

MARIANE TAMI AMANO

**O PAPEL DA HEME OXIGENASE-1 NA
MODULAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS
LEVANDO À PROTEÇÃO DA LESÃO POR
ISQUEMIA E REPERFUSÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Niels Olsen Saraiva Câmara

Versão original

São Paulo
2011

RESUMO

Amano MT. O papel da heme oxigenase-1 na modulação de células dendríticas levando à proteção da lesão por isquemia e reperfusão [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A insuficiência renal aguda (IRA) atinge um grande número de pacientes hospitalizados e sua principal causa é a lesão de isquemia e reperfusão (IR). Algumas evidências recentes mostram a participação de linfócitos T CD4⁺ e células dendríticas (DC) no desenvolvimento da lesão por IR. Entretanto, os mecanismos efetores envolvidos na participação destas células ainda não estão claros, o que dificulta o desenvolvimento de estratégias para diminuir a lesão tecidual. Estudos mostram que a enzima heme oxigenase-1, responsável pela quebra de heme em subprodutos, está relacionada à diminuição de respostas inflamatórias, como na IRA. No entanto, pouco se sabe sobre a participação de linfócitos T e DC neste modelo. Neste trabalho visamos investigar mais a fundo o papel do linfócito T CD4⁺ e DC na lesão renal e a possível participação destas células na proteção da lesão por IR induzida pela HO-1. Para realizar este estudo, injetamos em camundongos a protoporfirina Hemin, um indutor de HO-1, e realizamos a IR. A lesão renal foi avaliada pelos níveis de uréia e creatinina no soro. Para ver a expressão gênica de citocinas utilizamos o RT-PCR quantitativo e a dosagem de proteínas foi feita por bioplex. A fenotipagem celular foi feita por FACS. Observamos que a indução HO-1 levou à proteção da lesão por IR, acompanhada da diminuição das quimiocinas MCP-1 e RANTES. Confirmamos o envolvimento de linfócitos T CD4⁺ na lesão por IR utilizando animais deficientes deste tipo celular, e vimos *in vitro* a inibição de proliferação de linfócitos CD4⁺ na presença do Hemin. A diminuição de INF-g em animais tratados com Hemin sugeriu uma menor ativação de linfócitos T. Embora a transferência de esplenócitos tratados com Hemin tenha conferido proteção a animais CD4 deficientes, a transferência de células CD4⁺ purificadas tratadas com Hemin não apresentou diferença. Confirmamos então a participação de DC na IR com animais depletados das mesmas e a sua modulação por Hemin *n vitro*. Observamos que o tratamento com Hemin *in vivo* alterou o fenótipo das DC após a reperfusão, apresentando mais CD86 e menos CD80. Por ser a principal célula produtora de TNF-a nesta lesão, verificamos os níveis de TNF-a e a expressão local da mesma e em ambos os casos o tratamento com Hemin suprimiu a produção de TNF-a. Em conjunto, concluímos que há proteção associada à HO-1, que não envolve linfócitos T diretamente, mas é capaz de modular a resposta inflamatória de DC, levando a uma menor produção de TNF-a.

Palavras- chave: Isquemia. Rim. Células dendríticas. Linfócitos T. Imunossupressão. Citocinas.

ABSTRACT

Amano MT. The role of heme oxygenase-1 in dendritic cells modulation leading to ischemia and reperfusion injury protection [Ph.D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The acute kidney injury (AKI) reaches a large number of patients in hospitals and it is mainly caused by ischemia and reperfusion (IR). Some recent evidences have shown the role of CD4⁺ T cells and dendritic cells (DC) in the IR injury development. However, the effectors mechanisms involved in the participation of these cells are still not clear, which makes more difficult the development of strategies to diminish the tissue damage. Studies have shown that the heme oxygenase-1 enzyme, responsible for breaking heme in byproducts, is associated to a decrease in inflammatory responses, as in AKI. Besides, little is known about the involvement of T cells and DC in this model. In this work, we aim to further investigate the role of CD4⁺ T cells and DC in renal injury and the possible role of these cells in the IR injury protection induced by HO-1. To perform this study, we injected in mice the protoporphyrin Hemin, a HO-1 inducer, and we did the IR. The renal injury was evaluated by serum levels of urea and creatinine. To analyze cytokines gene expression we used quantitative RT-PCR and proteins dosage was done by bioplex. Cell phenotyping was performed by FACS. We observed that HO-1 induction lead to IR injury protection combined with MCP-1 na RANTES chemokines decrease. We confirmed the CD4⁺ T cell involvement in IR injury using T cell deficient animals, and we saw *in vitro*, the proliferation inhibition of CD4⁺ T cells in Hemin presence. The IFN-g decrease in Hemin treated animals suggested less T cells activation. Although the transfer of hemin treated splenocytes had conferred protection to CD4 deficient mice, the transfer of hemin treated CD4⁺ purified cells did not differ from the other group. We confirmed the role of DC in IR with depleted mice and its modulation by Hemin *in vitro*. We observed that Hemin treatment *in vivo* altered the DC phenotype after reperfusion, presenting CD86 increase and CD80 decrease. Because DC is the main source of TNF-a in this lesion, we verified TNF-a levels and its local gene expression, and in both cases Hemin treatment suppressed TNF-a production. Taken together these results, we concluded that there is a protection associated to HO-1, which do not involves T cells directly, but is able to modulate DC inflammatory response, leading to lower TNF-a production.

Keywords: Ischemia. Kidney. Dendritic cells. T cells. Immunosuppression. Cytokines.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesão Renal Aguda Induzida por Isquemia e Reperfusão

A lesão por isquemia e reperfusão (IR) se desenvolve a partir da interrupção do fluxo sanguíneo e conseqüente privação do suprimento de oxigênio para o rim [1]. É considerada a principal causa de insuficiência renal aguda (IRA). Embora os estudos sobre a IR tenha aumentado nas últimas décadas, pouco se mudou nos dados estatísticos dos hospitais com relação à IRA. Nos últimos 50 anos, as taxas de mortalidade de pacientes com IRA mantiveram-se semelhantes, em torno de 50% [2]. A IRA isquêmica está associada à falência de múltiplos órgãos e também à sepse [3], o que dificulta ainda mais o tratamento. A IRA pode prolongar a estadia de pacientes no hospital, o que conseqüentemente leva ao aumento de custos, mortalidade e morbidade [4].

No transplante renal (TxR), o órgão é inevitavelmente isquemiado e reperfundido. Na prática clínica, a forma mais comum de avaliar a extensão da lesão de IR é através da incidência de necrose tubular aguda pós TxR, que pode ser definida como a perda de função imediata do rim transplantado, levando à necessidade de diálise logo na primeira semana após a cirurgia, sendo também em alguns casos um importante fator da perda do enxerto a longo prazo [5, 6].

A patofisiologia da lesão renal aguda por IR pode ser explicada pelas seguintes etapas [3, 4]:

- 1- **INÍCIO:** Durante a isquemia, ocorre uma depleção de ATP que leva à quebra da homeostase de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} nas células do túbulo proximal, afetando a reabsorção de nutrientes e levando ao acúmulo de metabólitos fosfolipídicos, desfosforilação, redistribuição e agregação generalizada de proteínas.
- 2- **DURANTE:** A queda de ATP também leva à perda da polaridade das células no epitélio do túbulo proximal, ocorrendo perda das microvilosidades da borda em escova, acompanhada de morte celular, por necrose e apoptose. Além disso, há uma maior geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Nesta fase inicial também ocorre uma intensa vasoconstrição, acompanhada da diminuição de vasodilatadores. Há aumento de moléculas de adesão como a

intercelular-1 (ICAM-1), P-selectina e E-selectina no endotélio, acompanhado de uma infiltração de neutrófilos e monócitos. Citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- α são expressas logo após a isquemia, bem como proteínas do sistema complemento como C5a, que age como fator quimiotático de neutrófilos e monócitos. Outras quimiocinas (MCP-1, IL-8, RANTES e CXCR3) também estão associadas ao complexo processo que decorre da isquemia, indicando uma resposta inflamatória.

- 3- **REPARO:** Em um momento mais tardio há a remoção de restos apoptóticos e ocorre a diferenciação de células viáveis, que neste caso não apresentam as microvilosidades, mas são capazes de proliferar para então sofrerem nova diferenciação e reconstituir o epitélio normal (**Figura 1**).

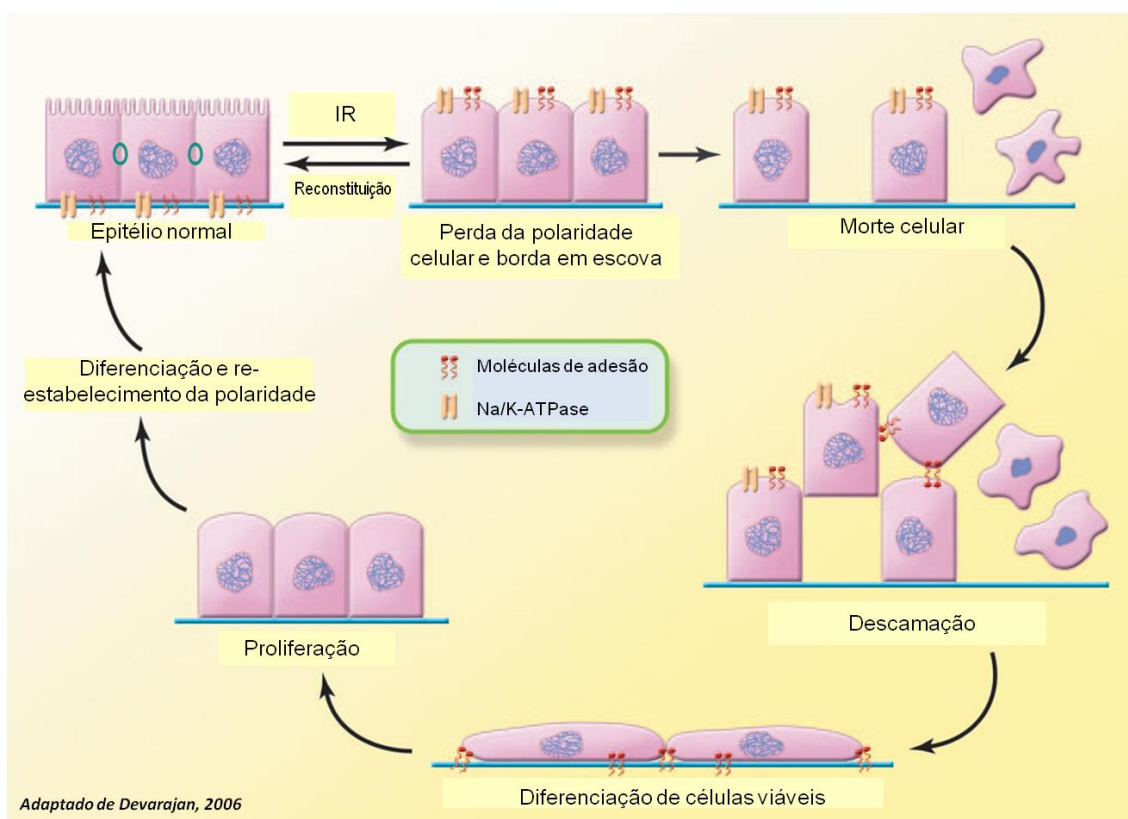


Figura 1. Alterações da estrutura celular do túbulo proximal após IR. O rim é submetido à isquemia e as células do túbulo sofrem despolarização e perda das microvilosidades da borda em escova. Em casos de insulto leve, pode haver reconstituição imediata. Em insultos graves, há morte celular por apoptose ou necrose, descamação para retirada de restos celulares, diferenciação de células viáveis, proliferação celular e diferenciação para reconstituição do epitélio.

1.2 O Sistema Imune na IR Renal

A hipóxia leva à inflamação rins isquemiados. A resposta inflamatória começa durante a isquemia e é acelerada durante a reperfusão com ativação endotelial, aumento da expressão de citocinas, quimiocinas, ativação de complemento e recrutamento de leucócitos [7]. Estes, ao se aderirem, liberam ERO, que por sua vez pode levar à indução de ligantes de Toll-like receptors (TLRs) endógenos como *heat shock protein* (HSP), ácido hialurônico e fibronectina [8]. A expressão de TLRs é aumentada após a IR, bem como a expressão da HSP 70 que é um ligante de TLR2 e TLR4 [9]. Além disso, animais deficientes de TLR2 e a inibição da síntese do mesmo levam à proteção da lesão por IR [10]. Animais TLR4 deficientes também apresentaram proteção na lesão por IR de forma MyD88 dependente e TRIF independente [11]. Na clínica, observou-se que TLR4 é constitutivamente expresso em todos os rins doados, mas esta expressão é aumentada em órgãos de doadores falecidos [12]. Uma vez que a ativação de TLRs induz a maturação de DC, estes trabalhos sugerem a participação da imunidade inata interligando a imunidade adaptativa neste modelo de lesão. Além de TLRs, o sistema complemento também faz parte da imunidade inata e parece contribuir fortemente no processo inflamatório que leva à injúria renal induzida pela isquemia. O fragmento C5a é um poderoso fator quimiotático de neutrófilos, monócitos e linfócitos T. No rim, ele é continuamente expresso por células tubulares renais e macrófagos [13] e tem sua expressão aumentada após a IR. Além disso, a inibição de C5a pelo uso de anticorpos monoclonais leva à proteção da lesão [14]. A via das lectinas também parece estar envolvida no processo de lesão por IR, pois a isquemia leva ao aumento de deposição de MBL no rim, seguida de deposição de C3, C6 e C9 [15]. Além da participação de proteínas do complemento, outros componentes solúveis estão envolvidos no processo de lesão por IR, como as citocinas e quimiocinas. Citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina (IL)-6 e IL-1 β , e quimiocinas como MCP-1, IL-8 e "*regulated on activation normal T cell expressed and secreted*" (RANTES) são aumentadas após a IR [16].

As primeiras células a serem associadas à lesão por IR foram os neutrófilos. Por serem células de rápida migração ao tecido inflamado, era esperado encontrar um grande infiltrado deste tipo celular após a IR. No entanto, sua participação na

lesão é controversa. Coelhos e ratos depletados de neutrófilos não apresentaram nenhuma proteção [17, 18]. Por outro lado, outros grupos observaram um papel fundamental dos neutrófilos após IR na produção de IFN-g, IL-17 e na regulação de NKT [19, 20]. Já as células NK parecem participar principalmente da indução de apoptose neste modelo. Além do aumento deste tipo celular nos rins após IR, há também o aumento da expressão da molécula Rae-1 que interage com NKGD2 promovendo a citotoxicidade [21], além disso, animais depletados de NK foram protegidos da lesão por IR [22]. Linfócitos B também estão, de certa forma, envolvidos na injúria por IR, uma vez que animais deficientes de linfócitos B são protegidos [23]. No entanto, a transferência adotiva de linfócitos B para animais BKO não restaura a lesão [23]. Sabe-se apenas que linfócitos B limitam o reparo tecidual [24].

Monócitos e macrófagos estão presentes em rins pós-isquemia [25, 26]. A migração de monócitos neste modelo é dependente dos receptores de quimiocinas CCR2 e CX3CR1 [26]. A expressão das citocinas IL-6, TNF- α , IL-1 β e TGF- β no rim são dependentes de macrófagos [27, 28], porém o aumento da expressão de IL-10 também, o que sugere que estas células tenham um papel na regeneração [29].

Assim, notamos que uma complexidade de eventos acontece durante a isquemia e a reperfusão que culminam na lesão renal aguda. A dependência de vários tipos celulares e moléculas solúveis, mostra que se trata de um sistema interligado e não de uma única via de ativação para a lesão.

1.3 Linfócitos na IR Renal

Inicialmente, a patogênese renal decorrente da lesão por IR tinha como foco principal a participação dos neutrófilos [30]. No entanto, há evidências de que o linfócito T possui um papel nesse modelo, pois estudos

mostram que essa célula participa do processo inflamatório da lesão por IR em outros órgãos como fígado [31], pulmão [32] e intestino [33]. Além disso, observou-se a presença de linfócitos em rins humanos pós IR [34] e que o bloqueio da via de co-estimulação CD28-B7 diminui a disfunção renal após IR em ratos [35, 36]. Também foi observado aumento de expressão de moléculas de adesão de leucócitos CD11/CD18 [18] e da ICAM-1 [37-39], e a produção de citocinas relacionadas a linfócitos na IRA [40-43] em camundongos.

Nosso grupo demonstrou que animais depletados de linfócitos T CD4⁺, tanto animais MHC classe II KO, quanto camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti-CD4⁺, GK1.5, apresentaram melhor recuperação da função renal após a IR, comparados com animais C57Bl/6 isquemiados [44]. De forma inversa, a transferência de linfócitos T CD4⁺ em animais atímicos (*nude*), que são protegidos da lesão por IR, restaurou o fenótipo de lesão, evidenciando a participação destas células na IRA. No entanto, a transferência de linfócitos T CD4⁺, deficientes de CD28 ou incapazes de produzir a IFN-g, não foram capazes de restaurar tal fenótipo [45].

Embora alguns estudos [46, 47] indiquem uma associação entre a resposta Th1 e o desenvolvimento da lesão após IR, ainda não está claro se o mecanismo envolvido depende da ação dos linfócitos ou das citocinas. Outro questionamento seria qual antígeno endógeno estaria primando estas células.

Schackleton já em 1998 mostrou que linfócitos T CD4⁺ eram auto-reativos após a lesão de IR, ou seja, quando incubados com células tubulares pré-ativadas com IFN-g proliferavam [48].

Outro dado importante foi publicado por Savransky et al., onde animais deficientes para as cadeias α/β ou γ/δ do TCR eram parcialmente protegidos da lesão de IR, ainda que a produção de IFN-g não tenha sido diferente [49]. Além disso, a transferência de linfócitos TCR específico para OVA (DO11.10), para animais *nude* que normalmente são protegidos, levou ao aumento de lesão e células de animais OVA transgênicos com fundo genético RAG KO, levaram a uma pior lesão em comparação com as células dos animais apenas transgênicos para OVA, o que indica uma dependência de TCR, mas não uma especificidade [50].

Recentemente, foi relatada a participação de linfócitos T CD4⁺ no controle da lesão, pela atuação de Tregs [51-53]. A transferência deste tipo celular em animais selvagens levou à melhora da lesão por IR [53], enquanto animais deficientes de Treg apresentaram piora na lesão [52].

O conjunto desses dados indica a contribuição de linfócitos T CD4⁺ no desenvolvimento e controle da lesão por IR, confirmando mais uma vez a complexidade da série de eventos envolvidos.

1.4 Células Dendríticas na IR Renal

Células dendríticas são células derivadas de monócitos, e consideradas células apresentadoras de antígeno (APC) sendo de grande importância para a ativação de linfócitos [54]. Na forma imatura, as DCs apresentam alta capacidade de fagocitose, baixa expressão de MHC de classe II e proteínas co-estimulatórias e baixa capacidade de estimular proliferação de linfócitos T. Após a maturação, essas características tornam-se opostas [54]. Os sinais que levam a maturação das DCs e ativam a resposta de linfócitos T, derivam de produtos de lesão tecidual. Na ausência destes estímulos, as DCs atuam como controladoras da tolerância imune induzindo células reguladoras [55].

As DCs renais apresentam expressão de MHC classe II e proteínas co-estimulatórias, e estão localizadas no interstício peritubular, onde ficam em contato com o epitélio e capilares peritubular [56]. Embora a especificidade de antígenos dos linfócitos T ainda não tenha sido determinada, sabe-se que o bloqueio dos ligantes CD80/CD86 diminui a IRA [35]. Wu et al. [57] sugeriram que a indução da lesão por IR era capaz de aumentar o número de DC derivadas de células mononucleares de sangue periférico e a expressão de moléculas MHC de classe II no modelo de IR em ratos. Além disso, essas células seriam capazes de produzir mais IL-12 *in vitro* e de ativar melhor os linfócitos T levando à maior produção de IFN- γ . O mesmo grupo [57] também mostrou que ratos submetidos à IR renal apresentavam menor diferenciação de DC derivadas de células da medula óssea, mas a capacidade de ativação destas DC não era alterada. Estes trabalhos mostram uma influência sistêmica

da lesão por IR. Além de influenciar DC de maneira sistêmica, a lesão por IR também atua sobre células intra-renais. Dong et al. [58] mostraram que a IR unilateral era capaz de aumentar a ativação de linfócitos T mediada por DC nos linfonodos renais, tanto no linfonodo do lado isquemiado, quanto no lado não isquemiado, mais uma vez mostrando a influência sistêmica e o envolvimento de DC renais na ativação de linfócitos T CD4⁺. Também demonstraram que as DCs renais fagocitam partículas filtradas e não filtradas da circulação e migram do rim para o linfonodo [58]. Este mesmo grupo, caracterizou as DC renais em CD11c⁺F4/80⁺ e CD11c⁺F4/80⁻, dentre elas, o primeiro grupo apresenta expressão elevada de moléculas de ativação (MHC II, CD80, CD86 e CD40) e das proteínas IL-6, MCP-1 e RANTES após IR e são as principais células produtoras de TNF- α no rim nesta lesão [59].

Desta forma, a IR parece levar as DC a um perfil ativado pró-inflamatório, possivelmente, orquestrando a ativação de outras células.

1.5 Heme-Oxigenase-1 na IR

A HO-1 é uma enzima cliva pontes de carbono da molécula heme na dependência de oxigênio e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), levando à produção de biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro [60]. Existem 3 isoformas de heme oxigenase: HO-1, HO-2 e HO-3, no entanto, só a primeira é induzível [61]. Os estímulos capazes de induzir a HO-1, que é uma HSP32, são diversos estímulos, dentre eles a hipóxia, endotoxinas e ERO. O papel protetor da HO-1 pode ser uma combinação de ações que envolvem a redução de heme livre, considerado tóxico, e a produção de moléculas protetoras (biliverdina, CO e ferro) [62]. Acredita-se que a molécula Heme livre possa gerar uma resposta inflamatória moderada seguida de uma resposta regulatória atribuída à ação de HO-1 [63].

Biliverdina é convertida pela biliverdina redutase à bilirrubina. Esta age como potente antioxidante sendo um dos principais no soro [64]. Bilirrubina também está associada ao aumento de Treg e promove maior aceite em

modelo alogênico [65]. Na IR renal, a injeção de bilirrubina leva à proteção da lesão renal [66].

Embora o CO seja conhecido por ser um gás tóxico a certas concentrações na atmosfera, também tem um papel anti-oxidante, capaz de estimular genes anti-oxidantes e apresentar efeitos anti-apoptóticos [67]. Exatamente por ser tóxico em altas quantidades, o uso terapêutico deste produto torna-se limitado. Para tanto, Motterlini desenvolveu componentes que liberam CO (CORMs). Um dos tipos de CORM (CORM-2) levou à proteção da lesão da IR hepática, acompanhada da diminuição de TNF- α e IL-6 [68]. A inibição de HO-1 com a posterior adição de CORM foi capaz de levar à proteção da lesão por IR renal, indicando um papel de proteção de CO independente da ação da HO-1 [69].

O ferro também é um potente antioxidante, mas esta ação é mais eficaz se o mesmo se encontra desligado do anel de heme. A ferritina é uma proteína capaz de sequestrar ferro, retirando-o da molécula heme. Viu-se que a adição de ferritina levou à proteção da lesão por IR renal [70], corroborando mais uma vez os dados de proteção pela HO-1.

Tullius et al.,[71] mostraram que com uma única dose (5 mg/mL) intraperitoneal de outra porfirina indutora de HO-1: cobalto de protoporfirina IX (CoPPIX), ratos eram protegidos da lesão pós IR com menor expressão de TNF- α , IFN- γ e bcl-x e maior infiltração de monócitos/macrófagos e linfócitos T CD8+. Nosso grupo demonstrou a proteção por CoPPIX no modelo de lesão por IR e pela toxicidade da droga ciclosporina em camundongos [72]. A metaloporfirina sintética Hemin é capaz de aumentar a expressão de HO-1 e conseqüentemente apresentar uma ação citoprotetora, anti-inflamatória e anti-apoptótica em diversos modelos. Na lesão renal aguda induzida por IR, o Hemin teve um papel protetor, apresentando níveis de creatinina, uréia e malonaldeído similares ao controle [73]. No modelo de lesão renal crônica induzida por IR também foi amenizada, apresentando menor proteinúria, albuminúria, inflamação e proteínas pró-fibróticas [74]. Estes estudos sugerem a aplicação do hemin como um bom indutor de HO-1 para possível uso terapêutico.

A lesão de IR é o principal fator etiológico da necrose tubular aguda pós-transplante, e leva a menor sobrevida do enxerto, a curto e longo-prazo, além de ser a principal causa da IRA. Portanto, o entendimento dos mecanismos da lesão por IR é crucial para o desenvolvimento de terapias. Os linfócitos T CD4⁺ e as células dendríticas desempenham um papel importante nesta fisiopatogenia e são moduláveis em diversos modelos de lesão. Nossa hipótese é de que o aumento da HO-1 seja capaz de inibir a ativação de linfócitos T CD4⁺ ou das DC, levando à menor lesão induzida por IR.

6 CONCLUSÃO

No modelo de IR renal as DC participam do desenvolvimento da lesão renal, contribuindo com a produção de TNF- α . Na indução da HO-1, a lesão pode ser amenizada através da modulação das DC renais que passam a ser menos ativadas e a produzir menos TNF- α , podendo afetar de maneira generalizada outras células para um perfil mais protetor.

REFERÊNCIAS

- [1] Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int.* 2004 Aug;66(2):480-5.
- [2] Ympa YP, Sakr Y, Reinhart K, Vincent JL. Has mortality from acute renal failure decreased? A systematic review of the literature. *Am J Med.* 2005 Aug;118(8):827-32.
- [3] White LE, Hassoun HT. Inflammatory Mechanisms of Organ Crosstalk during Ischemic Acute Kidney Injury. *International Journal of Nephrology.* 2012:505197.*in press.*
- [4] Urbschat A, Obermuller N, Haferkamp A. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers.* 2011 Jul;16 Suppl 1:S22-30.
- [5] Cecka JM, Cho YW, Terasaki PI. Analyses of the UNOS Scientific Renal Transplant Registry at three years--early events affecting transplant success. *Transplantation.* 1992 Jan;53(1):59-64.
- [6] Paul LC. Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int.* 1999 Sep;56(3):783-93.
- [7] Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany).* 2009 Sep;87(9):859-64.
- [8] Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation.* 2005 Mar 15;79(5):505-14.
- [9] Kim BS, Lim SW, Li C, Kim JS, Sun BK, Ahn KO, et al. Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. *Transplantation.* 2005 May 27;79(10):1370-7.
- [10] Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest.* 2005 Oct;115(10):2894-903.
- [11] Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, Hall FW, Kiosses WB, Tobias PS, et al. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol.* 2007 May 15;178(10):6252-8.
- [12] Kruger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS, et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 3;106(9):3390-5.
- [13] Huang Y, Rabb H, Womer KL. Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses. *Cellular immunology.* 2007 Jul;248(1):4-11.
- [14] Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y, et al. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2000 May;105(10):1363-71.
- [15] de Vries B, Walter SJ, Peutz-Kootstra CJ, Wolfs TG, van Heurn LW, Buurman WA. The mannose-binding lectin-pathway is involved in complement activation in the course of renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2004 Nov;165(5):1677-88.

- [16] Ramesh G, Reeves WB. Inflammatory cytokines in acute renal failure. *Kidney Int Suppl.* 2004 Oct(91):S56-61.
- [17] Thornton MA, Winn R, Alpers CE, Zager RA. An evaluation of the neutrophil as a mediator of in vivo renal ischemic-reperfusion injury. *Am J Pathol.* 1989 Sep;135(3):509-15.
- [18] Rabb H, Mendiola CC, Dietz J, Saba SR, Issekutz TB, Abanilla F, et al. Role of CD11a and CD11b in ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol.* 1994 Dec;267(6 Pt 2):F1052-8.
- [19] Li L, Huang L, Sung SS, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, et al. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol.* 2007 May 1;178(9):5899-911.
- [20] Li L, Huang L, Vergis AL, Ye H, Bajwa A, Narayan V, et al. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2010 Jan;120(1):331-42.
- [21] Feng L, Cheng F, Ye Z, Li S, He Y, Yao X, et al. The effect of renal ischemia-reperfusion injury on expression of RAE-1 and H60 in mice kidney. *Transplant Proc.* 2006 Sep;38(7):2195-8.
- [22] Zhang PL, Rothblum LI, Han WK, Blasick TM, Potdar S, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. *Kidney Int.* 2008 Mar;73(5):608-14.
- [23] Burne-Taney MJ, Ascon DB, Daniels F, Racusen L, Baldwin W, Rabb H. B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol.* 2003 Sep 15;171(6):3210-5.
- [24] Jang HR, Gandolfo MT, Ko GJ, Satpute SR, Racusen L, Rabb H. B cells limit repair after ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Apr;21(4):654-65.
- [25] Ysebaert DK, De Greef KE, Vercauteren SR, Ghielli M, Verpooten GA, Eyskens EJ, et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2000 Oct;15(10):1562-74.
- [26] Li L, Huang L, Sung SS, Vergis AL, Rosin DL, Rose CE, Jr., et al. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 2008 Dec;74(12):1526-37.
- [27] Jo SK, Sung SA, Cho WY, Go KJ, Kim HK. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2006 May;21(5):1231-9.
- [28] Day YJ, Marshall MA, Huang L, McDuffie MJ, Okusa MD, Linden J. Protection from ischemic liver injury by activation of A2A adenosine receptors during reperfusion: inhibition of chemokine induction. *American Journal of Physiology.* 2004 Feb;286(2):G285-93.
- [29] Vinuesa E, Hotter G, Jung M, Herrero-Fresneda I, Torras J, Sola A. Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischaemia/reperfusion injury. *J Pathol.* 2008 Jan;214(1):104-13.

- [30] Rabb H, O'Meara YM, Maderna P, Coleman P, Brady HR. Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 1997 May;51(5):1463-8.
- [31] Martin M, Mory C, Prescher A, Wittekind C, Fiedler M, Uhlmann D. Protective effects of early CD4(+) T cell reduction in hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Gastrointest Surg.* 2010 Mar;14(3):511-9.
- [32] Yang Z, Sharma AK, Linden J, Kron IL, Laubach VE. CD4+ T lymphocytes mediate acute pulmonary ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 2009 Mar;137(3):695-702.
- [33] Shigematsu T, Wolf RE, Granger DN. T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation.* 2002 Apr;9(2):99-109.
- [34] Solez K, Morel-Maroger L, Sraer JD. The morphology of "acute tubular necrosis" in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model. *Medicine (Baltimore).* 1979 Sep;58(5):362-76.
- [35] Chandraker A, Takada M, Nadeau KC, Peach R, Tilney NL, Sayegh MH. CD28-b7 blockade in organ dysfunction secondary to cold ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 1997 Dec;52(6):1678-84.
- [36] Takada M, Chandraker A, Nadeau KC, Sayegh MH, Tilney NL. The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 1997 Sep 1;100(5):1199-203.
- [37] Kelly KJ, Williams WW, Jr., Colvin RB, Bonventre JV. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jan 18;91(2):812-6.
- [38] Kelly KJ, Williams WW, Jr., Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest.* 1996 Feb 15;97(4):1056-63.
- [39] Rabb H, Mendiola CC, Saba SR, Dietz JR, Smith CW, Bonventre JV, et al. Antibodies to ICAM-1 protect kidneys in severe ischemic reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jun 6;211(1):67-73.
- [40] Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest.* 1997 Jun 1;99(11):2682-90.
- [41] Goes N, Urmson J, Vincent D, Halloran PF. Acute renal injury in the interferon-gamma gene knockout mouse: effect on cytokine gene expression. *Transplantation.* 1995 Dec 27;60(12):1560-4.
- [42] Goes N, Urmson J, Ramassar V, Halloran PF. Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. Evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-10. *Transplantation.* 1995 Feb 27;59(4):565-72.

- [43] Lemay S, Rabb H, Postler G, Singh AK. Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 2000 Mar 15;69(5):959-63.
- [44] Pinheiro HS, Camara NO, Noronha IL, Maugeri IL, Franco MF, Medina JO, et al. Contribution of CD4+ T cells to the early mechanisms of ischemia- reperfusion injury in a mouse model of acute renal failure. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*. 2007 Apr;40(4):557-68.
- [45] Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, et al. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest*. 2001 Nov;108(9):1283-90.
- [46] Yokota N, Burne-Taney M, Racusen L, Rabb H. Contrasting roles for STAT4 and STAT6 signal transduction pathways in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Aug;285(2):F319-25.
- [47] Marques VP, Goncalves GM, Feitoza CQ, Cenedeze MA, Fernandes Bertocchi AP, Damiao MJ, et al. Influence of TH1/TH2 switched immune response on renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2006;104(1):e48-56.
- [48] Shackleton CR, Ettinger SL, McLoughlin MG, Scudamore CH, Miller RR, Keown PA. Effect of recovery from ischemic injury on class I and class II MHC antigen expression. *Transplantation*. 1990 Mar;49(3):641-4.
- [49] Savransky V, Molls RR, Burne-Taney M, Chien CC, Racusen L, Rabb H. Role of the T-cell receptor in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*. 2006 Jan;69(2):233-8.
- [50] Satpute SR, Park JM, Jang HR, Agreda P, Liu M, Gandolfo MT, et al. The role for T cell repertoire/antigen-specific interactions in experimental kidney ischemia reperfusion injury. *J Immunol*. 2009 Jul 15;183(2):984-92.
- [51] Monteiro RM, Camara NO, Rodrigues MM, Tzelepis F, Damiao MJ, Cenedeze MA, et al. A role for regulatory T cells in renal acute kidney injury. *Transplant Immunology*. 2009 May;21(1):50-5.
- [52] Kinsey GR, Sharma R, Huang L, Li L, Vergis AL, Ye H, et al. Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Aug;20(8):1744-53.
- [53] Gandolfo MT, Jang HR, Bagnasco SM, Ko GJ, Agreda P, Satpute SR, et al. Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. *Kidney Int*. 2009 Oct;76(7):717-29.
- [54] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
- [55] Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med*. 1999 Feb 15;189(4):611-4.
- [56] Kaissling B, Le Hir M. Characterization and distribution of interstitial cell types in the renal cortex of rats. *Kidney Int*. 1994 Mar;45(3):709-20.

- [57] Wu CJ, Sheu JR, Chen HH, Liao HF, Yang YC, Yang S, et al. Renal ischemia/reperfusion injury inhibits differentiation of dendritic cells derived from bone marrow monocytes in rats. *Life Sci*. 2006 Feb 2;78(10):1121-8.
- [58] Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Antigen presentation by dendritic cells in renal lymph nodes is linked to systemic and local injury to the kidney. *Kidney Int*. 2005 Sep;68(3):1096-108.
- [59] Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*. 2007 Feb 21.
- [60] Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968 Oct;61(2):748-55.
- [61] Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem*. 1986 Jan 5;261(1):411-9.
- [62] Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:323-54.
- [63] Soares MP, Marguti I, Cunha A, Larsen R. Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work? *Current Opinion in Pharmacology*. 2009 Aug;9(4):482-9.
- [64] Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25):16093-8.
- [65] Rocuts F, Zhang X, Yan J, Yue Y, Thomas M, Bach FH, et al. Bilirubin promotes de novo generation of T regulatory cells. *Cell Transplantation*. 2010;19(4):443-51.
- [66] Adin CA, Croker BP, Agarwal A. Protective effects of exogenous bilirubin on ischemia-reperfusion injury in the isolated, perfused rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Apr;288(4):F778-84.
- [67] Otterbein LE, Kolls JK, Mantell LL, Cook JL, Alam J, Choi AM. Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. *J Clin Invest*. 1999 Apr;103(7):1047-54.
- [68] Wei Y, Chen P, de Bruyn M, Zhang W, Bremer E, Helfrich W. Carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterology*. 2010;10:42.
- [69] Vera T, Henegar JR, Drummond HA, Rimoldi JM, Stec DE. Protective effect of carbon monoxide-releasing compounds in ischemia-induced acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Apr;16(4):950-8.
- [70] Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B, et al. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *Faseb J*. 2003 Sep;17(12):1724-6.

- [71] Tullius SG, Nieminen-Kelha M, Buelow R, Reutzel-Selke A, Martins PN, Pratschke J, et al. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplantation*. 2002 Sep 15;74(5):591-8.
- [72] Goncalves GM, Cenedeze MA, Feitoza CQ, de Paula CB, Macusso GD, Pinheiro HS, et al. Heme oxygenase 1 and renal ischemia and reperfusion injury: the impact of immunosuppressive drug. *Int Immunopharmacol*. 2006 Dec 20;6(13-14):1966-72.
- [73] Demirogullari B, Ekingen G, Guz G, Bukan N, Erdem O, Ozen IO, et al. A comparative study of the effects of hemin and bilirubin on bilateral renal ischemia reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2006;103(1):e1-5.
- [74] Correa-Costa M, Semedo P, Monteiro AP, Silva RC, Pereira RL, Goncalves GM, et al. Induction of heme oxygenase-1 can halt and even reverse renal tubule-interstitial fibrosis. *PLoS One*. 2010;5(12):e14298.
- [75] Ascon DB, Lopez-Briones S, Liu M, Ascon M, Savransky V, Colvin RB, et al. Phenotypic and functional characterization of kidney-infiltrating lymphocytes in renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol*. 2006 Sep 1;177(5):3380-7.
- [76] Goncalves GM, Cenedeze MA, Feitoza CQ, Wang PM, Bertocchi AP, Damiao MJ, et al. The role of heme oxygenase 1 in rapamycin-induced renal dysfunction after ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int*. 2006 Nov;70(10):1742-9.
- [77] Gloria MA, Cenedeze MA, Pacheco-Silva A, Camara NO. The blockade of cyclooxygenases-1 and -2 reduces the effects of hypoxia on endothelial cells. *Braz J Med Biol Res*. 2006 Sep;39(9):1189-96.
- [78] Pittock ST, Norby SM, Grande JP, Croatt AJ, Bren GD, Badley AD, et al. MCP-1 is up-regulated in unstressed and stressed HO-1 knockout mice: Pathophysiological Correlates. *Kidney Int*. 2005 Aug;68(2):611-22.
- [79] Yokoyama T, Shimizu M, Ohta K, Yuno T, Okajima M, Wada T, et al. Urinary heme oxygenase-1 as a sensitive indicator of tubulointerstitial inflammatory damage in various renal diseases. *American Journal of Nephrology*. 2011;33(5):414-20.
- [80] Rabb H, Daniels F, O'Donnell M, Haq M, Saba SR, Keane W, et al. Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Sep;279(3):F525-31.
- [81] Chora AA, Fontoura P, Cunha A, Pais TF, Cardoso S, Ho PP, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest*. 2007 Feb;117(2):438-47.
- [82] Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, et al. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol*. 2004 Apr 15;172(8):4744-51.
- [83] Kim MG, Boo CS, Ko YS, Lee HY, Cho WY, Kim HK, et al. Depletion of kidney CD11c+ F4/80+ cells impairs the recovery process in ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Sep;25(9):2908-21.

[84] Chauveau C, Remy S, Royer PJ, Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert FX, et al. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1694-702.