

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

**EFEITOS IMUNOSSUPRESSORES DA
DEXAMETASONA, CICLOSPORINA E
CICLOFOSFAMIDA SOBRE LINFÓCITOS
T E B DE CAMUNDONGOS BALB/C**

ADRIANO PEREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

**São Paulo
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

**PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

**EFEITOS IMUNOSSUPRESSORES DA DEXAMETASONA,
CICLOSPORINA E CICLOFOSFAMIDA SOBRE LINFÓCITOS T
E B DE CAMUNDONGOS BALB/C**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração:
Imunopatologia Veterinária

Orientador:
Profa. Dra. Maria Anete Lallo.

ADRIANO PEREIRA

**São Paulo
2007**

Pereira, Adriano

Efeitos imunossupressores da dexametasona, ciclosporina e ciclofosfamida sobre linfócitos T e B de camundongos Balb/c / Adriano Pereira - São Paulo, 2007.

54p.

Dissertação de Mestrado – Universidade Paulista.

Área de concentração: Imunopatologia Veterinária

Orientador: Profa. Dra. Maria Anete Lallo

Immunosuppressive effects of dexamethasone, cyclosporine and cyclophosphamide on T and B lymphocytes of Balb/c mice

1. ciclofosfamida 2. dexametasona 3. ciclosporina 4. imunossupressão 5. linfócitos 6. camundongos

Aos meus eternos amigos, Alessandro e Ronalda, pelo apoio, amizade, carinho e pela presença constante em minha vida durante toda esta etapa que esta se cumprindo.

Aos meus pais, que encheram minha vida de carinho, dedicação e compreensão.

Às minhas tias Ivone, Leila, Paula, Renata e Tereza, por sempre terem me apoiado e acreditado em mim.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. **Maria Anete Lallo**, pela orientação e ensinamentos constantes e por toda a amizade e confiança depositadas em mim. E, acima de tudo, pelo prazer de estar ao lado desta excelente pessoa e exemplo de profissional a ser seguida.

Ao Prof. Dr. **Eduardo Fernandes Bondan**, professor da UNIP, pelas sugestões e contribuições em várias etapas deste estudo. E ainda, pelo exemplo de professor extraordinário e também, pela amizade conquistada durante o período de convivência.

Ao Ms. **Ronni Rômulo e Brito**, doutorando do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de São Paulo, pelo contínuo apoio, e auxílio nas análises por citometria de fluxo e estatística do presente estudo. E ainda, pela amizade conquistada neste período.

À Dr^a. **Beatriz Helena Pizarro de Lourenço**, biomédica do Hospital do Câncer de Barretos, pelo auxílio nas etapas iniciais do trabalho experimental e pela amizade.

Ao Prof. Dr. **Mario Mariano**, chefe do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de São Paulo, que gentilmente cedeu espaço em seu laboratório para a realização deste trabalho.

À **Solange Aparecida Consorte, Adriana Psota e Joana**, técnicas do Laboratório de Histopatologia do Instituto do Coração, pelos ensinamentos teóricos e práticos das técnicas histológicas, que foi de fundamental importância para a realização experimental de parte deste trabalho e pela amizade.

À Dr^a. **Vera Demarchi Aiello**, Patologista chefe do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração, que gentilmente abriu as portas do Laboratório de histopatologia, permitindo o aprendizado das técnicas histológicas.

À Dr^a. **Nádia Vieira Sambiase**, biomédica chefe do Laboratório de Imuno-histoquímica, Hibridização *in situ* e Biologia Molecular do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração, que permitiu a utilização do laboratório de Imuno-histoquímica. Aos Biologistas Ms. **Suely Aparecida Palomino** e **Antônio Vicente Guedes**, pela amizade e inestimável colaboração na execução das técnicas histológicas.

Ao Dr. **Mauro Canzian**, Dr^a. **Léa** e Dr^a. **Jussara Bianchi Castelli**, médicos patologistas do Instituto do Coração, pelos conhecimentos de patologia e, particularmente, sugestões e contribuição no auxílio na análise dos cortes histológicos.

Ao Prof. Dr. **José Guilherme Xavier**, Patologista Veterinário do Laboratório GENOA e professor da UNIP, pelos ensinamentos, sugestões e contribuição ao estudo histopatológico do baço.

À **Carla Rosa Godoy**, **Graciela Aparecida Brocardo** e a Ms. **Lis Vilela de Almeida**, pela amizade e carinho. Por ter dividido os momentos bons e ruins que ocorreram neste período, pelos conselhos e por todo o apoio.

Às médicas do laboratório de Imunopatologia Prof^a. Dr^a. **Beatriz Beittler**, Prof^a. Dr^a. **Juliana Pereira** e Prof^a. Dr^a. **Grácia Martinez**, pelo convívio e apoio constante e que, gentilmente concederam a utilização do fotomicroscópio do Laboratório para a documentação fotográfica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Antônio**, pelo auxílio e orientação na análise computadorizada de imagens.

À **Miriam**, funcionária e mestranda do Laboratório de Práticas em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na elaboração de tabelas e pelas sugestões e amizade.

Aos colegas de curso e queridos amigos **Heloisa**, **Luiz**, **Carolina**, **Vera**, **Priscila**, **Beatriz**, **Rudgero**, **Renato** e **João**, pelo convívio e momentos inesquecíveis, pela contínua troca de informações, sugestões e críticas.

A todos os meus **professores** do mestrado, que contribuíram para o meu crescimento intelectual e profissional, compartilhando idéias e conhecimentos e pela amizade.

À **Dada**, técnica do Biotério da UNIP, pela ajuda contínua no cuidado dos animais utilizados neste trabalho e pela amizade. Ao **Paulo**, Técnico do Laboratório de Patologia da UNIP, pela colaboração na execução das técnicas histológicas realizadas.

À Divisão Farmacêutica do complexo do Hospital das Clínicas, pela doação da ciclosporina e da ciclofosfamida para a realização de parte da pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES)** pelo suporte financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – hormônio adrenocorticotrópico

APC – *Allophycocyanin* – alofococianina

CsA – ciclosporina

CY – ciclofosfamida

DNA – ácido desoxirribonucléico

Dx – dexametasona

FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorter*

HE – hematoxilina-eosina

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

IF – Intensidade de fluorescência

IFN - interferon

IL – interleucina

NFAT – fator nuclear de células T ativadas

PBS – solução tamponada por fosfato

RG – receptor de glicocorticóide

RNA – ácido ribonucléico

R-PE – *phycoerythrin* – R-ficoeritrina

SCID – imunodeficiência combinada severa

TCR – receptor de células T

UNIP - Universidade Paulista

USP - Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	4
3 REVISÃO DaLITERATURA.....	5
3.1 Modelos Animais de Experimentação em Imunologia.....	5
3.2 Agentes Imunossupressores.....	6
3.2.1 Ciclosporina (Csa).....	6
3.2.2 Corticosteróides.....	10
3.2.3 Ciclofosfamida (CY).....	13
3.3 Compartimentos Celulares da Resposta Imune Celular E Humoral.....	15
3.3.1 Linfócitos B.....	17
3.3.1 Linfócitos T.....	18
3.4 Marcadores de Superfície de Linfócitos.....	20
3.5 Imunofenotipagem de Linfócitos por Citometria de Fluxo.....	21
4 MÉTODOS.....	24
4.1 Animais.....	24
4.2 Tratamento Imunossupressivo.....	24
4.3. Sacrifício dos Animais, Colheita e Processamento Materiais.....	25
4.3.1 Sacrifício dos Animais.....	25
4.3.2 Colheita do Sangue.....	25
4.3.3 Leucograma.....	25
4.3.4 Citometria de Fluxo.....	26
4.3.4.1 Marcação de Células para Análise em Citometria de Fluxo.....	26
4.3.4.2 Avaliação das Populações Celulares por Citometria de Fluxo.....	27
4.3.4.3 Análise das Populações Celulares por FACS.....	28
4.3.5 Necrópsia e Análise Histopatológica.....	28
4.4 Análise Estatística.....	29

5 RESULTADOS.....	30
5.1 Leucograma.....	30
5.2 Análise de Populações Celulares por Citometria de Fluxo.....	33
5.3 Achados Histopatológicos.....	35
6 DISCUSSÃO.....	37
7 CONCLUSÃO.....	43
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

RESUMO

Animais imunodeficientes são amplamente utilizados como modelos para pesquisas biológicas em estudos nas áreas de oncologia, imunologia e doenças infecciosas. Hoje em dia, fármacos com ação imunossupressora têm sido usados experimentalmente para a obtenção de camundongos imunossuprimidos. Este trabalho visou avaliar as populações de linfócitos T e B do compartimento circulatório de camundongos imunossuprimidos com dexametasona (Dx), ciclosporina (CsA) ou ciclofosfamida (CY), assim como, realizar a análise histopatológica do baço desses animais. Para isso foram utilizados camundongos isogênicos Balb/c divididos em 4 grupos: I – camundongos não-imunossuprimidos (grupo controle); II – camundongos imunossuprimidos com CY (75 mg/Kg, por via intraperitoneal (ip), duas vezes por semana,); III – camundongos tratados com DX (5 mg/kg, diariamente, ip) e IV – camundongos imunossuprimidos com CsA (10 mg/Kg, 3 vezes por semana, ip). Foram feitos os sacrifícios aos 7, 14 e 28 dias após o início do tratamento. Nestas datas amostras de sangue foram colhidas para a contagem de leucócitos totais e análise de populações de linfócitos T e B através de citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD19, respectivamente. Os resultados revelaram que os leucócitos totais dos camundongos tratados com as três drogas e em todas as datas apresentaram uma diminuição significativa quando comparados com os resultados dos animais controle. A proporção de linfócitos B e T dos animais tratados também diminuíram significativamente em todas as datas. A análise histopatológica do baço revelou uma moderada redução celular da polpa branca e ocorrência de células em apoptose nos grupos II e III. Os resultados revelaram que os modelos experimentais propostos demonstraram serem adequados para estudos experimentais em modelos de camundongos imunodeficientes.

Palavras chaves: ciclofosfamida, dexametasona, ciclosporina, imunossupressão, linfócitos, camundongos.

ABSTRACT

Immunodeficient animals are important research models for studies in oncology, immunology, and infectious diseases. Immunosuppressive drugs have been experimentally used to obtain a state of immunodeficiency in mice. This investigation aimed to quantify the circulating T and B cells of mice treated with the immunosuppressive agents dexamethasone (Dx), cyclosporin (CsA) and cyclophosphamide (CY), as well as to observe the behaviour of lymphocytic populations in the spleen of these animals. Balb/c mice were divided into 4 groups: I – control group; II - mice immunosuppressed with CY (75 mg/kg, twice a week, intraperitoneal route - ip); III – mice treated with Dx (5 mg/kg, daily, ip) and IV – mice which received CsA (10 mg/kg, 3 times a week, ip). The animals were sacrificed at 7, 14 and 28 days after the beginning of the treatment. On those days blood samples were collected for counting the total peripheral blood leukocytes and T and B lymphocytes using flow cytometry with monoclonal antibodies to CD3 and CD19, respectively. Total leukocytes of mice treated with the three drugs in all days showed a significant decrease when compared to the results of the control group. The proportion of B and T lymphocytes from the treated animals also decreased significantly in all dates. Spleen sections revealed a moderated decrease in the cellularity of the white pulp and the development of lymphocyte apoptosis in mice from groups I and II. The results showed that the proposed experimental models demonstrated to be suitable for studies of murine immunodeficiency.

Keywords: cyclophosphamide, dexamethasone, cyclosporine, immunosuppression, lymphocytes, mice.

1 INTRODUÇÃO

Modelos animais têm sido amplamente utilizados em pesquisas biológicas como uma alternativa ao estudo de doenças, pois eles reproduzem de forma similar tais condições (FERREIRA et al., 2005).

Sabe-se que determinadas enfermidades somente ocorrem em indivíduos com imunossupressão. Neste sentido, modelos animais com deficiências imunes podem ajudar no estudo das mesmas. Além disso, são usados na pesquisa da resposta imune e nos diferentes elementos envolvidos na defesa contra as doenças. Camundongos portadores de deficiências imunológicas adquiridas geneticamente, tais como os animais atímicos (também chamadas de nude) e os camundongos com imunodeficiência combinada severa (SCID) são freqüentemente usados como modelos animais imunossuprimidos, contudo sua criação e manutenção têm alto custo, sendo restrita no aspecto financeiro (STANLEY e VIRGIN, 1993; DIDIER et al., 1994; SEYDEL e STANLEY, 1996).

Drogas imunossupressoras podem ser utilizadas em pesquisas para diminuir a resposta imune em animais. Entre os agentes imunossupressores empregados estão a dexametasona (Dx), a ciclosporina (CsA), a ciclofosfamida (CY) entre outras (LALLO, 1998; CASTRO, 1999; LALLO et al., 2002).

A Dx é um glicocorticóide amplamente utilizado por suas propriedades imunossupressoras e antiinflamatórias, tanto na medicina humana quanto na veterinária. Essa droga possui atividade linfopênica, especialmente quanto à produção de linfócitos T. A Dx pode induzir a apoptose em diferentes células do sistema imunológico, incluindo os precursores de linfócitos T e B imaturos e

linfócitos T maduros. Este glicocorticoide também inibe a transcrição de importantes citocinas como a interleucina 2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ), os quais são essenciais para a proliferação de linfócitos T (NORBIATO et al., 1997; KUPERMAN, 2005).

Por sua vez, a CsA, um potente imunossupressor, exerce seu efeito numa população restrita de células linfóides e poupa as outras células de linhagem mielóide, conferindo-lhes certa seletividade. CsA inibe a ativação de linfócitos T bloqueando a expressão de vários genes de citocinas, tais como a IL-2 e IL-4, que normalmente são induzidos na ativação dessas células (MATSUDA e KOYASY, 2000; GARCIA et al., 2004a).

A CY é uma mostarda nitrogenada usada no tratamento de diversos tipos de câncer (KOLLER, 1982; TURK, 1989) e de doenças auto-imunes (COUNIHAN e FEIGHERY, 1991; BACH, 1993). A droga é um potente imunossupressor, atuando em células com alta atividade mitótica, inibindo tanto a resposta imune humoral quanto a celular (GARCIA et al., 2004b).

Apesar de modelos murinos imunossuprimidos por fármacos serem usados por vários autores (LALLO, 1998; CASTRO, 1999; LALLO et al., 2002) não tem sido feita a análise dos elementos que envolvem a resposta imunológica que refletem a imunidade celular e humoral.

Dos diferentes elementos envolvidos na defesa, os linfócitos são as células centrais do sistema imune responsáveis pela imunidade adquirida e pelos atributos imunológicos de diversidade, especificidade, memória e reconhecimento do próprio e do não-próprio. Estas células podem ser subdivididas em duas principais populações, os linfócitos B e os T, baseando-se em suas funções e nos seus componentes de membrana celular. Os

linfócitos B são considerados as células efetoras da resposta imune humoral enquanto que os linfócitos T constituem o tipo celular responsável pela resposta imune celular (GOLDSBY et al., 2002).

Várias técnicas têm sido utilizadas para identificar essas populações de linfócitos B e T, entre elas a imunohistoquímica e a citometria de fluxo, ambas tendo como princípio a utilização de anticorpos monoclonais específicos para moléculas expressas nesses tipos celulares. Entre várias moléculas presentes na membrana dos linfócitos, as mais utilizadas como alvos para a sua identificação, são a CD3, expresso nos linfócitos T, e a CD19, restrita aos linfócitos B (GOLDSBY et al., 2002).

2 OBJETIVO

Considerando-se a necessidade de modelos biológicos mais acessíveis para a realização de estudos experimentais envolvendo modelos animais imunossuprimidos, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de 3 diferentes agentes imunossupressores – dexametasona, ciclofosfamida e ciclosporina sobre os compartimentos celulares responsáveis pela resposta imune humoral e celular de camundongos. Para tal avaliou-se as populações de linfócitos B (CD19⁺) e linfócitos T (CD3⁺) circulantes por citometria de fluxo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Modelos Animais de Experimentação em Imunologia

Modelos animais são utilizados em todos os campos da pesquisa biológica. Estes são assim classificados por apresentarem mecanismos patológicos suficientemente similares aos observados em uma doença humana, atuando assim como modelos animais (FERREIRA et al., 2005).

Para as pesquisas básicas em imunologia, os camundongos têm sido os animais de escolha. Eles são mais facilmente manuseáveis, possuem características geneticamente bem definidas e um ciclo de procriação rápido (ANDERSEN et al., 2004). O sistema imune do camundongo foi caracterizado de maneira mais extensiva do que qualquer outra espécie. O valor da pesquisa básica em um sistema que utiliza camundongo é realçado pelo enorme impacto que esta pesquisa tem na intervenção clínica na doença humana (GOLDSBY et al., 2002).

Linhagens endocruzadas de camundongos isogênicos, isto é, animais geneticamente idênticos (singênico) produzidos por endogamia são utilizados com a finalidade de controlar as variações experimentais causadas por diferenças na composição genética dos animais experimentais (GOLDSBY et al., 2002; ABBAS et al., 2003).

As linhagens isogênicas são desenvolvidas por cruzamentos repetidos entre as ninhadas de irmãos e irmãs. A endogamia repetida por 20 gerações, geralmente, fornece uma linhagem cujas ninhadas são homozigóticas em mais de 98% de todos os *loci*. Mais de 150 diferentes linhagens endocruzadas de

camundongos estão disponíveis, sendo que os Balb/c, produzido pela primeira vez por MacDowell, são muito utilizados no Brasil (GOLDSBY et al., 2002; ANDERSEN et al., 2004).

3.2 Agentes Imunossupressores

3.2.1 Ciclosporina (CsA)

A CsA, potente imunossupressor, é um polipeptídeo cíclico, contendo 11 aminoácidos. Ela deriva de um fungo do solo da Noruega, o *Tolypocladium inflantum gams* e foi introduzida na década de 70 para provável uso em transplante de órgãos sólidos. No entanto, seu uso efetivo ocorreu em 1983, no European Multicenter Trial Group, e, a partir desta data, vem melhorando substancialmente a sobrevivência de pacientes submetidos a transplantes (GARCIA et al., 2004a; REZZANI, 2004).

Diferente de outras drogas imunossupressoras, como os agentes alquilantes, a CsA não é uma droga citotóxica. A CsA exerce seu efeito numa população restrita de células linfóides e poupa as outras células de linhagem mielóide, conferindo-lhes certa seletividade. CsA inibe a ativação de linfócitos T bloqueando a expressão de vários genes de citocinas, como a IL-2 e IL-4, que normalmente são induzidos na ativação dessas células (MATSUDA e KOYASY, 2000; GARCIA et al., 2004a).

A ação supressora da CsA resulta na inibição da ativação de linfócitos T. Essa ação depende da formação de um complexo heterodimérico com seu receptor citoplasmático, a ciclofilina, especialmente com a ciclofilina A, de peso

molecular de 17 kDa, que é a imunofilina mais abundante encontrada nas células T. A ciclofilina é uma peptil-propil *cis-trans* isomerase, mas sua atividade isomerase não parece ser relevante à sua atividade imunossupressora das drogas que a elas se ligam. Em vez disso, os complexos imunofilina-droga ligam-se e inibem a calcineurina, resultando na inibição da expressão de genes relacionados com a ativação celular e formação do linfócito T citotóxico (MATSUDA e KOYASY, 2000; REZZANI, 2004).

A calcineurina é uma proteína citossólica pertencente à superfamília das serina/treonina fosfatases, que é formada por duas subunidades, uma catalítica (calcineurina A, CnA) e uma regulatória (calcineurina B, CnB). A calcineurina é ativada quando ocorrem elevadas concentrações de Ca^{2+} intracelular. O aumento do Ca^{2+} intracelular livre leva a ativação da proteína ligadora de Ca^{2+} , calmodulina. A calmodulina ativada se liga a subunidade catalítica (CnA) da calcineurina, levando a ativação de sua atividade fosfatase (MATSUDA e KOYASY, 2000; REZZANI, 2004).

O complexo ciclofilina/CsA se liga diretamente a CnA da calcineurina, inibindo então sua atividade. A calcineurina defosforila certas proteínas reguladoras nucleares, como o NFAT (fator nuclear de células T ativadas) (MATSUDA e KOYASY, 2000; REZZANI, 2004).

O NFAT é um fator de transcrição cuja nomenclatura é errônea, pois se sabe agora que esses fatores de transcrição são encontrados não somente nas células T, mas também nas células B, NK, mastócitos, monócitos e em algumas células hematopoiéticas. O NFAT contém uma seqüência de aminoácidos chamada de sinal de localização nuclear, que permite que ele seja

translocado no núcleo. Nas células não-estimuladas, essa seqüência é inoperante pela fosforilação de resíduos de serina/treonina. Uma vez que o NFAT é defosforilado pela calcineurina, ele entra no núcleo, onde atua como uma proteína reguladora de transcrição, ligando-se à região promotora de genes de IL-2, IL-4, FN-?, causando a transcrição dos mesmos e a secreção das referidas citocinas (JANEWAY et al., 2001).

A importância do NFAT na ativação das células T é ilustrada pelos efeitos inibidores eletivos da CsA sobre este fator de transcrição. O bloqueio do NFAT é considerado, portanto, o principal efeito da CsA. Este leva a inibição da transcrição de citocinas, sendo que o bloqueio de IL-2 parece ser o mais importante, mas ocorre também diminuição da produção de IL-4, gama-interferon e fator de necrose tumoral (KAHAN, 1989; JANEWAY et al., 2001).

Estudos também têm mostrado que a ativação da calcineurina também transcola para o núcleo membros da família do NFAT, sugerindo-se que esses ajudariam a manter a ativação do NFAT no núcleo (SHIBASAKI et al., 1996). Entre os membros da família do NFAT estão o NFAT1, NFAT2 e NFAT4, que estão envolvidos na ativação transcricional de genes que codificam citocinas, incluindo IL-2 e IL-4 e também CD40L. Por impedir a ativação da calcineurina, a CsA inibe deslocamento desses membros da família do NFAT para o núcleo e subseqüentemente a expressão de genes para ativação de linfócitos T (RAO et al., 1997).

A ativação transcricional do gene IL-2 necessita da interação de vários fatores de transcrição, incluindo AP-1, NF-?B e NFAT (CRABTREE, 1989). O NF-?B é um heterodímero de duas proteínas relacionadas de 65 kD e 50 kD (p65 e p50). Essas proteínas compartilham uma região de homologia em seus

terminais N, a qual é requerida para ligação e dimerização de DNA. Nas células quiescentes, NF- κ B é encontrado no citoplasma, ligado a um inibidor chamado I- κ B. Em resposta a um sinal extracelular, I- κ B é fosforilado, ubiquitinado e degradado no proteossoma e, desta forma, o NF- κ B é transloca-se para o núcleo e regula a expressão gênica (LODISH et al., 2002). Já o fator de transcrição AP-1 é um heterodímero de Fos e Jun, os quais regulam a expressão de muitos genes envolvidos no crescimento celular (JANEWAY et al., 2001).

Tem sido demonstrado que a CsA afeta a atividade da AP-1 e do NF- κ B, em adição ao NFAT, implicando assim, na presença de outros alvos para essa droga, além da via calcineurina/NFAT (MATTILA et al., 1990; RINCON e FLAVELL, 1994).

De acordo com SU et al. (1994) e MATSUDA et al. (1998) também há evidências de que a CsA bloqueia as vias de sinalizações JNK e p38, em adição a via calcineurina/NFAT. Tanto a JNK como a p38 são proteínas serino/treoninoquinases, pertencentes à superfamília das MAP-quinases (MAPK). Essas proteínas são ativadas no citosol em respostas a sinais extracelulares específicos e podem ser translocadas para o núcleo (LODISH et al., 2002). Desta forma, a ação da CsA em diferentes alvos de sinalização nos linfócitos T, pode explicar a alta especificidade de sua atividade imunossupressora (MATSUDA et al., 1998).

3.2.2 Corticosteróides

Os glicocorticóides são importantes esteróides secretados principalmente pelas células da zona fasciculada das supra-renais, cuja síntese é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), secretado pela hipófise anterior. Os principais hormônios endógenos são a hidrocortisona, também chamado de cortisol, e a corticosterona. Ambos afetam o metabolismo dos hidratos de carbono e das proteínas (RANG et al., 2001; GUYTON e HALL, 2002).

Os corticosteróides são derivados farmacológicos dos membros da família de glicocorticóides e, entre esses análogos sintéticos estão a dexametasona, a prednisona, a prednisolona e a metilprednisona. Esses fármacos quando comparados com o seu análogo endógeno, o cortisol, são tão potentes quanto este, como a prednisona, ou no caso da prednisolona e a metilprednisona são quatro e cinco vezes mais potentes, respectivamente. Já a dexamentasona é trinta vezes mais potente do que o cortisol, sendo esta regularmente utilizada para fins antiinflamatórios e imunossupressores, tanto na medicina humana como na veterinária. Esses potentes agentes anfiinflamatórios exercem vários efeitos que resultam na redução do número e atividade das células do sistema imune (GUYTON e HALL, 2002).

O tratamento com corticosteróides causa um decréscimo no número de linfócitos circulantes, como resultado principalmente da lise dos linfócitos induzida pelo esteróide (linfólise). Algumas espécies de animais como, por exemplo, hamster, camundongo, rato e coelho, são particularmente sensíveis à linfólise induzida pelo corticosteróide. Nestes animais, o tratamento com corticosteróides em doses baixas causa um linfólise disseminada em que o

peso do timo é reduzido em cerca de 90% e, o baço e os linfonodos também encolhem visivelmente (GOLDSBY et al., 2002).

Nos roedores, os corticosteróides induzem a morte celular programada dos timócitos imaturos, enquanto que os timócitos maduros são resistentes a esta atividade. Duas horas após a incubação *in vitro* com os corticosteróides, os timócitos imaturos começam a apresentar uma morfologia característica de apoptose, e 90% da cromatina é degradada, em aproximadamente, 24 horas após o tratamento (GOLDSBY et al., 2002).

Semelhante a outros hormônios esteróides, os corticóides são lipofílicos e, desta maneira, conseguem atravessar a membrana plasmática das células. Uma vez no citosol eles agem através da ligação a um fator de transcrição nuclear, o receptor de glicocorticóide (RG). Esse receptor se encontra em quase todos os tecidos, incluindo linfócitos T e B e timócitos (GAYNON e LUSTIG, 1995; GOLDSBY et al., 2002).

O RG é uma proteína de 777 aminoácidos, de 86kDa, localizada no citoplasma das células, e consiste de três domínios primários, formado por um aminoterminal, um carboxiterminal e um domínio central. O domínio aminoterminal é requerido para a ativação transcricional enquanto que o carboxiterminal é onde ocorre a ligação ao esteróide. Já o domínio central codifica dois dedos de zinco que reconhecem uma seqüência de ácido desoxirribonucléico (DNA) específica dentro da região promotora de genes responsivos aos glicocorticóides (GAYNON e LUSTIG, 1995).

Uma vez que os corticóides se ligam ao RG, os complexos resultantes receptor-hormônio são subseqüentemente transportados para o núcleo, onde eles se ligam a seqüências específicas de DNA reguladoras ora ativando, ora

inibindo a transcrição (GAYNON e LUSTIG, 1995; GOLDSBY et al., 2002). Foi demonstrado que os corticosteróides induzem um aumento na transcrição do inibidor de NF-kB (I-kB). A ligação deste inibidor ao NF-kB no citosol impede a translocação do NF-kB para o núcleo e, conseqüentemente, evita a ativação de inúmeros genes pelo NF-kB incluindo os genes envolvidos na ativação de linfócitos T e na produção de citocinas (GOLDSBY et al., 2002).

Após administração inicial, os corticosteróides exibem um efeito marcadamente lítico sobre os linfócitos e os mecanismos de lise celular são vários, entre eles: inibição de linfocinas essenciais à proliferação e sobrevivência celular, parada do ciclo celular, alterações na expressão de vários oncogenes e apoptose (morte celular programada) (GAYNON e LUSTIG, 1995). Mecanismos que levam a estas alterações incluem a inibição da passagem da fase G_0 - G_1 , síntese de novos genes e, conseqüentemente, de ácido ribonucléico (RNA) e proteínas (GAYNON e CARREL, 1999). Outros fatores que influenciam a apoptose celular incluem a degradação de proteínas regulatórias, que inibem a apoptose e/ou ativação de proteínas que promovem a morte celular (proteassoma multicatalítico), presença de caspases, família de proteínas Bcl-2 e alteração na homeostase de cálcio (FRANKFURD e ROSEN, 2004).

3.2.3 Ciclofosfamida (CY)

Ciclofosfamida (N,N-di-2-cloroetil-N'-O-trimetilenofosfodiamida) é um agente alquilante do tipo mostarda nitrogenada que interfere com a síntese do DNA e sua principal ação farmacológica é sobre os tecidos em divisão

(JANEWAY et al., 2001). Este fármaco possui 2 grupos alquil que são capazes de se ligarem de forma covalente com substâncias nucleofílicas nas células (RANG et al., 2001).

O processo de alquilação da CY possui um significativo efeito citotóxico, mutagênico e carcinogênico. Apesar de vários constituintes nucleofílicos celulares poderem ser alquilados, tais como RNA, proteínas e componentes de membrana, os eventos citotóxicos primários ocorrem pela alquilação do DNA, formando ácidos nucléicos modificados por ligações estabelecidas intrafilamento ou ligação cruzada (RANG et al., 2001).

A alquilação consiste na introdução de cadeia alifática em composto cíclico, por substituição de um hidrogênio por um radical alquílico. A ação dos agentes alquilantes baseia-se na afinidade de seus grupos eletrofílicos (cloroetilamina, etilenoiminas e ésteres do ácido sulfônico) para com grupos nucleofílicos (OH, SH, NH₂) das proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos. Por esse mecanismo atuam de maneira muito semelhante às radiações ionizantes (raio X, isótopos radioativos), tanto do ponto de vista bioquímico como farmacodinâmico, de onde terem sido chamados anteriormente agentes radiométicos (MILLER et al., 1977).

A CY foi desenvolvida originalmente para o tratamento de câncer e, após observações de que era citotóxica para os linfócitos em divisão, também se descobriu que era imunossupressora. O uso desse composto é limitado por uma variedade de efeitos citotóxicos sobre os tecidos do corpo, os quais têm em comum a propriedade da divisão celular contínua (JANEWAY et al., 2001). Sua toxicidade geralmente é expressa quando a célula entra na fase S (síntese de DNA) e a continuidade do ciclo é bloqueada na fase G₂ (pré-mitótica)

(RANG et al., 2001). Adicionalmente, maior sensibilidade celular à alquilação parece ocorrer no final de G_1 (pré-síntese de DNA) ou S do que em G_2 , mitose ou início de G_1 (CALABRESI e PARKS, 1987; CHABNER et al., 1996).

Os efeitos hematológicos do tratamento com CY incluem principalmente linfocitopenia, afetando tanto o número como a função de linfócitos T e B, inibindo tanto a resposta imune humoral quanto a celular (ROITT et al., 1999; GARCIA et al., 2004b). Além da função imune reduzida pelo efeito da CY, esta também causa anemia, leucopenia, granulocitopenia e trombocitopenia (JANEWAY et al., 2001).

A droga pode ser administrada por via oral, intravenosa, intramuscular ou diretamente nas cavidades pleural ou peritoneal (RANG et al., 2001). Tanto em humanos quanto em animais experimentais, após doses baixas de CY, observa-se uma redução maior no número de linfócitos B do que no de linfócitos T e, neste grupo, a subpopulação CD8 é mais reduzida do que a T CD4; entretanto, com doses mais elevadas, todos os tipos celulares encontram-se igualmente reduzidos (JANEWAY et al., 2001). A CY é usada em altas doses quando o objetivo é eliminar todos os linfócitos em divisão, como no tratamento de alguns receptores de transplantes de medula óssea. Já em doses menores, essa droga é utilizado em combinação com outros fármacos como os corticosteróides, para tratar as respostas imunes indesejadas, como no caso de doenças auto-imunes (ROITT et al., 1999).

Em razão da interferência na função das células T e B, a CY é eficaz no controle da produção de anticorpos e da imunidade mediada por células em animais de experimentação exercendo assim, um papel importante no estudo

tanto das doenças por auto-anticorpos quanto na rejeição de enxertos e resposta imune frente a doenças infecciosas (ROITT et al., 1999).

3.3 Compartimentos Celulares da Resposta Imune Celular e Humoral

Dos diferentes elementos envolvidos na defesa, os linfócitos são as células centrais do sistema imune responsáveis pela imunidade adquirida e pelos atributos imunológicos de diversidade, especificidade, memória e reconhecimento do próprio e do não-próprio. Assim como os outros tipos de leucócitos, os linfócitos são produzidos na medula óssea pelo processo de hematopoiese e ao saírem desta, circulam nos sistemas linfáticos e sanguíneos e se localizam em vários órgãos linfóides, como linfonodos e baço (JANEWAY et al., 2001; ABBAS et al., 2003).

Os linfócitos no homem constituem 20-40% das células sanguíneas brancas do corpo e 99% das células da linfa. Existem aproximadamente 10^{11} linfócitos no corpo humano, variando este número entre 10^{10} - 10^{12} , dependendo do tamanho do corpo e da idade (GOLDSBY et al., 2002). Já nos camundongos esse tipo celular é predominante entre os glóbulos brancos e, diferentes autores têm demonstrado que a proporção dessas células varia de 70-90% dos leucócitos totais no sangue circulante (PEREIRA et al., 2003; BESSLER et al., 2004; LEE et al., 2004).

Estas células linfóides podem ser subdivididas em duas principais populações, os linfócitos B e os T, baseando-se em suas funções e nos seus componentes de membrana celular. Essas células são pequenas, móveis e

não-fagocíticas que não podem ser distinguidas morfológicamente (GOLDSBY et al., 2002; ABBAS et al., 2003).

Os linfócitos T e B que não interagiram com os antígenos - referidos como virgens ou não-estimulados - são células em repouso na fase G_0 do ciclo celular. Conhecidas como linfócitos pequenos, estas células têm somente cerca de 6 μm de diâmetro; seu citoplasma forma uma borda dificilmente distinguível ao redor do núcleo. Os linfócitos pequenos têm a cromatina densamente empacotada, poucas mitocôndrias e o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi pouco desenvolvidos (GOLDSBY et al., 2002).

A interação de linfócitos pequenos com o antígeno, na presença de determinadas citocinas, induzem estas células a entrarem no ciclo celular, prosseguindo gradualmente de G_0 a G_1 e subseqüentemente em S, G_2 e M (GOLDSBY et al., 2002). Como avançam no ciclo celular, os linfócitos crescem para 15 μm de diâmetro em células blásticas, denominadas de linfoblastos. Estas células têm uma alta proporção entre citoplasma e núcleo e maior complexidade de suas organelas do que os linfócitos pequenos. Os linfoblastos se proliferam e, eventualmente, diferenciam-se em células efetoras ou em células de memória (JANEWAY et al., 2001; GOLDSBY et al., 2002).

As células efetoras funcionam de várias maneiras a fim de eliminar o antígeno. Estas células têm vida curta, variando, geralmente, de poucos dias a poucas semanas. As células plasmáticas - as células efetoras secretoras de anticorpos da linhagem da célula B - têm um citoplasma característico que contém abundante retículo endoplasmático, devido à alta taxa de síntese protéica, arranjado em camadas concêntricas e, também muitas vesículas de Golgi. As células efetoras da linhagem da célula T incluem as células T

secretoras de citocinas (células T auxiliares) e os linfócitos T citotóxicos (CTL) (JANEWAY et al., 2001; GOLDSBY et al., 2002).

Alguns dos descendentes dos linfoblastos T e B se diferenciam em células de memória. A persistência desta população de células é responsável pela imunidade por toda a vida, para muitos patógenos. As células de memória se assemelham aos linfócitos pequenos, mas podem ser distinguidas das células virgens pela presença ou ausência de determinadas moléculas de membrana celular (JANEWAY et al., 2001; GOLDSBY et al., 2002).

Uma resposta imune eficaz contra uma diversidade muito grande de patógenos envolve tanto os linfócitos T como os linfócitos B, considerados as células efetoras da resposta imune celular e humoral, respectivamente. Essas células produzem e exibem os receptores de superfície celular ligadores do antígeno, que lhes conferem sua especificidade contra uma diversidade muito grande de antígenos não-próprios (JANEWAY et al., 2000; ABBAS et al., 2003).

3.3.1 Linfócitos B

A maturação dos linfócitos B ocorre dentro da medula óssea e a designação da letra “B” se origina do seu sítio de maturação, ou seja, na bursa de Fabrícus em pássaros. O nome tornou-se apropriado para o seu principal local de maturação, a medula óssea (Bone Marrow), em um número de espécies de mamíferos, incluindo os humanos e os camundongos (GOLDSBY et al., 2002).

As células B maduras são facilmente distinguíveis de outros linfócitos devido à síntese e expressão de moléculas de imunoglobulina (anticorpos) ligadas à membrana que atuam como receptores do antígeno. Cada uma das aproximadamente $1,5 \times 10^5$ moléculas de anticorpo da membrana de uma única célula B tem um sítio de ligação idêntico para o antígeno (GOLDSBY et al., 2002).

A interação entre antígeno e anticorpo ligado à membrana das células B virgens maduras, assim como, as interações com as células T e os macrófagos, induz seletivamente a ativação e a diferenciação dos clones das células B de especificidade correspondente. Nesse processo, as células B se dividem repetidamente e se diferenciam em um período superior de 4 a 5 dias, gerando uma população de células plasmáticas e células de memória (GOLDSBY et al., 2002).

As células plasmáticas que não possuem anticorpos ligados à membrana sintetizam e secretam uma das cinco classes de anticorpo. Todos os descendentes clonais de uma determinada célula B secretam as moléculas de anticorpo com a mesma especificidade de ligação antigênica. As células plasmáticas são células terminalmente diferenciadas e muitas morrem em uma ou duas semanas (GOLDSBY et al., 2002).

3.3.2 Linfócitos T

Os linfócitos T também se originam na medula óssea. De modo diferente das células B que maturam dentro da medula óssea, as células T migram para a glândula do timo para maturar. Durante a sua maturação dentro do timo, as

células T começam a expressar uma única molécula ligadora de antígeno, denominada de receptor das células T (TCR) na sua membrana. Embora este receptor seja estruturalmente distinto de uma imunoglobulina, eles compartilham algumas características estruturais em comum com as moléculas de imunoglobulinas, mais notavelmente na estrutura de seus sítios de ligação ao antígeno (JANEWAY et al., 2000; GOLDSBY et al., 2002).

Diferente dos anticorpos ligados à membrana das células B, os TCRs não reconhecem antígenos livres. Em vez disso, esses receptores reconhecem o antígeno somente quando ligado a determinadas classes de moléculas próprias. A maioria das células T reconhece o antígeno somente quando ele está ligado a uma molécula própria codificada por genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (JANEWAY et al., 2000; GOLDSBY et al., 2002).

Uma diferença fundamental entre os ramos do sistema imune humoral e mediado por célula é que a célula B é capaz de ligação com o antígeno solúvel, enquanto que a célula T está restrita à ligação do antígeno que está exposto nas próprias células. Para serem reconhecidos pela maioria das células T, estes antígenos devem estar juntamente com as moléculas do MHC na superfície das células apresentadoras de antígenos ou nas células infectadas por vírus, nas células cancerosas e nos enxertos (JANEWAY et al., 2000; GOLDSBY et al., 2002).

3.4 Marcadores de Superfície de Linfócitos

As moléculas de superfície celular reconhecidas pelos anticorpos monoclonais são chamadas de antígenos, uma vez que podem ser produzidos anticorpos contra eles; mas também podem ser designadas "marcadores", pois identificam e discriminam diferentes populações celulares, como células de linhagens particulares ou estado de diferenciação das mesmas células (ABBAS et al., 2003).

Um marcador de superfície que identifica uma linhagem ou um estágio celular particular, que tenha uma estrutura definida e que seja reconhecido por um grupo de anticorpos monoclonais, é designado como grupo de diferenciação ou "CD" (cluster of differentiation) (ABBAS et al., 2003). Desta forma, todos os antígenos da superfície dos leucócitos cujas estruturas sejam definidas recebem a designação CD, seguida de um número; ou a nomenclatura Ly para marcadores em camundongos. Quando um antígeno Ly de camundongo é identificado como um homólogo CD humano, o Ly é retirado e redesignado com CD apropriado (LAI et al., 1998).

Entre os vários antígenos expressos na superfície dos linfócitos B, os CD19, CD20 e CD22, são atualmente os principais marcadores utilizados na identificação de células B humanas e em camundongos (LAI et al., 1998).

O CD19 é uma glicoproteína transmembrânica de 95 kDa, um membro da superfamília das imunoglobulinas, que é expressa durante todo o desenvolvimento do linfócito B a partir da célula pré-B, nos estágios de maturação da célula B e deixa de se expressar no plasmócito. Na superfície desta célula B, a molécula CD19 associa-se com o CD21 (CR-2) e o CD81 (TAPA-1), e esse complexo multimolecular sinergiza com imunoglobulinas da superfície para promover ativação celular. O CD19 participa no

desenvolvimento e ativação do linfócito B, na maturação dos linfócitos B de memória e na regulação da tolerância (KROP et al., 1996; SATO et al., 1997).

Semelhante ao linfócito B, os linfócitos T expressam moléculas de membrana distintas. Todas as subpopulações das células T expressam o TCR, um complexo de polipeptídeos que inclui o CD3; e a maioria pode ser diferenciada pela presença de uma ou outra molécula de membrana, como o CD4 e CD8. Além disso, a maioria dos linfócitos T expressa muitas outras moléculas de membrana como o CD7, CD8, CD96, CD121, CD134, entre outros (GOLDSBY et al., 2002).

3.5 Imunofenotipagem de Linfócitos por Citometria de Fluxo

Técnicas como a citometria de fluxo e a imunohistoquímica têm sido utilizadas para identificar as populações de linfócitos B e T, ambas tendo como princípio a utilização de anticorpos monoclonais específicos para moléculas expressas nesses tipos celulares.

A citometria de fluxo é um método que permite a análise de células em suspensão, promovendo a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência das mesmas. Apesar do custo elevado e da necessidade de técnicos especializados para realização da avaliação citofluorométrica, esta técnica tem uma ampla aplicação em vários segmentos da imunologia, da biologia celular e da hematologia (ROITT et al., 1999).

O citômetro de fluxo é o aparelho utilizado para avaliação da emissão de fluorescência das células (FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorter*). A

avaliação do tamanho relativo da célula (“Forward scatter – FSC”) e da granulosidade ou complexidade interna da célula (“Side Scatter – SSC”) permite a classificação dos leucócitos em linfócitos, monócitos e granulócitos (GRINDEM, 1996). A imunofenotipagem consiste no isolamento de populações de células distintas com diferentes antígenos de superfície marcados com anticorpos fluorescentes específicos. Os linfócitos B e T, por exemplo, são identificados claramente e separados uns dos outros por anticorpos contra as regiões constantes dos receptores de antígenos das células B e T, como o CD19 e CD3, respectivamente (ROITT et al., 1999).

A análise dos linfócitos pela citometria de fluxo deve ser acompanhada pelas contagens totais e diferenciais de leucócitos. A quantidade absoluta das subpopulações linfocitárias é determinada pelas porcentagens da citometria de fluxo, o valor total de leucócitos e o valor diferencial relativo de linfócitos. É importante conhecer a distribuição normal das populações de linfócitos em animais sadios para aplicar a citometria de fluxo e utilizá-la para definir doenças, monitorar seu progresso e auxiliar no prognóstico (BYRNE et al., 2000).

A imunofenotipagem de linfócitos é uma aplicação comum da citometria de fluxo em imunologia e hematologia de seres humanos, e tem sido utilizada para estudar os efeitos de doenças e modificações do sistema imune nas populações de linfócitos. Na medicina veterinária, essa técnica vem começando a ser utilizada a fim de avaliar a apoptose, a progressão das infecções pelos vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina, a resposta de transplantes de órgãos em modelos caninos, a resposta imunológica frente às infecções (BYRNE et al., 2000) e ao tratamento

quimioterápico de animais acometidos por leucemias e linfomas (RIVAS et al., 1996).

4 MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 54 camundongos isogênicos Balb/c, livres de patógenos específicos, machos, com cinco semanas de idade, provenientes do Biotério de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Paulista (UNIP), sob protocolo nº 01/05 CEP/ICS/UNIP, dentro das normas que regulamentam a pesquisa envolvendo animais.

4.2 Tratamento Imunossupressivo

Os animais foram separados em 4 grupos da seguinte forma – o grupo I (n=9), recebeu apenas água destilada estéril, por via intraperitoneal (ip); o grupo II (n=15) recebeu duas doses semanais de 75 mg/Kg de CY (ip), administradas com intervalo de, no mínimo 72 horas; o grupo III (n=15) recebeu 5 mg/Kg de Dx (ip) administradas diariamente e o grupo IV (n=15) recebeu 10 mg/Kg de CsA (ip), 3 vezes por semana, por todo o período experimental.

Durante o desenvolvimento do experimento, os animais permaneceram isolados no biotério da Universidade Paulista (UNIP), onde foram mantidos em caixas de polipropileno contendo maravalha previamente esterilizada por autoclavagem (130°C por 20 minutos), e trocadas 3 vezes por semana. Os

camundongos receberam água *ad libitum* e ração peletizada previamente esterilizada.

4.3 Sacrifício dos Animais, Colheita e Processamento dos Materiais

4.3.1 Sacrifício dos Animais

O sacrifício dos animais foi realizado aos 7, 14 e 28 dias após o início da aplicação das drogas por meio do aprofundamento da anestesia com éter etílico. Cinco animais dos grupos II, III, IV e 3 animais do grupo I, foram sacrificados nos respectivos dias.

4.3.2 Colheita do Sangue

Durante o aprofundamento da anestesia inalatória com éter etílico, antes da parada respiratória, foi coletado o sangue dos animais, para realização do leucograma e análise das populações de linfócitos T e B circulantes por citometria de fluxo. Tal coleta foi realizada por sangria através da artéria braquial esquerda com seringa contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA).

4.3.3 Leucograma

A contagem dos leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer. A partir do sangue colhido com EDTA, foi feita uma diluição deste de 1:20 com

o líquido de Turk (hemolítico) e, em seguida, foram contados os leucócitos dos 4 quadrantes laterais da câmara de Newbauer. Após a contagem, foram somados os valores dos quadrantes e, em seguida, dividido por 4 e multiplicado então por 200. Os valores foram expressos em leucócitos/mm³ de sangue.

Para a contagem diferencial foram feitos esfregaços sangüíneos a partir do sangue coletado no momento da sangria. Estes esfregaços foram corados com panótico e então se procedeu à contagem em microscópio de luz. Foram contados nos campos, através de movimentos de zigue-zague ao longo do esfregaço sangüíneo, um total de 100 células. O resultado foi expresso em leucócitos/mm³ de sangue (valor absoluto) de cada tipo celular.

4.3.4 Citometria de Fluxo

4.3.4.1 Marcação de Células para Análise em Citômetro de Fluxo

Para a avaliação da porcentagem dos linfócitos T e B, o sangue total colhido com EDTA foi diluído em solução hemolítica tamponada, para lise das hemácias, e centrifugado a 1500 rpm por 3 minutos. Esse procedimento de centrifugação foi repetido de duas a três vezes, descartando-se o sobrenadante após cada centrifugação e, ressuspendendo-se o sedimento com novo tampão hemolítico. Ao final deste processo restava somente um botão de células remanescentes, contendo os leucócitos polimorfonucleares e mononucleares. Logo após foi realizada à lavagem do sedimento com solução tamponada por fosfato (PBS).

A solução de PBS contendo os glóbulos brancos foi ajustada para 1×10^6 leucócitos/ μL e incubada na proporção de 1:100 com os anticorpos monoclonais anti-mouse CD3e conjugado ao fluorocromo alofococianina (*Allophycocyanin* - APC; Pharmingen, USA) e anti-mouse CD19 conjugado ao fluorocromo R-ficoeritrina (*phycoerythrin* – R-PE, Pharmingen, USA) (QUADRO 1).

QUADRO 1 Anticorpos monoclonais utilizados

Descrição	Clone
APC ^a anti-mouse CD3e	145-2C11
R-PE ^b anti-mouse CD19	1D3

^a alofococianina, ^b R-ficoeritrina

A diluição foi feita com 1 μL do anticorpo monoclonal em 99 μL da amostra para cada anticorpo (anti-CD4 e anti-CD8) e somente um tubo com a amostra sem anticorpos, usado como controle negativo da intensidade da fluorescência (IF). No FACS para a avaliação da emissão de fluorescência das células, utilizou-se o filtro FL2 (para a R-PE) e o filtro FL4 (para o APC).

4.3.4.2 Avaliação das Populações Celulares por Citometria de Fluxo

Para cada um dos tubos contendo as células marcadas foi feita a leitura e análise da fluorescência com o programa de computador CELLQuest (Beckton Dickinson, San Jose, CA, EUA) no citômetro FACSCalibur (Beckton Dickinson, San Jose, CA, EUA). As janelas de aquisição no citômetro de fluxo foram definidas pelo tamanho (dispersão frontal) e granularidade (dispersão lateral) das células. Além dessas diferenças morfológicas, cada célula era

detectada a partir dos antígenos de superfície revelados pelos anticorpos específicos marcados com os fluorocromos, em FACS.

Em todos os experimentos foram utilizados, para cada animal estudado, tubos de controle negativo com células sem marcação, fazendo-se o ajuste da auto-fluorescência da amostra, como já descrito anteriormente. Em seguida, foram adquiridos os eventos dos outros tubos do painel do experimento marcados com os respectivos anticorpos. A IF das amostras marcadas com anticorpos foi obtida pela subtração do valor da IF do tubo controle negativo.

4.3.4.3 Análise das Populações Celulares por FACS

A proporção de linfócitos T e B foi expressa em porcentagem dos leucócitos totais de sangue periférico através da análise dos citogramas gerados pelo programa do citômetro de fluxo CELLQuest.

4.3.5 Necrópsia e Análise Histopatológica

Uma vez observada a parada respiratória, foi iniciada a necropsia do animal para a retirada do baço. Após divulsão da pele da região abdominal caudal até a região torácica cranial e incisão abdominal, foi feita a retirada do baço, sendo este transferido logo após para uma solução fixadora de formaldeído a 10%. Após permanecer nesta solução por aproximadamente 72 horas, o órgão foi submetido à desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Então Foram obtidos 2 cortes com 5 μ m de espessura, os quais foram

corados com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação de alterações histopatológicas pela microscopia de luz.

4.4 Análise Estatística

A significância estatística da análise dos compartimentos celulares circulantes dos animais foi estabelecida em $p < 0,05$, sendo que todo o processamento estatístico foi realizado com auxílio do programa GraphPad Prisma (versão 4.01), utilizando-se o teste ANOVA, de um critério.

5 RESULTADOS

5.1 Leucograma

O número total de leucócitos (Fig. 1 e Tab. 1) dos animais tratados com os 3 fármacos, em todas as datas de sacrifícios, apresentou uma diminuição significativa quando comparados com os resultados dos animais controle.

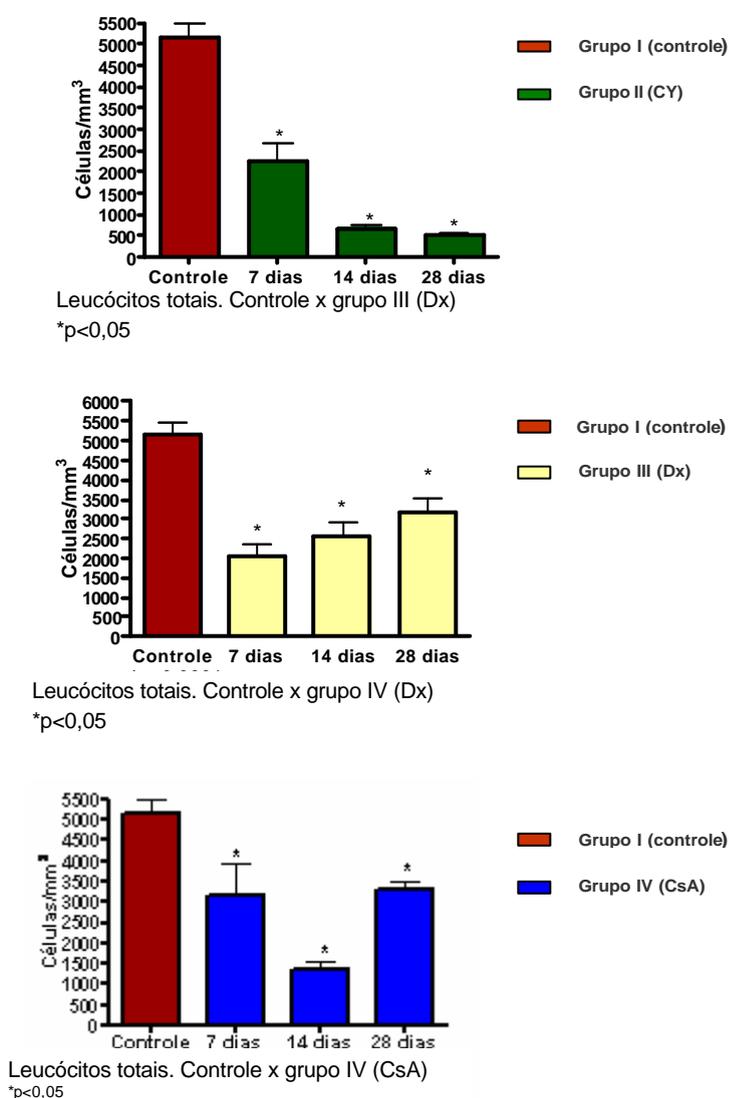


Figura 1. Número total de leucócitos circulantes em camundongos tratados com CY (grupo II), Dx (grupo III) ou CsA (grupo IV) e em camundongos não-tratados (grupo I = controle) aos 7, 14 e 28 dias pós-tratamento. * Valores estatisticamente significantes

Tabela 1 – Leucograma: médias dos leucócitos de acordo com os grupos estudados

Parâmetros Hematológicos	Grupo I (controle)	Grupo II (CY)			Grupo III (Dx)			Grupo IV (CsA)		
		7 dias	14 dias	28 dias	7 dias	14 dias	28 dias	7 dias	14 dias	28 dias
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	5,1 ± 0,8	2,2 ± 0,9*	0,1 ± 0,03*	0,5 ± 0,07*	2,0 ± 0,7*	1,07 ± 0,7*	4,4 ± 1,4*	2,6 ± 1,9*	0,4 ± 0,1*	3,3 ± 0,4*
Linfócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	4,9 ± 0,9	1,8 ± 0,8*	0,6 ± 0,1*	0,4 ± 0,05*	1,2 ± 0,3*	1,5 ± 0,5*	2,3 ± 0,6*	1,9 ± 1,3*	1,5 ± 0,5*	2,5 ± 0,5*
Neutrófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,03	0,8 ± 0,6	1,1 ± 0,7	2,0 ± 1,4	0,8 ± 0,4	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,09
Monócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	0,4 ± 0,1	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,0 ± 0,0	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,0 ± 0,0
Eosinófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	0,04 ± 0,02	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,01 ± 0,01	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,04 ± 0,05	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,02
Basófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Os resultados se referem à média ± desvio padrão.

* Diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$, em relação ao grupo I (controle)

Na contagem diferencial dos leucócitos (Tab. 1) foi observada uma diminuição significativa na porcentagem de linfócitos totais nos grupos II, III e IV quando comparado ao grupo I, nas três datas de sacrifício (Fig. 2).

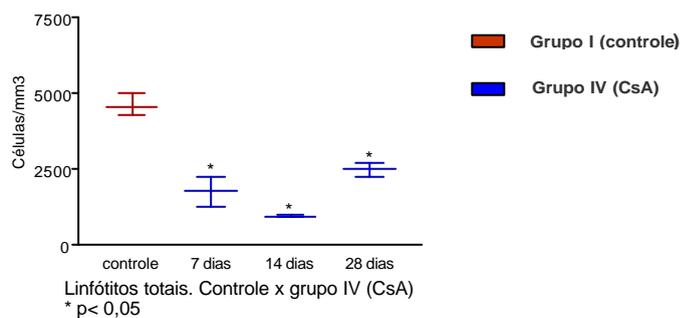
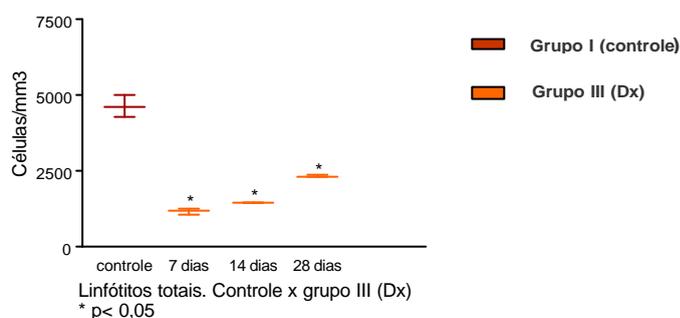
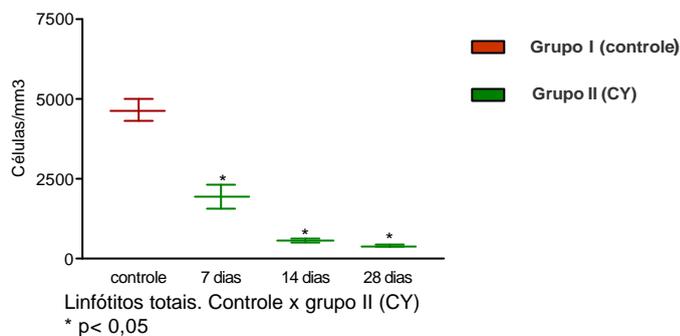


Figura 2. Número de linfócitos totais circulantes em camundongos tratados com CY (grupo II), Dx (grupo III) ou CsA (grupo IV) e em camundongos não tratados (grupo I = controle) aos 7, 14 e 28 dias pós-tratamento.

* Valores estatisticamente significativos

5.2 Análise de Populações Celulares por Citometria de Fluxo

A proporção de linfócitos B CD19⁺ e linfócitos T CD3⁺ dos animais tratados com as drogas (grupos II, III e IV) (Tab. 2) diminuíram significativamente em todas as datas dos sacrifícios, quando comparados com o número de células dos animais do grupo I, que não receberam o tratamento imunossupressor (Fig. 3).

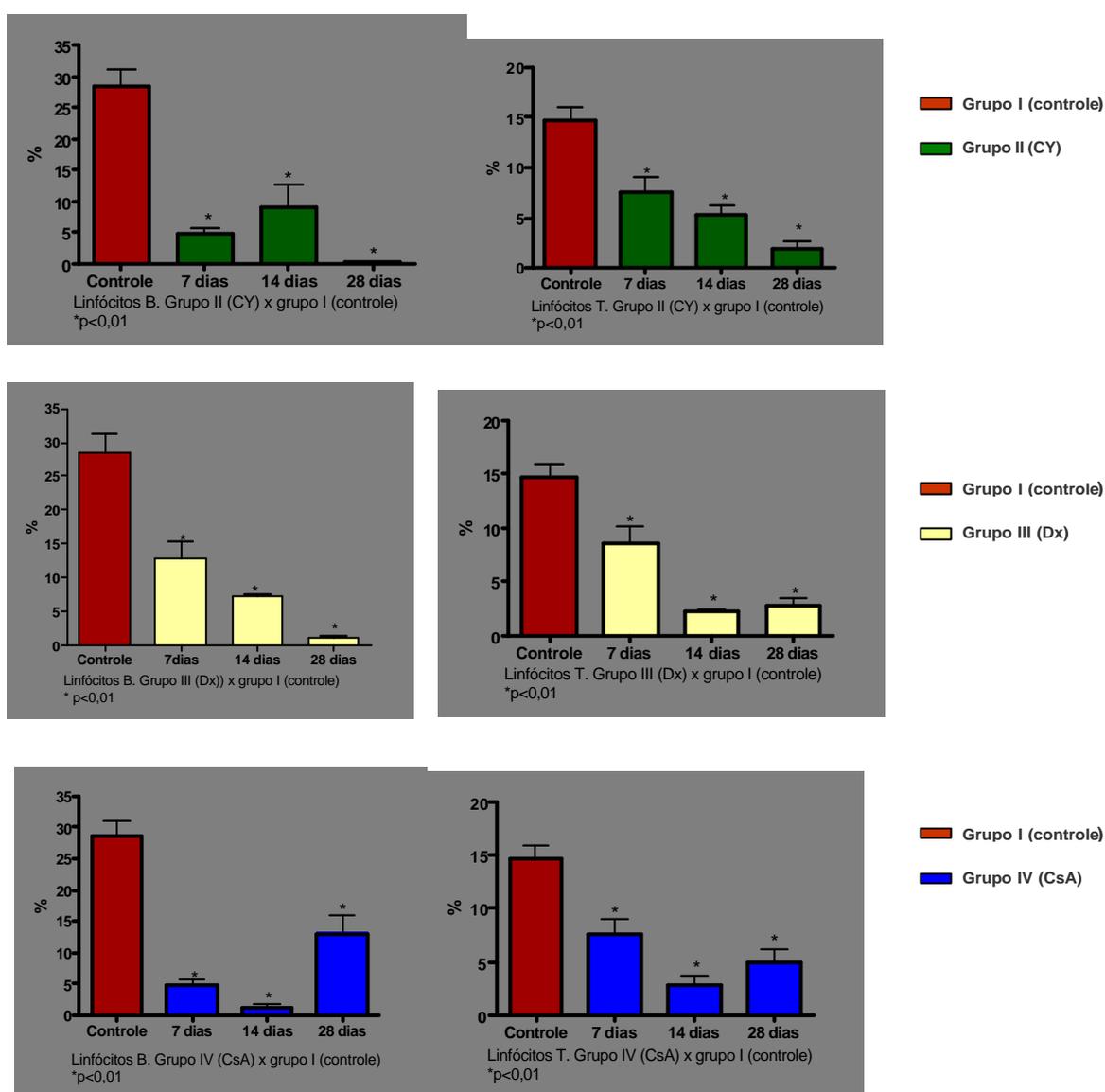


Figura 3. Porcentagem das populações de células B CD19⁺ e T CD3⁺ dos camundongos dos grupos II (CY), III (Dx) e IV (CsA) comparados aos animais do grupo I (controle) e sacrificados aos 7, 14 e 28 dias. * Valores estatisticamente significativos

Tabela 2 – Valores Percentuais de linfócitos T CD3⁺ e B CD19⁺ obtidos por citometria de fluxo

Porcentagem de Linfócitos	Grupo I (controle)	Grupo II (CY)			Grupo III (Dx)			Grupo IV (CsA)		
		7 dias	14 dias	28 dias	7 dias	14 dias	28 dias	7 dias	14 dias	28 dias
Linfócitos T CD3 ⁺ (%)	14,7 ± 3,6	7,6 ± 3,4*	5,3 ± 2,1*	1,9 ± 1,6*	8,6 ± 3,6*	2,2 ± 0,6*	2,7 ± 1,8*	7,6 ± 3,4*	2,8 ± 2,0*	4,9 ± 2,8*
Linfócitos B CD19 ⁺ (%)	28,5 ± 7,4	4,7 ± 2,1*	9,1 ± 7,6*	0,15 ± 0,1*	12,8 ± 5,4*	7,2 ± 1,1*	1,0 ± 0,7*	4,7 ± 2,1*	1,1 ± 1,3*	13,1 ± 6,6*

Os resultados se referem à média ± desvio padrão.

* Diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$, em relação ao grupo I (controle)

5.3 Achados Histopatológicos

O exame histopatológico dos baços dos animais pertencentes aos grupos II e III, sacrificados aos 7 dias, evidenciou uma discreta redução celular da polpa branca, que se tornou mais pronunciada nos animais sacrificados no 14º e 28º dias de experimento. Por sua vez, os animais do grupo IV mostraram discreta redução da polpa branca no 14º e 28º dias de sacrifício. Nos animais do grupo II e III, aos 28 dias, também foi observada uma rarefação das áreas de bainhas linfóides periarteriolares e ausência de folículos linfóides (Fig. 3A, B e C).

A coloração de HE foi eficaz para verificação da ocorrência de células em apoptose. Foi evidente a maior ocorrência de apoptose nos baços dos animais pertencentes ao grupo II e III (Fig. 4) quando comparados aos animais dos grupos I e IV.

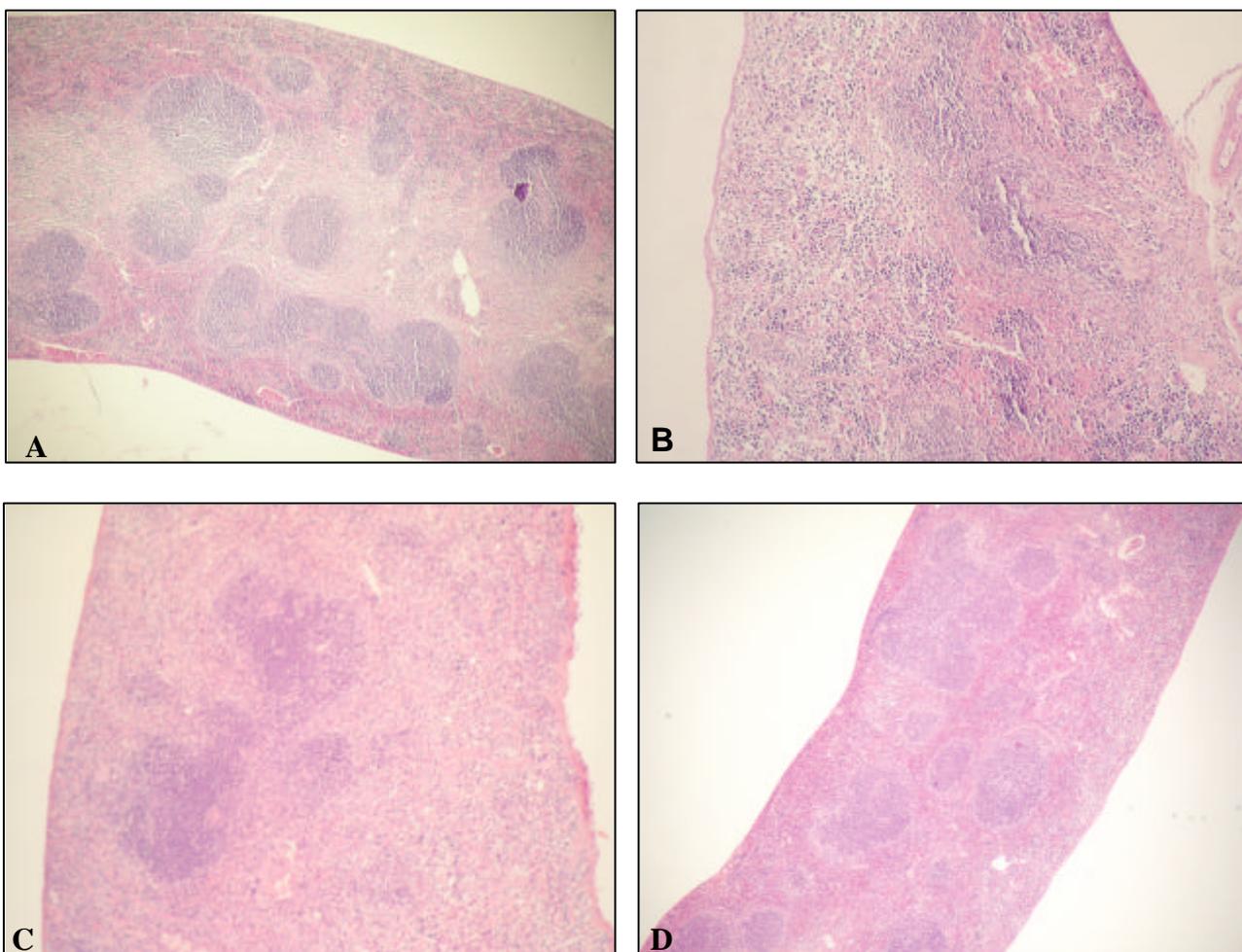


Figura 3. Baço de animais sacrificados aos 28 dias. (A) Animal do grupo I (controle) com evidente integridade da polpa branca. (B e C) Animais dos grupos II e III (CY e Dx, respectivamente) mostrando evidente redução celular na polpa branca com ausência de folículos linfóides. (D) Animal do grupo IV (CsA) com apenas discreta redução celular na polpa branca (40x).



Figura 4. Baço de animais dos grupos II e III mostrando células em apoptose (setas). (A) Animal do grupo II (CY) sacrificados aos 28 dias. (B e C) Animais do grupo III (Dx) sacrificados aos 14 e 28 dias, respectivamente (1000x).

6 DISCUSSÃO

Modelos murinos imunossuprimidos por drogas têm sido utilizados experimentalmente em pesquisas. Apesar do seu uso crescente, tais estudos não têm analisado diretamente o efeito supressor desses fármacos sobre a resposta imune celular e humoral (KERR et al., 1982; RUBINO e WALKER, 1988; BASOMBRÍO et al., 2000). Em experimentos com animais tratados com fármacos supressores da resposta imune, a confirmação do estado imunossupressivo se dá pelo curso de infecções oportunistas, as quais se manifestam de forma grave nestes animais, sendo comparáveis aos modelos animais geneticamente imunodeficientes. Neste sentido, o presente trabalho adiciona à literatura específica esclarecimentos quanto ao envolvimento de alguns elementos da resposta imune em camundongos imunossuprimidos farmacologicamente por CY, Dx e CsA.

LALLO (1998), em um estudo de infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos Balb/c tratados com CsA ou CY, observou que os animais tratados com a CY foram os que mais se aproximaram dos modelos da infecção em animais atímicos e SCID, evidenciados por DIDIER et al. (1994) e KOUDELA et al. (1993), respectivamente. LALLO et al. (2002) trabalhando com infecção experimental em camundongos tratados com Dx, observaram que os animais imunossuprimidos também cursavam com o mesmo quadro clínico de infecção que os camundongos atímicos e SCID.

Os protocolos utilizados nestes trabalhos, tanto para a CsA (10 mg/Kg, 3 vezes por semana) como para a Dx (5 mg/Kg, diariamente) foram os mesmos

da presente investigação, enquanto que para a CY os autores acima utilizaram a dose de 50 mg/Kg e em neste estudo esta foi de 75 mg/kg.

Os resultados do presente trabalho revelaram claramente o efeito imunossupressor dos 3 fármacos evidenciado pela redução no número total de leucócitos circulantes. Essa leucopenia foi consequência da redução significativa dos linfócitos observada na contagem diferencial do sangue periférico. Resultados semelhantes foram observados por ARTYM et al. (2003b) e BALLEARI et al. (1993), em pesquisas realizadas com camundongos imunossuprimidos com CY e por SORIANELLO et al. (2002), estudando ação imunossupressora da CsA e da Dx em ratos.

Diferentes estudos têm demonstrado o efeito imunossupressor da Dx, CY e da CsA em modelos animais, tais como ratos (SORIANELLO et al., 2002), camundongos (MACHADO et al., 1985; TUYAMA et al., 1997; ARTYM et al., 2003a), frangos (ISOBE e LILLEHOJ, 1993), suínos (DROSSLER et al., 1983), felinos (LATIMER et al., 1986) e ovinos (GARCIA et al., 2004b). Essas 3 drogas, apesar de terem mecanismos de ação distintos, são conhecidas como potentes supressores do sistema imunológico.

A CY é um importante agente alquilante que tem efeitos citotóxicos sobre células com alta atividade mitótica. Já é conhecida a sua ação imunossupressora em modelos animais, tais como ovinos (GARCIA et al., 2004b) e suínos (DERBYSHIRE, 1983; DROSSLER et al.; 1983). O uso de CY na presente investigação revelou diminuição das populações de linfócitos T e B circulantes ao longo de todo o período experimental (28 dias) tal como observado por REILLY et al. (1983); ARTYM et al. (2003b); SUN et al. (2004) e BAFNA e MISHRA (2006).

A Dx é um glicocorticóide sintético que possui ação antiinflamatória e supressora sobre o sistema imune, sendo utilizada amplamente em experimentos com ratos e camundongos (CHROUSOS, 1995; BESEDVSKY e REY, 1996). Sua ação fortemente supressora se reflete principalmente na resposta imune celular, devido aos seus efeitos diretos sobre a população de linfócitos T (NORBIATO et al., 1997; KUPERMAN, 2005).

Os resultados observados nesse estudo confirmam esse efeito, mostrando uma diminuição significativa da população de linfócitos T circulantes nos animais do grupo III, tratados com Dx. Também houve uma diminuição significativa da população de linfócitos B CD19⁺ do compartimento circulatório. Trabalhos na literatura têm demonstrado esse efeito supressor da Dx sobre populações de linfócitos B CD19⁺ em camundongos (GARVY et al., 1993; OSMOND et al., 1994) e em humanos (LILL-ELGHANIAN et al., 2002). Adicionalmente, estudos experimentais similares realizados em suínos por GATNAU et al. (1995) e LO et al. (2005) também revelaram uma diminuição significativa da resposta imune humoral através da dosagem de imunoglobulinas.

CsA é uma potente droga imunossupressora utilizada para prevenção de rejeição em casos de transplantes de órgãos e no tratamento de doenças auto-imunes. A CsA inibe a ativação de linfócitos T bloqueando a expressão de vários genes de citocinas, tais como a IL-2 e IL-4, que normalmente são induzidos na ativação dessas células (MATSUDA e KOYASY, 2000; GARCIA et al., 2004a). Apesar dos estudos demonstrarem que a ação da CsA é predominantemente ou exclusivamente limitada a resposta imune mediada por linfócitos T (BOREL et al., 1977; WIESINGER e BOREL, 1980), esta droga

também inibe o processo de formação de anticorpos dependentes de células T, ao passo que para antígenos T-independentes, como o lipopolissacarídeo (LPS), o processo mostra-se pouco afetado (KAHAN, 1985; SHEVACH, 1985; BOREL, 1989).

CHARAN et al. (1986) e ZIMECHI e WIECZOREK (2001), trabalhando com modelos murinos experimentais tratados com CsA, descreveram uma diminuição das imunoglobulinas circulantes caracterizando um estado de supressão da resposta imune humoral. KAIBARA et al. (1983), usando um modelo de ratos com artrite, também evidenciaram essa mesma imunossupressão humoral devido a baixa quantidade de imunoglobulinas verificada nestes animais após o uso de CsA. Contudo em nenhum destes trabalhos foi realizada a quantificação de linfócitos B, sendo que tais achados foram atribuídos à provável redução de interleucinas produzidas por linfócitos T, responsáveis pela ativação dos linfócitos B. Na presente investigação, observou-se uma evidente redução do compartimento celular circulante caracterizado pela diminuição de linfócitos T CD3⁺ corroborando com os dados da literatura. Também se observou uma diminuição significativa do compartimento celular da resposta imune humoral caracterizada pela redução dos linfócitos B CD19⁺. Apesar do mecanismo de ação sobre as populações de linfócitos B não ser conhecido, este estudo demonstra claramente o efeito direto da CsA sobre esta população celular.

Em relação ao exame histopatológico dos baços foi evidenciado nos animais do grupo II e III, tratados respectivamente com CY e Dx, depleção celular com rarefação da bainha linfóide periarteriolar e ausência de folículos linfóides. STOCKMAN et al. (1973) e LALLO (1998), trabalhando com

camundongos imunossuprimidos com CY revelaram achados semelhantes, descrevendo uma evidente atrofia da polpa branca. QUINTANAR-QUINTANAR et al. (2004), em estudo experimental com hamsters e NEISHABOURI et al. (2004), com camundongos, também relataram esse padrão de depleção celular em seus animais imunossuprimidos com Dx, corroborando com os dados da presente investigação.

LALLO (1998), não observou alteração histopatológica compatível com a administração de CsA, em seus animais submetidos ao tratamento com este agente imunossupressor. Nesta investigação, nos animais do grupo IV, imunossuprimidos com CsA, foi observada apenas uma discreta redução celular da polpa branca quando comparados aos animais não tratados.

Estudos experimentais têm demonstrado a ocorrência de apoptose nos baços de animais tratados com CY (BLANKENBERG et al., 2001) e Dx (BATISTA et al., 2005). Os resultados do presente trabalho revelaram maior ocorrência de apoptose nos baços dos animais imunossuprimidos com CY (grupo II) e DX (grupo III) quando comparados aos animais controle (grupo I) e aqueles imunossuprimidos com CsA (grupo IV), podendo assim, atribuir a depleção celular da polpa branca a esse fenômeno nos animais tratados com CY e Dx.

Diante dos resultados apresentados, a utilização de modelos experimentais empregando-se drogas imunossupressoras pode ser uma solução para os que pretendem fazer estudos experimentais em modelos murinos imunodeficientes, já que eles reproduzem as mesmas condições encontradas em animais geneticamente imunossuprimidos. Qualquer um dos

fármacos empregados pode ser escolhido como agente imunossupressivo já que apresentaram resultados semelhantes.

7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitiram concluir que:

- Houve diminuição significativa das populações de linfócitos T e B circulantes nos animais tratados com os 3 agentes imunossupressores – dexametasona (Dx), ciclofosfamida (CY) e ciclosporina (CsA).

- A imunossupressão utilizando os 3 fármacos manteve-se durante todo o período do experimento de 28 dias.

- Houve redução celular discreta a moderada da polpa branca nos baços dos camundongos tratados com Dx e CY e discreta redução celular nos animais tratados com CsA.

- A presença de um grande número de células em apoptose foi observada na polpa branca dos baços dos camundongos tratados com Dx e CY.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LIGHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**.

4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 50p.

ANDERSEN, M.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.;

MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. **Princípios Éticos e Práticos do Uso de**

Animais de Experimentação. 1 ed. São Paulo: UNIFESP – Universidade

Federal de São Paulo, 2004. 122p.

ARTYM, J.; ZIMECKI, M.; PAPROCKA, M.; KRUZEL, M.L. Orally administered

lactoferrin restores humoral immune response in immunocompromised mice.

Immunology Letters, v.89, p.9-15, 2003a.

ARTYM, J.; ZIMECKI, M.; KRUZEL, M.L. Reconstitution of the cellular immune

response by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice is correlated with

renewal of T cell compartment. **Immunobiology**, v.207, p.197-205, 2003b.

BACH, J.F. Immunosuppressive therapy of autoimmune diseases. **Trends in**

Pharmacological Sciences, v.14, p.213-216, 1993.

BAFNA, A.R.; MISHRA, S.H. Immusostimulatory effect of methanol extract of

Curculigo orchioides on immunosuppressed mice. **Journal of**

Ethnopharmacology, v.104, p.1-4, 2006.

BALLEARI, E.; MASSA, G.; MUSSELLI, C.; TIMITILLI, S.; BATTAGLIA, A.;

GHIO, R. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.68, n.3, p.363-367,

1993.

BASOMBRÍO, M.A.; SEGURA, M.A.; GÓMEZ, L.; PADILLA, M. Studies on the

virulence of *Trypanosoma cruzi* using immunodeficient animals. **Memórias do**

Instituto Oswaldo Cruz, v.95, p.175-178, 2000.

BATISTA, J.J.; MARTINS, A.S.; MORO, L.; VASCONCELOS, A.C. Expressão gênica de caspases 3 e 8 em timo e baço de ratas recém-desmamadas e imunossuprimidos por glicocorticóides. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.457-464, 2005.

BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v.17, p.64-102, 1996.

BESSLER, H.; BERGMAN, M.; SALMAN, H.; BEILIN, B.; DJALDETTI, M. The relationship between partial splenectomy and peripheral leukocyte count. **Journal of Surgical Research**, v.122, p.49-53, 2004.

BLANKENBERG, F.G.; NAUMOVSKI, L.; TAIT, J.F.; POST, A.M.; STRAUSS, W. Imaging cyclophosphamide-induced intramedullary apoptosis in rats using ^{99m}Tc -radiolabeled annexin V. **The Journal of Nuclear Medicine**, v.42, p.309-316, 2001.

BOREL, J.F.; FEURER, C.; MAGNÉE, C.; STÄHELIN, H. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. **Immunology**, v.32, p.1017-1025, 1977.

BOREL, J.F. Cyclosporine. *In*: DALE, M.M.; FOREMAN, J.C. **Textbook of Immunopharmacology**. 2. ed. Oxford: Blackwell, 1989. p.300-311.

BYRNE, K.M.; KIM, H.W.; CHEW, B.P.; REINHART, G.A.; HAYEK, M.G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.73, p.167-182, 2000.

CALABRESI, P.; PARKS, J.R. **Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p.817-856.

CASTRO, J.M. **Eficácia do albendazol, sulfóxido de albendazol, metronidazol e ciclosporina no tratamento da infecção experimental pelo Encephalitozoon cuniculi (protozoa: microspora) em camundongos balb/c imunossuprimidos com ciclofosfamida.** 1999. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

CHABNER, B.A.; ALLEGRA, C.J.; CURT, G.A.; CALABRESI, P. **Goodman & Gilman's – the pharmacological basis of therapeutics.** 9 ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p.1233-1287.

CHARAN, S.; HUEGIN, A.W.; CERNY, A.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. Effects of cyclosporin A on humoral immune response and resistance against vesicular stomatitis virus in mice. **Journal of Virology**, v.57, p.1139-1144, 1986.

CHROUSOS, G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v.20, p.1351-1362, 1995.

COUNIHAN, T.J.; FEIGHERY, C. Immunosuppressive therapy in autoimmune disease - a review. **Irish Journal of the Medical Science**, v.160, p.199-205, 1991.

CRABTREE, G.R. Contingent genetic regulatory events in T-lymphocyte activation. **Science**, v.258, p.478–480, 1989.

DERBYSHIRE, J.B. The effect of immunosuppression with cyclophosphamide on an experimental porcine enterovirus infection in piglets. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.47, p.235-237, 1983.

DIDIER, E.S.; VARNER, P.W.; DIDIER, P.J.; ALDRAS, A.M.; MILLICHAMP, N.J.; MURPHEY-CORB, M.; BOFM, R.; SHADDUCK, J.A. Experimental

microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. **Folia Parasitologica**, v.41, p.1-11, 1994.

DROSSLER, K.; PARKER, D.; TURK, J.L. The effect of cyclophosphamide on immunological memory. **Immunopharmacology**, v.6, p.123-132, 1983.

FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V.J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.20, p.28-34, 2005.

FRANKFURT, O.; ROSEN, S.T. Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates. **Current Opinion in Oncology**, v.15, p.552-563, 2004.

GARCIA, S.C.; LOPES, L.S.; SCHOT, K.L.; BECK, S.T.; POMBLUM, V.J. Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, p.393-401, 2004a.

GARCIA, M.; SERTÓRIO, S.P.; ALVES, G.J.; CHATE, S.C.; CARNEIRO, R.; LALLO, M.A. Uso da ciclofosfamida em modelo de imunossupressão experimental em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, p.115-9, 2004b.

GARVY, B.A.; TELFORD, W.G.; KING, L.E.; FRAKER, P.J. Glucocorticoid and irradiation induced apoptosis in normal murine bone marrow B-lineage lymphocytes as determined by flow cytometry. **Immunology**, v.79, p.270-277, 1993.

GATNAU, R.; ZIMMERMAN, D.R.; NISSEN, S.L.; WANNEMUEHLER, M.; R.C. EWAN. Effects of excess dietary leucine and leucine catabolites on growth and immune responses in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.73, p.159-165, 1995.

GAYNON, P.S.; LUSTIG, R.H. The use of glucocorticoids in acute lymphoblastic leukemia of childhood. Molecular, cellular, and clinical

considerations. **Journal of pediatric hematology/oncology: official journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology**, v.17, p.1-12, 1995.

GAYNON, P.S.; CARREL, A.L. Glucocorticosteroid therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.457, p.593-605, 1999.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Kuby Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 35p.

GRINDEM, C.B. Blood cell markers. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.26, p.1043-1065, 1996.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.813-815.

ISOBE, T.; LILLEHO, H.S. Dexamethasone suppresses T cell-mediated immunity and enhances disease susceptibility to *Eimeria mivati* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.39, p.431-446, 1993.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia – O Sistema Imune na Saúde e na Doença**. 5 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2001. 15p.

KAHAN, B.D. Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. **Transplantation**, v.40, p.457-476, 1985.

KAIBARA, N.; HOTOKEBUCHI, T.; TAKAGISHI, K.; KATSUKI, I. Paradoxical effects of cyclosporin A on collagen arthritis in rats. **The Journal of Experimental Medicine**, v.158, p.2007-2015, 1983.

KERR, I.B.; COSTA, S.C.G.; ALENCAR, A. Experimental paracoccidioidomycosis in immunosuppressed mice. **Immunology Letters**, v.5, p.151-154, 1982.

KOLLER, L.D. Chemical-induced immunomodulation. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.181, p.1102-1106, 1982.

KOUDELA, B.; VÍTOVEC, J.; KUCEROVÁ, Z.; DITRICH, O.; TRÁNICEK, J. The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. **Folia Parasitologica**, v.40, p.279-86, 1993.

KROP, I.; SHAFFER, A.L.; FEARON, D.T.; SCHLISSEL, M.S. The signaling activity of murine CD19 is regulated during B cell development. **Journal of Immunology**, v.157, p.48-56, 1996.

KUPERMAN, H. **Estudo duplo-cego comparativo entre prednisona e dexametasona na avaliação da reserva adrenal em crianças e adolescentes com leucemia linfocítica aguda**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

LAI, L.; ALAVERDI, N.; MALTAIS, L.; MORSE, H.C. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. **Journal of Immunology**, v.160, p.3861-3868, 1998.

LALLO, M.A. **Estudo da infecção experimental pelo Encephalitozoon cuniculi em camundongos Balb-c tratados com ciclofosfamida ou ciclosporina**. 1998. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

LALLO, M.A.; SANTOS, M.J.; BONDAN, E.F. Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. **Revista de Saúde Pública**, v.36, p.621-626, 2002.

LATIMER, K.S.; RAKICH, P.M.; PURSWELL, B.J.; KIRCHER, I.M. Effects of cyclosporin a administration in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.11, p.161-173, 1986.

LEE, J.K.; BYUN, J.A.; PARK, S.H.; KIM, H.S.; PARK, J.H.; EOM, J.H.; OH, H.Y. Evaluation of the potential immunotoxicity of 3-monochloro-1,2-propanediol in Balb/c mice I. Effect on antibody forming cell, mitogen-stimulated lymphocyte proliferation, splenic subset, and natural killer cell activity. **Toxicology**, v.204, p.1-11, 2004.

LILL-ELGHANIAN, D.; SCHWARTZ, K; KING, L.; FRAKER, P. Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow. **Experimental Biology and Medicine**, v.227, p.763-770, 2002.

LO, D.Y.; LEE, W.M.; CHIEN, M.S.; LIN, C.C.; LEE, W.C. Effects of dexamethasone on peripheral blood mononuclear cell phenotype in weanling piglets. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.28, p.251-258, 2005.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S,L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Biologia Celular e Molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 882p.

MACHADO, L.R.; FECCHIO, D.; LIMONGI, J.C.P.; BERGER, A.; LIVRAMENTO, J.A., SPINA-FRANÇA, A. Neurocriptococose e imunossupressão. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v.43, p.29-38, 1985.

MATSUDA, S.; MORIGUCHI, T.; KOYASU, S.; NISHIDA, E. T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin. A. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.12378–12382, 1998.

MATSUDA, S.; KOYASU, S. Mechanisms of action of cyclosporine. **Immunopharmacology**, v.47, p.119–125, 2000.

MATTILA, P.S.; ULLMAN, K.S.; FIERING, S.; EMMEL, E.A.; MC-CUTCHEON, M.; CRABTREE, G.R.; HERZENBERG, L.A. The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. **The EMBO Journal**, v.9, p.4425–4433, 1990.

MILLER, O.; BONJES, B.F.; NEGREIROS, E.B.; ROXO, E.; PEDRAS, M.P.C.V.; BELLIS, M.A. **Farmacologia Clínica e Terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1977. 693p.

NEISHABOURI, E.Z.; HASSAN, Z.M.; AZIZI, E.; OSTAD, S.N. Evaluation of immunotoxicity induced by diazinon in C57bl/6 mice. **Toxicology**, v.196, p.173-179, 2004.

NORBIATO, G.; BEVILACQUA, M.; VAGO, T. Glucocorticoids and the immune system in AIDS. **Psychoneuroendocrinology**, v.22, p.19-25, 1997.

OSMOND, D.; RICO-VARGAS, S.; VALENZONA, H.; FANTEUX, L.; LIU, L.; JANANI, R.; LU, JANANI, R.; LU, L.; JACOBSEN, K. Apoptosis and macrophage mediated cell deletion in the regulation of B lymphopoiesis in mouse bone marrow. **Immunology Reviews**, v.142, p.209-230, 1994.

PEREIRA, V.R.A.; LORENA, V.M.B.; SILVA, A.P.G.; NAKAZAWA, M.; SILVA, E.D.; FERREIRA, A.G.P.; MONTARROYOS, U.; COUTINHO, E.M.; GOMES, Y.M. Avaliação hematológica e histopatológica de camundongos BALB/c e C57BL/6 expostos aos antígenos recombinantes *Cytoplasmic Repetitive Antigen* e *Flagellar Repetitive Antigen* de *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.739-742, 2003.

QUINTANAR-QUINTANAR, M.E.; JARILLO-LUNA, A.; RIVERA-AGUILAR, V.; VENTURA-JUÁREZ, J.; TSUTSUMI, V.; SHIBAYAMA, M.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R. Immunosuppressive treatment inhibits the development of

amebic liver abscesses in hamsters. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v.10, p.317-324, 2004.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 311p.

RAO, A.; LUO, C.; HOGAN, P.G. Transcription factors of the NF-AT family: regulation and function. **Annual Review of Immunology**, v.15, p.707-747, 1997.

REILLY, M.F.; WHITE, K.L.; BRADLEY, S.G. Host resistance of mice to *Naegleria fowleri* infections. **Infection and Immunity**, v.42, p.645-652, 1983.

REZZANI, R. Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v.39, p.85-128, 2004.

RINCON, M.; FLAVELL, R.A. AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. **The EMBO Journal**, v.13, p.4370–4381, 1994.

RIVAS, A.L.; LETWIN B.; GREENLEE P.; LOPEZ J.; FADDEN M.; QUIMBY F. Characterization of monoclonal antibodies directed to canine T lymphocyte markers expressed during development. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 51, p.1-11, 1996.

ROITT, D.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2001. 294p.

ROSA, L.F.P.B.C.; VAISBERG, M.W. Influências do exercício na resposta imune. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v.8, p.167-172, 2002.

RUBINO, M.J.; WALTER, D. Immunosuppression and murine polyomavirus infections. **Virus Research**, v.9, p.1-10, 1988.

SATO, S.; MILLER, A.S.; HOWARD, M.C.; TEDDER, T.F. Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19. **Journal of Immunology**, v.159, p.3278-3287, 1997.

SEYDEL, K.B.; STANLEY, S.L. SCID mice and study of parasitic disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, p.126-134, 1996.

SHEVAC, E.M. The effects of cyclosporin A on the immune system. **Annual Review of Immunology**, v.3, p.397-423, 1985.

SHIBASAKI, F.; PRICE, E.R.; MILIAN, D.; McKEON, F. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. **Nature**, v.382, p.370-373, 1996.

SORIANELLO, E.; SCHILLACI, R.; CHAMSON-REIG, A.; LUX-LANTOS, V.; LIBERTUN, C. Actions of immunosuppressor drugs on the development of an experimental ovarian tumor. **Experimental Biology and Medicine**, v.227, p.658-664, 2002.

STANLEY, S.L.; VIRGIN, H.W. SCID mice as models for parasitic infections. **Parasitology Today**, v.9, n.11, p.407-411, 1993.

STOCKMAN, G.D.; HEIM, L.R.; SOUTH, M.A.; TRENTIN, J.J. Differential effects of cyclophosphamide on the B and T cell compartments of adult mice. **The Journal of Immunology**, v.110, p.277-282, 1973.

SU, B.; JACINTO, E.; HIBI, M.; KALLUNKI, T.; KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. **Cell**, v.77, p.727-736, 1994.

SUN, D.; KRISHNAN, A.; SU, J.; LAWRENCE, R.; ZAMAN, K.; FERNANDES, G. Regulation of immune function by calorie restriction and cyclophosphamide treatment in lupus-prone NZB/NZW F1 mice. **Cellular Immunology**, v.228, n.1, p.54-65, 2004.

TURK, J.L. Immunosuppressive agents. *In*: DALE, M.M.; FOREMAN, J.C. **Textbook of Immunopharmacology**, 2. ed. Oxford: Blackwell, 1989. p.312-319.

TUYAMA, A.; NETO, F.N.; LMA, J.S.V.; RIBEIRO, L.; CONDÉ, M.L.; ANDRADE, L.C.F.; BASTOS, M.G. Imunossupressão por diferentes drogas na reação de hipersensibilidade retardada à ovalbumina. **Revista Juiz de Fora**, v.23, p.11-22, 1997.

ZIMECKI, M.; Wieczorek, z. Differential patterns of cyclosporine A-induced inhibition of humoral and cellular immune responses to sheep erythrocytes in mice. **Polish Journal of Pharmacology**, v.53, p.495-500, 2001.

WIESINGER, D.; BOREL, J.F. Studies on the mechanism of action of cyclosporin A. **Immunobiology**, v.156, p.454-463, 1980.

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](#)