

# EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE IMUNOSSUPRESSORES SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO DE TRUTA ARCO-ÍRIS

Túlio Teruo YOSHINAGA<sup>1</sup>; Eryka Zolcsák SOUSA<sup>1</sup>; Ricardo Shohei HATTORI<sup>2</sup>; Yara Aiko TABATA<sup>2</sup>; José Roberto KFOURY JÚNIOR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

<sup>2</sup>Polo Regional do Vale do Paraíba – APTA/SAA, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Campos do Jordão, Campos do Jordão, SP [hattori.fish@gmail.com](mailto:hattori.fish@gmail.com)

**Palavras-chave:** imunossupressão; linfócitos; FK506; ciclosporina A; *Oncorhynchus mykiss*

## INTRODUÇÃO

Imunossupressores são drogas comumente utilizadas em humanos no tratamento de doenças autoimunes, no tratamento de vários tipos de câncer e também para prevenir a rejeição em transplantes de órgãos. Agem reduzindo ou bloqueando mecanismos de ativação do sistema imunológico, mas podem causar efeitos colaterais como danos teciduais (RATHEE *et al.*, 2012). Estudos com imunossupressores em peixes são escassos e se restringem principalmente ao zebrafish. Nesta espécie foi demonstrado que o FK506 induz um crescimento anormal de nadadeiras (KUJAWSKI *et al.*, 2014) enquanto a ciclosporina A causa má formação dos vasos sanguíneos em embriões (PANDEY *et al.*, 2015), não sendo observados efeitos similares aos descritos em humanos. Frente a estas considerações, este trabalho examinou os efeitos da ciclosporina A e FK506 sobre o sistema imunológico de trutas arco-íris a fim de avaliar seu potencial uso em pesquisas na área de imunologia de peixes.

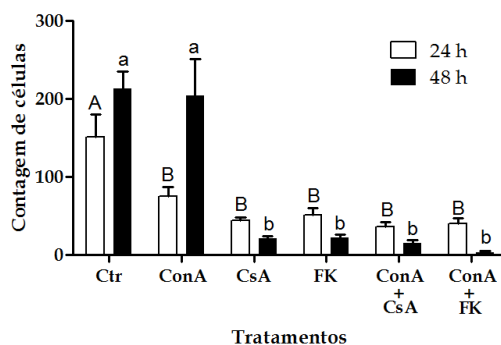
## MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, foi realizado um experimento *in vitro* para avaliar os efeitos de imunossupressores sobre a sobrevivência de células mononucleares. Para isso, o sangue periférico foi coletado de trutas adultas; as células foram isoladas por centrifugação com Histopaque e cultivadas a 20°C em meio RPMI suplementado com a concanavalina A (10 µg mL<sup>-1</sup>), um agente mitótico, e os imunossupressores ciclosporina A (30 mg mL<sup>-1</sup>) e FK506 (0,1 mg mL<sup>-1</sup>). A contagem das células viáveis após 24 e 48 horas de cultura foi feita na Câmara de Neubauer usando a técnica de exclusão de células mortas coradas por azul de tripano (4%). Posteriormente, os mesmos imunossupressores foram diluídos em solução fisiológica e administrados por injeção intracelomática em juvenis de truta arco-íris, em duas

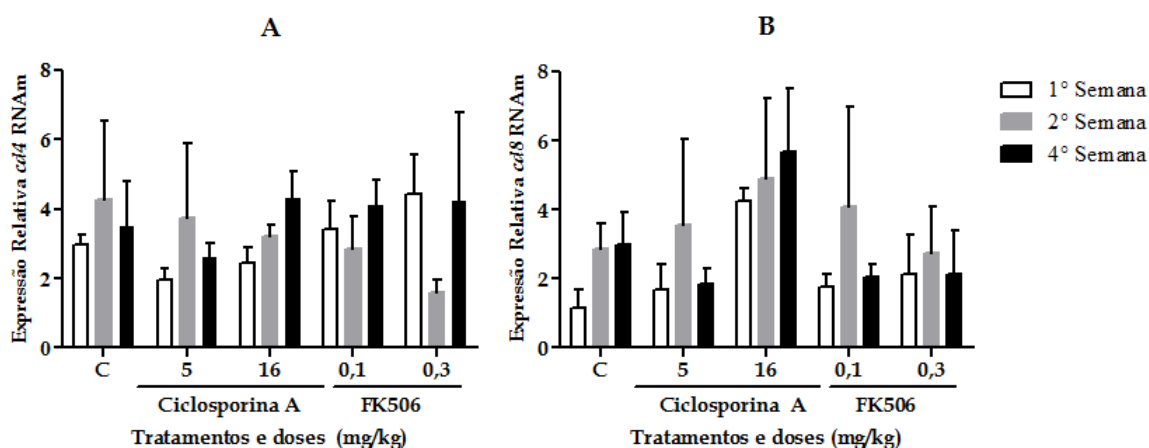
doses diferentes de ciclosporina A (5 e 16 mg kg<sup>-1</sup>) e duas de FK506 (0,1 e 0,3 mg kg<sup>-1</sup>). As injeções foram feitas semanalmente num período de quatro semanas. Foram conduzidas análises histológicas convencionais em rim e fígado, bem como quantificação de RNAm (qRT-PCR) de *cd4* e *cd8* em rim cefálico, de acordo com HATTORI *et al.* (2009). Para as análises estatísticas, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO

A análise de sobrevivência das células após 24 e 48 horas demonstrou uma redução no número de células em presença da ciclosporina A e FK506 (Figura 1). Houve também redução da sobrevivência nos tratamentos das duas drogas conjugadas com a concanavalina A. Resultados similares foram obtidos em experimentos *in vitro* com células humanas (MIROUX *et al.*, 2009), sugerindo que estas drogas estejam afetando a sobrevivência dos monócitos. As análises de expressão de *cd4* e *cd8* por qRT-PCR (Figura 2) e histológicas de rim e fígado não revelaram nenhum tipo de supressão na expressão destes genes ou danos teciduais. Estes resultados podem ter sido decorrentes do intervalo semanal de aplicação, diferentemente do que se observa em mamíferos, onde a administração destes imunossupressores é diária (BOREL *et al.*, 1976; STARZL *et al.*, 1989). Métodos alternativos como injeções utilizando outros tipos de veículos ou administração diária via oral devem ser testados a fim de obter uma ação imunossupressora mais eficaz.



**Figura 1.** Sobrevivência de células viáveis nos diferentes tratamentos após 24 e 48 horas de cultura em meio RPMI a 20°C. Ctr: Controle; ConA: Concanavalina A (10 µg mL<sup>-1</sup>); CsA: Ciclosporina A (30 mg mL<sup>-1</sup>); FK: FK 506 (100 µg mL<sup>-1</sup>). Dados estão representados pela média ± erro padrão da média (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de 24 (maiúsculas) e 48 (minúsculas) para  $P < 0,05$ .



**Figura 2.** Expressões relativas de RNAm dos genes *cd4* (A) e *cd8* (B) em rim após uma, duas e quatro semanas de tratamento com a ciclosporina A e FK506. Dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 3$ ). Os valores foram normalizados com o gene  $\beta$ -actin. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, J.; NAGY, S.; GROTH, C-G.; ANDERSSON, U. 1992 Effects of FK506 and cyclosporine A on cytokine production studied in vitro at a single-cell level. *Immunology*, 75(1): 136-142.
- BOREL, J.F.; FEURER, C.; GUBLER, H.U.; STÄHELIN, H. 1976 Biological effects of cyclosporine A: A New Antilymphocytic. *Agents and Actions*, 6(4): 468-475.
- HATTORI, R.S.; FERNANDINO, J.I.; KISHII, A.; KIMURA, H.; OURA, M.; SOMOZA, G.M.; YOKOTA, M.; STRÜSSMANN, C.A.; WATANABE, S. 2009 Cortisol-Induced Masculinization: Does Thermal Stress Affect Gonadal Fate in Pejerrey, a Teleost Fish with Temperature-Dependent Sex Determination? *PLoS One*, 4(8): e6548.
- KUJAWSKI, S.; LIN, W.; KITTE, F.; BÖRMEL, M.; FUCHS, S.; ARULMOZHIVARMAN, G.; VOGT, S.; THEIL, D.; ZHANG, Y.; ANTOS, C.L. 2014 Calcineurin regulates coordinated outgrowth of Zebrafish Regenerating fins. *Developmental Cell*, 28: 573-587.
- RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, S.; RATHEE, D.; KUMAR, V. 2012 Immunosuppressants: A review. *The Pharma Innovation Journal*, 1(12): 90-101.
- PANDEY, R.; BOTROS, M.A.; NACEV, B.A.; ALBIG, A.R. 2015 Cyclosporin A disrupts notch signaling and vascular lumen maintenance. *PLoS One*, 10(3): e0119279.
- STARZL, T.E.; FUNG, J.; VENKATARAMMAN, R.; TODO, S.; DEMERTRIS, A.J.; JAIN, A. 1989 FK506 for liver, kidney and pancreas transplantation. *The Lancet*: 1000-1004.