

UTILIZAÇÃO DE EMULSÕES PARA ADMINISTRAÇÃO DE IMUNOSSUPRESSORES EM ENXERTOS ALOGÊNICOS DE TESTÍCULO EM TRUTA ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

Tulio Teruo YOSHINAGA^{1,5}, Ricardo Shohei HATTORI², Yara Aiko TABATA², Arno Juliano BUTZGE³, Ricardo Yasuichi TSUKAMOTO⁴, José Roberto KFOURY JÚNIOR¹

¹ Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

² Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão/IP/APTA

³ Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Botucatu/SP

⁴ Puriagua LTDA, São Paulo

Endereço/Adress: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP Avenida Professor Dr. Orlando Marques Paiva, nº 87, Cidade Universitária – São Paulo/SP CEP 05508-270. e-mail: teruo92@gmail.com

*Órgão Financiador: FAPESP 2013/17612-9 e CNPq 404583/2016-4

Palavras Chave: Imunossupressão, leucócitos, tacrolimus, ciclosporina

INTRODUÇÃO

O enxerto de testículo constitui um modelo experimental para estudos com rejeição imunológica e imunoprivilegio, com potencial utilização como tecnologia reprodutiva (HAYASHI *et al.*, 2018). No entanto, a rejeição é um problema em qualquer transplante e limita a sua aplicação. Os imunossupressores são utilizados para evitar a rejeição em transplantes em humanos, sendo o tacrolimus e ciclosporina os mais utilizados (HALLORAN, 2004). Ambos inibem a expressão da interleucina 2 (IL-2), citocina essencial para ativação das células T (MACIAN, 2005), que por sua vez atuam no processo de rejeição. No entanto seus efeitos sobre o sistema imune são escassos e limitados, como no caso do linguado *Paralichthys olivaceus* (XING *et al.*, 2017). Dentro desse contexto, o objetivo deste estudo foi determinar a ação imunossupressora do tacrolimus e ciclosporina, administrados por emulsões, por meio da expressão da *il2* e avaliar sua utilização em enxertos alogênicos subcutâneos de testículo na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido na Estação Experimental de Salmonicultura/Instituto de Pesca, Campos do Jordão, de acordo com o comitê de ética animal certificado CEUA-FMVZ-USP nº 1589150216. As doses de imunossupressores foram baseadas na posologia para humanos e ajustadas para aplicação via emulsão para evitar a manipulação diária dos

animais. Assim, duas doses de tacrolimus (0,5 e 1,5 mg/kg) e duas de ciclosporina (20 e 40 mg/kg) foram preparadas. Os imunossupressores foram dissolvidos em solução salina (0,7%) e misturados com óleo contendo 1% do emulsificante Arlacel™ 165 na proporção de 1:1 (água-óleo). As quatro doses foram administradas em 4 grupos de 20 animais através de injeção intracelomática. O grupo controle (n= 20) recebeu as emulsões sem imunossupressor. Amostras do rim cranial de 5 animais foram coletadas 3, 7, 14 e 21 dias após as injeções a fim de quantificar os efeitos sobre a expressão de *il2* por qRT-PCR.

Na segunda etapa, o tacrolimus foi testado como imunossupressor na rejeição de enxertos de testículo. 15 trutas de seis meses de idade com testículos imaturos foram utilizadas como doadores. O testículo esquerdo foi cirurgicamente removido e fragmentado em quatro partes, sendo que um destes enxertado num espaço subcutâneo na região dorsal do próprio doador e os restantes em outros três receptores. Os receptores (n=45) receberam injeções semanais contendo tacrolimus (duas doses) em emulsão; o grupo controle recebeu apenas a emulsão. Cinco animais de cada grupo foram coletados 1, 3 e 5 semanas após os enxertos para análises histológica e de RT-PCR com o gene marcador de células germinativas *grfa*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa do experimento, foi verificado a supressão da expressão da *il2* três dias após a aplicação das emulsões em todos os grupos tratados. Aos sete dias, houve uma redução da expressão da *il2* no grupo controle em relação aos tratamentos e dessa forma apenas a ciclosporina em sua dose mais alta a redução foi significativa. Aos 14 e 21 dias após a aplicação de imunossupressores não houve alteração na expressão da *il2*. Emulsões são consideradas agentes adjuvantes que estimulam o sistema imunológico muito utilizadas em vacinas (O'HAGAN *et al.*, 2013). Isso justifica a alta expressão da *il2* em três dias no grupo controle em relação aos tratamentos. Dessa forma, é possível que efeitos do tacrolimus durem até sete dias. Outro fato importante foi a mortalidade de animais tratados, um do grupo de 20 mg kg⁻¹, dois do grupo de 40 mg kg⁻¹ de ciclosporina e um no grupo de 1,5 mg kg⁻¹ de tacrolimus, podendo ser resultado de efeitos colaterais dos medicamentos. O tacrolimus possui menos efeitos colaterais que a ciclosporina (HALLORAN, 2004) e considerando os resultados uma administração a cada sete dias foi utilizada em enxertos de testículo.

No experimento com enxertos, análises histológicas revelaram a presença de cistos de espermatogônias na primeira e terceira semana tanto no grupo doador como no grupo tratado com 0,5 mg kg⁻¹ de tacrolimus; tais cistos não foram observados nos grupos restantes. Análises de RT-PCR demonstraram a expressão de *grfa* no grupo doador e no grupo tratado com tacrolimus durante os períodos analisados. No grupo sem imunossupressor, este marcador não foi amplificado em 60% das amostras 5 semanas após o enxerto, sugerindo a ausência de células germinativas. A análise conjunta destes resultados implica que o tacrolimus apresenta maior eficiência na dosagem baixa, atuando de modo a evitar ou retardar a rejeição das células germinativas na truta arco-íris.

CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que o tacrolimus e a ciclosporina possuem efeito inibitório sob a transcrição de *il2*. Além disso, o tacrolimus, principalmente na dose baixa, foi capaz de evitar/retardar a rejeição em enxertos de testículo, podendo ser utilizado em estudos envolvendo transplantes em peixes. A otimização dos tratamentos combinando imunossupressores que inibem outras vias do sistema imunológico consiste numa alternativa para evitar a rejeição e consequentemente a manutenção alógena das células germinativas.

REFERÊNCIAS

- HALLORAN, P. F. 2004 Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 351(26): 2715–2729.
- HAYASHI, M.; SAKUMA, D.; YOSHIZAKI, G. 2018 Production of functional sperm by subcutaneous auto-grafting of immature testes in rainbow trout. *Molecular reproduction and development*, 85(2): 155–162.
- MACIAN, F. 2005 NFAT proteins: Key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews Immunology*, 5(6): 472–484.
- O'HAGAN, D. T.; TSAI, T. F.; BRITO, L. A. 2013 Emulsion based vaccine adjuvants. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(8): 1698–1700.
- XING, J.; XIAO, Y.; TANG, X.; SHENG, X.; ZHAN, W. 2017 Inhibition of Cyclosporine A or rapamycin on T lymphocyte counts and the influence on the immune responses of B lymphocytes in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 66: 78–85.