abolished by adoptive transfer of B-1 cells, which were able to regulate the infiltration of inflammatory cells, namely $CD8^+$ T and mast cells, into the graft.

Methods

Mice

Female BALB/c, BALB/Xid (H-2^d) and C57BL/6 (H-2^b) were purchased from the animal facility of Universidade Federal de São Paulo (CEDEME) and maintained in specific pathogen free environment. With exception to neonate heart donors, all animals were 6 weeks old at the time of transplantation.

Skin and heterotopic heart grafting

For all transplants, receptors were either BALB/c or BALB/Xid and donors were either C57BL/6 (allografts) or BALB/c (isograft control).

Skin grafts were performed as described (Billingham Q5 and Medawar 1951). Briefly, a full-thickness 1 cm^2 tail skin piece was removed from the donor and transplanted to the dorsal region of the receptor. The graft was covered in protective bandage for 5 days to allow healing. In survival experiments, grafts were daily monitored and rejection was defined when >80% of graft area exhibited necrotic aspect.

Heterotopic heart grafts were performed according to Fey's method (Fey et al. 1998). In brief, a heart from neonate donor was excised, longitudinally split in two and put in a Petri dish with cold saline solution. Receptor mouse was anesthetized and a 1 cm incision was made in the base of its ear pinna. From the incision, a subcutaneous pocket was gently opened with a steel hypodermic needle and the split-heart was then inserted into the pocket. A slight pressure was used to close the incision. The ears were daily monitored and rejection was defined using a score scale that comprehended four aspects: macroscopic observation of contractile activity (indicative of heart function), graft pigmentation (indicative of appropriate blood influx), loss of graft's original size and loss of graft's defined shape (indicatives of tissue damage).

In both techniques the observer was blinded to the groups and rejection was confirmed by histology.

Adherent peritoneal cell culture

The previously described method (Almeida et al. 2001) was adapted. Cells were harvested from the peritoneal cavity of mice by flushing with 8 mL RPMI 1640 medium (Sigma, Saint Louis, MO, USA). The cell suspension (5×10^5 cells/mL RPMI) remained for 40 min at 37 °C in a Petri dish in order to allow adherence. All supernatant was then discarded and the same volume of RPMI 1640 containing 10% heat-inactivated fetal calf serum was added to the adherent cells. Cultures were maintained for 5 days at 37 °C in 5% CO_2 atmosphere. At day 5 the floating cells were harvested for further experimental procedures. To obtain 10^7 floating cells, peritoneal cells from 8 to 10 mice were pooled together.

Analysis of cell phenotypes

Samples obtained from graft-infiltrating cells, adherent cell cultures or peritoneal *ex vivo* lavage were analyzed by flow cytometry. Cell density was adjusted to 10^7 cells/mL in phosphate buffered saline (PBS) with

UNCORRECTED PROOF

1% bovine serum albumine. For all procedures, rat antibodies directed against mouse molecules were used. Fc receptors were blocked using anti-CD16/CD32 (1 μl per 10^6 cells) and cells were stained in different antibody combinations with fluorescein-isothiocianate (FITC) anti-CD19, phycoerythrin (PE) anti-CD117, cy-chrome (Cy) anti-CD5, allophycocyanin (APC) anti-CD11b, PE anti-CD23, Cy anti-CD4 and Cy anti-CD8 (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA) (1 μl per 10^6 cells). Cells were then washed twice and resuspended for analysis. Samples were run on a FACS-Calibur and CELLQuest software (both from BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) was used for data acquisition and analysis.

Isolation of skin graft-infiltrating cells

As previously described (Jiankuo et al. 2003), on day 10 post-transplantation the skin graft was immersed in RPMI 1640 medium and finely cut into small pieces with a scalpel. The graft was digested for 2 h in RPMI 1640 containing 30 U/mL Liberase enzyme (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) and 200 U/mL DNAse I (Roche Applied Science, Indianapolis, IN – cat. no. 10104159001) were performed at 37 °C at constant shaking. Cells remained for 15 min in 1% PBS–EDTA at room temperature before passing through an organza mesh. The single-cell suspension was analyzed by FACS.

B-1 cell tracking assay

Carboxyfluorescein diacetate-succinimidyl ester (CFDA SE, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) was used to assess B-1 cells within skin grafts. Cells were obtained from culture as described above and suspended in 10 mL PBS, at a maximum concentration of 10^6 cells/mL. 2 μL CFSE 5 mM were added to the cell suspension. Cells were incubated at 37 °C, for 10 min at constant shaking. Reaction was quenched by washing twice with RPMI supplemented with 10% fetal calf serum. Cell concentration was adjusted for adoptive transfer as described below.

Adoptive transfer

5×10^5 floating cells from the culture described above were diluted in 100 μL sterile PBS and intraperitoneally transferred into BALB/Xid mice. All transplants in B-1 cell-transferred animals were performed 1 week after injection. Control mice were injected with sterile PBS.

Cell count under light microscope

Heterotopic hearts 14 day post-transplant were fixed in 12% formalin for histological processing. Sections were stained with toluidine blue and mast cell numbers per area of tissue were counted.

Statistical analysis

Survival curves were analyzed by the logrank test. Peritoneal B-1 cell populations were compared using one-way ANOVA followed by Dunnet's post-test for comparison with the isogenic control group. The frequency of cell infiltration was compared by the two-tailed Student's t test for BALB/c vs BALB/Xid, on each experimental day. All other data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. The level of significance was set on $p < 0.05$.

Results

Delayed rejection in B-1-cell-deficient recipients is abolished by adoptive transfer of cultured B-1 cells

To assess a possible role for B-1 cells in graft rejection, we monitored allograft survival using BALB/c and BALB/Xid mice. To create a BALB/Xid + B-1 group, a B-1 cell-enriched suspension (Fig. 1A) was adoptively transferred into BALB/Xid mice. One week after injection, B-1 cell frequency in the peritoneal cavity of BALB/Xid + B-1 was similar to wild type (Fig. 1B)

Rejection of both skin (Fig. 1C) and heart (Fig. 1D) allografts were delayed in BALB/Xid group, when compared to BALB/c. Interestingly, BALB/Xid + B-1 group did not exhibit such delay in rejection kinetics.

Even though the absence of B-1 cells retarded graft loss, it was not able to completely avoid rejection. Moreover, the difference between BALB/Xid and the other survival curves was heightened when mice received heart grafts, a less immunogenic transplant than skin. These results led us to consider B-1 cells to have a supporting rather than a leading role in accelerating graft rejection.

Peritoneal B-1 cell population responds to the stimulus of allogeneic skin grafting

Since we found indication of B-1 cell participation in graft rejection, we assessed the effect of receiving a skin graft on B-1 cell population. For that, peritoneal B-1 cell frequency was measured in skin grafted BALB/c mice at different periods after transplantation. The skin isografts failed to provoke any significant shifts in the peritoneal B-1 cell population ($CD11b^+/CD19^+$) on the observed days when compared to unmanipulated wild-type animals (*data not shown*). Interestingly, skin allografts induced a significant decrease in the frequency of peritoneal B-1 cells early after transplantation (days 1

UNCORRECTED PROOF

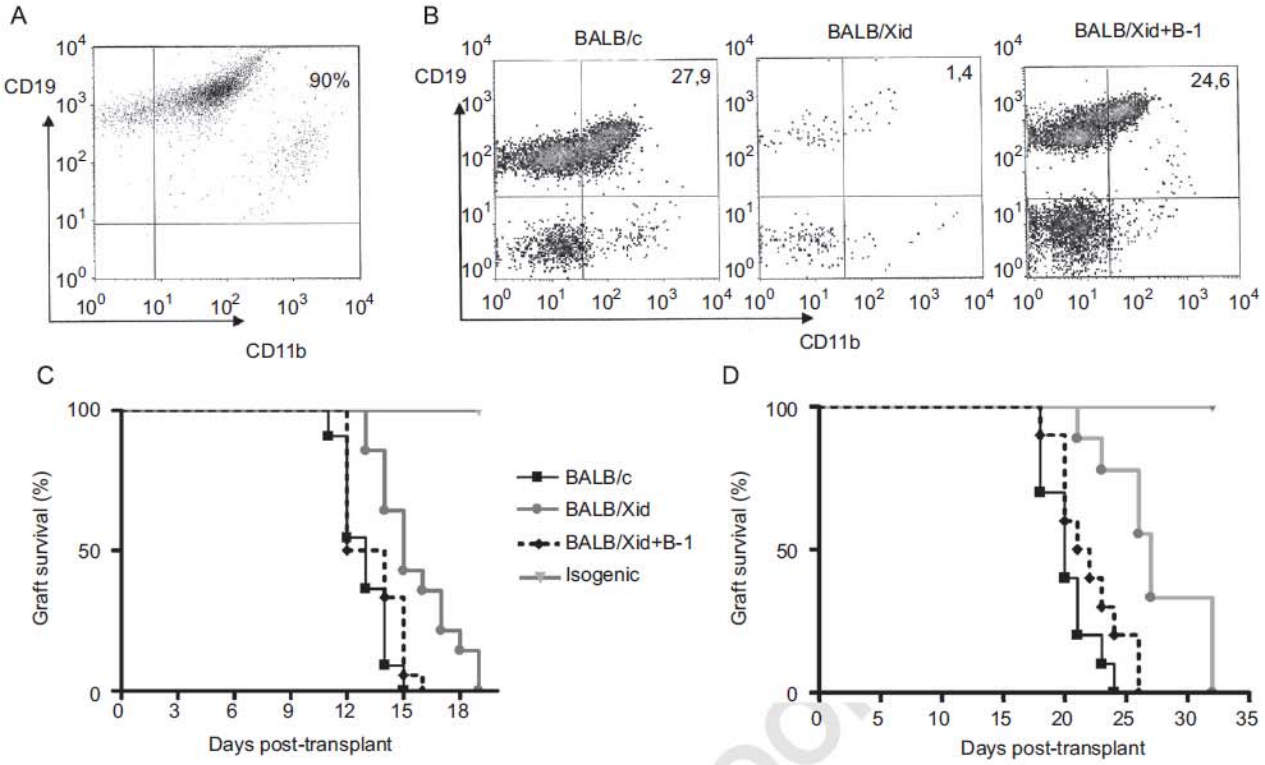


Fig. 1. Delayed rejection in B-1 deficient recipients is abolished by adoptive transfer of cultured B-1 cells. (A) The supernatant of a 5-day adherent peritoneal cell culture from BALB/c contains 90% B-1 cells ($CD11b^+$ and $CD19^+$), which were transferred intraperitoneally into BALB/mice. Further analysis showed that these cells were $CD11b^+/CD19^+/CD23^-/CD5^-$ (*data not shown*). (B) Peritoneal cells from BALB/c, BALB/Xid and BALB/Xid + B-1 mice were harvested and analyzed by FACS. Density plots show percentage of total peritoneal B-1 cells (CD11b+/CD19+). (C) Allogeneic and syngeneic skin graft survival was followed over time. $p = 0.0005$ for BALB/c (black line, $n = 11$) vs BALB/Xid (gray line, $n = 14$) and $p = 0.0035$ for BALB/Xid vs BALB/Xid + B-1 (dotted line, $n = 18$). (D) Allogeneic and syngeneic heterotopic heart graft survival was followed over time. $p = 0.0002$ for BALB/c ($n = 10$) vs BALB/Xid ($n = 9$) and $p = 0.0024$ for BALB/Xid vs BALB/Xid + B-1 ($n = 10$).

and 3) and then a marked increase later on day 10, (Fig. 2A and B). The shifts in peritoneal B-1 cell frequencies were not caused by shifts in other cell types, since the absolute cell count of total peritoneal cells followed a similar decrease/increase pattern as observed with B-1 cells (*data not shown*).

The frequency of B-1 cells is restored to normal levels on day 15 (Fig. 2B), a time when the allograft is considered to be rejected (median survival = 13 days, Fig. 1C – BALB/c curve) and when the foreign stimuli are severely diminished.

B-1 cells infiltrate the allograft

Results described so far suggest that B-1 cells are involved in the allograft rejection process. Because of that, we decided to investigate whether B-1 cells are, like other cells, present in the inflammatory infiltrate of transplanted skin. For that, cultured B-1 cells were labeled with CFSE and adoptively transferred to unmanipulated BALB/c mice. One week after injection, mice received skin grafts which were then collected at different time points for digestion and analysis of graft-infiltrating cells.

Cell suspensions derived from isografts and those from allografts on day 1 failed to contain fluorescent cells (Fig. 3A, first two histograms). However, we found $CFSE^+$ cells among allograft-infiltrating cells on day 3 (Fig. 3A, third histogram). Nevertheless, the presence of $CFSE^+$ cells in the graft was not sustained, since they were not detected on day 10 post-transplant (Fig. 3B).

These results indicate the B-1 cells, much like other cells from innate and adaptive immunity, are able to infiltrate the rejecting graft.

Increased infiltrating mast cells and decreased infiltrating T cells in the absence of B-1 cells

There is extensive data correlating the types of graft-infiltrating cells and the fate of the transplanted organ – tolerance or rejection. (Tilney et al. 1979; Alegre et al. 2007; Zhai et al. 2004; Lu et al. 2006). We hypothesized

UNCORRECTED PROOF

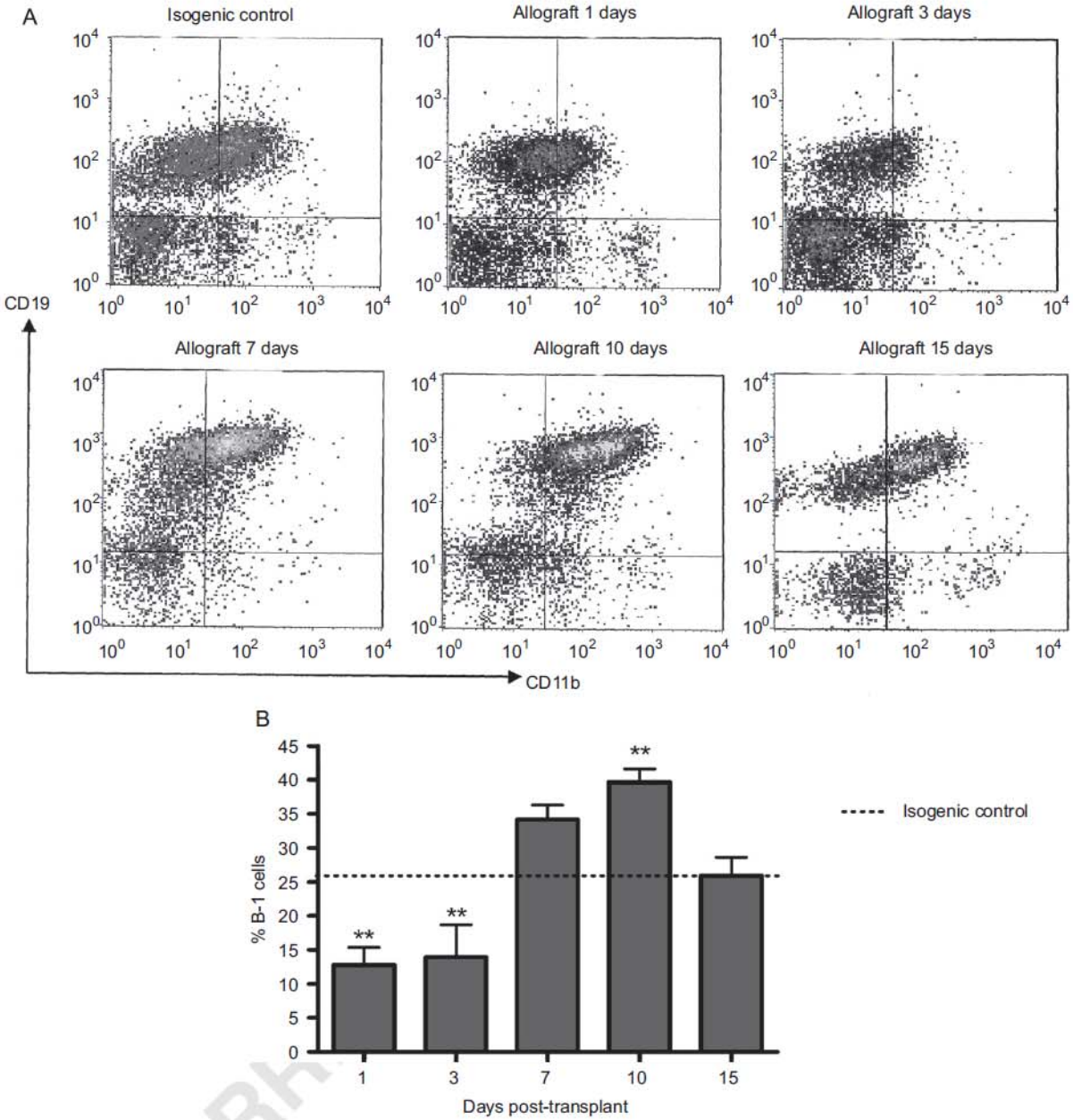


Fig. 2. Shifts in peritoneal B-1 cell population after skin transplantation. (A) Peritoneal cells of transplanted mice were harvested at indicated days post-transplant and B-1 cell ($CD11b^+$ and $CD19^+$) frequency was analyzed. Each density plot shows data that were generated by analyzing 10,000 events and is representative of 4 mice. (B) Total peritoneal B-1 cell frequency means and SEM ($n = 4$ mice/day) are shown for indicated time points. The frequency of peritoneal $CD11b^+/CD19^+$ cells from isografted mice remained constant during the observed period and failed to differ from unmanipulated mice (*data not shown*). The dotted line shows the mean frequency from isografted control animals on day 1 post-transplant (mean = 26.81%, SEM = 3.18%). ** indicates $p<0.01$ for allograft day 1 vs isograft control, allograft day 3 vs isograft control and allograft day 10 vs isograft control.

that disparities observed in allograft survival between BALB/c and BALB/Xid mice may be due to differences in the inflammatory infiltrate between the two groups. To verify that, we analyzed skin graft-infiltrating cells labeled with antibodies for specific cell surface markers present on macrophages, B-1 cells, T cells and mast cells. We failed to find differences in the numbers of infiltrating macrophages ($CD11b^+$) between BALB/c and BALB/Xid at any experimental points (*data not shown*). However, skin pieces grafted in BALB/c mice on day 10 exhibited increased numbers of both T $CD8^+$ cells and T $CD4^+$ cells when compared to BALB/Xid

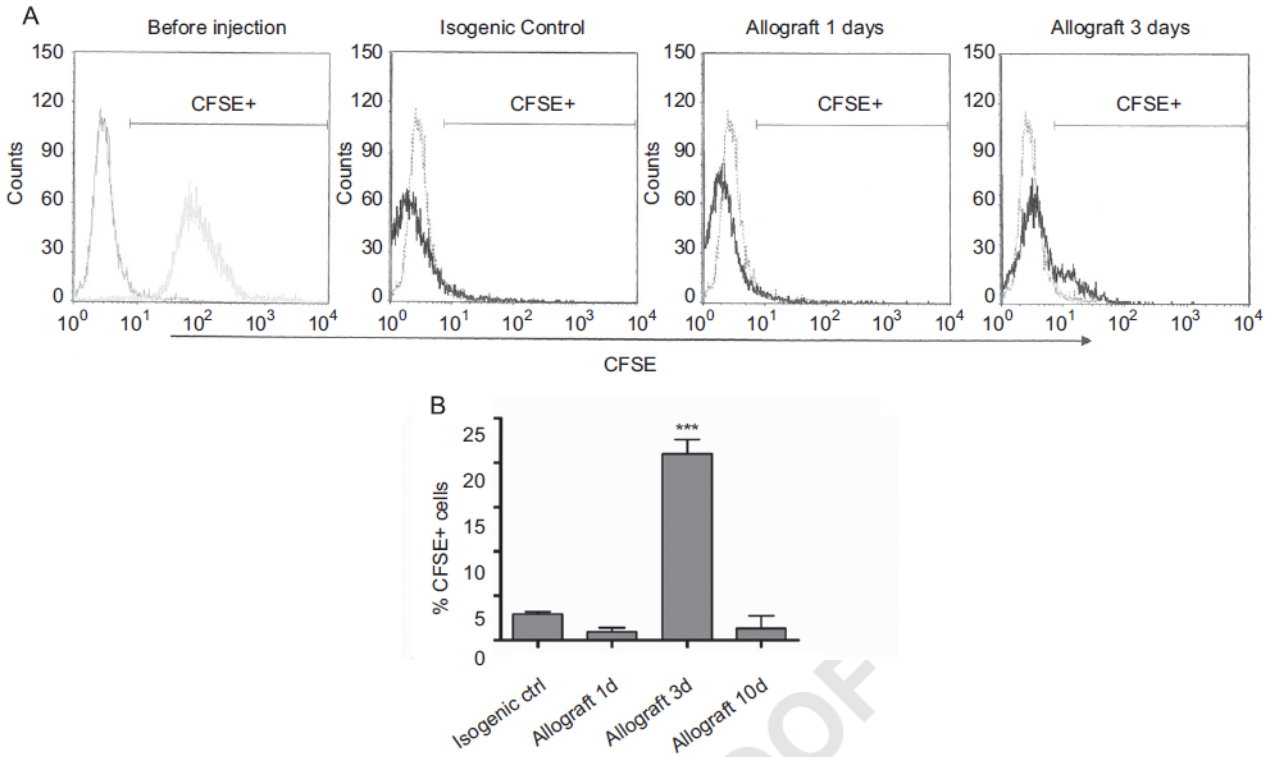


Fig. 3. CFSE-labeled B-1 cells infiltrate skin allografts. (A) CFSE-labeled B-1 cells were adoptively transferred into BALB/c mice and graft-infiltrating cells was analyzed by FACS. The initial fluorescence of labeled cells is shown in the first histogram (thick gray line). Each of the three other histograms is representative of four different animals and shows the unlabeled cells (thin gray line) and the study groups (thick black line). (B) Percentage of CFSE$^+$ events in the graft-infiltrating cell suspension. Means and SEM are shown ($n = 4$ for each time point). *** indicates $p < 0.001$ for allogenic 3 vs any other group.

group (Fig. 4A and B). Interestingly, on the same day there were more CD117$^+$ mast cells infiltrating allografts in BALB/Xid than in BALB/c mice (Fig. 4C).

We also assessed mast cell infiltration in the heterotopic heart graft model. Since transplanted split-hearts were too small to be digested and still yield adequate cell amounts for FACS analysis, we used a different method. Split-hearts sections were stained with toluidine blue (Fig. 4E and F) and mast cells were counted. Mast cell counts were higher in BALB/Xid group on days 14 (Fig. 4D) and 22 (*data not shown*) post-transplant when compared to BALB/c group.

These results clearly demonstrate that the density of some inflammatory cells, namely mast cells, CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells, within rejecting skin allografts is different between normal and B-1-cell-deficient recipients. Furthermore, differences in the inflammatory infiltrate were found on day 10 post-transplant, which coincides with the expansion of the peritoneal B-1 cell population in BALB/c mice (Fig. 2). In a similar way to the skin model, heterotopic heart allografts contain more infiltrating mast cells when transplanted to BALB/Xid mice.

Adoptive transfer of B-1 cells reduces infiltrating mast cell density

In order to confirm if the presence of B-1 cells indeed modify the inflammatory infiltrate within rejecting allografts, we adoptively transferred B-1 cells from BALB/c into BALB/Xid mice. One week post-injection, BALB/Xid + B-1 received skin allografts.

Interestingly, BALB/Xid + B-1 group had significantly fewer CD117$^+$ mast cells than BALB/Xid and exhibited no differences when compared to BALB/c group (Fig. 5A and B). Similar findings were obtained when counting mast cells in heart sections from BALB/Xid + B1 recipients (*data not shown*). Therefore, there appears to be a correlation between the presence of B-1 cells in the recipient's peritoneal cavity and the mast cell graft infiltration.

Adoptive transfer of B-1 cells totally restores CD8$^+$ T cell, but not CD4$^+$ T cell graft infiltration

We also analyzed the frequency of skin allograft-infiltrating T cells in the Xid + B-1 group. Similarly to mast cells, infiltrating CD8$^+$ T cells in BALB/Xid + B-1

UNCORRECTED PROOF

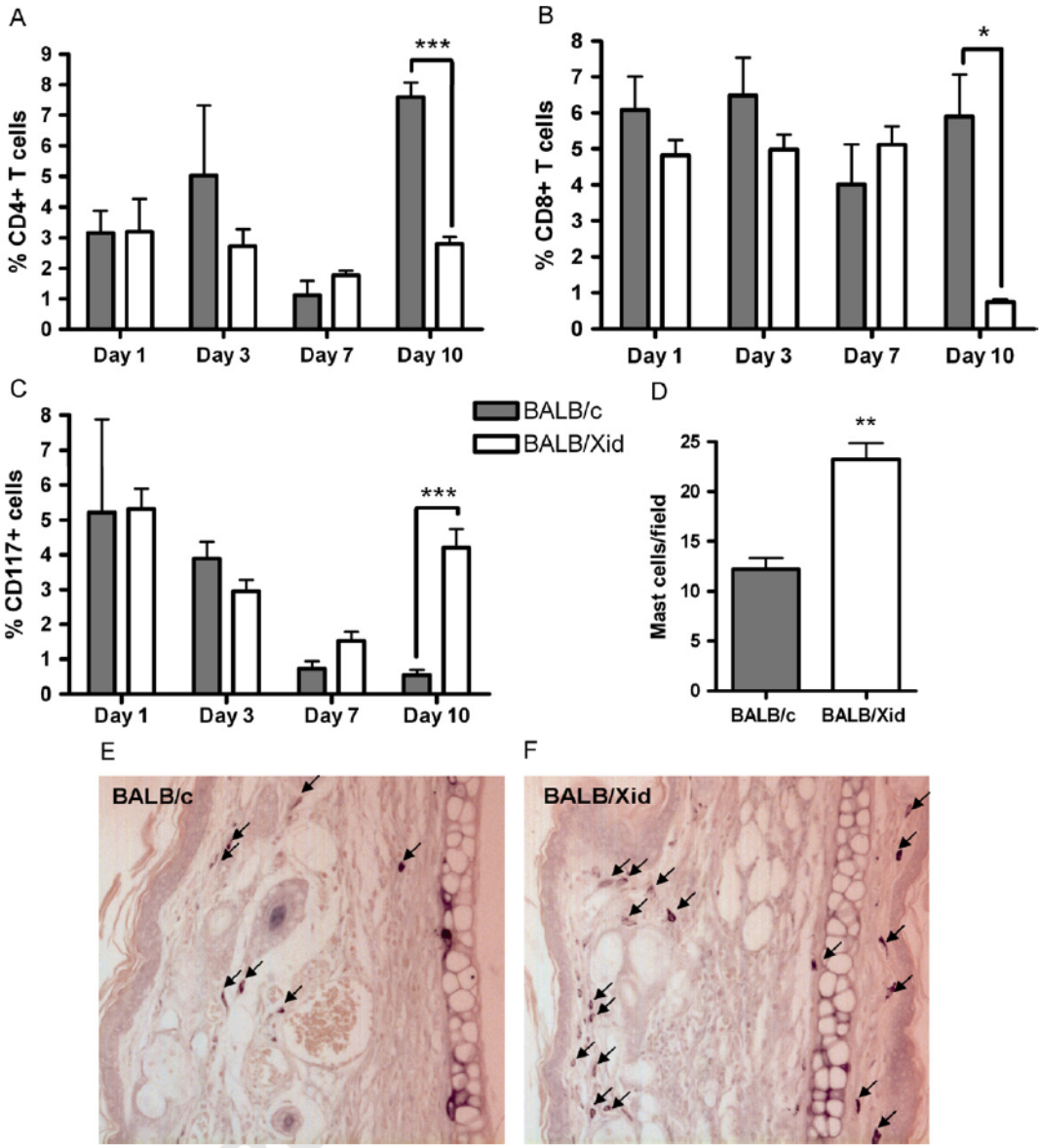


Fig. 4. More mast cells and fewer T cells infiltrate skin transplanted to B-1-cell-deficient mice. A, B and C, allografts were collected at indicated time points for digestion. Total graft-infiltrating cells were labeled with specific antibodies and analyzed by FACS. Means and SEM are shown ($n = 4$ animals for each bar). (A) $CD4^+$ T cells were defined as $CD4^+$ cells inside the lymphocyte gate, which was defined by forward and side scatter parameters. *** represents $p<0.001$ between BALB/c vs BALB/Xid. (B) $CD8^+$ T cells were defined as $CD8^+$ cells inside the lymphocyte gate. * represents $p<0.05$ between BALB/c vs BALB/Xid. (C) Mast cells were defined as $CD117^+$ cells. *** represents $p<0.001$ between BALB/c vs BALB/Xid. (D) Heterotopic heart allograft sections were stained by toluidine blue and analyzed through a light microscope. Mast cells were defined as purple-red cells and were counted per visible field under magnification of 200 ×. Each heart section provided 4–8 visible fields. Means and SEM for each heart section are shown ($n = 5$ heart sections for each group). ** represents <0.01 between BALB/c vs BALB/Xid. (E) and (F) sections from hearts grafted in BALB/c and BALB/Xid are shown, respectively. Magnification is 200 ×. Arrows indicate mast cells.

group did not differ from the BALB/c group (Fig. 5B, second graph), showing that B-1 cell transfer was able to totally restore infiltrating $CD8^+$ T cell frequency. Such restoration, however, was not observed in $CD4^+$ T cells (Fig. 5B, third graph), since their presence remained scarce in both BALB/Xid + B-1 and BALB/Xid group.

Discussion

The role of B-1 cells in innate and adaptive immune responses is controversial. For many years, B-1 cells have been considered as the first line of defense against

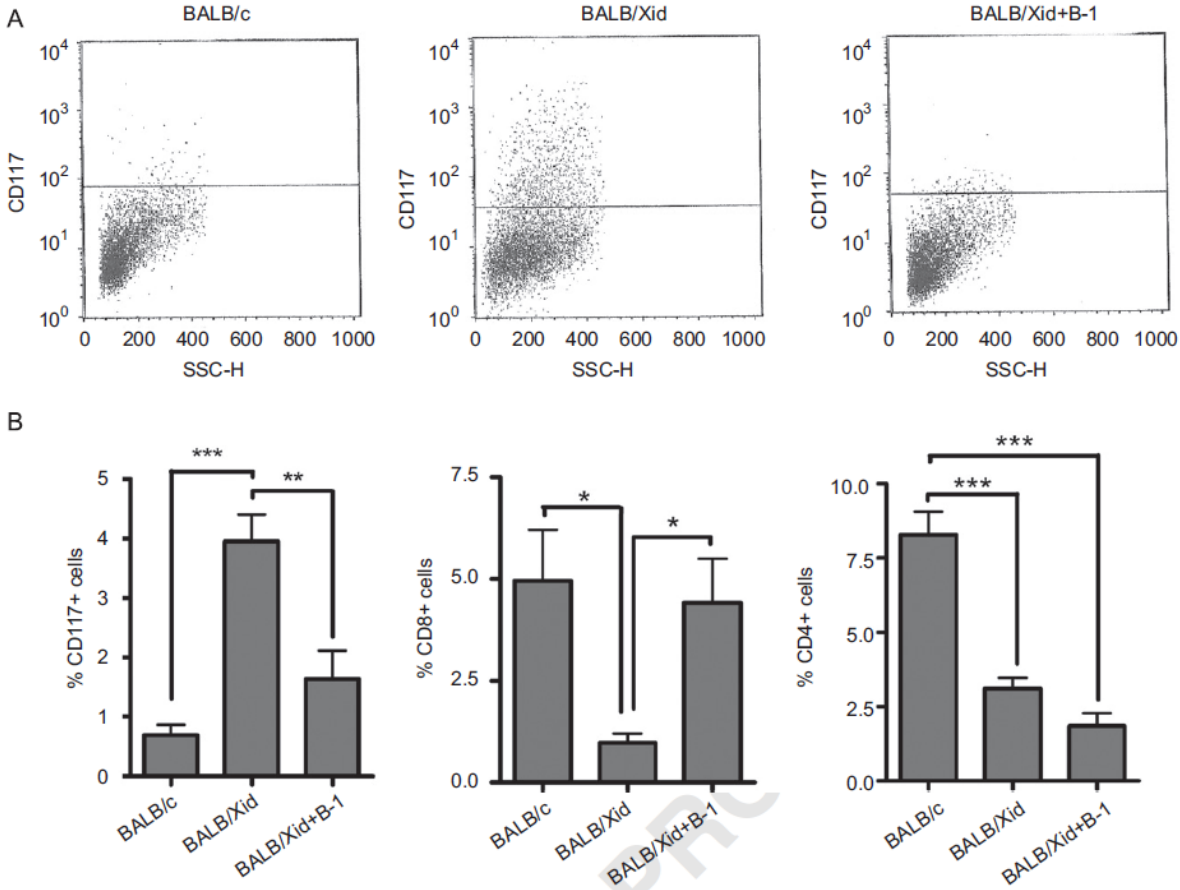


Fig. 5. Adoptive transfer of B-1 cells modifies the graft inflammatory infiltrate. (A) Graft-infiltrating cells were isolated and analyzed on day 10 post-transplant. Each dot plot showing mast cells ($CD117^+$) is representative of five different animals per group. (B) Percentage of total graft-infiltrating mast cells, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells 10 days post-transplant. Means and SEM are shown ($n = 5$ for each group). In the first graph, *** indicates $p < 0.001$ for BALB/c vs BALB/Xid and ** indicates $p < 0.01$ for BALB/Xid vs BALB/Xid + B-1 cells. In the second graph, * indicates $p < 0.05$ for BALB/Xid vs BALB/c and BALB/Xid vs BALB/Xid + B-1. In the third, *** indicates $p < 0.001$ for BALB/c vs BALB/Xid and BALB/c vs BALB/Xid + B-1.

pathogens, because of their ability to secrete natural antibodies (Baumgarth et al. 2005). Therefore, B-1 cells are commonly associated to innate immunity, and their participation in T-cell-mediated immune responses has been often underestimated. However, recent studies have associated B-1 cells to immune reactions classically attributed to T cells, such as immediate (De Lorenzo et al. 2007) or delayed-type hypersensitivity (Szczepanik et al. 2003).

In the present study, we assessed whether B-1 cells participate in allograft rejection, a phenomenon mainly orchestrated by T cells.

The previously unknown fact that skin and heart allografts had their survival extended when transplanted to BALB/Xid mice indicates that B-1 cells may contribute with other immune system elements to the elimination of foreign tissue. Accordingly, BALB/Xid + B-1 group exhibited similar graft survival kinetics as BALB/c group.

In the present work, peritoneal cavity B-1 cells were shown to respond to allogeneic stimulus in the skin through shifts in $CD11b^+/CD19^+$ cell frequency. This type of B-1 cell response has been demonstrated to occur upon various stimuli (Alugupalli et al. 2003; Shimomura et al. 2008; Velupillai et al. 1997). Alugupalli et al. have observed that the expansion of peritoneal B-1 cells coincides with clearance of *Borrelia hermsii* bacteremia (Alugupalli et al. 2003), and that the persistence of expansion correlates with long-term resistance to reinfection (Alugupalli et al. 2004). Thus, peritoneal B-1 cell frequency seems to reflect the state of B-1 cell activation in response to systemic (bacteremia) or localized (Palos et al., personal communication) stimuli. Accordingly, our results show that accumulation of B-1 cells in the peritoneal cavity on day 10 post-transplant was concurrent with differences observed in graft-infiltrating cells. Moreover, we observed that these changes in peritoneal B-1 cell numbers occurred only

after allogeneic skin transplantation, and not after isografting. However, whether B-1 cell expansion was alloantigen-driven or induced by inflammatory signals, such as cytokines, independently from the nature of the specific antigen (Choi and Baumgarth 2008), remains to be solved.

In B-1 cell tracking assays, we found adoptively transferred CFSE-stained B-1 cells within rejecting skin pieces on day 3 post-transplant. These findings are in accordance with previously published researches which show that B-1 cells are able to migrate from the peritoneal cavity to an inflammatory focus (Almeida et al. 2001; Bogsan et al. 2005). It is likely that B-1 cell participation in graft rejection, much like many immune responses, is based on different and redundant mechanisms. In view of that, B-1 cells may also be acting from distant sites, through an array of soluble factors. Indeed, that is what Szczepanik et al. (2003) have proposed. They have uncovered a role for B-1 cells in the early phases of protein-induced DTH and have showed that B-1 cells mediate T-cell recruitment to the antigen challenge site, through sensitization of mast cells.

Since DTH reaction and transplantation rejection share many features, we were prompted to investigate whether B-1 cells may influence the recruitment of allograft-infiltrating cells. Interestingly, on day 10 post-transplantation, skin grafted to BALB/Xid mice had fewer $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells than did transplants in BALB/c mice. Moreover, BALB/Xid group exhibited an increased amount of graft-infiltrating mast cells, both in skin and heterotopic heart transplants. Higher numbers of mast cells and lower numbers of T cells correlated with longer graft survival in the BALB/Xid group.

These results corroborate the research from Lu et al. (2006), who have shown that mast cells are essential in order to establish allograft acceptance in mice rendered tolerant by a tolerizing protocol. In that case, the authors have described an increased mast cell-gene expression as well as increased mast cell density within tolerant skin allografts when compared to rejecting ones. Also, the absence of mast cells coincided with an increased number of $CD4^+$ T cells in rejecting grafts. Although we did not use a tolerizing protocol, our results are to some extent similar to the ones from Lu et al. In our model, grafts that take longer to be rejected (BALB/Xid) contain a higher density of infiltrating mast cells.

This unanticipated anti-inflammatory role for mast cells was also documented by Grimbaldeston et al. (2007) in a model of contact hypersensitivity. The authors have shown that mast cell-derived IL-10 is able to limit skin damage and leukocyte infiltration, including $CD8^+$ T cells, in hapten challenge site.

In the present work, it may be possible that the differences in mast cell graft infiltration between BALB/c and BALB/Xid resulted from an increased survival capability inherent to BALB/Xid-derived mast cells (Kawakami et al. 1997), rather than from lack of B-1 cell interference. In order to rule that possibility out, we adoptively transferred cultured B-1 cells into BALB/Xid mice, which 7 days later received skin allografts. B-1 cell reconstitution severely decreased graft-infiltrating mast cell density, showing that, in the presence of B-1 cells, Btk-deficient mast cells are still able to migrate into the transplanted organ. Intragraft mast cell paucity in BALB/Xid + B-1 group was accompanied by increased numbers of $CD8^+$ but not $CD4^+$ T cells.

It has been documented that $CD4^+$ T cells from BALB/Xid differ from the ones from BALB/c, in some infection models (Al Qaoud et al. 1998; Hoerauf et al. 1994). Although the authors suggest that these differences are due to lack of B-1 cells, no direct evidence has been shown, and disparities may be caused by a B-1-cell-independent Btk-deficient environment (Babai et al. 1999). This, therefore, seems to be the case observed here with graft-infiltrating $CD4^+$ T cells in BALB/Xid and BALB/Xid + B-1 groups.

Conversely, $CD8^+$ T and mast cell infiltration were shown to be affected by B-1 cell adoptive transfer in BALB/Xid mice. However, the mechanisms responsible for this regulation remain elusive. B-1 cells were shown to mediate T-cell recruitment to DTH site via mast cell stimulation (Szczepanik et al. 2003). It is possible that, in our model, B-1 cells directly exert a negative regulation of mast cells by secretion of still undefined factors. B-1 cells may also avidly compete with mast cells for growth factors such as IL-9 (Lu et al. 2006; Vink et al. 1999), leading to an expansion of the peritoneal B-1 cell population and a deficiency in graft-infiltrating mast cells on day 10. Without B-1 cell interference, graft-infiltrating mast cells may limit $CD8^+$ T cell infiltration by being an important source of locally secreted IL-10 (Grimbaldeston et al. 2007).

Altogether, these findings contribute to the understanding of B-1 cell biology and support the idea that B-1 cells, apart from their role in natural antibody-dependent humoral immunity, also participate in important T-cell-mediated responses, such as allograft rejection and DTH.

Acknowledgements

We thank Dr. Veronica Coelho and Luiz Mundel for advices with transplantation procedures and Ricardo Toledo Russo for help with isolation of graft-infiltrating cells. This research received financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

UNCORRECTED PROOF

References

Abrahao, T.B., Freymuller, E., Mortara, R.A., Lopes, J.D., Mariano, M., 2003. Morphological characterization of mouse B-1 cells. Immunobiology 208, 401–411.

Al Qaoud, K.M., Fleischer, B., Hoerauf, A., 1998. The Xid defect imparts susceptibility to experimental murine filariosis – association with a lack of antibody and IL-10 production by B cells in response to phosphorylcholine. Int. Immunol. 10, 17–25.

Alegre, M.L., Florquin, S., Goldman, M., 2007. Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: time for reassessment. Curr. Opin. Immunol. 19, 563–568.

Almeida, S.R., Aroeira, L.S., Frymuller, E., Dias, M.A., Bogsan, C.S., Lopes, J.D., Mariano, M., 2001. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. Int. Immunol. 13, 1193–1201.

Alugupalli, K.R., Gerstein, R.M., Chen, J., Szomolanyi-Tsuda, E., Woodland, R.T., Leong, J.M., 2003. The resolution of relapsing fever borreliosis requires IgM and is concurrent with expansion of B1b lymphocytes. J. Immunol. 170, 3819–3827.

Alugupalli, K.R., Leong, J.M., Woodland, R.T., Muramatsu, M., Honjo, T., Gerstein, R.M., 2004. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. Immunity 21, 379–390.

Babai, B., Louzir, H., Cazenave, P.A., Dellagi, K., 1999. Depletion of peritoneal CD5+ B cells has no effect on the course of Leishmania major infection in susceptible and resistant mice. Clin. Exp. Immunol. 117, 123–129.

Baumgarth, N., Tung, J.W., Herzenberg, L.A., 2005. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. Springer Semin. Immunopathol. 26, 347–362.

Billingham, R.E., Medawar, P.B., 1951. The technique of free skin grafting in mammals. J. Exp. Biol. 28, 385–402.

Bogsan, C.S., Novaes e Brito, R.R., Palos, M.C., Mortara, R.A., Almeida, S.R., Lopes, J.D., Mariano, M., 2005. B-1 cells are pivotal for in vivo inflammatory giant cell formation. Int. J. Exp. Pathol. 86, 257–265.

Choi, Y.S., Baumgarth, N., 2008. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. J. Exp. Med. 205, 3053–3064.

Cramer, D.V., 2000. Natural antibodies and the host immune responses to xenografts. Xenotransplantation 7, 83–92.

Lorenzo, B.H., Brito, R.R., Godoy, L.C., Lopes, J.D., Mariano, M., 2007. Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction. Immunol. Lett. 114, 110–118.

Fey, T.A., Krause, R.A., Hsieh, G.C., Andrews, J.M., Bretheim, P.T., Morgan, S.J., Luly, J.R., Mollison, K.W., 1998. Improved methods for transplanting split-heart neonatal cardiac grafts into the ear pinna of mice and rats. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 39, 9–17.

Grimbaldeston, M.A., Nakae, S., Kalesnikoff, J., Tsai, M., Galli, S.J., 2007. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. Nat. Immunol. 8, 1095–1104.

Hayakawa, K., Hardy, R.R., 2000. Development and function of B-1 cells. Curr. Opin. Immunol. 12, 346–353.

Hayakawa, K., Hardy, R.R., Herzenberg, L.A., 1986. Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. Eur. J. Immunol. 16, 450–456.

Hayakawa, K., Hardy, R.R., Parks, D.R., Herzenberg, L.A., 1983. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodefective, and autoimmune mice. J. Exp. Med. 157, 202–218.

Herzenberg, L.A., Stall, A.M., Lalor, P.A., Sidman, C., Moore, W.A., Parks, D.R., Herzenberg, L.A., 1986. The Ly-1 B cell lineage. Immunol. Rev. 93, 81–102.

Hoerauf, A., Solbach, W., Lohoff, M., Rollinghoff, M., 1994. The Xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. Int. Immunol. 6, 1117–1124.

Jiankuo, M., Xingbing, W., Baojun, H., Xiongwin, W., Zhuoya, L., Ping, X., Yong, X., Anting, L., Chunsong, H., Feili, G., Jinquan, T., 2003. Peptide nucleic acid antisense prolongs skin allograft survival by means of blockade of CXCR3 expression directing T cells into graft. J. Immunol. 170, 1556–1565.

Kawahara, T., Ohdan, H., Zhao, G., Yang, Y.G., Sykes, M., 2003. Peritoneal cavity B cells are precursors of splenic IgM natural antibody-producing cells. J. Immunol. 171, 5406–5414.

Kawakami, Y., Miura, T., Bissonnette, R., Hata, D., Khan, W.N., Kitamura, T., Maeda-Yamamoto, M., Hartman, S.E., Yao, L., Alt, F.W., Kawakami, T., 1997. Bruton's tyrosine kinase regulates apoptosis and JNK/SAPK kinase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3938–3942.

Khan, W.N., Alt, F.W., Gerstein, R.M., Malynn, B.A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Muller, S., Kantor, A.B., Herzenberg, L.A., 1995. Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. Immunity 3, 283–299.

Lu, L.F., Lind, E.F., Gondek, D.C., Bennett, K.A., Gleeson, M.W., Pino-Lagos, K., Scott, Z.A., Coyle, A.J., Reed, J.L., Snick, J., Strom, T.B., Zheng, X.X., Noelle, R.J., 2006. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. Nature 442, 997–1002.

Manohar, V., Brown, E., Leiserson, W.M., Chused, T.M., 1982. Expression of Lyt-1 by a subset of B lymphocytes. J. Immunol. 129, 532–538.

Murakami, M., Yoshioka, H., Shirai, T., Tsubata, T., Honjo, T., 1995. Prevention of autoimmune symptoms in autoimmune-prone mice by elimination of B-1 cells. Int. Immunol. 7, 877–882.

Shimomura, Y., Mizoguchi, E., Sugimoto, K., Kibe, R., Benno, Y., Mizoguchi, A., Bhan, A.K., 2008. Regulatory role of B-1 B cells in chronic colitis. Int. Immunol. 20, 729–737.

Szczepanik, M., Akahira-Azuma, M., Bryniarski, K., Tsuji, R.F., Kawikova, I., Ptak, W., Kiener, C., Campos, R.A., Askenase, P.W., 2003. B-1 B cells mediate required early T cell recruitment to elicit protein-induced delayed-type hypersensitivity. J. Immunol. 171, 6225–6235.

Tilney, N.L., Garovoy, M.R., Busch, G.J., Strom, T.B., Graves, M.J., Carpenter, C.B., 1979. Rejected human renal allografts: recovery and characteristics of infiltrating cells and antibody. Transplantation 28, 421–426.

UNCORRECTED PROOF

Velupillai, P., Secor, W.E., Horauf, A.M., Harn, D.A., 1997. B-1 cell (CD5+B220+) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylactosamine sugars. J. Immunol. 158, 338–344.

Vink, A., Warnier, G., Brombacher, F., Renauld, J.C., 1999. Interleukin 9-induced in vivo expansion of the B-1 lymphocyte population. J. Exp. Med. 189, 1413–1423.

Zhai, Y., Shen, X.D., O'Connell, R., Gao, F., Lassman, C., Busuttil, R.W., Cheng, G., Kupiec-Weglinski, J.W., 2004. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. J. Immunol. 173, 7115–7119.

Zhou, W., Ohdan, H., Tanaka, Y., Hara, H., Tokita, D., Onoe, T., Asahara, T., 2003. NOD/SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes can be a model for investigating B cells responding to blood group A carbohydrate determinant. Transplant Immunol. 12, 9–18.

UNCORRECTED PROOF

Bilbiografia consultada

Rother ED, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª edição rev. e atual. São Paulo; 2005.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo