

Camila Takáo Lopes

## Modelos Experimentais em Transplante

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo –  
Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de  
Mestre em Ciências

São Paulo

2009

Camila Takáo Lopes

## Modelos Experimentais em Transplante

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo –  
Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de  
Mestre em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Valquiria Bueno

Coordenadora: Profa. Dra. Mirian Aparecida Boim

São Paulo

2009

Lopes, Camila Takáo

**Modelos Experimentais em Transplante** / Camila Takáo Lopes -- São Paulo, 2009.  
101 p.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Nefrologia

**Experimental Models in Transplantation**

1. Transplante; 2. Rejeição; 3. Imunossupressão; 4. Nefrotoxicidade

Este trabalho foi realizado na Disciplina de Nefrologia, Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, sob a orientação da Profa. Dra. Valquiria Bueno.

Apoio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo  
(FAPESP)

“Ninguém está pedindo para que sejamos sublimes – apenas sérios, confiáveis e persistentes.”

(Eleanor Chelimsky)

Dedico este trabalho aos meus pais, Helena e Antonio Lopes

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Valquiria Bueno, por confiar e investir no meu potencial desde a graduação, pelo tempo dedicado a mim, pela oportunidade de acesso à pesquisa, pelo exemplo de perseverança e seriedade e pela amizade.

Ao Prof. Dr. José Daniel Lopes, às Profas. Dras. Célia Regina Whitaker Carneiro e Ieda Longo Maugéri, pela receptividade na Disciplina de Imunologia do Departamento de Micro Imuno Parasitologia.

À Profa. Dra. Ieda Maria Longo Maugéri, novamente, pela disponibilização de espaço e de tempo em seu laboratório, acolhimento e apoio intelectual.

À Coordenação de Pós Graduação da Disciplina de Nefrologia do Departamento de Medicina, por oportunizar meu ingresso na pós-graduação.

Aos professores da Disciplina de Imunologia já citados e aos Drs. Alexandre Salgado Basso, Miriam Galvonas Jasiulionis, Zulma Fernandes Peixinho, Mario Mariano e Elaine Guadalupe Rodrigues, pelos ensinamentos e exemplos de profissionais e pesquisadores.

Ao Prof. Dr. José Antonio Cordeiro, pela colaboração, atenção, pelos esclarecimentos e pela análise estatística.

Ao Prof. Dr. Marcello Fabiano Franco, pela colaboração, atenção, pelos esclarecimentos e pela análise histológica.

À Profa. Dra. Guiomar Nascimento Gomes, pela atenção e disponibilização de espaço no laboratório de Fisiologia Renal e biotério.

A Flávia Cristina Rosin, pela amizade e apoio, pelas horas de trabalho, estudo, almoços e conversas.

A Natália Regina Antunes Salinas, pela amizade, pelas horas de trabalho e pelo exemplo de superação.



À pós-graduanda Thais Maria da Fonseca Pletizkaitz, pela amizade, paciência e pelo estimado ensino das técnicas de avaliação de parâmetros renais.

Aos Drs. André Luis Lacerda Bachi, Carla Cristina Squaiella e Juliana Sequeres Mussalem, pela amizade, disponibilidade, pelo ensino de técnicas, conselhos e exemplo de pós-graduandos.

Aos pós-graduandos Paula Sola, Adriana Taveira, Mariana Toricelli, Fernanda Molognoni, Fabiana Melo, Fabiana Meliso, Alice Santana, Maria Carolina Azevedo, Helena Oliveira, Anuska Alvares, Márcia Guerreschi, Bruno Vivanco e Carolina L'Abbate, pela amizade, pelo apoio e pelas discussões durante os cursos e as reuniões científicas.

A todos os funcionários da Disciplina de Imunologia, em especial Geová, Aparecido, Daniela Teixeira, Ivone, Cláudia e Creusa, pela prestatividade, tornando a trajetória mais fácil.

Aos secretários da Disciplina de Nefrologia, Pablo, Michael e Priscila, pela estimada ajuda nos momentos de dúvida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro que viabilizou minha dedicação exclusiva a este trabalho.

Aos meus pais, mais uma vez, pelo apoio incondicional, pela preocupação e pelos conselhos.

Ao José Luiz, pela convivência, pelo apoio e pelos conselhos, e por ter me ouvido todos os dias.

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas .....	XIII
Lista de figuras .....	XVI
Lista de Tabelas .....	XVII
Lista de anexos .....	XVIII
<b>RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
1.1. Imunossupressão em Transplantes – aspectos gerais .....	3
1.2. Dinâmica dos Linfócitos .....	9
1.3. FTY720 – Histórico e Mecanismos de Ação Propostos .....	12
1.4. FTY720 – Transplante e Toxicidade Renal .....	20
1.5. Sirolimus – Transplante e Toxicidade Renal .....	23
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
2.1. Objetivos gerais .....	26
2.2. Objetivos específicos .....	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1. Animais.....	27
3.2. Drogas e Desenho do Estudo .....	27
3.3. Transplante de Pele .....	29
3.4. Avaliação dos Parâmetros Imunológicos .....	30
3.5. Avaliação do Número de Leucócitos no Sangue Periférico .....	30
3.6. Avaliação do Número de Linfócitos nos Linfonodos Drenantes .....	30
3.7. Avaliação do Número de Timócitos .....	31
3.8. Avaliação do Número de Esplenócitos .....	31
3.9. Avaliação das Células no Enxerto .....	32

3.10. Avaliação da Expressão das Moléculas CD3, CD4, CD8 e CD11b por Citometria de Fluxo .....	32
3.11. Avaliação dos Parâmetros Urinários .....	33
3.12. Avaliação dos Parâmetros Sanguíneos .....	33
3.13. Dosagem das Concentrações Urinária e Sérica de Creatinina .....	33
3.14. Dosagem da Concentração Sérica de Uréia .....	35
3.15. Dosagem de Proteinúria .....	36
3.16. Análise Estatística .....	37
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
4.1. Sobrevida dos Animais e Variação da Massa Corpórea .....	38
4.2. Sobrevida do Aloenxerto de Pele .....	39
4.3. Fatores Associados ao Aumento da Sobrevida do Aloenxerto de Pele .....	39
4.3.1. Células no Sangue Periférico .....	39
4.3.1.1. Fenótipo das Células no Sangue Periférico .....	40
4.3.2. Células no Baço .....	41
4.3.2.1. Fenótipo das Células no Baço .....	42
4.3.3. Células nos Linfonodos Drenantes .....	43
4.3.3.1. Fenótipo das Células nos Linfonodos Drenantes .....	44
4.3.4. Células no Timo .....	44
4.3.4.1. Fenótipo das Células no Timo .....	45
4.3.5. Células no Enxerto .....	46
4.3.5.1. Fenótipo das Células no Enxerto .....	46
4.4. Parâmetros Renais .....	52
4.4.1. Parâmetros urinários .....	52
4.4.2. Parâmetros sanguíneos .....	52

4.4.3. Clearance de Creatinina .....	52
4.4.4. Histologia Renal .....	53
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>
<b>8. APÊNDICE .....</b>	<b>92</b>
<b>9. ABSTRACT .....</b>	<b>100</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APCs</b>	Células Apresentadoras de Antígeno
<b>AZA</b>	Azatioprina
<b>CCL</b>	Família de quimiocinas com resíduos de cisteína consecutivas na extremidade N-terminal
<b>CXCR, CCR</b>	Receptores de Quimiocinas
<b>CD</b>	Grupamento de Diferenciação
<b>CD62L</b>	L-selectina
<b>CICr</b>	Clearance de Creatinina
<b>CNIs</b>	Inibidores de Calcineurina
<b>CsA</b>	Ciclosporina
<b>CXCL</b>	Família de quimiocina em que outro aminoácido se situa entre as duas cisteínas na extremidade N-terminal
<b>DCs</b>	Células Dendríticas
<b>DT</b>	Ducto torácico
<b>FTY</b>	FTY720
<b>FTY-P</b>	FTY720-fosfato
<b>GM-CSF</b>	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos-Macrófagos
<b>HEV</b>	Vênulas de Endotélio Alto
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.v.</b>	Via intravenosa
<b>ICAM-1</b>	Molécula de Adesão Intercelular 1
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IFN</b>	Interferon

<b>LCMV</b>	Vírus da Coriomeningite Linfocítica
<b>LFA-1/CD11a</b>	Antígeno Associado a Função de Linfócito 1
<b>LNs</b>	Linfonodos
<b>LNP</b>	Linfonodos Periféricos
<b>LNM</b>	Linfonodos Mesentéricos
<b>MHC</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade
<b>MHC II</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II
<b>MMF</b>	Micofenolato Mofetil
<b>MPA</b>	Ácido Micofenólico
<b>mTOR</b>	Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos
<b>MTTF</b>	Tempo Médio até Rejeição
<b>NFAT</b>	Fator Nuclear de Células T Ativadas
<b>NK</b>	Células Assassinas Naturais
<b>PP</b>	Placas de Peyer
<b>PRED</b>	Prednisona
<b>S1P</b>	Esfingosina-1-Fosfato
<b>S1PR</b>	Receptor de Esfingosina-1-Fosfato
<b>S1P<sub>1</sub></b>	Receptor 1 de Esfingosina-1-Fosfato
<b>S1P<sub>2</sub></b>	Receptor 2 de Esfingosina-1-Fosfato
<b>S1P<sub>3</sub></b>	Receptor 3 de Esfingosina-1-Fosfato
<b>S1P<sub>4</sub></b>	Receptor 4 de Esfingosina-1-Fosfato
<b>S1P<sub>5</sub></b>	Receptor 5 de Esfingosina-1-Fosfato
<b>SLO</b>	Órgãos Linfóides Secundários
<b>SphK</b>	Esfingosina Quinase
<b>SRL</b>	Sirolimus

<b>Tac</b>	Tacrolimus
<b>TCR</b>	Receptor de Células T
<b>TFG</b>	Taxa de Filtração Glomerular
<b>Th1</b>	Células T auxiliaadoras do tipo 1
<b>Th2</b>	Células T auxiliaadoras do tipo 2
<b>Treg</b>	Células T reguladoras
<b>v.o.</b>	Via Oral

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Variação da média de massa corpórea ao longo de 21 dias de acompanhamento.....38
- Figura 2.** Visão macroscópica do processo de rejeição do enxerto (a); Sobrevida do enxerto (b); Dot plots representativos do grupo FTY+SRL mostrando a porcentagem de linfócitos T (c); Células TCD4+, TCD8+ e CD11b+ infiltrantes no enxerto (d).....47
- Figura 3.** Porcentagem de células no sangue periférico. (a) linfócitos; (b) neutrófilos; (c) monócitos; (d) células CD3+CD4+; (e) células CD3+CD8+; (f) células CD11b+ no gate de linfócitos; (g) células CD11b+ no gate de monócitos/granulócitos.....48
- Figura 4.** Número de células no baço. (a) esplenócitos totais; (b) esplenócitos CD3+CD4+; (c) esplenócitos CD3+CD8+; (d) esplenócitos CD11b+ no gate de linfócitos; (e) esplenócitos CD11b+ no gate de monócitos/granulócitos.....49
- Figura 5.** Número de células nos linfonodos axilares. (a) células totais; (b) células CD3+CD4+; (c) células CD3+CD8+.....50
- Figura 6.** Número de células no timo. (a) timócitos totais; (b) timócitos CD3+CD4+; (c) timócitos CD3+CD8+; (d) timócitos CD4+CD8+.....51
- Figura 7.** (a) Concentração sérica de creatinina e (b) Clearance de creatinina; (c) Secções renais coradas com H&E de animais representativos.....54



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Volume urinário 24 horas, concentração urinária de creatinina (UCr), concentração urinária de proteína (UPr) e concentração sérica de uréia. Os dados são mostrados como mediana (Q3-Q1).....	53
--	----

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1. Anexo 1.</b> Dot plots representativos da avaliação de populações no sangue periférico (A), baço(B), linfonodos (C) e timo (D) no gate de linfócitos 5 dias após o transplante de pele.....	92
<b>Anexo 2.</b> Sobrevida do aloenxerto de pele durante em cada animal durante 17 dias de acompanhamento.....	93
<b>Anexo 3.</b> Porcentagem de células no enxerto em cada animal 5 dias após o transplante de pele.....	94
<b>Anexo 4.</b> Porcentagem de leucócitos no sangue periférico em cada animal 5 dias após o transplante de pele. Linfócitos (Lφs), Neutrófilos (Nφs) e Monócitos (Mφs)..	95
<b>Anexo 5.</b> Número de linfócitos ( $\times 10^6$ ) no baço em cada animal 5 dias após o transplante de pele.....	96
<b>Anexo 6.</b> Número de linfócitos ( $\times 10^6$ ) nos linfonodos drenantes em cada animal 5 dias após o transplante de pele.....	97
<b>Anexo 7.</b> Número de células ( $\times 10^6$ ) no timo em cada animal 5 dias após o transplante de pele.....	98
<b>Anexo 8.</b> Parâmetros urinários e sanguíneos em cada animal após 21 dias de acompanhamento.....	99

## RESUMO

A associação de novos compostos a doses menores das drogas imunossupressoras já utilizadas em transplante pode aumentar o potencial das mesmas na prevenção de episódios de rejeição e causar menos efeitos colaterais. Sirolimus (SRL) aumenta a sobrevida de aloenxertos ao bloquear a proliferação das células T ativadas, porém acarreta efeitos colaterais como hipertensão, edema periférico e proteinúria. FTY720 (FTY), um novo imunomodulador, aumenta a sobrevida de aloenxertos em modelos experimentais impedindo a migração de linfócitos para o sítio inflamatório (enxerto) sem prejudicar sua ativação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevida do aloenxerto de pele murino parcialmente compatível (doador F1 e receptor C57BL/6) na vigência da administração prolongada (21 dias) de FTY+SRL, os eventos imunológicos associados à sobrevida do aloenxerto e os efeitos da administração dessas drogas sobre parâmetros renais.

A sobrevida do aloenxerto foi significativamente aumentada pela administração das drogas de maneira isolada ( $p < 0,0005$ ) ou em combinação ( $p < 0,0005$ ), havendo somente um episódio de rejeição no grupo tratado com FTY+SRL. A maior sobrevida esteve associada a menor porcentagem de linfócitos no sangue periférico ( $p < 0,005$ ) devido a menores porcentagens de linfócitos CD3+CD4+ ( $p < 0,005$ ) e CD3+CD8+ ( $p < 0,005$ ). Por outro lado, a porcentagem de células CD11b+ esteve significativamente aumentada ( $p < 0,005$ ). Nos linfonodos, o grupo tratado com FTY+SRL apresentou diminuição significativa do número de linfócitos CD3+CD4+ ( $p < 0,005$ ) e de linfócitos CD3+CD8+ ( $p < 0,005$ ). No baço, houve diminuição do número de células totais ( $p < 0,005$ ) devido à diminuição do número de linfócitos CD3+CD4+ ( $p < 0,005$ ) e CD3+CD8+ ( $p < 0,005$ ) e de células CD11b+ ( $p < 0,005$ ). No

timo, houve diminuição significativa do número de timócitos ( $p < 0,005$ ) no grupo tratado com FTY+SRL devido a uma diminuição do número de células CD4+CD8+ ( $p < 0,005$ ). No enxerto, o tratamento com FTY+SRL diminuiu significativamente a porcentagem de células CD3+CD4+ ( $p < 0,05$ ) e apresentou uma tendência à diminuição da porcentagem de células CD11b+ ( $p = 0,056$ ). A concentração sérica de creatinina esteve aumentada nos animais tratados com FTY+SRL ( $p < 0,05$ ), porém não houve alterações quanto ao volume urinário 24 horas, concentrações de proteína ou creatinina urinárias ou alterações estruturais.

Em suma, a combinação FTY+SRL foi eficaz em aumentar a sobrevida do aloenxerto de pele murino em uma combinação parcialmente compatível. Os eventos imunológicos sugeridos associados a este achado foram a diminuição do número de células CD3+CD4+ e CD3+CD8+ no sangue periférico; a retenção das células apresentadora de antígeno (CD11b+) do receptor no sangue periférico, impedindo sua migração para os linfonodos e baço, reduzindo a atividade aloestimulatória das células T naive do hospedeiro; o prejuízo da migração das DCs do doador para os órgãos linfóides secundários e consequente prejuízo da apresentação de antígenos; a prevenção do egresso de timócitos maduros para a periferia e apoptose dos timócitos CD4+CD8+ imaturos; a possível seleção de células infiltrantes no enxerto com fenótipo regulador. A combinação de drogas não esteve associada a prejuízo da função ou estrutura renais.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Imunossupressão em transplante – aspectos gerais

O transplante de órgãos é uma intervenção terapêutica eficaz em indivíduos com doenças terminais de coração, pulmão, fígado, rim e intestino. A maior experiência da equipe transplantadora e os avanços no manejo imunológico, nas técnicas cirúrgicas, nos cuidados intensivos e no desenvolvimento de novos medicamentos imunossupressores tiveram grande impacto no progresso dessa modalidade terapêutica<sup>1</sup>. A função adequada da maioria dos órgãos transplantados ultrapassa 5 anos e, em 40 anos, reduziu-se a incidência de rejeição aguda de mais de 70% para menos de 20%, e elevou-se a sobrevida de 40% para aproximadamente 90% no primeiro ano de transplante<sup>2</sup>. Os imunossupressores modulam diferentes etapas da resposta imunológica ao aloenxerto, causam imunossupressão não-específica e todos acarretam efeitos colaterais específicos<sup>3</sup>. O objetivo atual na área dos transplantes é o desenvolvimento de protocolos imunossupressores menos tóxicos, com combinação de drogas que possam minimizar o risco e a incidência de rejeição aguda e crônica, além de causar menos efeitos colaterais<sup>4,5</sup>.

O modelo experimental de transplante de pele pode ser convenientemente usado para esclarecer os efeitos e o mecanismo de ação de novas drogas imunossupressoras devido à sua maior imunogenicidade comparado a outros tecidos, implicando necessidade de potente imunossupressão para prevenir a rejeição, e ao baixo custo de execução<sup>6</sup>. Não é totalmente clara a razão para a maior imunogenicidade da pele. Algumas das explicações incluem o processo de revascularização, a drenagem linfática e a presença de antígenos teciduais

específicos<sup>7</sup>. Na pele, células de Langerhans epidérmicas e células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*) dérmicas apresentadoras de antígeno desempenham um papel essencial na imunidade cutânea<sup>8</sup>. É importante a migração das células de Langerhans para os linfonodos (LNs) drenantes na iniciação do processo de rejeição: apesar de poucas, tais células induzem proliferação significativa de linfócitos em transplantes de pele alogênico e congênito<sup>7</sup>. É importante também o tamanho do enxerto na determinação da suscetibilidade à rejeição, fatores inversamente proporcionais<sup>6</sup>. A resposta imunológica ao aloenxerto de pele consiste em dois componentes: destruição inflamatória antígeno-não-específica da epiderme e destruição antígeno-específica dos componentes celulares da derme. Apesar da intensa resposta inflamatória que acompanha as respostas de rejeição *in vivo*, é o mecanismo efetor antígeno-específico que determina se o aloenxerto será aceito ou rejeitado<sup>9</sup>.

No alotransplante de pele, as células de Langerhans entram em contato com o antígeno e o levam ao encontro dos linfócitos nos LNs, sobretudo os drenantes. Após o transplante de pele no dorso do animal, espera-se, portanto, aumento no número e ativação dos linfócitos nos dias 4 e 5 pós-transplante nos LNs axilares<sup>10</sup>.

As diferenças nos loci do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), são o desencadeador mais potente de rejeição de aloenxertos. Mesmo em gêmeos univitelinos, ocorre rejeição do enxerto devido às diferenças entre os antígenos menores de histocompatibilidade<sup>11</sup>. Em modelo de transplante de pele entre camundongos de linhagens diferentes, aos 10 dias pós-transplante, os esplenócitos dos receptores demonstraram proliferação *in vitro* em contato com peptídeos do MHC II do doador, indicando a ocorrência de

processamento e apresentação peptídica durante uma resposta *in vivo* ao aloenxerto<sup>12</sup>.

O estímulo das células T pelo MHC alogênico apresentado por células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen presenting cells*) contidas no enxerto do doador é chamada apresentação direta, enquanto o estímulo por APCs do próprio receptor é chamada apresentação indireta<sup>13</sup>. Recentemente, foi descrito outro possível mecanismo de apresentação de aloantígenos denominado semi-direto, em que as APCs do receptor podem adquirir moléculas de MHC funcionais intactas das células do doador e este MHC adquirido é capaz de estimular células T específicas para o antígeno<sup>14</sup>. O receptor de células T (TCR, do inglês *T Cell Receptor*) das células CD4<sup>+</sup> (grupamento de diferenciação 4, do inglês *cluster differentiation 4*) interage com o antígeno apresentado pela APC no contexto do MHC II. A interação TCR-antígeno é necessária, mas não suficiente para ativar as células T alorreativas. As cadeias CD3 e  $\zeta$  ligam o reconhecimento do antígeno pelo TCR aos eventos bioquímicos que levam à ativação funcional das células T<sup>15</sup>. Os sinais co-estimuladores promovidos pela interação entre as moléculas B7 da APC e CD28 da células T CD4<sup>+</sup> e pela interação entre CD40 das APCs e CD40 Ligante das células T CD4<sup>+</sup> iniciam uma cascata quinase-dependente que ativa vias bioquímicas efetoras como a da calcineurina, as quais aumentam o cálcio livre intracelular e promovem a transcrição genética codificadora de citocinas. A enzima calcineurina faz com que o fator nuclear de células T ativadas (NFAT, do inglês *nuclear factor of activated T cells*) sofra desfosforilação e migre do citoplasma para o núcleo, regulando, então, a transcrição genética de interleucinas (IL)-2, IL-3, IL-4 e interferon (IFN)- $\gamma$ . A célula T passa da fase G0 do ciclo celular para a fase ativada G1, mas somente progride de G1 para S e começa a proliferar-se quando as citocinas ligam-

se aos seus receptores e emitem sinais de transdução para o núcleo da célula, os quais passam pela proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês *mammalian Target of Rapamycin*). O mTOR catalisa a ativação de ciclinas e quinases ciclina-dependentes, a ativação do sinal 2 mediado por CD28 e dos fatores de transcrição induzidos por CD28 (Fator Nuclear  $\kappa$ B), a dissociação de fatores para tradução de proteínas microssomais e a síntese da proteína ribossomal S6. As APCs aumentam a expressão de B7 e passam a expressar IL-12. A IL-2 atua de modo sinérgico com a IL-12 na ativação da APC, que apresenta antígenos para as células T CD8+ citotóxicas precursoras e co-estimula sua ativação. A interação do Fas ligante dos linfócitos T CD8+ ativados com o Fas expresso nas células do enxerto associada à liberação de granzimas e perforinas acarreta a apoptose celular. A IL-12, ainda, age nas células T CD4+ estimuladas pelo antígeno e induz a diferenciação desses linfócitos em células T auxiliaadoras do tipo 1 (Th1, do inglês *T helper 1*). Na ausência de IL-12, a diferenciação para células Th2 é induzida. Dentre várias outras interleucinas, as células Th1 secretam IFN- $\gamma$  e IL-2, que promovem citotoxicidade mediada por células ao ativar macrófagos e células CD8+. IFN- $\gamma$  também estimula a produção de anticorpos IgG2a. As células Th2 secretam principalmente IL-4, que estimula células B a produzirem anticorpos IgG1 e IgE<sup>16-20</sup>.

Durante mais de duas décadas, a imunossupressão de manutenção em transplante baseou-se na administração de azatioprina (AZA) e corticosteróides/prednisona (PRED) sem monitoração sanguínea, e o tratamento dos episódios de rejeição aguda era fundamentado em altas doses esteroidais, acarretando inadequada imunossupressão e altas taxas de rejeição aguda<sup>2,21</sup>. A AZA atua na fase proliferativa do ciclo celular como análogo das bases purínicas, inibindo a síntese de RNA e DNA e, logo, inibindo a ativação de células T. Seu principal efeito adverso é



depressão dose-dependente da medula óssea. Os corticosteróides afetam quase todas as fases das respostas imune e inflamatória, sendo sua ação imunossupressora associada à inibição da transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias pelas células T e pelas APCs e à leucocitopenia secundária à redistribuição de leucócitos circulantes. Dessa forma, seu uso impede a produção de citocinas e inibe o recrutamento e a ativação das células T. Seus efeitos colaterais incluem retenção de líquidos, diabetogênese, prejuízo à cicatrização, úlcera péptica e osteoporose<sup>22</sup>.

A nova e revolucionária fase da imunossupressão química deu-se com o advento da ciclosporina (CsA) nos anos 80<sup>2,22,23</sup>. Os novos protocolos de combinação com a CsA aumentaram a taxa de sobrevivência dos transplantes, e a CsA tornou-se a base principal da imunossupressão e parte do protocolo padrão, contra a qual todas as novas drogas devem ser testadas<sup>23</sup>. No início dos anos 90, disponibilizou-se um análogo da CsA, Tacrolimus (Tac). A administração de CsA e Tac, drogas inibidoras da calcineurina, está associada a efeitos colaterais como nefrotoxicidade, infecção, hipertrofia gengival, pruridos e diabetes de novo<sup>24,25</sup>. A imunossupressão causada por essas drogas deve-se ao bloqueio da transcrição de citocinas envolvidas na ativação das células T por meio da inibição da calcineurina, prejudicando então a resposta imune. Predominantemente como resultado dessa inibição, múltiplos processos bioquímicos em diversas células além dos linfócitos são alterados, o que pode acarretar os efeitos colaterais dessas drogas<sup>26,27</sup>.

O Sirolimus (SRL) é um produto da fermentação macrocíclica do actinomiceto *Streptomyces hygroscopicus*, originalmente investigado como agente antifúngico e antitumoral, aprovado para uso clínico desde 1999<sup>23,28</sup>. O SRL e o Tac ligam-se ao receptor intracelular proteína de ligação ao FK506 12, gerando um complexo tóxico

que interfere em um componente específico da maquinaria sinalizadora celular. Enquanto o Tac intervém na atividade enzimática da calcineurina e na transcrição de diversas citocinas na transição da fase G0 para a fase G1 do ciclo celular, o SRL interfere em sinais decorrentes da ativação da quinase multifuncional mTOR, de receptores de fatores de crescimento e de citocinas na transição da fase G1 para S do ciclo celular<sup>23,29</sup>. A via de ativação da mTOR envolve processos metabólicos e tradução de proteínas para manutenção da homeostase celular<sup>30</sup>. Inibindo o mTOR, SRL acarreta a inibição da atividade do linfócito T induzida por citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12 e IL-15), por aloantígenos e mitógenos e também a inibição da atividade do linfócito B na produção de imunoglobulinas induzida por antígenos e citocinas<sup>23</sup>. O tratamento com SRL acarreta benefícios e efeitos adversos, possivelmente devido a alterações na regulação transcricional<sup>31</sup>.

Recentemente, um novo imunomodulador, FTY720 (FTY), foi sintetizado a partir da modificação química da mioricina, um produto natural do ascomiceto *Isaria sinclairii*<sup>32</sup>. Estudos apontam para o potencial efeito imunomodulador do FTY, que mostrou-se protetor em modelos experimentais de lesão de isquemia e reperfusão<sup>33,34</sup>, doenças autoimunes<sup>35,36</sup>, crescimento tumoral e metástase<sup>37,38</sup>, e no prolongamento da sobrevida e prevenção de rejeição aguda em diversos modelos experimentais de transplante de pele, coração, fígado e rim por meio do bloqueio da chegada de células no tecido transplantado ou em locais-alvo de células autorreativas sem, contudo, ocasionar efeitos colaterais significantes ou toxicidade renal<sup>32,39-42</sup>.

## 1.2. Dinâmica dos linfócitos

Os linfócitos naive recirculam continuamente entre o sangue e a linfa por meio dos órgãos linfóides secundários (SLO, do inglês *secondary lymphoid organs*), que incluem os LNs, as Placas de Peyer (PP) e o baço, onde antígenos e APCs estão localizados. Para entrar nos LNs e PP, os linfócitos aderem e transmigram através de vênulas pós-capilares denominadas vênulas de endotélio alto (HEV, do inglês *high endothelial venules*), localizadas principalmente nas zonas de células T, mas também na periferia dos folículos de células B<sup>43</sup>. Os SLO estão estrategicamente posicionados para amostrar antígenos que entram através de qualquer superfície corpórea; o baço filtra antígenos do sangue, LNs filtram a linfa que drena da superfície da pele ou mucosas, e as Placas de Peyer obtêm antígenos a partir do lúmen intestinal. Os folículos linfóides contêm DCs foliculares que capturam e apresentam antígenos em sua superfície para reconhecimento pelas células B, enquanto as zonas T contêm DCs derivadas da medula óssea que apresentam complexos MHC-peptídeo para as células T<sup>44</sup>.

Outros leucócitos são excluídos da adesão e transmigração através das HEV pela expressão diferencial de quimiocinas. Os linfócitos que migram preferencialmente pelos LNs periféricos expressam L-selectina (CD62L), que reconhece adressinas nas HEV dos LNs, enquanto linfócitos que migram preferencialmente através do intestino expressam a integrina  $\alpha_4\beta_7$ , que reconhece uma adressina vascular nas vênulas da lâmina própria intestinal e das HEV das PP. A junção de CD62L a esses ligantes diminui a velocidade dos linfócitos, que rolam pelas HEV e ligam-se fortemente às moléculas de adesão célula-endotélio ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1, do inglês *intercellular adhesion molecule-1*) e ICAM-2 através do

antígeno associado a função de linfócito 1 (LFA-1/CD11a), do inglês *lymphocyte function-associated antigen-1*), uma  $\beta_2$ -integrina que será descrita posteriormente. Os linfócitos então transmigram entre as células endoteliais adjacentes e penetram a membrana basal para acessar o parênquima do tecido<sup>45</sup>.

Duas famílias de receptores acoplados à proteína G desempenham papéis essenciais na migração dos linfócitos pelos SLO: receptores de quimiocinas e receptores de esfingosina-1-fosfato (S1P, do inglês *sphingosine-1-phosphate*). As quimiocinas expressas pelas células do estroma linfóide guiam os movimentos das DCs e dos linfócitos durante a imunovigilância e a iniciação de respostas imunes adaptativas. As quimiocinas CCL (Família de quimiocinas com resíduos de cisteína consecutivas na extremidade N-terminal)<sup>19</sup> e CCL21, presentes nas células endoteliais das HEV, ativam  $\beta_2$ -integrinas em linfócitos naive e DCs através do receptor CCR7; CXCL13, preferencialmente expressa por HEV nos folículos das PP, ativa  $\beta_2$ -integrinas principalmente em linfócitos B através do receptor CXCR5; CXCL (Família de quimiocinas em que outro aminoácido se situa entre as duas cisteínas na extremidade N-terminal)<sup>12</sup>, presente no sítio luminal das HEV, ativa  $\beta_2$ -integrinas em linfócitos T e B através do receptor CXCR4. O receptor 1 de S1P (S1P<sub>1</sub>, do inglês *sphingosine-1-phosphate receptor-1*) é necessário para o egresso dos linfócitos do timo e SLO e é negativamente regulado pela droga imunomoduladora FTY<sup>43,44</sup>.

Wang *et al.* sugeriram que uma ampla série de efeitos da S1P nas células pode ser divisível em: (a) aqueles que auxiliam a sobrevivência e facilitam algumas respostas funcionais, geralmente em concentrações fisiológicas baixas (3-100nM, concentrações encontradas em muitos tecidos), como supressão de apoptose induzida por ativação e aumento das respostas quimiotáticas às quimiocinas; (b) aqueles que suprimem respostas quimiotáticas e ciclos de migração, geralmente em

concentrações fisiológicas mais altas (0,3 a 3 $\mu$ M, concentrações encontradas no sangue e na linfa)<sup>45</sup>.

As integrinas são proteínas de superfície celular transmembrana que ligam-se a proteínas do citoesqueleto e transmitem sinais extracelulares. As integrinas de leucócitos compartilham de uma cadeia comum (CD18) associada a três subunidades: LFA-1 (CD11a), CD11b e CD11c. A molécula CD11b é expressa por monócitos/macrófagos<sup>46</sup>, neutrófilos<sup>47</sup>, células assassinas naturais (NK, do inglês *natural killer*)<sup>48</sup>, DCs CD8+<sup>49</sup> e células T CD8+ recentemente ativadas<sup>50</sup>, e seus ligantes incluem proteínas expressas por células (p.ex. ICAM-1), bem como proteínas solúveis (p.ex. fragmentos do complemento)<sup>51</sup>.

Os linfócitos naive que entram no órgão linfóide e não detectam seu antígeno específico emigram pelos vasos linfáticos eferentes para o ducto torácico e retornam à circulação para continuar a averiguar outros SLO. Se ocorrer o encontro com o antígeno, a ativação dos linfócitos ocasiona mudanças na expressão de seus receptores de quimiocinas e, portanto, na capacidade migratória. A expressão de CCR7 é transitoriamente regulada positivamente, para que essas células permaneçam na zona T por um período de tempo. Logo, algumas das células T CD4+ regulam positivamente sua expressão de CXCR5, perdem a expressão de CCR7 e migram para os folículos de células B, onde CXCL13 é espessa, e auxiliam os linfócitos B ativados através das moléculas CD40 (das células B) e CD40 Ligante. Esta interação induz aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras B7 pelas células B, as quais, por sua vez, aumentam a interação entre os linfócitos B e T e induzem a produção de IL-4 pela célula T. Os linfócitos B ativados tornam-se então plasmócitos secretores de anticorpos. Uma parte das células T ativadas sofre expansão clonal e diferencia-se em células de memória central e células de memória

efetoras<sup>43,44</sup>. A expressão do S1P<sub>1</sub> e a responsividade a S1P são também reguladas negativamente para retenção das células nos órgãos linfóides. A reaquisição dos níveis de expressão do receptor e da responsividade a S1P está associada à saída das células desses órgãos<sup>52</sup>. As células T naive e células de memória central expressam os receptores CCR7 e CD62L e recirculam continuamente para os SLO, produzem IL-2, proliferam-se após ativação e podem auxiliar a proliferação de células efetoras de memória, as quais não recirculam pelos SLO, mas vigiam os órgãos periféricos e migram para os locais de inflamação<sup>53-55</sup>.

### **1.3. FTY720 – Histórico e mecanismos de ação propostos**

A Mioricina é um metabólito do fungo ascomiceto *Isaria sinclairii*, identificado numa seleção de produtos naturais, que foi capaz de diminuir a proliferação de linfócitos em reação mista de linfócitos alogênicos murinos<sup>56</sup>. Contudo, quando testadas suas propriedades imunossupressoras *in vivo*, a mioricina mostrou-se tóxica. A inoculação intraperitoneal (i.p.) de 0,03-0,3mg/Kg/dia do metabólito a ratos F344 receptores de aloenxerto de pele de doadores LEW durante 10 dias levou a um aumento mínimo da sobrevida do enxerto, enquanto animais que receberam 1,0mg/Kg/dia morreram com graves alterações digestivas<sup>57</sup>. Testes de derivados sintéticos da ISP-1 visando a aumentar a capacidade de prevenção de rejeição em modelos de alotransplante de pele levaram à identificação de um novo imunomodulador, o FTY720, 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol hidrocloreto<sup>58</sup>.

Inicialmente, acreditou-se que FTY causaria apoptose de linfócitos, pois a exposição *in vitro* de esplenócitos de rato e células mononucleares de sangue periférico

humano a altas concentrações da droga – 4mM ou mais – induziu características típicas de apoptose, tais como fragmentação de DNA cromossômico<sup>59,60</sup>.

Posteriormente, foi demonstrado que a administração de uma única dose da droga (0,1 a 1mg/Kg) diminuiu o número de linfócitos no sangue periférico, ducto torácico (DT) e baço de ratos F344 em três a 24 horas de maneira reversível, já que retornaram aos níveis do controle sete dias a duas semanas depois. Concomitantemente, foram aumentados de maneira dose-dependente os números de linfócitos nos LNs periféricos (LNP), mesentéricos (LNM) e PPs, cujo retorno aos níveis do controle levou de 24 horas a cinco dias. Além disso, linfócitos marcados com calceína e transfundidos via intravenosa (i.v.) apresentaram tráfego acelerado para os LNP, LNM e PP três horas após a administração da droga. Estes resultados indicaram que a redução dos linfócitos maduros no sangue periférico, DT e baço foi predominantemente causada por migração linfocitária acelerada do sangue ou baço para os LNP, LNM e PP, e não por citotoxicidade<sup>61</sup>.

Considerando a rápida redução dos linfócitos do sangue periférico em ratos após uma única administração oral de FTY, Luo *et al.* estudaram *in vivo* os efeitos da administração oral de 1mg/Kg/dia de FTY durante 2 semanas na distribuição de linfócitos em camundongos C57BL/6J. O número de linfócitos sanguíneos periféricos diminuiu para aproximadamente 10% dos níveis dos controles, porém, ao contrário daquilo observado após a administração de uma única dose da droga, os números de linfócitos nos LNP, LNM, PP e baço diminuíram para aproximadamente 50% dos níveis dos controles. Além disso, a administração de FTY foi capaz de aumentar a sobrevivência do aloenxerto de pele de camundongos C3H/HeJ em camundongos *aly/aly*, deficientes em LN e PP, demonstrando que os LN e PP não foram necessários para que a droga exibisse seus efeitos imunomoduladores<sup>62</sup>. Em

concordância com os dados de Luo et al., Sugito et al. posteriormente observaram que a administração oral de FTY na dose de 1mg/Kg/dia durante 14 dias consecutivos diminuiu significativamente o número total de linfócitos no sangue periférico, bem como os subtipos B220+, CD3+ e CD4+, em camundongos aly/aly com ou sem esplenectomia. Enxertos de pele de doadores C3H apresentaram sobrevida prolongada em comparação àqueles de animais que não receberam a droga e a histologia dos grupos tratados apresentou menos infiltração celular. Logo, o papel do FTY não pode ser totalmente explicado pela hipótese de que a droga promove o movimento dos linfócitos e os isola em SLO<sup>63</sup>.

Ao contrário dos imunossuppressores clássicos que causam imunossupressão inespecífica, foi mais tarde demonstrado que doses terapêuticas orais de FTY (0,3mg/Kg/dia) administradas por até 15 dias não prejudicaram as respostas imunes humorais nem a memória imunológica de células B e T. Também não ocorreu supressão da geração de linfócitos T citotóxicos específicos aos Vírus da Coriomeningite Linfocítica (LCMV) e Vírus da Estomatite Vesicular em LNs dos camundongos infectados<sup>64</sup>. Recentemente, foi evidenciado que a administração i.v. de baixas doses de FTY (0,004mg/Kg/dia) a camundongos durante os três primeiros dias de infecção pela linhagem clone 13 de LCMV – que induz infecção crônica e persistente – promove o clearance viral em sete dias. Além disso, quando administrada nas mesmas dosagens a camundongos persistentemente infectados pelo vírus há 30 dias, a droga também leva ao clearance viral. Estes resultados estiveram associados a linfopenia e a seqüestro dos linfócitos nos LNs, manutenção das respostas de células T específicas ao LCMV e recuperação funcional de células TCD8, cuja função havia sido prejudicada pela infecção crônica<sup>65</sup>.



Outros dados recentes sugeriram que a via intracelular de ativação das células T não é alterada pelo FTY. Os efeitos da CsA na expressão gênica de IL-2, IFN- $\gamma$  e Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF, do inglês *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) dependente de NFAT foram estudados em pacientes transplantados renais tratados com FTY (linfopênicos) ou com Ácido Micofenólico (MPA, do inglês *mycophenolic acid*). O reduzido número absoluto de linfócitos no sangue periférico do grupo tratado com FTY+CsA+corticosteróides foi acompanhado de diminuição das expressões quantitativas dos genes de IL-2, IFN- $\gamma$  e GM-CSF em relação aos pacientes tratados com MPA+CsA+corticosteróides. Contudo, a redução relativa na expressão gênica (relação expressão gênica duas horas após a administração de CsA/expressão pré-administração de CsA) foi similar nos pacientes tratados com FTY e com MPA<sup>66</sup>.

Em 2002, constatou-se que o FTY *in vivo* é fosforilado a FTY-fosfato (FTY-P), e que sua forma fosforilada é agonista de alta afinidade de quatro dos cinco receptores da molécula lipídica S1P, a saber, receptores de S1P 1, 3, 4 e 5 (S1P<sub>1,3,4,5</sub>) e que a droga ativa a sinalização intracelular dos receptores de S1P (S1PR, do inglês *Sphingosine-1-Phosphate Receptor*) com afinidade similar ou maior à da S1P. Após três horas de administração de 2,5mg/Kg de FTY a camundongos, os vasos dos seios medulares e subcapsulares dos LNM não continham linfócitos, os quais foram retidos no sítio abluminal do endotélio linfático, sugerindo que as células não podem acessar estruturas de egresso. Logo, já que linfócitos naive entram no tecido linfático ao sair de um linfonodo, a ausência de linfócitos por FTY na linfa seria mais consistente com bloqueio do egresso dos linfócitos pela ativação agonista de receptores de S1P<sup>67,68</sup>.

Conforme revisado em 2008, os esfingolipídeos são amplamente distribuídos na membrana plasmática em organismos eucariontes e desempenham papel na estrutura da membrana celular, interações célula-célula e célula-matriz, crescimento e diferenciação. Alguns de seus metabólitos, como a S1P, produzida a partir da esfingosina pela enzima esfingosina quinase (SPhK, do inglês *sphingosine kinase*), possuem funções de sinalização. A S1P liga-se a cinco receptores de membrana acoplados à proteína G – S1P<sub>1,2,3,4,5</sub>, o que ativa vias de sinalização intracelular, levando a uma variedade de respostas celulares, como proliferação, regulação da migração celular, rearranjo do citoesqueleto e reforço das junções aderentes<sup>69</sup>.

Os receptores S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>4</sub> são expressos por células T e B<sup>70,71</sup>. S1P<sub>3</sub> é expresso por células B da zona marginal<sup>72</sup> e por células dendríticas murinas<sup>73</sup> e S1P<sub>5</sub> é expresso por células NK<sup>74</sup>. S1P<sub>1</sub> também é expresso por células endoteliais<sup>75</sup>.

Em 2003, demonstrou-se *in vitro* que FTY é fosforilado pelas enzimas SphK1 e SphK2. Cada uma das enzimas foi transitoriamente transfectada para células em cultura. Embora a expressão de SphK2 fosse muito menor que aquela da SphK1, os lisados celulares das células transfectadas com SphK2 fosforilaram o FTY mais efetivamente<sup>76</sup>. Corroborando com esses dados, Zemann *et al.* demonstraram *in vivo* que a SphK2 é essencial na fosforilação do FTY em camundongos. A administração oral ou i.v. de FTY a camundongos deficientes em SphK2 não foi capaz de induzir linfopenia em 24 horas, ao contrário dos camundongos selvagens. A administração i.v. de 1mg/Kg de FTY-P induziu a linfopenia nos camundongos selvagens em até 24 horas, enquanto os camundongos deficientes em SphK2 apresentaram linfopenia somente transitória, completamente perdida 24 horas depois<sup>77</sup>.

Enquanto a maior parte da liberação de S1P pelas plaquetas depende de ativação plaquetária<sup>78</sup>, o FTY-P é eficientemente convertido a partir do FTY e liberado de

maneira ativação-independente pelas plaquetas, mas não pelos eritrócitos ou por células endoteliais, o que sugere que as plaquetas são a maior fonte de FTY-P<sup>79</sup>.

Enquanto agonista do S1P<sub>1</sub>, FTY-P ativa sua via de sinalização intracelular com afinidade similar à da S1P ou maior<sup>67,80</sup>. O endotélio regula a permeabilidade a proteínas e células por meio de junções célula-célula, bem como junções aderentes, estruturas formadas entre células adjacentes pela adesão de proteínas transmembrana. O estímulo de S1P<sub>1</sub> por um ligante acarreta mudanças na organização do citoesqueleto endotelial que alteram a função das junções aderentes, reforçando a integridade da barreira<sup>81,82</sup>. O tratamento de células endoteliais com FTY-P aumenta a ativação de S1P<sub>1</sub>, aumentando a junção e diminuindo a permeabilidade e, assim, os linfócitos não conseguem passar pelas junções celulares e acumulam-se nos tecidos linfóides<sup>82</sup>.

Entretanto, o agonismo de FTY-P também exibe funções antagonistas funcionais em relação ao S1P<sub>1</sub>, causando perda do receptor na superfície celular<sup>73,83</sup>. Após a ancoragem do ligante, S1P<sub>1</sub> é internalizado e o estímulo fica desensibilizado<sup>84</sup>. Quando o ligante é a S1P, o receptor é reciclado e volta para a superfície. Entretanto, quando o estímulo é o FTY-P, S1P<sub>1</sub> não volta para a membrana celular, resultando em perda do receptor na superfície da célula<sup>83</sup>. De acordo com o modelo antagonista, a S1P é um quimioatraente potente para células que expressam predominantemente S1P<sub>1</sub>. Normalmente, a biodisponibilidade da S1P aumenta a partir dos tecidos linfóides para o plasma, e os linfócitos migram em resposta ao gradiente de S1P<sup>85</sup>. Após tratamento com FTY, a subsequente perda de S1P<sub>1</sub> na superfície celular resulta em responsividade reduzida ao gradiente de S1P e os linfócitos ficam retidos no tecido linfóide<sup>86</sup>.

Em 2004, estabeleceu-se que o S1P<sub>1</sub> é essencial para a recirculação dos linfócitos e regula o egresso dessas células do timo e órgãos linfóides periféricos. Em camundongos cujas células hematopoiéticas não expressavam S1P<sub>1</sub>, não foram encontrados linfócitos T na periferia porque as células T maduras foram incapazes de sair do timo. Embora as células B estivessem presentes nos SLO, sua presença esteve deficiente no sangue e na linfa, sugerindo que elas teriam recirculado pouco, porém apresentaram menor dependência desse receptor do que as células T. Além disso, foi demonstrado que a responsividade quimiotática dependente de S1P<sub>1</sub> é regulada positivamente no desenvolvimento das células T antes da saída do timo, enquanto a expressão de S1P<sub>1</sub> e a responsividade a S1P são reguladas negativamente durante a ativação linfocitária periférica para retenção das células nos órgãos linfóides. A reaquisição da expressão do receptor e da responsividade à S1P leva a saída dos linfócitos dos SLO. Timócitos maduros simples-positivos e células T periféricas de camundongos tratados com FTY não migraram em resposta à S1P, pois a droga causou modulação negativa quase completa de S1P<sub>1</sub><sup>52</sup>. Em concordância com esses resultados, foi demonstrado que FTY inibe a sinalização dos S1PRs por indução de internalização prolongada e degradação parcial e que o S1P<sub>1</sub> é o S1PR que provavelmente medeia a linfopenia pós-administração de FTY. Esses resultados indicaram que o efeito do bloqueio do egresso da droga poderia ocorrer por atividade antagonista funcional de FTY-P ao S1P<sub>1</sub>, causando uma perda do receptor na superfície celular<sup>70</sup>. Mais tarde, foi demonstrado *in vitro* que FTY-P induz fosforilação do S1P<sub>1</sub>, subsequente endocitose e então poliubiquitinação e conseqüente degradação proteossômica<sup>87</sup>.

Além da linfopenia periférica induzida pelo FTY, os efeitos diferenciais do imunomodulador nos leucócitos e em subpopulações de linfócitos foram investigados por grupos distintos.

No sangue de camundongos BALB/c tratados com 1mg/Kg/dia de FTY i.p. durante 20 dias, foi observada a cinética das mudanças no número de células mononucleares e subtipos de linfócitos. O número de células mononucleares diminuiu significativamente para menos de 20% dos valores controle um dia após a primeira injeção e o efeito durou por todo o período de administração. O número de células CD3+ diminuiu para menos de 2% daquele encontrado no controle durante o curso do tratamento. O número de células CD4+ em particular diminuiu para menos de 0,3% daquele encontrado no controle, enquanto o declínio das células CD8+ foi muito mais moderado, porém ainda significativo. A quantidade de células B (B220+) também diminuiu significativamente para menos de 10% daquela no controle. Não foram observadas mudanças no número de células NK (CD122+CD3-). Esses resultados sugerem que o FTY afeta mais as células T do que as células B, mais as células CD4+ do que as células CD8+ e não afeta as células NK<sup>88</sup>.

Em camundongos C57BL/6 tratados com 0,5mg/Kg/dia de FTY v.o. por até 14 dias, o número de células T esteve diminuído no sangue e órgãos periféricos em 3 dias. Esse declínio atribui-se principalmente a uma redução das células naive, enquanto números substanciais de células efetoras ou de memória foram retidos na periferia. As células T naive também estiveram diminuídas nos SLO em uma semana de tratamento, principalmente devido a uma redução das células CD4+ naive dos LNs<sup>89</sup>.

Na clínica se constatou a ausência do efeito de FTY em células NK, monócitos e granulócitos humanos<sup>90</sup> e em modelo murino a droga não teve efeito no tráfego das células NK<sup>91</sup>.

Estudos recentes evidenciam que as DCs humanas e murinas expressam receptores de S1P, e que a S1P e o FTY ou FTY-P alteram sua migração, perfil de produção de citocinas e função estimulatória de células T *in vitro*<sup>73,92-94</sup>.

#### **1.4. FTY720 – Transplante e toxicidade renal**

A habilidade imunomoduladora de FTY em diferentes modelos experimentais de alotransplante foi demonstrada por diversos grupos.

Yanagawa *et al.* demonstraram que a administração de 0,1 ou 1,0mg/Kg/dia via oral (v.o.) de FTY foi capaz de aumentar a sobrevida do aloenxerto de pele entre ratos totalmente incompatíveis quando ao MHC para 10,5 e 21 dias, respectivamente, comparada a 7 dias do grupo controle. O número de células T CD4+ e T CD8+ infiltrantes no enxerto esteve significativamente diminuído nos grupos tratados de maneira dose-dependente<sup>95</sup>. Além disso, o mesmo grupo demonstrou que FTY (0,1mg/Kg/dia) inibe a infiltração de células T no aloenxerto com mais eficácia que CsA (10mg/Kg/dia), ainda que a CsA seja mais efetiva em diminuir a expressão de IL-2 e IFN- $\gamma$  pelas células infiltrantes. A combinação das duas drogas foi sinérgica para o aumento da sobrevida do aloenxerto de pele para mais de 70 dias<sup>61</sup>.

Mais tarde, o grupo demonstrou a relevância da data de início da administração de FTY anterior ao aumento da infiltração no aloenxerto para inibir a rejeição aguda no modelo de alotransplante de pele entre ratos. No enxerto de pele do grupo controle, ocorreu infiltração de células T CD8+ no 5º dia pós-transplante, sendo esta

significativamente diminuída pela administração de 1mg/Kg/dia de FTY a partir dos dias 0 e 3, mas não a partir do dia 4, que ocasiona apenas diminuição parcial das células<sup>96</sup>.

Nosso grupo também demonstrou o aumento da sobrevida do aloenxerto de pele pela administração v.o. de 1mg/Kg/dia de FTY como monoterapia em modelo murino de combinação totalmente incompatível quanto ao MHC (H2<sup>b</sup> como doador e H2<sup>d</sup> como receptor, aumento de 8,0 para 12,4 dias após administração contínua da droga<sup>97</sup>, H2<sup>d</sup> como doador e H2<sup>b</sup> como receptor, aumento de 12,6 para 16,6 dias após 4 dias de administração da droga<sup>98</sup>, ou em combinação com drogas imunossupressoras convencionais como 10mg/Kg/dia i.p. de CsA (sobrevida maior que 17 dias)<sup>99</sup> ou o Tac (sobrevida de 14,0 dias)<sup>100</sup>.

A administração v.o. de 2,0, 4,0 ou 8,0mg/Kg/dia de FTY a partir do dia 3 até o dia 9 após o transplante cardíaco entre ratos BN e WKY prolongou significativamente a sobrevida do aloenxerto de 9 para 30,5 (2,0mg/Kg/dia), 24,9 (4,0mg/Kg/dia), e 21,5 (8,0mg/Kg/dia) dias, o que esteve associado a menor infiltrado linfocítico nos enxertos<sup>101</sup>. No modelo de alotransplante cardíaco entre ratos LEW e F344, a sobrevida foi significativamente aumentada pela administração v.o. de FTY por 7 dias nas doses mínimas de 0,25 ou 0,5 mg/Kg/dia de 21,7 para 46 a 58 dias e nas doses maiores de 1,0 ou 2,0mg/Kg/dia para mais de 100 dias. Estes resultados estiveram associados a menor gravidade das mudanças vasculares crônicas nos grupos tratados com 1,0 ou 2,0mg/Kg/dia nos dias 14 e 21<sup>102</sup>.

No modelo murino de alotransplante cardíaco entre camundongos BALB/c e receptores C57BL/6, o tratamento v.o. com 3mg/Kg/dia de FTY durante diferentes períodos retardou significativamente a rejeição. A sobrevida média aumentou de 8 dias para 14 (administração a partir do dia -3 ao dia 0), 16 (administração a partir do

dia 0 ao dia 14) e 27 dias (administração a partir do dia -2 ao dia 11). Quatorze dias após o transplante, os enxertos do último grupo apresentavam poucos sinais de rejeição, enquanto nos demais grupos, foram observados inflamação grave, necrose de miócitos, edema e vasculite, sugerindo efeitos específicos do FTY nas fases precoces da resposta imune contra aloenxertos<sup>103</sup>.

A administração v.o. de FTY por 18 dias no modelo de alotransplante de córnea entre ratos FISHER e LEW aumentou a sobrevida do enxerto de 11,3 Para 35,3 dias (0,3mg/Kg/dia) e 44,5 dias (1,2mg/Kg/dia), o que esteve associado a redução do infiltrado no enxerto de células T CD4+ e, de maneira menos importante, de células T CD8+ e CD161+ (NK)<sup>104</sup>.

A associação de FTY ao Tac resulta em aumento da sobrevida do enxerto renal em modelo canino e enxerto cardíaco e hepático em ratos<sup>105-107</sup>. Nosso grupo demonstrou recentemente que a administração de 1mg/kg/dia de FTY como monoterapia e associado à CsA ou ao Tac aumenta a sobrevida do aloenxerto de pele sem causar nefrotoxicidade<sup>39,99,108-110</sup>. Ratos tratados com altas doses orais de FTY (5mg/kg/dia) não apresentaram efeitos colaterais ou mudanças na função e estrutura renais<sup>111</sup>. Em estudos clínicos de fases I e II, FTY foi bem tolerado por pacientes transplantados renais e não ocasionou efeitos colaterais significativos, exceto por bradicardia assintomática e transitória<sup>112,113</sup>. O efeito cronotrópico negativo da droga é explicada pelo agonismo de FTY-P pelos receptores S1P expressos nos miócitos atriais, que desencadeia a ativação de canais de potássio  $IK_{ACh}$  ligados à proteína G<sup>114</sup>.

Estudos clínicos de fase II mostraram que a combinação de FTY com CsA apresenta eficácia semelhante a regimes-padrão com CsA ou Micofenolato Mofetil (MMF, do inglês *Mofetil Micophenolate*) na prevenção de rejeição aguda no transplante renal



de novo<sup>112,113,115</sup>. Contudo, estudos de fase III comparando a eficácia de regimes contendo FTY com as terapias imunossupressoras convencionais indicam que a eficácia na prevenção de rejeição aguda do enxerto renal de FTY combinado com doses regulares de CsA foi semelhante àquela da combinação de CsA e MMF, sem benefício significativo. A terapia com FTY esteve associada a prejuízo da função renal e a edema macular, o que levou a uma pausa do programa clínico para o desenvolvimento de FTY no transplante renal. Entretanto, as razões para o menor clearance de creatinina nos pacientes tratados com FTY ainda não foram esclarecidos, havendo necessidade, portanto, de estudos mais aprofundados<sup>116</sup>.

### **Sirolimus – Transplante e toxicidade renal**

Koehl *et al.* demonstraram efeitos antioncogênicos do SRL comparado à CsA em modelos de tumor e transplante cardíaco em camundongos, nos quais o enxerto foi protegido de rejeição e o crescimento tumoral foi inibido, resultando em melhora da sobrevivência animal<sup>117</sup>. Em humanos, a administração de SRL após retirada da CsA aos três meses de terapia reduziu a incidência de malignidades de pele e de outros tipos em cinco anos após um transplante renal quando comparada com a associação de SRL à CsA<sup>118</sup>.

A administração de 2mg/kg de SRL melhorou significativamente o desenvolvimento de nefropatia crônica e diminuiu a fibrose intersticial e a proliferação da camada íntima arterial quando comparada à terapia com 1,5 mg/kg de CsA em modelo de alotransplante renal em ratos. Os valores de creatinina foram também menores nos animais tratados com SRL, quase similares aos enxertos singênicos do grupo controle<sup>119</sup>. Em investigação do efeito do SRL no desenvolvimento de fibrose renal,

camundongos foram tratados com 0,2mg/kg de SRL diariamente a partir do dia anterior à obstrução unilateral de ureter. A terapia promoveu uma redução tardia da expressão de RNAm do Fator de Transformação e Crescimento - fenótipo antifibrótico<sup>120</sup>.

Em modelo de indução de insuficiência renal aguda por oclusão de artéria renal em ratos, a administração prolongada de não prejudicou a recuperação das funções renais devido a uma provável resistência adquirida das células tubulares aos efeitos deletérios da mesma droga. As células T não seriam suscetíveis a essa resistência devido à sua curta meia-vida, que não permitiria exposição suficiente à droga para adquiri-la. A diferença entre as respostas do sistema imune e das células tubulares renais à exposição prolongada ao SRL poderia explicar a relativa falta de toxicidade renal associada à droga<sup>121</sup>.

Estudos clínicos de fase I e II demonstraram efeito sinérgico da eficácia e segurança da combinação de SRL com CsA<sup>122-128</sup>, confirmados em estudos clínicos multicêntricos, randomizados e controlados de fase III, que demonstraram redução significativa da incidência de rejeição aguda confirmada por biópsia pela combinação de SRL e CsA em receptores de aloenxertos renais quando comparada à associação de AZA e CsA ou à monoterapia com CsA, porém os valores do clearance de creatinina estiveram reduzidos nos grupos do SRL, o que causou preocupações a respeito de efeitos adversos diretos na função renal pelo SRL ou de exacerbação da nefrotoxicidade da CsA<sup>129,130</sup>. Em investigação recente prospectiva e controlada dos efeitos a longo prazo da conversão tardia de Inibidores da Calcineurina (CNIs, do inglês *Calcineurin Inhibitors*) para SRL na função renal em transplantados renais com disfunção do enxerto estabilizada moderada ou grave, todos os pacientes desenvolveram proteinúria pelo menos moderada nos primeiros

dois anos de conversão, porém foi constatada estabilidade ou até melhora da taxa de filtração glomerular em metade deles comparada à avaliação inicial, e a sobrevida do enxerto de 75% após cinco anos de conversão foi considerada aceitável<sup>131</sup>.

Foi relatado que a conversão dos CNIs para SRL resulta em anemia e deficiência de ferro (baixa concentração sérica de ferro apesar da concentração normal de ferritina)<sup>132,133</sup>. A terapia com SRL associado a PRED e Tac esteve relacionada a incidência significativamente maior de complicações de ferida operatória em receptores de enxerto renal quando comparada à associação de Tac, PRED e MMF<sup>134</sup>. A administração de SRL em receptores de enxerto cardíaco, além de associar-se a um aumento nas complicações de cicatrização em ferida pós-operatória, também acarretou maior taxa de derrame pleural e pericárdico quando comparada à administração de MMF<sup>135</sup>. Além disso, nos seis primeiros meses após o início de terapia baseada em SRL, constatou-se proteinúria dose-independente associada a edema em pacientes transplantados renais, pancreáticos, de ilhotas e de fígado-rim. A proteinúria ocorreu principalmente em pacientes convertidos para SRL do que naqueles submetidos à terapia de novo com a droga, e foi revertida após suspensão da administração<sup>136</sup>. Apesar dos efeitos colaterais acarretados pelo SRL, foi sugerido que a monitoração da concentração sanguínea de SRL, bem como sua associação a outras drogas imunossupressoras, podem maximizar sua eficácia e minimizar sua toxicidade<sup>137</sup>.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

- Avaliar a sobrevida do aloenxerto de pele parcialmente compatível durante a administração de FTY720+Sirolimus;
- Avaliar os eventos imunológicos associados à sobrevida do aloenxerto de pele em camundongos tratados com FTY720+Sirolimus;
- Avaliar os efeitos da administração de FTY720+Sirolimus sobre parâmetros renais.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Acompanhar diariamente o processo de necrose do tecido enxertado durante 17 dias para estabelecer a data de rejeição e, conseqüentemente a sobrevida do transplante de pele
- Avaliar o efeito das monoterapias FTY720 e Sirolimus, além da combinação de ambas administradas por 21 dias na sobrevida do transplante de pele
- Verificar a proporção de células CD3+CD4+, CD3+CD8+ e CD11b+ no sangue periférico, baço, linfonodos drenantes, timo e enxerto no 5o dia pós transplante (ativação imunológica);
- Avaliar as concentrações séricas de creatinina e uréia, as concentrações urinárias de creatinina, uréia e proteína, as alterações estruturais renais e o clearance de creatinina após 21 dias de administração das drogas como monoterapias ou em associação.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Para o transplante de pele, foram utilizados camundongos (BALB/c, H2<sup>d</sup> x C57BL/6, H2<sup>b</sup>)F1 como doadores e C57BL/6 como receptores, respectivamente. Para a avaliação de parâmetros renais (urinários e sanguíneos), foram utilizados camundongos C57BL/6. Os animais, machos e adultos (8 a 10 semanas), foram fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da UNIFESP, pesando de 20 a 30g e foram mantidos em gaiolas em condições controladas de luminosidade (ciclo claro-escuro de 12 horas) recebendo água e ração *ad libitum*. Foram observados os preceitos de bons cuidados aos animais, segundo o COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIFESP, sendo o nº do processo: 0125/08.

#### **3.2. Drogas e Desenho do Estudo**

FTY720 foi gentilmente cedido pela Novartis (Basel, Suíça) e Sirolimus (Wyeth, EUA) foi adquirido comercialmente. As drogas foram diluídas em água destilada para alcançar a dose de 1mg/kg no volume de 0,2mL e administradas diariamente por gavagem. Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

##### Protocolo de Avaliação de Sobrevida do Enxerto

Tx: C57BL/6 transplantado e não tratado (n=7);

SRL: C57BL/6 transplantado e tratado com SRL por 21 dias (n=5);

FTY: C57BL/6 transplantado e tratado com FTY por 21 dias (n=5);

FTY+SRL: C57BL/6 transplantado e tratado com FTY+SRL (n=5)



Protocolo de Avaliação Imunológica (5º dia pós transplante)

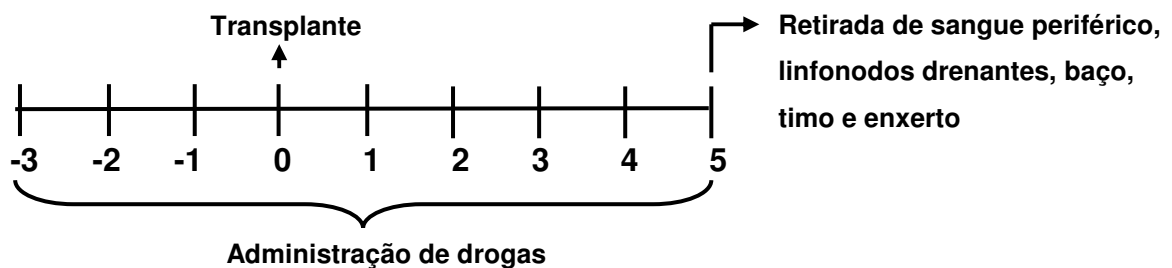
Controle: C57BL/6 não transplantado e não tratado (n=5);

Tx: C57BL/6 transplantado e não tratado (n=7);

SRL: C57BL/6 transplantado e tratado com SRL por 9 dias (n=6);

FTY: C57BL/6 transplantado e tratado com FTY por 9 dias (n=5);

FTY+SRL: C57BL/6 transplantado e tratado com FTY+SRL (n=5)



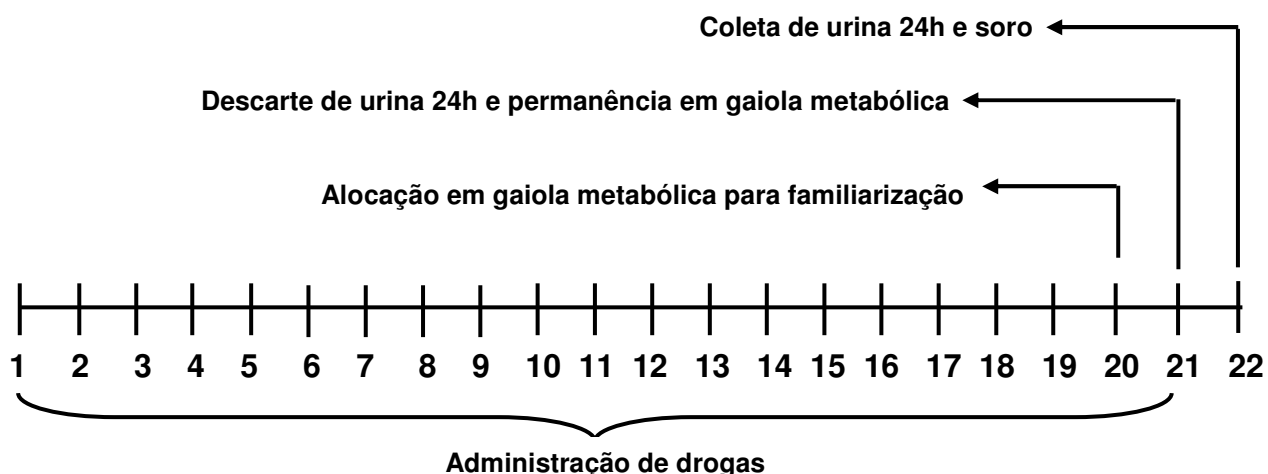
Protocolo de Avaliação Renal

Controle: C57BL/6 não tratado e acompanhado por 21 dias (n=5)

SRL: C57BL/6 tratado com SRL por 21 dias (n=6)

FTY: C57BL/6 tratado com FTY por 21 dias (n=5)

FTY+SRL: C57BL/6 tratado com FTY+SRL por 21 dias (n=5)



### 3.3. Transplante de Pele

Os camundongos receptores foram anestesiados com injeção i.p. de 0,3-0,4mL de solução composta por 0,3mL de Dopalen (Vetbrands, Brasil) e 0,5mL de Anasedan (Vetbrands, Brasil) dissolvidos em 10mL de água destilada.

Após deslocamento cervical, o animal doador teve uma incisão feita na pele da cauda com 1cm a partir da base e em direção à extremidade, seguida por uma nova incisão, perpendicular à primeira, ao redor de toda a cauda. A pele foi destacada utilizando-se pinças, removida e imediatamente imersa em solução fisiológica, onde permaneceu até o momento do uso.

Após o procedimento de anestesia, um quadrado de 1cm<sup>2</sup> de pele foi removido do dorso (já depilado) do receptor e, logo em seguida, um segmento de pele da cauda do doador com a mesma medida foi implantado e fixado por sutura com fio de polipropileno monofilamento 7-0 (Cirumédica, Brasil) ou fio de nylon 6-0 (Brasuture, Brasil). O transplante de pele foi avaliado diariamente para a definição da data de rejeição, caracterizada pela presença de 90% de necrose do epitélio do enxerto.

### **3.4. Avaliação dos Parâmetros Imunológicos**

No 5º dia pós-transplante, os camundongos receptores foram novamente anestesiados como já descrito. Foram realizadas incisões abdominal e torácica para acesso à veia cava inferior e coleta de sangue, LNs axilares, baço e timo. Também foram retirados os enxertos. Os leucócitos foram contados no sangue, bem como os linfócitos nos demais tecidos. Foram avaliadas as porcentagens de células CD3+CD4+, CD3+CD8+ e CD11b+ no sangue, baço e enxerto, porcentagens de células CD3+CD4+ e CD3+CD8+ nos LNs e no timo e também células CD4+CD8+ no timo.

### **3.5. Avaliação do Número de Leucócitos no Sangue Periférico**

A contagem foi realizada por meio de esfregaço sangüíneo. Para a técnica de esfregaço, colocou-se uma gota de sangue sobre uma lâmina de microscopia (Glass Técnica SP/Brasil). Com a lâmina extensora, pressionou-se a gota de sangue com ângulo de 45° em relação à lâmina em que a gota foi depositada, arrastando-a em direção ao lado oposto com velocidade constante. A lâmina secou à temperatura ambiente e a coloração foi feita utilizando-se Panótico (Laborclin, PR/Brasil). Após a secagem, foram contados 100 leucócitos para obtenção da porcentagem de linfócitos, neutrófilos e monócitos com auxílio de objetiva com óleo de imersão (Microscópio de luz Olympus CBA/Japão).

### **3.6. Avaliação do Número de Linfócitos nos Linfonodos Drenantes**

Os LNs foram transferidos para uma placa de Petri com PBS (Phosphate Buffered



Saline, Merck, SP/Brasil) e macerados até remoção da cápsula. O macerado foi passado por peneira de 500 mesh e, da suspensão celular, foram aplicados 10 $\mu$ L à câmara de Neubauer Improved (Normax, SP/Brasil). Por meio de microscópio de luz, foram quantificados os linfócitos na área delimitada pela câmara. Foram contados 25 quadrantes e, em seguida, calculou-se o número total de linfócitos, segundo a fórmula: número de células obtido x volume da solução de linfócitos $\times 10^4$ .

### **3.7. Avaliação do Número de Timócitos**

O timo foi transferido para uma placa de Petri com PBS e macerado como descrito para os LNs. A contagem foi realizada diluindo-se a amostra em Trypan Blue 0,4% na proporção de 1:20 (5 $\mu$ L de amostra + 95  $\mu$ L de Trypan Blue). Foram contados 25 quadrantes e, em seguida, calculou-se o número total de linfócitos, segundo a fórmula: número de células obtido x volume da solução de linfócitos x fator de diluição (20) x  $10^4$ .

### **3.8. Avaliação do Número de Esplenócitos**

O baço foi removido da região abdominal e macerado como descrito para os LNs. A suspensão celular foi, então, centrifugada por 5 minutos a 1500rpm. Além dos linfócitos, o pellet resultante continha hemácias. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido a 2mL de tampão de hemólise (150mM de NH<sub>4</sub>Cl, 10mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,1mM de EDTA dissolvidos em 1L de água destilada) por 2 minutos para eliminação das hemácias. A suspensão celular foi novamente centrifugada por 5 minutos a 1500rpm. O pellet, que representa os linfócitos, foi ressuspenso em 1mL

de PBS. A contagem foi realizada diluindo-se a amostra em Trypan Blue 0,4% como descrito para o timo.

### **3.9. Avaliação das Células no Enxerto**

O enxerto foi removido da região dorsal, recortado em pequenas porções e macerado como descrito para os LNs. Além de passar pela peneira, a suspensão celular foi filtrada duas vezes utilizando-se um BD Falcon Cell Strainer de nylon, 70 $\mu$ m (BD Biosciences/EUA).

### **3.10. Avaliação da expressão das moléculas CD3, CD4, CD8 e CD11b por Citometria de Fluxo**

As células isoladas a partir dos LNs, timo, baço, sangue e enxerto foram centrifugadas (1500rpm por 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e sobre o pellet de células foram adicionados 0,50 $\mu$ L dos anticorpos monoclonais Pe Rat Anti-Mouse CD8, PerCP Rat Anti-Mouse CD4 e APC Hamster Anti-Mouse CD3 ou APC Rat Anti-Mouse CD11b (BD Biosciences, EUA) seguido de incubação no escuro por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com 1,0mL de PBS e centrifugadas (1500rpm por 5 minutos). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi fixado com Paraformaldeído 1% na proporção de 1:5 (100 $\mu$ L de PBS e 400 $\mu$ L de Paraformaldeído 1%). A suspensão celular foi analisada no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando-se o software Cell Quest Pro. Pelo menos 10000 eventos foram avaliados. A porcentagem de células expressando as moléculas avaliadas foi multiplicada pelo número de células dos

respectivos tecidos, exceto para o sangue e o enxerto, cujas células não foram quantificadas.

### **3.11. Avaliação dos parâmetros urinários**

Camundongos C57BL/6 controle foram alocados em gaiolas metabólicas individuais de acrílico e aço inoxidável (Nalgene 350-0311/EUA) a partir do 20º dia de tratamento para evitar que o estresse de adaptação à gaiola metabólica interferisse no volume de urina (24 horas de adaptação + 24 horas para coleta de urina)<sup>138</sup>. A urina coletada neste período foi centrifugada a 1500 rpm por cinco minutos para descarte de sedimentos, mensuração do volume e dosagens de creatinina e proteínas totais.

### **3.12. Avaliação dos parâmetros sanguíneos**

Após infusão i.p. de 0,4 a 0,5mL de anestésico na proporção estequiométrica descrita acima, uma amostra de sangue não heparinizado foi colhida da veia cava inferior. O soro foi separado após centrifugação a 1500rpm por cinco minutos e utilizado para mensuração da concentração de creatinina.

### **3.13. Dosagem das concentrações urinária e sérica de creatinina**

A creatinina, um produto secundário do metabolismo muscular e é impermeável à membrana tubular, sendo depurada quase inteiramente pela filtração glomerular.

Assim, o clearance de creatinina também pode ser usado para avaliar a Taxa de Filtração Glomerular (TFG)<sup>139</sup>.

As concentrações de creatinina na urina e no soro foram determinadas por ensaio colorimétrico baseado na técnica de Jaffé (Creatinina, Labtest Diagnóstica/Brasil). A urina foi diluída na proporção de 1:25, ou seja, 20µL de urina para 480µL de água destilada. O soro não foi diluído. As alíquotas de 125µL das amostras individuais de urina já diluídas, das amostras de soro e de um padrão de creatinina não diluído (4,0mg/dL), foram adicionados 250µL de ácido pícrico (44,4mmol/L), seguido de incubação em banho maria (37°C) por 10 minutos. A creatinina e outros componentes cromogênicos das amostras reagem com a solução de picrato em meio alcalino. As absorvâncias ( $A_1$ ) foram lidas em espectrofotômetro Genesys 5 (Spectronic/Dinamarca) em 510nm. As amostras e o padrão foram então acidificados (adição de 50µL de ácido acético 11,4mmol/L) em temperatura ambiente por cinco minutos para decompor o complexo picrato-creatinina, sendo que a cor derivada dos cromógenos permaneceu inalterada e sua absorvância ( $A_2$ ) foi mensurada também em 510nm. A diferença entre a leitura das duas absorvâncias forneceu o valor de creatinina verdadeiro após aplicação na seguinte fórmula:

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = \frac{A_1 - A_2}{\text{Absorvância do padrão}} \times 4$$

Para a concentração de creatinina urinária, o valor obtido a partir da fórmula foi ainda multiplicado por 25, fator de diluição.

O Clearance de Creatinina foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{ClCr (mL/min/100g)} = \frac{\text{UCr (mg/dL)} \times \text{UVol (mL)} \times 100}{\text{SCr (mg/dL)} \times \text{peso (g)} \times 1440}$$

Onde UCr = creatinina urinária; UVol = volume urinário; SCr = creatinina sérica

### 3.15. Dosagem da concentração sérica de uréia

O catabolismo dos carboidratos e lipídeos gera dióxido de carbono e água, que podem ser excretados facilmente pelos pulmões e rins, respectivamente. Por outro lado, o catabolismo protéico gera diversos produtos de excreção, sendo o nitrogênio o mais abundante. Em mamíferos, a maioria dos catabólitos nitrogenados é excretada na urina na forma de uréia<sup>140</sup>. Muitos avaliam a concentração de nitrogênio ureico no sangue (concentração de nitrogênio no sangue proveniente da uréia) como indicador de lesão renal<sup>141-143</sup>. Logo, determinamos a concentração de uréia sérica por ensaio enzimático-colorimétrico baseado na técnica de Jaffé (Uréia CE, Labtest Diagnóstica/Brasil). A alíquotas de 5µL das amostras de soro e de um padrão de uréia não diluído (70mg/dL), foram adicionados 500µL de urease tamponada, seguido de incubação em banho maria (37°C) por cinco minutos. As amostras foram então oxidadas (adição de 500µL de oxidante) a 37°C por cinco minutos. As absorbâncias (A) foram lidas em espectrofotômetro Genesys 5 em 600nm. A uréia é hidrolisada pela urease a íons amônio e CO<sub>2</sub>. Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato de sódio (contido na urease tamponada) e hipoclorito de sódio (contido no oxidante) sob ação catalisadora do nitroprussiato de sódio (contido na urease tamponada) para formar o azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra.

A concentração de uréia nas amostras foi determinada após aplicação dos valores das absorbâncias na seguinte fórmula:

$$\text{Uréia (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 70}{\text{Absorbância do padrão}}$$

### 3.15. Dosagem de proteinúria

Apesar da resistência extremamente baixa ao fluxo de água, a parede do capilar glomerular restringe de maneira eficiente a passagem de proteínas do sangue para a cápsula de Bowman com base no tamanho molecular, carga elétrica e configuração. A proteinúria é um indicador de alterações estruturais da parede do capilar glomerular, bem como de lesão celular no túbulo proximal<sup>144</sup>.

Neste trabalho, a concentração de proteínas totais na urina foi determinada por ensaio de detecção de proteínas solubilizadas Bradford com reagente corante concentrado (Bioagency, SP/Brasil).

Para construção de uma curva padrão de proteína, foi utilizado Padrão de proteína 1,38mg/mL (Bioagency, SP/Brasil). Os pontos construídos foram 0,2mg/mL (72µL de padrão para 428µL de água destilada), 0,4mg/mL (145µL de padrão para 355µL de água destilada), 0,6mg/mL (217µL de padrão para 283µL de água destilada), e 0,8mg/mL (290µL de padrão para 210µL de água destilada). A curva foi construída na forma de gráfico de dispersão no software Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft/EUA).

A urina foi diluída na proporção de 1:1 ou seja, 10µL de urina para 10µL de água destilada. A 20µL das amostras individuais de urina já diluídas e a 20µL dos respectivos pontos da curva padrão, foi adicionado 1mL de Reagente de Bradford diluído em água destilada na proporção de 1:5, seguido de incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro Genesys 5 em 595nm.

A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada após aplicação dos valores das absorbâncias na equação da respectiva curva padrão.

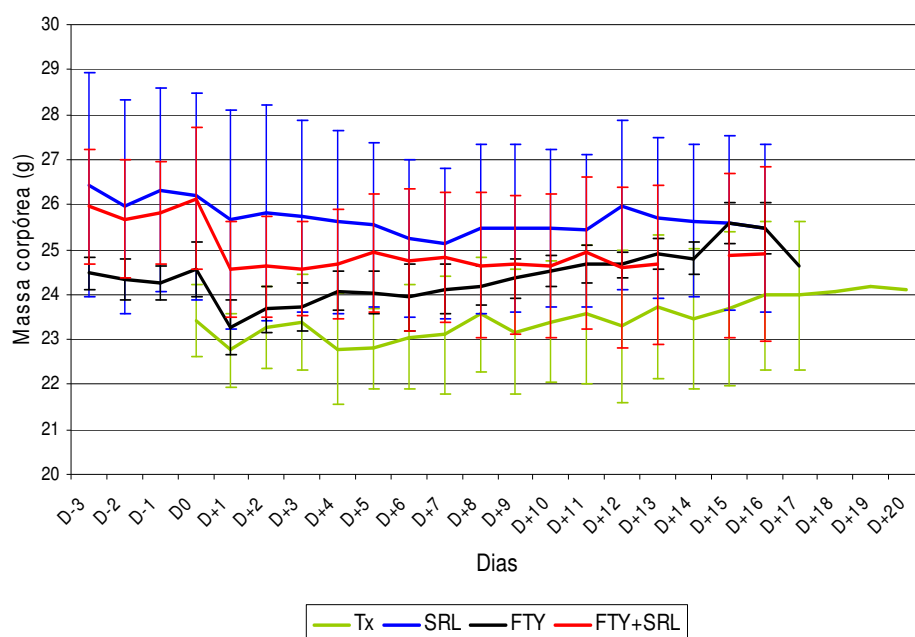
### **3.16. Análise Estatística**

Os dados referentes ao número de células no baço, células CD3+CD4+ nos linfonodos drenantes, células CD3+CD8+ no timo e porcentagem de monócitos no sangue foram analisados avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) e expressos como média±desvio padrão. O tempo de sobrevivência do aloenxerto de pele nos diferentes tratamentos foi analisado pelo método de Kaplan-Meier. Os dados referentes ao número de células CD11b+ no gate de linfócitos do baço foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis com correção do valor de p de Bonferroni. Os demais dados foram avaliados pelo Teste de Mood e expressos como mediana(intervalo interquartilico: q3-q1). Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## 4. Resultados

### 4.1. Sobrevida dos animais e variação da massa corpórea

Não houve mortes decorrentes dos tratamentos ao longo do estudo. Avaliou-se em todos os grupos a variação da massa corpórea diariamente nos experimentos de observação até o 17º dia pós-transplante. Todos os grupos submetidos ao transplante, tanto os tratados quanto o não tratado, apresentaram redução de peso logo após o procedimento cirúrgico. Ao final do experimento, enquanto os grupos Tx e FTY apresentaram ganho de massa corpórea ( $\Delta = +0,8\text{g}$  e  $+0,2\text{g}$ , respectivamente), os grupos aos quais foram administrados SRL ou FTY+SRL apresentaram perda ( $-1,0\text{g}$  e  $-1,1\text{g}$  respectivamente) (Figura 1).



**Figura 1.** Variação da média de massa corpórea ao longo de 21 dias de acompanhamento



## **4.2. Sobrevida do aloenxerto de pele**

As figuras 2a e 2b mostram que, no grupo Tx (n=5), o transplante de pele é rejeitado entre o 9º e o 13º dia pós-transplante (Tempo Médio até a rejeição, MTTF, do inglês *mean time till failure*, de  $9,8 \pm 0,8$  dias), no grupo tratado exclusivamente com SRL (n=5), a rejeição ocorre entre o 14º e o 16º dia pós-transplante (MTTF= $15,0 \pm 0,5$  dias), sendo que um dos animais não apresentou rejeição do enxerto; no grupo tratado exclusivamente com FTY (n=5), a rejeição ocorre entre o 12º e o 17º dias (MTTF= $14,8 \pm 0,9$  dias), sendo que um dos animais não apresentou rejeição do enxerto; no grupo tratado com a combinação FTY+SRL (n=5), somente um dos animais apresentou rejeição do enxerto até o 17º dia pós-transplante.

## **4.3. Fatores associados ao aumento de sobrevida do aloenxerto de pele**

### **4.3.1. Células no sangue periférico**

O grupo controle apresentou 81,0(4,5)% de linfócitos, 16,0(6,5)% de neutrófilos e 3,0 $\pm$ 1,4% no sangue periférico; o grupo Tx apresentou 63,0(27,0)% de linfócitos, 32,0(25,0)% de neutrófilos e 4,6 $\pm$ 0,8% de monócitos; o grupo tratado apenas com SRL apresentou 50,0(14,8)% de linfócitos, 41,0(13,5)% de neutrófilos e 8,2 $\pm$ 2,7% de monócitos; o grupo tratado somente com FTY apresentou 15,0(5,0)% de linfócitos, 27,5(3,5)% de neutrófilos e 8,2 $\pm$ 2,7% de monócitos; o grupo tratado com a combinação FTY+SRL apresentou 18,0(6,0)% de linfócitos, 75,5(6,3)% de neutrófilos e 8,6 $\pm$ 1,3% de monócitos (Figura 3a).

Houve diminuição significativa da porcentagem de linfócitos após o procedimento do transplante (Tx vs Controle,  $p < 0,005$ ) e após tratamento com FTY ou FTY+SRL (FTY ou FTY+SRL vs Tx,  $p < 0,005$ ). A porcentagem de neutrófilos foi significativamente aumentada pela administração FTY ou FTY+SRL (FTY ou FTY+SRL vs Tx ou SRL,  $p < 0,005$ ). A porcentagem de monócitos foi significativamente aumentada por todos os tratamentos (SRL ou FTY ou FTY+SRL vs Tx,  $p < 0,005$ ).

#### **4.3.1.1. Fenótipo das células do sangue periférico**

Para análise do fenótipo celular no sangue periférico, foram construídos gates para consideração de duas populações celulares para análise: linfócitos e monócitos/granulócitos (Figuras 3a-g) [145].

No grupo controle, 21,2(5,8)% das células no gate de linfócitos eram CD3+CD4+, 14,5(2,8)% eram CD3+CD8+ e 3,5(1,8)% eram CD11b+. No mesmo grupo, 42,5(11,6)% das células no gate de monócitos/granulócitos eram CD11b+.

No grupo transplante sem tratamento, 22,4(12,0)% das células no gate de linfócitos eram CD3+CD4+, 15,8(4,0)% eram CD3+CD8+ e 6,0(3,5)% eram CD11b+. No mesmo grupo 42,7(28,7)% das células no gate de monócitos/granulócitos eram CD11b+.

No grupo tratado somente com SRL, 25,1(4,4)% das células no gate de linfócitos eram CD3+CD4+, 17,9(4,1)% eram CD3+CD8+ e 7,3(7,4)% eram CD11b+. No mesmo grupo, 56,5(42,4)% das células no gate de monócitos/granulócitos eram CD11b+.

No grupo tratado somente com FTY, 1,8(1,6)% das células no gate de linfócitos

eram CD3+CD4+, 1,8(0,3)% eram CD3+CD8+ e 50,7(3,3)% eram CD11b+. No mesmo grupo, 93,5(9,8)% dos monócitos/granulócitos eram CD11b+.

No grupo tratado com a combinação FTY+SRL, 1,3(0,6)% das células no gate de linfócitos eram CD3+CD4+, 5,8(3,1)% eram CD3+CD8+ e 44,1(13,6)% eram CD11b+. No mesmo grupo, 93,4(2,5)% das células no gate de monócitos/granulócitos eram CD11b+.

Não foram observadas mudanças significativas da porcentagem de linfócitos CD3+CD4+, CD3+CD8+ ou CD11b+ e de células CD11b+ no gate de monócitos/granulócitos após o procedimento do transplante (Tx vs Controle) ou após a administração de SRL (SRL vs Tx). Os tratamentos com FTY ou FTY+SRL, por outro lado, acarretaram diminuição significativa da porcentagem de linfócitos CD3+CD4+ (FTY ou FTY+SRL vs Tx ou SRL,  $p < 0,005$ ) e CD3+CD8+ (FTY ou FTY+SRL vs Tx ou SRL,  $p < 0,005$ ) e aumento significativo das porcentagens de linfócitos CD11b+ (FTY ou FTY+SRL vs Tx ou SRL,  $p < 0,005$ ) e de células CD11b+ no gate de monócitos/granulócitos (FTY ou FTY+SRL vs Tx,  $p < 0,005$ ). O tratamento combinado diminuiu também a porcentagem de células CD3+CD8+ com relação ao tratamento isolado com FTY (FTY+SRL vs FTY,  $p < 0,05$ ).

#### **4.3.2 Células no baço**

O grupo controle apresentou  $36,3 \pm 3,5 \times 10^6$  esplenócitos; o grupo Tx apresentou  $65,3 \pm 10,4 \times 10^6$  esplenócitos; o grupo tratado somente com SRL apresentou  $36,3 \pm 5,5 \times 10^6$  esplenócitos; o grupo tratado somente com FTY apresentou  $29,9 \pm 5,5 \times 10^6$  esplenócitos; o grupo combinação apresentou  $25,2 \pm 3,9 \times 10^6$  esplenócitos (Figura 4a).

A quantidade de esplenócitos aumentou significativamente após o procedimento do transplante (Tx vs Controle,  $p < 0,05$ ) e diminuiu significativamente após administração das drogas (SRL ou FTY ou FTY+SRL vs Tx,  $p < 0,005$ ).

#### 4.3.2.1. Fenótipo das células do baço

Para análise do fenótipo celular no baço, foram construídos gates para consideração de duas populações celulares para análise: linfócitos e monócitos/granulócitos (Figuras 4b-e) [146].

No grupo controle,  $11,3(2,4) \times 10^6$  das células no gate de linfócitos eram CD3+CD4+,  $7,5(1,8) \times 10^6$  eram CD3+CD8+ e  $1,7(0,5) \times 10^6$  eram CD11b+. No mesmo grupo,  $17,3(3,9) \times 10^6$  das células no gate de monócitos/granulócitos eram CD11b+.

No grupo transplante sem tratamento,  $15,9(5,2) \times 10^6$  das células no gate de linfócitos eram CD3+CD4+,  $13,0(3,7) \times 10^6$  eram CD3+CD8+ e  $3,5(2,3) \times 10^6$  eram CD11b+. No mesmo grupo  $42,9(18,2) \times 10^6$  das células no gate de monócitos/granulócitos eram CD11b+.

No grupo tratado somente com SRL,  $9,0(2,6) \times 10^6$  das células no gate de linfócitos eram CD3+CD4+,  $5,9(1,5) \times 10^6$  eram CD3+CD8+ e  $1,7(1,7) \times 10^6$  eram CD11b+. No mesmo grupo,  $22,6(6,0) \times 10^6$  das células no gate de monócitos/granulócitos eram CD11b+.

No grupo tratado somente com FTY,  $5,5(3,4) \times 10^6$  das células no gate de linfócitos eram CD3+CD4+,  $4,8(3,6) \times 10^6$  eram CD3+CD8+ e  $3,4(0,8) \times 10^6$  eram CD11b+. No mesmo grupo,  $21,7(5,0) \times 10^6$  das células no gate de monócitos/granulócitos eram CD11b+.

No grupo tratado com a combinação FTY+SRL,  $4,3(1,1) \times 10^6$  das células no gate de

linfócitos eram CD3+CD4+,  $5,5(0,7) \times 10^6$  eram CD3+CD8+ e  $3,8(3,1) \times 10^6$  eram CD11b+. No mesmo grupo,  $21,8(5,6) \times 10^6$  das células no gate de monócitos/granulócitos eram CD11b+.

Após o procedimento do transplante, houve aumento estatisticamente significativo do número de linfócitos CD3+CD4+ (Tx vs Controle,  $p < 0,005$ ), CD3+CD8+ (Tx vs Controle,  $p < 0,005$ ) e células CD11b+ nos gates de linfócitos (Tx vs Controle,  $p < 0,05$ ) e de monócitos/granulócitos (Tx vs Controle,  $p < 0,005$ ). Os tratamentos diminuíram significativamente o número de linfócitos CD3+CD4+ (FTY ou SRL ou FTY+SRL vs Tx,  $p < 0,005$ ) e CD3+CD8+ (SRL ou FTY ou FTY+SRL vs Tx,  $p < 0,005$ ). Os tratamentos com FTY ou FTY+SRL diminuíram a quantidade de células CD11b+ no gate de monócitos/granulócitos (FTY ou FTY+SRL vs Tx,  $p < 0,005$ ). O tratamento com FTY aumentou significativamente a quantidade de células CD11b+ no gate de linfócitos comparado ao tratamento com SRL (FTY vs SRL,  $p < 0,05$ ).

#### **4.3.3. Células nos linfonodos drenantes**

O grupo controle apresentou  $1,8(0,3) \times 10^6$  células nos LNs periféricos; o grupo Tx apresentou  $1,9(1,1) \times 10^6$  células nos LNs periféricos; o grupo tratado somente com SRL apresentou  $1,3(0,5) \times 10^6$  células; o grupo tratado somente com FTY apresentou  $1,4(0,5) \times 10^6$  células; o grupo combinação apresentou  $1,1(0,6) \times 10^6$  células (Figura 5). Apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e somente transplantado, houve uma tendência à diminuição do número de células no sítio nos grupos tratados, que apresentaram quantidades inferiores àquelas do grupo controle (SRL ou FTY ou FTY+SRL vs Controle,  $p < 0,05$ ), de maneira mais importante no grupo FTY+SRL.

#### 4.3.3.1. Fenótipo das células dos linfonodos drenantes

Para análise do fenótipo celular nos LNs axilares, foi construído um gate para consideração da população de linfócitos (Figuras 5b,c).

No grupo controle,  $0,92 \pm 0,12 \times 10^6$  dos linfócitos eram CD3+CD4+ e  $0,54(0,16) \times 10^6$  eram CD3+CD8+.

No grupo transplante sem tratamento,  $0,64 \pm 0,15 \times 10^6$  dos linfócitos eram CD3+CD4+ e  $0,61(0,46) \times 10^6$  eram CD3+CD8+.

No grupo tratado somente com SRL,  $0,59 \pm 0,08 \times 10^6$  eram linfócitos CD3+CD4+ e  $0,40(0,07) \times 10^6$  eram linfócitos CD3+CD8+.

No grupo tratado somente com FTY,  $0,34 \pm 0,08 \times 10^6$  dos linfócitos eram CD3+CD4+ e  $0,45(0,18) \times 10^6$  eram CD3+CD8+.

No grupo tratado com a combinação FTY+SRL,  $0,14 \pm 0,10 \times 10^6$  dos linfócitos eram CD3+CD4+ e  $0,35(0,12) \times 10^6$  eram CD3+CD8+.

O grupo Tx apresentou diminuição significativa do número de linfócitos CD3+CD4+ (Tx vs Controle,  $p < 0,005$ ), bem como os grupos FTY e FTY+SRL (FTY ou FTY+SRL vs Tx ou SRL,  $p < 0,005$ ). Além disso, o tratamento combinado acarretou maior decréscimo dessas células comparado ao grupo SRL ( $p < 0,005$ ). O número de linfócitos CD3+CD8+ apresentou-se diminuído no grupo FTY+SRL comparado ao grupo Tx ( $p < 0,005$ ).

#### 4.3.4. Células no timo

O grupo controle apresentou  $69,0(7,9) \times 10^6$  timócitos; o grupo Tx apresentou  $43,2(7,8) \times 10^6$  timócitos; o grupo tratado somente com SRL apresentou

26,3(40,3) $\times 10^6$  timócitos; grupo tratado somente com FTY apresentou 40,0(6,9) $\times 10^6$  timócitos; o grupo combinação FTY+SRL apresentou 25,0(4,9) $\times 10^6$  timócitos (Figura 6a).

A quantidade de timócitos apresentou-se significativamente diminuída após o procedimento do transplante (Tx vs Controle,  $p < 0,005$ ). Os tratamentos com FTY e FTY+SRL diminuíram significativamente o número de timócitos (FTY ou FTY+SRL vs Tx,  $p < 0,005$ ), sendo a diminuição mais importante observada no grupo FTY+SRL (FTY+SRL vs FTY,  $p < 0,005$ ).

#### 4.3.4.1. Fenótipo das células do timo

Para análise do fenótipo celular no timo, foi construído um gate para consideração da população de linfócitos (Figura 6b-d).

No grupo controle, 6,9(1,4) $\times 10^6$  dos timócitos eram CD3+CD4+, 4,6 $\pm$ 0,5 $\times 10^6$  eram linfócitos CD3+CD8+ e 60,3(7,9) $\times 10^6$  eram CD4+CD8+.

No grupo transplante sem tratamento, 3,5(1,9) $\times 10^6$  dos timócitos eram CD3+CD4+, 2,0 $\pm$ 0,7 $\times 10^6$  eram CD3+CD8+ e 39,9(5,6) $\times 10^6$  eram CD4+CD8+.

No grupo tratado somente com SRL, 2,1(2,1) $\times 10^6$  dos timócitos eram CD3+CD4+, 1,7 $\pm$ 1,1 $\times 10^6$  eram CD3+CD8+ e 23,4(36,3) $\times 10^6$  eram CD4+CD8+.

No grupo tratado somente com FTY, 6,5(3,4) $\times 10^6$  dos timócitos eram CD3+CD4+, 2,0 $\pm$ 0,8 $\times 10^6$  eram CD3+CD8+ e 33,4(10,2) $\times 10^6$  eram CD4+CD8+.

No grupo tratado com a combinação FTY+SRL, 3,4(5,0) $\times 10^6$  dos timócitos eram CD3+CD4+, 2,5 $\pm$ 0,7 $\times 10^6$  eram CD3+CD8+ e 17,5(6,9) $\times 10^6$  eram CD4+CD8+.

O procedimento do transplante diminuiu significativamente o número de timócitos CD3+CD4+ (Tx vs Controle,  $p < 0,005$ ), CD3+CD8+ (Tx vs Controle,  $p < 0,005$ ) e

CD4+CD8+ (Tx vs Controle,  $p < 0,005$ ). Os tratamentos diminuíram significativamente a quantidade de células CD4+CD8+ (SRL vs Tx,  $p < 0,005$ ; FTY vs Tx,  $p < 0,005$ ; FTY+SRL vs Tx,  $p < 0,005$ ). Não houve diferenças significativas quanto à quantidade de células CD3+CD8+ entre os grupos tratados e somente transplantado.

#### **4.3.5. Células no enxerto**

##### **4.3.5.1. Fenótipo das células no enxerto**

No grupo transplante sem tratamento, 6,5(6,3)% eram linfócitos CD3+CD4+, 7,6(5,4)% eram linfócitos CD3+CD8+ e 8,8(9,2)% eram leucócitos CD11b+ (Figuras 2c,d).

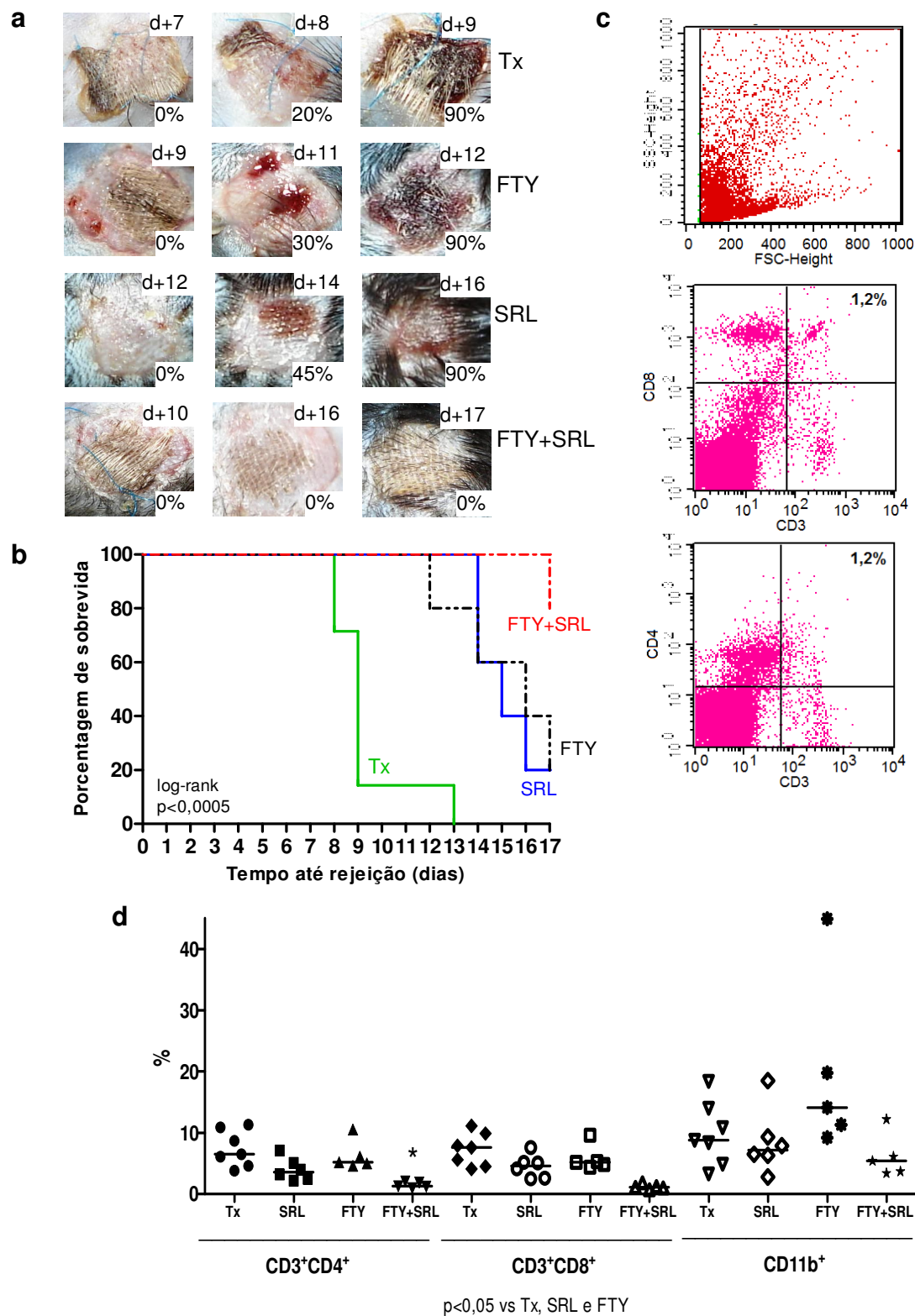
No grupo tratado somente com SRL, 3,6(3,2)% eram linfócitos CD3+CD4+, 4,6(3,2)% eram linfócitos CD3+CD8+ e 7,2(6,2)% eram leucócitos CD11b+.

No grupo tratado somente com FTY, 5,2(3,5)% eram linfócitos CD3+CD4+, 5,2(2,9)% eram linfócitos CD3+CD8+ e 14,1(22,1)% eram leucócitos CD11b+.

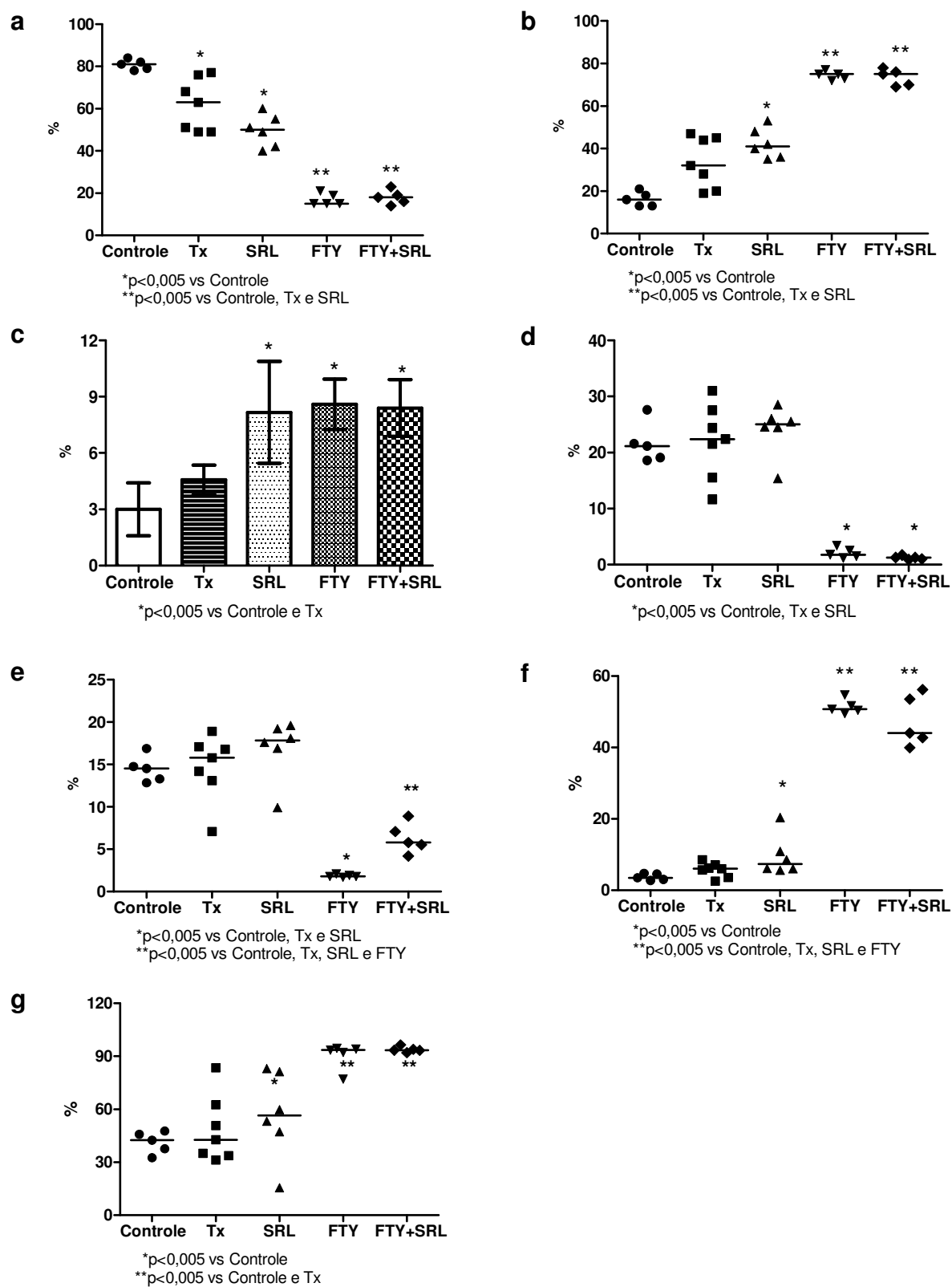
No grupo tratado com a combinação FTY+SRL, 1,3(0,9)% eram linfócitos CD3+CD4+, 1,1(0,7)% eram linfócitos CD3+CD8+ e 5,4(5,6)% eram leucócitos CD11b+.

O tratamento com FTY+SRL diminuiu significativamente a porcentagem de células CD3+CD4+ (FTY+SRL vs Tx ou SRL ou FTY,  $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre as porcentagens de linfócitos CD3+CD8+ (Tx vs SRL vs FTY vs FTY+SRL,  $p = 0,091$ ). Não houve diferença estatística quanto às porcentagens de células CD11b+ ( $p = 0,056$ ), porém houve uma tendência à diminuição no grupo FTY+SRL.

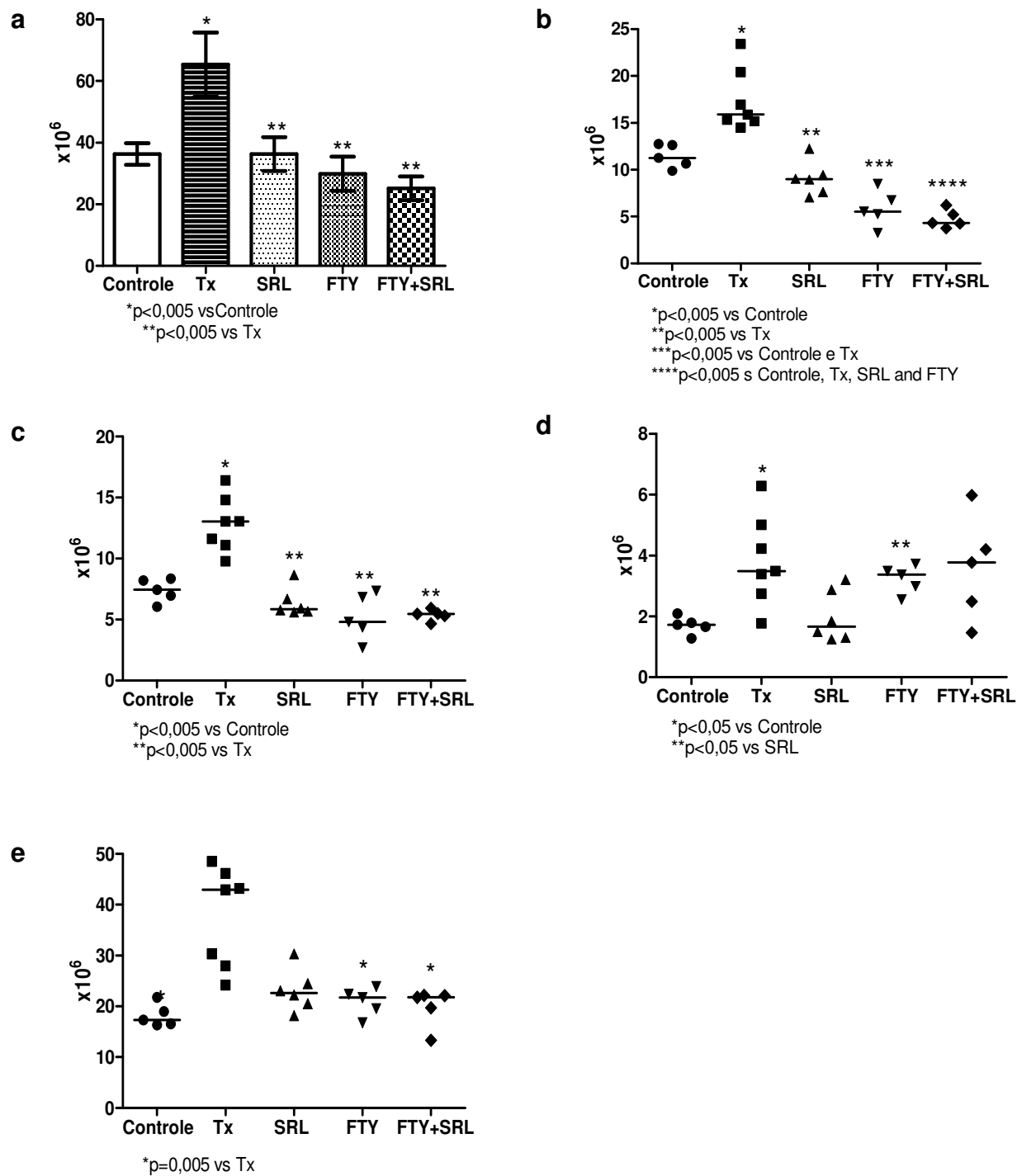




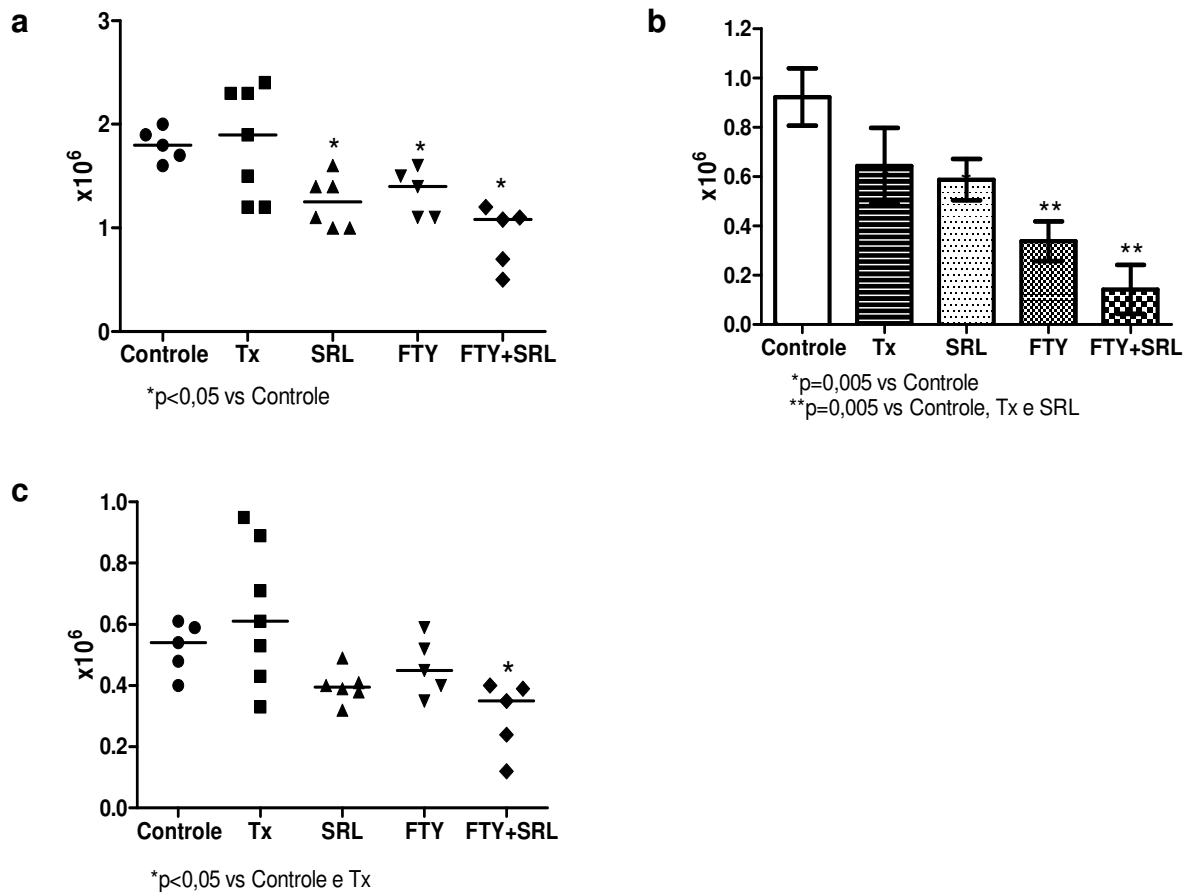
**Figura 2.** Visão macroscópica do processo de rejeição do enxerto (a); Sobrevida do enxerto (b); Dot plots representativos do grupo FTY+SRL mostrando a porcentagem de linfócitos T (c); Células TCD4+, TCD8+ e CD11b+ infiltrantes no enxerto (d).



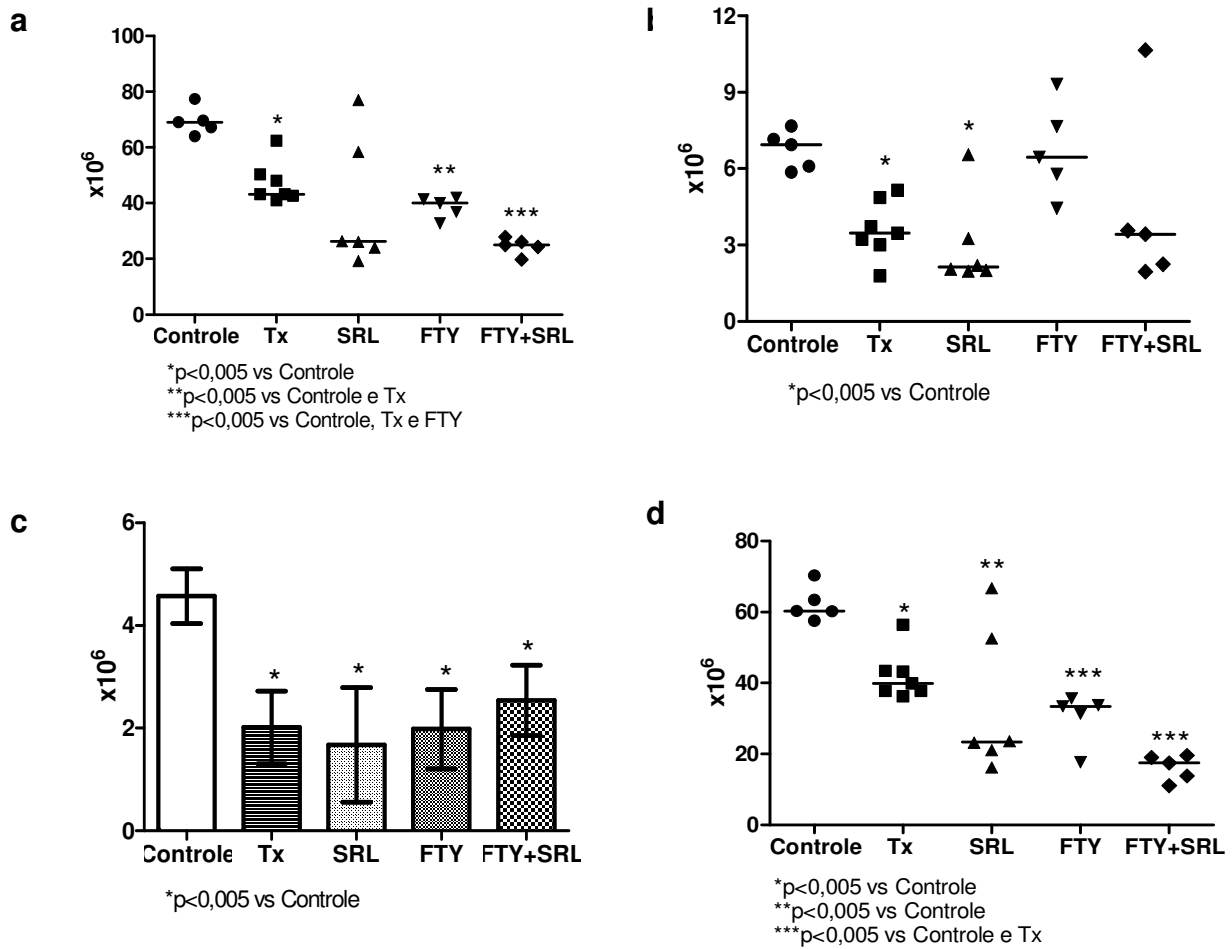
**Figura 3.** Porcentagem de células no sangue periférico. (a) linfócitos; (b) neutrófilos; (c) monócitos; (d) células CD3+CD4+; (e) células CD3+CD8+; (f) células CD11b+ no gate de linfócitos; (g) células CD11b+ no gate de monócitos/granulócitos.



**Figura 4.** Número de células no baço. (a) esplenócitos totais; (b) esplenócitos CD3+CD4+; (c) esplenócitos CD3+CD8+; (d) esplenócitos CD11b+ no gate de linfócitos; (e) esplenócitos CD11b+ no gate de monócitos/granulócitos.



**Figura 5.** Número de células nos linfonodos axilares. (a) células totais; (b) células CD3+CD4+; (c) células CD3+CD8+.



**Figura 6.** Número de células no timo. (a) timócitos totais; (b) timócitos CD3+CD4+; (c) timócitos CD3+CD8+; (d) timócitos CD4+CD8+.

#### **4.4. Parâmetros renais**

##### **4.4.1. Parâmetros urinários**

Conforme mostrado na Tabela 1, os animais tratados não apresentaram diferenças quanto ao volume urinário 24 horas, concentrações de proteína ou creatinina urinárias comparados aos controles. Entretanto, os animais tratados com SRL apresentaram uma ampla variabilidade (Q3-Q1) de excreção de creatinina.

##### **4.4.2. Parâmetros sanguíneos**

A concentração sérica de creatinina (mg/dL) no grupo FTY+SRL - 0,92(0,42) – foi significativamente aumentada em relação aos grupos Controle - 0,45(0,18), SRL - 0,30(0,23) – e FTY - 0,44(0,20) - (Figura 7a). Não houve diferenças entre as concentrações séricas de uréia (Tabela 1).

##### **4.4.3. Clearance de Creatinina**

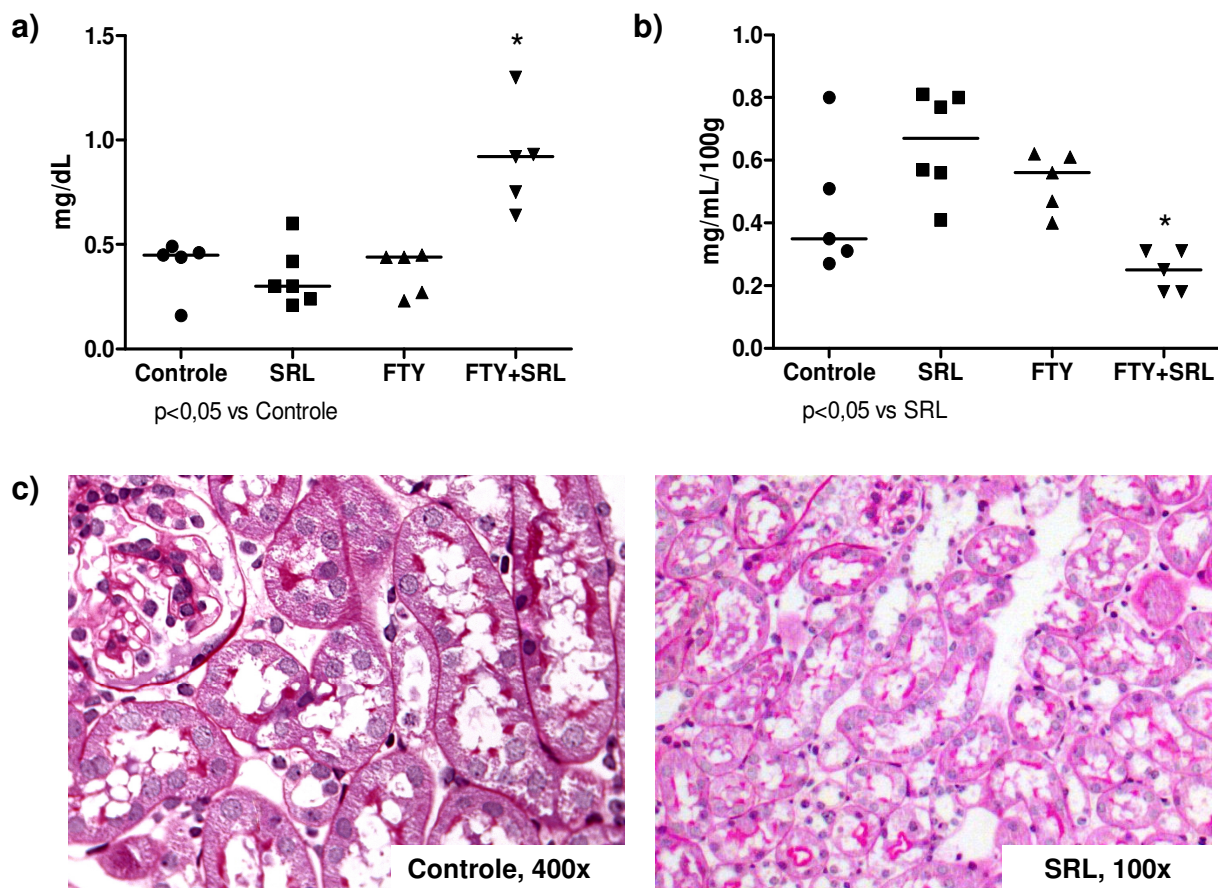
Conforme mostrado na Figura 1b, ambos os tratamentos isolados aumentaram discretamente o ClCr (mL/min/100g) – SRL=0,67(0,37) e FTY=0,67(0,28). Os animais tratados com SRL apresentaram aumento significativo desse parâmetro comparado ao FTY+SRL. FTY+SRL - 0,25(0,13) – não diferiu do Controle - 0,35(0,37).

#### 4.4.4. Histologia Renal

Não foram observadas alterações estruturais significativas nos animais tratados. Um de seis camundongos tratados com SRL apresentou pouca vacuolização, focos tubulares degenerativos e nucléolos proeminentes em células tubulares, porém borda em escova preservada, glomérulos normais e sem microvacuolização (Figura 7c).

**Tabela 1.** Volume urinário 24 horas, concentração urinária de creatinina (UCr), concentração urinária de proteína (UPr) e concentração sérica de uréia. Os dados são mostrados como mediana (Q3-Q1).

Groups	Volume (mL)	UCr (mg/dL)	UPr (mg/mL)	SUr (mg/dL)
Control	1,0(0,6)	47,3(7,3)	1,7(0,4)	57,1(12,4)
SRL	1,4(1,2)	50,6(19,5)	1,7(0,4)	48,0(18,3)
FTY	1,2(0,3)	49,7(15,0)	1,5(0,4)	63,1(9,5)
FTY+SRL	1,5(0,3)	48,9(14,8)	1,5(0,3)	60,9(9,1)
p	0,269	0,697	0,088	0,081



**Figura 7.** (a) Concentração sérica de creatinina e (b) Clearance de creatinina; (c) Secções renais coradas com H&E de animais representativos. O animal tratado com SRL apresenta modificações tubulares focais degenerativas, nucléolos proeminentes em células tubulares, glomérulos e borda em escova preservados.



## 5. DISCUSSÃO

A administração isolada de FTY e SRL tem sido bem tolerada em modelos experimentais descritos em ratos e camundongos<sup>32,33,41,42,109</sup>. Em nosso modelo experimental com camundongos, os animais apresentaram comportamento habitual nas gaiolas e houve discreta perda de massa corpórea nos grupos tratados. A perda de massa corpórea observada logo após a realização dos transplantes provavelmente está associada aos procedimentos que caracterizam o processo, como o uso de anestésico, as incisões, a remoção do tecido e as suturas, que deixam o animal debilitado durante este período.

A ausência de recuperação da massa corpórea inicial pelos animais dos grupos SRL e FTY+SRL sugerem que as drogas interferiram de alguma maneira no metabolismo desses animais.

Nosso grupo observou anteriormente que camundongos C57BL/6 tratados por gavagem com 1mg/Kg/dia de FTY durante 21 dias também apresentaram prejuízo do ganho de massa corpórea, padrão que não esteve associado ao estresse da gavagem, pois animais recebendo veículo apresentaram ganho de massa corpórea [99]. Em camundongos C57BL/6 obesos, foi demonstrado que a administração i.p. de FTY (3mg/kg) a cada 48 horas durante 8 semanas causou perda de massa corpórea inicial devido a menor ingesta alimentar durante as duas primeiras semanas, sugerindo possíveis ações da droga no sistema nervoso (saciedade) e/ou metabolismo. Após esse período, a ingesta alimentar foi similar à do grupo controle, porém não houve ganho de massa corpórea<sup>147</sup>. Os motivos pelos quais doses mais altas de FTY interferem na capacidade de manutenção da massa corpórea pelos animais, entretanto, ainda não são claros.

Ratos Sprague Dawley tratados i.p. com 1,5mg/Kg/dia de SRL durante 14 dias também apresentaram prejuízo do ganho de massa corpórea, o qual foi exacerbado pela combinação com CsA<sup>148</sup>, assim como ratos LEW tratados v.o. com 0,8, 2,0 ou 6,0mg/Kg/dia de SRL por até 28 dias<sup>149</sup>. Da mesma maneira, ratos Han:SPRD tratados i.p. com 0,2mg/Kg/dia de SRL durante 5 semanas apresentaram declínio de 22% da massa corpórea, significativamente maior que aquela apresentada por ratos aos quais foi administrado veículo<sup>150</sup>.

A administração de FTY isoladamente ou em combinação com drogas imunossupressoras convencionais como a CsA e o Tac em modelos experimentais de transplante de pele<sup>39,95,96,99,100,151,152</sup> rim<sup>32,105</sup>, fígado<sup>107</sup>, coração<sup>42</sup> e córnea<sup>104</sup> foi bem sucedida em aumentar a sobrevida dos enxertos.

Stepkowski *et al.* demonstraram que administração isolada de 0,05 a 8,0mg/Kg/dia v.o. de FTY prolongou a sobrevida do aloenxerto de coração entre ratos Wistar Furth e Buffalo de maneira dose-dependente de 6,4 dias para até 40 dias, enquanto a administração de 0,08mg/Kg/dia v.o. de SRL foi ineficaz em retardar a rejeição (6,8 dias). A administração combinada de FTY (0,05, 0,1 ou 0,5mg/Kg/dia v.o.) e SRL (0,08mg/Kg/dia v.o.) aos ratos durante 14 dias aumentou significativamente a sobrevida do enxerto para 15,5, 30,2 e 38,4 dias, respectivamente, evidenciando uma possibilidade de redução das doses de SRL de 1 a 3 vezes e de FTY de 2 a 4 vezes<sup>153</sup>. Da mesma maneira, observamos no presente estudo um aumento da sobrevida do aloenxerto de pele no grupo tratado com FTY isoladamente. Além disso, somente um episódio de rejeição foi observado durante o período de acompanhamento de 21 dias dos 5 animais aos quais foi administrada a combinação FTY+SRL. Considerando-se a ausência de efeito do FTY sobre a função linfocítica<sup>65,66,154</sup> e sua provável capacidade de impedir respostas imunes

localizadas<sup>149</sup>, a associação FTY+SRL poderia permitir o uso de doses diminuídas das drogas, acarretando menos efeitos colaterais.

Após a realização do transplante de pele, ocorre ativação linfocitária nos SLO, síntese de IL-2 e conseqüente proliferação do clone de linfócitos ativados contra os antígenos do enxerto e migração para o sítio inflamatório (enxerto)<sup>155</sup>. Em nossos experimentos, no 5º dia pós-transplante, a porcentagem de linfócitos no sangue periférico estava significativamente diminuída comparada àquela encontrada no grupo controle, sugerindo que essas células já estariam migrando para o enxerto nesse período.

A diminuição das porcentagens de ambos os subtipos de linfócitos CD3+CD4+ e CD3+CD8+ no sangue dos animais tratados com FTY e FTY+SRL condiz com a linfopenia observada nesses mesmos grupos. Diminuições significativas das quantidades de linfócitos CD3+CD4+ e CD3+CD8+ no sangue também foram observadas por Chiba *et al.*<sup>61</sup> 12 horas após a administração oral única de 0,1mg/Kg de FTY a ratos F344, por Yagi *et al.*<sup>88</sup> durante 20 dias de administração i.p. de 1mg/Kg/dia de FTY a camundongos BALB/c e por Mehling *et al.*<sup>156</sup> em pacientes com esclerose múltipla recidivante tratados com 1,25mg de FTY por dia.

Por outro lado, considerando-se os relatos da ausência de ação do FTY sobre granulócitos e monócitos<sup>90,154,157</sup>, a meia vida curta dos neutrófilos (aproximadamente 8 horas após a saída da medula óssea)<sup>158</sup> e a rápida passagem dos monócitos pelo sangue (aproximadamente um dia após a saída da medula óssea, quando migram para outros órgãos para se diferenciar em macrófagos especializados)<sup>159</sup>, acreditamos que as porcentagens aumentadas de neutrófilos e monócitos no sangue dos animais tratados com SRL, FTY e FTY+SRL observadas no esfregaço sanguíneo deva-se ao influxo fisiológico de neutrófilos para o sangue

periférico a partir da medula óssea enquanto as populações de linfócitos diminuem. O aumento relativo dessas células no sangue contribuiria em parte para o aumento da porcentagem de células CD11b+ observado no sangue dos animais tratados com FTY e FTY+SRL.

Lan *et al.*<sup>94</sup> demonstraram que DCs murinas do sangue e do baço murinos expressam todos os receptores de S1P. A administração i.p. única de 3,5mg/Kg de FTY a camundongos C57BL/10J aumentou a quantidade de DCs no sangue, o que esteve associado a modulação negativa de CCR7 e de moléculas de adesão de superfície celular, dentre elas CD11b, importante para a adesão da DC ao endotélio e ICAM-1. Por outro lado, a administração da droga diminuiu a quantidade de DCs no baço e nos LNs, possivelmente devido à redução da expressão de CCR7, que interferiu na migração dessas células a partir do sangue. Além disso, as DCs foram também retidas no sangue e reduzidas concomitantemente no baço de receptores de transplante alogênico de medula óssea tratados com FTY, o que esteve associado a reduzida atividade aloestimulatória das células T naive do hospedeiro.

Diante desses dados e considerando os relatos da ausência de ação do FTY sobre células NK<sup>90,91</sup>, podemos sugerir que possivelmente um aumento do número de DCs do receptor retidas no sangue periféricos dos grupos FTY e FTY+SRL - que teriam a capacidade migratória pelas HEV prejudicada pela administração de FTY - seria em parte responsável pelas porcentagens de células CD11b+ aumentadas, junto com o aumento relativo de neutrófilos e monócitos. O número diminuído de esplenócitos CD11b+ no baço dos animais tratados com FTY ou FTY+SRL corrobora com a hipótese de reduzida atividade aloestimulatória sobre as células T naive do hospedeiro.

Ainda, a administração i.p. diária de 3mg/Kg de FTY a partir do dia -1 em modelo murino de transplante de pele completamente incompatível aumentou o tempo médio de sobrevida dos enxertos de 12 para 34,5 dias. Este aumento esteve associado a inibição da migração de DCs alogênicas para os LNs drenantes após o transplante. As DCs que efetivamente migraram para os tecidos linfóides secundários apresentavam menor expressão de MHC de classe II, CD86 e CCR7, moléculas importantes para a propriedade intrínseca das DCs de migrarem para os LNs periféricos (CCR7) e para a co-estimulação da ativação de células T alogênicas (CD86)<sup>160</sup>.

Logo, além da retenção das DCs do receptor (apresentação indireta do aloantígeno) no sangue pela administração de FTY, também as DCs do doador (apresentação direta do aloantígeno) contidas no enxerto de pele em nosso modelo teriam sua migração e apresentação de antígenos nos SLO prejudicada, colaborando para a maior sobrevida do enxerto observada.

Em nossos experimentos, observamos aumento significativo do número de esplenócitos nos animais transplantados e não tratados devido a um aumento de linfócitos CD3+CD4+, CD3+CD8+ e células CD11b+ no gate de monócitos/granulócitos. Este aumento possivelmente decorre da ativação e conseqüente proliferação linfocitária após apresentação dos antígenos do enxerto pelas APCs<sup>155</sup>.

A ação do SRL em diminuir a contagem de esplenócitos foi demonstrada previamente em camundongos NZB/W F1, no modelo experimental de lúpus eritematoso sistêmico. A linhagem desenvolve uma doença autoimune caracterizada por esplenomegalia, linfadenopatia, produção de autoanticorpos e glomerulonefrite mediada por complexos imunes. Comparado ao grupo que recebeu salina, o grupo

dessa linhagem tratado com SRL (3mg/Kg/dia v.o.) durante 4 meses suprimiu a linfoproliferação, reduzindo significativamente o tamanho e o peso do baço e a contagem total de esplenócitos<sup>161</sup>.

O mesmo efeito também foi demonstrado para FTY quando, após 2,5 dias de tratamento oral com uma dose estimada de 1,25 mg/kg/dia da droga, Morris *et al.* observaram um declínio progressivo e significativo do número de linfócitos do baço de camundongos C57BL/6, que durou pelos 21 dias de tratamento. O grupo observou também um aumento inicial (após o 2º dia de administração) do número de linfócitos nos LNs e redução gradual até o 21º dia de tratamento, quando a quantidade de células atingiu níveis moderadamente menores do que aqueles observados no dia 0. O fato de os esplenócitos não serem afetados inicialmente tanto quanto os LNs ocorreria em função das diferenças na composição de linfócitos do baço, que tipicamente contém muito mais células maduras do que as células presentes nos LNs<sup>154</sup>. Do mesmo modo, após 2 semanas de administração v.o. de FTY a camundongos C57BL/6J, Luo *et al.* observaram diminuição do número de linfócitos no baço para aproximadamente 50% dos níveis do controle, além de diminuição do número de células também nos LNs periféricos, mesentéricos e placas de Peyer<sup>62</sup>.

Nossos resultados corroboram com esses achados, pois, após 9 dias de tratamento (5º dia pós-transplante), ambos FTY720 e SRL diminuíram o número de linfócitos no baço, porém não foram observadas diferenças estatísticas quanto ao número de linfócitos nos LNs drenantes entre os grupos tratados e somente transplantado, apesar de haver uma tendência à diminuição do número de linfócitos nos LNs nos grupos tratados. A administração de FTY+SRL diminuiu de maneira mais importante o número de esplenócitos, indicando que a supressão da linfoproliferação pelo SRL

foi sinérgica quando combinada ao redirecionamento dos linfócitos do baço pelo FTY720. Como sugerido por Morris *et al.*<sup>154</sup>, no 9º dia de administração de FTY, os números de linfócitos nos LNs já estariam passando por um declínio ou, como sugerido por Luo *et al.*<sup>62</sup>, e por Sugito *et al.*<sup>63</sup>, há outros possíveis efeitos de FTY ainda não conhecidos, modulando o tráfego celular independentemente da presença de LNs a baço.

A tendência à diminuição do número de células nos LNs nos grupos tratados deveu-se à diminuição do número de linfócitos CD3+CD4+ nos grupos FTY e FTY+SRL e de linfócitos CD3+CD8+ no grupo FTY+SRL. As células sob efeito do FTY podem ter sido redirecionadas pra outros LNs, como os mesentéricos, e Placas de Peyer, sítios não avaliados neste trabalho. Sob ação do SRL, a proliferação das células pode ter sido suprimida.

Yasuo *et al.* demonstraram diminuição significativa do número de timócitos 7 dias após o transplante hepático de ratos ACI para LEW, acompanhada de extensiva apoptose de células do córtex e mudanças fenotípicas dos timócitos. No dia 7 pós-transplante, o número de timócitos estava significativamente diminuído, bem como a população CD4+CD8+, enquanto a proporção de células da medula tímica e células CD4+CD8- CD4-CD8+ estava aumentada, sugerindo uma aceleração da maturação dos timócitos para que participem da rejeição do aloenxerto na periferia<sup>162</sup>.

Também em nossos experimentos, observamos diminuição significativa do número de timócitos e do número de timócitos duplo-positivos (CD4+CD8+) no grupo Tx, porém não houve aumento do número de timócitos CD3+CD4+ ou CD3+CD8+. De fato, observamos diminuição do número de timócitos CD3+CD4+ e CD3+CD8+. Considerando a maior imunogenicidade da pele comparada a outros tecidos<sup>6</sup>, acreditamos que a maturação e a emigração para a periferia das células maduras

(CD3+CD4+ e CD3+CD8+) em nosso modelo já tenha ocorrido no 5º dia pós-transplante.

Yagi *et al.*<sup>88</sup> constataram que a administração i.p. de 1mg/Kg/dia de FTY a camundongos BALB/c durante 20 dias manteve a celularidade total no timo. Contudo, a população de timócitos prestes a emigrar para a periferia (timócitos simples-positivos) aumentou gradualmente na medula do timo a partir do 2º dia de tratamento. Em adição, houve diminuição significativa do número de emigrantes tímicos para os LNs e baço além de supressão da proliferação de timócitos duplo-positivos imaturos, gerando indiretamente o acúmulo de timócitos maduros.

DiJoseph *et al.*<sup>149</sup> mostraram que a administração oral de 0,8, 2,0 e 6,0mg/Kg de SRL por 28 dias foi capaz de induzir atrofia tímica em ratos LEW, que apresentaram reduzida celularidade cortical e medular. Tian *et al.*<sup>163</sup> mostraram que a administração i.p. de 1mg/Kg/dia de SRL a ratos DA durante 14 dias diminuiu a celularidade tímica a partir do dia 8. No dia 14, o número de células CD4+CD8+ estava diminuído devido a um aumento de apoptose dessas células, enquanto não houve mudanças do número de células CD4+CD8- e CD4-CD8+.

Em nossos experimentos, observamos diminuição significativa do número de timócitos e de células CD4+CD8+ nos grupos tratados com FTY ou FTY+SRL, mais importantes no grupo tratado com a combinação das drogas, porém não houve aumento do número de timócitos CD3+CD4+ ou CD3+CD8+ nesses grupos. No grupo SRL, observamos uma tendência à diminuição do número total de timócitos e diminuição significativa do número de timócitos CD4+CD8+, enquanto os números de células CD3+CD4+ e CD3+CD8+ não foram modificados. Esses resultados sugerem que o SRL induziu apoptose da população CD4+CD8+, o que não permitiu



maturação para o fenótipo CD3+CD4+ e CD3+CD8+ e conseqüente acúmulo induzido pelo FTY, pelo menos após 9 dias de administração oral das drogas.

Em pacientes transplantados renais, uma dose única de FTY (0,25 a 3mg) reduziu significativamente as porcentagens de linfócitos periféricos para 30 a 70%, porém o efeito da droga em diferentes subpopulações de células T esteve associado à dose administrada. Células CD4+CD62L+, capazes de migrar através da barreira endotelial das HEV para os LNs foram principalmente afetadas (0,25 a 2,0mg), enquanto que os linfócitos CD4+CCR5+, células potencialmente capazes de infiltrar o enxerto durante a rejeição, somente foram reduzidos por doses de 3,5mg de FTY<sup>164</sup>.

Estudos experimentais envolvendo protocolos de tolerância induzida a aloenxerto cardíaco murino sugeriram que células Treg CD4+CD25+Foxp3+ específicas ao aloantígeno desenvolvem-se e acumulam-se periféricamente nos LNs. A administração de anticorpo monoclonal anti-CD62L – prevenção de migração de células T para os LNs – a camundongos transplantados submetidos a um dos protocolos de indução de tolerância (transfusão de esplenócitos do doador i.v. para o receptor sete dias antes do transplante + anticorpos CD40 Ligante) diminuiu o tempo médio de sobrevida do aloenxerto, que foi restaurada pelo seqüestro dos linfócitos nos LNs pela administração de FTY<sup>165</sup>.

FTY (0,3mg/kg/dia por 6 semanas) administrado a camundongos Ly5.2 irradiados e transplantados com células de camundongos Ly5.1 (deficientes em células T) não afetou a migração de precursores linfóides a partir da medula para o timo, nem o processo de diferenciação das células T. Sob influência da droga, os camundongos quiméricos apresentaram na periferia células T saídas do timo e a timopoiese progrediu normalmente nos animais tratados e não tratados. A reconstituição das

células T nos animais tratados, porém, não foi tão eficiente como no grupo não tratado, que apresentou número significativamente mais alto de células T CD4+ e T CD8+ derivadas do doador no baço e LNs periféricos<sup>166</sup>. Esses dados indicam que, apesar de o efeito bloqueador do FTY720 limitar o egresso tímico de células T, uma proporção diminuída de células consegue deixar o timo e contribuir com a reconstituição celular periférica de células T. As quimeras foram também utilizadas para investigação do efeito da droga na distribuição de células T reguladoras (Treg, CD4+CD25+) e não reguladoras (CD4+CD25-) nos órgãos linfóides secundários. A administração de FTY720 aumentou significativamente a razão Treg/não Treg (no baço e LNs periféricos) que foram capazes de deixar o timo sob os efeitos da droga. Esses dados sugerem que as Treg liberadas para a periferia na presença da droga podem contribuir para o efeito imunossupressor de FTY, ou seja, podem interferir na habilidade de células T periféricas pré-existentes em organizar a resposta imune que leva à rejeição do enxerto<sup>166</sup>.

Estudos *in vitro* de Wang *et al.* demonstraram aumento da atividade das Treg CD4+CD25+ pela S1P. A cocultura de células CD4+CD25+ com células CD4+CD25- diminuiu a proliferação de células CD4+CD25- e a produção de IL-2 por essas últimas em 31% e 20%, respectivamente. A pré-incubação das células CD4+CD25+ com S1P aumentou a inibição da proliferação das células TCD4+CD25- para até 50% e a produção de IL-2 em 51% ( $3 \times 10^{-7}$ M de S1P) a 60% ( $10^{-6}$ M de S1P)<sup>45</sup>. Considerando que a S1P parece ser necessária para a supressão ótima da atividade das células T efectoras pelas Treg CD4+CD25+, Sawicka *et al.* investigaram o efeito do FTY no seqüestro e atividade funcional dessas células. Camundongos C57BL/6 aos quais foram administradas doses de 0,01 a 0,1mg/Kg de FTY por gavagem durante três dias consecutivos apresentaram linfopenia dose-dependente e

proporção significativamente maior de células Treg CD4+CD25+ nos sangue e no baço, mas não nos LNs, e proporção significativamente menor de Treg expressando CD62L no baço em relação a animais controle. Foram identificados níveis significativamente menores de expressão de RNAm para S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>4</sub> nas células CD4+CD25+ comparadas às células CD4+CD25-. Apesar de a administração de FTY aos animais reduzir em aproximadamente 50% a expressão dos dois receptores em ambos os subtipos celulares, comparadas às células CD4+CD25-, as células CD4+CD25+ apresentam menor resposta quimiotática a concentrações de S1P, sendo essa resposta similar na presença ou ausência de administração de FTY. Esses dados sugerem que a droga afeta de maneira diferente a migração para tecidos linfóides de pelo menos um subtipo de Treg (aquelas com baixa expressão de CD62L), cuja recirculação seria menos dependente de S1P<sub>1</sub> e, portanto, menos responsiva a S1P. Além disso, células CD4+CD25+ obtidas do baço de camundongos pré-tratados com FTY apresentavam regulação positiva da expressão de Foxp3 e, quando transfundidas em animais sensibilizados com ovalbumina 24 horas antes do desafio com o antígeno em aerosol inibiram a infiltração de eosinófilos e linfócitos nas vias aéreas. Esses dados sugeriram que a droga aumenta diretamente a atividade funcional de células Treg CD4+CD25+<sup>167</sup>.

Treg CD4+CD25+high humanas estimuladas por IL-2 via TCR e CD28 passam por rápida expansão quando o Sirolimus é adicionado. Enquanto células CD4+CD25- sofrem apoptose induzida pela droga, as células CD4+CD25+high são resistentes à morte celular, apresentam fenótipo regulador característico (Foxp3+, CD62L+, GITR+, CTLA4+ e CCR7+) e mantêm a expressão de receptores de migração para LNs<sup>168</sup>.

Apesar da maior sobrevida do enxerto obtida pelos grupos transplantados tratados comparados ao Tx, não observamos diferença significativa para as porcentagens de linfócitos CD3+CD4+ ou CD3+CD8+ no enxerto entre os grupos SRL ou FTY, enquanto o tratamento com FTY+SRL diminuiu significativamente o número de células CD3+CD4+.

Acreditamos que administração isolada de FTY poderia permitir a infiltração de subpopulações específicas de células T mais resistentes à ação da droga, como os linfócitos CD4+CCR5+, ou o fenótipo das células infiltrantes poderia ser regulador, suprimindo a atividade de células T citotóxicas contra o enxerto. A maior sobrevida do aloenxerto de pele observada no grupo FTY+SRL poderia dever-se ao favorecimento da migração de células com fenótipo regulador para o enxerto por ambas as drogas, bem como pelo sinergismo entre supressão de linfoproliferação, apoptose de timócitos imaturos (CD4+CD8+), linfopenia, retenção de DCs do receptor no sangue periférico e prejuízo da apresentação de antígenos pelas DCs do doador nos SLO.

Considerando a ausência de efeito do FTY sobre a função linfocítica e sua provável capacidade de impedir respostas imunes localizadas, porém permitir a manutenção de respostas sistêmicas, a associação FTY+SRL poderia permitir o uso de doses diminuídas de ambas as drogas, acarretando menos efeitos colaterais.

A administração isolada de FTY (1mg/Kg/dia, via oral) durante 4 dias aumentou a sobrevida do aloenxerto de pele entre linhagens completamente incompatíveis de camundongos<sup>39</sup>. Essa mesma dose administrada durante 21 dias a camundongos não esteve associada a toxicidade renal<sup>110</sup>. Da mesma maneira, a administração de altas doses de FTY (5mg/Kg/dia, via oral) a ratos durante 21 dias não esteve associada a esclerose, lesões tubulares, infiltrados ou fibrose, e os animais tratados

apresentaram clearance de creatinina ajustado ao peso, produção de urina 24 horas e osmolalidade urinária normais<sup>111</sup>.

Foi demonstrado então que a administração combinada de FTY (1mg/Kg/dia, via oral) + CsA (10mg/Kg/dia, i.p.) ou FTY (1mg/Kg/dia, via oral) + Tac (2mg/Kg/dia, via oral) durante 21 dias aumentou significativamente a sobrevida do aloenxerto de pele murino. Entretanto, os animais tratados com FTY720+CsA apresentaram alterações discretas da função renal (concentração plasmática de sódio reduzida e excreção urinária de albumina aumentada), enquanto que os animais tratados com FTY+Tac apresentaram alterações mais proeminentes (diurese de 24 horas aumentada e diminuição da concentração urinária de creatinina e sódio)<sup>17,108</sup>.

Após verificação de que a combinação FTY720+SRL é efetiva em aumentar a sobrevida do aloenxerto de pele, e considerando a possibilidade de nefrotoxicidade da combinação FTY+SRL, a proteinúria foi avaliada como indicador de alterações estruturais da parede do capilar glomerular, bem como de lesão celular no túbulo proximal<sup>144</sup>. Nossos resultados evidenciaram ausência de alterações da concentração urinária de proteína quando o grupo Controle foi comparado às monoterapias ou aos animais tratados com FTY+SRL.

O aumento da concentração sérica de creatinina, o principal marcador biológico de função renal utilizado na clínica, está relacionado a diminuição da TFG. Em nosso modelo, embora a concentração sérica de creatinina estivesse elevada no grupo FTY+SRL, o clearance de creatinina foi similar ao do Controle, sugerindo que não houve alterações funcionais significativas na TFG nesse grupo<sup>139</sup>. Além disso, os rins dos animais tratados com FTY+SRL não apresentaram quaisquer alterações estruturais. O clearance de creatinina aumentado nos animais tratados com as

monoterapias provavelmente estão relacionados à ampla variabilidade dos níveis urinários de creatinina.

Pacientes com doença renal crônica ou pacientes transplantados tratados com inibidores de calcineurina apresentam aumento significativo das concentrações sérica de uréia e de creatinina e TFG diminuída<sup>169</sup>. Em nosso modelo, as concentrações séricas de uréia não diferiram quando os animais Controle foram comparados aos animais tratados com as monoterapias ou com FTY+SRL.

Enquanto relatos de dois grandes estudos clínicos prospectivos de fase III de um ano de acompanhamento associaram o FTY (2,5mg mais dose total de CsA ou 5mg mais dose reduzida de CsA) a diminuição do ClCr e desenvolvimento de edema macular em pacientes transplantados renais<sup>116,169</sup>, o tratamento via oral diário com FTY como monoterapia (1,25 ou 5,0mg/dia) em pacientes com esclerose múltipla por até 2 anos em um estudo de fase II de 24 meses resultou efetivo e bem tolerado<sup>170</sup>. Além disso, foi relatada a resolução do edema macular induzido por FTY (5mg) após 3 meses de descontinuação da droga<sup>171</sup>, e acredita-se que esse efeito colateral tenha resultado da interação FTY-CsA<sup>116,170,171</sup>. É possível, então, que os efeitos adversos atribuídos ao FTY no transplante renal sejam específicos para esta população e relacionados a recuperação mais lenta e incompleta da função renal, bem como a co-morbidades e co-medicações.

## 6. CONCLUSÃO

A combinação FTY720+Sirolimus aumentou a sobrevida do aloenxero de pele e não foram observados sinais de rejeição até 17 dias após o transplante em 80% dos receptores.

Os eventos imunológicos sugeridos associados a este achado foram a diminuição do número de células CD3+CD4+ e CD3+CD8+ no sangue periférico; a retenção das células apresentadora de antígeno (CD11b+) do receptor no sangue periférico, impedindo sua migração para os linfonodos e baço, reduzindo a atividade aloestimulatória das células T naive do hospedeiro; o prejuízo da migração das DCs do doador para os órgãos linfóides secundários e consequente apresentação de antígenos; a prevenção do egresso de timócitos maduros para a periferia e apoptose dos timócitos CD4+CD8+ imaturos; a possível seleção de células infiltrantes do enxerto com fenótipo regulador.

A combinação FTY720+SRL não esteve associada a alterações estruturais ou funcionais renais significativas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garcia VD, Almeida T, Pinto JBT. Processo de Doação - Transplante. In: Garcia VD, Abbud Filho M, Neumann J, Pestana JOM. Transplante de Órgãos e Tecidos. São Paulo: Segmento Farma. 2ª ed. 2006, p.115-127.
2. Garcia SC, Lopes LS, Schott KL, Beck ST, Pomblum VJ. Ciclosporina A e Tacrolimus: uma revisão. J. Bras Patol Med Lab 2004; 40(6): 393-401.
3. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. Crit Rev Oncol Hematol 2005; 56: 23–46.
4. Ponticelli C. Calcineurin inhibitors in renal transplantation: too precious to be abandoned. Nephrol Dial Transplant 2000; 15: 1307-1309.
5. Knechtle SJ. Clinical trials – where are we now? Immunol Rev 2003; 196: 237–246.
6. Jones ND, Turvey SE, Maurik AV, Hara M, Kingsley CI, et al. Differential Susceptibility of Heart, Skin, and Islet Allografts to T Cell-Mediated Rejection. J Immunol 2001; 166: 2824-2830.
7. Ritchers CD. Migration of Dendritic Cells to the Draining Lymph Node after Allogeneic or Congeneic Rat Skin Transplantation. Transplantation 1999; 67(6): 828-832.
8. Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. Langerhans cells – dendritic cells of the epidermis. Apmis 2003; 111(7-8): 725–740.
9. Rosenberg AS, Singer A. Evidence that the effector mechanism of skin allograft rejection is antigen-specific. Proc Natl Acad 1988; 85: 7739-7742.



10. Nogueira-Martins MF, Lima RSM, Pestana JOM, Bueno V. Immune response in the draining Lymph node after skin transplantation. *JBT* 2003; 6: 80-83.
11. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editores. Transplantation Immunology. In: *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: Saunders Elsevier. 6<sup>a</sup> ed, 2007. p.375-396.
12. Benichou G, Takizawa PA, Olson CA, McMillan M, Sercarz EE. Donor Major Histocompatibility Complex (MHC) Peptides Are Presented by Recipient MHC Molecules during Graft Rejection. *J Exp Med* 1992; 175: 305-308.
13. Gould DS, Auchincloss H Jr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* 1999; 20(2): 77-82.
14. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Ochoa FS, James MJ, Marelli-Berg FM et al. A Novel Pathway of Alloantigen Presentation by Dendritic Cells. *J Immunol* 2004; 173: 4828-4837.
15. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editores. Antigen Receptors and Accessory Molecules of T Lymphocytes. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 6<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p.137-152.
16. Crabtree GR. Calcium, Calcineurin, and the Control of Transcription. *J Biol Chem* 2001; 276(4): 2313–2316.
17. Abbud Filho M, Pestana JOM, Garcia VD. Agentes Imunossupressores Químicos. In: Garcia VD, Abbud Filho M, Neumann J, Pestana JOM. *Transplante de Órgãos e Tecidos. Transplante de Órgãos e Tecidos*. São Paulo: Segmento Farma. 2<sup>a</sup> ed. 2006, p.249-259.
18. Kahan BD. Sirolimus and FTY720: New Approaches to Transplant Immunosuppression. *Transpl Proc* 2002; 34: 2520-2522.

19. Rossini AA, Greiner DL, Mordes JP. Induction of Immunological Tolerance for Transplantation. *Physiol Rev* 1999; 79(1): 99-141.
20. Kamoun M. Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. *Clin Biochem* 2001; 34(1): 29-34.
21. Patel PS. Overcoming the force and power of immunity: a history of immunosuppression in kidney transplantation. *J Nephrol* 2006; 19: 137-143.
22. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56: 23-46.
23. Pestana JOM. Análise de ensaios terapêuticos que convergem para a individualização da imunossupressão no transplante renal. [Tese apresentada para obtenção do título de livre docente]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. Departamento de Medicina. Disciplina de Nefrologia, 2001.
24. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RDM. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: Longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 2004; 78: 557-565.
25. Kamar N, Mariat C, Delahousse M, Dantal J, Najjar AA, Cassuto E et al. Diabetes mellitus after kidney transplantation: a French multicentre observational study. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 1986-1993.
26. Almawy WY, Melemedjian OK. Clinical and Mechanistic Differences Between FK506 (Tacrolimus) and Cyclosporin A. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1916-1918.
27. Dumont FJ. FK506, An Immunosuppressant Targeting Calcineurin Function. *Curr Med Chem* 2000; 7: 731-748.

28. Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: A review of the evidence. *Kidney Int* 2001; 59: 3–16.
29. Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G et al. Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells. *J Biol Chem* 1995; 270(2): 815-822.
30. Vickers K, Mitra R, Kapoor M, Kahan B, Morrisett JD. Effect of Sirolimus Treatment on Gene Expression in Renal Transplant Patients. *World J Surg* 2007; 31(4): 644-653.
31. Koehl GE, Andrassy J, Guba M, Richter S, Kroemer A, Scherer MN et al. Rapamycin protects allografts from rejection while simultaneously attacking tumors in immunosuppressed mice. *Transplantation* 2004; 77: 1319–1326.
32. Ueda H, Takahara S, Itoh S, Nomi H, Shibahara N, Katsuoka Y. Preoperative administration of FTY720 prolonged renal allograft survival. *Transplant Immunol* 2005; 14: 1-8.
33. Suleiman M, Cury PM, Pestana JOM, Burdmann EA, Bueno V. FTY720 Prevents Renal T-Cell Infiltration After Ischemia/Reperfusion Injury. *Transplant Proc* 2005; 37: 373–374.
34. Kaudel CP, Frink M, van Griensven M, Schmiedem U, Probst C, Bergmann S et al. FTY720 Application Following Isolated Warm Liver Ischemia Improves Long-Term Survival and Organ Protection in a Mouse Model. *Transp Proc* 2007; 39: 493-498.
35. Fujino M, Funeshima N, Kitazawa Y, Kimura H, Amemiya H, Suzuki S et al. Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Lewis Rats by FTY720 Treatment. *J Pharmacol And Exper Ther* 2003; 305(1): 70-77.

36. Kataoka H, Sugahara K, Shimano K, Teshima K, Koyama M, Fukunari A et al. FTY720, Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulator, Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibition of T Cell Infiltration. *Cell & Molec Immunol* 2005; 2(6): 439-448.
37. Azuma H, Takahara S, Ichimaru N, Wang JD, Itoh Y, Otsuki Y et al. Marked Prevention of Tumor Growth and Metastasis by a Novel Immunosuppressive Agent, FTY720, in Mouse Breast Cancer Models. *Cancer Res* 2002; 62: 1410–1419.
38. Yasui H, Hideshima T, Raje N, Roccaro AM, Shiraishi N, Kumar S et al. FTY720 Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells and Overcomes Drug Resistance. *Cancer Res* 2005; 65(16): 7478-7484.
39. Lima RSM, Nogueira-Martins MF, Silva HT, Pestana JOM, Bueno V et al. FTY720 Treatment Prolongs Skin Graft Survival in a Completely Incompatible Strain Combination. *Transplant Proc* 2004; 36: 1015-1017.
40. Chiba K, Hocino H, Ohtsuki M, Kataoka H, Maeda Y, Matsuyuki H et al. Immunosuppressive Activity of FTY720, Sphingosine 1-Phosphate receptor Agonist: I. Prevention of Allograft Rejection in Rats and Dogs by FTY720 and FTY720-Phosphate. *Transplant Proc* 2005; 37: 102-106.
41. LI X.-K, Tamura AA, Fujino M, Guo L, Kakefuda T, Funeshima N, Enosawa S et al. Induction of lymphocyte apoptosis in rat liver allograft with ongoing rejection by FTY720. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 331-339.
42. Wang MH, Milekhin V, Hua Z, Hong-Zheng H. FTY720, a new immunosuppressant, as rescue therapy in mouse cardiac transplantation. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24(9): 847-852.
43. Miyasaka M, Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nature Rev Immunol* 2004; 4: 360-370.

44. Cyster JG. Chemokines, Sphingosine-1-Phosphate, and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 127–159.
45. Wang W, Graeler MK, Goetzl EJ. Physiological sphingosine 1-phosphate requirement for optimal activity of mouse CD4<sup>+</sup> regulatory T Cells. *FASEB J* 2004; 18: 1043-1045.
46. Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 1979; 9: 301-306.
47. Latger-Cannard V, Besson I, Doco-Lecompte T, Lecompte T. A standardized procedure for quantitation of CD11b on polymorphonuclear neutrophil by flow cytometry: potential application in infectious diseases. *Clin Lab Haematol* 2004; 26(3): 177-186.
48. Klein E, Di Renzo L, Yefenof E. Contribution of CR3, CD11b/CD18 to cytolysis by human NK cells. *Mol Immunol* 1990; 27(12): 1343-1347.
49. Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavi CF et al. The Surface Phenotype of Dendritic Cells Purified from Mouse Thymus and Spleen: Investigation of the CD8 Expression by a Subpopulation of Dendritic Cells. *J Exp Med* 1992; 176: 47-58.
50. Christensen JE, Andreasen SO, Christensen JP, Thomsen AR. CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8<sup>+</sup> T cells and memory cells. *Int Immunol* 2001; 13(4): 593-600.
51. Carlos T, Harlan J. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068–2101.

52. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004; 427: 355-360.
53. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 745-763.
54. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8<sup>+</sup> memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 2003; 101: 4260–4266.
55. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401: 708–812.
56. Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, Ikumoto T, Sasaki S, Toyama R et al. Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J Antibiot* 1994; 47: 208–215.
57. Fujita T, Yoneta M, Hirose R, Sasaki S, Inoue K, Kiuchi M, Hirase S et al. Simple compounds, 2-alkyl-2-amino-1,3-propanediols have potent immunosuppressive activity. *Bioorg & Med Chem Lett* 1994; 5: 847–852.
58. Fujita T, Hirose R, Yoneta M, Sasaki S, Inoue K, Kiuchi M et al. Potent immunosuppressants, 2-alkyl-2-aminopropane-1,3-diols. *J Med Chem.* 1996; 39: 4451–4459.
59. Suzuki S, Enosawa T, Kakefuda T, Shinomiya T, Amari M, Naoe S et al. A novel immunosuppressant, FTY720, with a unique mechanism of action, induces long-term graft acceptance in rat and dog allotransplantation. *Transplantation* 1996; 61: 200-205.

60. Suzuki S, Li XK, Enosawa S, Shinomiya T. A new immunosuppressant, FTY720, induces bcl-2-associated apoptotic cell death in human lymphocytes. *Immunology* 1996; 89: 518-523.
61. Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, Kataoka H, Kawaguchi T, Ohtsuki M et al. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *J Immunol* 1998; 160(10): 5037-5044.
62. Luo Z-J, Tanaka T, Kimura F, Miyasaka M. Analysis of the mode of action of a novel immunosuppressant FTY720 in mice. *Immunopharmacol* 1999; 41(3):199-207.
63. Sugito K, Tsugumichi K, Inoue M, Ikeda T, Hagiwara M, Fukusawa M. The Effect of a Novel Immunosuppressant, FTY720, in Mice Without Secondary Lymphoid Organs. *Surg Today* 2005; 35: 662-667.
64. Pinschewer DD, Ochsenbein AF, Odermatt B, Brinkmann V, Hengartner H, Zinkernagel RM. FTY720 Immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion and memory. *J Immunol* 2000; 164: 5761-5770.
65. Premenko-Lanier M, Moseley NB, Pruett ST, Romagnoli PA, Altman JD. Transient FTY720 treatment promotes immune-mediated clearance of a chronic viral infection. *Nature* 2008; 454: 894-898.
66. Sommerer C, Morath C, Giese T, Meurer S, Zeier M. Activity of Nuclear Factor of Activated T Cells Is Independent of the Number of Peripheral Lymphocytes in FTY720-Treated Patients. *Transplant Proc* 2008; 40: 1416-1418.

67. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 2002; 296: 346-349.
68. Brinkmann V, Cyster JG, Hla Timothy. FTY720: Sphingosine-1-Phosphate Receptor-1 in the Control of Lymphocyte Egress and Endothelial Barrier Function. *Am J Transpl* 2004; 4: 1019-1025.
69. Kihara A, Igarashi Y. Production and release of sphingosine 1-phosphate and the phosphorylated form of the immunomodulator FTY720. *Biochim Biophys Acta* 2008; 32: 212-220.
70. Gräler M, Goetzl EJ. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB J* 2002; 16(14): 1874–1878.
71. Dorsam G, Graeler M, Seroogy C, Kong Y, Voice JK, Goetzl EJ. Transduction of multiple effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) on T cell functions by the S1P1 G protein coupled receptor. *J Immunol* 2003; 171: 3500–3507.
72. Cinamon G, Matloubian M, Lesneski M J, Xu Y, Low C, Lu T et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nature Immunol* 2004; 5: 713–720.
73. Maeda Y, Matsuyuki H, Shimano K, Kataoka H, Sugahara K, Chiba K. Migration of CD4 T cells and dendritic cells toward sphingosine 1-phosphate (S1P) is mediated by different receptor subtypes: S1P regulates the functions of murine mature dendritic cells via S1P receptor type 3. *J Immunol* 2007; 178(6): 3437-3446.
74. Walzer T, Chiossone L, Chaix J, Calver A, Carozzo C, Garrigue-Antar L et al. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nature Immunol* 2007; 8(12): 1337-1344.



75. Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* 2003; 102(10): 3665-3667.
76. Paugha SW, Paynea SG, Barboura SE, Milstienb S, Spiegel S. The Immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. *FEBS Lett* 2003; 554: 189-193.
77. Zemann B, Kinzel B, Muller M, Reuschel R, Mechtcheriakova D, Urtz N et al. Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood* 2006; 107(4): 1454-1458.
78. Yatomi Y, Yamamura S, Ruan F, Igarashi Y. Sphingosine 1-Phosphate Induces Platelet Activation through an Extracellular Action and Shares a Platelet Surface Receptor with Lysophosphatidic Acid. *J Biol Chem* 1997; 272: 5291–5297.
79. Anada Y, Igarashi Y, Kihara A. The immunomodulator FTY is phosphorylated and released from platelets. *Eur J Pharmacol* 2007, 568: 106–111.
80. Brinkmann V, Cyster JG, Hla Timothy. FTY720: Sphingosine-1-Phosphate Receptor-1 in the Control of Lymphocyte Egress and Endothelial Barrier Function. *Am J Transpl* 2004; 4: 1019-1025.
81. Lee MJ, Thangada S, Claffey SP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 1999; 99: 301–312.
82. Sanchez T, Estrada-Hernandez T, Paik JH, Wu MT, Venkataraman K, Brinkmann V. Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability, *J Biol Chem* 2003; 278: 47281–47290.

83. Gräler MH, Goetzl EJ. The immunosuppressant FTY720 downregulates sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptors. *FASEB* 2004; 18: 551-553.
84. Liu CH, Thangada S, Lee MJ, Van Brocklyn JR, Spiegel S, Hla T. Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 1179–1190.
85. Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 2005; 309: 1735–1739.
86. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 2007; 316: 295–298.
87. Oo ML, Thangada S, Wu M-T, Liu CH, Macdonald TH, Lynch KR et al. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J Biol Chem* 2007; 282: 9082–9089.
88. Yagi H, Kamba R, Chiba K, Soga H, Yaguchi K, Nakamura M et al. Immunosuppressant FTY720 inhibits thymocyte emigration. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1435-1444.
89. Hofmann M, Brinkmann V, Zerwes H-G. FTY720 preferentially depletes naive T cells from peripheral and lymphoid organs. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 1902–1910.
90. Vaessen LM, van Besouw NM, Mol WM, Ijzermans JN, Weimar W. FTY720 treatment of kidney transplant patients: a differential effect on B cells, naive T cells, memory T cells and NK cells. *Transpl Immunol* 2006; 15: 281–288.

91. Walzer T, Chiossone L, Chaix J, Calver A, Carozzo C, Garrigue-Antar L et al. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nature Immunol* 2007; 8(12): 1337-1344.
92. Idzko M, Panther E, Corinti S, Morelli A, Ferrari D, Herouy Y et al. Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses. *FASEB J* 2002; 16(6): 625–627.
93. Muller H, Hofer S, Kaneider N, Neuwirt H, Mosheimer B, Mayer G et al. The immunomodulator FTY720 interferes with effector functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2005; 35(2): 533–545.
94. Lan YY, De Creus A, Colvin BL, Neuwirt H, Mosheimer B, Mayer G et al. The sphingosine-1-phosphate receptor agonist FTY720 modulates dendritic cell trafficking in vivo. *Am J Transplant* 2005; 5(11): 2649–2659.
95. Yanagawa Y, Hoshino Y, Kataoka H, Kawaguchi T, Ohtsuki M, Sugahara K et al. FTY720, a novel immunosuppressant, prolongs rat skin allograft survival by decreasing T-cell infiltration into grafts. *Transplant Proc* 1999; 31: 1227-1229.
96. Yanagawa Y, Hoshino Y, Chiba K. The significance of timing of FTY720 administration on the immunosuppressive effect to prolong rat skin allograft survival. *Int Immunopharmacol* 2000; 22: 597-602.
97. Lopes CT, Silva LBL, Cury PM, Burdmann EA, Bueno V. Changes in lymphocyte phenotype and increased skin allograft survival after FTY720+FK506 therapy. *Bras J Hematol Hemother* 2008; 30: 181-187.
98. Lima RSM, Nogueira-Martins MF, Silva HT, Pestana JOM, Bueno V. FTY720 Treatment Prolongs Skin Graft Survival in a Completely Incompatible Strain Combination. *Transplant Proc* 2004; 36: 1015-1017.

99. Silva FR, Silva LBL, Cury PM, Burdmam EA, Bueno V. FTY720 in combination with cyclosporine – an analysis of skin allograft survival and renal function. *Int Immunopharmacol* 2006; 6:1911-1918.
100. Lopes CT, Gallo AP, Franco M, Cury PM, Bueno V. Skin Allograft Survival and Analysis of Renal and Blood Parameters after FTY720+FK506 Treatment. *Transplant Proc* 2008, 40: 856-860.
100. Chueh S-C, Tsai C-C, Chiu B, Li Y-C, Lai M-K. Rescuing acute rejection of rat cardiac allografts with FTY720. *Transplant Proc* 2000; 32:1629-1630.
101. Chueh S-C, Chen J-R, Chen J, Lai M-K. FTY720 prevents chronic rejection of rat heterotopic cardiac allografts. *Transplant Proc* 2001; 33: 542-543.
102. Zhang L, Zhu T, Sun EW, Shen SQ, Min ZL, Chen ZK. Pretreatment with FTY720 alone induced long-term survival of mouse heart allograft. *Transplant Proc* 2002; 35: 567-568.
103. Mayer K, Birnbaum F, Reinhard T, Reis A, Braunstein S, Claas F. FTY720 prolongs clear corneal allograft survival with a differential effect on different lymphocyte populations. *Br J Ophthalmol* 2004; 88(7): 915–919.
104. Suzuki T, Jin MB, Shimamura T, Yamashita K, Taniguchi M, Nomura M et al. A new immunosuppressant, FTY720, in canine kidney transplantation: effect of single drug, induction and combination treatments. *Transpl Int* 2004; 17: 574–584.
105. Xu M, Pirenne J, Antoniou EA, Afford SC, D'Silva M, McMaster P. Effect of peritransplant FTY720 alone or in combination with post-transplant tacrolimus in a rat model of cardiac allotransplantation. *Transpl Int* 1998;11: 288–294.
106. Tamura A, Li XK, Funeshima N, Enosawa S, Amemiya H, Kitajima M et al. Immunosuppressive therapy using FTY720 combined with tacrolimus in rat liver transplantation. *Surgery* 2000; 127: 47–54.

107. Silva FR, Silva LBL, Cury PM, Burdmann EA, Bueno V. FTY720 in combination with cyclosporine—an analysis of skin allograft survival and renal function. *Int Immunopharmacol* 2006; 6:1911–1918.
108. Galvão VR, Ginoza M, Franco M, Burdmann E, Bueno V et al. Prolonged Administration of FTY720 Does Not Cause Renal Toxicity in Mice. *Transplant Proc.* 2005; 37: 112-113.
109. Gallo AP, Silva LBL, Franco M, Burdmann EA, Bueno V. Tacrolimus in combination with FTY720 – an analysis of renal and blood parameters. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 1723-1728.
110. Tawadrous MN, Mabuchi A, Zimmermann A, Wheatley AM. Effects of Immunosuppressant FTY720 on Renal and Hepatic Hemodynamics in the Rat. *Transplantation* 2002; 74(5): 602–610.
111. Budde K, Schutz M, Glander P, Peters H, Waiser J, Liefeldt L et al. FTY720 (fingolimod) in renal transplantation. *Clin Transplant* 2006; 20(Suppl 17): 17–24.
112. Tedesco-Silva H, Mourad G, Kahan BD, Grinyo JB, Weimar W, Mulgaonkar S et al. FTY720, a novel immunomodulator: efficacy and safety results from the first phase 2A study in de novo renal transplantation. *Transplantation* 2005; 79: 1553-1560.
113. Koyrakh L, Roman MI, Brinkmann V, Wickman K. The heart rate decrease caused by acute FTY720 administration is mediated by the G protein-gated potassium channel I. *Am J Transplant* 2005; 5: 529-536.
114. Mulgaonkar S, Tedesco H, Oppenheimer F, Walker R, Kunzendorf U, Russ G et al. FTY720/cyclosporine regimens in de novo renal transplantation: a 1-year dose-finding study. *Am J Transplant* 2006; 6: 1848–1857.

115. Salvadori M, Budde K, Charpentier B, Klempnauer J, Nashan B, Pallardo LM et al. FTY720 versus MMF with cyclosporine in de novo renal transplantation: a 1-year, randomized controlled trial in Europe and Australasia. *Am J Transplant* 2006; 6: 2912–2921.
116. Koehl GE, Andrassy J, Guba M, Richter S, Kroemer A, Scherer MN et al. Rapamycin protects allografts from rejection while simultaneously attacking tumors in immunosuppressed mice. *Transplantation* 2004; 77:1319–1326.
117. Campistol JM, Eris J, Oberbauer R, Friend P, Hutchison B, Morales JM. Terapia com Sirolimo após Retirada Precoce da Ciclosporina Reduz o Risco de Câncer no Transplante Renal de Adultos. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 581-589.
118. Savikko J, von Willebrand E. Sirolimus Attenuates Chronic Allograft Nephropathy in an Experimental Rat Kidney Transplantation Model. *Transplant Proc* 2006; 38: 2699–2700.
119. Damião MJ, Bertocchi APF, Monteiro RMM, Gonçalves GM, Cenedeze MA, Feitoza CQ et al. The Effects of Rapamycin in the Progression of Renal Fibrosis. *Transplant Proc* 2007; 39: 457–459.
120. Lieberthal W, Fuhro R, Andry C, Patel V, Levine JS. Rapamycin Delays But Does Not Prevent Recovery from Acute Renal Failure: Role of Acquired Tubular Resistance. *Transplantation* 2006; 82(1): 17-22.
121. Brattstrom C, Tyden G, Sawe J, Herlenius G, Claesson K, Groth CG. A randomized, double-blind, placebo-controlled study to determine safety, tolerance, and preliminary pharmacokinetics of ascending single doses of orally administered sirolimus (rapamycin) in stable renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1996; 28: 985-986.

122. Kahan BD, Podbielski J, Napoli KL, Katz SM, Meier-Kriesche HU, Van Buren CT. Immunosuppressive effects and safety of a sirolimus/cyclosporine combination regimen for renal transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1040-1046.
123. Kahan BD, Julian BA, Pescovitz MD, Vanrenterghem Y, Neylan J. For the Rapamune Study Group. Sirolimus reduces the incidence of AR episodes despite lower cyclosporine doses in Caucasian recipients of mismatched primary renal allografts: a phase II trial. *Transplantation* 1999; 68: 1526-1532.
124. Groth CG, Backman L, Morales J-M, Calne R, Kreish H, Lang P et al. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation* 1999; 67: 1036-1042.
125. Andoh TF, Lindsley J, Franceschini N, Bennett WM. Synergistic effects of cyclosporine and rapamycin in a chronic nephrotoxicity model. *Transplantation* 1996; 62: 311-316.
126. Knight R, Ferrarresso M, Serino F, Katz S, Lewis R, Kahan BD. Low-dose rapamycin potentiates the effects of subtherapeutic doses of cyclosporine to prolong renal allograft survival in the mongrel canine model. *Transplantation* 1993; 55: 947-949.
127. Khanna KA. Mechanism of the combination immunosuppressive effects of rapamycin with either cyclosporine or tacrolimus. *Transplantation* 2000; 70: 690-694.
128. Kahan BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 2000; 356: 194-202.
129. MacDonald AS, RAPAMUNE Global Study Group. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen

for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001; 71: 271-280.

130. Krüger B, Fischereider M, Jauch K-W, Graeb C, Hoffmann U, Böger CA et al. Five-Year Follow-up After Late Conversion From Calcineurin Inhibitors to Sirolimus in Patients With Chronic Renal Allograft Dysfunction. *Transplant Proc* 2007; 39: 518–521.

Maiorano A, Stallone G, Schena A, Infante B, Pontrelli P, Schena FP et al. Sirolimus interferes with iron homeostasis in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 82: 908-912.

131. Thauinat O, Beaumont C, Chatenoud L, Lechaton S, Mamzer-Bruneel M-F, Varet B et al. Anemia after late introduction of sirolimus may correlate with biochemical evidence of a chronic inflammatory state. *Transplantation* 2005; 80: 1212-1219.

132. Troppmann C, Pierce JL, Gandhi MM, Gallay BJ, Mcvicar JP, Perez RV. Higher Surgical Wound Complication Rates With Sirolimus Immunosuppression After Kidney Transplantation: A Matched-Pair Pilot Study. *Transplantation* 2003; 76(2): 426-429.

133. Kuppahallya S, Al-Khaldib A, Weissshaarc D, Valantine HA, Oyerb P, Robbinsb RC et al. Wound Healing Complications with De Novo Sirolimus Versus Mycophenolate Mofetil-Based Regimen in Cardiac. Transplant Recipients *Am J Transplant* 2006; 6: 986–992.

134. Franco AFV, Martini D, Abensur H, Noronha IL. Proteinuria in Transplant Patients Associated With Sirolimus. *Transplant Proc* 2007; 39: 449–52.

135. Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Toxicity and efficacy of sirolimus: relationship to whole-blood concentrations. *Clin Ther* 2000, 22: B93-B100.



136. Bankir L, Chen K, Yang B. Lack of UT-B in vasa recta and red blood cells prevents urea-induced improvement of concentrating ability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F144-51.
137. Guyton AC, Hall JE. Urine Formation by the Kidneys: II. Tubular Processing of the Glomerular Filtrate. In: Schmitt W, Gruliow R, editors. *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: Elsevier Inc 327. 2006, p.327-347.
138. Yang B, Bankir L. Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F881–F896.
139. Terada Y, Inoshita S, Kuwana H, Kobayashi T, Okado T, Ichijo H, *et al.* Important role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in ischemic acute kidney injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 365: 1043-1049.
140. de Vries B, Matthijsen RA, van Bijnen AAJHM, Wolfs TGAM, Buurman WA. Lysophosphatidic Acid Prevents Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibition of Apoptosis and Complement Activation. *Am J Pathol* 2003; 163(1): 47-56.
141. Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS, Cantley LG. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest* 2003; 112: 42–49.
142. D'amico G, Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int* 2003; 63: 809-825.
143. Desmeules P, Dufour M, Fernandes MJG. A rapid flow cytometry assay for the assessment of calcium mobilization in human neutrophils in a small volume of lysed whole-blood. *J Immunol Methods* 2009; 340: 154-157.
144. Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamazaki T, Yamamoto N *et al.* Novel two-parameter flow cytometry (MIL4/SSC followed by MIL4/CT7) allows for

identification of five fractions of guinea pig leukocytes in peripheral blood and lymphoid organs. *J Immunol Methods* 2006; 311(1-2):47-56.

145. Kendall MR, Hupfeld CJ. FTY720, a sphingosine 1-phosphate receptor modulator, reverses high-fat diet-induced weight gain, insulin resistance and adipose tissue inflammation in C56Bl/6 mice. *Diabetes Obes Metabol* 2008; 10(9): 802-805.

146. Whiting PH, Woo J, Adam BJ, Hasan NU, Davidson RJL, Thomson AW. Toxicity of rapamycin: a comparative and combination study with cyclosporine at immunotherapeutic dosages in the rat. *Transplantation* 1991; 52: 203-208.

147. DiJoseph JF, Fluhler E, Armsrong J, Sharr M, Sehgal SN. Therapeutic Blood Levels of Sirolimus (Rapamycin) in the Allografted Rat. *Transplantation* 1996; 62(8): 1109-1112.

148. Lieberthal W, Fuhro RC, Andry C, Renke H, Abernathy VE, Koh JS. Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F693-F706.

149. Silva FR, Gallo AP, Palma P, Cury PM, Bueno V. FTY720+CsA prolong skin allograft survival without preventing T cell activation. *Transplant International* 2005; 18(Supl 1): 111-111.

150. Yanagawa Y, Sugahara K, Kataoka H, Kawaguchi T, Masubuchi Y, Chiba K. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. II. FTY720 prolongs skin allograft survival by decreasing T cell infiltration into grafts but not cytokine production in vivo. *J Immunol* 1998; 160: 5493-5499.

151. Stepkowski SM, Wang M-e, Qu X, Yu J, Okamoto M, Tejpal N et al. Synergistic Interaction of FTY720 With Cyclosporine or Sirolimus to Prolong Heart Allograft Survival. *Transplant Proc* 1998; 30: 2214–2216.

152. Morris MA, Gibb DR, Picard F, Brinkmann V, Straume M, Ley KI. Transient T cell accumulation in lymph nodes and sustained lymphopenia in mice treated with FTY720. *Eur J Immunol.* 2005; 35(12): 3570-3580.
153. Rosenberg AS. Cellular basis of skin allograft rejection: An in vivo model of immune-mediated tissue destruction. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 333-358.
154. Mehling M, Brinkmann V, Antel J, Bar-Or A, Goebels N, Vedrine C et al. FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis. *Neurology* 2008; 71: 1261-1217.
155. Budde K, Schmouder RL, Nashan B, Brunkhorst R, Lücker PW, Mayer T et al. Pharmacodynamics of single doses of the novel immunosuppressant FTY720 in stable renal transplant patients. *Am J Transplant* 2003; 3: 846-854.
156. Mollinedo F, Borregaard N, Boxer LA. Novel trends in neutrophil structure, function and development. *Immunol Today* 1997; 20(12): 535-537.
157. Steiniger B, Stehling O, Scriba A, Grau V. Monocytes in the rat: Phenotype and function during acute allograft rejection. *Immunol Rev* 2001; 184: 38–44.
158. Lan YY, Tokita D, Wang Z, Wang HC, Zhan J, Brinkmann V, Thomson AW. Sphingosine 1-phosphate receptor agonism impairs skin dendritic cell migration and homing to secondary lymphoid tissue: Association with prolonged allograft survival. *Transpl Immunol* 2008; 20(1-2) 88:94.
159. Lui SL, Tsang R, Chan KW, Zhang F, Tam S, Yung S et al. Rapamycin attenuates the severity of established nephritis in lupus-prone NZB/W F1mice. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23(9): 2768-2776.
160. Yasuo Y, Kazutoshi O, Nobutomo M, Fujio M, Osamu I, Eiji A. Tumor Necrosis Factor-[beta] is associated with thymic apoptosis during acute rejection. *Transplantation* 1998; 66(7): 894-902.

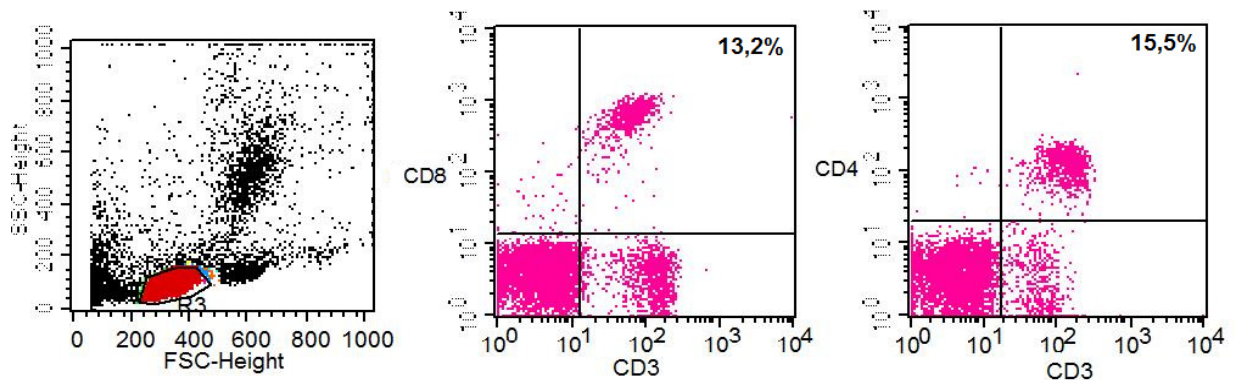
161. Tian L, Lu L, Yuan Z, Lamb JR, Tam PK. Acceleration of apoptosis in CD4+CD8+ thymocytes by rapamycin accompanied by increased CD4+CD25+ T cells in the periphery. *Transplantation* 2004;77(2):183-189.
162. Böhler T, Waiser J, Schuetz M, Neumayer HH, Budde K. FTY720 exerts differential effects on CD4+ and CD8+ T-lymphocyte subpopulations expressing chemokine and adhesion receptors. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 702–713.
163. Ochando JC, Yopp AC, Yang Y, Garin A, Li Y, Boros P et al. Lymph Node Occupancy Is Required for the Peripheral Development of Alloantigen-Specific Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *J Immunol* 2005; 174: 6993–7005.
164. del Rio ML, Pabst O, Ramirez P, Penuelas-Rivas G, Förster R, Rodriguez-Barbosa J-I. The thymus is required for the ability of FTY720 to prolong skin allograft survival across different histocompatibility MHC barriers. *Transplant Int* 2007; 20: 895-903.
165. Sawicka E, Dubois G, Jarai G, Edwards M, Thomas M, Nicholls A. The Sphingosine 1-Phosphate Receptor Agonist FTY720 Differentially Affects the Sequestration of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T-Regulatory Cells and Enhances Their Functional Activity. *J Immunol* 2005; 175: 7973–7980.
166. Strauss L, Whiteside TL, Knights A, Bergmann C, Knuth A, Zippelius A. Selective Survival of Naturally Occurring Human CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells Cultured with Rapamycin. *J Immunol* 2007; 178: 320–329.
167. Malyszko J, Malyszko JS, Bachorzewska-Gajewska H, Poniowski B, Dobrzycki S, Mysliwiec M. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is a New and Sensitive Marker of Kidney Function in Chronic Kidney Disease Patients and Renal Allograft Recipients. *Transplant Proc* 2009; 41: 158-161.

168. Tedesco-Silva H, Pescovitz MD, Cibrik D, Rees MA, Mulgaonkar S, Kahan BD et al. Randomized Controlled Trial of FTY720 Versus MMF in De Novo Renal Transplantation. *Transplantation* 2006; 82(12): 1689-1697.
169. O'Connor P, Comi G, Montalban X, Antel J, Radue EW, Vera A et al. Oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis: Two-year results of a phase II extension study. *Neurology* 2009; 72: 73-79.
170. Saab G, Almony A, Blinder KJ, Schuessler R, Brennan DC. Reversible Cystoid Macular Edema Secondary to Fingolimod in a Renal Transplant Recipient. *Arch Ophthalmol* 2008; 126(1): 140-141.

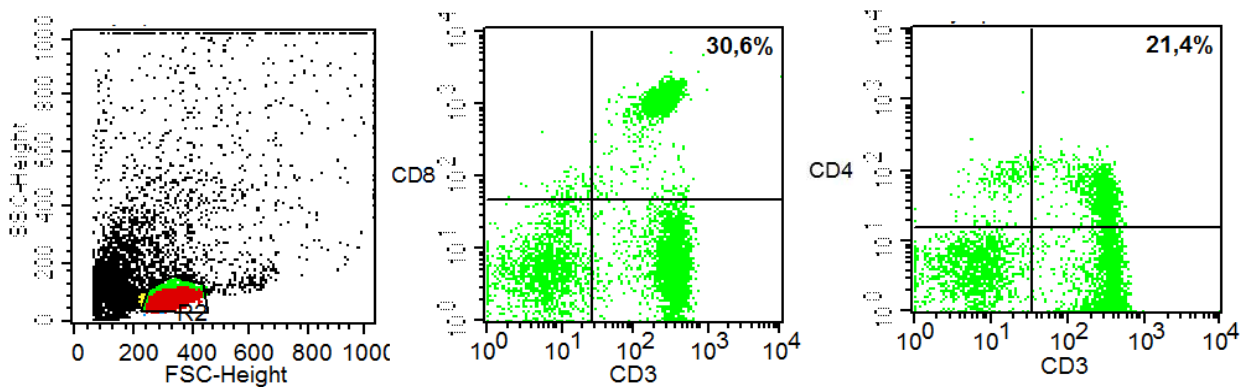
## 8. APÊNDICE

**Anexo 1.** Dot plots representativos da avaliação de populações no sangue periférico (A), baço(B), linfonodos (C) e timo (D) no gate de linfócitos 5 dias após o transplante de pele.

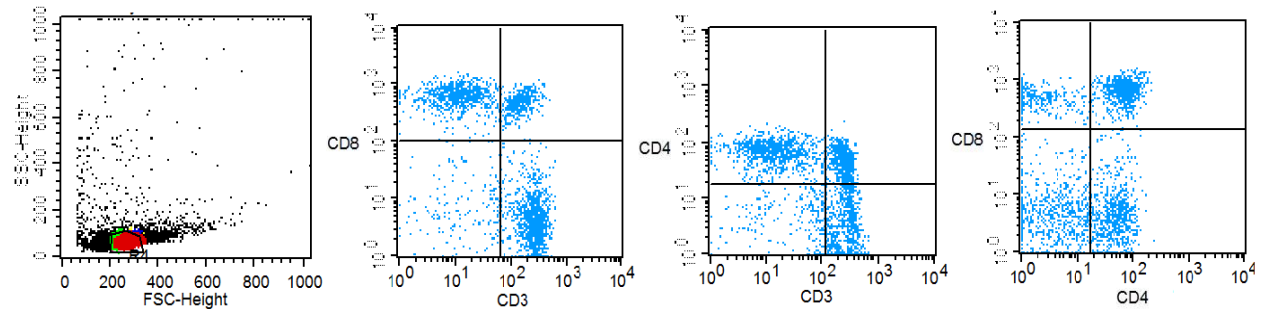
**(A)**



**(B)**



**(C)**



**Anexo 2.** Sobrevida do aloenxerto de pele durante em cada animal durante 17 dias de acompanhamento.

Grupo - Animal	Data de rejeição
Tx 1	9
Tx 2	9
Tx 3	9
Tx 4	9
Tx5	8
Tx 6	8
Tx 7	13
SRL 1	14
SRL 2	0
SRL 3	14
SRL 4	15
SRL 5	16
FTY 1	0
FTY 2	12
FTY 3	14
FTY 4	16
FTY 5	17
FTY+SRL 1	0
FTY+SRL 2	0
FTY+SRL 3	0
FTY+SRL 4	0
FTY+SRL 5	17

\* Valor zero indica que o enxerto não havia sido rejeitado até o final do período de acompanhamento

**Anexo 3.** Porcentagem de células no enxerto em cada animal 5 dias após o transplante de pele.

Grupos - Animais	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD11b+
Tx 1	6,5	7,6	4,9
Tx 2	11,3	11,1	10,8
Tx 3	3,8	4,5	3,3
Tx 4	4,6	4,1	8,8
Tx5	6,1	5,6	8,4
Tx 6	10,9	9,9	14,0
Tx 7	8,7	7,9	18,4
SRL 1	7,1	7,6	18,5
SRL 2	5,1	5,1	9,3
SRL 3	2,5	2,5	7,9
SRL 4	3,2	5,2	6,3
SRL 5	4,0	4,1	6,5
SRL 6	2,2	2,6	2,8
FTY 1	10,5	9,6	19,8
FTY 2	5,0	4,4	9,2
FTY 3	5,2	4,8	11,3
FTY 4	6,1	5,3	14,1
FTY 5	4,6	5,2	44,9
FTY+SRL 1	1,2	1,2	6,1
FTY+SRL 2	2,1	1,1	3,7
FTY+SRL 3	1,9	1,0	3,4
FTY+SRL 4	1,3	0,7	5,4
FTY+SRL 5	1,00	1,8	12,2



**Anexo 4.** Porcentagem de leucócitos no sangue periférico em cada animal 5 dias após o transplante de pele. Linfócitos (Lφs), Neutrófilos (Nφs) e Monócitos (Mφs).

Grupos - Animais	Lφs	Nφs	Mφs	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD11b+	CD11b+ gate de gate de Lφs	granulócitos/ monócitos
Controle 1	79	18	3	27,6	16,9	4,5	47,7	
Controle 2	78	21	1	21,2	14,5	3,0	45,8	
Controle 3	81	16	3	21,6	14,8	3,5	42,5	
Controle 4	84	13	3	19,1	12,9	2,7	37,7	
Controle 5	82	13	5	18,6	13,3	4,7	32,6	
Tx 1	77	19	4	15,5	13,1	5,7	42,7	
Tx 2	76	20	4	31,0	18,9	2,6	62,5	
Tx 3	68	28	4	22,4	15,8	6,0	31,3	
Tx 4	63	32	5	11,6	7,1	3,6	83,6	
Tx5	49	47	4	24,4	17,1	7,1	50,8	
Tx 6	49	45	6	21,5	16,8	8,5	33,8	
Tx 7	51	44	5	27,5	14,2	6,2	35,1	
SRL 1	55	36	9	25,5	19,2	6,0	47,2	
SRL 2	51	40	9	24,5	19,6	20,4	83,1	
SRL 3	60	35	5	26,0	17,6	8,5	15,7	
SRL 4	42	53	5	15,4	9,9	10,9	81,3	
SRL 5	40	48	12	24,6	18,1	6,1	53,3	
SRL 6	49	42	9	28,5	16,9	5,6	59,7	
FTY 1	15	75	10	2,5	1,8	54,7	93,5	
FTY 2	15	75	10	1,5	1,7	51,7	94,6	
FTY 3	19	73	8	1,8	2,1	50,7	92,2	
FTY 4	15	77	8	3,4	1,8	50,4	77,0	
FTY 5	21	72	7	1,2	1,9	49,5	94,1	
FTY+SRL 1	19	70	11	1,3	4,2	44,1	93,3	
FTY+SRL 2	16	76	8	1,0	7,1	39,9	92,0	
FTY+SRL 3	14	78	8	1,3	8,9	53,6	93,4	
FTY+SRL 4	18	75	7	0,9	5,8	42,8	93,9	
FTY+SRL 5	23	69	8	1,7	5,5	56,2	96,4	

**Anexo 5.** Número de linfócitos ( $\times 10^6$ ) no baço em cada animal 5 dias após o transplante de pele.

Grupos - Animais	Células Totais	CD3+CD4+CD3+CD8+	CD11b+ gate de linfócitos	CD11b+ gate de granulócitos/ monócitos
Controle 1	34,4	10,7	7,0	1,3
Controle 2	31,4	9,9	6,1	1,7
Controle 3	37,0	12,6	8,2	1,8
Controle 4	40,5	11,3	7,5	1,7
Controle 5	38,2	12,7	8,6	2,1
Tx 1	70,6	15,2	13,1	5,0
Tx 2	52,0	15,3	9,8	1,8
Tx 3	80,8	23,4	14,8	6,3
Tx 4	60,5	15,9	11,6	3,5
Tx5	56,5	14,5	11,1	2,7
Tx 6	62,0	17,0	13,0	3,4
Tx 7	75,0	20,4	16,4	4,2
SRL 1	34,0	9,0	6,7	1,2
SRL 2	32,0	7,6	5,6	1,3
SRL 3	41,0	9,0	5,9	1,5
SRL 4	34,8	9,4	5,8	2,9
SRL 5	31,2	7,1	5,7	1,8
SRL 6	45,0	12,2	8,7	3,2
FTY 1	30,0	5,3	4,4	3,5
FTY 2	23,5	3,3	2,7	3,4
FTY 3	27,6	5,5	4,8	3,0
FTY 4	38,5	6,8	6,8	3,7
FTY 5	30,0	8,5	7,4	2,6
FTY+SRL 1	26,4	4,3	5,5	3,8
FTY+SRL 2	22,8	5,2	5,3	4,2
FTY+SRL 3	19,7	3,8	4,7	1,5
FTY+SRL 4	27,5	4,3	5,9	2,5
FTY+SRL 5	29,4	6,2	5,5	6,0

**Anexo 6.** Número de linfócitos ( $\times 10^6$ ) nos linfonodos drenantes em cada animal 5 dias após o transplante de pele.

Grupos - Animais	Células Totais	CD3+CD4+	CD3+CD8+
Controle 1	2,0	1,1	0,5
Controle 2	1,9	0,9	0,6
Controle 3	1,6	0,8	0,4
Controle 4	1,8	1,0	0,5
Controle 5	1,7	0,8	0,6
Tx 1	1,9	0,5	0,6
Tx 2	1,5	0,6	0,5
Tx 3	2,4	0,8	0,7
Tx 4	2,3	0,7	1,0
Tx5	1,2	0,6	0,4
Tx 6	2,3	0,9	0,9
Tx 7	1,2	0,5	0,3
SRL 1	1,0	0,5	0,4
SRL 2	1,0	0,6	0,4
SRL 3	1,1	0,7	0,3
SRL 4	1,4	0,6	0,4
SRL 5	1,4	0,5	0,4
SRL 6	1,6	0,6	0,5
FTY 1	1,5	0,4	0,5
FTY 2	1,1	0,3	0,5
FTY 3	1,1	0,3	0,4
FTY 4	1,6	0,4	0,6
FTY 5	1,4	0,2	0,4
FTY+SRL 1	0,7	0,1	0,2
FTY+SRL 2	1,2	0,2	0,4
FTY+SRL 3	1,1	0,1	0,4
FTY+SRL 4	0,5	0,1	0,1
FTY+SRL 5	1,1	0,3	0,4

**Anexo 7.** Número de células ( $\times 10^6$ ) no timo em cada animal 5 dias após o transplante de pele.

Grupos - Animais	Células Totais	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD4+CD8+
Controle 1	67,2	6,1	5,2	60,2
Controle 2	77,4	7,2	4,7	70,3
Controle 3	69,0	7,7	4,2	60,3
Controle 4	64,0	6,9	5,0	57,6
Controle 5	69,6	5,9	3,9	63,4
Tx 1	42,6	1,8	2,4	36,3
Tx 2	50,4	5,2	3,3	43,4
Tx 3	62,4	3,2	1,7	56,4
Tx 4	41,0	3,5	1,6	37,8
Tx5	43,2	3,0	1,0	39,9
Tx 6	43,2	3,7	2,0	37,8
Tx 7	48,0	4,9	2,2	43,2
SRL 1	26,1	2,0	1,1	23,2
SRL 2	19,2	2,0	1,4	16,2
SRL 3	26,4	2,2	1,2	23,6
SRL 4	24,0	2,1	0,8	21,1
SRL 5	58,4	3,3	1,7	52,6
SRL 6	77,0	6,6	3,9	66,7
FTY 1	41,4	5,8	1,2	35,7
FTY 2	36,9	4,5	1,0	31,4
FTY 3	40,0	9,3	2,6	33,4
FTY 4	42,0	6,5	2,4	33,8
FTY 5	32,8	7,7	2,6	17,7
FTY+SRL 1	26,1	3,6	2,1	19,0
FTY+SRL 2	19,8	2,2	1,9	13,8
FTY+SRL 3	27,9	2,00	3,2	19,6
FTY+SRL 4	24,3	3,4	2,2	17,5
FTY+SRL 5	25,0	10,7	3,4	11,1

**Anexo 8.** Parâmetros urinários e sanguíneos em cada animal após 21 dias de acompanhamento.

Grupos - Animais	Volume urinário (mL)	Proteinúria (mg/mL)	Creatinina Urinária (mg/dL)	Creatinina Sérica (mg/dL)	Uréia Urinária (mg/dL)	Clearance de Creatinina (mL/min/100g)
Controle 1	1,3	1,8	38,7	0,2	57,1	0,8
Controle 2	1,0	1,7	49,5	0,4	63,0	0,4
Controle 3	0,9	1,3	44,8	0,5	54,2	0,3
Controle 4	1,7	1,8	48,6	0,5	47,1	0,5
Controle 5	1,0	1,8	47,3	0,5	63,2	0,3
SRL 1	2,1	2,0	44,6	0,2	42,5	0,6
SRL 2	2,4	1,6	37,8	0,6	42,5	0,8
SRL 3	1,0	1,7	68,7	0,2	41,6	0,8
SRL 4	1,6	1,7	50,2	0,3	53,5	0,4
SRL 5	1,1	0	51,1	0,2	61,3	0,8
SRL 6	0,9	#	60,3	0,6	60,6	0,6
FTY 1	1,6	1,2	60,5	0,5	58,7	0,6
FTY 2	1,3	1,3	44,1	0,3	63,1	0,6
FTY 3	1,0	1,5	44,1	0,2	59,9	0,6
FTY 4	1,2	1,7	49,7	0,4	72,6	0,4
FTY 5	1,2	1,6	57,7	0,4	65,0	0,5
FTY+SRL 1	1,6	1,6	55,2	1,3	66,1	0,2
FTY+SRL 2	1,8	1,7	60,8	0,9	60,9	0,3
FTY+SRL 3	1,5	1,4	44,8	0,8	62,4	0,3
FTY+SRL 4	1,4	1,2	41,7	0,9	54,6	0,2
FTY+SRL 5	1,4	1,5	48,9	0,6	55,7	0,3

\* Valor zero indica que o parâmetro não foi avaliado e # indica falha técnica

## 9. ABSTRACT

The association of new compounds with lower doses of current immunosuppressive drugs used in transplantation might increase their potential in preventing rejection episodes and lead to decreased side effects. Sirolimus (SRL) increases allograft survival by blocking activated T cell proliferation, but it causes side effects like hypertension, peripheral edema and proteinuria. FTY720 (FTY), a new immunomodulator, increases experimental allograft survival by impairing lymphocyte migration towards the inflammatory site (graft) without undermining their activation. Our study had for aim to evaluate semi-allogeneic murine skin allograft survival (F1 donor and C57BL/6 recipient) under prolonged administration (21 days) of FTY+SRL, the immunological events associated with allograft survival and the effects of these drugs on renal parameters.

Allograft survival was significantly increased by monotherapies ( $p < 0.0005$ ) or combined administration ( $p < 0.0005$ ). FTY+SRL Group presented only one episode of rejection. The increased survival was related to lower percentage of lymphocytes in the peripheral blood ( $p < 0.005$ ) due to decreased percentages of CD3+CD4+ ( $p < 0.005$ ) and CD3+CD8+ ( $p < 0.005$ ) lymphocytes. On the other hand, the percentage of CD11b+ was significantly increased ( $p < 0.005$ ). In the lymph nodes, FTY+SRL-treated animals presented significantly lower number of CD3+CD4+ ( $p < 0.005$ ) and CD3+CD8+ ( $p < 0.005$ ) lymphocytes. In the spleen, there was decreased number of total splenocytes ( $p < 0.005$ ) due to lower numbers of CD3+CD4+ ( $p < 0.005$ ) and CD3+CD8+ ( $p < 0.005$ ) lymphocytes and CD11b+ cells ( $P < 0.005$ ). In the thymus, FTY+SRL presented significantly decreased number of total thymocytes ( $p < 0.005$ ) due to diminished number of CD4+CD8+ cells ( $p < 0.005$ ).

In the graft, FTY+SRL significantly lower CD3+CD4+ cell percentages ( $p<0.05$ ) and presented a trend towards a decrease of CD11b+ cell percentages ( $p=0.056$ ). Serum creatinine concentration was increased in FTY+SRL-treated animals ( $p<0.05$ ), but there were no alterations of 24-hour urinary volume, urinary creatinine or protein concentrations or structure alterations.

In summary, FTY+SRL combination was effective in increasing semi-allogeneic murine skin allograft survival. The suggested immunological events associated with this finding were the decrease of CD3+CD4+ and CD3+CD8+ cell numbers in the peripheral blood; retention of recipient antigen presenting cell (CD11b+) in the peripheral blood, preventing their migration to lymph nodes and spleen, decreasing the allostimulatory activity of the recipient's naive T cells; impairment of donor DC migration to the secondary lymphoid organs and decrease of antigen presentation; prevention of mature thymocyte egress to the periphery and CD4+CD8+ immature thymocyte apoptosis; possible selection of cells with regulatory phenotype infiltrating the graft. The drug combination was not associated with impairment of kidney functions or structure.