

PARTICIPAÇÃO DA APOPTOSE NA REJEIÇÃO AGUDA DO TRANSPLANTE INTESTINAL EM RATOS

André Dong Won LEE¹, Ulysses RIBEIRO Jr.¹, Marcelo Alves FERREIRA², Antônio SESSO², Cláudio José Caldas BRESCIANI¹ e Joaquim GAMA-RODRIGUES¹

RESUMO – Racional - O transplante de intestino delgado é procedimento cirúrgico em estudo visando sua aplicação no tratamento dos pacientes portadores da síndrome do intestino curto, com vistas à reabilitação oral. A grande barreira, porém, se deve à rejeição pela grande quantidade de tecido linfóide presente no intestino delgado. **Objetivo** - Estudo da apoptose em alotransplante heterotópico intestinal. **Material e Métodos** - Realizaram-se 24 alotransplantes intestinais em ratos da raça Brown-Norway (doador) para Lewis (receptor), sendo subdivididos em três subgrupos de oito animais, sacrificados respectivamente no terceiro dia de pós-operatório (Tx₍₃₎), no quinto dia de pós-operatório (Tx₍₅₎) e no sétimo dia de pós-operatório (Tx₍₇₎) para coleta das biopsias dos enxertos intestinais. Compararam-se os resultados com o grupo isotransplante (C) que envolveu oito animais da raça Lewis (doador) para Lewis (receptor), porém neste grupo realizaram-se biopsias seriadas no mesmo animal, sendo subdivididos em três momentos: biopsia no terceiro dia de pós-operatório (C₍₃₎), no quinto dia de pós-operatório (C₍₅₎) e sacrificados no sétimo dia de pós-operatório (C₍₇₎) para coleta da biopsia. Realizou-se, inicialmente, análise intragrupo entre os momentos C₍₃₎, C₍₅₎ e C₍₇₎ para todos os parâmetros de rejeição citados anteriormente, como também para os três subgrupos Tx₍₃₎, Tx₍₅₎ e Tx₍₇₎. Posteriormente, realizou-se a análise intergrupo de forma transversal e pareada comparando-se o grupo isotransplante com o grupo alotransplante. (C₍₃₎ com Tx₍₃₎; C₍₅₎ com Tx₍₅₎ e C₍₇₎ com Tx₍₇₎). No grupo isotransplante não houve expressão estatística quanto aos marcadores analisados. Porém, no grupo alotransplante observou-se que alterações da apoptose foram marcantes a partir do terceiro dia de pós-operatório.

DESCRIPTORIOS – Intestino delgado, transplante. Rejeição de enxerto. Apoptose. Ratos.

INTRODUÇÃO

O transplante de intestino delgado (TID) é a proposta lógica para tratar a falência intestinal, porém existem sérias dificuldades ainda não superadas e que não o tornam procedimento rotineiro^(1, 23). Entre os obstáculos, destacam-se a rejeição de difícil controle^(21, 46), a necessidade de manter imunossupressão agressiva, surtos infecciosos graves, a complexa técnica cirúrgica, dificuldades na preservação do enxerto, desencadeamento de doenças linfoproliferativas^(40, 47), que limitam a indicação clássica usual do TID^(21, 23).

O modelo experimental em ratos proporcionou estudos mais controlados na avaliação da rejeição aguda e crônica^(8, 11), das dificuldades ligadas à preservação intestinal^(12, 26), da compreensão da função do enxerto⁽³⁷⁾, da doença do enxerto versus hospedeiro (DEVH)^(14, 15), da indução de tolerância^(2, 33) e do novo campo fascinante da medicina moderna, – a engenharia tecidual – que poderá revolucionar a forma de tratamento de diversas doenças, inclusive permitindo a produção de tecido intestinal em laboratório^(22, 24).

Por conta dos estudos experimentais, verificou-se que a forte tendência à rejeição no TID é devido à grande concentração de tecido linfóide presente no intestino transplantado^(8, 11, 17). A rejeição causa perda da integridade da barreira mucosa e favorece a translocação bacteriana e a sepse. A necessidade do uso de intensa imunossupressão para controlar a rejeição provoca maior tendência à infecção e ao desenvolvimento de tumores, além do risco de toxicidade para vários órgãos. Essas complicações limitam a sobrevivência prolongada após o TID e representam grande desafio à sua aplicação clínica^(1, 9, 17, 23).

No Brasil, foram realizados, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), dois casos pioneiros de TID por Okumura na década de 60⁽³⁵⁾. Nessa Faculdade realiza-se pesquisa experimental de TID desde 1971, visando sua aplicação clínica^(11, 15, 43). Recentemente, realizou-se na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo o primeiro TID, introduzindo entre nós o emprego de FK-560⁽⁷⁾ para evitar a rejeição nesta modalidade de transplante.

A morte celular determina a perda da estrutura celular e da sua função de forma irreversível, sendo um fenômeno biológico constatado nos organismos vivos. Ocorrem dois tipos de morte

¹ Departamento de Gastroenterologia e ² Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP.
Endereço para correspondência: Dr. André Dong Won Lee - Rua Prof. Carolina Ribeiro, 123 - apt.101 - Vila Mariana - 04116-020 - São Paulo, SP.

celular denominados apoptose⁽¹⁰⁾ e necrose^(3, 41). A necrose celular é consequência da agressão do meio ambiente, que resulta em alterações precoces da membrana plasmática e leva à acidose com alteração do transporte de íons (potássio, magnésio, cálcio, sódio e cloro), por aumento da permeabilidade da camada de fosfolípides e ruptura física da membrana e conseqüente perda da compartimentalização celular.

Em contraste, a apoptose compreende uma atividade bioquímica em resposta às alterações locais do meio ambiente intracelular, desencadeadas pela endonuclease nuclear, a qual divide o DNA em oligômeros⁽¹⁸⁾. O processo da apoptose é observado quando a morte celular é evento fisiológico programado durante a embriogênese, metamorfose ou "turn over" celular normal. Entretanto, tem se tornado evidente que a apoptose ocorre também por meio de estímulos patológicos, como o que ocorre na vigência de infecções virais, hepatites, por exemplo^(5,6). Morfológicamente a apoptose é caracterizada pela condensação nuclear e citoplasmática seguida de perda da membrana nuclear, fragmentação da cromatina nuclear e subseqüente formação de inúmeros fragmentos de condensado nuclear e citoplasmático. Esses corpos apoptóticos são absorvidos pelas células adjacentes, não ocorrendo infiltrado leucocitário, obrigatoriamente encontrado nas reações inflamatórias.

Em transplante de órgãos, a apoptose tem sido investigada em transplante clínico e experimental de fígado⁽³⁴⁾, rim⁽³⁶⁾ e pâncreas⁽²⁵⁾. Com a finalidade de se aprimorar o diagnóstico precoce e específico, e também o prognóstico da rejeição, decidiu-se pela busca experimental de outros métodos indicadores da rejeição, uma vez que o estudo histológico das biopsias é insuficiente para prover o almejado diagnóstico de certeza desta grave complicação.

Portanto, o objetivo do presente estudo experimental foi a avaliação da apoptose em ratos submetidos a alotransplante intestinal.

MÉTODOS

Animal de Experimentação

Empregou-se o modelo de transplante intestinal em ratos isogênicos das raças Brown-Norway e Lewis, sendo 24 animais machos da raça Brown-Norway e 40 machos da raça Lewis, com o peso entre 200 a 350 gramas, distribuídos aleatoriamente, sem prévia seleção ou análise de qualquer parâmetro clínico-laboratorial para quaisquer dos grupos estudados. Os animais Brown-Norway foram apenas doadores do intestino delgado e os da raça Lewis, 8 doadores e 32 receptores. Os animais foram anestesiados com pentobarbital (65 mg/kg) e atropina (0,04 mg/kg) via intraperitoneal, seguida de anestesia inalatória com halotano 2% associado a oxigênio (2,5 L/min).

Os animais foram distribuídos em dois grupos, a saber:

Grupo Isotransplante (C)

É o grupo controle (C), constituído por oito animais receptores da raça Lewis submetidos ao isotransplante. O mesmo animal foi submetido a duas biopsias e posteriormente ao sacrifício nos seguintes momentos:

Momento C₍₃₎ – Os oito animais receptores foram submetidos a biopsia intestinal no terceiro dia pós-operatório (PO3).

Momento C₍₅₎ – Os oito animais foram submetidos a biopsia intestinal no quinto dia de pós-operatório (PO5).

Momento C₍₇₎ – Os oito animais foram sacrificados no sétimo dia de pós-operatório (PO7).

Grupo Alotransplante (Tx)

Constituído por 24 animais receptores da raça Lewis e 24 animais doadores da raça Brown-Norway, distribuídos em três subgrupos descritos a seguir:

Subgrupo Tx₍₃₎ – Oito animais receptores da raça Lewis submetidos ao alotransplante e sacrificados no terceiro dia de pós-operatório (PO3).

Subgrupo Tx₍₅₎ – Oito animais receptores da raça Lewis submetidos ao alotransplante e sacrificados no quinto dia de pós-operatório (PO5).

Subgrupo Tx₍₇₎ – Oito animais receptores da raça Lewis submetidos ao alotransplante e sacrificados no sétimo dia de pós-operatório (PO7).

Procedimento cirúrgico

O transplante intestinal foi executado de forma heterotópica (Thiry-Vella), segundo a técnica de LEE et al.⁽²⁹⁾, ZHONG et al.^(48, 49) e MONCHICK e RUSSELL⁽³¹⁾. Não foi utilizada nenhuma forma de imunossupressão (Figura 1).

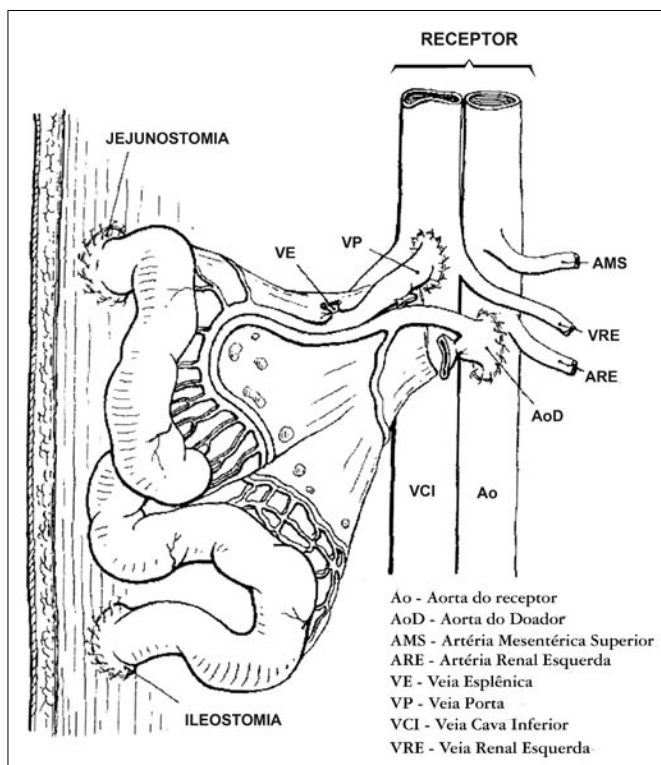


FIGURA 1 – Esquema das posições das anastomoses vasculares; nota-se detalhe da anastomose término-lateral porta-cava e aorto-aórtica

Apoptose

Realizou-se a reação de TUNEL (Terminal deoxynucleotidil transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling) utilizando-se o kit "In Situ Cell Death Detection Kit, Cat. 1684817 – Boehringer Mannheim" para estudo imunoistoquímico de detecção e quantificação da apoptose, baseado na quebra das cadeias de DNA. Os tecidos foram analisados através da microscopia óptica.

A avaliação da apoptose^(18, 30) foi realizada por dois investigadores (UR, ADWL) pelo índice apoptótico, pela leitura direta das lâminas preparadas pela reação de TUNEL em áreas denominadas zona quente^(10, 41, 47) (maior probabilidade de se encontrar células alteradas devido à rejeição); no caso foram as criptas e a lâmina própria das vilosidades intestinais. Foram escolhidos 10 campos aleatórios na área considerada zona quente e feita a leitura do número total das células apoptóticas^(38, 39), somando-se o total de células apoptóticas nos 10 campos analisados

à microscopia óptica com aumento de 400x. Houve exclusão da leitura nas áreas com evidência de necrose (Figuras 2, 3)



FIGURA 2 – Reação de TUNEL com 400x de aumento do momento C₍₃₎, mostrando células apoptóticas de coloração acastanhada

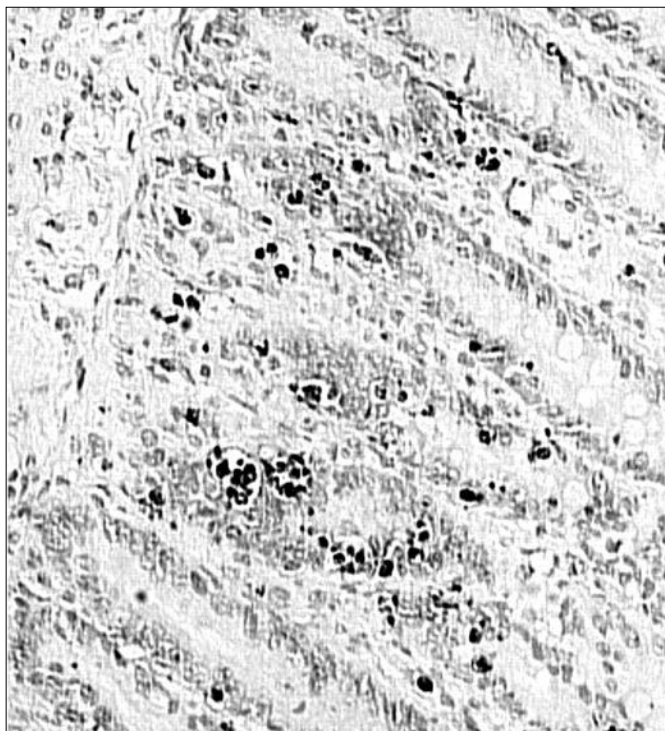


FIGURA 3 – Reação de TUNEL com 400x de aumento do subgrupo Tx(5), mostrando células apoptóticas de coloração acastanhada

Análise estatística

Os dados foram confrontados com a curva de Gauss (curva normal) e classificados em não-paramétricos (para $P < 0,05$).

Os dados foram analisados de duas formas: intragrupo (dentro de cada grupo de estudos) e intergrupo (comparando os grupos em momentos diferentes).

Na análise intragrupo no grupo C foi realizado o teste de Friedman com pós-teste de Muller-Dunn (o mesmo animal em diferentes momentos) e no grupo Tx o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn (animais diferentes em momentos diferentes).

Na análise transversal intergrupo entre os grupos C e Tx foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

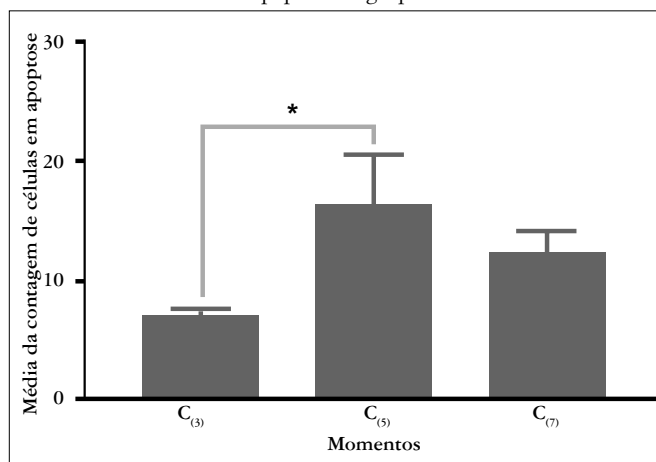
Os dados foram expressos em mediana e percentil 25 e 75.

RESULTADOS

Avaliação da Apoptose

No grupo C – Na análise da apoptose intragrupo entre os três momentos do grupo isotransplante (C₍₃₎, C₍₅₎ e C₍₇₎), houve diferença estatística quanto ao aumento do número de células em apoptose do momento C₍₃₎ para o C₍₅₎. O mesmo não ocorreu do momento C₍₅₎ para C₍₇₎. A contagem das células apoptóticas variou de 4 a 106 células (Gráfico 1).

GRÁFICO 1 - Análise da apoptose do grupo C



* $P < 0,05$

No grupo Tx – Na análise da apoptose intragrupo do grupo Tx entre os subgrupos Tx₍₃₎, Tx₍₅₎ e Tx₍₇₎, houve diferença estatística do subgrupo Tx₍₃₎ para Tx₍₅₎, ocorrendo aumento do número de células apoptóticas. Ocorreu, porém, o inverso do subgrupo Tx₍₅₎ para Tx₍₇₎ com diferença estatística, acarretado pela queda do número de células apoptóticas. E ao comparar o subgrupo Tx₍₃₎ com o Tx₍₇₎, embora o número de células apoptóticas no processo da rejeição seja maior no último subgrupo Tx₍₇₎, não houve diferença estatística entre ambas (Gráfico 2).

Avaliação Intergrupo entre os Grupos C e Tx – Na análise da apoptose intergrupo entre os momentos C₍₃₎, C₍₅₎ e C₍₇₎ e os subgrupos Tx₍₃₎, Tx₍₅₎ e Tx₍₇₎, de forma pareada e transversal, observou-se que em todos os momentos os subgrupos do Tx obtiveram maior número de células em apoptose em relação aos três momentos do grupo C, com diferença estatística marcante, mais acentuada no quinto dia pós-operatório (C₍₅₎ e Tx₍₅₎) (Gráfico 3).

GRÁFICO 2 - Análise da apoptose intragrupo do grupo Tx

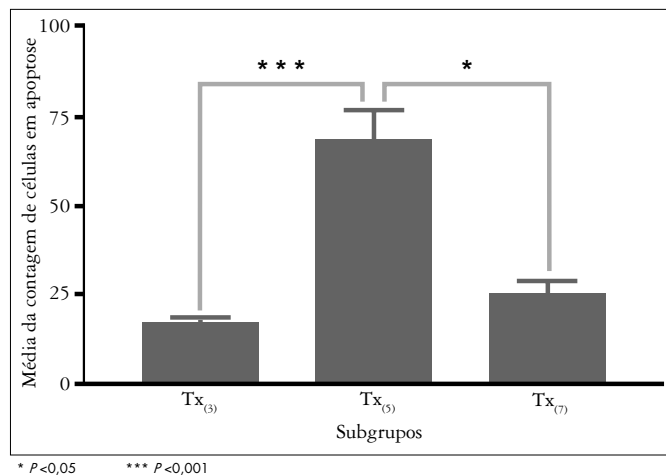
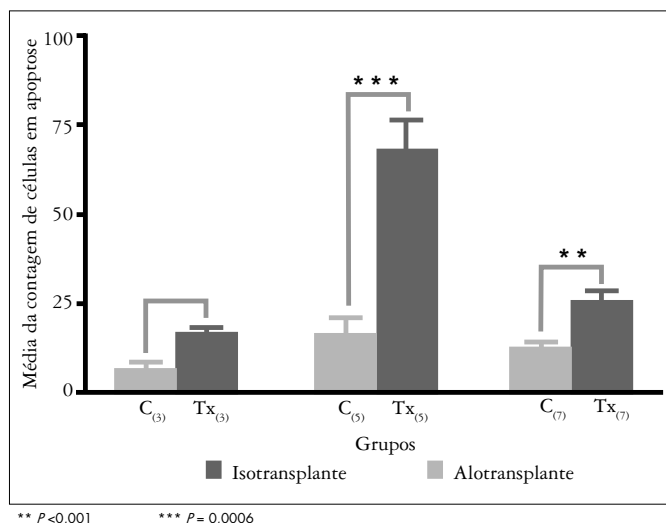


GRÁFICO 3 - Análise transversal da apoptose intergrupo entre os grupos C e Tx



DISCUSSÃO

Observou-se o aumento de células em apoptose do subgrupo C₍₃₎ para C₍₅₎, embora o grupo seja isento do fenômeno da rejeição. Estes dados contrariam os resultados de FAYYAZI et al.⁽¹⁰⁾, que comprovaram no grupo de animais que se submeteram ao isotransplante a não ocorrência do aumento do número de células em apoptose no decorrer do período pós-operatório (PO3 ao PO7), mantendo baixo número de células apoptóticas devido ao fenômeno normal de “turn over” celular dos enterócitos. Mas existem outras variáveis que puderam influir no mecanismo da apoptose em tecido submetido ao isotransplante:

- o mecanismo de isquemia-reperfusão^(27,32,41) se caracteriza pela lesão da mucosa intestinal devido à depressão da atividade mitótica e diminuição do seu metabolismo durante a isquemia fria na solução de preservação a 4°C (tempo do enxerto submerso na solução de preservação). E também pelo aumento de células inflamatórias no intestino reperfundido por provável ativação da adesão de glicoproteínas a neutrófilos ou células endoteliais que

desencadeiam interações celulares, resultando no processo da apoptose. O intestino delgado contém grande reservatório de mediadores que são liberados após perfusão tecidual⁽³²⁾. Esses mediadores incluem metabólitos reativos ao oxigênio, óxido nítrico, adesão dos leucócitos, protease, citocinas. Os metabólitos são produzidos por várias células, incluindo as células endoteliais, neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. Durante a reperfusão tecidual ocorre o estímulo, desencadeando a liberação da cascata do processo inflamatório inespecífico e específico que incluem os linfócitos T e B. Lembrando que as lesões do enxerto intestinal, devido ao mecanismo isquemia-reperfusão, apresentaram-se completamente regeneradas depois de 24 horas da perfusão tecidual⁽³²⁾;

- a lavagem da luz intestinal é importante para a fase de isquemia fria e quente, que é o tempo em que o enxerto intestinal permanece fora da solução de preservação a 4°C, enquanto se realizam as anastomoses vasculares do enxerto ao receptor, pois as enzimas digestivas: (protease pancreática, sal biliar e endotoxinas) têm efeito na patogênese da lesão da mucosa intestinal durante o tempo de isquemia⁽²⁷⁾;
 - o “turn over” da célula da mucosa intestinal é mais rápida em relação a órgãos sólidos e a apoptose é observada com maior frequência nas vilosidades intestinais de tecido normal controle⁽⁴¹⁾;
 - a pressão elevada durante a lavagem da luz intestinal e da perfusão intestinal acarreta lesões no enxerto intestinal^(28, 48, 49);
 - a solução da Universidade de Wisconsin representa a solução de preservação modelo em relação a outras soluções pelo menor risco de lesão tecidual, mesmo em tempo prolongado de preservação^(12, 13).
- Houve aumento expressivo de células em apoptose do subgrupo Tx₍₃₎ para Tx₍₅₎, o que corresponde ao relatado por vários autores^(4,10,47). Esse mecanismo de rejeição associada à apoptose é ainda controverso⁽¹⁰⁾. A apoptose, neste caso, representa a resposta epitelial às alterações causadas pelo fenômeno da rejeição^(4,10). Isto pode corresponder à liberação das citocinas por células imunocompetentes, envolvidas na rejeição. Sabe-se que os linfócitos T-citotóxicos interagem com os antígenos de histocompatibilidade do enxerto intestinal causando lesão da membrana celular e resultando na apoptose.

Ocorreu, porém, decréscimo expressivo do subgrupo Tx₍₅₎ para Tx₍₇₎, diferentemente do encontrado por outros autores^(10,47). FAYAZZI et al.⁽¹⁰⁾ mostrou aumento gradativo de células em apoptose até o nono dia de pós-operatório, depois ocorre o decréscimo do mesmo.

VENNARECCI et al.⁽⁴⁷⁾ observaram aumento do número de células em apoptose até o 15º PO e depois decréscimo progressivo. Esses autores propõem que o aumento do número de células apoptóticas está correlacionado à rejeição leve (grau 1) e moderada (grau 2). Nos casos de rejeição intensa (grau 3) e rejeição crônica, observou-se baixo índice de células apoptóticas por provável necrose e fibrose extensa da mucosa intestinal.

Neste estudo notou-se que no grupo Tx₍₇₎, a maioria se encontra no estágio de rejeição intensa (grau 3) associada à necrose extensa^(3,10), o que provavelmente acarretou a queda do número de células em apoptose.

Estes dados não mostram exatamente controvérsia em relação aos autores citados, mas sim, apenas que neste estudo a rejeição se instalou de modo mais intenso e precoce.

Observou-se nítido aumento de células apoptóticas do grupo Tx em relação ao C em todos os momentos, por provável fenômeno da rejeição que se traduz na apoptose, em concordância com o observado por vários autores^(6, 10, 32, 47).

Portanto, pode-se concluir, dentro das condições de realização desta pesquisa, que a apoptose foi relevante como marcador na fase inicial da rejeição, ocorreu a partir do terceiro dia de pós-operatório e manifestou-se principalmente nas criptas da mucosa intestinal.

Lee ADW, Ribeiro Jr U, Ferreira M, Sesso A, Bresciani CLC, Gama-Rodrigues J. Apoptosis participation in the acute rejection of intestinal transplantation in rats. *Arq Gastroenterol* 2004;41(3):193-8.

ABSTRACT - Background - Intestinal transplantation is a possible treatment for patients with short bowel syndrome, aiming the reintroduction of oral diet. However, the major obstacle in this procedure is the strong rejection. Delay in rejection diagnosis may be irreversible and lethal. **Aim** - To define method for early diagnosis of rejection based on the apoptosis from intestinal allograft. **Material and Methods** - Isogenic rats Brown-Norway (BN) and Lewis (LEW) were submitted to intestinal heterotopic allotransplantation and divided in two groups: LEW donor to LEW recipient isograft group C and BN donor to LEW recipient allograft group (Tx). According to the day of sacrifice, Tx group were subdivided in three subgroups with eight animals each as follow: Tx3- sacrificed at third postoperative day (POD), Tx5 – sacrificed at fifth POD and Tx7 – sacrificed at seventh POD. Eight animals from control group were subdivided in three moments according to the time of biopsy from the graft as follow: C3 – biopsy at third POD; C5 – biopsy at fifth POD and C7 – biopsy at seventh POD. All animals from control group were sacrificed at seventh POD. Rejection parameters were compared between the control groups (C3 vs C5, C3 vs C7 and C5 vs C7, and allograft group (Tx3 vs Tx5, Tx3 vs Tx7 and Tx5 vs Tx7). The same parameters were analyzed between the control group and allograft groups (C3 vs Tx3, C5 vs Tx5 and C7 vs Tx7). In C group no statistical significant difference regarding the expression of the apoptotic cells were detected, while in Tx group, the presence of apoptotic cells were remarkable since the third postoperative day.

HEADINGS – Intestine, small, transplantation. Graft rejection. Apoptosis. Rats.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abu-Elmagd K, Reyes J, Bond G, Mazariegos G, Wu T, Murase N, Sindhi R, Martin D, Colangelo J, Zak M, Janson D, Ezzelarab M, Dvorchik I, Parizhskaya M, Deutsch M, Demetris A, Fung J, Starzl TE. Clinical intestinal transplantation: a decade of experience at a single center. *Ann Surg* 2001;234:404-16.
2. Bakonyi A, Berho M, Ruiz P, Misiakos EP, Carreno M, De Faria W, Sommariva A, Inverardi L, Miller J, Ricordi C, Tzakis AG. Donor and recipient pretransplant conditioning with nonlethal radiation and antilymphocyte serum improves the graft survival in a rat small bowel transplant model. *Transplantation* 2001;72:983-8.
3. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:1208-14.
4. Cagiannos C, Zhong R, Zang Z, Jiang J, Garcia BM, Chakrabarti S, Jevnikar AM, Sinclair NR, Grant DR. Effect of major histocompatibility complex expression on murine intestinal graft survival. *Transplantation* 1998;66:1369-74.
5. Chang KL, Chen YY, Shibata D, Weiss LM. Description of an in situ hybridization methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagn Mol Pathol* 1992;1:246-55.
6. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:126-30.
7. 7º Congresso Brasileiro de Transplante de Órgãos; 2001; Vitória, ES. Anais. Vitória; 2001.
8. Demetris AJ, Murase N, Ye Q, Galvão FH, Richert C, Saad R, Pham S, Duquesnoy RJ, Zeevi A, Fung JJ, Starzl TE. Analysis of chronic rejection and obliterative arteriopathy. Possible contributions of donor antigen-presenting cells and lymphatic disruption. *Am J Pathol* 1997;150:563-78.
9. Dionigi P, Alessiani M, Ferrazi A. Irreversible intestinal failure, nutrition support, and small bowel transplantation nutrition. *Nutrition* 2001;17:747-50.
10. Fayyazi A, Schlemminger R, Gieseler R, Peters JH, Radzun HJ. Apoptosis in the small intestinal allograft of the rat. *Transplantation* 1997;63:947-51.
11. Galvão FH, Waitzberg DL, Lee ADW, Tolosa EMC. Transplante ortotópico de intestino delgado em ratos Wistar. Técnica microcirúrgica e análise da rejeição aguda. In: Anais Congresso Brasileiro de Cirurgia; 1993; Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro; 1993.
12. Galvão FH, Waitzberg D, Logulo A, Soares S, Gonçalves EL. Histological and permeability alterations in cold-stored small bowel: a comparison of University of Wisconsin and Euro-Collins solutions. *Transplant Proc* 1994;26:1496.
13. Galvão FH, Waitzberg DL, Logulo AF, Sementilli A, Rompeno SC, Lima-Gonçalves E. Alterações histopatológicas do intestino delgado após preservação hipotérmica com as soluções da Universidade de Wisconsin e Euro-Collins. Estudo experimental. *Rev Assoc Med Bras* 1995;41:187-92.
14. Galvão FH, Murase N, Todo S, Zeevi A, Ye Q, Doughton CS, Demetris AJ, Waitzberg DL, Fung JJ, Starzl TE. Cytokine profile in graft-versus-host disease after small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1996;28:2455.
15. Galvão FH, Ye Q, Doughton C, Murase N, Todo S, Zeevi A, Waitzberg D, Fung JJ, Starzl TE. Experimental animal model of graft-versus-host disease (GVHD) after small-bowel transplantation: characteristics of the model and application to developing treatment strategies. *Transplant Proc* 1997;29:700.
16. Galvão FH. Novo modelo experimental de doença do enxerto versus hospedeiro após transplante de intestino delgado [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1998.
17. Galvão FHE. Transplante de intestino delgado. In: Waitzberg DL, ed. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000. v. 2, p.1539-50.
18. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
19. Hayashi M, Martinez OM, Krams SM, Burns W, Esquivel CO. Cytokines are involved in the rejection of small intestine allografts. *Transplant Proc* 1997;29:1802.
20. Hayashi M, Martinez OM, Krams SM, Burns W, Esquivel CO. Characterization of allograft rejection in an experimental model of small intestinal transplantation. *J Gastrointest Surg* 1998;2:325-32.
21. Hoffman AL, Makowka L, Banner B, Cai X, Cramer DV, Pascualone A, Todo S, Starzl TE. The use of FK-506 for small intestine allotransplantation. Inhibition of acute rejection and prevention of fatal graft-versus-host disease. *Transplantation* 1990;49:483-90.
22. Kaihara S, Kim SS, Kim BS, Mooney D, Tanaka K, Vacanti JP. Long-term follow-up of tissue-engineered intestine after anastomosis to native small bowel. *Transplantation* 2000;69:1927-32.
23. Kato T, Ruiz P, Thompson JF, Eskind LB, Weppler D, Khan FA, Pinna AD, Nery JR, Tzakis AG. Intestinal and multivisceral transplantation. *World J Surg* 2002;26:226-37.
24. Kim SS, Kaihara S, Benvenuto MS, Choi RS, Kim BS, Mooney DJ, Taylor GA, Vacanti JP. Regenerative signals for intestinal epithelial organoid units transplanted on biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering of small intestine. *Transplantation* 1999;67:227-33.
25. Knoop M, McMahon RF, Jones CJ, Hutchinson IV. Apoptosis in pancreatic allograft rejection-ultrastructural observations. *Exp Pathol* 1991;41:219-24.
26. Kobayashi Y, Galvão FH, Nomoto M, Murase N, Tzakis AG, Starzl TE, Todo S. Influence of graft perfusion pressure on graft viability after small bowel preservation and transplantation. *Transplant Proc* 1996;28:2598-9.
27. Kokudo Y, Itoh M, Mori S, Karasawa Y, Okano K, Yachida S, Ishimura K, Wakabayashi H, Maeba T, Maeta H. Effect of luminal flush on mucosal injury during cold ischemia in the rat small bowel. *Transplant Proc* 1996;28:1841-2.
28. Lee ADW. Estudo da morbidade em transplante ortotópico de intestino delgado em ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.
29. Lee ADW, Gama-Rodrigues J, Galvão FH, Waitzberg DL. Study of morbidity in orthotopic small intestine transplantation with Wistar rats. Experimental study. *Arq Gastroenterol* 2002;39:39-47.
30. Meyer D, Thorwarth M, Otto C, Gasser M, Gassel HJ, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A. Apoptosis as an instrument for immune regulation: study on a liver/small bowel tolerant rat model. *Transplant Proc* 1998;30:2362-3.
31. Monchick GJ, Russell PS. Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery* 1971;70:693-702.
32. Mueller AR, Platz KP, Heckert C, Hausler M, Schuppan D, Lobeck H, Neuhaus P. Differentiation between preservation reperfusion injury and acute rejection after small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1998;30:2657-9.
33. Murase N, Ye Q, Nalesnik MA, Demetris AJ, Abu-Elmagd K, Reyes J, Ichikawa N, Okuda T, Fung JJ, Starzl TE. Immunomodulation for intestinal transplantation by allograft irradiation, adjunct donor bone marrow infusion, or both. *Transplantation* 2000;70:1632-41.
34. Nawas S, Fennel RH. Apoptosis of bile duct epithelial cells in hepatic allograft rejection. *Histopathology* 1994;25:137-xx.
35. Okumura M, Mester M. The coming of age of small bowel transplantation: a historical perspective. *Transplant Proc* 1992;24:1241-2.
36. Olsen S, Burdick JF, Keown PA, Wallace AC, Racusen LC, Solez K. Primary acute renal failure ("acute tubular necrosis") in the transplanted kidney: morphology and pathogenesis. *Medicine* 1989;68:173-87.

37. Pakarinen MP, Halttunen J. The physiology of the transplanted small bowel: an overview with insight into graft function. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:561-77.
38. Reis MM, Higuchi M De L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;83:165-72.
39. Reis MM, Higuchi M De L, Aiello VD, Benvenuti LA. Fatores de crescimento presente no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33:509-18.
40. Reyes J, Green M, Bueno J, Jabbour N, Nalesnik M, Yunis E, Kocoshis S, Kauffman M, Todo S, Starzl TE. Epstein Barr virus associated posttransplant lymphoproliferative disease after intestinal transplantation. *Transplant Proc* 1996;28:2768-9.
41. Shah KA, Shurey S, Green CJ. Apoptosis after intestinal ischemia – reperfusion injury: a morphological study. *Transplantation* 1997;64:1393-7.
42. Su GL, Walgenbach KJ, Heeckt PH, Wang Q, Halfter W, Waitside TL, Bauer AJ. Increased expression of interferon-gama in a rat model of chronic intestinal allograft rejection. *Transplantation* 1996;62:242-8.
43. Tolosa EM, Goffi FS, Behmer OA, Fujimura I, Lemos PC, Freitas-Neto AG, Nakashima Y. Homologous transplantation of the small intestine in dogs. Histological evaluation of rejection. *AMB Rev Assoc Med Bras* 1971;17:303-6.
44. Toogood GJ, Rankin AM, Tam PK, Morris PJ, Dallman MJ. The immune response following small bowel transplantation. I. An unusual pattern of cytokine expression. *Transplantation* 1996;62:851-5.
45. Toogood GJ, Rankin AM, Tam PKH, Morris PJ, Dallman MJ. The immune response following small bowel transplantation. II. A very early cytokine response in the gut-associated lymphoid tissue. *Transplantation* 1997;63:1118-23.
46. Toyama N, Kobayashi E, Kiyozaki H, Mori Y, Miyata M. Lethal hyperacute rejection following small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1994;26:1527.
47. Vennarecci G, Berho M, Sommariva A, Neto AB, Misiakos EP, Inverardi L, Ruiz P, Ricordi C, Tzakis AG. Apoptosis and rejection in rat intestinal transplantation: correlation with FK506 doses and donor specific bone marrow infusions. *Transplantation* 2001;71:1718-24.
48. Zhong R, Wang P, Chen H, Sutherland F, Duff J, Grant D. Surgical techniques for orthotopic intestinal transplantation in the rats. *Transplant Proc* 1990;22:2443-4.
49. Zhong R, Grant D, Sutherland F, Wang PZ, Chen HF, Lo S, Stiller C, Duff J. Refined technique for intestinal transplantation in the rat. *Microsurgery* 1991;12:268-74.

Recebido em 1/8/2003.
Aprovado em 28/11/2003.