

COO. ACERVO: 64876  
R 13827958/04

R#24,20

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA e FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**“EFEITO DOS IMUNOSSUPRESSORES CICLOSPORINA  
MICROEMULSÃO, MICOFENOLATO MOFETIL E  
RAPAMICINA NO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE  
WALKER”**

**SÔNIA LEITE DA SILVA**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2003**

616.994  
5383 e  
2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

S583e Silva, Sônia Leite da

Efeito dos imunossuppressores ciclosporina microemulsão, micofenolato mofetil e rapamicina no desenvolvimento do tumor de Walker. / Sônia Leite da Silva. – Fortaleza, 2003.

242f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes.

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará.  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Neoplasia – pós-transplante. 2. Rapamicina. 3. Micofenolato mofetil. 4. Ciclosporina. 5. Tumor de Walker. I. Título. II. Campos, Henry de Holanda (co-orient.)

**CDD 616.994**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA e FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**“EFEITO DOS IMUNOSSUPRESSORES CICLOSPORINA  
MICROEMULSÃO, MICOFENOLATO MOFETIL E RAPAMICINA NO  
DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE WALKER”**

**SÔNIA LEITE DA SILVA**

**Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-  
Graduação em Farmacologia da Universidade  
Federal do Ceará - UFC, para obtenção do título  
de Doutor em Farmacologia**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA ELISABETE A. DE MORAES**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. HENRY DE HOLANDA CAMPOS**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2003**


Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau em Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.


A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.


**Sônia Leite da Silva**


Tese aprovada com louvor em: 17/02/2003

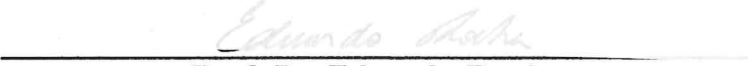
### **BANCA EXAMINADORA**

  
**Profa. Dra. Maria Elisabete A. de Moraes – Orientadora**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

  
**Prof. Dr. Henry de Holanda Campos – Co-orientador**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

  
**Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

  
**Prof. Dr. Vinicius Daher Alvarez Delfino**  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA - PR

  
**Prof. Dr. Eduardo Rocha**  
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

**“Só quando podemos desenvolver livremente as possibilidades que nos são inerentes é que podemos viver como pessoas livres”**

**Baruch Spinoza**

Filósofo holandês

1632-1677

(extraído do livro O mundo de Sofia, de Jostein Gaarder)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará com o apoio do Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais e do Instituto Claude Bernard.

As drogas utilizadas no estudo foram doadas pelo Núcleo de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará e a Rapamicina pelo Laboratório Wyeth do Brasil.

## **AGRADECIMENTOS**

A realização de uma tese é uma jornada que começa com duas ou três pessoas: um orientando e seus orientadores. Mas ao longo de sua trajetória, este caminho se torna tão árduo e difícil, que para realizá-lo nos damos conta que é necessária uma legião de pessoas numa frente de batalha aparentemente interminável. Mas para fazer parte desta legião é necessário que estas pessoas tenham alguns requisitos básicos, senão acabarão abandonando a jornada antes que esta chegue ao seu final. Ao longo de sua jornada, fatalmente você se defrontará com dificuldades, como por exemplo, o cansaço, a falta de dinheiro, os experimentos mal sucedidos, as dificuldades na aquisição de determinadas técnicas e uma biblioteca inadequada para as suas necessidades. Mas, de repente, se você notar que tem oito mãos em vez de duas, que conseguiu seus ratos quando parecia impossível, que não terá que vir só nos finais de semana para fazer o experimento, que alguém trocou as raspas da gaiola dos seus animais, que alguém se deu a trabalho de passar tardes no portal buscando seus artigos, então você se dará conta que sua tese tem uma co-autoria tão imensa que seria necessário uma página especial somente para eles. E quando menos você perceber, estará chegando ao fim, graças ao apoio desta legião de pessoas dia após dia durante quatro anos, e você terá virado mais uma página no livro da sua vida.

### **A minha mãe**

Pelo amor, apoio e confiança sempre depositada. É para seus filhos um símbolo de coragem, honestidade, lealdade e perseverança.

### **A minha família e aos amigos**

Pelo amor, carinho, apoio incondicional e pelos maiores ensinamentos e as melhores lembranças de toda a minha vida

## AGRADECIMENTOS

A **Profa. Dra. Maria Elisabete A. de Moraes**, pela confiança depositada em aceitar-me sob sua orientação, pelas valiosas sugestões durante o curso de doutorado e na elaboração da tese. O convívio mais próximo deu-me a oportunidade de melhor conhecê-la e admirá-la pela sua capacidade e integridade profissional.

Ao **Prof. Dr. Henry de Holanda Campos**, pelo seu apoio, incentivo, amizade, espírito crítico e as inestimáveis sugestões na elaboração desta tese. É um enorme orgulho tê-lo novamente como orientador, agora na tese de doutorado. Porém, mais do que um orientador, um símbolo de competência, responsabilidade e compromisso com os ideais desta Universidade.

Ao **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho**, pela paciência e bom humor com que me recebeu todas vezes que foram necessárias; os seus ensinamentos e preciosas sugestões foram indispensáveis na realização do projeto e elaboração da tese.

A **Dra Sílvia Fernandes Ribeiro da Silva**, pela sua amizade, ensinamentos, conselhos e apoio incondicional e constante durante todo o doutorado e período de realização da tese.

Ao **Dr. Reinaldo Amorim Carvalho**, do Instituto Evandro Chagas de Belém do Pará, e à **Dra. Maria Artemiza Portela de Almeida Cardoso**, do Biotério do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelo auxílio inestimável que prestaram na elaboração deste projeto, sempre com a maior gentileza. Sem o apoio de vocês teria sido impossível a realização deste projeto.

Ao **Prof. Dr. Francisco Valdecir de Almeida Ferreira**, pela valiosa colaboração na avaliação histológica dos tecidos tumorais.

Ao Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais na pessoa do **Prof. Dr. Roberto Barreto Marques**, pelo apoio pessoal e material dispensado durante todo o processo de elaboração do projeto.

Ao **Prof. Dr. João Batista Evangelista Jr.**, chefe do Serviço de Nefrologia e Transplante Renal, pelo apoio durante a realização deste projeto, sendo impossível conciliar todas as atividades sem a sua compreensão e valiosa colaboração.

A **Profa. Rosa Maria Salani**, pelo inestimável auxílio prestado na realização das análises estatísticas, muitas vezes realizadas nos seus fins-de-semana.

A todos os **professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**, pelos valiosos ensinamentos recebidos nestes dois anos.

À **Silvana França dos Santos**, técnica do Laboratório de Oncologia Experimental, pelo auxílio na elaboração do projeto desta tese.

Agradecimento especial às secretárias **Flávia Maria Martins Aguiar**, **Sílvia Maria Azevedo de Lima**, **Aura Rhanes Farias Nogueira Yida**, pela gentileza,

amabilidade e disposição com que sempre me receberam todas as vezes que se fizeram necessário.

Ao **Sr. Bento Francisco Oliveira**, pelo auxílio nos cuidados dos animais durante a realização dos experimentos

Aos estudantes **Ítalo Nascimento Farias, Rafael Oliveira Cavalcante, Thiago Magalhães Farias Menezes, Thyciana Rodrigues Ribeiro, Denniberg da Costa da Silva**, pela participação no desenvolvimento deste projeto.

A todos os funcionários da **Biblioteca de Ciências da Saúde** pela gentileza, amabilidade com que sempre me receberam e pelo valioso auxílio na obtenção e elaboração das referências bibliográficas.

À **Jaqueline Maria de Amorim Fernandes, José Wilson Pascoal, Maria do Carmo Serpa Cavalcante, Márcia Maria Silva Santos Faria, Daisy M. Meireles Arruda, Christiane de Oliveira Costa, Ticiane Santa da Silva**, pelo carinho, apoio e incentivo ao longo destes anos de convivência.

## **AOS ANIMAIS**

Agradecimento especial aos animais, que são submetidos ao sacrifício em prol do avanço no conhecimento científico que beneficia exclusivamente a espécie humana.

**“Nós não viemos a este mundo: viemos dele, como as folhas de uma árvore. Tal como o oceano produz ondas, o universo produz pessoas. Cada indivíduo é uma expressão de todo o reino da natureza, uma ação singular do universo total. Raramente este fato é, se é que alguma vez chega a ser, sentido pela maioria dos indivíduos.”**

**Allan Watts**

O livro do Tabu

(extraído do livro O Homem Holístico de André Di Biase)

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS .....	xvii
LISTA DE FIGURAS .....	xxiii
ABREVIATURA .....	xxix
RESUMO .....	xxxiv
ABSTRACT .....	xxxv
PREFÁCIO .....	xxxvi
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1. Mecanismos de Resposta Imune.....</b>	<b>02</b>
<b>1.1.1. Fase de reconhecimento antigênico e ativação dos linfócitos</b>	<b>02</b>
<b>1.2. Tipos de Rejeição aos Enxertos .....</b>	<b>09</b>
1.2.1. Rejeição Hiperaguda	09
1.2.2. Rejeição Aguda	10
1.2.3. Rejeição Crônica	12
<b>1.3. Drogas Imunossupressoras.....</b>	<b>18</b>
<b>1. 3.1. Ciclosporina</b>	<b>18</b>
a) Química	18
b) Farmacocinética	20
c) Mecanismo de Ação	22
d) Toxicidade	28
<b>1.3.2. Micofenolato Mofetil</b>	<b>32</b>
a) Química	32
b) Farmacocinética	34
c) Mecanismo de Ação	34
d) Toxicidade	40
<b>1.3.3. Rapamicina</b>	<b>41</b>
a) Química	41
b) Farmacocinética	43
c) Mecanismo de ação	46
e) Toxicidade	50

1.4. Câncer após Transplante de Órgãos e Tecidos .....	51
1.5. Carcinossarcoma 256 de Walker .....	62
2. OBJETIVOS .....	63
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
I.    Materiais	
1. Equipamentos, Reagentes e Vidraria	66
2. Animais	67
3. Drogas	67
3.1. Rapamicina	67
3.2. Micofenolato mofetil	68
3.3. Ciclosporina A	68
3.4. Cloridrato de cetamina	68
3.5. Cloridrato de xilazina	69
II.   Métodos	69
1. Protocolo de Estudo	69
PRIMEIRA ETAPA: Avaliação do efeito das drogas imunossupressoras sobre o crescimento e formação de metástases ou a regressão de tumor, em animais inoculados com células do carcinossarcoma 256 de Walker	70
1. Metodologia utilizada na implantação do Carcinossarcoma 256 de Walker em ratos Wistar	71
2. Protocolos	74
2.1. Avaliação do efeito de drogas imunossupressoras, usadas isoladamente, sobre o crescimento tumoral e formação de metástases, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker.	75
2.2. Avaliação do efeito da associação de Rapamicina com Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato mofetil sobre o crescimento tumoral e formação de metástases, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker.	78

2.3. Avaliação do efeito da associação do Micofenolato mofetil com a Ciclosporina microemulsão sobre o crescimento tumoral e formação de metástases, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker.	<b>80</b>
2.4. Avaliação do efeito da Rapamicina e do Micofenolato mofetil sobre a regressão do carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea de ratos Wistar.	<b>81</b>
SEGUNDA ETAPA: Modificação na técnica de implantação do carcinossarcoma de Walker, utilizando o gradiente de Ficoll-Hypaque para isolamento das células tumorais	<b>82</b>
1. Preparação do inóculo celular	<b>83</b>
2. Protocolos	<b>86</b>
2.1. Comparação da curva de crescimento tumoral do carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando ou não o gradiente de Ficoll-Hypaque para isolamento das células tumorais antes da implantação em animais..	<b>86</b>
2.2. Avaliação do efeito da Rapamicina na regressão do carcinossarcoma 256 de Walker, em modelo animal empregando células tumorais isoladas com gradiente de Ficoll-Hypaque.	<b>88</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>91</b>
PRIMEIRA ETAPA: Avaliação do efeito das drogas imunossupressoras sobre o crescimento e formação de metástases ou a regressão de tumor, em animais inoculados com células do carcinossarcoma 256 de Walker	<b>92</b>
4.1.1. Avaliação do efeito de drogas imunossupressoras, usadas isoladamente, sobre o crescimento tumoral e	

formação de metástases, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker.	<b>93</b>
4.1.2. Avaliação do efeito da associação de Rapamicina com outras imunossupressoras sobre o crescimento tumoral e formação de metástases, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker.	<b>109</b>
4.1.3. Avaliação do efeito da associação do Micofenolato mofetil com a Ciclosporina microemulsão sobre o crescimento tumoral e formação de metástases, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker.	<b>128</b>
4.1.4. Avaliação do efeito da Rapamicina e do Micofenolato Mofetil sobre a regressão do carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea de ratos Wistar.	<b>139</b>
SEGUNDA ETAPA: Modificação na técnica de implantação do carcinossarcoma de Walker, utilizando o gradiente de Ficoll-Hypaque para isolamento das células tumorais	<b>150</b>
4.2.1. Comparação da curva de crescimento tumoral do carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando ou não o gradiente de Ficoll-Hypaque para isolamento das células tumorais antes da implantação em animais..	<b>151</b>
4.2.2. Avaliação do efeito da Rapamicina na regressão do carcinossarcoma 256 de Walker, em modelo animal empregando células tumorais isoladas com gradiente de Ficoll-Hypaque.	<b>161</b>
5. DISCUSSÃO .....	<b>191</b>
6. CONCLUSÕES .....	<b>192</b>
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	<b>194</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral por via oral, iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral. 95
- Tabela 2.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Rapamicina, na dose de 1,5 mg/kg/dia por via oral, iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral. 96
- Tabela 3.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Ciclosporina microemulsão, na dose de 10 mg/kg/dia por via oral, iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral. 97
- Tabela 4.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Micofenolato Mofetil, na dose de 10 mg/kg/dia por via oral, iniciado 24 horas antes da inoculação tumoral. 98
- Tabela 5.** Peso tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral, Rapamicina, Ciclosporina Microemulsão ou Micofenolato Mofetil administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. 100
- Tabela 6.** Análise histológica do tumor de Walker no 10º dia após o implante em ratos Wistar tratados com água mineral, Ciclosporina microemulsão, Micofenolato mofetil ou Rapamicina, todos iniciados 24 horas antes do implante e administrados durante 10 dias. 106
- Tabela 7.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral, Rapamicina, Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato Mofetil administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. 107

- Tabela 8.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral por via oral, iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral. 111
- Tabela 9.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Rapamicina, na dose de 1,5 mg/kg/dia, administrada por via oral e iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral. 112
- Tabela 10.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com a associação Ciclosporina microemulsão, na dose de 10 mg/kg/dia, e Rapamicina, 1,5mg/kg/dia, administradas por via oral e iniciadas 24 horas antes da inoculação tumoral. 113
- Tabela 11.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com a associação Micofenolato Mofetil, na dose de 10 mg/kg/dia, e Rapamicina, 1,5 mg/kg/dia, administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. 114
- Tabela 12.** Peso tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral, Rapamicina, ou associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato Mofetil, todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. 116
- Tabela 13.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral, Rapamicina ou associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato Mofetil, todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. 117
- Tabela 14.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral por via oral, iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral. 120

- Tabela 15.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Rapamicina, na dose de 1,5 mg/kg/dia por via oral, iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral. 121
- Tabela 16.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Ciclosporina microemulsão, na dose de 10 mg/kg/dia, e Rapamicina, 1,5mg/kg/dia, ambas administradas por via oral e iniciadas 24 horas antes da inoculação tumoral. 122
- Tabela 17.** Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Micofenolato Mofetil, na dose de 10 mg/kg/dia, e Rapamicina, 1,5 mg/kg/dia, ambos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. 123
- Tabela 18.** Peso tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: mineral, Rapamicina ou associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato Mofetil, administrados por via oral, todos iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. 125
- Tabela 19.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral, Rapamicina ou associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato Mofetil, todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. 126
- Tabela 20.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral por via oral, iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral. 129
- Tabela 21.** Crescimento tumoral, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Ciclosporina microemulsão, na dose de 10 mg/kg/dia, administrada por via oral e iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral. 130

<b>Tabela 22.</b> Crescimento tumoral, expresso em cm <sup>3</sup> , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com a associação Ciclosporina microemulsão, na dose de 10 mg/kg/dia, e Micofenolato mofetil, 10 mg/kg/dia, administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.	<b>131</b>
<b>Tabela 23.</b> Peso tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral, Ciclosporina microemulsão ou associação Ciclosporina + Micofenolato Mofetil, administrados por via oral, todos iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.	<b>133</b>
<b>Tabela 24.</b> Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral, Ciclosporina microemulsão ou associação de Ciclosporina com Micofenolato Mofetil, todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.	<b>137</b>
<b>Tabela 25.</b> Crescimento tumoral, expresso em cm <sup>3</sup> , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral por via oral, iniciada no 4 <sup>o</sup> dia após a inoculação tumoral e administrada durante 7 dias.	<b>140</b>
<b>Tabela 26.</b> Crescimento tumoral, expresso em cm <sup>3</sup> , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Rapamicina, na dose de 1,5 mg/kg/dia por via oral, iniciada no 4 <sup>o</sup> dia após a inoculação tumoral e administrada durante 7 dias.	<b>141</b>
<b>Tabela 27.</b> Crescimento tumoral, expresso em cm <sup>3</sup> , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Micofenolato Mofetil, na dose de 10 mg/kg/dia por via oral, iniciado no 4 <sup>o</sup> dia após a inoculação tumoral e administrada durante 7 dias.	<b>142</b>
<b>Tabela 28.</b> Peso tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral, Rapamicina ou Micofenolato Mofetil, iniciados no 4 <sup>o</sup> dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 7 dias.	<b>144</b>

<b>Tabela 29.</b> Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral, Rapamicina ou Micofenolato Mofetil, iniciados no 4º dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 7 dias.	<b>148</b>
<b>Tabela 30.</b> Crescimento tumoral, expresso em cm <sup>3</sup> , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando células tumorais isoladas sem gradiente de Ficoll-Hypaque.	<b>152</b>
<b>Tabela 31.</b> Crescimento tumoral, expresso em cm <sup>3</sup> , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando células tumorais isoladas com gradiente de Ficoll-Hypaque.	<b>153</b>
<b>Tabela 32.</b> Peso tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando células tumorais isoladas com e sem gradiente de Ficoll-Hypaque.	<b>155</b>
<b>Tabela 33.</b> Análise histológica do tumor de Walker no 10º dia após o implante em ratos Wistar, utilizando suspensão celular obtida com ou sem o gradiente de Ficoll-Hypaque.	<b>158</b>
<b>Tabela 34.</b> Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker utilizando células tumorais isoladas com e sem gradiente de Ficoll-Hypaque.	<b>159</b>
<b>Tabela 35.</b> Crescimento tumoral, expresso em cm <sup>3</sup> , em animais inoculados com células isoladas do carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com azeite de oliva administrado, iniciado no 4º dia após a inoculação tumoral e administrado por via oral durante 10 dias.	<b>162</b>
<b>Tabela 36.</b> Crescimento tumoral, expresso em cm <sup>3</sup> , em animais inoculados com células isoladas do carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Rapamicina, na dose de 1,5 mg/kg/dia, iniciado no 4º dia após a inoculação tumoral e administrada por via oral durante 10 dias.	<b>163</b>
<b>Tabela 37.</b> Peso tumoral em animais inoculados com células isoladas do carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com azeite de oliva ou Rapamicina, na dose de 1,5 mg/kg/dia, ambos iniciados no 4º dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 10 dias.	<b>165</b>

**Tabela 38.** Peso corporal de animais inoculados com células isoladas de carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com azeite de oliva ou Rapamicina, na dose de 1,5 mg/kg/dia, ambos iniciado no 4<sup>o</sup> dia após a inoculação tumoral e administrado por via oral durante 10 dias.

**168**

## LEGENDAS DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Funções efetoras das células Th1.	<b>06</b>
<b>Figura 2.</b> Funções efetoras das células Th2.	<b>07</b>
<b>Figura 3.</b> Mecanismos imunes da rejeição dos enxertos.	<b>16</b>
<b>Figura 4.</b> Histopatologia das diferentes formas de rejeição do enxerto.	<b>17</b>
<b>Figura 5.</b> Estrutura química da ciclosporina A.	<b>19</b>
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de ação da ciclosporina A e tacrolimus	<b>25</b>
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de ação da ciclosporina A.	<b>26</b>
<b>Figura 8.</b> Estrutura química do micofenolato mofetil (MMF)	<b>33</b>
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de ação do Micofenolato mofetil e via da síntese das purinas	<b>38</b>
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de ação do Micofenolato mofetil.	<b>39</b>
<b>Figura 11.</b> Metabolismo da Rapamicina nos seres humanos.	<b>42</b>
<b>Figura 12.</b> Metabolismo da Rapamicina.	<b>45</b>
<b>Figura 13.</b> Sítios de ação da enzima alvo da Rapamicina (mTOR).	<b>48</b>
<b>Figura 14.</b> O “paradigma da citocina”.	<b>49</b>
<b>Figura 15.</b> Rato Wistar exibindo crescimento de carcinossarcoma 256 de Walker na região axilar direita 10 dias após a injeção subcutânea de 1ml de suspensão contendo $1 \times 10^6$ células tumorais.	<b>72</b>
<b>Figura 16.</b> Rato Wistar exibindo crescimento de carcinossarcoma 256 de Walker na coxa direita de animal doador 7 dias após a injeção intramuscular de 1ml de suspensão contendo $1 \times 10^6$ células tumorais.	<b>73</b>
<b>Figura 17.</b> Todas as drogas utilizadas no estudo foram administradas por via oral através de pipetas automáticas de 20, 100 e 200 $\mu$ l	<b>77</b>
<b>Figura 18a.</b> Esfregaço de células do carcinossarcoma 256 de Walker coradas com hematoxilina e eosina: a) suspensão celular obtida a partir de tecido tumoral fragmentado, homogeneizado em solução de ringer com lactato e gentamicina e filtrado (aumento de 400X e 1000X, respectivamente).	<b>84</b>

<b>Figura 18b.</b> Esfregaço de células do carcinossarcoma 256 de Walker coradas com hematoxilina e eosina: b) suspensão celular obtida a partir de tecido tumoral fragmentado, homogeneizado em solução de ringer com lactato e gentamicina, filtrado e centrifugado em gradiente de ficoll-hypaque (aumento de 400X e 1000X, respectivamente).	<b>85</b>
<b>Figura 19a.</b> Esquemas dos protocolos de estudos da primeira fase .....	<b>89</b>
<b>Figura 19b.</b> Esquemas dos protocolos de estudos da segunda fase .....	<b>90</b>
<b>Figura 20.</b> Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral (cont, n=10), Rapamicina (Rapa, n=10), Ciclosporina microemulsão (CsA, n=10) ou Micofenolato Mofetil (MMF, n=10), administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.	<b>99</b>
<b>Figura 21.</b> Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com Micofenolato Mofetil, na dose de 1,5 mg/kg/d, iniciado 24 horas antes do implante tumoral e administrado durante 10 dias por via oral.	<b>101</b>
<b>Figura 22.</b> Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido à tratamento com: a) Ciclosporina microemulsão, na dose de 10 mg/kg/d, iniciada 24 horas antes do implante tumoral e administrada durante 10 dias por via oral; b) Rapamicina, na dose de 1,5 mg/kg/d, iniciada 24 horas antes do implante tumoral e administrada durante 10 dias por via oral.	<b>102</b>
<b>Figura 23.</b> Carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea da axila direita, em animais submetidos aos diversos tratamento: Ciclosporina microemulsão (CsA, 10 mg/kg/d), Rapamicina (Rapa, 1,5 mg/kg/d), Micofenolato mofetil (MMF, 10 mg/kg/d) ou água mineral (Cont), iniciados 24 horas antes do implante tumoral e administrados durante 10 dias por via oral.	<b>103</b>
<b>Figura 24.</b> Carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea da axila direita, em animais submetidos a tratamento com: a) Ciclosporina microemulsão (CsA, 10 mg/kg/d), b) água mineral (Cont, 100	

µl/d), c) Rapamicina (Rapa, 1,5 mg/kg/d), d) Micofenolato mofetil (MMF, 10mg/kg/d). Todas as drogas foram iniciados 24 horas antes do implante tumoral e administrados durante 10 dias por via oral.

104

**Figura 25.** Cortes histológicos de carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea da axila direita de ratos Wistar mostrando: (a) a presença de neoplasia indiferenciada de pequenas células com aspecto denso ou (b) pseudonucleado, (c) áreas de necrose, reabsorção, edema, e (d) hemorragia intersticial (aumento de 200 e 400X).

105

**Figura 26.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont, n=10), Rapamicina (Rapa, n=10), Ciclosporina microemulsão (CsA, n=10) ou Micofenolato Mofetil (MMF, n=10) administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

108

**Figura 27.** Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont, n=6), Rapamicina (Rapa, n=9) ou associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão (CsA + Rapa, n=6) ou Micofenolato Mofetil (MMF + Rapa, n=6), todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

115

**Figura 28.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont), Rapamicina (Rapa) ou associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão (CsA + Rapa) ou Micofenolato Mofetil (MMF + Rapa), todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

118

**Figura 29.** Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont, n=9), Rapamicina (Rapa, n=8), ou associações Rapamicina + Ciclosporina microemulsão (CsA + Rapa, n=9) ou Micofenolato Mofetil

(MMF + Rapa, n=9) por via oral, todos iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

124

**Figura 30.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont, n=9), Rapamicina (Rapa, n=8) ou associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão (CsA + Rapa, n=9) ou Micofenolato Mofetil (MMF + Rapa, n=9), administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

127

**Figura 31.** Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont, n=7), Ciclosporina microemulsão (CsA, n=9), ou associação Ciclosporina microemulsão + Micofenolato mofetil (CsA + MMF, n=8), todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

132

**Figura 32.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com água mineral, iniciada 24 horas antes do implante tumoral e administrada durante 10 dias por via oral.

134

**Figura 33.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com a) Ciclosporina microemulsão, 10 mg/kg/dia; b) Micofenolato mofetil, 10 mg/kg/dia, todos iniciados 24 horas antes do implante tumoral e administrada durante 10 dias por via oral.

135

**Figura 34.** Carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea axilar direita, em animais submetido a tratamento com a) água mineral; b) Ciclosporina microemulsão (CsA, 10 mg/kg/d); c) Ciclosporina microemulsão associada a Micofenolato mofetil (MMF, 10mg/kg/d), todos iniciados 24 horas antes do implante tumoral e administrada durante 10 dias por via oral.

136

**Figura 35.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont, n=7),

Ciclosporina microemulsão (CsA, n=9) ou associação de Ciclosporina microemulsão + Micofenolato Mofetil (CsA + MMF, n=8), administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. 138

**Figura 36.** Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont, n=7), Rapamicina (Rapa, n=10) ou Micofenolato Mofetil (MMF, n=9), iniciados no 4º dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 7 dias. 143

**Figura 37.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com a) água mineral; b) Rapamicina, na dose de 1,5 mg/kg/dia, ambas iniciadas no 4º dia após o implante tumoral e administrada durante 7 dias por via oral. 145

**Figura 38.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com Micofenolato mofetil, na dose de 1,5 mg/kg/d, iniciado no 4º dia após o implante tumoral e administrado durante 7 dias por via oral. 146

**Figura 39.** Carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea axilar direita, em animais submetido a tratamento com a) água destilada; b) Rapamicina, 1,5 mg/kg/d); c) Micofenolato mofetil, 10mg/kg/d), todos iniciados no 4º dia após o implante tumoral e administrada durante 7 dias por via oral. 147

**Figura 40.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont), Rapamicina (Rapa) ou Micofenolato Mofetil (MMF), todos iniciados no 4º dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 7 dias. 149

**Figura 41.** Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando células tumorais isoladas sem e com gradiente de Ficoll-Hypaque. 154

**Figura 42.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita a partir de uma suspensão

de células tumorais isoladas (a) sem gradiente de ficoll; (b) com gradiente de ficoll.	156
<b>Figura 43.</b> Carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea da axila direita, em animais sendo injetados com 1ml suspensão contendo $1 \times 10^6$ células isoladas (a) sem gradiente de ficoll; (b) com gradiente de ficoll.	157
<b>Figura 44.</b> Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando células tumorais isoladas com e sem gradiente de Ficoll-Hypaque.	160
<b>Figura 45.</b> Crescimento tumoral em animais inoculados com células isoladas do carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Rapamicina (Rapa, n=9), na dose de 1,5 mg/kg/dia, ou azeite de oliva, (Az-Ol, n=9), ambos iniciados no 4º dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 10 dias.	164
<b>Figura 46.</b> Carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea da axila direita, em animais sendo submetidos a tratamento com Rapamicina (Rapa, 1,5 mg/kg/d) ou azeite de oliva (Cont), iniciados no 4º dia após o implante tumoral e administrados durante 10 dias por via oral.	166
<b>Figura 47.</b> Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com: a) Azeite de oliva por via oral iniciado, no 4º dia após o implante tumoral e administrado durante 10 dias; b) Rapamicina, na dose de 1,5mg/kg/d, iniciada no 4º dia após o implante tumoral e administrada por via oral durante 10 dias.	167
<b>Figura 48.</b> Peso corporal de animais inoculados com células isoladas de carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com azeite de oliva (Az-Ol, n=9) ou Rapamicina (Rapa, n=9), na dose de 1,5 mg/kg/dia, ambos iniciado no 4º dia após a inoculação tumoral e administrado por via oral durante 10 dias.	169
<b>Figura 49.</b> Mecanismos de transdução de sinal sensível à Rapamicina	183

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	ácido desoxiribonucléico
<b>Ag</b>	antígeno
<b>Akt</b>	proteinoquinase B
<b>ALG</b>	globulina anti-linfocítica
<b>AMP</b>	adenosina 5'-monofosfato
<b><math>\alpha</math>-IR-3</b>	anticorpo monoclonal contra IGF-1R
<b>AP-1</b>	proteína de ativação 1
<b>APC</b>	células apresentadoras de antígenos
<b>APRTase</b>	adenina fosforibosiltransferase
<b>ARN</b>	ácido ribonucléico
<b>ARN pol II</b>	RNA polimerase II
<b>ATG</b>	globulina anti-timocítica
<b>AUC</b>	área sob a curva
<b>AZA</b>	azatioprina
<b>Az-OI</b>	azeite de oliva
<b>°C</b>	grau centígrado ou Celsius
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	cálcio
<b>CAAs</b>	células apresentadoras de antígenos
<b>CCDA</b>	citotoxicidade celular dependente de anticorpo
<b>Cdks</b>	quinases ciclinas-dependentes
<b>CFL</b>	ciclofilina
<b>CyP</b>	ciclofilina
<b>Cmax</b>	concentração máxima
<b>CMV</b>	citomegalovírus
<b>Cont</b>	controle
<b>CPAg</b>	célula apresentadora de antígeno
<b>CPH</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade
<b>CsA</b>	ciclosporina microemulsão

<b>CSF-GM</b>	fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos
<b>CTTR</b>	Cincinnati Transplant Tumor Registry
<b>D</b>	dia, day
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>dATP</b>	desoxi adenina trifosfato
<b>dGTP</b>	desoxi guanosina trifosfato
<b>DHT</b>	hipersensibilidade tardia
<b>DNA</b>	ácido desoxiribonucléico
<b>Dm</b>	diâmetro maior
<b>EBV</b>	Epstein-Barr vírus
<b>EDTA-ERA</b>	<i>European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association</i>
<b>4EBP1</b>	proteína 1 de ligação do fator iniciador 4E
<b>EV-HPV</b>	epidermodisplasia-verruciforme
<b>FKBP-12</b>	<i>FK-binding protein 12</i>
<b>FK 506</b>	tacrolimus
<b>FNT</b>	fator de necrose tumoral
<b>FRAP</b>	<i>FKBP-rapamycin associated protein</i>
<b>g</b>	grama
<b>G</b>	grupo
<b>GDP</b>	guanosina difosfato
<b>GMP</b>	guanosina 5'-monofosfato
<b>GTP</b>	guanosina trifosfato
<b>HBV</b>	vírus da hepatite B
<b>HLA</b>	antígeno leucocitário humano
<b>HDL</b>	lipoproteína de alta densidade
<b>HGPRTase</b>	hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase
<b>HPLC</b>	cromatografia líquida de alta resolução
<b>HPLC-MS</b>	cromatografia líquida de alta resolução com espectrometria de massa

<b>HPV</b>	papilomavírus
<b>IBAs</b>	ensaio de ligação da imunofilina
<b>ICAM-1</b>	<i>intercellular adhesion molecule</i>
<b>IDL</b>	lipoproteína de intensidade intermediária
<b>IGF</b>	fator de crescimento semelhante à insulina
<b>IGF-1R</b>	receptor do fator de crescimento semelhante à insulina
<b>I<math>\kappa</math>Bs</b>	inibidores do fator nuclear $\kappa$ B
<b>IMP</b>	inosina 5'-monofosfato
<b>IMPDH</b>	inosina monofosfato desidrogenase
<b>INF</b>	interferon
<b>IL</b>	interleucina
<b>IL-2R</b>	receptor da interleucina 2
<b>IP3</b>	inositol 1,4,5-tri-fosfato
<b>kd</b>	quilodaltons
<b>Kf</b>	coeficiente de ultrafiltração
<b>Kg</b>	quilograma
<b>LDL</b>	lipoproteína de baixa densidade
<b>mAbs</b>	anticorpo monoclonal
<b>LFA</b>	<i>leucocyte function-associated antigen</i>
<b>LMP</b>	proteína de membrana latente
<b>MEIA</b>	enzima-ensaio com micropartículas
<b>MMF</b>	micofenolato mofetil
<b>mg</b>	miligrama
<b>ml</b>	mililitro
<b>MPA</b>	ácido micofenólico
<b>MPAG</b>	glucoronídeo do ácido micofenólico
<b>mRNA</b>	ácido ribonucléico mensageiro
<b>mTOR</b>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>MTW</b>	peso tumoral médio
<b>N</b>	número

NCI	Instituto Nacional Câncer
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
NFAT	fator nuclear das células T ativadas
NF-κB	fator nuclear κB
NIPC	neoplasia indiferenciada de pequenas células
NK	células natural <i>killer</i>
Nm	nanômetro
OKT3	anticorpos monoclonais anti-CD3
PHAS-1	<i>phosphorylated heat- and acid-stable protein</i>
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PIKKs	fosfoinositídeo 3-quinase relacionada a quinases
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	fosfatidil-4,5 bifosfato;
PKC	proteinoquinase C
PLC	fosfolipase C
PO	<i>per os</i>
PRPP	fosforibosilpirofosfato
PRED	prednisona
p70 <sup>S6k</sup>	proteína 40S ribossomal S6 cinase
PTKs	proteínas tirosina-quinases
PTLD	doenças linfoproliferativas
RA	rejeição aguda
Rapa	Rapamicina
RAFT1	<i>Rapamycin-FKBP target 1</i>
RAP1	<i>Rapamycin associated protein 1</i>
RC	rejeição crônica
RHA	rejeição hiperaguda
RIA	radioimunoensaio
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
RR	risco relativo
Sc	subcutâneo

<b>TRL</b>	Tacrolimus
<b>Tc</b>	linfócitos T citotóxico
<b>tmax</b>	tempo máximo
<b>TCR</b>	receptor de células T
<b>TGF</b>	fator de crescimento e transformação
<b>Th</b>	linfócitos T helper
<b>TI</b>	% inibição/crescimento
<b>TV</b>	volume tumoral
<b>TW</b>	peso tumoral
<b>U.N.O.S.</b>	<i>United Network for Organ Sharing, Richmond</i>
<b>UVB</b>	ultravioleta
<b>VCAM</b>	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
<b>VLA-4</b>	<i>very late activation antigen.</i>
<b>VEGF</b>	fator de crescimento do endotélio vascular
<b>Vo</b>	via oral
<b>Vs</b>	<i>versus</i>
<b>X</b>	vezes
<b>XMP</b>	xantosina monofosfato
<b>μl</b>	microlitro
<b>μg</b>	micrograma
<b>μm</b>	micrômetro

## RESUMO

**“EFEITO DOS IMUNOSSUPRESSORES CICLOSPORINA MICROEMULSÃO, MICOFENOLATO MOFETIL E RAPAMICINA NO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE WALKER”.** SÔNIA LEITE DA SILVA. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Fortaleza, 2003. Orientadores: Maria Elisabete Amaral de Moraes e Henry de Holanda Campos.

**Objetivos:** O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de 3 imunossupressores no desenvolvimento do tumor de Walker e avaliar uma nova técnica de isolamento destas células utilizando um gradiente de ficoll-hypaque.

**Métodos e Resultados:** Um 1 milhão de células tumorais foram injetadas por via sc. na axila direita de ratos Wistar machos de 4 a 8 semanas de idade. Volume tumoral (TV), % inibição/crescimento tumoral (TI) e peso tumoral (TW) foram analisados por ANOVA multivariada e univariada. **Experimento I:** (grps): 1-Controle (Cont, n=10), água mineral; 2-Rapamicina, 1,5mg/kg/dia (Rapa, n=10); 3-Ciclosporina microemulsão, 10mg/kg/d, (CsA, n=10); 4-Micofenolato mofetil, 10mg/kg/d (MMF, n=10). As drogas foram introduzidas 24h antes da inoculação do tumor e administradas v. o. durante 10 dias. No 10<sup>o</sup> dia, TV foi menor no grp Rapa do que no Cont (6,8±2,7cm<sup>3</sup> vs. 14,9±4,2cm<sup>3</sup>, p<0,001), mas semelhante ao da CsA (13,9±3,0cm<sup>3</sup>, p=0,89). TV foi menor no grp MMF em relação ao Cont (10,3±2,8cm<sup>3</sup>, p<0,05). TI: Rapa-49,3%; MMF-28,3%. TW também foi significativamente menor na Rapa (3,7±1,2g) e MMF (5,2±2,0g) quando comparados com CsA (8,8±2,1g) e Cont (7,3±2,0g). **Experimento II:** Cont (n=9); Rapa (n=8); Rapa+CsA (n=9); Rapa+MMF (n=9). Todas as drogas foram iniciadas 24h antes da inoculação tumoral e administradas durante 10 dias. No 10<sup>o</sup> dia, TV foi menor nos grps Rapa, Rapa+CsA e Rapa+MMF quando comparados com o grp Cont (3,8±1,5cm<sup>3</sup>; 3,1±1,2cm<sup>3</sup> e 4,6±2,7cm<sup>3</sup> vs. 10,9±3,8cm<sup>3</sup>; p<0,0001). TW também foi menor nestes grps do que no Cont (3,5±1,2g; 2,3±0,4g; e 2,7±1,1g vs. 7,3±1,4g; p<0,0001). TI foi de -52.1% no grp Rapa, -68.5% no grp Rapa+CsA e -63% no grp Rapa+MMF. **Experimento III:** Cont (n=7); CsA (n=9); MMF+CsA (n=8). Todas as drogas foram iniciadas 24h antes do implante tumoral e administradas por v. o. durante 10 dias. No 10<sup>o</sup> dia, TV do grp MMF+CsA (19,7±3,7cm<sup>3</sup>) foi semelhante (p=0,435) aos da CsA (18,3±3,4cm<sup>3</sup>) e Cont (19,1±3,5cm<sup>3</sup>). Da mesma forma, TW foi similar entre os grps (CsA=11,2±2,1g; MMF+CsA=9,9±2,8g; e Cont=9,7±3,1g; p=0,457). **Experimento IV:** Cont (n=7); Rapa (n=10); MMF (n=9). Todas as drogas foram iniciadas no 4<sup>o</sup> dia após o implante tumoral e administradas durante 7 dias. No 10<sup>o</sup> dia, TV nos grps Rapa e MMF foram semelhantes ao Cont (Rapa=13,2±3,2cm<sup>3</sup> e MMF=12,3±5,5cm<sup>3</sup> vs Cont=14,9±7,4cm<sup>3</sup>; p=0,831) da mesma forma que o TW (Rapa=5,2±1,6g e MMF=6,9±2,4g vs. Cont=6,3±3,2g; p=0,229). **Experimento V: Técnica de Isolamento das Células Tumorais.** A suspensão de células tumorais foi centrifugada em gradiente de Ficoll-Hypaque e 1 ml da suspensão foi injetado sc. na axila direita (n=10) e TV, TW foram comparados com animais injetados com 1ml da suspensão de células utilizando a técnica **sem gradiente de ficoll-hypaque** (n=10). No 10<sup>o</sup> dia, nenhuma diferença foi observada no TV (sem ficoll=17,9±3,8 e com ficoll=17,2±4,4cm<sup>3</sup>; p=0,190) nem no TW (sem ficoll=7,0±1,8g; com ficoll=7,3±2,8g, p=0,569) entre as duas técnicas. **Experimento VI:** foi avaliado o efeito da Rapa sobre o crescimento tumoral utilizando o gradiente de ficoll para isolamento das células tumorais. Cont (n=10) azeite de oliva; Rapa (n=10). Rapa foi iniciada no 4<sup>o</sup> dia após o implante tumoral e administrada por v. o. durante 10 dias. No 13<sup>o</sup> dia, TV no grp da Rapa (21,1±6,0 cm<sup>3</sup>) foi semelhante ao Cont (24,9±6,4cm<sup>3</sup>; p=0,831) da mesma forma que o TW no 14<sup>o</sup> dia (Rapa=9,3±4,0g vs. Cont=10,0±2,6g; p=0,445). **Conclusões:** O gradiente de Ficoll-Hypaque pode ser usado com sucesso para isolamento das células tumorais do carcinossarcoma de Walker. Rapa inibiu de maneira importante o crescimento do carcinossarcoma de Walker quando usada isoladamente ou associada à CsA microemulsão ou MMF. MMF também atenua o crescimento do carcinossarcoma de Walker quando usado isoladamente, porém este efeito inibitório é perdido quando o MMF é associado à CsA. Não existe sinergismo para inibição do crescimento tumoral com o emprego da associação Rapa + MMF. O efeito antiproliferativo da Rapa e do MMF é perdido quando as drogas são introduzidas após o tumor se apresentar em fase de crescimento.

## ABSTRACT

**Effect of Immunosuppressive Cyclosporin microemulsion, Mycophenolate mofetil and Rapamycin in Tumor Development of Walker's Tumor.** SÔNIA LEITE DA SILVA. Paper presented to the Post-Graduation Course of Pharmacology at the Federal University of Ceara as required to obtain the PhD degree in Pharmacology, Fortaleza, 2003. Professors: Maria Elisabete Amaral de Moraes and Henry de Holanda Campos.

**Purpose:** The purpose of this study was to investigate the effect of 3 immunosuppressive drugs on Walker's tumor development and to evaluate a novel isolation technique of these tumoral cells using a ficoll-hypaque gradient.

**Methods and Results.** one million of tumoral cells were inoculated by sc. injection in the right axillary region in forty male Wistar rats, 4-8 weeks-age. Tumor volume (TV), % tumor growth/inhibition (TI), and tumor weight (TW) were assessed and analysed by ANOVA multivariate and univariate assays. **Experiment I:** 1-Control (n=10), mineral water; 2-Rapamycin, 1.5mg/kg/day (Rapa, n=10); 3-Cyclosporin microemulsion, 10mg/kg/d, (CsA, n=10); 4-Mycophenolate mofetil, 10mg/kg/d (MMF, n=10). All drugs were introduced one day before tumor inoculation and administered p.o. over 10 days. On day 10, TV was smaller in Rapa than in Control ( $6.8 \pm 2.7 \text{ cm}^3$  vs.  $14.9 \pm 4.2 \text{ cm}^3$ ,  $p < 0.001$ ) in opposition to CsA ( $13.9 \pm 3.0 \text{ cm}^3$ ,  $p = 0.89$ ). TV was lower in MMF than in Control ( $10.3 \pm 2.8 \text{ cm}^3$ ,  $p < 0.05$ ) and similar to CsA and Rapa. TI was -49.3% in Rapa and -28.3% in MMF. TW was also significantly lower in Rapa ( $3.7 \pm 1.2 \text{ g}$ ), MMF ( $5.2 \pm 2.0 \text{ g}$ ) as compared to CsA ( $8.8 \pm 2.1 \text{ g}$ ) and Control ( $7.3 \pm 2.0 \text{ g}$ ). **Experiment II:** Control (n=9); Rapa (n=8); Rapa+CsA (n=9); Rapa+MMF (n=9). All drugs were started 24 hr. before tumor inoculation and administered over 10 days. On day 10, TV was lower in Rapa, Rapa+CsA and Rapa+MMF as compared to Control ( $3.8 \pm 1.5 \text{ cm}^3$ ;  $3.1 \pm 1.2 \text{ cm}^3$  and  $4.6 \pm 2.7 \text{ cm}^3$  vs.  $10.9 \pm 3.8 \text{ cm}^3$ ;  $p < 0.0001$ ). TW was also lower in these groups than in Control ( $3.5 \pm 1.2 \text{ g}$ ;  $2.3 \pm 0.4 \text{ g}$ ; and  $2.7 \pm 1.1 \text{ g}$  vs.  $7.3 \pm 1.4 \text{ g}$ ;  $p < 0.0001$ ). TI was -52.1% in Rapa, -68.5% in Rapa+CsA and -63% in Rapa+MMF. **Experiment III:** Control (n=7); CsA (n=9); MMF+CsA (n=8). Drugs were given p. o. over 10 days beginning 24 hr. before tumor inoculation. On day 10, TV was similar ( $p = 0.435$ ) in MMF+CsA ( $19.7 \pm 3.7 \text{ cm}^3$ ) as compared to CsA ( $18.3 \pm 3.4 \text{ cm}^3$ ) and Control ( $19.1 \pm 3.5 \text{ cm}^3$ ). TW was similar in these groups (CsA= $11.2 \pm 2.1 \text{ g}$ ; MMF+CsA= $9.9 \pm 2.8 \text{ g}$ ; and Control= $9.7 \pm 3.1 \text{ g}$ ;  $p = 0.457$ ). **Experiment IV:** Control (n=7); Rapa (n=10); MMF (n=9). All drugs were started on Day 4 after tumor implant and administered over 7 days. On day 10, TV in Rapa and MMF were similar to Control (Rapa= $13.2 \pm 3.2 \text{ cm}^3$  and MMF= $12.3 \pm 5.5 \text{ cm}^3$  vs. Control= $14.9 \pm 7.4 \text{ cm}^3$ ;  $p = 0.831$ ) as well as TW (Rapa= $5.2 \pm 1.6 \text{ g}$  and MMF= $6.9 \pm 2.4 \text{ g}$  vs. Control= $6.3 \pm 3.2 \text{ g}$ ;  $p = 0.229$ ). **Experiment V: Isolation Technique of Tumoral cells Using a Ficoll-Hypaque Gradient.** The tumoral cells were centrifuged on a Ficoll-Hypaque gradient and one million cells tumoral were implanted in the right axillary region (n=10) and TV, TI, and TW were compared with technique **without the Ficoll-Hypaque gradient** (n=10). On day 10, no differences were observed in TV (without ficoll= $17.9 \pm 3.8$  and with ficoll= $17.2 \pm 4.4 \text{ cm}^3$ ;  $p = 0.190$ ) and TW (without ficoll= $7.0 \pm 1.8 \text{ g}$ ; with ficoll =  $7.3 \pm 2.8 \text{ g}$ ,  $p = 0.569$ ). **Experiment VI:** the effect of Rapa on tumor growth was assessed using the tumor cell suspension obtained by a ficoll-hypaque gradient. Control (n=10) olive oil; Rapa (n=10). Treatment was started on Day 4 after tumor implant and administered p. o. over 10 days. On day 13, TV in Rapa ( $21.1 \pm 6.0 \text{ cm}^3$ ) was similar to Control ( $24.9 \pm 6.4 \text{ cm}^3$ ;  $p = 0.831$ ). as well as TW on day 14 (Rapa= $9.3 \pm 4.0 \text{ g}$  vs. Control= $10.0 \pm 2.6 \text{ g}$ ;  $p = 0.445$ ).

**Conclusions:** A Ficoll-Hypaque gradient can provide more adequate isolation of Walker's carcinosarcoma cells. Rapamycin greatly inhibited tumor growth when used alone or in association with cyclosporin micro-emulsion or MMF. MMF when used alone in this model attenuated Walker's carcinosarcoma growth but this inhibitory effect was lost when MMF is used in combination with CsA. There was no synergism in the association Rapa + MMF in the inhibition of tumor growth The antiproliferative effect of Rapa or MMF was lost when either drug was administered in presence of a established tumor.

## PREFÁCIO

O primeiro transplante renal no Estado do Ceará foi realizado em 1977 no Hospital Universitário Walter Cantídio e, desde então, 370 transplantes foram realizados neste centro. A partir de 1983 o Hospital Geral de Fortaleza tornou-se um importante centro de transplante renal, com a realização de 505 transplantes.

A Central de Transplantes de Estado do Ceará foi criada em junho de 1998 e desde a sua criação foram realizados 510 transplantes renais, 35 cardíacos e 10 hepáticos.

Estes receptores de transplante, tratados com drogas imunossupressoras para evitar a rejeição do enxerto, apresentam elevado risco de desenvolvimento de neoplasias, principalmente de pele, devido à exposição solar intensa em nossa região. A incidência de neoplasias nos receptores de transplante e a morbidade e mortalidade associadas justificam o investimento em pesquisas que visem obter mais informações sobre a participação das novas drogas imunossupressoras sobre o desenvolvimento de tumores, o que constitui o objetivo principal desta tese. Informações científicas recentes de que agentes como micofenolato mofetil e rapamicina poderiam exercer ação antineoplásica, evitando a progressão de neoplasias ou favorecendo a sua regressão, representaram um dos principais argumentos para a realização deste trabalho.

No capítulo introdutório descrevemos inicialmente a evolução natural de um transplante, a partir dos mecanismos de reconhecimento do antígeno, os diversos tipos de rejeição, bem como as drogas imunossupressoras utilizadas para sua profilaxia. As drogas empregadas em nosso modelo experimental foram a Ciclosporina microemulsão, o Micofenolato mofetil e a Rapamicina. A abordagem de cada droga envolveu a sua composição química, farmacocinética, mecanismo de ação e toxicidade. Por último, um enfoque especial foi dado à ocorrência de neoplasias, complicação decorrente da imunossupressão, com demonstrações

das diferentes incidências de neoplasia de acordo com as regiões, tipo de transplante e tempo de imunossupressão. Os principais tipos de neoplasias foram descritos, bem como alguns fatores de riscos a eles associados.

A escolha do carcinossarcoma de Walker para avaliar a atividade antiproliferativa das drogas imunossupressoras, deveu-se ao fato de ser este um modelo bem caracterizado e reprodutível de tumor, de rápido crescimento, com baixo grau de metástases, que vem sendo utilizado em nossa Universidade há vários anos para testar a ação de substâncias anti-tumorais (FONTELES et al, 1966; MORAES et al., 1980).

Numa primeira fase, o protocolo experimental foi desenvolvido para testar o efeito de cada droga isoladamente e da associação de drogas como CsA+Rapa, CsA+MMF ou MMF+Rapa sobre o crescimento tumoral, após a inoculação de um milhão de células tumorais na região subcutânea axilar direita em ratos Wistar machos. As drogas foram iniciadas 24 horas antes do implante tumoral. Os parâmetros avaliados foram volume e peso tumoral, percentagem de inibição do crescimento tumoral e peso corporal dos ratos. Como foi observado um efeito antiproliferativo com o MMF e a Rapamicina, foi averiguado se este efeito permanecia se a droga fosse introduzida quando o tumor já se apresentava em fase de crescimento, ou seja no 4<sup>o</sup> dia após o implante tumoral.

Na segunda fase, testamos uma nova técnica de isolamento da célula tumoral utilizando um gradiente de ficoll, com a finalidade de eliminar pequenos fragmentos de tecidos, hemácias, granulócitos e plaquetas que permanecem na suspensão celular e que talvez pudessem interferir no crescimento tumoral. Uma vez mostrado que a célula tumoral permaneceu viável, foi realizado um estudo comparativo entre as duas técnicas

Por último, investigamos novamente a ação da Rapamicina na regressão tumoral utilizando a nova técnica de obtenção da suspensão celular.

Os resultados destes experimentos são de grande importância, pois existem raros trabalhos utilizando modelos *in vivo* para testar o efeito antiproliferativo das novas drogas imunossupressoras e nenhum com este desenho experimental.

# INTRODUÇÃO

As moléculas de classe I são expressas em praticamente todas as células nucleadas do organismo sendo responsáveis por apresentar os peptídeos de origem intracelular para o sistema de defesa celular. Estas moléculas são codificadas pelo complexo de genes MHC (Major Histocompatibility Complex) localizado no cromossomo 6 humano. A classe I é composta por duas cadeias polipeptídicas,  $\alpha$  e  $\beta$ , que se associam para formar um sítio de ligação para o peptídeo. A cadeia  $\beta$  possui um domínio extracelular que se liga ao peptídeo, enquanto a cadeia  $\alpha$  possui um domínio transmembranal e um domínio citoplasmático. A expressão da classe I é regulada por fatores transcritoriais, incluindo o fator NF- $\kappa$ B, que é ativado por estímulos como LPS (lipopolissacarídeo) e citocinas como o IFN- $\gamma$  (interferon gama). A expressão da classe I é também regulada por fatores transcritoriais como o NF- $\kappa$ B, que é ativado por estímulos como LPS e citocinas como o IFN- $\gamma$ .

O reconhecimento dos antígenos apresentados pela classe I ocorre na superfície dos linfócitos T (TCR - T Cell Receptor) que se ligam ao complexo molécula-peptídeo. Esta interação é essencial para a ativação dos linfócitos T pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). A interação entre o TCR e a classe I é mediada por moléculas co-receptoras, como o CD28, que se ligam ao complexo molécula-peptídeo.

Desde a realização do primeiro transplante com sucesso entre humanos por J. E. Murray em 1954, o grande desafio dos transplantes de órgãos tem sido controlar a resposta imune do receptor dirigida contra o enxerto do doador, processo conhecido como rejeição (HAMILTON, 1988). O conhecimento dos mecanismos de rejeição só foi possível graças à melhor compreensão dos mecanismos de resposta imune.

## 1. MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNE

### 1. 1. Fase de Reconhecimento Antigênico e Ativação dos Linfócitos

O primeiro passo no início da resposta imune é o reconhecimento antigênico. As principais moléculas envolvidas neste reconhecimento formam o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), também conhecido como Sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA). Este Complexo está localizado no braço curto do cromossoma seis e pode ser dividido em duas classes de moléculas: classe I localizada nos *loci* A, B, C, e classe II, localizada nos *loci* DR, DP, DQ (ROITT et al., 1999).

As moléculas de classe I são expressas em quase todas as células nucleadas do organismo, sendo responsáveis pela ativação dos linfócitos CD8+, enquanto que as de classe II são expressas principalmente nas células imunocompetentes, incluindo macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, e são responsáveis pela ativação dos linfócitos CD4+. Células endoteliais e tubulares renais, entre outras, podem ser induzidas a expressarem moléculas de classe II em resposta a citocinas inflamatórias, principalmente interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), adquirindo um papel estimulatório na resposta imune ao transplante (PANAJOTOPOULUS et al., 1997; ABBAS et al., 2002a).

O reconhecimento dos aloantígenos é realizado pelo receptor localizado na superfície dos linfócitos T (TCR). Estes aloantígenos são apresentados aos linfócitos T pelas células apresentadoras de antígenos (CAAs), em forma de peptídeos, sempre ligados às moléculas do CPH (PÁDUA NETO, 1999).

As CAAs podem ser células do doador presentes dentro dos órgãos vascularizados no momento do transplante, os chamados “leucócitos passageiros”. Estas células expressam moléculas de classes I e II e podem estimular diretamente os linfócitos T, iniciando o processo de rejeição. Esta constitui a **via direta** de alo-reconhecimento do antígeno (PÁDUA NETO, 1999).

Na **via indireta**, as CAAs do receptor fagocitam os aloantígenos do doador, processam peptídeos ligados às moléculas do CPH, expressando-os na fenda da superfície celular (PÁDUA NETO, 1999).

A ligação do aloantígeno ao TCR, o primeiro sinal para a ativação dos linfócitos T, é importante, porém, não suficiente para o desencadeamento do processo de rejeição ao enxerto. Sinais co-estimulatórios são necessários para ativar as células T (SALOMON et al., 1998).

Moléculas de adesão são expressas nas células T e se unem a seus respectivos ligantes, localizados nas superfícies das CAAS, com a finalidade de estabilizar a adesão intercelular. A expressão destes ligantes nas CAAS é regulada por citocinas inflamatórias, como interleucina 1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral (FNT), INF- $\alpha$  e INF- $\beta$ . Este fato explica porque as CAAs ativadas por citocinas são mais eficientes na ativação das células T e esta observação também pode ser aplicada para as CAAs amadoras, por exemplo, células endoteliais ativadas por citocinas (SALOMON et al., 1998). Isto pode explicar porque a rejeição é mais comum nos primeiros meses após o transplante e porque pacientes estáveis com infecção ativa podem subitamente desenvolver rejeição aguda. A necrose tubular aguda pode ser considerada um estado pro-inflamatório. A morte cerebral do doador é freqüentemente associada a trauma grave, hipotermia, instabilidade hemodinâmica ou bacteremia subclínica, devida a múltiplas punções endovenosas antes da retirada dos órgãos. Assim, a maior incidência de rejeição em enxertos com função retardada poderia ser explicada pelo aumento na expressão dos ligantes co-estimulatórios induzido pelas citocinas (SALOMON et al., 1998).

Entretanto, o aumento da adesão entre as células também não é suficiente para ativar as células T, sendo necessário que ocorra o segundo sinal de ativação. Na verdade, os sinais do complexo TCR/CD3, se não forem acompanhados do segundo sinal, podem levar à inativação celular, também designada como estado de anergia celular (ABBAS et al., 2002b).

O segundo sinal melhor conhecido ocorre pela ligação das moléculas CD28 dos linfócitos T com as moléculas co-estimuladoras B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), expressas na superfície das CAAs “profissionais”, incluindo células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Essas moléculas, ausentes ou expressas em baixos níveis nas células T em repouso, são induzidas por vários estímulos, como endotoxinas,  $\text{INF-}\gamma$  e ligação do CD40L da célula T ao CD40 localizado na superfície das CAAs. As células T ativadas expressam outras moléculas de superfície, como CTLA-4, homóloga de CD28, que transmite sinais que inibem a ativação das células T, podendo exercer um papel no término da resposta da célula T e na autotolerância (ABBAS et al., 2002b).

O segundo sinal de ativação desencadeia o sistema de segundo-mensageiro, que mobiliza cálcio dos estoques intracelulares e, por sua vez, fosforila uma proteinoquinase, aumentando a síntese e expressão de IL-2 e de seu receptor (IL-2R), essenciais para a expansão clonal das células CD4+ (ABBAS et al., 2002b).

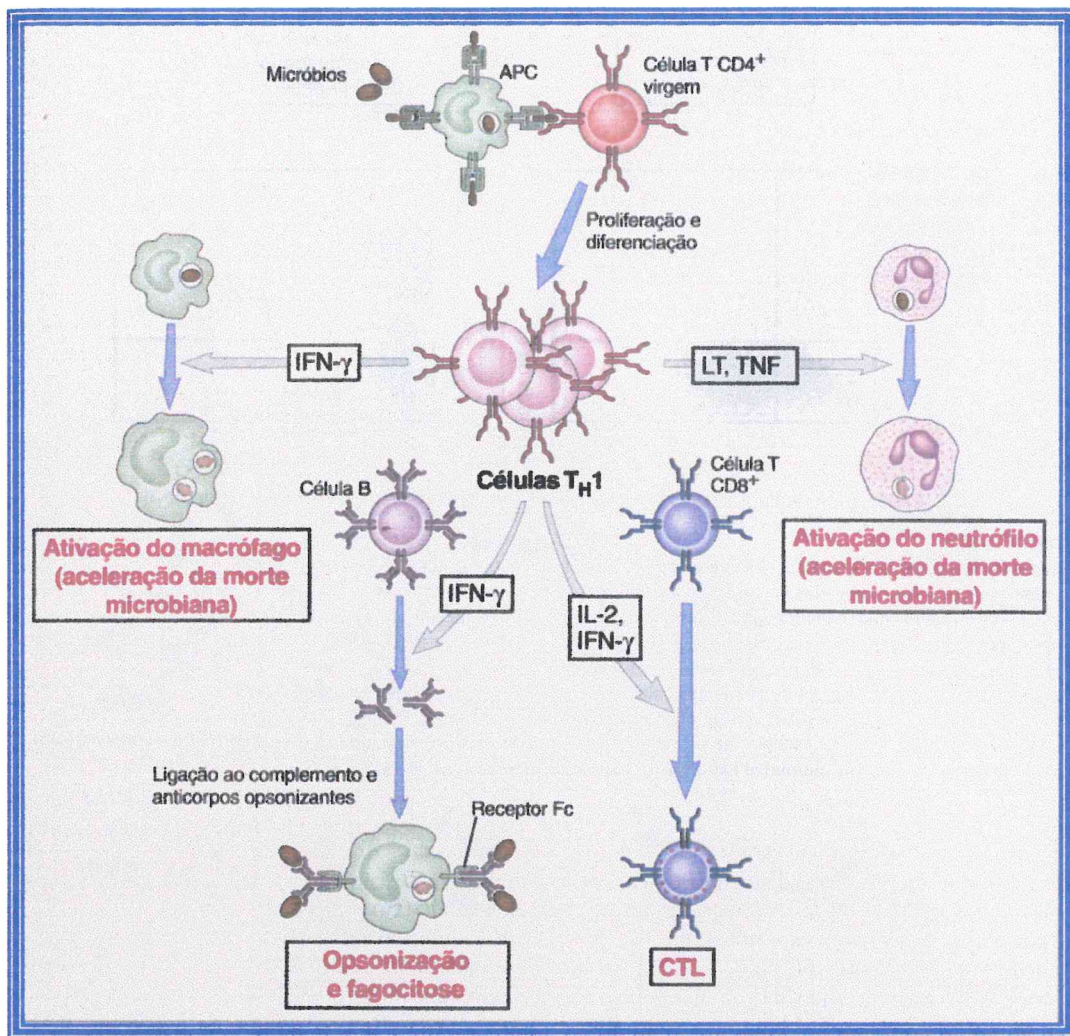
Os linfócitos CD4+ são divididos em duas populações: Th1 e Th2, que se diferenciam pelo perfil de interleucina que cada um produz. Os linfócitos Th1 produzem IL-2, IL-3,  $\text{FNT-}\beta$ ,  $\text{INF-}\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$ , e são responsáveis pela resposta imune mediada por células. Os linfócitos Th1 ativam os principais fagócitos (macrófagos e neutrófilos) e as células CD8+ (**figura 1**). Os linfócitos Th2 são produtores de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e são responsáveis pelo componente humoral da resposta imune, pois ativam os linfócitos B, produtores de anticorpos. (**figura 2**) (ABBAS et al., 2002c).

As células Th1 e Th2 se desenvolvem a partir de um mesmo precursor e uma pode exercer função regulatória sobre a outra. O  $\text{INF-}\beta$  inibe a expressão

das citocinas produzidas pelas células Th2, enquanto que a IL-4 e IL-10 inibem aquelas produzidas pelas células Th1 (ABBAS et al., 2002c).

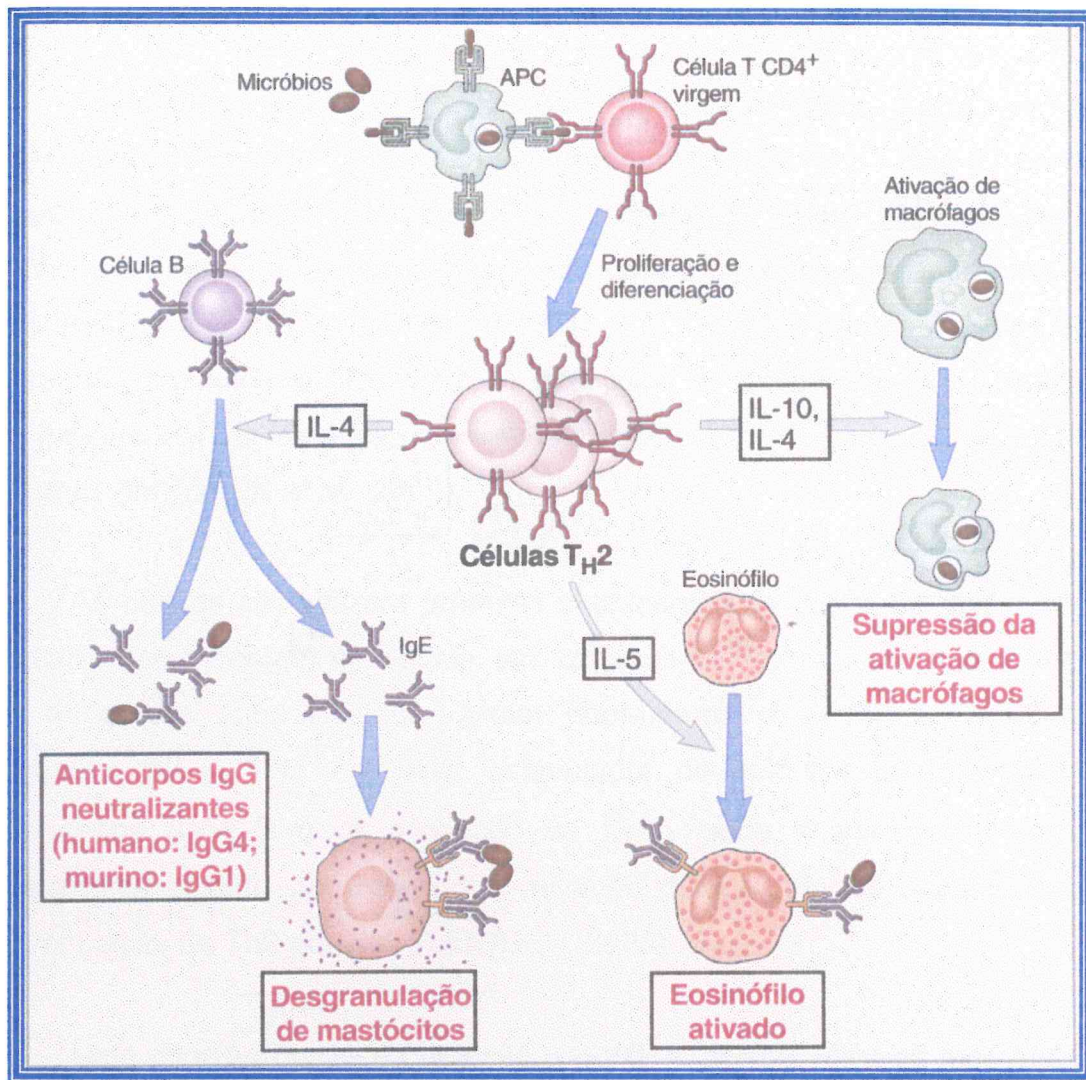


Figura 1. Funções efetivas das células Th1 e Th2. As células Th1 diferenciam em Th1, secretam IFN- $\gamma$  e estimulam as células dendríticas e macrófagos para aumentar a fagocitose, a formação de lisossomos e a produção de citocinas que estimulam as células Th1. As células Th2 que secretam IL-4 e IL-10 inibem as células dendríticas e macrófagos que produzem citocinas que estimulam as células Th2. O ciclo se fecha com as células Th1 estimulando as células dendríticas e macrófagos, que por sua vez estimulam as células Th1.



**Figura 1.** Funções efetoras das células Th1. As células CD4+ que se diferenciam em Th1 secretam IFN- $\gamma$ , linfotoxina e IL-2. O IFN- $\gamma$  atua sobre os macrófagos para aumentar a fagocitose e a morte dos micróbios nos fagolisosomas e sobre os linfócitos B para aumentar a produção de anticorpos IgG que opsonizam os micróbios para a fagocitose. A IL-2 é um fator de crescimento autócrino predominante para esta subpopulação de células T e, juntamente com o IFN- $\gamma$ , poderá contribuir para a diferenciação das células CD8+ em linfócitos T citolíticos. A linfotoxina ativa os neutrófilos.

APC = células apresentadoras de antígenos, INF = interferon, IL = interleucina (ABBAS et al., 2002c)



**Figura 2.** Funções efetoras das células Th2. As células CD4<sup>+</sup> que se diferenciam em células Th2 secretam IL-4 e IL-5. A IL-4 atua sobre as células B para estimular a produção de anticorpos que se ligam aos mastócitos, tais como IgE. A IL-4 é também uma citocina de crescimento e diferenciação autócrina para as células Th2. A IL-5 ativa os eosinófilos. As citocinas originadas das células Th2 antagonizam os efeitos de ativação dos macrófagos das citocinas derivadas da Th1.

APC= células apresentadoras de antígenos.

(ABBAS et al.,2002c).

As células *natural killer* (NK) são grandes linfócitos granulares que apresentam atividade espontânea contra células-alvo, não havendo necessidade de exposição prévia aos antígenos como os linfócitos T (imunidade natural). Elas são derivadas de uma linhagem linfóide diferente dos linfócitos T e são CD3 -, CD16+, CD56+. Sua função é destruir células com expressão diminuída ou aberrante de moléculas de classe I do CPH, podendo ser importantes na detecção de células infectadas por vírus ou de células malignas (IMBODEN et al., 2000).

As células NK utilizam grânulos citoplasmáticos contendo perforinas e granzimas para destruir as células, são capazes de destruir células recobertas por anticorpos (citotoxicidade celular dependente de anticorpo - CCDA), produzem INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (CSF-GM). A produção de INF- $\gamma$  pode amplificar a resposta imunológica celular, aumentando a ativação de macrófagos e desviando a diferenciação de Th2 em Th1 (IMBODEN, 2000).

Uma citocina chave na rejeição é o INF- $\gamma$ , porque ativa os macrófagos, as células endoteliais e aumenta a expressão das moléculas de classe I e II do CPH (PÁDUA NETO, 1999).

Após a ativação dos linfócitos, ocorre a migração dos leucócitos para o tecido transplantado. Para que esta migração ocorra, é necessário que haja um aumento na expressão das moléculas de adesão na superfície dos leucócitos e das células endoteliais, o que facilita a diapedese dos leucócitos, que uma vez no tecido transplantado, iniciarão o processo de citotoxicidade e destruição do aloenxerto. As principais moléculas de adesão leucocitárias são LFA-1 (*leucocyte function-associated antigen-1*), VLA-4 (*very late activation antigen*) e L-selectina, enquanto que as moléculas de adesão vascular são ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), ICAM-2, VCAM-10 (*vascular cell adhesion molecule-10*) (PÁDUA NETO, 1999).

## 2. TIPOS DE REJEIÇÃO AOS ENXERTOS

Rejeição é um processo de destruição do órgão transplantado pelo hospedeiro que é iniciado e dirigido contra antígenos estranhos ou próprios do enxerto (REICHEL et al., 1997).

O termo “crise de rejeição” foi utilizado pela primeira vez por Hamburger et al. (1959) quando descreveram um paciente apresentando insuficiência renal aguda reversível após receber um rim de seu irmão gêmeo não homozigótico.

Com as melhorias desenvolvidas nas técnicas cirúrgicas, nas terapias contra bactérias, vírus e fungos, e na seleção de doadores e receptores, a origem imunológica passou a ser a principal causa precoce e tardia de perda de enxertos (GILKS et al., 1990).

### 2. 1. Rejeição Hiperaguda - RHA

A RHA ocorre rapidamente, freqüentemente dentro de minutos a horas após o restabelecimento do fluxo sangüíneo do órgão transplantado. O órgão torna-se cianótico, mosqueado, edemaciado e a sua função cessa. Histologicamente, a reação é caracterizada por deposição de anticorpos, lesão endotelial, necrose fibrinóide, proeminente infiltrado de leucócitos polimorfonucleares, formação de trombos plaquetários e escasso infiltrado linfocitário (**figuras 3 e 4**) (WILLIAMS et al., 1968; FORBES et al., 1982; STARZL et al., 1970; BUSCH et al., 1971).

Os dois tipos de anticorpos que podem induzir RHA são anticorpos IgG contra antígenos de classe I do Sistema HLA (ou CPH) e anticorpos IgM contra grupos sangüíneos ABO (MORLEY, 1994; PAUL et al., 1978; FRYER et al., 1994).

A formação de anticorpos anti-HLA pode ser induzida por transfusões sangüíneas, gravidez e transplante de órgãos, sendo que este último parece ter um maior efeito na sensibilização (SANFILIPPO et al., 1982).

Relatos de RHA associada a anticorpos contra antígenos endoteliais específicos e antígenos de classe II do Sistema HLA são menos freqüentes. Este tipo de rejeição é provocado por anticorpos humorais dirigidos contra aloantígenos do doador expressos nas células endoteliais (DEMIRHAN et al.; 1998). Teoricamente, a RHA pode ser prevenida pela realização de provas cruzadas (*crossmatch*) pré-transplante e de transplantes com compatibilidade no grupo sanguíneo ABO.

Apesar do desenvolvimento nas técnicas de provas cruzadas, este tipo de rejeição ainda ocorre em aproximadamente 0,1% a 1,0% dos transplantes de rim.

A patofisiologia exata da RHA ainda não foi elucidada. É provável que mecanismo mediado por célula, mais especificamente CCDA, esteja envolvido. Uma hipótese atual é que anticorpo específico contra células do endotélio vascular induza rejeição hiperaguda ou acelerada (AHERN et al., 1982; MOHANAKUMAR et al., 1981; JORDAN et al., 1988).

A RHA, embora relatada em transplantes renal e cardíaco, é um evento extremamente raro no transplante hepático, mesmo quando realizado com prova cruzada positiva (ADAMS, 1990).

## **2. 2. Rejeição Aguda – RA**

A RA continua a ser a causa mais comum de perda de aloenxerto em transplante, mesmo quando ocorre identidade completa entre o par doador e receptor nos antígenos do Sistema HLA, os chamados HLA-idênticos.

Woodruff (1952) notou que a RA ocorria mais comumente nas primeiras seis semanas após o transplante e, após este tempo, havia uma diminuição na sua incidência e gravidade. As alterações histopatológicas da RA são caracterizadas por um infiltrado agudo de células mononucleares, freqüentemente atingindo a região perivascular e provocando arterite (**figuras 3 e 4**). Estudos de imunohistoquímica têm mostrado que as células

mononucleares infiltrantes são heterogêneas e consistem de células T, macrófagos, células B e grandes linfócitos granulares. O padrão de infiltração celular pode variar de acordo com o tipo do órgão transplantado e no mesmo órgão, dependendo da região analisada (MORLEY, 1994).

Os mecanismos celulares envolvidos são bastante complexos e a interação entre os vários tipos de células ainda não está esclarecida. Porém, está claro que as células T CD4+ participam de modo importante na indução da RA (SABLINSKI et al., 1991).

Em humanos, a responsividade das células CD8+ a aloantígenos sem auxílio da célula CD4+ é muito limitada, sugerindo que um mecanismo celular dependente de CD4+ seja dominante (YAMASHITA et al., 1990). Porém, com a sensibilização podem ocorrer alterações qualitativas na resposta memória das células CD4+ e CD8+, sendo a maior alteração detectada nas células CD8+, que se tornam relativamente independentes do auxílio das células CD4+ e podem isoladamente efetuar a rejeição, tornando a terapia com anticorpo monoclonal anti-CD4 ou a paridade nos antígenos de classe II do Sistema HLA menos efetivos na prevenção da rejeição aguda (HALL, 1991).

As células T podem ser divididas em dois grupos funcionais de acordo com a capacidade de liberar citocinas e atrair macrófagos ativados para mediar a destruição tecidual (hipersensibilidade tardia – DTH) ou capacidade das células T de reconhecer especificamente uma célula alvo e provocar a sua lise (citotoxicidade direta mediada por célula). Recentes estudos têm sugerido que a resposta das células T citotóxicas predomina na rejeição aguda que ocorre no início do transplante, enquanto que a resposta tipo DHT parece predominar nas rejeições que ocorrem mais tardiamente (ODE-HAKIM et al., 1996).

Os anticorpos freqüentemente associados com rejeição aguda e que apresentam pior prognóstico são aqueles dirigidos contra os aloantígenos HLA de classe I (HALLORAN et al., 1992). O alvo destes anticorpos é o endotélio das artérias e arteríolas da microcirculação e do glomérulo (TRPKOV et al., 1996). Uma vez que o anticorpo é depositado, ocorre recrutamento de

leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, em virtude dos receptores Fc, e linfócitos granulares grandes, via CCDA. Alterações na permeabilidade da microvasculatura podem aumentar a afluência de células imunocompetentes para o interstício do enxerto. O processo de reparação vascular pode resultar em dano irreversível para os vasos do enxerto.

Durante o processo de rejeição renal, a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e de aloantígenos de classe II do HLA é induzida de novo nas células do túbulo renal pelas citocinas produzidas durante o processo inflamatório, tais como FNT- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e INFs (HILL et al., 1995; BISHOP et al., 1986; MOOLENAAR et al., 1991). A exposição das CAAs a estas citocinas aumenta a expressão de ligantes co-estimulatórios e favorece a ocorrência do segundo sinal necessário para a ativação das células T, aumentando assim a eficiência na apresentação do antígeno. Isto pode explicar porque os episódios de rejeição são mais comuns nos primeiros meses após o transplante e porque pacientes com função estável do enxerto podem subitamente apresentar rejeição aguda após uma infecção viral.

### 2. 3. Rejeição Crônica – RC

A RC ocorre de maneira lenta e inexorável num curso de meses a anos. O padrão deste tipo de rejeição pode variar conforme o tipo de órgão transplantado. A primeira descrição histopatológica da rejeição crônica em rim transplantado foi feita por Hume e cols. em 1955. Existe no rim uma tríade de alterações patológicas que incluem arteriolesclerose e nefrosclerose, relacionada à lesão endotelial, atrofia tubular e fibrose intersticial, acarretada pelo dano e reparo, e glomerulopatia (**figura 3**). As alterações vasculares são caracterizadas por espessamento da camada intimal, com progressiva oclusão do lúmen (**figura 4**). Este processo é mais evidente nas arteríolas arqueadas e interlobulares, porém alterações semelhantes podem ser observadas nas artérias renais principais e na hialinização das arteríolas aferentes e eferentes. Este espessamento é resultado da proliferação miointimal das células musculares lisas associada ao aumento do colágeno (HOSTETTER et al.,

1994, PAUL, 1999). A lesão pode ser precedida por acúmulo subendotelial de linfócitos e macrófagos (GOULDESBROUGH et al., 1994, PAUL, 1999).

Hamburger e cols. (1964) foram os primeiros a descrever a glomerulonefrite da rejeição, uma lesão característica da rejeição crônica, também chamada de nefropatia da rejeição. O glomérulo apresenta uma variedade de anormalidades, sendo as alterações mais precoces caracterizadas por alargamento do glomérulo, hiper celularidade glomerular com edema das células endoteliais e mesangiais, mesangiólise e infiltração mesangial de células mononucleares. Imunofluorescência mostra deposição segmentar inespecífica de IgM e fibrina, algumas vezes associada com traços de C3. Outras alterações glomerulares incluem colapso dos capilares glomerulares, hipertrofia glomerular, expansão da matriz mesangial com colapso parcial ou total dos capilares glomerulares ou glomeruloesclerose focal. O aparelho justaglomerular freqüentemente está hipertrofiado (HOSTETTER et al., 1994; PAUL, 1995).

O número exato de pacientes que retornam ao tratamento dialítico devido à RC é incerto. Estudos mostram que se excluirmos os pacientes que morreram com enxerto funcionando, o retorno ao tratamento dialítico foi acarretado pela RC em 50% a 80% dos pacientes (HOSTETTER et al., 1994; SCHWEITZER et al., 1991). Por outro lado, se incluirmos os óbitos com enxerto funcionando, esta taxa é, em média, 25% (HOSTETTER et al., 1994; PAUL, 1995; SCHWEITZER et al., 1991; MASSY et al., 1996).

Embora a RC seja uma causa freqüente de perda do enxerto, o processo envolvido na sua gênese não está bem esclarecido. Acredita-se que mecanismos dependentes e independentes de anticorpos possam estar implicados (TULLIUS et al., 1995). Provavelmente o evento se inicia com a lesão endotelial, que ativa e atrai linfócitos circulantes. Ativação e recrutamento de macrófagos parecem ser essenciais, pelos menos em modelos de RC em ratos.

O endotélio arterial é o alvo proeminente, com biópsias mostrando arteriopatia obliterativa. Dentro da hiperplasia intimal existem variados graus de proliferação da musculatura lisa e infiltrado inflamatório de macrófagos, células T, células plasmáticas e eosinófilos (DEMETRIS et al., 1989).

Acredita-se que este tipo de rejeição seja parcialmente mediado por anticorpos. Alguns estudos sugerem a CCDA como mecanismo efetor, combinando mecanismo celular e humoral na resposta imune (THOMAS et al., 1976; THOMAS et al., 1989).

Gibbs e cols. (1993) demonstraram que as moléculas de adesão ICAM-1 estavam expressas nas células tubulares, no endotélio glomerular e, possivelmente, nos capilares intertubulares em cinco das dez biópsias renais com RC, enquanto que VCAM-1 foi induzida nos túbulos renais e endotélio glomerular em dois enxertos.

Hancock e cols. (1993) sugerem que as moléculas ICAM-1 podem determinar infiltração mononuclear e localização da RC em ratos.

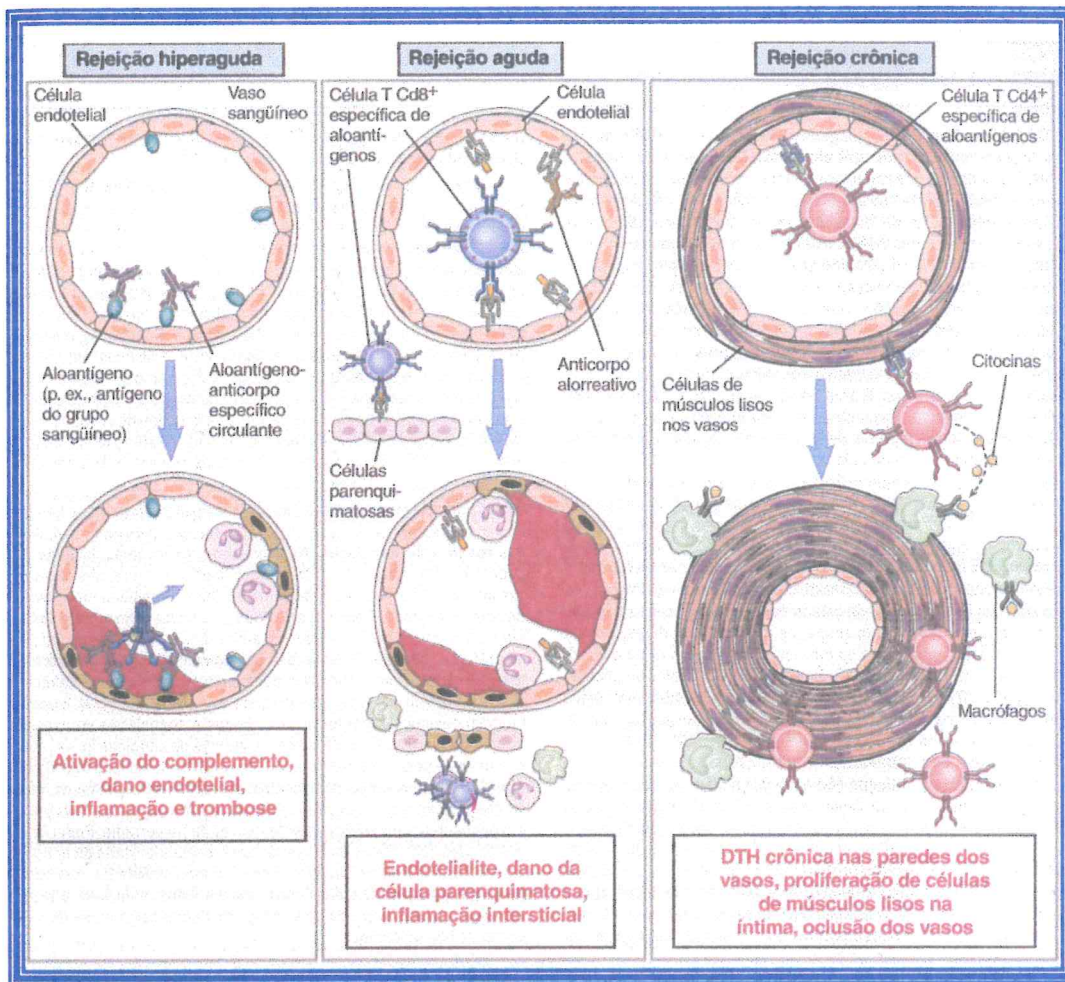
Um dos fatores de risco mais importantes relacionados à RC é a frequência e gravidade de episódios de rejeição aguda (TESI et al., 1993; BASADONNA et al., 1993). Duas hipóteses têm sido propostas para explicar este fato. Primeiramente, episódios de RA permaneceriam latentes, apesar do tratamento com imunossupressores, levando a dano e cicatriz do tecido renal. Estudos mostraram que pacientes com RA que foram comprovadamente tratados com sucesso apresentaram excelente sobrevida do enxerto a longo-prazo (TESI et al., 1993; LAND et al., 1991). Biópsias de enxertos renais realizadas de rotina mostraram infiltrado focal de células inflamatórias, principalmente de células T CD4+, que poderiam representar uma subpopulação de células Th1 (RUSH et al., 1994; SOLEZ et al., 1993). Estas células Th1 seriam responsáveis pela RA, que permaneceria localizada devido à inibição da geração e ativação de novas células T pela IL-4 e IL-10 liberadas pelas células Th2. Episódios subclínicos e repetidos de RA acarretariam lesão progressiva e crônica do tecido renal (LOWRY et al., 1993).

Outra hipótese, não mutuamente exclusiva, é que mecanismos regulatórios da resposta imune, responsáveis por prevenir a RA, teriam um papel importante no desencadeamento da RC. A inibição das células Th1 pelos imunossupressores favorece a proliferação das células Th2, responsáveis pela resposta das células B e formação de anticorpos. Desta forma, a RC seria uma forma de lesão predominantemente mediada por anticorpo.

Resumindo, as lesões vasculares da RC poderiam resultar de episódios repetidos de RA mediados por Th1 ou lesão induzida por anticorpo e mediada por Th2 contra antígenos localizados na parede dos vasos do órgão transplantado, especialmente no endotélio (PAUL et al., 1985).

Diversos mediadores, incluindo citocinas pró-inflamatórias, enzimas e fatores de crescimento, tais como fator de crescimento e transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), FNT- $\alpha$ , angiotensina II e endotelina parecem envolvidos nos vários estágios da resposta inflamatória e restauração teciduais. Estes mediadores são sintetizados e secretados pelas células inflamatórias que invadem o tecido e pelas células parenquimatosas ativadas do enxerto. TGF- $\beta$  é uma citocina multifuncional que tem um papel central na formação e degradação da matriz extracelular e seu efeito é, geralmente, promover o acúmulo de matriz extracelular. A expressão de mRNA do TGF- $\beta$  é aumentada em rins transplantados com nefropatia crônica (PAUL, 1999).

No coração, a lesão patológica predominante é uma arteriopatia agressiva, que acomete preferencialmente a circulação distal. No pulmão, uma forma semelhante de falência acelerada de etiologia desconhecida é chamada de bronquiolite obliterante. No fígado, embora a rejeição nos primeiros meses seja relativamente incomum, lesão gradual dos ductos biliares pode ocorrer sem evidência clínica de lesão inicial, a qual é chamada de "*vanishing bile duct syndrome*". Da mesma forma, RC de pâncreas total ou segmentar transplantado tem sido descrita com quadro histológico semelhante aos demais órgãos (BURDICK, 1991; TULLIUS et al., 1995).



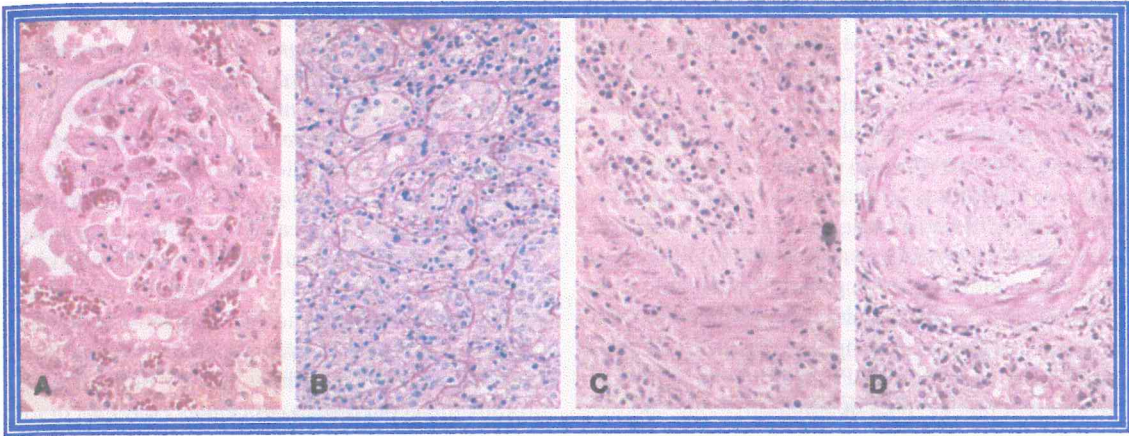
**Figura 3.** Mecanismos imunes da rejeição de enxertos.

**A** – Na rejeição hiperaguda, os anticorpos reativos pré-formados no endotélio vascular ativam o complemento e desencadeiam uma rápida trombose intravascular e necrose da parede do vaso.

**B** – Na rejeição celular aguda, os linfócitos T CD8+ reativos com os aloantígenos nas células endoteliais e nas células parenquimatosas medeiam o dano a esses tipos celulares. Os anticorpos alorreativos formados depois da incorporação podem também contribuir para a lesão vascular.

**C** – Na rejeição crônica com arteriosclerose do enxerto, a lesão da parede do vaso induz proliferação de células musculares lisas na íntima e oclusão luminal. A lesão pode ser causada por uma reação de hipersensibilidade tardia (DHT) aos aloantígenos contidos na parede dos vasos.

(ABBAS et al., 2002d)



**Figura 4.** Histopatologia das diferentes formas de rejeição do enxerto.

**A** – Rejeição hiperaguda de um enxerto renal com lesão endotelial, trombos de plaquetas e de trombina, e início de infiltração de neutrófilos em um glomérulo.

**B** – Rejeição aguda de um rim com células inflamatórias no interstício e entre as células epiteliais dos túbulos.

**C** – Rejeição aguda de uma aloenxerto renal com reação inflamatória destrutiva da camada endotelial de uma artéria.

**D** - Destruição de um aloenxerto renal com arteriosclerose do enxerto. O lúmen vascular está substituído por um acúmulo de células de músculo liso e de tecido conjuntivo na íntima dos vasos.

(ABBAS et al., 2002d).

### 3. DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS

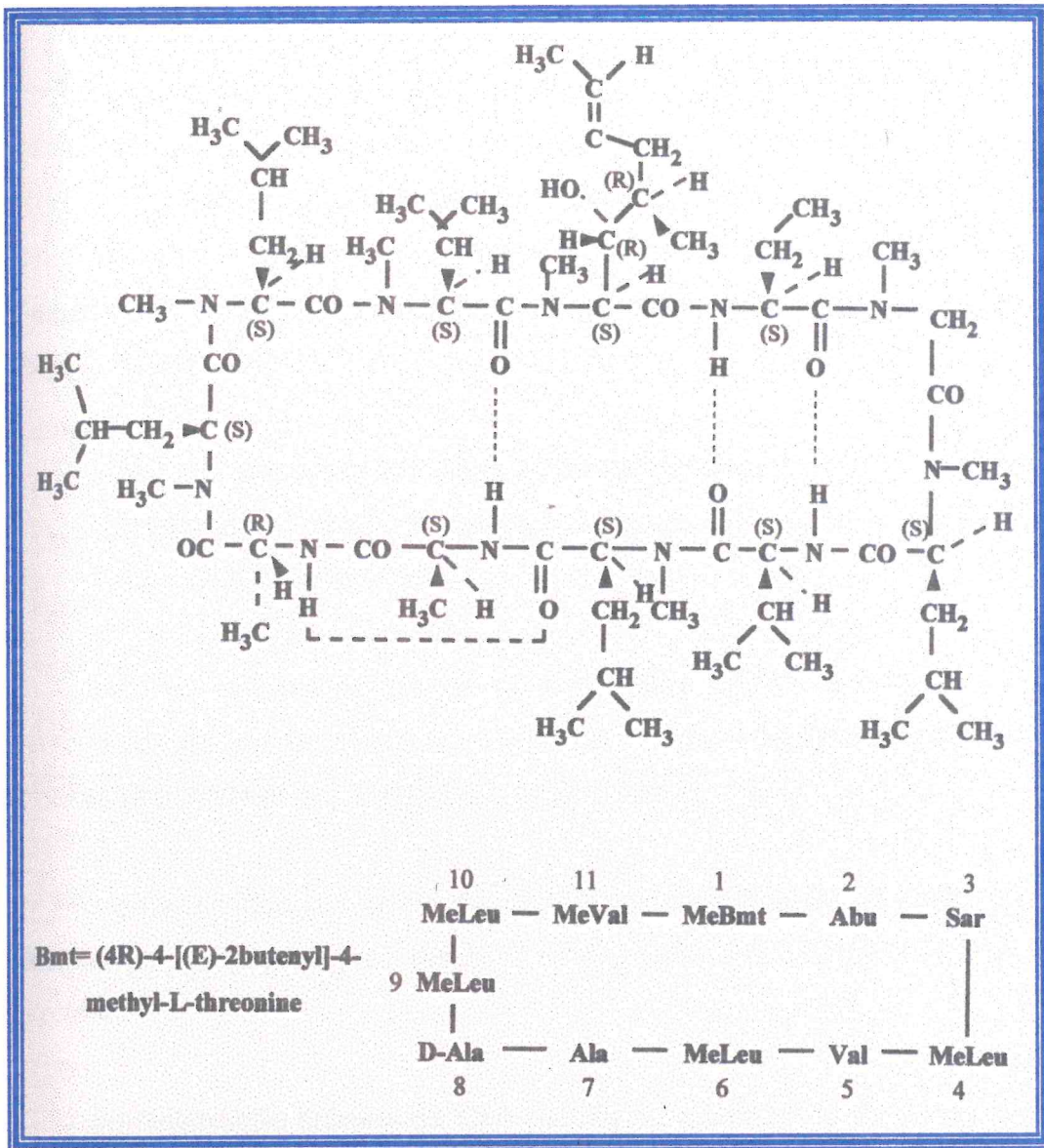
#### 3. 1. CICLOSPORINA A

##### a) Química

A CsA é um undecapeptídeo cíclico hidrofóbico isolado dos fungos *Tolyocladium inflatum* Gams e *Cylindrocarpum lucidum* Booth, com peso molecular de 1203 Daltons (COHEN et al. 1984). A **figura 5** mostra a estrutura química da CsA (PETCHER et al., 1976). É um peptídeo neutro, rico em aminoácidos hidrofóbicos, insolúvel em água e *n*-hexano, porém solúvel em lipídeos e outros solventes orgânicos (BOREL, 1994). A atividade imunossupressora parece estar relacionada aos aminoácidos hidrofílicos nas posições 11, 1, 2 e 3 (LORBER, 1991).



Figura 5 Estrutura química da ciclosporina A, um peptídeo cíclico hidrofóbico formado por 11 aminoácidos. (PETCHER et al., 1976)



**Figura 5.** Estrutura química da ciclosporina A. A ciclosporina A é um peptídeo cíclico hidrofóbico formado por 11 aminoácidos, isolado do fungo *Tolypocladium inflatum* Gams, cuja estrutura foi elucidada por Petcher e cols. em 1975 (PETCHER et al., 1976).

## b) Farmacocinética

A CsA é absorvida no intestino delgado, principalmente no íleo distal. Diversos fatores afetam a absorção, como o aumento da motilidade gastrointestinal, reduzido esvaziamento gástrico, insuficiência pancreática exócrina, colestase, esteatorréia e terapia com colestiramina. A administração de CsA concomitante com alimentos parece aumentar a absorção da droga (LORBER, 1991).

O nível de absorção da CsA após administração oral é altamente variável (KAHAN et al., 1982). A biodisponibilidade varia de 20% a 50%, com média de 34% (WOOD et al., 1983).

O pico no sangue total ou no plasma ocorre entre 1 e 8 horas após a ingestão da droga, em geral entre 3 e 4 horas. A meia vida terminal varia de 25 a 30 horas (KEOWN et al., 1981;1982; COHEN et al., 1984).

Noventa e cinco por cento da CsA plasmática é ligada à proteína, em grande parte às lipoproteínas (WOOD et al., 1983; NIEDERBERGER et al., 1983)

A administração crônica da CsA resulta no acúmulo da droga na pele e gordura, em particular, e níveis elevados também ocorrem no fígado, rins, órgãos linfóides e glândulas endócrinas (KEOWN et al., 1982; SMITH et al., 1983; ATKINSON et al., 1983a).

A CsA atravessa a placenta e pode estar presente no leite materno (GIRAL et al., 1994).

Uma nova preparação da CsA para uso oral na forma de um pré-concentrado de microemulsão foi desenvolvida. Esta nova formulação em contato com a solução aquosa dos fluidos gastrintestinais forma imediatamente uma microemulsão aumentando a absorção, melhorando a biodisponibilidade da droga e reduzindo a variabilidade na farmacocinética intra e interindividual.

Estudos têm demonstrado redução na incidência de rejeição aguda e na toxicidade com esta nova formulação (FREI et al., 1994; HOLT et al., 1994; MUELLER et al., 1994).

A CsA é metabolizada pelo fígado, através do sistema P450-IIIa citocromo oxidase, e mais de 80% dos metabólitos são excretados pela bile nas fezes (WOOD et al., 1983, LA TOUR DU PIN, 1989). Recirculação enterohepática tem sido relatada (KAHAN et al., 1983).

A excreção urinária após uma única dose é de 0,1% da droga nativa e 10% dos metabólitos (WOOD et al., 1983). Disfunção hepatobiliar diminui a eliminação da droga de maneira importante, enquanto que a insuficiência renal não altera os níveis sanguíneos desta droga (KEOWN et al., 1982).

O "clearance" da CsA em crianças foi 40% mais rápido do que em adultos, enquanto que nos idosos o metabolismo é mais lento (YEE et al., 1986).

Drogas que inibem o sistema do citocromo P-450 podem aumentar os níveis sanguíneos da CsA, como cetoconazole, eritromicina, claritromicina, contraceptivos orais, bloqueadores dos canais de cálcio, metilprednisolona. Por outro lado, drogas que induzem o sistema P-450 podem causar redução nos níveis sanguíneos da CsA, como rifampicina, fenobarbital, carbamazepina, isoniazida (WADHWA et al., 1987; LA TOUR DU PIN, 1989; YEE, MCGUIRE, 1990; LORBER, 1991).

Devido à marcada variabilidade na absorção, medida dos níveis sanguíneos tem sido utilizada para monitorar a adequação do tratamento e evitar a toxicidade da droga. A CsA pode ser dosada no sangue total ou no soro utilizando cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e radioimunoensaio (RIA). A HPLC mede a droga mãe enquanto que o RIA avalia a droga mãe e seus metabólitos, resultando em níveis que podem ser duas a três vezes mais elevados (COHEN et al., 1984; KAHAN, 1989). Embora existam fortes evidências de que os efeitos predominantes da CsA sejam

determinados pela droga-mãe, alguns dados sugerem que os metabólitos maiores, como o AM1, anteriormente chamado de metabólito M-17, um composto monohidroxilado na posição 1, apresenta 10% da atividade imunossupressora e grande potencial nefrotóxico. A contribuição do AM1 é provavelmente significativa somente em casos onde o metabolismo da CsA é alterado pela concomitante administração de diltiazem ou cetoconazole (KAHAN, 1993).

### c) Mecanismo de ação

A CsA é uma droga antifúngica cuja atividade imunossupressora foi demonstrada pela primeira vez por Borel, através de experimentos *in vitro* e *in vivo* (BOREL et al., 1976a; 1977).

A ação predominante da CsA é dirigida contra os linfócitos Th (BOREL et al., 1976b; BOREL et al., 1981; BURKHARDT; GUGGENHEIM, 1979; GORDON; SINGER, 1979). Este efeito nas células Th previne a produção de interleucinas, especialmente a transcrição do gene da IL-2 (LARSSON, 1980; PALACIOS; MOLLER, 1981) e da cadeia leve (CD25, p55) do receptor da IL-2 (HESS et al., 1983, KAHAN, 1989). Assim, a CsA age exclusivamente sobre os linfócitos T ativados, especialmente os linfócitos T CD4+.

A CsA entra na célula por um mecanismo não dependente de energia, através da dissolução na bicamada de lipídeo da membrana plasmática (LORBER, 1991). No interior da célula, a CsA se liga a uma família de imunofilinas chamada de ciclofilina (CFL). Todos os membros da família da imunofilina têm atividade rotamase, isto é são peptidil-prolil-cis-trans isomerases, atividade esta que é inibida pela CsA. A ciclofilina A (CFL-A) é uma proteína de 18-kD que exibe a mais alta e específica atividade e é mais sensível à inibição pela CsA. Os imunossupressores derivados dos macrolídeos, entretanto, não inibem esta atividade rotamase. As CFL são abundantes nos tecidos linfóides e não linfóides.

A CFL-A e a CFL-B são encontradas no citoplasma e no núcleo, não havendo nenhuma específica associação com organelas intracelulares. A CFL-

B e a CFL-D possuem um sinal de localização na membrana e são encontradas na fração do retículo endoplasmático. A relativa abundância e a alta conservação das CFLs sugerem um importante papel destas proteínas na função celular normal (RYFFEL, 1998).

O complexo CsA-CFL liga-se e inibe a calcineurina, uma serina/treonina fosfatase ativada pelo  $Ca^{+2}$ . A calcineurina é ativada nas células T quando os níveis de  $Ca^{+2}$  intracelulares sobem após a ligação ao TCR; na ativação ela desfosforila o fator de transcrição NF-AT no citoplasma, permitindo que ele migre para o núcleo, onde forma um complexo com um segundo fator de transcrição, AP-1, que induz a transcrição de vários genes, incluindo IL-2, CD-40 ligante e ligante Fas. O complexo CsA-CFL liga-se à calcineurina e impede a ativação do NF-AT, impedindo a sua migração para o núcleo e inibindo a síntese de IL-2 (**figura 6**). O complexo também se ligaria ao NF- $\kappa$ B, fator que codifica a síntese das cadeias leves das imunoglobulinas, impedindo a sua ligação ao promotor da IL-2 (BAUMANN; BOREL, 1992; JANEWAY Jr et al., 2002).

A inibição da expressão da IL-2 nas células T impede os linfócitos Th de organizar uma resposta contra os antígenos estranhos e, por conseguinte, a expansão clonal de linfócitos T citotóxicos (Tc) a partir de seus precursores, como mostra a **figura 7** (BAUMANN; BOREL, 1992; JANEWAY Jr et al., 2002).

A CsA inibe a transdução de sinal da linfocina cálcio-dependente, impedindo a passagem da fase **G0 para a fase G1** do ciclo celular (KAHAN, 1993).

Esta droga não age sobre a população de linfócitos T memória e não acarreta destruição linfocitária, sendo sua atividade imunossupressora totalmente e rapidamente reversível com a interrupção do tratamento.

Embora se acredite que a CsA não iniba a função dos linfócitos B (BOREL et al., 1977; GORDON; SINGER, 1979), existem atualmente algumas evidências do contrário, tanto em homens (PAAVONEN; HAYRY, 1980;

PISETSKY; HAUGHTON, 1986) quanto em animais (BOUWER; HINRICHS, 1983).

Existem evidências que a CsA pode inibir a produção de IL-1 pelos macrófagos, mas não a resposta a esta interleucina (THOMSON et al., 1983). Da mesma forma, a produção de IL-3 e de INF- $\gamma$  pode ser inibida pela CsA (KALMAN; KLIMPEL, 1983; KAHAN, 1989).

A CsA não parece influenciar a resposta inflamatória de granulação *in vivo*, fato compatível com a resposta de cicatrização normal da ferida cirúrgica observada nos pacientes submetidos a tratamento com esta droga (NEMLANDER et al., 1983).

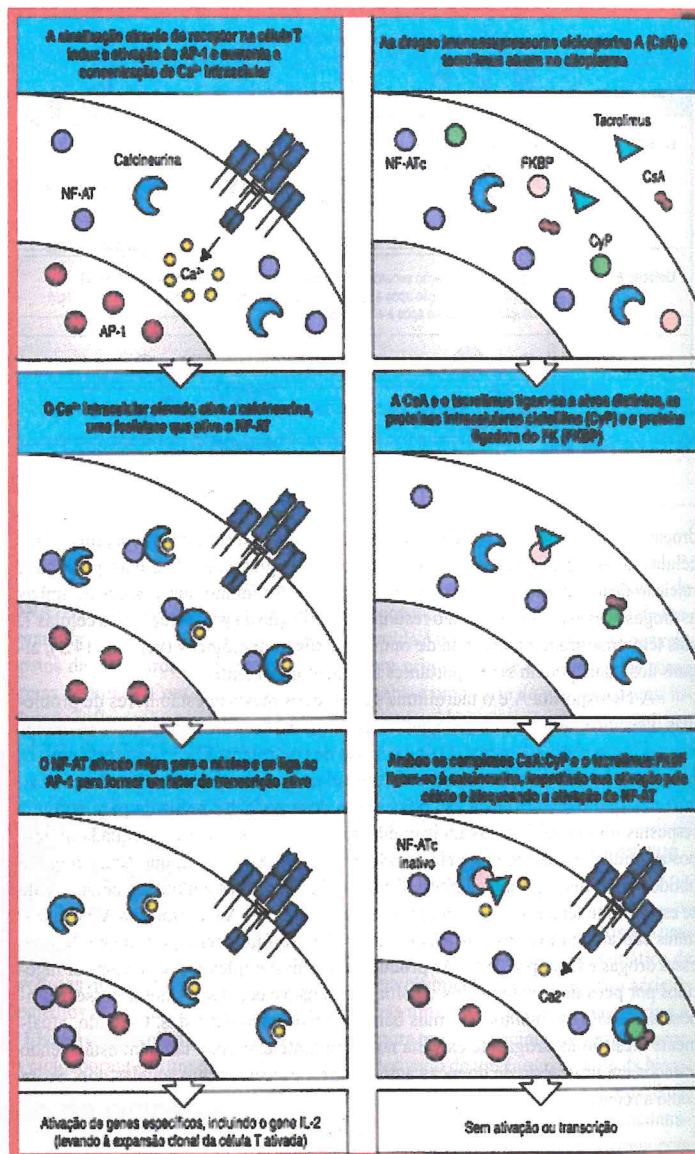
Recentemente foi demonstrado que a CsA bloqueia a via de sinalização da JNK e da p38 desencadeadas pelo reconhecimento antigênico pelas células T (MATSUDA; KOYASU, 2000).



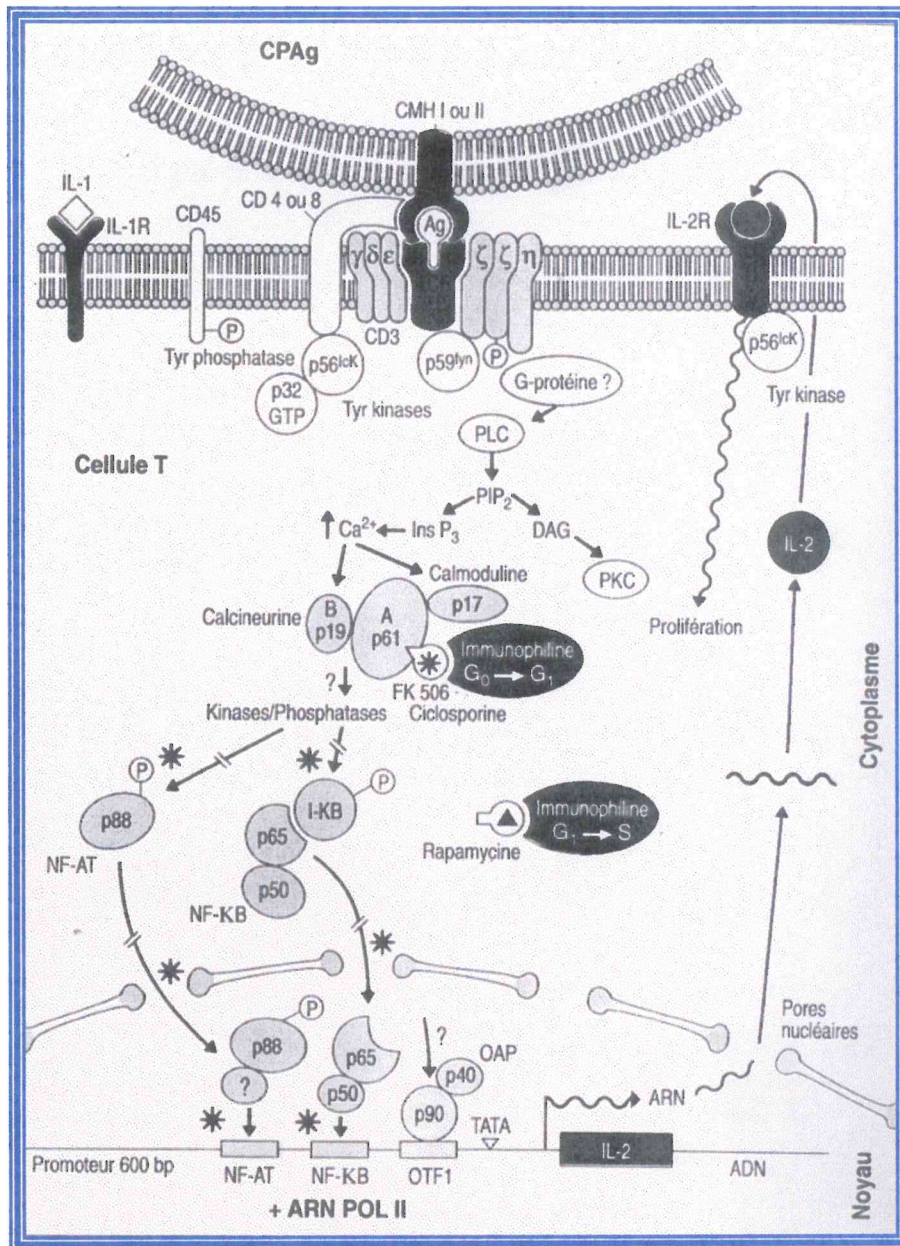
(JANEWAY Jr et al., 2002)

**Figura 6.** Mecanismo de ação da ciclosporina A e tacrolimus.

A ciclosporina A (CsA) e o tacrolimus (TRL) inibem a ativação da célula T, interferindo com a serina/treonina fosfatase específica, calcineurina. A sinalização pelas tirosina quinases associadas ao receptor das células T leva à ativação e ao aumento da síntese do fator de transcrição AP-1, bem como ao aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  no citoplasma (quadros à esquerda). O  $Ca^{2+}$  liga-se à calcineurina, ativando-a para defosforilar a forma citoplasmática do fator nuclear das células T ativadas (NFATc). Uma vez defosforilado, o NFATc ativo migra ao núcleo para formar um complexo com a AP-1 e proteínas associadas; o



complexo NFATc:AP-1 pode então induzir a transcrição dos genes necessários para a ativação das células T, incluindo o gene IL-2. Quando a CsA ou o TRL estão presentes, formam complexos com seus alvos imunofilinas, respectivamente a ciclofilina (CyP) e a proteína ligadora do FK (FKBP) (quadros à direita). O complexo da CyA-CsA pode se ligar à calcineurina, bloqueando sua capacidade de ativar o NFATc. O complexo do FKBP-TRL liga-se à calcineurina no mesmo sítio, bloqueando também sua atividade (JANEWAY Jr et al., 2002).



**Figura 7. Mecanismo de ação da ciclosporina A.**

A CsA ligada à sua imunofilina interfere com a função de moléculas intracelulares que transmitem os sinais, dependentes de  $Ca^{2+}$ , entre o TCR e a ativação dos genes da IL-2 no núcleo. A regulação da transcrição do gene da IL-2 é modulada pela associação de fatores de transcrição (NF-AT, NF- $\kappa$ B, OTF-1) interagindo com seus sítios específicos de reconhecimento sobre o promotor do gene da IL-2. Os complexos DNA-proteínas com RNA polimerase II (ARN pol II), promovem a transcrição do gene da IL-2, induzida pelo antígeno. Os sítios potenciais de intervenção do complexo pentamérico (calcineurina [p19/p61], calmodulina, imunofilina, CsA)

acarretando modificação pos-transcrição dos fatores de transcrição que interferem com sua translocação para o interior do núcleo estão indicados (\*). A CsA e o FK-506 interferem com a transição da fase G0 para G1 do ciclo celular.

CPAg: célula apresentadora de antígeno; Ag: antígeno;  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$ : subunidades do complexo CD3; IL-2: interleucina 2; TCR: receptor células T; CsA: ciclosporina A (BAUMMAN; BOREL, 1992).

#### d) Toxicidade

A nefrotoxicidade é a mais freqüente e importante complicação associada ao uso da CsA. Oligúria transitória durando vários dias, caracterizada por retenção renal de sódio e baixa osmolaridade urinária, foi relatada em receptores de transplante de coração (DEVINENI et al., 1983; EGEL et al., 1983), medula óssea (ATKINSON et al., 1983b) e fígado (POWELL-JACKSON et al., 1983) após o início do tratamento. Embora disfunção renal aguda irreversível possa ocorrer imediatamente após o transplante em pacientes recebendo CsA, esta manifestação é incomum. Ao contrário, piora crônica e reversível da função renal tem sido mais freqüente entre receptores de transplante de rim (EUROPEAN MULTICENTRE TRIAL GROUP, 1983; LAUPACIS, 1983), de coração (OYER et al., 1983; WALLWORK et al., 1983; HUNT, 1983), de pâncreas (TRAEGER et al., 1983), de medula óssea (HOWS et al., 1983) e de fígado (KLINTMALM et al., 1981) tratados com CsA em longo prazo. O aumento da creatinina sérica geralmente tem sido modesto, ocorrendo dentro de poucas semanas após o início do tratamento e não é progressivo (FLECHNER et al., 1983; NAJARIAN et al., 1983). Elevação da creatinina sérica também tem sido relatada em pacientes portadores de doenças auto-imunes, como uveíte e artrite reumatóide, tratados com CsA (BERG et al., 1986; PALESTINE et al., 1986).

A redução na filtração glomerular é acarretada pelo aumento da resistência vascular renal, principalmente na arteríola aferente, reduzindo o fluxo plasmático renal de modo dose-dependente. Repetidos episódios de hipoperfusão renal poderiam levar às alterações estruturais dos vasos pré-glomerulares e esclerose glomerular. Os hormônios implicados neste aumento do tônus vascular da arteríola aferente são o sistema renina angiotensina, o sistema nervoso simpático e a endotelina (REMUZZI; PERICO, 1995; MCNALLY; FEEHALLY, 1992; LEE, 1997). A CsA também tem capacidade de influenciar diretamente o coeficiente de filtração glomerular (Kf), alterando a contratilidade das células mensangiais e/ou a condutividade hidráulica. Esta redução do Kf reduziria o filtração glomerular (MCNALLY; FEEHALLY, 1992; LEE, 1997).

Nefropatia crônica induzida pela CsA é caracterizada primariamente por fibrose intersticial em faixa, atrofia tubular e anormalidades arteriolares, consistindo de necrose das células musculares lisas e depósitos nodulares de proteínas nas paredes das arteríolas aferentes ou hialinose intimal arteriolar. Estes depósitos substituem os miócitos necróticos e consistem de imunoglobulinas e componentes do sistema complemento (MCNALLY; FEEHALLY, 1992; NEILD et al., 1986; MIHATSCH et al., 1995). Estas lesões são inespecíficas e difíceis de serem distinguidas da RC ou da hialinose arteriolar hipertensiva ou diabética, particularmente nas fases terminais da doença (REMUZZI; PERICO, 1995). A RC afeta predominantemente as artérias e a presença de um infiltrado mononuclear intersticial difuso com edema e, às vezes, hemorragia ou arterite, auxilia no diagnóstico. A toxicidade pela CsA afeta predominantemente as arteríolas e a lesão precoce é caracterizada por vacuolização das células endoteliais e musculares lisas seguida de necrose e formação dos depósitos nodulares de proteínas ao redor da parede vascular (NEILD et al., 1986; MIHATSCH et al., 1995).

A lesão tubular proximal, caracterizada por edema, vacuolização e necrose, é um evento precoce na terapia com CsA (MCNALLY; FEEHALLY, 1992).

Os dois componentes que envolvem a patogênese da fibrose tubulointersticial provavelmente são a proliferação celular e a infiltração de macrófagos. A osteopontina é um fator quimiotático e adesivo de macrófagos e a sua expressão estava aumentada nas áreas com fibrose de rins de ratos tratados com CsA. Os macrófagos secretariam fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e TGF- $\beta$ , citocinas responsáveis pela proliferação de células e da matriz celular (YOUNG et al., 1995).

Hipertensão arterial requerendo terapia anti-hipertensiva desenvolveu nas primeiras semanas após o transplante em 60% a 95% dos receptores de transplante cardíaco (OYER et al., 1983; HUNT, 1983; THOMPSON et al., 1983). O estudo multicêntrico realizado no Canadá mostrou um aumento

significativo na freqüência de hipertensão arterial nos pacientes tratados com CsA (LAUPACIS, 1983). A causa da hipertensão permanece desconhecida. Thompson e cols. (1983) observaram uma correlação positiva entre a pressão arterial sistólica e diastólica média e os níveis de creatinina sérica, sugerindo uma inter-relação entre a hipertensão arterial e a nefrotoxicidade. O mecanismo do aumento da pressão arterial pode estar relacionado ao aumento da reabsorção tubular proximal de sódio, evento que é exacerbado pela depleção de volume, estimulação do sistema nervoso simpático pelos rins nativos e vasoconstricção periférica (KAHAN, 1993).

Interrupção da droga (THORP et al., 1983)

A CsA produz alterações nos túbulos renais, sendo os mais freqüentes a hipercalemia e a hiperuricemia. Os níveis médios de potássio plasmático são maiores nos receptores renais tratados com CsA e alguns pacientes desenvolvem, ocasionalmente, uma franca hipercalemia (SHEILL et al., 1983; ADU et al., 1983; FOLEY et al., 1983). Disfunção tubular intrínseca tem sido proposta para explicar estes distúrbios. O reduzido *clearance* de urato causado pela toxicidade tubular direta da CsA é exacerbado pela aumentada reabsorção tubular de urato secundária à vasculopatia induzida pela droga (KAHAN, 1993).

Hiperlipidemia é caracterizada por moderado aumento do colesterol total e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), mas não das lipoproteínas de alta densidade (HDL), e dos triglicerídeos. Estas alterações freqüentemente requerem tratamento farmacológico, não sendo suficiente apenas o aconselhamento dietético (KAHAN, 1993).

Interrupção da droga (THORP et al., 2000)

A CsA pode ter efeitos hepatotóxicos (CALNE et al., 1978; STARZL et al., 1981). Um transitório aumento nas bilirrubinas séricas, geralmente no primeiro mês após o transplante, ocorreu em até 20% dos receptores de transplante renal (EUROPEAN MULTICENTRE TRIAL GROUP, 1983). Elevação das transaminases é menos freqüente que a hiperbilirrubinemia e ambas respondem à redução na dose da CsA.

Persistente elevação da fosfatase alcalina sérica, que não regride com a redução na dose da CsA, tem sido observada em receptores de transplante renal (EUROPEAN MULTICENTRE TRIAL GROUP, 1983; RODGER et al.,

1983; LOERTSCHER et al., 1983). Este aumento ocorreu nas primeiras três semanas ou após três a seis meses de transplante. Entretanto, determinações das isoenzimas sugerem que a origem seja óssea, representando um processo de reparo ósseo em pacientes com osteodistrofia renal pré-existente.

Hiperplasia gengival ocorreu em 2% dos receptores de medula óssea e em 8% a 26% dos receptores renais (EUROPEAN MULTICENTRE TRIAL GROUP, 1983; LAUPACIS et al., 1983; BEVERIDGE et al., 1983). Esta anormalidade é mais freqüente em crianças e a resolução ocorre após a interrupção da droga (THORP et al., 2000).

Tremores transitórios e parestesias são comuns e têm sido relatados em 10% a 39% e 10%, respectivamente, regredindo com a redução na dose da medicação (EUROPEAN MULTICENTRE TRIAL GROUP, 1983; LAUPACIS et al., 1983). Outras alterações neurológicas caracterizadas por uma síndrome semelhante à disfunção cerebelar, alteração da função motora da medula espinhal e confusão mental têm sido descritas em pacientes submetidos a transplante alogênico de medula óssea (ATKINSON et al., 1984).

Hirsutismo é um efeito freqüente, ocorrendo em 30% a 44% dos pacientes tratados com CsA (EUROPEAN MULTICENTRE TRIAL GROUP, 1983; LAUPACIS et al., 1983). Ele aparece dentro de duas semanas a um mês após o transplante e envolve predominantemente a face, os braços, sobrelhas e dorso. O hirsutismo melhora, em média, quatro meses após a interrupção da droga (THORP et al., 2000)

Transitórios sintomas gastrintestinais são também comuns e ocorrem nas primeiras semanas de tratamento. Estes sintomas incluem anorexia, náuseas e íleo paralítico (EUROPEAN MULTICENTRE TRIAL GROUP, 1983; HARDESTY et al., 1983).

Síndrome hemolítico-urêmica e trombose vascular renal têm sido relatadas (THOMPSON et al., 1983; LEITHNER et al., 1983).

### 3. 2. MICOFENOLATO MOFETIL

#### a) Química

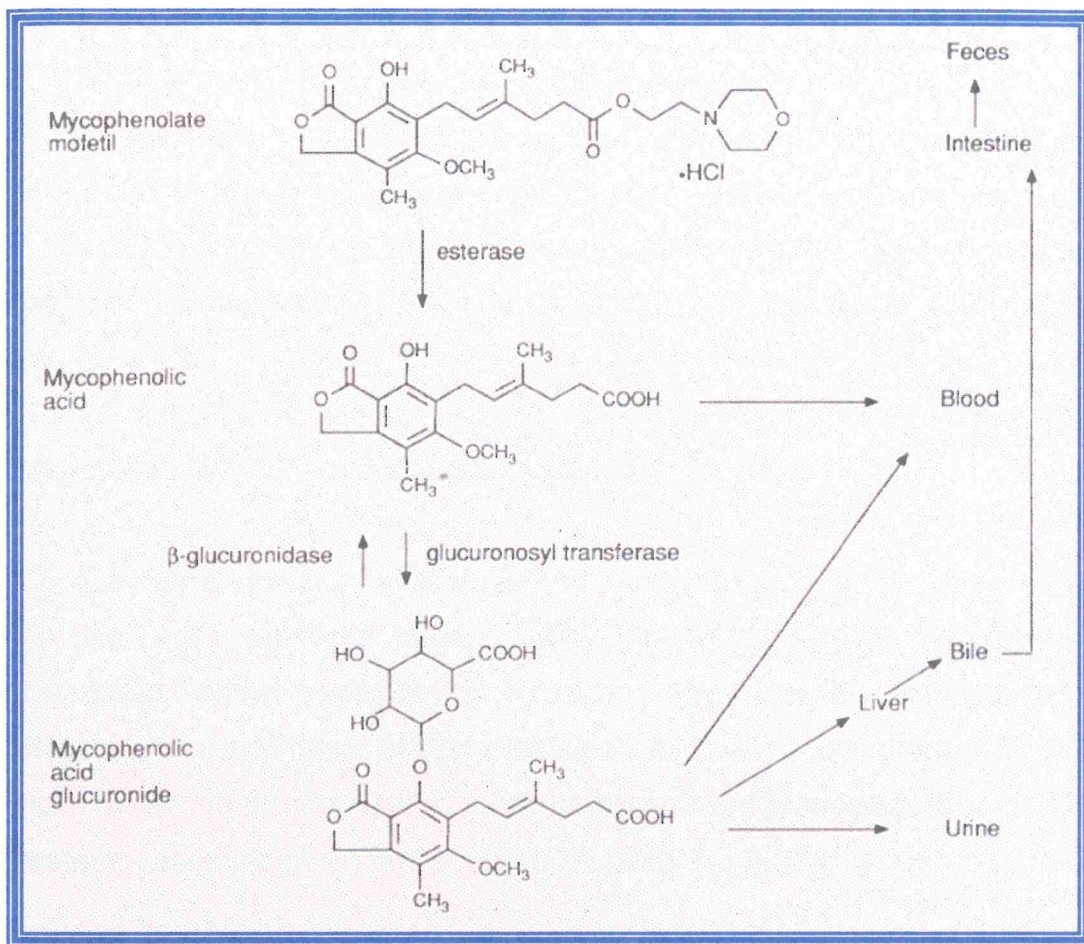
O ácido micofenólico (MPA) foi isolado por Gosio em 1896 a partir de cultura de caldo de cereal contendo *Penicillium* e foi demonstrado que esta droga apresentava atividade antibacteriana. Somente em 1960 o seu efeito inibitório sobre a enzima inosina 5'-monofosfato desidrogenase foi demonstrado e sua utilização como droga imunossupressora começou a ser investigada em 1982 (ALLISON, 2000).

O micofenolato mofetil (MMF) é uma pró-droga do MPA obtido a partir da fermentação de várias espécies de fungos *Penicillium*, especialmente *Penicillium glaucum* (CIANCIO et al., 1998).

O MMF é o éster 2-morfolinoetil do ácido micofenólico (MPA), cujo nome químico é 2-morfolinoetil(E)-6-(1,3-dihidro-4-hidroxi-6-metoxi-7-metoxi-3-oxo-5-isobenzofuranil)-4-metil-4-hexenoato. Tem uma fórmula empírica de  $C_{23}H_{31}NO_7$  e peso molecular de 433,50 kD (BULLINGHAM et al., 1996; CELLCEPT, [199?]).

O MMF apresenta uma solubilidade em água de 43g/ml a um pH de 7,4. Ele é livremente solúvel em acetona e metanol e pouco solúvel em etanol (CELLCEPT, [199?]).

A **figura 8** mostra a estrutura química, as vias de conversão e eliminação dos metabólitos do MMF (ALLISON; EUGUI, 2000).



**Figura 8.** Estrutura química do micofenolato mofetil (MMF).

MMF e ácido micofenólico e seus glicuronídeos e sítios de conversão e excreção. (ALLISON; EUGUI, 2000)

## **b) Farmacocinética**

O MMF é absorvido rápida e completamente após a administração oral e sofre metabolismo pré-sistêmico completo para MPA, o metabólito ativo, propiciando níveis sanguíneos proporcionais à dose de MMF administrada. A biodisponibilidade média absoluta de uma dose oral é de 94% em relação à dose endovenosa, com meia vida de 17 horas (BULLINGHAM et al., 1996).

O principal metabólito ativo do MPA é o glucoronídeo fenólico, MPA glucoronídeo (MPAG), que é farmacologicamente inativo.

Oitenta e sete por cento do MPAG é excretado pela urina e o restante pela bile. Após excreção biliar, o MPAG pode sofrer reglucoronidação e recirculação êntero-hepática, provocando um aumento secundário na concentração do MPA, 6 a 12 horas após a dose. O comprometimento da função renal não produz efeitos consistentes sobre a farmacocinética do MPA; entretanto, acúmulo de MPAG ocorre (CELLCEPT, [199?]).

Cerca de 97% do MPA, e 82% do MPAG, está ligado à albumina plasmática (CELLCEPT, [199?]).

O MPA parece não ser removido pela hemodiálise (CELLCEPT, [199?]).

## **c) Mecanismo de Ação**

Os linfócitos proliferam por divisão mitótica, o que requer a síntese de ácido desoxiribonucléico (DNA) para as células recém criadas. A construção do DNA por sua vez necessita da síntese de nucleotídeos purinas e pirimidinas. O nucleotídeo purina pode ser desenvolvido através de duas vias principais, a via “de novo” e duas vias de “recuperação” distintas (CIANCIO et al., 1998, ALLISON; EUGUI, 2000).

A via “de novo” reúne os nucleotídeos purina de moléculas menores que constróem seus componentes, como mostrado na **figura 9** (ALLISON; EUGUI, 2000).

Uma via de “recuperação” utiliza as bases hipoxantina, guanina e adenina como substratos, enquanto a outra via utiliza nucleotídeos pré-formados como substratos. Em cada via existe especificidade com relação à base ou ao nucleotídeo sendo “recuperado”. A recuperação de bases requer a atividade de fosforibosiltransferases (**figura 9**).

A hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRTase) catalisa as reações:



e



onde, PRPP = fosforibosilpirofosfato, IMP = inosina 5'-monofosfato, GMP = guanosina 5'-monofosfato

e a adenina fosforibosiltransferase (APRTase) catalisa:



onde, AMP = adenosina 5'-monofosfato

Essas duas enzimas não se sobrepõem quanto à especificidade do substrato. As reações fosforibosiltransferase são reguladas pelos produtos finais. Desta maneira, a recuperação de bases púricas é regulada (CORY, 1997).

Os linfócitos T e B são criticamente dependentes da via “de novo” para sua proliferação, enquanto que outros tipos de células podem usar as vias de “recuperação” para a síntese de purinas. Desta forma, uma resposta proliferativa dos linfócitos ativados requer um *pool* aumentado de nucleotídeos

guanosina e adenosina (ALLISON; EUGUI, 2000; PERICO; REMUZZI, 1997). Um defeito herdado na via de “recuperação” não tem efeito sobre a resposta imunológica.

O MPA é um potente inibidor não competitivo e reversível de uma enzima chave, a inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), da via “de novo” da síntese do nucleotídeo guanosina e não incorpora ao DNA (PERICO; REMUZZI, 1997; ALLISON; EUGUI, 2000). A inibição da IMPDH resulta na depleção de guanosina monofosfato (GMP), que normalmente é fosforilada a trifosfato (GTP) e, posteriormente convertida para molécula desoxi-GTP (dGTP) e incorporada ao DNA pela DNA polimerase (PERICO; REMUZZI, 1997; ALLISON; EUGUI, 2000). A distribuição da IMPDH é maior no timo e no baço do que nos outros órgãos, incluindo aqueles que apresentam células com atividade mitótica grande, como medula óssea e testículos, refletindo a importância desta enzima na função das células linfóides (ALLISON; EUGUI, 2000).

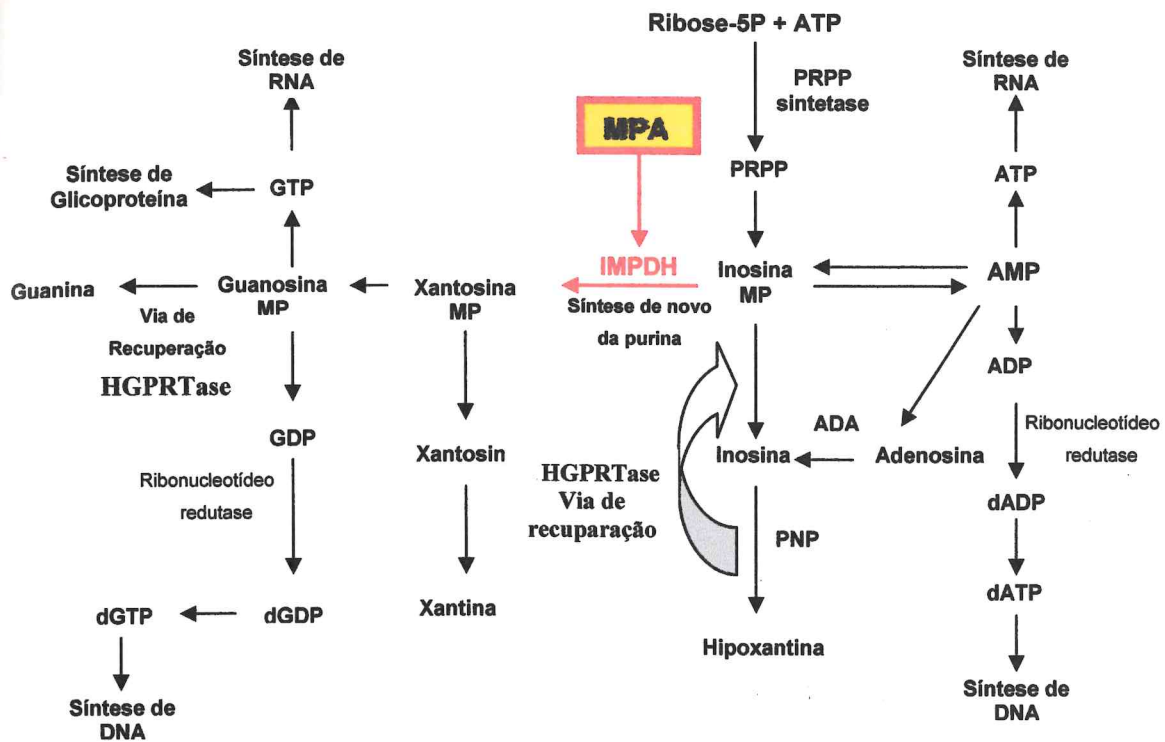
Os nucleotídeos guanosina ativam duas outras enzimas chaves no controle da síntese de DNA pelos linfócitos, a fosforibosilpirofosfato (PRPP) sintetase e a ribonucleotídeo redutase. O MPA causa uma depleção do nucleotídeo guanosina, alterando a síntese de DNA e exercendo um efeito antiproliferativo seletivo dos linfócitos T e B (**figura 10**). Assim, o MPA não bloqueia a estimulação antigênica ou mitogênica, mas bloqueia a síntese de DNA na **fase S** do ciclo celular (COHN et al., 1999).

O MPA pode induzir apoptose das células T policlonais ativadas em humanos (COHN et al., 1999) e inibe ainda a formação de anticorpos pelos linfócitos B (EUGUI et al., 1991; PERICO; REMUZZI, 1997).

O MPA impede ainda a glicosilação das glicoproteínas dos leucócitos e das células endoteliais pelo bloqueio da GTP e da uridina monofosfato, que estão envolvidas na transferência da fucose e da manose para as glicoproteínas. A glicosilação é um passo importante na expressão funcional das moléculas de adesão, como a E-selectina, L-selectina e VLA-4. Alteração

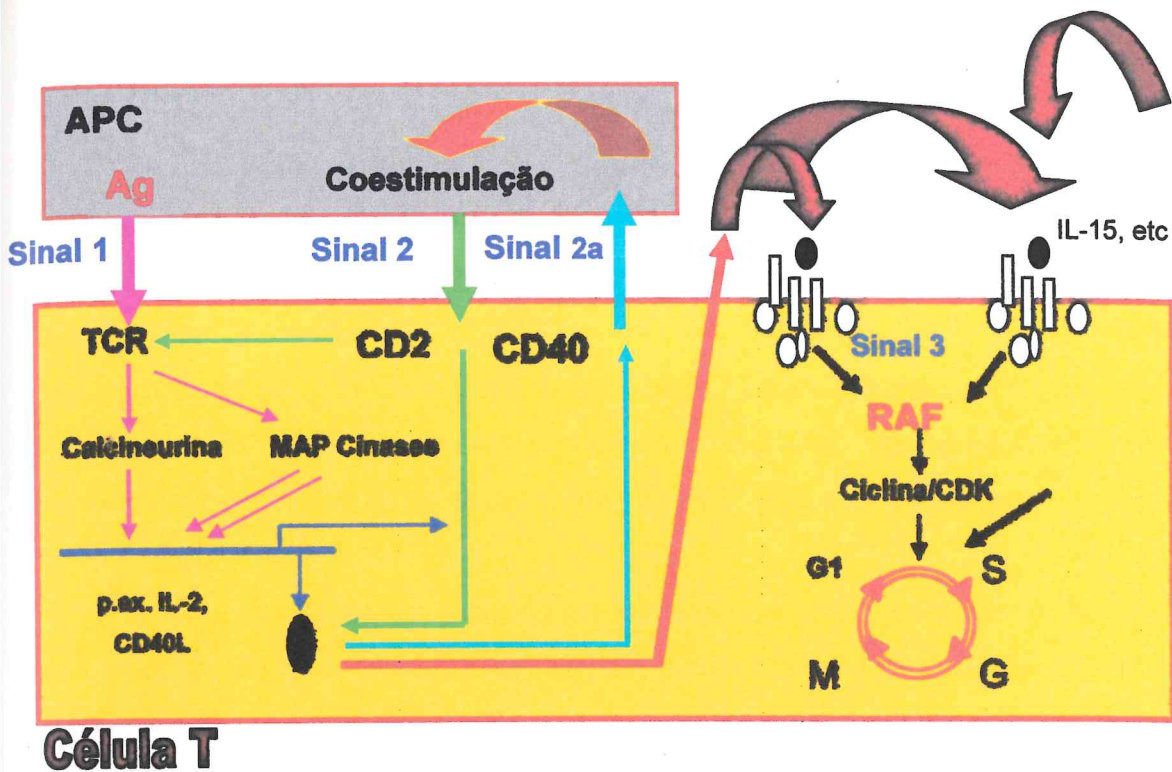
nas moléculas de adesão pode afetar a quimiotaxia e ativação dos linfócitos, inibindo o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de inflamação crônica, incluindo sítios de rejeição de órgãos vascularizados (ALLISON et al., 1993; ABELDA; BUCK, 1990; ALLISON; EUGUI, 2000; PERICO; REMUZZI, 1997).

Nos monócitos, o MPA reduz os níveis de GTP acelerando a diferenciação das células promonocíticas, aumentando a expressão dos antagonistas dos receptores da IL-1 (WATERS et al., 1993). O MPA parece não alterar o conteúdo de GTP dos neutrófilos nem sua capacidade de destruir bactérias pela produção de superóxido (ALLISON; EUGUI, 1993).



**Figura 9.** Mecanismo de ação do Micofenolato mofetil e via da síntese das purinas.

Os linfócitos T e B são seletivamente dependentes da síntese de purina pela "via de novo", onde o 5-fosforibosilpirofosfato (PRPP) é convertido em inosina monofosfato (IMP). A IMP é modificada pela enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), que catalisa a conversão de IMP em xantosina monofosfato (XMP) e é uma enzima limitante da reação. A XMP é, então, convertida em guanosina monofosfato (GMP). Guanosina trifosfato (GTP) e desoxiguanosina trifosfato (dGTP) são necessárias para a síntese de DNA. O micofenolato mofetil (MMF) é metabolizado para ácido micofenólico (MPA), que por sua vez inibe a enzima IMPDH, enzima-chave na síntese das purinas pela "via de novo". A inibição da IMPDH acarreta depleção dos estoques de nucleotídeos guanosina e excesso relativo de nucleotídeos adenina. Este excesso de adenosina monofosfato (AMP) e adenosina difosfato (ADP) resulta em inibição retroativa da enzima PRPP sintetase, enquanto que o excesso de desoxiadenosina trifosfato (dATP) inibe a ribonucleotídeo redutase, que é responsável pela conversão das purinas ribonucleotídeos em desoxinucleotídeos. Ambas são enzimas limitantes da velocidade da reação da síntese das purinas. Desta forma, o MPA inibe seletivamente a via de novo da síntese das purinas. Outras células podem usar a "via de recuperação", catalisada pela hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRTase) e serão resistentes aos efeitos do MMF (MELE, HALLORAN, 2000)



**Figura 10.** Mecanismo de ação do Micofenolato mofetil.

Inibição pelo ácido micofenólico (MPA) resulta em interrupção da divisão celular linfocítica. Os linfócitos são seletivamente dependentes da síntese de novo das purinas. O MPA inibe a enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH) necessária à síntese da guanosina monofosfato (GMP), um passo fundamental na biossíntese das purinas, que por sua vez é crucial para o ciclo celular dos linfócitos T e B. Desta forma, o MPA bloqueia a proliferação e expansão clonal dos linfócitos T e B, inibe a produção de anticorpos e previne a geração de linfócitos T citotóxicos e de outras células T efetoras. O MMF não interfere com a apresentação de antígenos (sinal 1), com a ligação de moléculas co-estimulatórias (sinal 2), nem com a ligação da IL-2 com seu receptor (sinal 3). MAP = proteinoquinase associada a mitógenos; TCR = receptor do linfócito T; CDK = quinase ciclina dependente; Ag = antígeno; APC = células apresentadora de antígenos (MELE, HALLORAN, 2000).

#### **d) Toxicidade**

A principal toxicidade foi observada para o trato gastrointestinal, freqüentemente manifestada como diarreia, dor abdominal, náuseas, vômitos e gastrite. Em algumas ocasiões, os sintomas são tão intensos que necessitam interromper a medicação (CIANCIO, et al., 1998; DUCLOUX et al., 1998; SCHRAMA et al., 2000; ZANKER et al., 1998). Toxicidade para a medula óssea também tem sido observada, podendo ocasionar leucopenia, anemia, trombocitopenia (CIANCIO, et al., 1998). O MMF não é nefrotóxico.

Alopécia moderada e difusa ou aumento da lipase sérica, sem aumento da amilase, têm sido descritas em alguns pacientes em uso de MMF (ZANKER et al., 1998).

O Estudo Multicêntrico realizado em quatorze centros americanos avaliou a freqüência de eventos adversos em 165 pacientes submetidos a transplante renal em uso de MMF, na dose de 2g/dia durante três anos. Diarreia foi observada em 41,8%, dor abdominal - 31,5%, náuseas - 34,5%, vômitos - 20%, anemia - 43,6%, leucopenia - 28,5%, trombocitopenia - 13,3%, infecção citomegálica - 15,2%, CMV invasivo - 10,9%, herpes simples - 15,2% e herpes zoster cutâneo - 9,7% (MYCOPHENOLATE MOFETIL..., 1999). Resultados semelhantes foram também observados no estudo multicêntrico realizado europeu (MYCOPHENOLATE MOFETIL..., 1999).

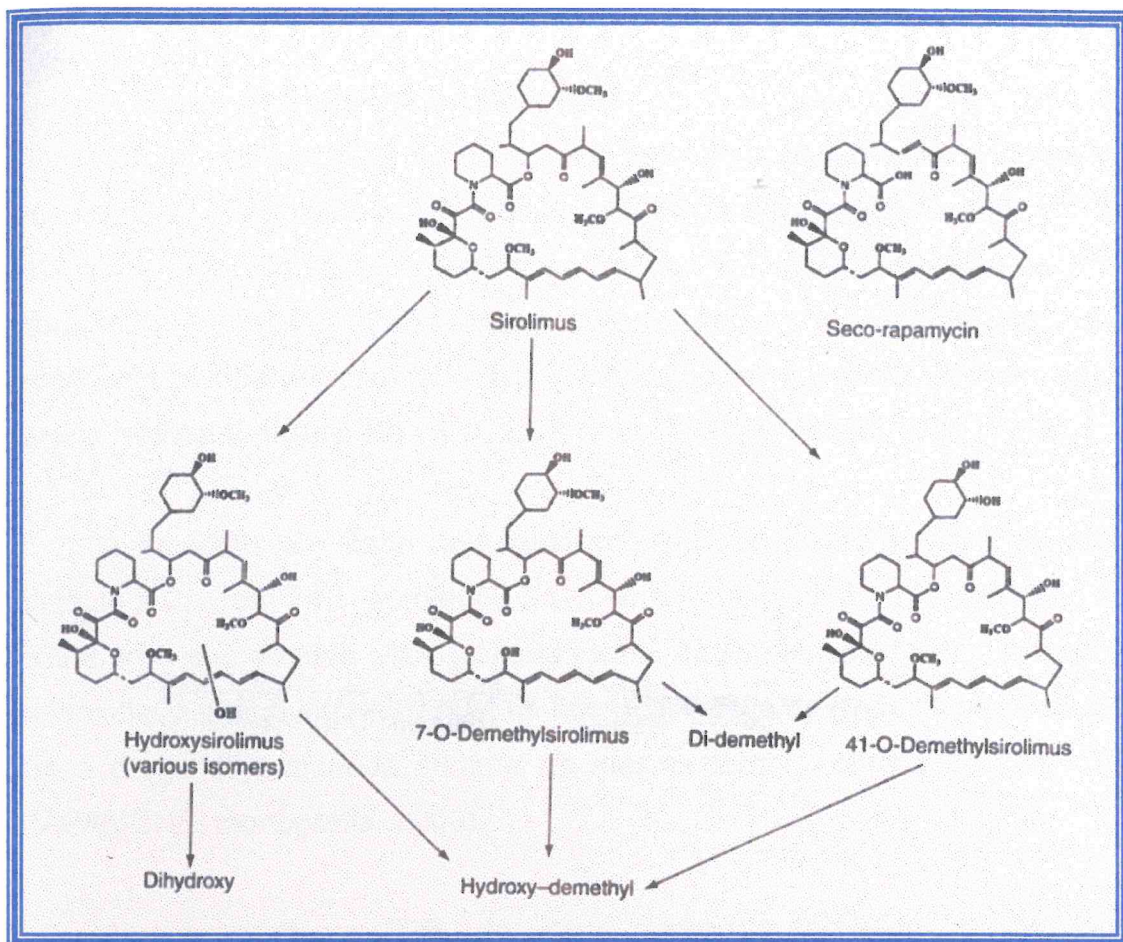
### 3. 3. RAPAMICINA – Rapa

#### a) Química

A Rapamicina (Rapa) é um produto de fermentação natural da bactéria actinomiceto, *Streptomyces hygroscopicus*, descoberta inicialmente em amostras de solo de Rapa Nui na Ilha de Páscoa e isolada em 1975 (KELLY et al., 1997). A Rapa foi estudada inicialmente como droga antifúngica e pesquisas realizadas no final dos anos 80 e início dos anos 90 demonstraram sua atividade imunossupressora (SEHGAL et al., 1975; STEPKOWSKI et al., 1991; COLLIER et al., 1991).

A Rapa é uma lactona hidrofóbica macrocíclica, cuja fórmula química é um esteroisômero de 9,10,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-hexadecaidro-9,27-diidroxí-3-[(1R)2[1S, 3R, 4R) hidroxí-3-metoxicicloexil]-1-metil]-10,21-dimetoxí-6,8,12,14,20,26-hexametil-23,27-epoxí-3H-píridol[2,1-c][1,4]oxa-azacíclo-hentricontino-1,5,11,28,29(4H,6H,31H)-pentona (**figura 11**). A fórmula molecular é  $C_{51}H_{79}O_{13}$  e apresenta peso molecular de 914,2 kD (MORRIS, 1995).

A Rapa é insolúvel em água e altamente solúvel em soluções oleosas.



**Figura 11.** Metabolismo da Rapamicina nos seres humanos (SHAW et al., 2000).

## b) Farmacocinética

A Rapa é rapidamente absorvida por via oral, com um pico de concentração máxima ( $t_{max}$ ) de 1 hora em indivíduos saudáveis e 2 horas em receptores de transplante renal. A biodisponibilidade da solução oral é de 14%. Esta baixa disponibilidade é devida ao metabolismo da Rapa pelas enzimas citocromo P-450 3A4 (CYP3A4) intestinais e hepáticas e ao contratransporte da droga pela bomba representada pela glicoproteína-P existente nas células da parede intestinal (**figura 12**) (SATLLER et al., 1992; LAMPEN et al., 1998).

A ingestão da Rapa com uma refeição com alto teor de gorduras diminuiu a  $C_{max}$  em 34%, aumentou a  $t_{max}$  em três vezes e meia e aumentou em 35% a área sob a curva (AUC). Desta forma, os alimentos podem aumentar a variabilidade inter e intraindividual na farmacocinética da Rapa, sendo indicado que a droga seja ingerida sempre da mesma forma, com ou sem alimento (RAPAMUNE, monografia, 2000).

Aproximadamente 92% da Rapa liga-se a proteínas plasmáticas, principalmente albumina (97%), além de  $\alpha$ 1-glicoproteínas ácidas e lipoproteínas (YATSCOFF et al., 1993).

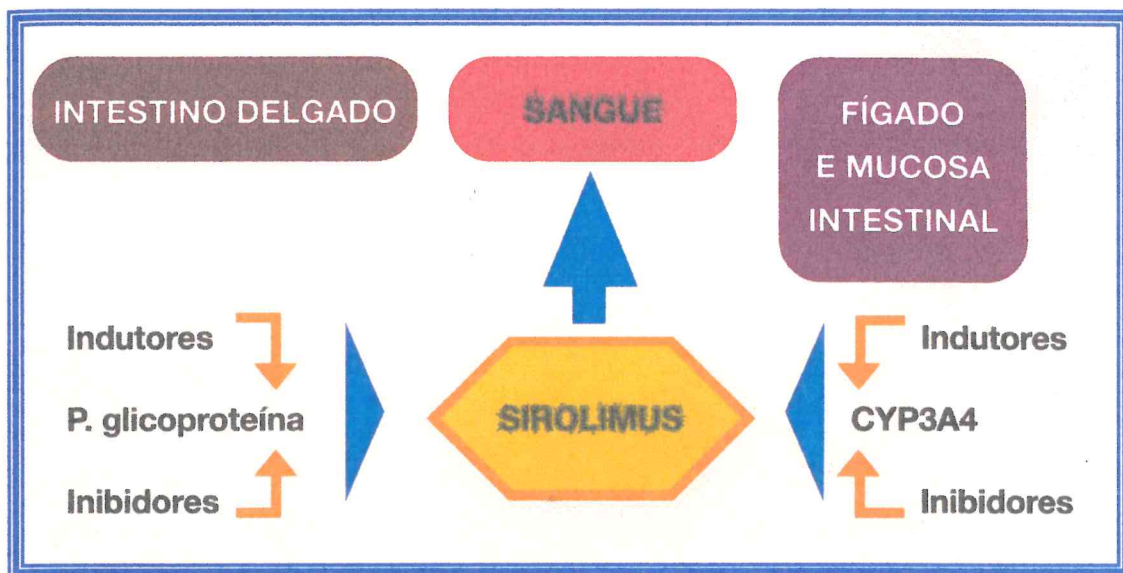
A Rapa é metabolizada por O-desmetilação e/ou hidroxilação pelas enzimas CYP3A4 encontradas no fígado e intestino delgado (LAMPEN et al.; 1998). Sete metabólitos são identificáveis no sangue total e plasma, porém a Rapa é o principal componente do sangue total e contribui com mais de 90% da atividade imunossupressora (Rapamune, monografia, 2000). Noventa e dois por cento da droga é eliminada principalmente pelas fezes e 2% pela urina. A meia-vida de eliminação no estado de equilíbrio em receptores renais estáveis foi de 62,3 horas após doses orais múltiplas (RAPAMUNE, monografia, 2000; KAHAN, et al., 2001).

O método padrão-ouro para dosagem de Rapa é a HPLC com espectrometria de massa (HPLC-MS), porém é um método caro e que requer técnica qualificada. A HPLC com ultravioleta apresenta boa correlação com

HPLC-MS e é técnica disponível em muitos laboratórios. Outras metodologias têm sido usadas em estudos experimentais: enzima-imunoensaio com micropartículas (MEIA), que mede a Rapa e seus metabólitos, podendo superestimar a concentração sanguínea em 10% a 42%; ensaio de ligação da imunofilina (IBAs), embora apresente fraca reatividade cruzada com seus metabólitos, é mais fácil de ser realizado e tem possibilidades de ser um método automatizado (SHAW et al., 2000; SAUNDERS et al., 2001).

A Rapa é metabolizada pelas isoenzima CYP3A4, pertencente à família do citocromo P-450, bem como constitui um substrato para glicoproteína-P, localizada no intestino delgado. Assim, drogas que interferem nestes dois fatores podem aumentar ou a diminuir a concentração da Rapa no sangue. Exemplos destas interações medicamentosas são a rifampicina, carbamazepina, fenobarbital, fenitoína, que podem reduzir os níveis séricos da Rapa, e diltiazem, nicardipina, verapamil, cetoconazol, ciclosporina, claritromicina, eritromicina, metoclorpramida, cisaprida, cimetidina, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, que podem aumentar a concentração sérica da Rapa (RAPAMUNE, monografia, 2000).

A administração concomitante de Rapa e CsA a voluntários normais aumentaram a C<sub>max</sub> média em 116% e a AUC média em 230%. Quando as drogas foram administradas com intervalo de 4 horas este aumento foi de 37% e 80%, respectivamente. Devido à interação da Rapa com a CsA é recomendado que as drogas sejam administradas com intervalo de 4 horas (RAPAMUNE, monografia, 2000).



**Figura 12.** Metabolismo da Rapamicina.

Metabolismo da Rapamicina pelas enzimas CYP3A4, pertencentes ao citocromo P-450, encontradas no fígado e intestino delgado e contratransporte da droga glicoproteína-P existente nas células da parede intestinal.

### c) Mecanismo de Ação

A Rapa não inibe a síntese de IL-2, porém bloqueia a resposta proliferativa dos linfócitos a IL-2 (ALLISON, 2000). A paralisação do ciclo celular provocada pela Rapa se dá através da formação de um complexo inibitório entre a Rapa e seu receptor intracelular, a imunofilina citosólica FKBP12 (*FK-binding protein 12*), uma peptídeo-prolil-isomerase que catalisa a quinase serina/treonina multifuncional, mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (SABERS et al., 1995). O bloqueio da mTOR diminui a resposta dos linfócitos ao segundo sinal co-estimulatório durante a fase G0 para a fase G1 do ciclo celular e a resposta ao terceiro sinal durante a construção da fase G1 (ALEXANDER et al., 1999). Ao bloquear o sinal co-estimulatório, a Rapa previne a ativação dos fatores do complexo  $\text{I}\kappa\text{B}$  (inibidores do fator nuclear  $\kappa\text{B}$ ) e, possivelmente também modula a atividade da proteinoquinase C. Ao bloquear o sinal 3 na fase G1 tardia do ciclo celular, a Rapa **inibe** quatro vias de sinalização estimuladas pelas citocinas: a) a degradação da  $\text{p27}^{\text{kip1}}$ , levando à ativação da ciclina; b) a estimulação da cinase  $\text{p70}^{\text{S6}}$ , um passo necessário para a síntese de proteínas estruturais no endossoma; c) a liberação do fator de alongação 4A de sua associação com PHAS-I (*phosphorylated heat- and acid-stable protein*), facilitando, desta forma, a síntese de proteínas ribossomais; d) a regulação aumentada da transcrição das proteínas anti-apoptóticas *bcl-2* e *p21*Ras (**figura 13**) (KAHAN et al., 2001; SAUNDERS et al., 2001). Estas ações celulares da Rapa podem explicar os seus efeitos terapêuticos e tóxicos. Os efeitos únicos desta droga são complementares aos inibidores da calcineurina, CsA e Tacrolimus, e aos anticorpos monoclonais dirigidos contra os IL-2R; uma relação que tem sido chamada de “paradigma da citocina” (**figura 14**) (KAHAN et al., 2001).

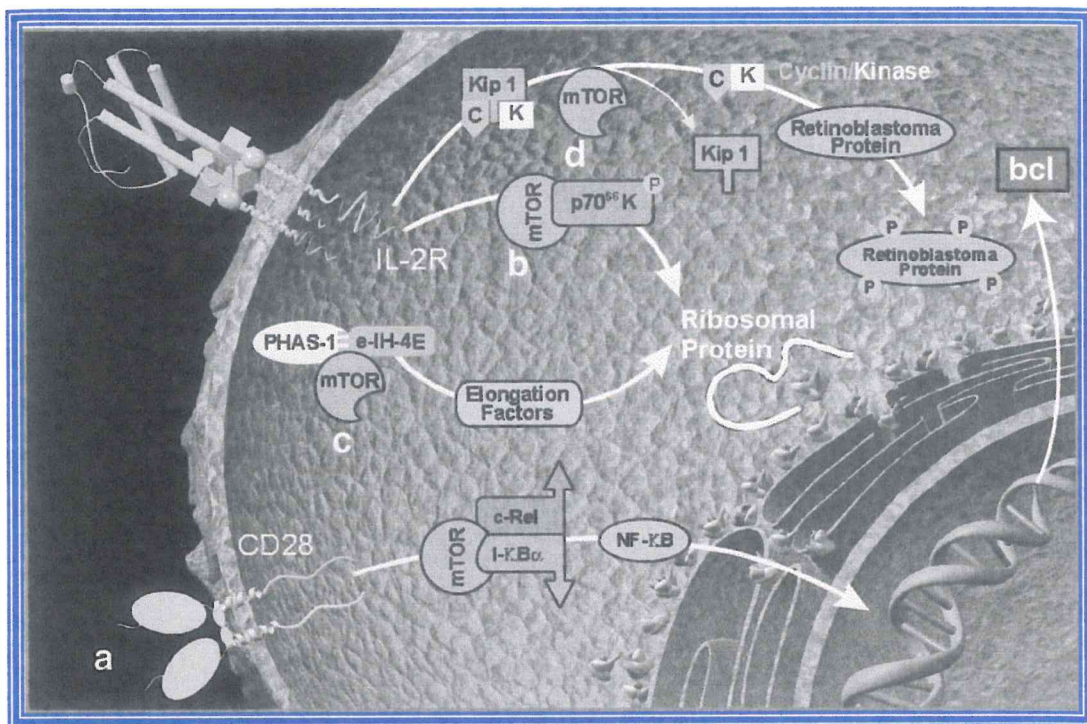
A atividade imunossupressora da Rapa resulta da inibição da atividade dos leucócitos. Ela bloqueia a proliferação das células T induzida pelas citocinas (IL-1,-2, -3, -4, -6, -7, -12 e -15), aloantígenos e mitógenos, de forma dose-dependente (SEHGAL, 1998; SAUNDERS, et al., 2001). Entretanto, ela não parece alterar a apoptose das células T induzida pela IL-2 (SAUNDERS, et al., 2001). As células *natural killer*, as células *killer* ativadas por citocinas e a

função de citotoxicidade dependente de anticorpo dos leucócitos são suprimidas pela Rapa em concentrações 10 a 100 vezes maiores do que aquela necessária para bloquear a proliferação das células T (SEHGAL et al., 1994).

A Rapa inibe a proliferação de células não imunes, como as células musculares lisas estimuladas pelo fator de crescimento fibroblástico básico ou fator derivado da plaqueta (CAO et al., 1995; MARX et al., 1995). Esta atividade poderia favorecer a inibição, pela Rapa, da proliferação da musculatura lisa, que é a lesão base da RC.

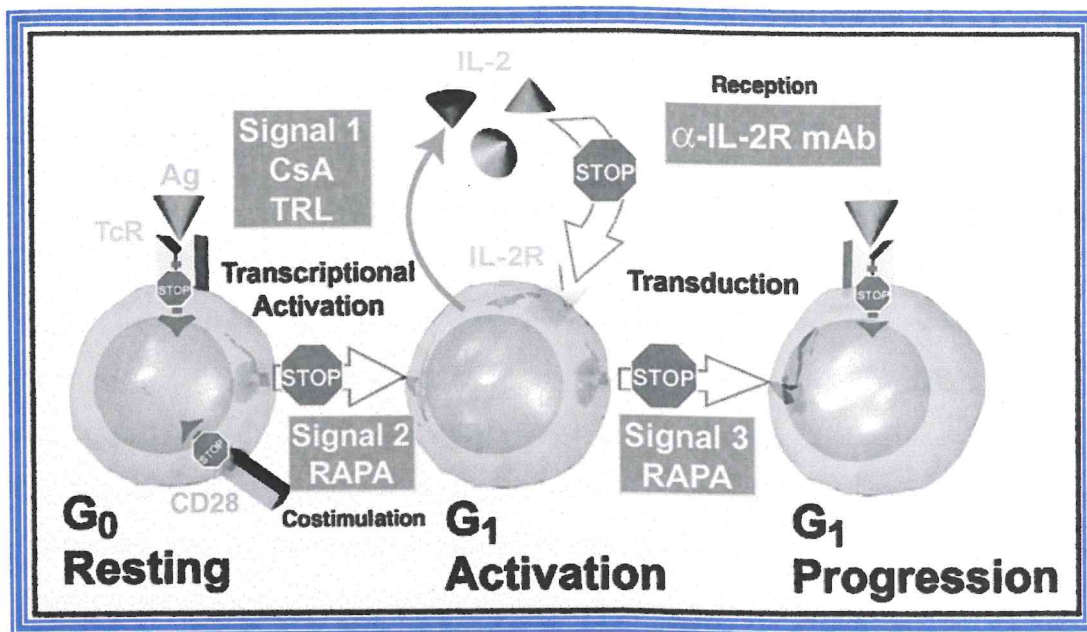
Em virtude de sua ação inibitória sobre a *bcl-2*, a Rapa pode produzir um efeito pró-apoptótico e facilitar a indução de tolerância (KAHAN et al., 2001).

Figura 13. Sítios de ação da enzima alvo da Rapamicina (mTOR) em células T. a) ablação dos fatores de  $\alpha$ -Rel, localizados após a interação com o estimulatório CD28; b) fosforilação da quinase p70<sup>S6K</sup> inibindo a atividade endossômica estrutural; c) liberação de eIF-4E de sua associação com PHAS-I, levando a atividade da 4E necessária para a tradução de proteínas poli-peptídicas nos ribossomas; d) dissociação do p27<sup>CIP1</sup> de sua associação com p53, promovendo a divisão celular e a regulação aumentada da expressão de um fator anti-apoptótico (KAHAN et al., 2001)



**Figura 13.** Sítios de ação da enzima alvo da Rapamicina (mTOR).

a) ativação dos fatores da c-Rel, localizados após a recepção do sinal co-estimulatório CD28; b) fosforilação da quinase p70<sup>S6</sup> precedendo a síntese protéica endossômica estrutural; c) liberação do e-IF4E de sua associação com PHAS-I, levando a atividade da 4E necessária para a elongação da cadeia polipeptídica nos ribossomas; d) dissociação do p27<sup>kip1</sup> de sua quinase ciclina C, promovendo a divisão celular e a regulação aumentada da expressão do bcl, um fator anti-apoptótico (KAHAN et al.; 2001).



**Figura 14.** O "paradigma da citocina".

O "paradigma da citocina" inclui o bloqueio do sinal 1 pelos antagonistas da calcineurina (ciclosporina-CsA e Tacrolimus-TRL) e a inibição do sinal 2 co-estimulatório pela Rapamicina (Rapa), reduzindo a ativação transcricional da síntese de citocinas durante da fase G<sub>0</sub> para a fase G<sub>1</sub>. O anticorpo monoclonal contra o receptor da IL-2 (mAbs IL-2R) bloqueia a capacidade da IL-2 de desencadear o sinal 3, evento transducional que é inibido pela Rapa, impedindo a progressão do ciclo celular da fase G<sub>1</sub> para S (KAHAN et al.; 2001).

#### **d) Toxicidade**

As reações mais freqüentemente observadas foram hipercolesterolemia, hiperlipidemia, leucopenia e trombocitopenia (GROTH et al., 1999; ALLISON, 2000; MACDONALD et al., 2001). A Rapa diminui a atividade da lipase lipoprotéica em cultura de células, porém efeito semelhante não foi observado em humanos. A Rapa acarreta aumento da HDL; no entanto, produz elevação mais acentuada da LDL e IDL (lipoproteína de intensidade intermediária), além dos triglicerídeos. Embora a freqüência de hiperlipidemia seja elevada, a ocorrência de complicações decorrentes dela, como pancreatite, acidente cerebrovascular ou infarto do miocárdio, é rara (KAHAN et al., 1998; KAHAN et al., 2001).

A Rapa pode ter efeitos tóxicos reversíveis sobre a progressão do ciclo das células da medula óssea estimulada pelas citocinas ou fatores de crescimento vascular, de forma semelhante ao efeito sobre os linfócitos. A supressão tende a ser maior sobre os megacariócitos do que sobre os leucócitos, é dose-dependente e reversível com a redução ou interrupção da droga (KAHAN et al., 1998; KAHAN et al., 2001).

Hipertensão arterial, eritema, acne, anemia, artralgia, diarréia, hipocalemia, febre, epistaxe e dor no pé foram mais freqüentemente observadas em pacientes fazendo uso de doses mais elevadas da Rapa. (KAHAN et al., 1998; GROTH et al., 1999; ALLISON, 2000; KAHAN et al., 2001; MACDONALD et al., 2001).

Em alguns pacientes têm sido relatados sintomas gastrintestinais como diarréia, náuseas e vômitos (KAHAN et al., 1998).

Nefrotoxicidade não foi associada ao uso da Rapa. Linfocele ocorreu com uma freqüência mais elevada em pacientes sendo tratados com Rapa, sendo atribuída ao retardo na cicatrização da ferida cirúrgica. (KAHAN et al., 1998; KAHAN et al., 2001).

Uma complicação é a ocorrência de pneumonite não infecciosa reversível (KAHAN et al.; 2001).

#### 4. CÂNCER APÓS TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS E TECIDOS

A incidência pode variar de acordo com a região, com o tipo de órgão transplantado e com o tempo decorrido após o transplante. Assim, foram relatadas estimativas de neoplasias em receptores de transplante renal de 2,8% na Alemanha (WALZ et al. 1992), 3,3% na Escandinávia (BIRKELAND, 1983) e Espanha (VILARDELL et al., 1992), 5,1% em Londrina-Pr (DELFINO et al, 1994), 5,6% nos Estados Unidos (PENN, 1993a), 5,9% em Kyoto (SUZUKI et al., 1994), 6,4% no Canadá (GUTTMANN et al., 1984) 7,6% em Yorkshire (LONDON et al., 1995), 14,2% na Finlândia e 49% na Austrália (SHEIL et al., 1985a; 1985b; 1993). Esta diferença nas incidências é acarretada, provavelmente, pela ocorrência das neoplasias de pele, que é maior nas áreas de maior risco. Outro fator que pode influenciar na incidência de neoplasias é o tipo de órgão transplantado. Rinaldi e cols. (2001) observaram uma incidência de 11,6% de neoplasias em 174 pacientes submetidos a transplante cardíaco em Pávia.

As neoplasias de pele e de lábios são as mais freqüentes após o transplante de órgãos, representando 38% dos tumores malignos (PENN, 1984). Sheil e cols. (1985a) mostraram que a incidência desta neoplasia na Austrália e Nova Zelândia aumenta de 0,6% nos pacientes pré-diálise para 2% durante o tratamento dialítico e 12% após três meses de transplante com rim de doador cadáver. após 4 anos de transplante, 28% dos pacientes apresentaram ceratoses pré-malignas (PENN, 1984).

Em regiões com pouca luz solar o risco de desenvolver câncer de pele é aumentado em 4 a 7 vezes, enquanto que em regiões aonde a exposição solar é maior este risco sobe para 21 vezes (PENN, 1984).

A prevalência de verrugas virais aumenta rapidamente após o transplante e existe uma forte associação entre o número de verrugas induzidas pelo papilomavírus (HPV) e o desenvolvimento de câncer de pele. Além disso, HPV tem sido detectado em lesões de pele benignas, pré-malignas e malignas. Os tipos de HPV associados a epidermodisplasia-verruciforme (EV-HPV) prevalecem em todos os tipos de lesões (BOUWES BAVINCK, 2001). Entretanto, outros autores não observaram partículas virais nos tumores de pele de pacientes transplantados utilizando cultura de tecido e microscopia eletrônica (KELLY et al., 1985).

A maioria das neoplasias cutâneas está localizada em áreas expostas aos raios solares, como face, mãos, antebraço e face posterior do pescoço. Elas freqüentemente estão associadas a outras lesões, verrugas e ceratoses, que devem ser diferenciadas das neoplasias (BLOHMÉ et al., 1984; LANG et al., 1994).

Os carcinomas espinocelulares predominam sobre os basocelulares com uma relação de 1,7:1 e em 44% dos casos eles são múltiplos. Os tumores cutâneos e de lábios são agressivos e metástases ganglionares foram observadas em 7,5%, sendo a maioria espinocelulares ou melanoma maligno. A incidência de melanoma também é aumentada na população de pacientes transplantados, com mortalidade em 46% dos casos (PENN, 1984).

Os principais fatores implicados no aumento da incidência de câncer cutâneo são: raça caucasóide, exposição aos raios ultravioleta (UVB), idade do receptor (BLOHMÉ et al., 1984), a presença do papilomavírus 5 e 8, que podem ser observados em 60% dos casos de câncer espinocelulares (BARR et al., 1989), infecção pelo herpes vírus (PENN, 1999), homozigose no *locus* DR e incompatibilidade no *locus* B do CPH entre doador e receptor (BOUWES BAVINCK et al., 1991), intensidade da imunossupressão e sensibilização da pele aos raios UVB pelos derivados imidazólicos da azatioprina. Entretanto, a presença da molécula A11 no CPH parece conferir resistência ao câncer cutâneo (STREILEIN, 1991).

Gjersvik e cols. (2000) analisaram 148 pacientes submetidos a transplante cardíaco e 1020 a transplante renal e observaram que o risco de desenvolver câncer de pele do tipo não melanoma é 2,8 vezes maior nos pacientes recebendo transplante de coração. Os autores atribuem este risco aumentado à imunossupressão mais agressiva utilizada nestes pacientes. Entretanto, outros autores não observaram uma incidência aumentada de melanoma nos pacientes transplantados quando comparados aos pacientes em programa de tratamento dialítico ou a população geral (BRUNNER et al., 1995).

As doenças linfoproliferativas (PTLD) representam a segunda causa mais freqüente de neoplasias após o transplante de órgãos, com incidência variando de 0,5% (CAILLARD et al., 2000) a 25% (FIRST et al., 1998), dependendo do estado de imunidade do receptor contra o vírus Epstein Barr (EBV), do tipo de órgão transplantado e da intensidade da imunossupressão (HO, 1995; WALKER et al., 1995, GRIDELLI, 2000). A primo-infecção pelo EBV constitui o risco mais elevado de desenvolver uma doença linfoproliferativa pós-transplante.

O risco do paciente submetido a transplante renal desenvolver PTLD é cerca de 30 a 40 vezes maior do que a população em geral (PENN, 1991; OPELZ et al., 1995).

PTLD compreende um grupo de manifestações, variando desde uma linfoproliferação benigna e autolimitada a formas mais agressivas e amplamente disseminadas da doença. Esta última é comumente associada com proliferação de células B, embora lesões contendo células T e células nulas também tenham sido relatadas. Histologicamente podem ser classificadas em três grupos: hiperplasia plasmocítica, doença linfoproliferativa polimórfica e linfoma/mieloma múltiplo (CHADBURN et al., 1997; HARRIS et al., 1997).

O quadro clínico pode se manifestar em qualquer período pós-transplante como uma síndrome semelhante à mononucleose infecciosa, como

massa tumoral única ou múltipla ou, freqüentemente, como uma disfunção do enxerto (GORAL et al., 1997). Randhawa e cols. (1996) estabeleceram os critérios para diagnóstico de PTLD no enxerto renal. Eles incluem a presença de nódulos de células linfóides em expansão, atipia nuclear e áreas serpiginosas de necrose com uma densa infiltração mononuclear de fundo.

As localizações extra-ganglionares são freqüentes, principalmente no trato gastrintestinal e sistema nervoso central (GORAL et al., 1997). Os sintomas ocorrem em pacientes mais jovens e em fase mais precoce do transplante, quando comparados com os outros tipos de neoplasias (KRIKORIAN et al., 1978).

A incidência de linfomas depende do tipo de órgão transplantado e da intensidade de imunossupressão recebida, podendo variar de 15% a 54% das neoplasias pós-transplantes. Foi relatado que a incidência de linfoma a cada ano é maior em pacientes submetidos a transplante cardíaco do que renal (OPELZ et al., 1993).

Um aspecto importante é a raridade do linfoma de Hodgkin nos pacientes transplantados, representando somente 3% do total dos linfomas, enquanto que na população em geral este tumor é o mais freqüente, com incidência de 24 a 48%. (WEINTRAUB et al., 1982; PENN, 1984). Dos linfomas não Hodgkin, 86% são originados das células B e 14% das células T (PENN, 1991). Além disso, o tipo histológico mais comum foi o histiocítico - sarcoma de células reticulares (67%).

Envolvimento extranodal ocorreu em 78% dos casos, sendo que em 70% deles um único órgão estava envolvido. O sítio mais comumente afetado foi o sistema nervoso central, descrito em 58%. Este sítio pode ser acometido em 1% dos pacientes não transplantados com linfoma não Hodgkin (WEINTRAUB et al., 1982; PENN, 1984).

Envolvimento linfomatoso do órgão transplantado foi observado em 15% dos casos (PENN, 1984).

Os possíveis fatores etiológicos favorecendo o aparecimento de linfomas em pacientes transplantados incluem a perda da alça de *feedback* que normalmente controla a proliferação dos linfócitos, estimulação antigênica crônica dos linfócitos pelos antígenos estranhos do CPH do enxerto ou pelas infecções múltiplas e crônicas e viroses oncogênicas, das quais o principal suspeito é o EBV (PENN, 1984; MATAS et al., 1976).

O risco de desenvolver Sarcoma de Kaposi é 400 a 500 vezes maior nos pacientes transplantados do que na população em geral (PENN, 1987). Enquanto a incidência desta doença na população em geral é negligenciável, em pacientes transplantados ela pode aumentar para 6%, com predominância de acometimento no sexo masculino de 3:1 em relação ao sexo feminino. O sarcoma é incomum nos receptores de transplantes pediátricos, representando apenas 3% dos pacientes com esta neoplasia (FIRST et al., 1998; PENN, 1999).

O Sarcoma de Kaposi pode ser classificado em duas formas: cutâneo-mucosa e visceral. Segundo Penn, 61% dos Sarcomas de Kaposi são não viscerais, acometendo pele, conjuntiva e mucosa orofaríngea. Esta forma manifesta-se como pápulas ou máculas azul-avermelhadas na pele e/ou mucosa orofaríngea ou como granuloma infectado que não cicatriza. A forma visceral correspondeu a 39% dos Sarcomas de Kaposi e acometeu principalmente trato gastrintestinal e pulmões (FIRST et al., 1998).

Os tumores cutâneos apresentam uma evolução favorável em mais da metade dos casos e remissões espontâneas têm sido observadas em um terço com a suspensão da imunossupressão. Entretanto, estas remissões são mais raras nas formas viscerais, ocorrendo em torno de 20% (QUNIBI et al., 1993).

Os possíveis fatores etiológicos implicados no aparecimento do Sarcoma de Kaposi em transplantados são a predisposição genética, infecções prolongadas e repetidas pelo citomegalovírus (CMV) e estimulação antigênica crônica pelo transplante ou por múltiplas infecções (PENN, 1984).

Os pacientes transplantados renais apresentam um risco aumentado de neoplasias do trato urinário secundário à degeneração maligna de cistos presentes nos rins nativos ou carcinoma urotelial em pacientes com antecedentes de nefropatia por analgésicos. A prevalência de carcinoma renal tem sido relatada ser 3% a 5% dos pacientes candidatos a transplante renal comparado com 2% da população geral (GULANIKAR, 1998; PENN, 1999).

Kyllönen e cols. (2000) analisaram 2.890 pacientes transplantados renais no período de 1967 a 1997 e não detectaram uma incidência aumentada de neoplasias comuns em homens, como pulmão, estômago e próstata, ou neoplasias comuns em mulheres, como mama, em relação à população geral. Estas mesmas observações foram relatadas por outros autores (SHEIL et al., 1985a; 1985b; BRUNNER et al., 1995). Segundo os registros do *European Dialysis and Transplant Association – European Renal Association* (EDTA – ERA) os sítios mais freqüentemente acometido pelas neoplasias foram os pulmões e os brônquios (BRUNNER et al., 1995).

A indicação de transplante de órgãos em pacientes com antecedentes de neoplasias é controversa, uma vez que a imunossupressão favorece o crescimento das células neoplásicas, aumentando o risco de recidiva. Este risco dependerá da natureza do câncer inicial, sendo muito elevado após câncer de bexiga de alto grau, sarcoma, melanoma, câncer espinocelular ou basocelular, câncer coloretal, câncer de mama e mieloma múltiplo. Nestes casos é aconselhável que o paciente esteja em remissão há pelo menos 5 anos.

O câncer *in situ* não contra-indica o transplante de órgãos. Segundo Penn (1993b), o risco de recidiva de câncer pré-existente após a realização de transplantes de órgãos é de 53% quando o paciente está em remissão entre 0 a 24 meses, 34% com remissão entre 25 a 60 meses e 13% quando o tempo de remissão é maior que 60 meses.

A incidência de neoplasias também é aumentada nos pacientes transplantados com idade menor ou igual a 18 anos. Wingen e cols. (1994)

observaram uma freqüência de neoplasias de 4% durante um período de observação de 5,7 anos. Porém, a distribuição dos tipos de neoplasias é diferente dos indivíduos transplantados na idade adulta. Os linfomas são os mais freqüentemente observados, ocorrendo em 52% dos registros de CTTR, seguido dos cânceres de pele e lábios (20%), carcinoma de vulva e ânus (4%), sarcomas excluindo Kaposi (4%), neoplasias hepáticas (3%), carcinomas de tireóide (3%), Sarcoma de Kaposi (2%) (PENN, 1994). Os linfomas não Hodgkin também predominam nesta faixa etária de pacientes transplantados, ocorrendo em 98% dos casos de linfomas (PENN, 1994; WINGEN et al., 1994). Não foi observada diferença na incidência de linfomas entre pacientes tratados com esquema clássico (Azatiprina e Prednisona-AZA+PRED) e CsA (GRUBER et al., 1994).

Neoplasias podem ser transmitidas ao receptor através do órgão doado. Do ponto de vista prático e médico-legal esta transmissão pode ser diferenciada em tumor transmitido pelo doador e tumor derivado do doador (PENN, 1993b). Os tumores transmitidos são aqueles existentes no doador no momento do transplante enquanto que os tumores derivados são tumores de novo que se desenvolvem nas células do doador que foram transplantadas, como leucemia promielocítica, PTLD e adenocarcinoma pancreático.

O U.N.O.S. (*United Network for Organ Sharing, Richmond*) registrou uma incidência de 0,04% de tumores relacionados ao doador. A mortalidade global, incluindo os receptores de órgãos de doadores vivos, foi de 38% (KAUFFMAN et al., 2002).

Diferentes mecanismos podem contribuir para o risco aumentado de câncer em pacientes imunossuprimidos e a importância de cada um deles varia com o tipo de malignidade:

#### **a) Piora da vigilância imunológica**

Permite que células potencialmente neoplásicas, com mutação somática ou infecção viral, escapem da eliminação pelo hospedeiro (BURNET, 1967;

KEAST, 1970). Vários mecanismos podem ser operantes: (COTRAN et al., 2000).

**a<sub>1</sub>) Crescimento seletivo de variantes antígeno-negativas:** durante a progressão do tumor podem ser eliminados os clones fortemente imunogênicos;

**a<sub>2</sub>) Perda ou redução da expressão de moléculas do CPH:** as células tumorais podem deixar de expressar níveis normais de moléculas de classe I do CPH, escapando, assim, do ataque pelas células T<sub>c</sub>, mas não das células NK;

**a<sub>3</sub>) Ausência de co-estimulação:** As células tumorais podem expressar moléculas de classe I do CPH mas, freqüentemente, não expressam moléculas co-estimuladoras. Isto pode acarretar um processo de anergia e induzir apoptose das células T;

**a<sub>4</sub>) Imunossupressão:** os tumores ou produtos tumorais podem ser imunossupressores, como é o caso do TGF- $\beta$ ;

**a<sub>5</sub>) Apoptose das células T<sub>c</sub>:** alguns melanomas e carcinomas hepatocelulares expressam o ligante Fas. Esses tumores matam os linfócitos que expressam Fas quando estes entram em contato com o tumor, eliminando, assim, as células T tumor-específicas.

## **b) Carcinogênese por radiação**

Evidências epidemiológicas mostram que os raios UV do sol induzem uma incidência aumentada de carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular e, possivelmente, melanoma maligno de pele. O grau de risco depende do tipos de raios UV, da intensidade de exposição e da quantidade de proteção fornecida pela camada de melanina na pele que absorve a luz.

A porção UV do espectro solar pode ser dividida em três faixas de comprimento de onda: UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320 nm) e UVC (200 a 280 nm). Destas, acredita-se que a UVB seja a responsável pela indução de cânceres cutâneos. A UVC, apesar de ser um potente mutágeno, é filtrada na camada de ozônio ao redor da terra.

A carcinogênese da luz UVB é atribuída à sua formação de dímeros de pirimidina no DNA. Esse tipo de lesão do DNA é reparado através via de reparo de excisão de nucleotídeos (NER, *nucleotide excision repair*). Existem cinco etapas do NER: (1) reconhecimento da lesão do DNA, (2) incisão do filamento lesado em ambos os lados da lesão, (3) remoção do oligonucleotídeo danificado, (4) síntese de um remendo de nucleotídeo, e (5) sua ligação. Esse processo requer o produto de pelo menos 20 genes. Foi postulado que a excessiva exposição ao sol pode sobrepular a capacidade de reparo da via do NER e, desta forma, lesões podem permanecer sem reparo permitindo erros de transcrição e, em alguns casos, o aparecimento de câncer (COTRAN et al., 2000).

### c) **Viroses oncogênicas**

O intervalo de tempo entre o transplante de órgãos e o aparecimento de algumas neoplasias reforça a hipótese de infecção por um oncovírus. Além disso, alguns tipos de neoplasias que ocorrem comumente nesta população são relacionadas a etiologia viral, tais como linfoma, câncer de pele, lábios, cérvix uterina, hepatoma e sarcoma de Kaposi (PENN, 1977; KINLEN et al., 1983).

Infecção pelo HPV tem sido associada a neoplasias de cérvix uterina e de pele (BOUWES BAVINCK et al., 2001; HALPERT et al., 1985). Os HPVs foram implicados na origem de vários cânceres, sobretudo carcinoma de células escamosas do colo uterino e região anogenital, além de cânceres orais e de laringe.

As análises moleculares de carcinomas associados ao HPV e verrugas genitais benignas revelam diferenças e podem ser pertinentes para a atividade de transformação desses vírus. Nas verrugas benignas e lesões pré-neoplásicas, o genoma do HPV é mantido numa forma epissômica (não integrada), ao passo que nos cânceres, o DNA viral é geralmente integrado ao genoma das células hospedeiras. Embora este sítio de integração seja randômico, o padrão de integração é clonal, isto é, o local de integração é idêntico no interior de todas as células de um determinado tipo de câncer, afastando a possibilidade de infestação passageira de uma célula em transformação (COTRAN et al., 2000).

Também existem evidências mostrando uma associação entre herpes vírus do tipo II e carcinoma de cérvix uterina. A infecção viral parece ser o fator desencadeador, embora não único, desta neoplasia (PAGANO, 1984).

A infecção pelo EBV é fortemente associada a dois tipos de neoplasias: o carcinoma de nasofaringe posterior e os linfomas de células B, especialmente o linfoma de Burkitt (PAGANO, 1984).

O EBV penetra nas células B através da molécula CD21, expressa em todas as células B. No interior dos linfócitos B, o genoma linear do EBV torna-se circular para formar um epissomo no núcleo da célula. As células B contendo o vírus latente são, então, imortalizadas. A base da imortalização das células B pelo EBV é complexa. Parece que a proteína de membrana latente 1 (LMO-1) está envolvida, impedindo a apoptose das células B através da regulação positiva da expressão do *bcl-2*; além disso, ativa as vias de promoção de crescimento, que normalmente são deflagradas por sinais oriundos das células T (COTRAN et al., 2000).

Outra associação bem estabelecida é a da infecção pelo vírus da hepatite (HBV) e o hepatocarcinoma (PAGANO, 1984). O HBV codifica um elemento regulador, denominado proteína *Hbx*, que desorganiza o controle normal de crescimento dos hepatócitos infectados através da ativação transcricional de vários genes promotores do crescimento, como o fator de

crescimento II semelhante à insulina (IGF-II) e receptores do IGF-IR. A proteína *Hbx* liga-se ao p53 e parece interferir nas suas atividades de supressão do crescimento (COTRAN et al., 2000).

#### **d) Estimulação antigênica crônica e regulação imune**

O tecido transplantado poderia estimular cronicamente o sistema retículo-endotelial. (ARMSTRONG et al., 1962; SCHWARTZ et al., 1965; WALFORD, 1966; SMITHERS et al., 1969). Schwartz (1972) sugere que a estimulação antigênica crônica impediria o mecanismo de *feedback* que normalmente controla a extensão das reações imunes. Isto acarretaria proliferação linfóide continuada, com ativação viral e proliferação de linfócitos transformados.

#### **e) HLA e câncer**

Existe uma forte associação entre alguns antígenos do Sistema HLA e a ocorrência de determinados tumores. A susceptibilidade do carcinoma de nasofaringe é associada com A2, Bw46 em chineses e com A29 em Africanos, este último com risco relativo (RR) de 19,6. O antígeno B37 em indivíduos da raça negra aumenta o RR de linfoma para 37,59 e DR5 em caucasóides do Mediterrâneo apresenta RR de Sarcoma de Kaposi de 12,7. O DR5 também é associado ao câncer de rim com RR de 4,7 (HORS et al., 1984).

#### **f) Ação neoplásica direta das drogas imunossupressoras:**

A Aza pode ocasionar quebra nos cromossomos e anormalidades nucleares em humanos e animais (JENSEN, 1967). Parece que a aza potencializa o efeito oncogênico de outros agentes, como por exemplo a luz UV, aumentando o risco de câncer de pele (KORANDA et al., 1975). Outra evidência da ação neoplásica das drogas imunossupressoras tem sido o aumento na incidência de linfomas em pacientes tratados com CsA (PENN I, 1987), anticorpo monoclonal anti-CD3 (OKT3), globulina anti-linfocítica (ALG) ou globulina anti-timocítica (ATG) (SWINNEN et al., 1990, OPELZ et al., 1993).

## 5. CARCINOSSARCOMA 256 DE WALKER

O tumor de Walker foi descoberto em 1928 por Gerge Walker na Universidade de Johns Hopkins, que observou uma massa tumoral na glândula mamária de uma rata albina prenha, que regredia temporariamente durante o período de lactação. O exame hispotatológico revelou um adenocarcinoma. O tumor foi transplantado para outros ratos albinos com índice de pega de 56%. (EARLE, 1935)

Após sucessivos transplantes, a neoplasia apresentou variações morfológicas, assumindo formas carcinomatosa, sarcomatosa mista e carcinossarcomatosa. Fisher e cols (1961) descreveram três tipos de células do tumor de Walker. Uma célula característica da variante carcinomatosa, de forma poligonal ou arredondada, núcleo volumoso, esférico ou ovóide, cromatina condensada na periferia e nucléolo proeminente. Um segundo padrão de célula sarcomatoso, geralmente fusiforme, com características semelhantes aos fibroblastos neoplásicos. O terceiro tipo de células indiferenciadas, pequenas densamente coradas, de forma arredondada, poligonal ou alongada, citoplasma escasso e núcleo de cromatina grumosa, sendo encontradas freqüentemente entre as células de padrão carcinomatoso.

Metástases do tumor de Walker, após inoculação por via intramuscular, têm sido observadas nos rins, baço, pulmões, fígado, supra-renais, medula óssea, coração e língua (IWANA DE MATTOS et al., 1980).

Fatores que interferem no crescimento do tumor são o sexo e a idade do animal, sendo relatado crescimento mais lento nos ratos muito jovens ou muito idosos ou nas ratas. (KATONA, 1972; CALDAROLA, 1968).

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1. Avaliar os efeitos da Rapamicina na regressão tumoral e no crescimento tumoral em animais inoculados com o carcinoma 256 de Walker e comparar estes efeitos com aqueles obtidos com imunossupressoras: Ciclosporina microemulsão ou Micolonolato.

2.2. Avaliar os efeitos da Rapamicina na regressão tumoral e no crescimento tumoral em animais inoculados com o carcinoma 256 de Walker, em condições de imunossupressão induzida por ciclosporina microemulsão.

2.3. Avaliar o efeito da Rapamicina na regressão do carcinoma 256 de Walker inoculado em animais.

2.4. Avaliar o efeito do Micolonolato moleto na regressão do carcinossarcoma 256 de Walker inoculado em animais.

2.5. Comparar o crescimento do carcinossarcoma de Walker em suspensão celular isolada com o sem gradiente de ficoll-hypaque.

2.6. Avaliar o efeito da Rapamicina na regressão tumoral do carcinoma 256 de Walker utilizando suspensão celular isolada em ficoll-hypaque.

# OBJETIVOS

## **1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito das drogas imunossupressoras Rapamicina, Micofenolato mofetil e Ciclosporina microemulsão sobre o crescimento ou regressão tumoral, utilizando modelo experimental de ratos Wistar inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, que apresenta baixo índice metastático.

## **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2. 1. Avaliar os efeitos da Rapamicina usada isoladamente sobre o crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e comparar estes efeitos com aqueles de outras drogas imunossupressoras: Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato mofetil;

2. 2. Avaliar o efeito da associação de Rapamicina com outras drogas imunossupressoras, Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato mofetil, sobre o crescimento tumoral, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker;

2. 3. Avaliar o efeito da Rapamicina na regressão do carcinossarcoma 256 de Walker inoculado em animais;

2. 4. Avaliar o efeito do Micofenolato mofetil na regressão do carcinossarcoma 256 de Walker inoculado em animais;

2. 5. Comparar o crescimento do carcinossarcoma de Walker utilizando suspensão celular isolada com e sem gradiente de ficoll-hypaque;

2. 6. Avaliar o efeito da Rapa na regressão tumoral do carcinossarcoma 256 de Walker utilizando suspensão celular isolada com gradiente de ficoll-hypaque.

# MATERIAIS

## E

# MÉTODOS

## I - MATERIAIS

### 1. Equipamentos, Reagentes e Vidraria

Azul tripano 0,45%

Álcool etílico 70% (Toper Alcool ®)

Água destilada

Soro fisiológico 0,9% - B Braun®

Ficoll-Paque™ Plus – frasco de 500ml - lote 290047

Gentamicina 80mg - Ariston®

Éter sulfúrico -

Formol 10% - Quimex

Azeite de oliva - Torremolinos

BD Descartex® - Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda

Seringas de 1, 3, 5, 10 ml – Plastopak®, Becton Dickinson, Ltda, Brasil

Agulhas 21G – Indústrias Cirúrgicas e Ópticas S. A. Brasil

Luvas de procedimento- Embramac

Tubos de endorf 1,5 ml – Analítica, Ltda

Tubos de 3ml contendo EDTA - Becton Dickinson, Ltda, Brasil

Tubos de Fisher de 1ml - Biosystems

Placas de Petri – Pirex®

Ponteiras amarelas e azuis – Analítica, Ltda

Pipetas automáticas de 20, 100 e 200 µl - Gilson®

Pipeta Pasteur P200 - Dropette™

Papel alumínio -

Graal e pistilo

Material cirúrgico

Paquímetro – Marberg®

Microscópio Óptico NIKON FX-35DX com LABOPHOT-2, Japão

Máquina fotográfica Cânon EOS 5000

Filmes 35mm para foto em cores FUJI Photofilm da Amazônia Ltda

Balança para pesagem de animais (tara de 0 a 2000 g, Mettler P3, USA)

Centrífuga Fisher Centrifuge Model 59

Capela com luz ultravioleta

Ringer com lactato – Laboratório Madrevita® Ltda: frasco de 500ml contendo 109 mEq/l de cloreto, 129,0 mEq/l de sódio, 4,0 mEq/l de potássio, 2,7 mEq/l de cálcio, 26,8 mEq/l de lactato.

## 2. ANIMAIS

Duzentos ratos Wistar machos, com 4 a 8 semanas de vida, pesando entre 100 e 160g, provenientes do Biotério da Universidade de Fortaleza e do Biotério do Instituto Evandro Chagas (PA), foram utilizados nos experimentos com carcinossarcoma 256 de Walker.

Estes animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração balanceada (Fri-Ribe) e água mineral Indaiá® “*ad libitum*” durante todo o experimento.

Todas as manipulações dos animais foram realizadas seguindo a bioética da manipulação de animais em estudos experimentais.

## 3. DROGAS

### 3. 1. Rapamicina

A Rapamicina (Rapamune ®) foi obtida da Wyeth, na forma de solução oral contendo 1mg/ml da droga, armazenada em envelopes de 2ml (lotes 3004076 e 3004201). A droga foi conservada a 4°C e protegida da luz durante todo o período de utilização. A dose de 1,5mg/kg/dia foi administrada por via oral.

$$\text{Dose } (\mu\text{l}) = \text{peso (g)} \times 1,5$$

### 3. 2. Micofenolato Mofetil

O Micofenolato Mofetil (CellCept®) foi obtido da Roche Indústria Brasileira, em comprimidos contendo 500mg da droga (lote B1076). Os comprimidos foram macerados em capela devido à sua toxicidade pulmonar, utilizando graal e pistilo até obter uma fina pasta e, posteriormente, diluído em água destilada até uma solução final de 25mg/ml. Esta solução foi armazenada a 4°C durante todo o experimento e administrada por via oral na dose de 10mg/kg/dia.

$$\text{Dose } (\mu\text{l}) = \frac{\text{peso (g)} \times 2}{5}$$

### 3. 3. Ciclosporina A

A Ciclosporina microemulsão (Sandimmun Neoral®) foi obtida da Novartis na forma de frascos de solução oral de 100mg/ml da droga (lote 312MFB0700) O frasco foi conservado a 4°C durante todo o período de utilização. A droga foi administrada por via oral na dose de 10mg/kg/dia.

$$\text{Dose } (\mu\text{l}) = \frac{\text{peso (g)}}{10}$$

### 3. 4. Cloridrato de Cetamina

A cetamina (Dopalen ®) foi obtida da Agribrands do Brasil Ltda, na forma de frasco ampola de 5ml com 1g (lote 529/01). A droga foi administrada por via intraperitoneal, na dose de 90mg/kg.

$$\text{Dose (ml)} = \left( \frac{\text{peso (g)} \times 0,09}{57,5} \right)$$

### 3. 5. Cloridrato de Xilazina

A xilazina (Anasedan®) foi obtida da Agribrands do Brasil Ltda, na forma de frasco ampola de 100ml contendo 2g (lote 253/01). A droga foi administrada por via intraperitoneal, na dose de 10mg/kg.

$$\text{Dose (ml)} = \left( \frac{\text{peso (g)} \times 20}{100} \right)$$

## II - MÉTODOS

### 1. PROTOCOLO DE ESTUDO

Este estudo foi dividido em 2 etapas, conforme esquematizado na **figura 19**:

**Etapa 1:** Avaliação do efeito das drogas imunossupressoras, usadas isoladamente ou em associação, sobre o crescimento ou regressão do carcinossarcoma 256 de Walker inoculado em ratos;

**Etapa 2:** Testar uma nova técnica de separação das células do carcinossarcoma 256 de Walker;

## PRIMEIRA ETAPA

**“Avaliação do efeito das drogas imunossupressoras sobre o crescimento e formação de metástases ou a regressão de tumor, em animais inoculados com células do carcinosarcoma 256 de Walker”.**

1.1. Material e métodos

1.1.1. Material

1.1.1.1. Animais

### 1.2. Preparação do tecido tumoral

Os animais doadores de tumor foram anestesiados com ketamina e sacrificados por deslocamento cervical. O tumor tumoral a coxa direita foi dissecado em camadas e fragmentado em fragmentos de 1 cm<sup>3</sup>, lavados com solução estéril de Ringer com lactato e Ringer com lactato e estérilizados, e retiraram-se fragmentos tumores isentossos. Estes fragmentos foram colocados em placa de Petri contendo gentamicina a 0,45% e Ringer com lactato na proporção de 1:10 triturados e homogeneizados. O material foi lavada uma vez em câmara de Neubauer e corado com azul triplo para contagem celular. A suspensão foi ajustada para manter  $1 \times 10^6$  células por

### 1.3. Técnica implantação do carcinosarcoma 256 de Walker

Após leve sedação do animal com éter sulfúreo, 0,1 ml de células tumorais, contendo  $1 \times 10^6$  células, foi injetada por via subcutânea na região dorsal próxima à axila direita. O procedimento foi realizado

Nos animais doadores, 100 mg de suspensão celular foram injetados intramuscular na coxa direita durante o período de anestesia. Os animais foram pesados a 7, 10 e 150g (figura 16). Em cada grupo, foram utilizados 10 animais doadores de tumor

# 1. METODOLOGIA UTILIZADA NA IMPLANTAÇÃO DO CARCINOSSARCOMA 256 DE WALKER EM RATOS WISTAR.

## 1. 1. Linhagem tumoral

A linhagem celular do carcinossarcoma 256 de Walker foi fornecida pelo Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Esta linhagem tumoral é mantida pela inoculação intramuscular de  $1 \times 10^6$  células tumorais na coxa direita traseira de ratos Wistar machos doadores de tumor, a cada 7 dias.

## 1. 2. Preparação do inóculo celular e repicagem

Os animais doadores de tumor foram anestesiados com xilazina e ketamina e sacrificados por deslocamento cervical no 7º dia após o implante tumoral. A coxa direita foi dissecada, em capela, utilizando material esterilizado, e retiraram-se fragmentos tumorais isentos de tecido necrótico. Estes fragmentos foram colocados em placa de Petri contendo solução de gentamicina a 0,45% e Ringer com lactato na proporção de 1:10 e, em seguida, triturados e homogeneizados. O material, uma vez filtrado, foi colocado em câmara de Newbauer e corado com azul tripano para avaliar a viabilidade celular. A suspensão foi ajustada para manter  $1 \times 10^6$  células tumorais/ml.

## 1. 3. Técnica implantação do carcinossarcoma 256 de Walker

Após leve sedação do animal com éter sulfúrico, 1ml da suspensão de células tumorais, contendo  $1 \times 10^6$  células, foi injetada por via subcutânea na região dorsal próxima à axila direita, utilizando seringa de insulina (**figura 15**).

Nos animais doadores, 1ml da suspensão celular foi injetado por via intramuscular na coxa direita dianteira de ratos Wistar machos, pesando entre 100 a 160g (**figura 16**). Em cada etapa do estudo foram preparados de 7 a 10 animais doadores de tumor.



**Figura 15.** Rato Wistar exibindo crescimento de carcinossarcoma 256 de Walker na região axilar direita 10 dias após a injeção subcutânea de 1ml de suspensão contendo  $1 \times 10^6$  células tumorais. Foto no 10º dia após implante tumoral



**Figura 16.** Rato Wistar exibindo crescimento de carcinossarcoma 256 de Walker na coxa direita de animal doador 7 dias após a injeção intramuscular de 1ml de suspensão contendo  $1 \times 10^6$  células tumorais. Foto no 7º dia após implante tumoral.

#### 1. 4. Curva de Crescimento Tumoral

A medida do tumor foi realizada diariamente utilizando-se um paquímetro manual. Os dois maiores diâmetros foram registrados e o volume tumoral calculado através da fórmula de **Steel (1977)**:

$$V \text{ (cm}^3\text{)} = D \times d^2 / 2$$

onde, **V** = volume tumoral, **D** = maior diâmetro tumoral, **d** = menor diâmetro tumoral

A média dos volumes tumorais de cada grupo de animais foram dispostas em gráfico relacionadas ao tempo em dias decorridos após a inoculação do tumor.

#### 1. 5. Inibição do crescimento tumoral

A inibição do crescimento tumoral foi calculada a partir da média do peso tumoral (MTW), em mg, no término do tratamento (ENG et al., 1984)

$$T/C \% = \frac{\text{MTW (grupo de tratamento)}}{\text{MTW (grupo controle)}} \times 100$$

$$\% \text{ inibição} = (100 - T/C \%)$$

## 2. PROTOCOLOS

### 2. 1. Avaliação do efeito de drogas imunossupressoras, usadas isoladamente, sobre o crescimento tumoral e formação de metástases, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker.

Quarenta ratos Wistar machos, com 4 a 8 semanas de vida, pesando entre 110 e 190g foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 10 ratos cada, de acordo com o esquema imunossupressor recebido:

**Grupo 1 (G1), n=10: Controle - Cont**, água mineral administrada por via oral;

**Grupo 2 (G2), n=10: Rapamicina – Rapa**, na dose de 1,5mg/kg/dia, administrada por via oral;

**Grupo 3 (G3), n=10: Ciclosporina microemulsão – CsA**, na dose de 10mg/kg/dia, administrada por via oral;

**Grupo 4 (G4), n=10: Micofenolato Mofetil – MMF**, na dose de 10mg/kg/dia, diluído em água destilada e administrado por via oral.

O esquema imunossupressor foi iniciado **24 horas antes** do implante tumoral. As drogas foram administradas por via oral utilizando pipetas automáticas de 20, 100 e 200  $\mu$ l (**figura 17**).

Após leve sedação com éter sulfúrico, todos os grupos de animais foram inoculados com células da linhagem do carcinossarcoma 256 de Walker na concentração de  $1 \times 10^6$  células, por via subcutânea, na região dorsal do animal, utilizando seringa de insulina.

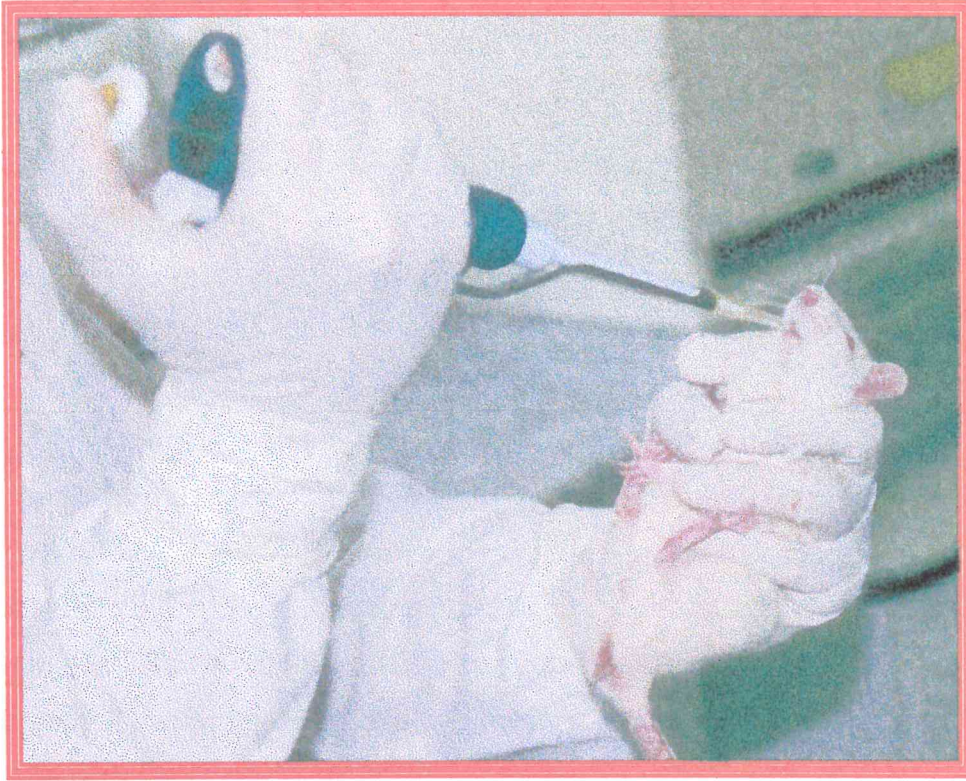
Os animais de cada grupo foram pesados a cada 2 dias e o tumor mensurado diariamente para realização das curvas de ganho de peso e de crescimento tumoral, respectivamente.

No 10º dia do experimento, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina e sacrificados por exsanguinação.

**Análise bioquímica:** O sangue foi coletado, 24 horas após a última dose de CsA, em tubos de 3ml contendo EDTA e o material armazenado a 4°C até a determinação do seu nível sangüíneo, através de anticorpo monoclonal por iluminescência polarizada utilizando o aparelho m-TDX (Abbott).

**Análise histológica:** Todos os animais sacrificados foram necropsiados para análise macroscópica e pesquisa de metástases no fígado, baço, pulmão. Os órgãos com suspeita de metástase foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, cortados no micrótomo na espessura de 4 a 6  $\mu$ , corados pela técnica de hematoxilina-eosina e analisados em microscópica óptica. Os parâmetros analisados foram a infiltração de pequenas células neoplásicas indiferenciadas (NIPC), a necrose tecidual, a infiltração de células granulocíticas e as áreas de hemorragia. Cada parâmetro foi avaliado por um observador não cego e quantificado como leve (+), moderado (++) ou intenso (+++).

Figura 17. Todas as drogas utilizadas foram analisadas por métodos automáticos através de pipetas automáticas de 20, 10 e 5  $\mu$ l.



**Figura 17.** Todas as drogas utilizadas no estudo foram administradas por via oral através de pipetas automáticas de 20, 100 e 200  $\mu$ l.

## 2. 2. Avaliação do efeito da associação de Rapamicina com Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato mofetil sobre o crescimento tumoral e formação de metástases, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker.

Trinta e cinco ratos Wistar machos, com 4 a 8 semanas de vida, pesando entre 97 e 162 g, foram divididos aleatoriamente em 3 grupos de 9 ratos cada e um grupo de 8 ratos, de acordo com o esquema imunossupressor recebido:

**G1 (n=8, Cont):** água mineral administrada por via oral;

**G2 (n=9, Rapa):** Rapa, na dose de 1,5mg/kg/dia, administrada por via oral;

**G3 (n=9, CsA + Rapa):** CsA microemulsão, na dose de 10mg/kg/dia, e Rapa, na dose de 1,5mg/kg/dia, administradas por via oral;

**G4 (n=9, MMF + Rapa):** MMF, na dose de 10mg/kg/dia, diluído em água destilada e Rapa, na dose de 1,5mg/kg/dia, ambos administrados por via oral.

O esquema imunossupressor foi iniciado **24 horas antes** do implante tumoral. As drogas foram administradas por via oral utilizando pipetas automáticas de 20, 100 e 200 µl.

Após leve sedação com éter sulfúrico, todos os grupos de animais foram inoculados com células da linhagem do carcinossarcoma 256 de Walker na concentração de  $1 \times 10^6$  células, por via subcutânea, na região dorsal do animal, utilizando seringa de insulina.

Os animais de cada grupo foram pesados e o tumor mensurado a cada 2 dias para realização das curvas de ganho de peso e de crescimento tumoral, respectivamente.

No 10º dia do experimento, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina e sacrificados por exsangüinação.

**Análise bioquímica:** O sangue foi coletado, 24 horas após a última dose de CsA, em tubos de 3ml contendo EDTA para determinação do seu nível sangüíneo.

Devido à mortalidade elevada neste experimento, o protocolo foi repetido com trinta e cinco animais pesando entre 107 e 163 g, que foram divididos aleatoriamente em 3 grupos de 9 ratos cada e um grupo de 8 ratos, de acordo com o mesmo esquema imunossupressor, já descrito

**G1 (n=9, Cont); G2 (n=8, Rapa); G3 (n=9, CsA + Rapa); G4 (n=9, MMF + Rapa).**

O protocolo de avaliação foi o mesmo já descrito, exceto a curva de crescimento tumoral, que foi realizada diariamente.

As drogas foram administradas por via oral, em doses automáticas de 20, 100 µl.

Após leve sedação com éter etílico, todos os grupos foram inoculados com células de linhagem do carcinoma  $2 \times 10^6$  em concentração de  $1 \times 10^6$  células, por via subcutânea, em cada animal, utilizando seringa de insulina.

Os animais de cada grupo foram pesados e a evolução mensurada diariamente para realização das curvas de crescimento tumoral, respectivamente.

No 10º dia do experimento, os animais foram anestesiados e cetamina e sacrificados por exsanguinação.

**Análise bioquímica:** O sangue foi coletado, 24 horas após a última dose de CsA, em tubos de 3ml contendo EDTA para determinação do seu nível sangüíneo.

### **2. 3. Avaliação do efeito da associação do Micofenolato mofetil com a Ciclosporina microemulsão sobre o crescimento tumoral e formação de metástases, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker.**

Vinte e quatro ratos Wistar machos, com 4 a 8 semanas de vida, pesando entre 128 e 190 g, foram divididos aleatoriamente em 3 grupos de 10 ratos cada, de acordo com o esquema imunossupressor recebido:

**G1 (n=7, Cont):** água mineral administrada por via oral;

**G2 (n=9, CsA):** CsA microemulsão, na dose de 10mg/kg/dia

**G3 (n=8: MMF + CsA):** MMF, na dose de 10mg/kg/dia, diluído em água destilada e CsA microemulsão, na dose de 10mg/kg/dia, ambos administrados por via oral

O esquema imunossupressor foi iniciado **24 horas antes** do implante tumoral. As drogas foram administradas por via oral utilizando pipetas automáticas de 20, 100 µl.

Após leve sedação com éter etílico, todos os grupos de animais foram inoculados com células da linhagem do carcinossarcoma 256 de Walker na concentração de  $1 \times 10^6$  células, por via subcutânea, na região dorsal do animal, utilizando seringa de insulina.

Os animais de cada grupo foram pesados a cada 2 dias e o tumor mensurado diariamente para realização das curvas de ganho de peso e de crescimento tumoral, respectivamente.

No 10º dia do experimento, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina e sacrificados por exsanguinação.

**Análise bioquímica:** O sangue foi coletado, 24 horas após a última dose de CsA, em tubos de 3ml contendo EDTA para determinação do nível seu sanguíneo.

## **2. 4. Avaliação do efeito da Rapamicina e do Micofenolato Mofetil sobre a regressão do carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea de ratos Wistar.**

Vinte e seis ratos Wistar machos, com 4 a 8 semanas de vida, pesando entre 107 e 210 g, foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, de acordo com o esquema imunossupressor recebido:

**G1 (n=7, Cont):** água mineral administrada por via oral;

**G2 (n=10, Rapa):** Rapa, na dose de 1,5mg/kg/dia, administrada por via oral;

**G3 (n=9, MMF):** MMF, na dose de 10mg/kg/dia, diluído em água destilada e administrado por via oral;

As drogas imunossupressoras foram iniciadas **no 4º dia após o implante tumoral** e administradas durante 7 dias por via oral utilizando pipetas automáticas de 20, 100 e 200 µl.

Após leve sedação com éter sulfúrico, todos os grupos de animais foram inoculados com células da linhagem do carcinossarcoma 256 de Walker na concentração de  $1 \times 10^6$  células, por via subcutânea, na região dorsal do animal, utilizando seringa de insulina.

Os animais de cada grupo foram pesados a cada 2 dias e o tumor mensurado diariamente para realização das curvas de ganho de peso e de crescimento tumoral, respectivamente.

No 10º dia do experimento, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina e sacrificados por exsangüinação.

## SEGUNDA ETAPA

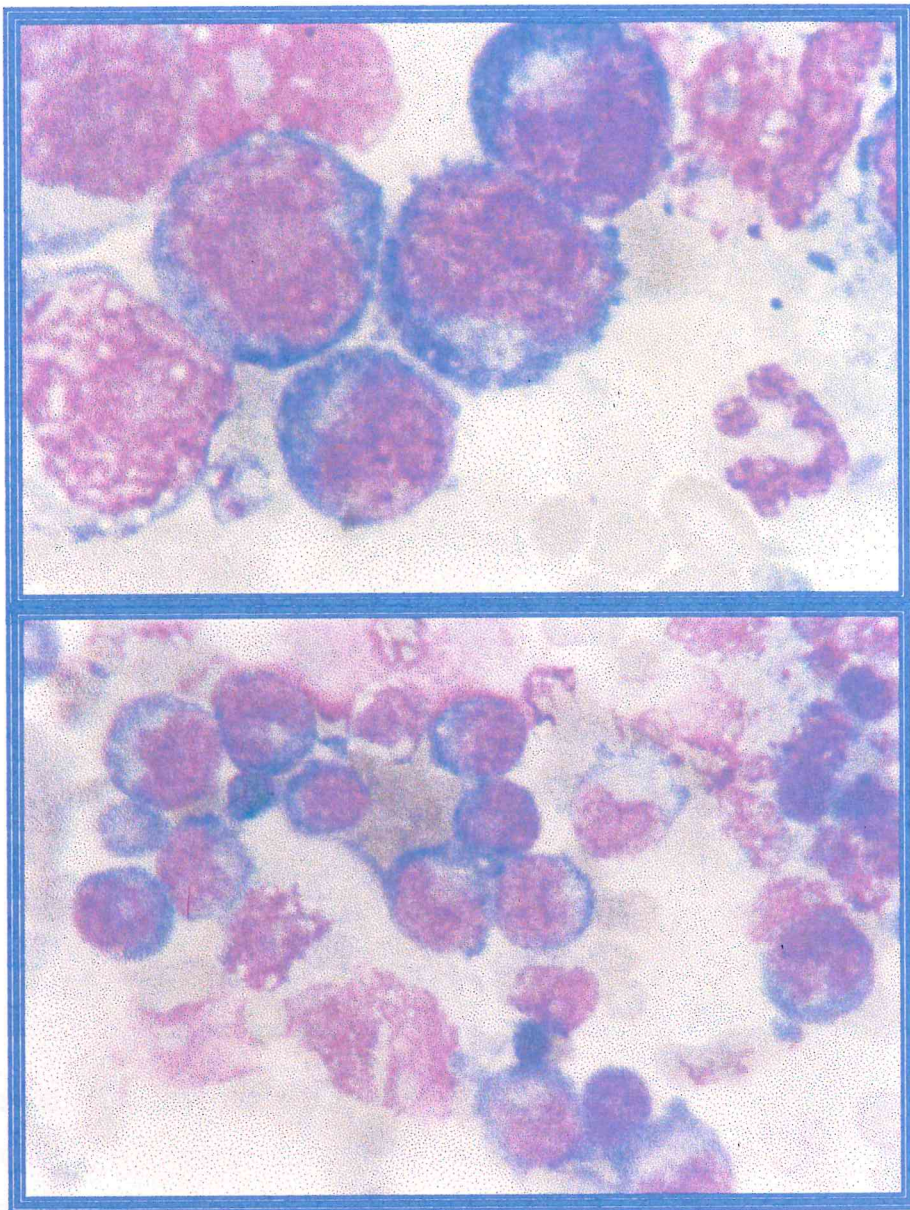
### “MODIFICAÇÃO NA TÉCNICA DE IMPLANTAÇÃO DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER, UTILIZANDO O GRADIENTE DE FICOLL-HYPAQUE PARA ISOLAMENTO DAS CÉLULAS TUMORAIS”

5.500 gpm durante 3 minutos. O conteúdo do tubo foi retirado com pipeta Pasteur e colocado em tubo com gentamicina e Ringer com lactato (10 a 15 gotas) e centrifugada a 1.000 gpm durante 1 minuto. O sobrenadante sedimentado ressuspenso com a solução de gentamicina e Ringer novamente centrifugada a 1.000 gpm durante 1 minuto. O sobrenadante novamente descartado e o sedimento diluído com solução de Ringer com lactato e 1 gota da suspensão celular foi colocada em câmara Newbauer e corada com azul tripano para avaliar a viabilidade. A suspensão foi ajustada para manter  $1 \times 10^6$  células tumorais/ml. As figuras 1 e 16b mostram as suspensões celulares tumorais obtidas com as técnicas sem e com gradiente de ficoll para a separação celular.

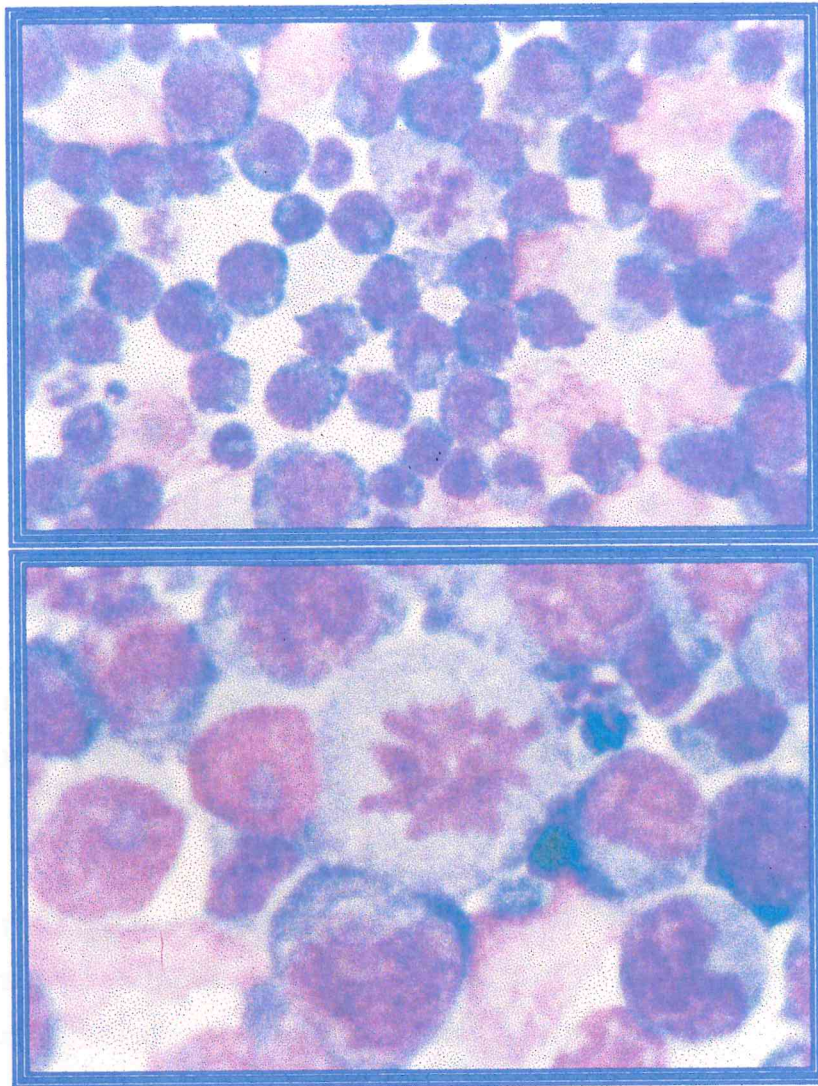
## 1. PREPARAÇÃO DO INÓCULO CELULAR

Os animais doadores de tumor foram anestesiados com xilazina e ketamina e sacrificados por deslocamento cervical no 7º dia após implante tumoral. A coxa direita foi dissecada, utilizando material esterilizado, e fragmentos tumorais isentos de tecido necrótico foram retirados. Estes fragmentos foram colocados em placa de Petri contendo solução de gentamicina a 0,45% e Ringer com lactato na proporção de 1:10 e, em seguida, triturados e homogeneizados. O material, uma vez filtrado, foi colocado em tubos de 1ml de Fisher contendo 0,2ml de Ficoll-Hypaque e centrifugado a 5.500 gpm durante 3 minutos. O anel de células localizado sobre o ficoll foi retirado com pipeta Pasteur e colocado em novo tubo de Fisher e a solução de gentamicina e Ringer com lactato foi acrescentada e, posteriormente, centrifugada a 1.000 gpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso com a solução de gentamicina e Ringer com lactato e novamente centrifugada a 1.000 gpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento diluído com solução de gentamicina e Ringer com lactato e 1 gota da suspensão celular foi colocada em câmara de Neubauer e corada com azul tripano para avaliar a viabilidade celular. A suspensão foi ajustada para manter  $1 \times 10^6$  células tumorais/ml. As **figuras 18<sup>a</sup> e 18<sup>b</sup>** mostram as suspensões celulares tumoral obtidas com as duas técnicas, sem e com gradiente de ficoll para a separação celular.

Figura 18a. Estreço de células do carcinossarcoma 258 J: V. H. e W. H. com gentamicina e eosina: suspensão celular obtida a partir de tumor fragmentado, homogeneizado em solução de ringer com lactato e filtrado (aumento de 400X e 1000X, respectivamente)



**Figura 18a.** Esfregaço de células do carcinossarcoma 256 de Walker coradas com hematoxilina e eosina: suspensão celular obtida a partir de tecido tumoral fragmentado, homogeneizado em solução de ringer com lactato e gentamicina e filtrado (aumento de 400X e 1000X, respectivamente).



**Figura 18b.** Esfregaço de células do carcinossarcoma 256 de Walker coradas com hematoxilina e eosina: suspensão celular obtida a partir de tecido tumoral fragmentado, homogeneizado em solução de ringer com lactato e gentamicina, filtrado e centrifugado em gradiente de ficoll-hypaque (aumento de 400X e 1000X, respectivamente);

## 2. PROTOCOLOS

### 2. 1. Comparação da curva de crescimento tumoral do carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando ou não o gradiente de Ficoll-Hypaque para isolamento das células tumorais antes da implantação em animais.

Vinte ratos Wistar machos, com 4 a 6 semanas de vida, pesando entre 124 e 180 g, foram divididos aleatoriamente em 2 grupos de 10 ratos cada, de acordo com a técnica de preparação da célula tumoral utilizada:

**G1 (n=10): sem gradiente de ficoll;**

**G2 (n=10): com gradiente de ficoll.**

Após leve sedação com éter sulfúrico, todos os grupos de animais foram inoculados com células da linhagem do tumor de Walker na concentração de  $1 \times 10^6$  células, por via subcutânea, na região dorsal do animal, utilizando seringa de insulina.

Os animais de cada grupo foram pesados a cada 3 dias e o tumor mensurado diariamente para realização das curvas de ganho de peso e de crescimento tumoral, respectivamente.

No 10<sup>o</sup> dia do experimento, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina e sacrificados por exsanguinação.

**Análise histológica:** Todos os animais sacrificados foram necropsiados para análise macroscópica e pesquisa de metástases no fígado, baço, pulmão. Os órgãos com suspeita de metástase foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, cortados no micrótomo na espessura de 4 a 6  $\mu$ , corados pela técnica de hematoxilina-eosina e analisados em microscópica óptica. Os parâmetros analisados foram a infiltração de pequenas células neoplásicas indiferenciadas (NIPC), a necrose tecidual, a infiltração de células granulocíticas e as áreas de hemorragia. Cada parâmetro foi avaliado por um

observador não cego e quantificado como leve (+), moderado (++) ou intenso (+++).

## **2. 2. Avaliação do efeito do Rapamicina na regressão do carcinossarcoma 256 de Walker, em modelo animal empregando células tumorais isoladas com gradiente de Ficoll-Hypaque.**

Vinte ratos Wistar machos, com 4 a 6 semanas de vida, pesando entre 90 e 160g, foram divididos aleatoriamente em 2 grupos de 10 ratos cada, de acordo com o esquema imunossupressor recebido:

**G1 (n=10, Cont):** azeite de oliva administrado por via oral;

**G2 (n=10, Rapa)** Rapa na dose de 1,5mg/kg/dia e administrada por via oral.

O esquema imunossupressor foi iniciado no **4º dia após o implante tumoral**. As drogas foram administradas por via oral utilizando pipetas automáticas de 20, 100 e 200 µl.

Após leve sedação com éter sulfúrico, todos os grupos de animais foram inoculados com células da linhagem do tumor de Walker na concentração de  $1 \times 10^6$  células, por via subcutânea, na região dorsal do animal, utilizando seringa de insulina.

Os animais de cada grupo foram pesados a cada 2 dias e o tumor mensurado diariamente para realização das curvas de ganho de peso e de crescimento tumoral, respectivamente.

No 14º dia do experimento, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina e sacrificados por exsanguinação.

## ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa de computação *SPSS Data Editor software* (SPSS for Windows software). Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0.05$ . Foi verificada a normalidade dos dados e na hipótese de não normalidade, foi realizada a transformação destes dados. Para comparação dos grupos foi empregado o teste ANOVA para modelos multivariados e para modelos com análise de medidas repetidas ao longo do tempo para comparação dois grupos foi utilizado o teste de Tukey.

Figura 19a. Esquemas dos protocolos de estudos da primeira fase

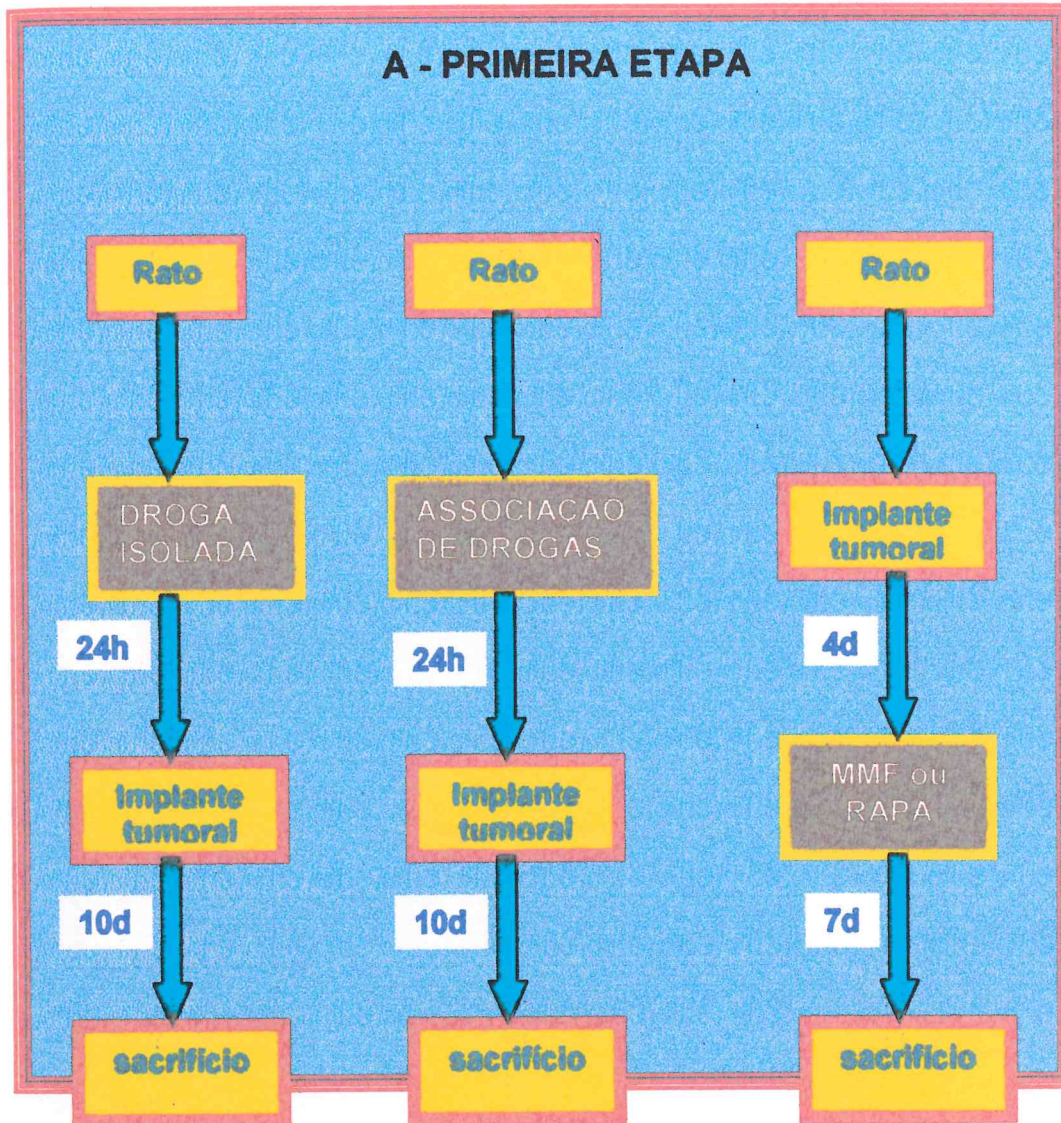
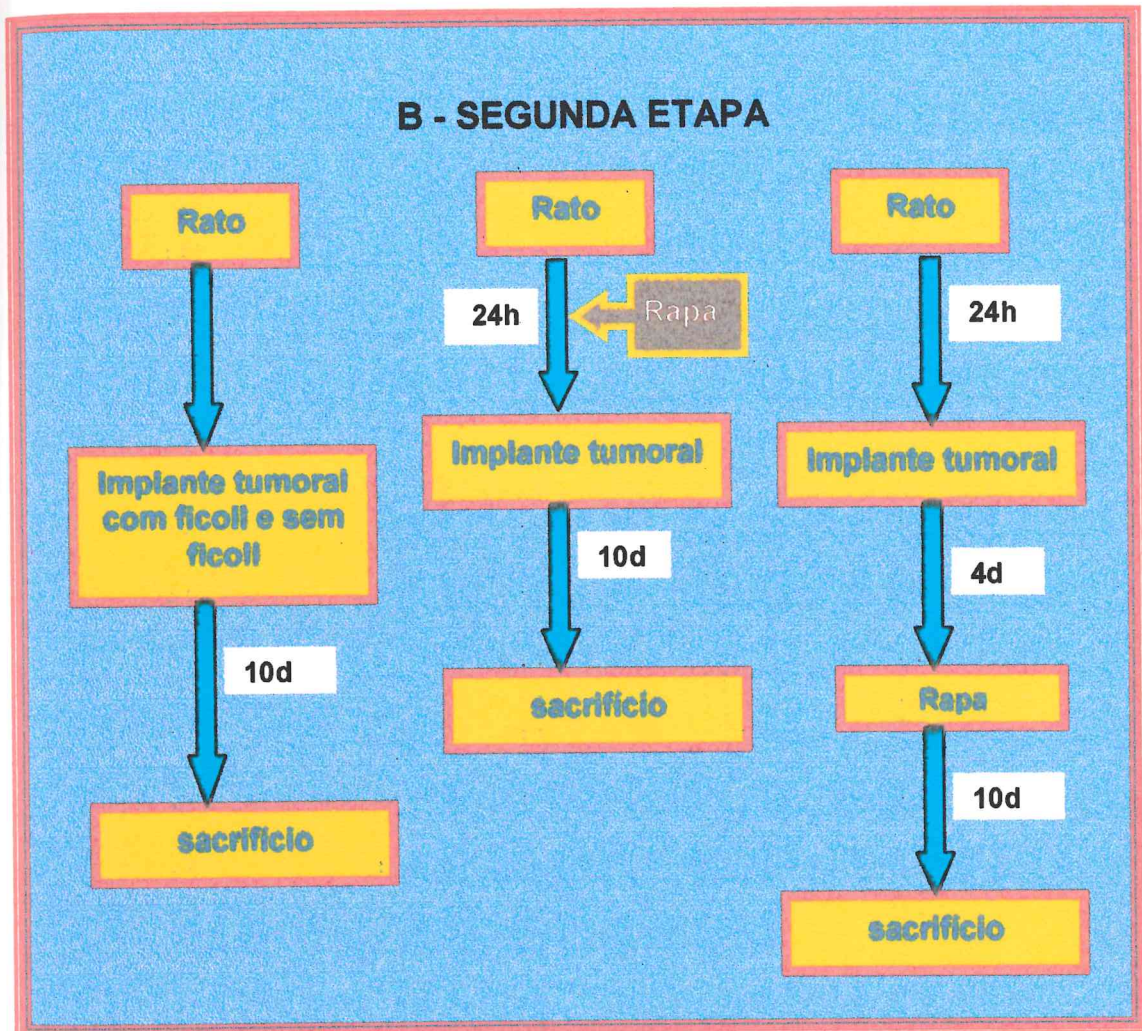


Figura 19b. Esquema do protocolo da segunda fase utilizando a técnica de Ficoll-Hypaque para isolamento das células tumorais



# RESULTADOS

## PRIMEIRA ETAPA

**“Avaliação do efeito das drogas imunossupressoras sobre o crescimento tumoral e formação de metástases ou a regressão, em animais inoculados com células do carcinossarcoma 256 de Walker”.**

Foram utilizados 100 animais, sendo 50 machos e 50 fêmeas, todos com peso médio de 180 g. Os animais foram divididos em 5 grupos, sendo 20 animais em cada grupo. Os grupos foram: 1) Controle; 2) Ciclofosfamide (CY); 3) Metilglicosaminofosfato (MMF); 4) Ciclofosfamide + Metilglicosaminofosfato (CY+MMF); 5) Ciclofosfamide + Metilglicosaminofosfato + Ciclofosfamide (CY+MMF+CY). Os animais foram inoculados com células do carcinossarcoma 256 de Walker e observados durante 10 dias. Os animais que sobreviveram foram sacrificados e os tumores removidos.

No 10º dia do experimento, o volume tumoral foi menor nos animais tratados com MMF ( $10,3 \pm 2,8 \text{ cm}^3$ ,  $p < 0,05$ ) (figura 2) e Ciclofosfamide (CY) ( $10,3 \pm 2,8 \text{ cm}^3$ ,  $p < 0,05$ ) (figura 2) em relação ao controle ( $14,9 \pm 4,2 \text{ cm}^3$ ; tabelas 1, 2, 4 e figura 2). O volume tumoral foi menor nos animais tratados com MMF e CY em relação aos animais inoculados com MMF, esta diferença não foi significativa. O crescimento tumoral foi significativamente maior nos animais tratados com MMF ( $10,3 \pm 2,8 \text{ cm}^3$ ,  $p < 0,05$ ) (figura 2a) do que naqueles do grupo controle ( $14,9 \pm 4,2 \text{ cm}^3$ ), porém não diferiu do grupo controle e CY ( $10,3 \pm 2,8 \text{ cm}^3$ ,  $p < 0,05$ ) (figura 2b).

Os animais foram sacrificados no 10º dia do experimento e foi detectada metástase tumoral em 10% dos animais pesados.

O peso do tumor foi significativamente menor nos animais tratados com MMF ( $3,1 \pm 1,2 \text{ g}$ ;  $p < 0,05$ ) (figura 3) e Ciclofosfamide (CY) ( $3,1 \pm 1,2 \text{ g}$ ;  $p < 0,05$ ) (figura 3) em relação ao controle ( $5,8 \pm 1,5 \text{ g}$ ;  $p < 0,05$ ) (figura 3).

## 2. 1. Avaliação do efeito das drogas imunossupressoras, usadas isoladamente, sobre o crescimento tumoral e formação de metástases, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker.

**Grupos experimentais:** Grupo 1 (G1), n=10: Controle - Cont, água mineral administrada por via oral; Grupo 2 (G2), n=10: Rapamicina – Rapa, na dose de 1,5 mg/kg/dia, administrada por via oral; Grupo 3 (G3), n=10: Ciclosporina microemulsão – CsA, na dose de 10mg/kg/dia, administrada por via oral; Grupo 4 (G4), n=10: Micofenolato Mofetil – MMF, na dose de 10 mg/kg/dia, diluído em água destilada e administrado por via oral.

Todos os animais inoculados com células tumorais desenvolveram tumor e sobreviveram até o final do experimento.

No 10<sup>o</sup> dia do experimento, o volume tumoral foi significativamente menor nos animais tratados com Rapa ( $6,8 \pm 2,7 \text{ cm}^3$ ,  $p < 0,001$ , **figura 22b**) e MMF ( $10,3 \pm 2,8 \text{ cm}^3$ ,  $p < 0,05$ , **figura 21**) quando comparados com o grupo controle ( $14,9 \pm 4,2 \text{ cm}^3$ ; **tabelas 1, 2, 4 e figura 20**). Embora o volume tumoral fosse menor nos animais tratados com Rapa quando comparado com aqueles tratados com MMF, esta diferença não foi significativa ( $p = 0,094$ ). O volume tumoral foi significativamente maior nos animais do grupo da CsA ( $13,9 \pm 3,0 \text{ cm}^3$ , **figura 22a**) do que naqueles do grupo Rapa ( $6,8 \pm 2,7 \text{ cm}^3$ ;  $p < 0,0001$ ), porém não diferiu do grupo controle ( $14,9 \pm 4,2 \text{ cm}^3$ ,  $p = 0,891$ ) nem do grupo MMF ( $10,3 \pm 2,8 \text{ cm}^3$ ;  $p = 0,0789$ , **tabela 3, figura 20**).

Os animais foram sacrificados no 10<sup>o</sup> dia após o implante tumoral. Não foi detectada metástase tumoral em nenhum rato. O tumor foi dissecado e pesado.

O peso do tumor foi significativamente menor nos animais tratados com Rapa ( $3,7 \pm 1,23 \text{ g}$ ) ou com MMF ( $5,2 \pm 2,0 \text{ g}$ ) do que naqueles tratados com CsA ( $8,8 \pm 2,1 \text{ g}$ ) ou com água destilada ( $7,3 \pm 2,0 \text{ g}$ ,  $p \leq 0,001$ , **tabela 5**).

A inibição do crescimento tumoral foi de 49,3%, em média, no grupo da Rapa e de 28,2%, no grupo MMF. Nos animais tratados com CsA houve um crescimento tumoral médio de 20,5%; o peso do tumor neste grupo não apresentou diferença significativa quando comparado ao do grupo controle ( $p=0,288$ , **figuras 23 e 24**).

A análise histológica evidenciou a presença de neoplasia indiferenciada de pequenas células (NIPC) em todos os grupos, com células de aspecto denso ou pseudonucleado, conforme mostrado nas **figuras 25a e 25b**, respectivamente. Infiltração leve (+) foi observada em 50% dos animais do grupo CsA, em 55,6% do grupo MMF, em 77,8% do grupo Rapa, em 55,6% do grupo controle, enquanto que infiltração intensa somente foi detectada nos animais do grupo controle (22,2%). Necrose tumoral ocorreu em todos os grupos, sendo intensa em 33,3% do grupo CsA, em 44,4% do grupo MMF, em 22,2% do grupo controle; moderada em 55,6% dos animais dos grupos CsA e MMF, em 77,8% do grupo Rapa e em 66,7% do grupo controle (**Figura 25c**). Exsudato granulocítico moderado ou leve foi observado em todos os grupos; áreas de hemorragia leve ou moderada foram evidenciadas em 88,9% do grupo MMF, em 44,4% do grupo Rapa e em 55,5% do grupo controle (**Figura 25d, tabela 6**).

O nível médio de ciclosporina, dosada no sangue total em 4 animais mostrou níveis de  $307,9 \pm 142,3$  ng/ml.

O peso corporal dos animais foi semelhante nos quatro grupos (Cont,  $141,3 \pm 19,0$  g; Rapa,  $139,3 \pm 16,3$  g; CsA,  $146,7 \pm 21,8$  g; MMF,  $145,7 \pm 26,9$  g). Todos os animais ganharam peso ao longo do estudo, não havendo diferença entre eles ao final do experimento (Cont,  $152,1 \pm 22,8$  g; Rapa,  $146,4 \pm 19,8$  g; CsA,  $159,4 \pm 19,9$  g; MMF,  $158,9 \pm 21,5$  g;  $p=0,085$ , **tabela 7 , figura 26**).

**Tabela 1.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **água mineral** por via oral, iniciada **24 horas antes** da inoculação tumoral.

Ratos	D4	D5	D6	D7	D8	D10
R1	0,00	0,00	0,41	1,90	5,51	16,
R2	0,00	0,04	0,41	1,57	4,63	9,1
R3	0,00	0,03	0,27	1,52	6,35	23,9
R4	0,00	0,0025	0,22	2,46	3,79	18,4
R5	0,00	0,04	0,17	1,10	1,67	15,4
R6	0,00	0,02	0,16	1,15	5,81	15,4
R7	0,00	0,09	0,11	1,47	4,00	14,4
R8	0,00	0,20	0,67	2,36	3,79	12,2
R9	0,00	0,08	0,13	1,80	2,75	10,9
R10	0,00	0,20	0,49	1,91	3,89	12,5
<b>Média</b>	<b>0,00</b>	<b>0,07</b>	<b>0,30</b>	<b>1,72</b>	<b>4,22</b>	<b>14,89</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>0,07</b>	<b>0,18</b>	<b>0,46</b>	<b>1,42</b>	<b>4,22</b>
<b>EMP</b>	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>	<b>0,08</b>	<b>0,19</b>	<b>0,47</b>	<b>1,72</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

**Tabela 2.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **Rapamicina**, na dose de 1,5mg/kg/dia por via oral, iniciada **24 horas antes** da inoculação tumoral.

Ratos	D4	D5	D6	D7	D8	D10
R1	0,00	0,00	0,08	1,27	2,60	6,35
R2	0,00	0,00	0,00	0,45	1,44	6,61
R3	0,00	0,00	0,05	0,75	2,46	8,06
R4	0,00	0,00	0,04	0,32	0,60	2,03
R5	0,00	0,00	0,13	0,32	0,94	4,20
R6	0,00	0,00	0,14	0,94	2,46	5,32
R7	0,00	0,00	0,08	0,70	1,27	11,80
R8	0,00	0,00	0,45	0,57	1,80	8,75
R9	0,00	0,02	0,22	0,75	3,61	7,81
R10	0,00	0,01	0,29	0,65	0,94	7,14
<b>Média</b>	<b>0,00</b>	<b>0,002</b>	<b>0,15</b>	<b>0,67</b>	<b>1,81</b>	<b>6,81</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>0,006</b>	<b>0,14</b>	<b>0,29</b>	<b>0,95</b>	<b>2,66</b>
<b>EMP</b>	<b>0,00</b>	<b>0,002</b>	<b>0,06</b>	<b>0,12</b>	<b>0,32</b>	<b>1,08</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

DE, 97, 12 - 1996

**Tabela 3.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **Ciclosporina microemulsão**, na dose de 10 mg/kg/dia por via oral, iniciada **24 horas antes** da inoculação tumoral.

Ratos	D4	D5	D6	D7	D8	D10
R1	0,00	0,08	0,51	3,24	8,13	20,0
R2	0,00	0,02	1,96	3,73	6,29	15,3
R3	0,02	0,10	0,67	1,47	5,07	11,7
R4	0,00	0,04	0,60	2,43	3,97	13,5
R5	0,01	0,08	0,32	1,15	4,80	14,3
R6	0,00	0,00	0,32	0,79	6,29	12,2
R7	0,00	0,00	0,25	1,27	4,60	9,4
R8	0,00	0,00	0,60	1,18	5,57	11,8
R9	0,00	0,00	0,22	1,08	5,00	16,4
R10	0,00	0,08	0,38	3,61	3,08	14,0
<b>Média</b>	<b>0,003</b>	<b>0,04</b>	<b>0,58</b>	<b>2,00</b>	<b>5,28</b>	<b>13,86</b>
<b>DP</b>	<b>0,007</b>	<b>0,04</b>	<b>0,51</b>	<b>1,15</b>	<b>1,40</b>	<b>2,96</b>
<b>EMP</b>	<b>0,003</b>	<b>0,02</b>	<b>0,21</b>	<b>0,47</b>	<b>0,47</b>	<b>1,20</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

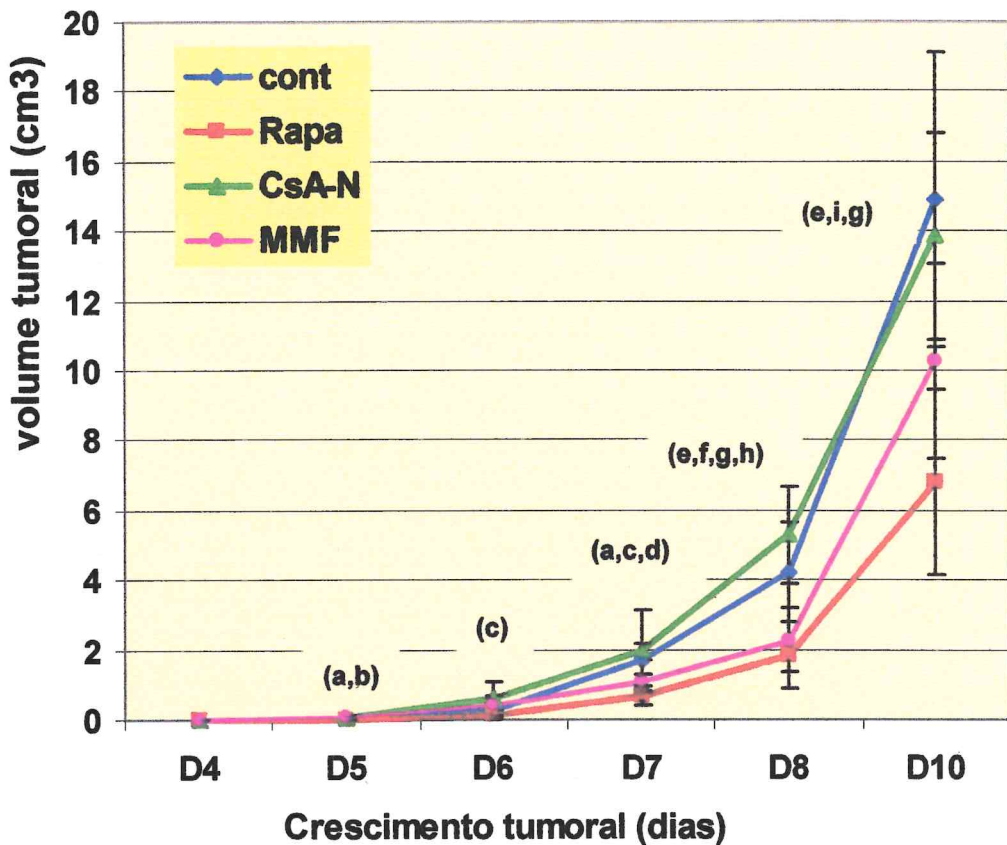
Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

**Tabela 4.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **Micofenolato Mofetil**, na dose de 10 mg/kg/dia por via oral, iniciado **24 horas antes** da inoculação tumoral.

Ratos	D4	D5	D6	D7	D8	D10
R1	0,00	0,03	0,36	0,86	2,60	9,69
R2	0,00	0,05	0,55	0,67	2,18	9,46
R3	0,02	0,13	0,65	2,43	2,89	11,00
R4	0,00	0,13	0,50	1,91	2,43	15,90
R5	0,00	0,00	0,08	0,13	2,03	4,80
R6	0,00	0,04	0,32	0,85	4,20	10,90
R7	0,00	0,00	0,13	0,50	1,08	11,80
R8	0,00	0,13	0,22	1,08	1,47	11,00
R9	0,00	0,14	0,94	1,08	2,43	10,10
R10	0,00	0,05	0,22	1,09	1,27	8,06
<b>Média</b>	<b>0,002</b>	<b>0,07</b>	<b>0,40</b>	<b>1,06</b>	<b>2,26</b>	<b>10,27</b>
<b>DP</b>	<b>0,006</b>	<b>0,06</b>	<b>0,27</b>	<b>0,67</b>	<b>0,91</b>	<b>2,82</b>
<b>EMP</b>	<b>0,003</b>	<b>0,02</b>	<b>0,11</b>	<b>0,27</b>	<b>0,30</b>	<b>1,15</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior, d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.



**Figura 20.** Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral (Cont, n=10), Rapamicina (Rapa, n=10), Ciclosporina microemulsão (CsA, n=10) ou Micoferolato Mofetil (MMF, n=10), administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. (a)  $p < 0,05$  Rapa comparado ao controle; (b)  $p < 0,05$  Rapa comparado ao MMF; (c)  $p < 0,05$  Rapa comparado à CsA; (d)  $p < 0,05$  MMF comparado à CsA; (e)  $p < 0,0001$  Rapa comparado ao controle; (f)  $p < 0,0001$  MMF comparado ao controle; (g)  $p < 0,0001$  Rapa comparado à CsA; (h)  $p < 0,0001$  MMF comparado à CsA; (i)  $p < 0,05$  MMF comparado ao controle.

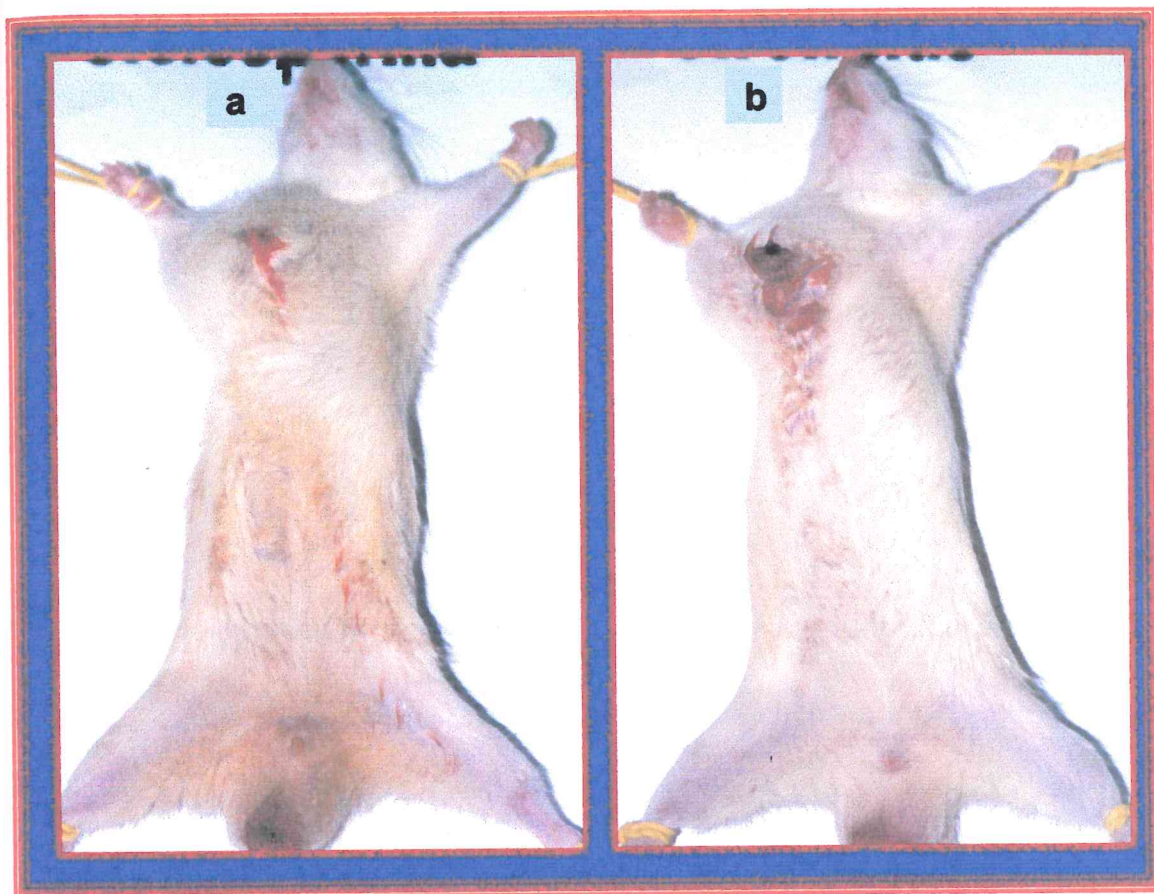
**Tabela 5.** Peso tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral, Rapamicina, Ciclosporina Microemulsão ou Micofenolato Mofetil administrados por via oral e iniciados **24 horas antes** da inoculação tumoral.

Ratos	Cont (g)	Rapa (g)	CsA (g)	MMF (g)
R1	8,0	6,0	11,0	3,5
R2	6,0	3,0	7,0	3,0
R3	10,0	4,0	12,0	5,5
R4	8,0	1,5	10,0	6,0
R5	5,0	3,0	7,0	2,0
R6	10,0	3,5	7,0	9,0
R7	4,0	4,0	7,5	5,5
R8	7,5	5,0	10,0	5,0
R9	6,0	3,0	10,0	7,0
R10	8,0	4,0	6,0	5,0
Média	7,30	3,70 <sup>(a,b)</sup>	8,80	5,20 <sup>(c,d)</sup>
DP	1,99	1,23	2,07	2,01
EMP	0,629	0,388	0,655	0,637

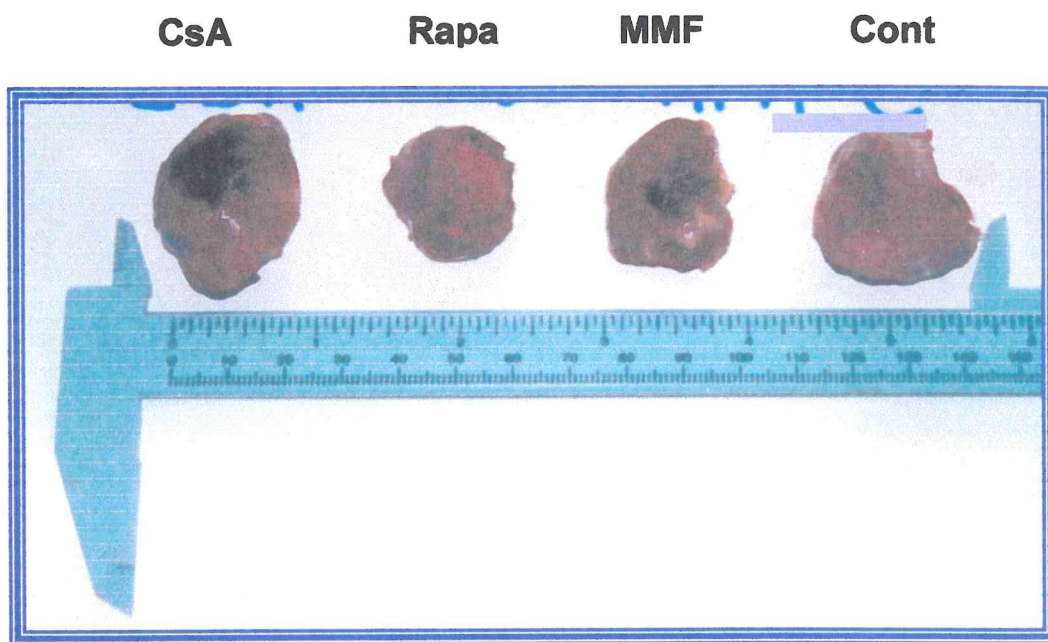
MMF = Micofenolato Mofetil, CsA = Ciclosporina microemulsão; Rapa = Rapamicina, Cont = controle, g = grama, DP = desvio padrão, EMP = erro médio padrão; (a)  $p \leq 0,001$  Rapa comparado ao controle; (b)  $p \leq 0,001$  Rapa comparado à CsA; (c)  $p \leq 0,05$  MMF comparado ao controle; (d)  $p \leq 0,001$  MMF comparado à CsA.



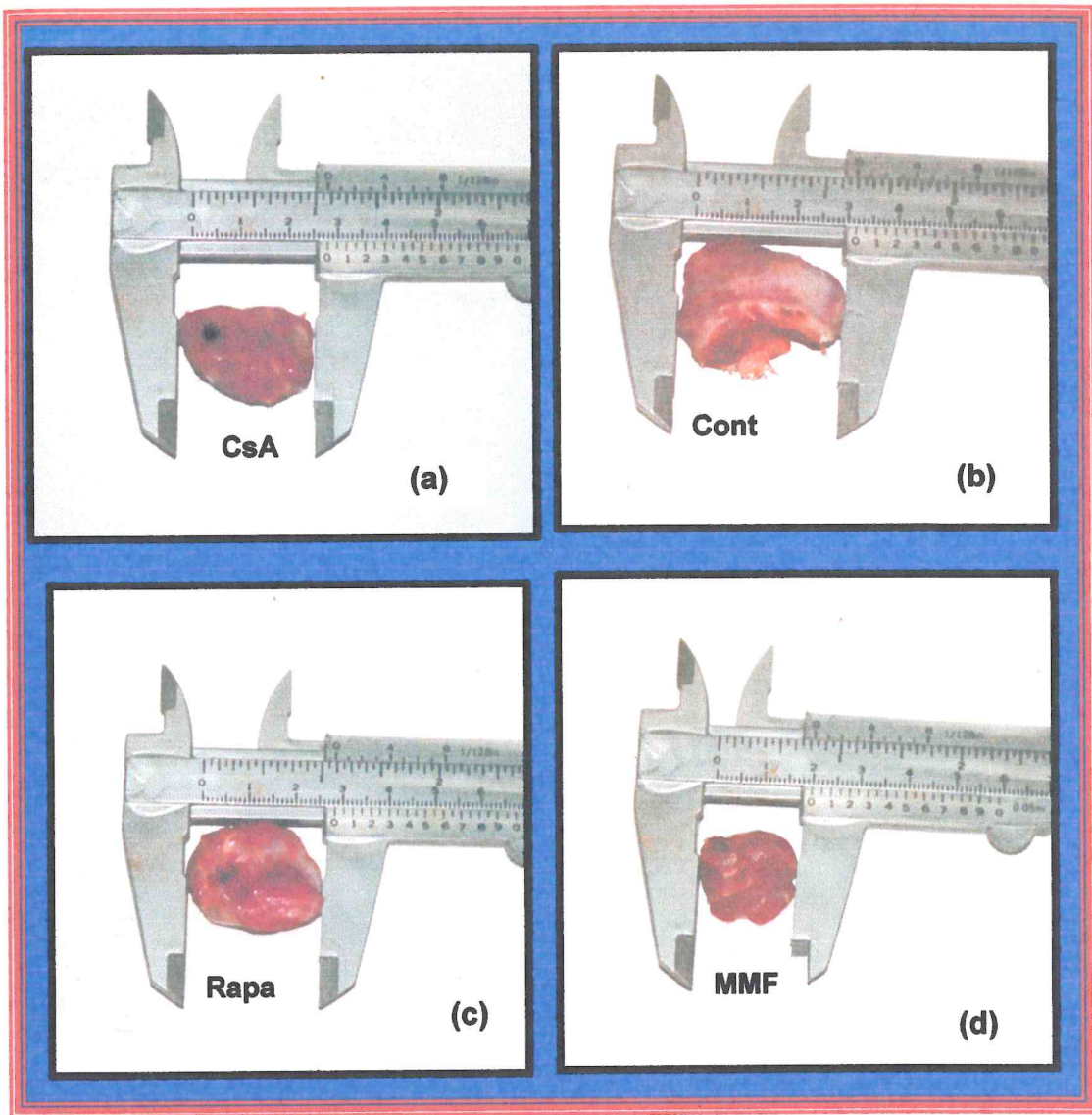
**Figura 21.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com Micofenolato Mofetil, na dose de 1,5mg/kg/d, iniciado 24 horas antes do implante tumoral e administrado durante 10 dias por via oral (foto no 10<sup>o</sup> dia).



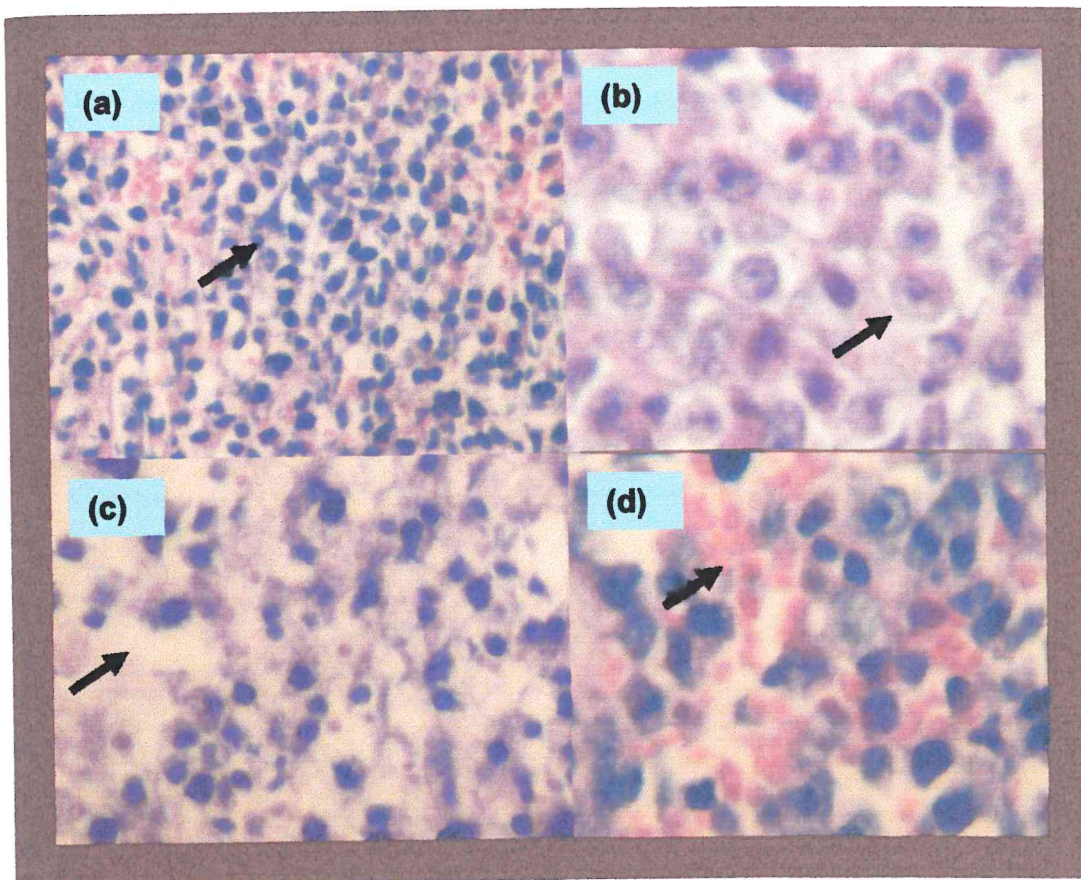
**Figura 22.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com: a) Ciclosporina microemulsão, na dose de 10 mg/kg/d, iniciada 24 horas antes do implante tumoral e administrada durante 10 dias por via oral; b) Rapamicina, na dose de 1,5 mg/kg/d, iniciada 24 horas antes do implante tumoral e administrada durante 10 dias por via oral (foto no 10<sup>o</sup> dia).



**Figura 23.** Carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea da axila direita, em animais submetidos aos diversos tratamentos: Ciclosporina microemulsão (CsA, 10mg/kg/d), Rapamicina (Rapa, 1,5mg/kg/d), Micofenolato mofetil (MMF, 10mg/kg/d) ou água mineral (Cont), iniciados 24 horas antes do implante tumoral e administrados durante 10 dias por via oral.



**Figura 24.** Carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea da axila direita, em animais submetidos a tratamento com: a) Ciclosporina microemulsão (CsA, 10mg/kg/d), b) água mineral (Cont, 100 µl/d), c) Rapamicina (Rapa, 1,5mg/kg/d), d) Micofenolato mofetil (MMF, 10mg/kg/d). Todas as drogas foram iniciados 24 horas antes do implante tumoral e administradas durante 10 dias por via oral.



**Figura 25.** Cortes histológicos de carcinosarcoma 256 de Walker, dissecado da região subcutânea da axila direita de ratos Wistar, mostrando (a) a presença de neoplasia indiferenciada de pequenas células com aspecto denso; (b) pseudonucleado; (c) áreas de necrose, reabsorção, edema; (d) hemorragia intersticial (aumento de 200 e 400X).

**Tabela 6.** Análise histológica do tumor de Walker no 10<sup>o</sup> dia após o implante em ratos Wistar tratados com água mineral, Ciclosporina microemulsão, Micofenolato mofetil ou Rapamicina, todos iniciados 24 horas antes do implante e administrados durante 10 dias.

Parâmetros		Controle (n=10)	CsA (n=10)	MMF (n=10)	Rapa (n=10)
NIPC	leve	55,6%	50%	55,6%	77,8%
	moderado	22,2%	50%	44,4%	22,2%
	intenso	22,2%	-	-	-
necrose	leve	11,1%	11,1%	-	22,2%
	moderado	66,7%	55,6%	55,6%	77,8%
	intenso	22,2%	33,3%	44,4%	-
Exsudato granulocítico	leve	88,9%	11,1%	44,4%	88,9%
	moderado	-	77,8%	55,6%	11,1%
	intenso	-	-	-	-
Hemorragia	leve	44,4%	-	88,9%	44,4%
	moderado	11,1%	-	-	-
	intenso	-	-	-	-

NIPC = neoplasia indiferenciada de pequenas células; CsA = Ciclosporina microemulsão; MMF = Micofenolato mofetil; Rapa = Rapamicina

**Tabela 7.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral, Rapamicina, Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato Mofetil administrados por via oral e **iniciados 24 horas** antes da inoculação tumoral.

Grupos	D-1	D0	D2	D4	D6	D8	D10
<b>Cont *</b> <b>n= 10</b>	141,3 ± 19,0	147,7 ± 20,8	151,2 ± 20,1	144,3 ± 20,1	153,1 ± 20,6	153,4 ± 21,5	152,1 ± 22,8
<b>Rapa *</b> <b>n= 10</b>	139,3 ± 16,3	146,5 ± 17,5	150,4 ± 16,6	151,7 ± 16,3	150,5 ± 17,3	149,9 ± 18,8	146,4 ± 19,8
<b>CsA *</b> <b>n= 10</b>	146,7 ± 21,8	147,9 ± 20,0	157,3 ± 19,3	150,4 ± 19,9	157,7 ± 18,9	159,0 ± 18,3	159,4 ± 19,9
<b>MMF *</b> <b>n= 10</b>	145,7 ± 26,9	137,9 ± 25,3	155,8 ± 24,3	153,3 ± 24,4	158,4 ± 23,3	158,1 ± 20,8	158,9 ± 21,5

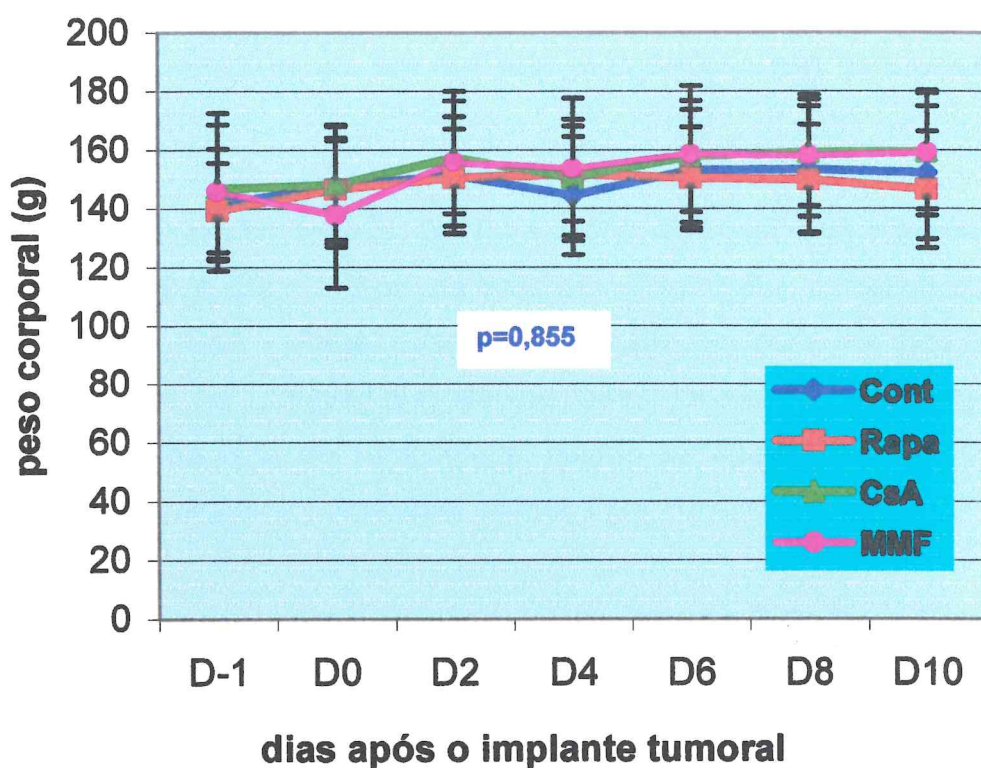
Valores expressos em gramas como média ± desvio padrão

Cont = controle (água destilada), CsA= Ciclosporina microemulsão

Rapa = Rapamicina, MMF = Micofenolato Mofetil, D = dia

\* p = 0,885 entre os grupos ao longo do tempo

grupos ao longo do experimento (p = 0,885)



**Figura 26.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (Cont, n=10), Rapamicina (Rapa, n=10), Ciclosporina microemulsão (CsA, n=10) ou Micofenolato Mofetil (MMF, n=10), administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. Não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do experimento ( $p = 0,885$ )

## 2. 2. Avaliação do efeito da associação de Rapamicina com Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato mofetil sobre o crescimento tumoral e formação de metástases, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker.

**Grupos experimentais:** G1 (n=8, Cont): água mineral administrada por via oral; G2 (n=9, Rapa): Rapa, na dose de 1,5mg/kg/dia, administrada por via oral; G3 (n=9, CsA + Rapa): CsA microemulsão, na dose de 10mg/kg/dia, e Rapa, na dose de 1,5mg/kg/dia, administradas por via oral; G4 (n=9, MMF + Rapa): MMF, na dose de 10mg/kg/dia, diluído em água destilada e Rapa, na dose de 1,5mg/kg/dia, ambos administrados por via oral.

Nove ratos morreram ao longo do experimento: 3 do grupo CsA + Rapa, nos dias 6, 7 e 8; 3 ratos do grupo MMF + Rapa, nos dias 2, 5 e 6; e 2 do grupo controle, nos dias 0 e 4.

No 10º dia do experimento, o volume tumoral foi significativamente menor nos animais tratados com Rapa isoladamente ou com a associação Rapa + CsA ou MMF (Rapa,  $1,5 \pm 0,5 \text{ cm}^3$ ; CsA + Rapa,  $2,6 \pm 0,5 \text{ cm}^3$ ; MMF + Rapa,  $2,0 \pm 1,1 \text{ cm}^3$ ) quando comparados ao grupo controle ( $8,4 \pm 2,1 \text{ cm}^3$ ;  $p < 0,001$ , tabelas 8 a 11, figura 27).

Os animais foram sacrificados no 10º dia após o implante tumoral. Não foi detectada metástase tumoral em nenhum animal. O tumor foi dissecado e pesado. O peso tumoral foi significativamente menor nos animais tratados com Rapa isolada ou associada com drogas imunossupressoras (Rapa,  $3,06 \pm 0,58 \text{ g}$ ; MMF + Rapa,  $2,00 \pm 0,63 \text{ g}$ ; CsA + Rapa,  $3,17 \pm 1,03 \text{ g}$ ) do que no grupo controle ( $8,08 \pm 1,69 \text{ g}$ ,  $p < 0,0001$ , tabela 12).

A inibição do crescimento tumoral foi observada em todos os grupos tratados, sendo de 62,1% no grupo Rapa, 75,2% no grupo MMF + Rapa e 60,8% no grupo CsA + Rapa.

O nível médio de ciclosporina, dosada no sangue total em 4 animais, foi de  $446,93 \pm 166,97$  ng/ml.

O peso corporal dos animais foi semelhante nos quatro grupos (Cont,  $121,3 \pm 13,0$  g; Rapa,  $121,7 \pm 21,2$  g; CsA + Rapa,  $118,3 \pm 18,1$  g; MMF + Rapa,  $118,3 \pm 11,9$  g). Todos os animais ganharam peso ao longo do estudo, não havendo diferença entre eles ao final do experimento (Cont,  $146,0 \pm 17,3$  g; Rapa,  $135,2 \pm 22,0$  g; CsA + Rapa,  $127,3 \pm 17,0$  g; MMF + Rapa,  $127,7 \pm 16,6$  g;  $p=0,0758$ , **tabela 13, figura 28**).

Rs	0,70	1,10	2,00
Média	0,23	0,79	1,53
DP	0,24	0,28	2,08
EMP	0,08	0,09	0,81

\* Volume tumoral ( $\text{cm}^3$ ) =  $(Dm \times d^2)/2$

Dm = Diâmetro maior, d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP = erro padrão, D = dia.

**Tabela 8.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **água mineral** por via oral, iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral.

Ratos	D4	D6	D8	D10
R1	0,10	0,35	5,32	10,57
R2	0,06	1,01	4,85	6,53
R3	0,18	0,57	6,91	10,0
R4	0,13	0,80	6,08	10,21
R5	0,20	0,90	1,90	5,81
R6	0,70	1,10	2,10	7,20
<b>Média</b>	<b>0,23</b>	<b>0,79</b>	<b>4,53</b>	<b>8,39</b>
<b>DP</b>	<b>0,24</b>	<b>0,28</b>	<b>2,08</b>	<b>2,11</b>
<b>EMP</b>	<b>0,08</b>	<b>0,09</b>	<b>0,66</b>	<b>0,67</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior, d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior, d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP = erro médio padrão, D = dia.

**Tabela 9.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **Rapamicina**, na dose de 1,5mg/kg/dia, administrada por via oral e iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral.

Ratos	D4	D6	D8	D10
R1	0,10	1,67	2,18	2,92
R2	0,01	0,55	0,85	1,09
R3	0,05	0,45	1,18	1,76
R4	0,00	0,45	3,24	4,15
R5	0,00	1,03	3,08	5,81
R6	0,00	0,18	1,86	3,40
R7	0,04	0,32	1,22	2,43
R8	0,04	0,53	1,47	3,97
R9	0,03	0,20	0,86	2,987
<b>Média</b>	<b>0,03</b>	<b>0,60</b>	<b>1,77</b>	<b>1,52</b>
<b>DP</b>	<b>0,03</b>	<b>0,47</b>	<b>0,90</b>	<b>0,48</b>
<b>EMP</b>	<b>0,01</b>	<b>0,15</b>	<b>0,28</b>	<b>0,16</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior, d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

**Tabela 10.** Crescimento tumoral\*, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com a associação **Ciclosporina microemulsão**, na dose de 10mg/kg/dia, e **Rapamicina**, 1,5mg/kg/dia, administradas por via oral e iniciadas 24 horas antes da inoculação tumoral.

Ratos	D4	D6	D8	D10
R1	0,00	0,29	2,60	2,82
R2	0,01	0,41	1,35	2,60
R3	0,02	0,29	1,44	2,43
R4	0,00	0,41	1,57	3,43
R5	0,02	0,13	1,47	2,60
R6	0,02	0,25	1,37	1,91
<b>Média</b>	<b>0,02</b>	<b>0,24</b>	<b>1,41</b>	<b>2,63</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>0,14</b>	<b>0,73</b>	<b>0,50</b>
<b>EMP</b>	<b>0,009</b>	<b>0,04</b>	<b>0,23</b>	<b>0,16</b>

\* Volume tumoral ( $\text{cm}^3$ ) =  $(Dm \times d^2)/2$

Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

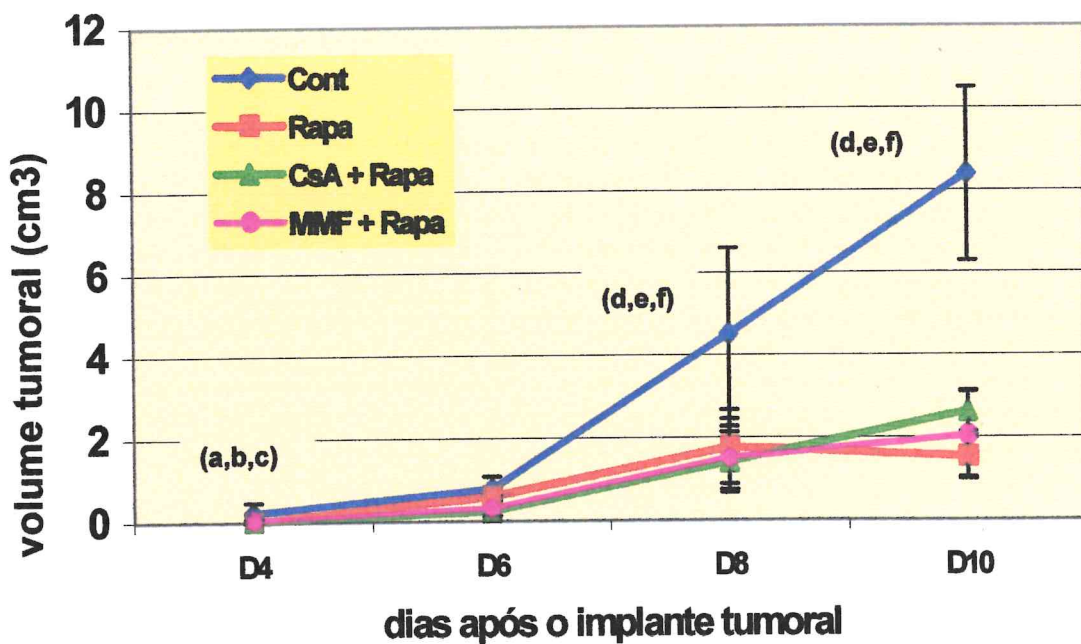
**Tabela 11.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com a associação **Micofenolato Mofetil**, na dose de 10mg/kg/dia, e **Rapamicina**, 1,5mg/kg/dia, administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

Ratos	D4	D6	D8	D10
R1	0,00	0,20	0,73	1,91
R2	0,11	0,85	2,46	3,08
R3	0,02	0,06	1,27	2,30
R4	0,11	0,55	2,43	3,24
R5	0,00	0,11	0,79	0,49
R6	0,00	0,11	1,35	1,27
<b>Média</b>	<b>0,040</b>	<b>0,31</b>	<b>1,51</b>	<b>2,05</b>
<b>DP</b>	<b>0,055</b>	<b>0,32</b>	<b>0,77</b>	<b>1,06</b>
<b>EMP</b>	<b>0,017</b>	<b>0,10</b>	<b>0,24</b>	<b>0,34</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior, d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

(CsA + Rapa, n=6) ou Micofenolato Mofetil (MMF + Rapa, n=6) administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. p<0,05 Rapa comparado ao controle; (b) p<0,05 CsA + Rapa comparado ao controle; (c) p<0,05 MMF + Rapa comparado ao controle; (d) p<0,05 CsA + Rapa comparado ao controle; (e) p<0,001 CsA + Rapa comparado ao controle; (f) p<0,001 MMF + Rapa comparado ao controle.



**Figura 27.** Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont, n=6), Rapamicina (Rapa, n=9), associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão (CsA + Rapa, n=6) ou Micofenolato Mofetil (MMF + Rapa, n=6) , todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. (a)  $p < 0,05$  Rapa comparado ao controle; (b)  $p < 0,05$  CsA + Rapa comparado ao controle; (c)  $p < 0,05$  MMF + Rapa comparado ao controle; (d)  $p \leq 0,001$  Rapa comparado ao controle; (e)  $p \leq 0,001$  CsA + Rapa comparado ao controle; (f)  $p \leq 0,001$  MMF + Rapa comparado ao controle.

**Tabela 12.** Peso tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral, Rapamicina, associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato Mofetil, todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

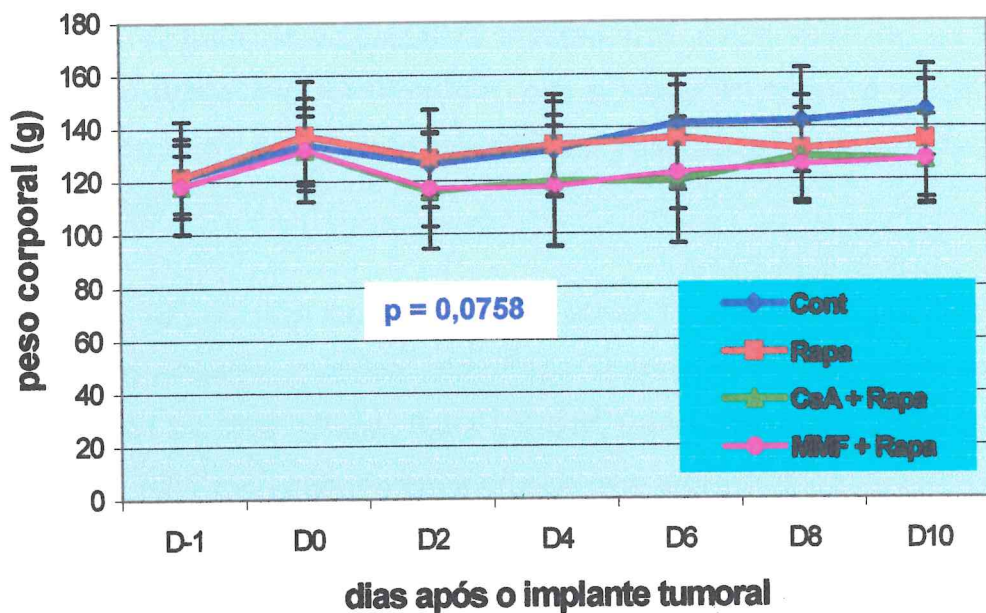
<b>Ratos</b>	<b>Cont (g)</b>	<b>Rapa (g)</b>	<b>CsA + Rapa (g)</b>	<b>MMF + Rapa (g)</b>
<b>R1</b>	6,5	3,0	3,5	2,0
<b>R2</b>	7,0	3,0	3,0	3,0
<b>R3</b>	11,0	2,5	3,0	2,0
<b>R4</b>	7,0	4,0	5,0	2,0
<b>R5</b>	9,0	3,5	2,5	1,0
<b>R6</b>	8,0	3,0	2,0	2,0
<b>R7</b>	-	3,5	-	-
<b>R8</b>	-	3,0	-	-
<b>R9</b>	-	2,0	-	-
<b>Média</b>	<b>8,08</b>	<b>3,06<sup>(a)</sup></b>	<b>3,17<sup>(b)</sup></b>	<b>2,00<sup>(c)</sup></b>
<b>DP</b>	<b>1,69</b>	<b>0,58</b>	<b>1,03</b>	<b>0,63</b>
<b>EMP</b>	<b>0,69</b>	<b>0,19</b>	<b>0,42</b>	<b>0,26</b>

MMF = Micofenolato Mofetil; CsA = Ciclosporina microemulsão; Rapa = Rapamicina; Cont = controle, g = grama, DP = desvio padrão; EMP = erro médio padrão; (a)  $p < 0,0001$  Rapa comparado ao controle; (b)  $p < 0,0001$  CsA + Rapa comparado ao controle; (c)  $p < 0,0001$  MMF + Rapa comparado ao controle.

**Tabela 13.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral, Rapamicina, associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato Mofetil, todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

Grupos	D-1	D0	D2	D4	D6	D8	D10
<b>Cont *</b> <b>n= 6</b>	121,3 ± 13,0	134,0 ± 14,0	126,6 ± 12,0	131,7 ± 18,1	141,5 ± 17,9	142,3 ± 19,8	146,0 ± 17,3
<b>Rapa *</b> <b>n= 9</b>	121,7 ± 21,2	137,4 ± 20,6	128,6 ± 18,5	133,4 ± 19,1	136,0 ± 19,7	131,7 ± 19,9	135,2 ± 22,0
<b>CsA</b> <b>+</b> <b>Rapa*</b> <b>n= 6</b>	118,3 ± 18,1	132,0 ± 19,6	116,1 ± 21,7	119,9 ± 24,8	119,9 ± 23,8	129,0 ± 17,6	127,3 ± 17,0
<b>MMF</b> <b>+</b> <b>Rapa*</b> <b>n= 6</b>	118,3 ± 11,9	131,9 ± 13,0	117,0 ± 14,0	117,9 ± 22,7	122,8 ± 14,0	125,7 ± 14,9	127,7 ± 16,6

Valores expressos em gramas como média ± desvio padrão; Cont = controle (água destilada), CsA = Ciclosporina microemulsão; Rapa = Rapamicina; MMF = Micofenolato Mofetil; D = dia; \* p = 0,0758 entre os grupos ao longo do experimento.



**Figura 28.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont), Rapamicina (Rapa), associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão (CsA + Rapa) ou Micofenolato Mofetil (MMF + Rapa), todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. Não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do experimento ( $p=0,0758$ )

Em virtude da expressiva mortalidade observada no experimento anterior, o protocolo foi repetido com animais de maior peso, 9 ratos em cada grupo, e o crescimento tumoral e o peso corporal foram mensurados diariamente.

No 10<sup>o</sup> dia do experimento, o volume tumoral foi significativamente menor nos animais tratados com Rapa isoladamente ou com a associação Rapa + CsA ou MMF (Rapa,  $3,8 \pm 1,5 \text{ cm}^3$ ; CsA + Rapa,  $3,1 \pm 1,2 \text{ cm}^3$ ; MMF + Rapa,  $4,6 \pm 2,7 \text{ cm}^3$ ) quando comparados com o grupo controle ( $10,9 \pm 3,8 \text{ cm}^3$ ;  $p < 0,0001$ , tabelas 14 a 17 , figura 29).

Os animais foram sacrificados no 10<sup>o</sup> dia após o implante tumoral. Não foi detectada metástase tumoral em nenhum animal. O tumor foi dissecado e pesado. O peso tumoral foi significativamente menor nos animais tratados com Rapa isoladamente ou associada a outros imunossupressores (Rapa,  $3,50 \pm 1,17 \text{ g}$ ; MMF + Rapa,  $2,70 \pm 1,06 \text{ g}$ ; CsA + Rapa,  $2,30 \pm 0,38 \text{ g}$ ) do que no grupo controle ( $7,30 \pm 1,41 \text{ g}$ ,  $p < 0,0001$ , tabela 18).

A inibição do crescimento tumoral foi observada em todos os grupos tratados, sendo de 52,1% no grupo da Rapa, 63% no grupo MMF + Rapa e 68,5% no grupo CsA + Rapa.

O nível médio de ciclosporina, dosada no sangue total em 5 animais, foi de  $345,9 \pm 194,9 \text{ ng/ml}$ .

O peso corporal dos animais foi semelhante nos quatro grupos (Cont,  $125,3 \pm 12,1 \text{ g}$ ; Rapa,  $128,0 \pm 16,4 \text{ g}$ ; CsA + Rapa,  $138,6 \pm 11,5 \text{ g}$ ; MMF + Rapa,  $138,7 \pm 14,5 \text{ g}$ ). Os animais ganharam peso ao longo do estudo, com exceção daqueles do grupo CsA + Rapa, que apresentaram perda de peso no final do experimento. Entretanto, a diferença entre os grupos não foi significativa (Cont,  $135,1 \pm 23,0 \text{ g}$ ; Rapa,  $145,8 \pm 22,3 \text{ g}$ ; CsA + Rapa,  $130,1 \pm 17,0 \text{ g}$ ; MMF + Rapa,  $138,7 \pm 14,5 \text{ g}$ ;  $p = 0,542$ , tabela 19, figura 30).

**Tabela 14.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **água mineral** por via oral, iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral.

Ratos	D5	D6	D7	D8	D9	D10
R1	0,00	0,32	2,56	5,29	9,13	12,50
R2	0,03	0,29	1,30	8,35	12,60	11,80
R3	0,01	0,11	1,01	4,33	5,00	6,05
R4	0,0135	0,20	2,43	6,78	10,10	17,90
R5	0,00	0,20	1,27	6,35	9,46	14,40
R6	0,00	0,03	1,35	5,00	9,80	7,99
R7	0,00	0,10	0,61	4,80	6,53	10,10
R8	0,00	0,13	1,91	4,80	5,73	6,88
R9	0,00	0,13	2,69	3,89	5,60	10,90
<b>Média</b>	<b>0,006</b>	<b>0,17</b>	<b>1,68</b>	<b>5,51</b>	<b>8,22</b>	<b>10,95</b>
<b>DP</b>	<b>0,009</b>	<b>0,09</b>	<b>0,74</b>	<b>1,40</b>	<b>2,60</b>	<b>3,77</b>
<b>EMP</b>	<b>0,004</b>	<b>0,04</b>	<b>0,30</b>	<b>0,47</b>	<b>1,06</b>	<b>1,54</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

**Tabela 15.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **Rapamicina**, na dose de 1,5mg/kg/dia por via oral, iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral.

Ratos	D5	D6	D7	D8	D9	D10
R1	0,25	0,41	0,41	2,03	2,03	4,40
R2	0,03	0,05	0,17	1,22	1,37	1,69
R3	0,41	0,60	0,38	2,25	3,61	5,51
R4	0,00	0,25	0,49	3,47	4,21	5,00
R5	0,00	0,11	0,41	2,25	3,18	4,51
R6	0,01	0,41	0,57	1,15	2,36	3,47
R7	0,00	0,14	0,67	1,69	3,08	3,97
R8	0,04	0,41	0,80	2,89	4,40	1,80
<b>Média</b>	<b>0,092</b>	<b>0,30</b>	<b>0,49</b>	<b>2,12</b>	<b>3,03</b>	<b>3,79</b>
<b>DP</b>	<b>0,152</b>	<b>0,19</b>	<b>0,19</b>	<b>0,79</b>	<b>1,06</b>	<b>1,50</b>
<b>EMP</b>	<b>0,062</b>	<b>0,08</b>	<b>0,08</b>	<b>0,26</b>	<b>0,43</b>	<b>0,57</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior, d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

Dm = Diâmetro maior, d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP = erro médio padrão, D = dia.

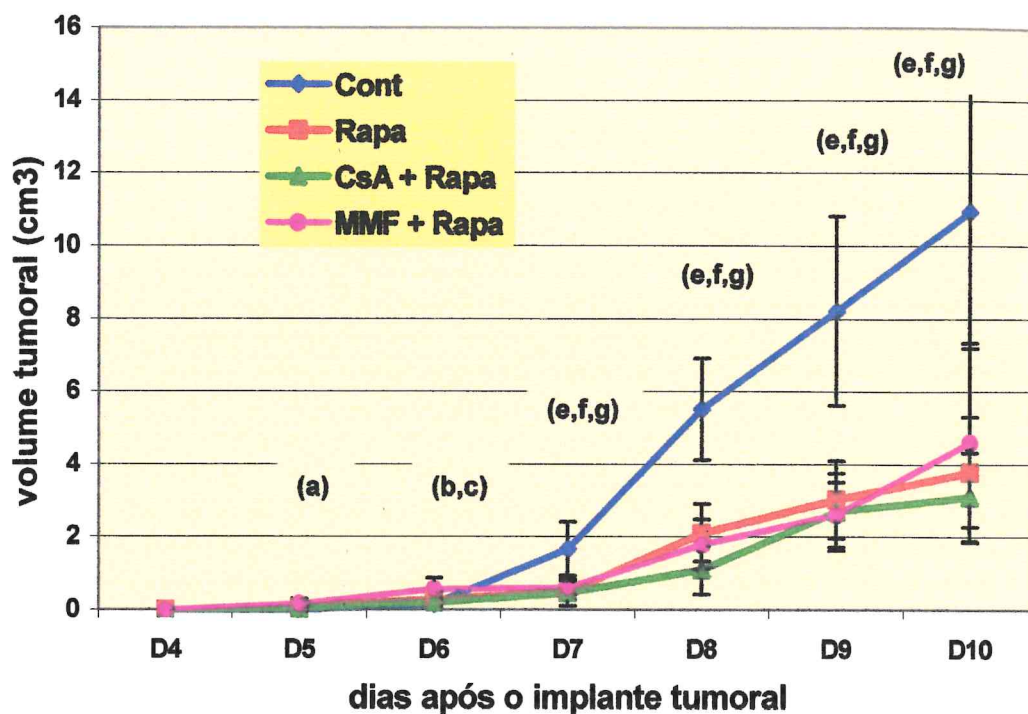
**Tabela 16.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **Ciclosporina microemulsão**, na dose de 10mg/kg/dia, e **Rapamicina**, 1,5mg/kg/dia, ambas administradas por via oral e iniciadas 24 horas antes da inoculação tumoral.

Ratos	D5	D6	D7	D8	D9	D10
R1	0,13	0,45	0,73	0,91	3,24	5,00
R2	0,20	0,35	0,85	1,44	3,47	3,47
R3	0,00	0,20	0,41	0,48	2,25	2,25
R4	0,00	0,06	0,13	0,85	1,61	1,96
R5	0,00	0,08	0,22	0,73	2,25	2,25
R6	0,00	0,18	0,18	1,08	2,36	2,16
R7	0,00	0,00	0,29	0,54	2,82	2,16
R8	0,00	0,20	0,25	1,15	1,44	3,89
R9	0,00	0,32	1,27	2,69	4,87	4,80
<b>Média</b>	<b>0,037</b>	<b>0,20</b>	<b>0,481</b>	<b>1,10</b>	<b>2,70</b>	<b>3,10</b>
<b>DP</b>	<b>0,075</b>	<b>0,15</b>	<b>0,39</b>	<b>0,67</b>	<b>1,06</b>	<b>1,21</b>
<b>EMP</b>	<b>0,031</b>	<b>0,0</b>	<b>0,16</b>	<b>0,22</b>	<b>0,43</b>	<b>0,50</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.





**Figura 29.** Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (Cont, n=9), Rapamicina (Rapa, n=8), associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão (CsA + Rapa, n=9) ou Micofenolato Mofetil (MMF + Rapa, n=9) por via oral, todos iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. (a)  $p \leq 0,01$  MMF + Rapa comparado ao Cont; (b)  $p \leq 0,001$  MMF + Rapa comparado ao Cont; (c)  $p < 0,05$  MMF + Rapa comparado ao Rapa; (d)  $p \leq 0,01$  MMF + Rapa comparado ao CsA + Rapa; (e)  $p \leq 0,0001$  Rapa comparado ao Cont; (f)  $p \leq 0,0001$  CsA + Rapa comparado ao cont; (g)  $p \leq 0,0001$  MMF+ Rapa comparado ao Cont.

**Tabela 18.** Peso tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral, Rapamicina, associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato Mofetil, administrados por via oral, todos iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

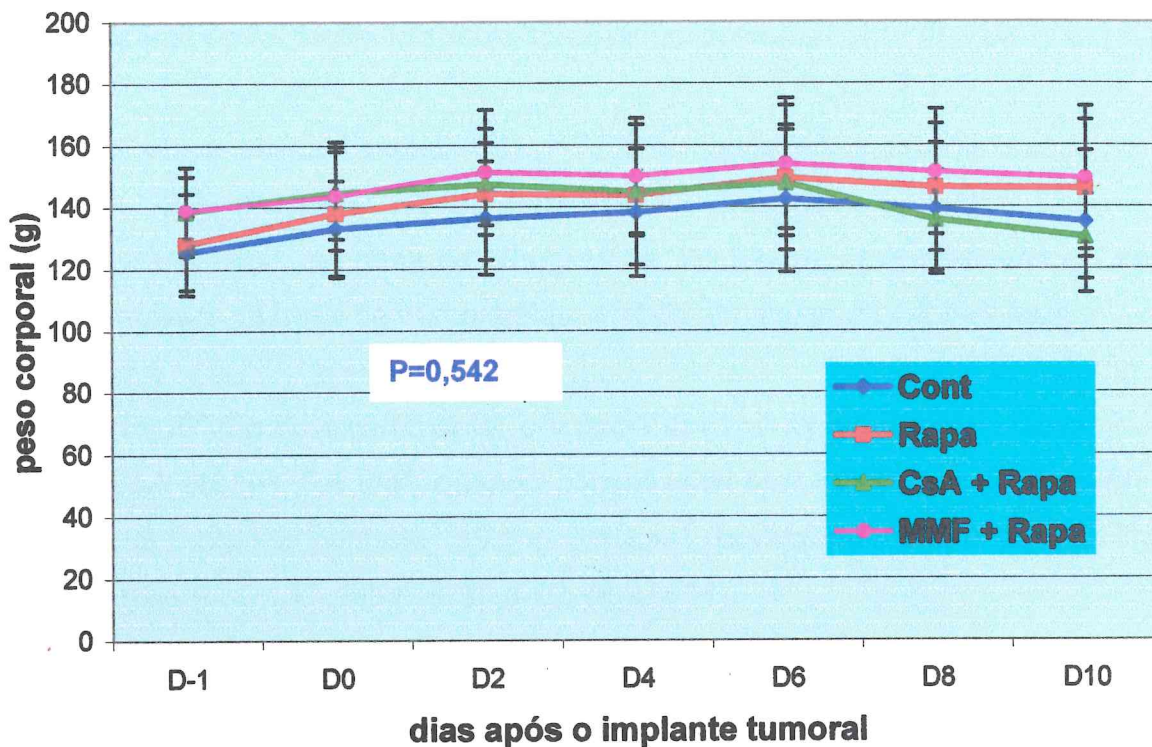
Ratos	Cont (g)	Rapa (g)	CsA + Rapa (g)	MMF + Rapa (g)
R1	8,5	3,0	2,5	2,0
R2	9,0	3,0	2,5	1,0
R3	5,5	2,0	2,0	4,0
R4	8,0	5,0	2,0	4,0
R5	5,0	4,5	2,0	2,0
R6	7,0	4,0	2,0	2,5
R7	8,0	3,0	2,0	4,0
R8	7,5	2,0	3,0	2,5
R9	-	5,0	-	2,5
<b>Média</b>	<b>7,30<sup>(a)</sup></b>	<b>3,50</b>	<b>2,30</b>	<b>2,70</b>
<b>DP</b>	<b>1,41</b>	<b>1,17</b>	<b>0,38</b>	<b>1,06</b>
<b>EMP</b>	<b>0,499</b>	<b>0,391</b>	<b>0,134</b>	<b>0,354</b>

MMF = Micofenolato Mofetil; CsA = Ciclosporina microemulsão; Rapa = Rapamicina; Cont = controle, g = grama, DP = desvio padrão; EMP = erro médio padrão; (a)  $p < 0,0001$ , controle comparado aos demais grupos.

**Tabela 19.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral, Rapamicina, associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão ou Micofenolato Mofetil, todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

Grupos	D-1	D0	D2	D4	D6	D8	D10
<b>Cont *</b> <b>n= 9</b>	125,3 ± 12,1	132,9 ± 15,7	136,4 ± 18,4	138,1 ± 20,7	142,6 ± 23,7	139,3 ± 21,2	135,1 ± 23,0
<b>Rapa *</b> <b>n= 8</b>	128,0 ± 16,4	138,0 ± 20,1	144,1 ± 21,3	143,8 ± 22,7	149,4 ± 23,4	146,2 ± 20,6	145,8 ± 22,3
<b>CsA</b> <b>+ Rapa *</b> <b>n= 9</b>	138,6 ± 11,5	144,6 ± 14,9	147,4 ± 13,3	144,8 ± 14,2	147,7 ± 17,3	135,6 ± 16,3	130,1 ± 13,8
<b>MMF</b> <b>+ Rapa *</b> <b>n= 9</b>	138,7 ± 14,5	143,7 ± 17,6	151,2 ± 20,2	150,0 ± 18,7	153,9 ± 21,2	151,2 ± 20,3	149,2 ± 23,2

Valores expressos em gramas como média ± desvio padrão; Cont = controle (água destilada); CsA = Ciclosporina microemulsão; Rapa = Rapamicina; MMF = Micofenolato Mofetil; D = dia; \* p=0,542 entre os grupos ao longo do experimento.



**Figura 30.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont, n=9), Rapamicina (Rapa, n=8), associação Rapamicina + Ciclosporina microemulsão (CsA + Rapa, n=9) ou Micofenolato Mofetil (MMF + Rapa, n=9), administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. Não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do experimento (p=0,542).

## 2. 3. Avaliação do efeito da associação de Micofenolato mofetil com Ciclosporina microemulsão sobre o crescimento tumoral e formação de metástases, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker.

**Grupos experimentais:** G1 (n=7, Cont): água mineral administrada por via oral; G2 (n=9, CsA): CsA microemulsão, na dose de 10mg/kg/dia; G3 (n=8: MMF + CsA): MMF, na dose de 10mg/kg/dia, diluído em água destilada e CsA microemulsão, na dose de 10mg/kg/dia, ambos administrados por via oral.

No 10<sup>o</sup> dia do experimento, o volume tumoral foi menor nos animais do grupo CsA ( $18,3 \pm 3,4 \text{ cm}^3$ ) quando comparados com os grupos CsA + MMF ( $19,7 \pm 3,7 \text{ cm}^3$ ) e controle ( $19,1 \pm 3,5 \text{ cm}^3$ ), porém esta diferença não foi significativa ( $p=0,435$ , **tabelas 20 a 22, figura 31**).

Os animais foram sacrificados no 10<sup>o</sup> dia após o implante tumoral. Não foi detectada metástase tumoral em nenhum animal. O tumor foi dissecado e pesado. O peso tumoral foi maior nos animais tratados com CsA ( $11,2 \pm 2,1 \text{ g}$ ) do que nos grupos CsA + MMF ( $9,86 \pm 2,79 \text{ g}$ ) e controle ( $9,7 \pm 3,1 \text{ g}$ ). Como verificado em relação ao volume tumoral, a diferença entre os grupos não foi significativa ( $p=0,457$ ; **tabela 23, figuras 32 e 33**).

Houve um crescimento tumoral de 15,6% no grupo da CsA e de 1,5% no grupo tratado com CsA + MMF (**figura 34**).

O nível médio de ciclosporina, dosada no sangue total em 4 animais de cada grupo, foi de  $48,3 \pm 26,4 \text{ ng/ml}$  no grupo CsA e de  $51,0 \pm 24,5 \text{ ng/ml}$  no grupo MMF + CsA.

O peso corporal dos animais foi semelhante nos quatro grupos (Cont,  $143,9 \pm 22,6 \text{ g}$ ; CsA,  $152,9 \pm 13,9 \text{ g}$ ; CsA + MMF,  $151,7 \pm 18,5 \text{ g}$ ). Todos ganharam peso ao longo do estudo, não havendo diferença entre eles ao final do experimento (Cont,  $172,4 \pm 25,1 \text{ g}$ ; CsA,  $179,5 \pm 14,6 \text{ g}$ ; CsA + MMF  $175,6 \pm 23,7 \text{ g}$ ;  $p=0,989$ , **tabela 24, figura 35**).

**Tabela 20.** Crescimento tumoral\*, expresso em  $\text{cm}^3$ , em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **água mineral** por via oral, iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral.

Ratos	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
R1	0,0	0,04	2,56	5,81	11,3	22,1	22,1
R2	0,006	0,32	3,61	5,57	10,9	12,6	17,6
R3	0,0	0,13	3,79	7,14	11,7	14,3	16,3
R4	0,004	0,25	2,60	4,51	11,7	13,5	20,1
R5	0,0	0,01	0,05	0,41	7,2	10,1	14,0
R6	0,004	0,41	2,14	6,05	15,3	19,6	24,5
R7	0,0	0,008	0,41	3,24	4,8	13,5	19,1
<b>Média</b>	<b>0,00</b>	<b>0,17</b>	<b>2,17</b>	<b>4,68</b>	<b>10,41</b>	<b>15,10</b>	<b>19,10</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>0,16</b>	<b>1,45</b>	<b>2,25</b>	<b>3,42</b>	<b>4,21</b>	<b>3,54</b>
<b>EMP</b>	<b>0,00</b>	<b>0,06</b>	<b>0,55</b>	<b>0,85</b>	<b>1,29</b>	<b>1,59</b>	<b>1,34</b>

\* Volume tumoral ( $\text{cm}^3$ ) =  $(Dm \times d^2)/2$

Dm = Diâmetro maior, d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

**Tabela 21.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinosarcoma 256 de Walker e tratados com **Ciclosporina microemulsão**, na dose de 10 mg/kg/dia, administrada por via oral e iniciada 24 horas antes da inoculação tumoral.

Ratos	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
R1	0,006	0,55	1,37	4,2	11,3	15,3	20,1
R2	0,004	0,75	1,96	7,26	13,0	19,5	22,1
R3	0,0	0,65	2,30	8,13	12,6	13,5	16,4
R4	0,008	2,05	2,75	9,06	14,0	16,4	23,9
R5	0,056	0,49	1,80	9,8	14,4	16,9	16,9
R6	0,004	0,49	1,57	8,44	15,4	16,9	17,9
R7	0,0	0,57	0,57	4,60	10,2	14,4	14,4
R8	0,0	0,14	0,45	6,08	8,13	10,6	19,1
R9	0,0	0,004	0,41	2,46	9,84	10,6	13,5
<b>Média</b>	<b>0,01</b>	<b>0,63</b>	<b>1,46</b>	<b>6,67</b>	<b>12,10</b>	<b>14,90</b>	<b>18,26</b>
<b>DP</b>	<b>0,02</b>	<b>0,58</b>	<b>0,84</b>	<b>2,49</b>	<b>2,40</b>	<b>2,97</b>	<b>3,42</b>
<b>EMP</b>	<b>0,01</b>	<b>0,19</b>	<b>0,28</b>	<b>0,83</b>	<b>0,80</b>	<b>0,99</b>	<b>1,14</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

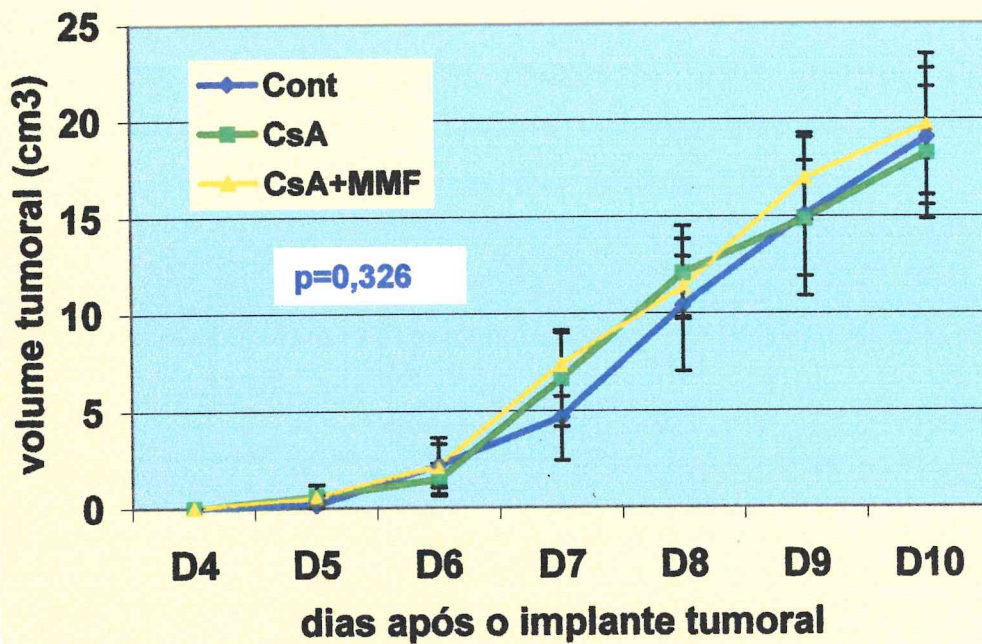
Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

**Tabela 22.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com a associação **Ciclosporina microemulsão**, na dose de 10mg/kg/dia, e **Micofenolato mofetil**, 10 mg/kg/dia, administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

Ratos	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
<b>R1</b>	0,01	0,67	2,05	8,35	11,3	17,9	22,1
<b>R2</b>	0,01	0,50	1,18	5,20	12,6	19,7	24,5
<b>R3</b>	0,01	0,36	2,75	8,06	10,9	19,6	15,8
<b>R4</b>	0,006	0,32	0,65	5,57	10,6	16,9	22,7
<b>R5</b>	0,0315	0,65	4,20	10,2	13,5	16,8	17,9
<b>R6</b>	0,004	0,75	1,30	8,13	8,4	13,5	17,3
<b>R7</b>	0,006	0,49	2,46	7,20	10,9	16,4	22,7
<b>R8</b>	0,0315	0,61	2,60	6,35	12,6	14,9	14,9
<b>Média</b>	<b>0,01</b>	<b>0,54</b>	<b>2,15</b>	<b>7,38</b>	<b>11,36</b>	<b>16,96</b>	<b>19,74</b>
<b>DP</b>	<b>0,01</b>	<b>0,15</b>	<b>1,12</b>	<b>1,65</b>	<b>1,57</b>	<b>2,14</b>	<b>3,67</b>
<b>EMP</b>	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>	<b>0,40</b>	<b>0,58</b>	<b>0,55</b>	<b>0,75</b>	<b>1,30</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.



**Figura 31.** Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (Cont, n=7), Ciclosporina microemulsão (CsA, n=9), associação Ciclosporina microemulsão + Micofenolato mofetil (CsA + MMF, n=8), administradas por via oral e iniciadas 24 horas antes da inoculação tumoral. Não houve diferença entre os grupos ao longo do tempo ( $p=0,326$ ).

**Tabela 23.** Peso tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral, Ciclosporina microemulsão, associação Ciclosporina + Micofenolato Mofetil, administrados por via oral, iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

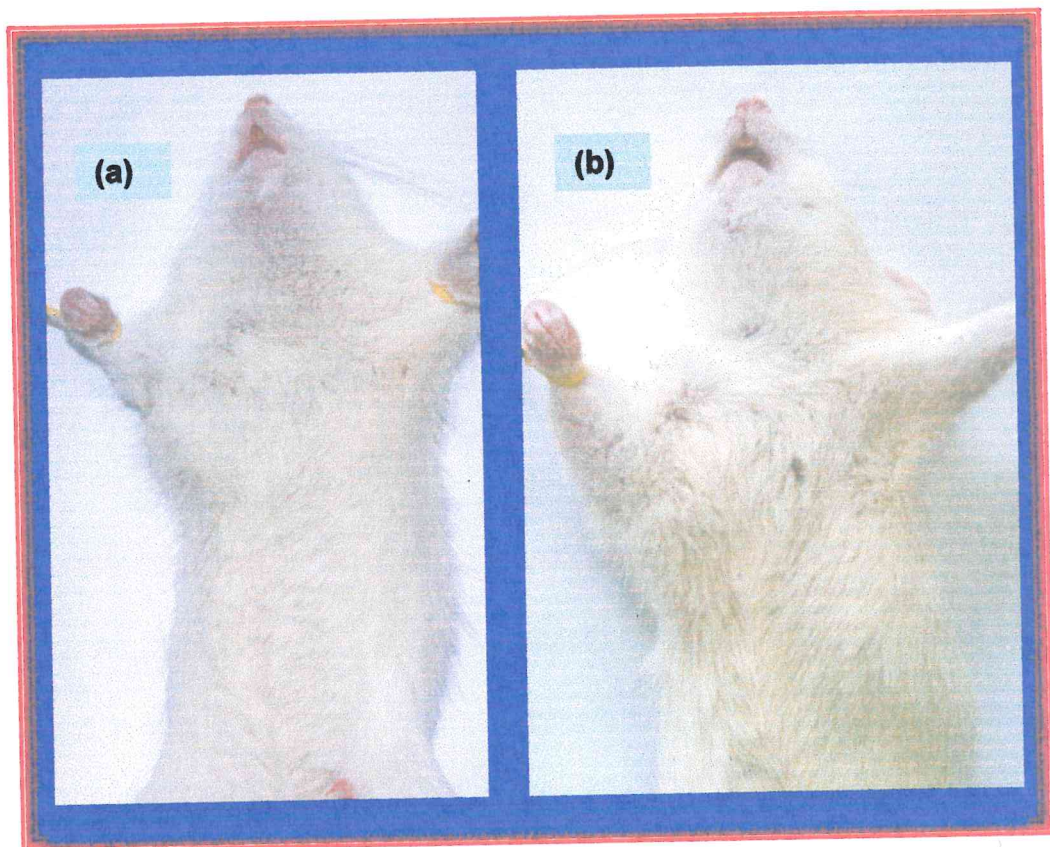
<b>Ratos</b>	<b>Cont *</b> <b>(g)</b>	<b>CsA *</b> <b>(g)</b>	<b>CsA + MMF *</b> <b>(g)</b>
<b>R1</b>	13,0	11,0	9,0
<b>R2</b>	12,0	9,0	5,0
<b>R3</b>	9,0	10,0	14,0
<b>R4</b>	9,0	14,0	9,0
<b>R5</b>	7,0	12,0	10,0
<b>R6</b>	13,0	15,0	12,0
<b>R7</b>	5,0	9,0	10,0
<b>R8</b>	-	11,0	
<b>R9</b>	-	10,0	
<b>Média</b>	<b>9,71</b>	<b>11,22</b>	<b>9,86</b>
<b>DP</b>	<b>3,09</b>	<b>2,11</b>	<b>2,79</b>
<b>EMP</b>	<b>1,09</b>	<b>0,67</b>	<b>1,06</b>

MMF = Micofenolato Mofetil; CsA = Ciclosporina microemulsão, Cont = controle, g = grama, DP = desvio padrão; EMP = erro médio padrão.

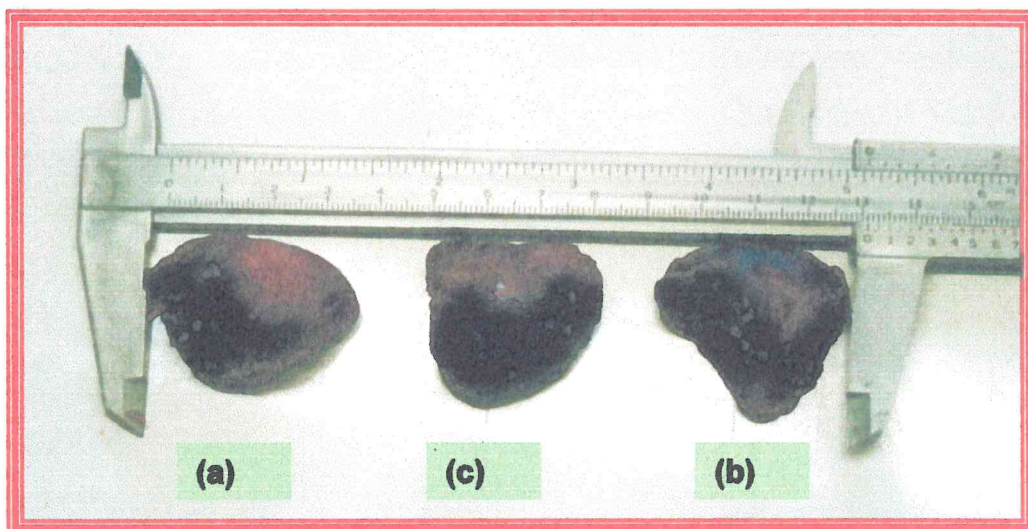
\*Não houve diferença entre os grupos ao longo do tempo (p=0,457).



**Figura 32.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com **água mineral**, iniciada 24 horas antes do implante tumoral e administrada durante 10 dias por via oral (foto no 10º dia).



**Figura 33.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com a) **Ciclosporina microemulsão**, 10mg/kg/dia; b) **Ciclosporina microemulsão associada a Micofenolato mofetil**, 10mg/kg/dia, todos iniciados 24 horas antes do implante tumoral e administrados durante 10 dias por via oral (foto no 10<sup>o</sup> dia).



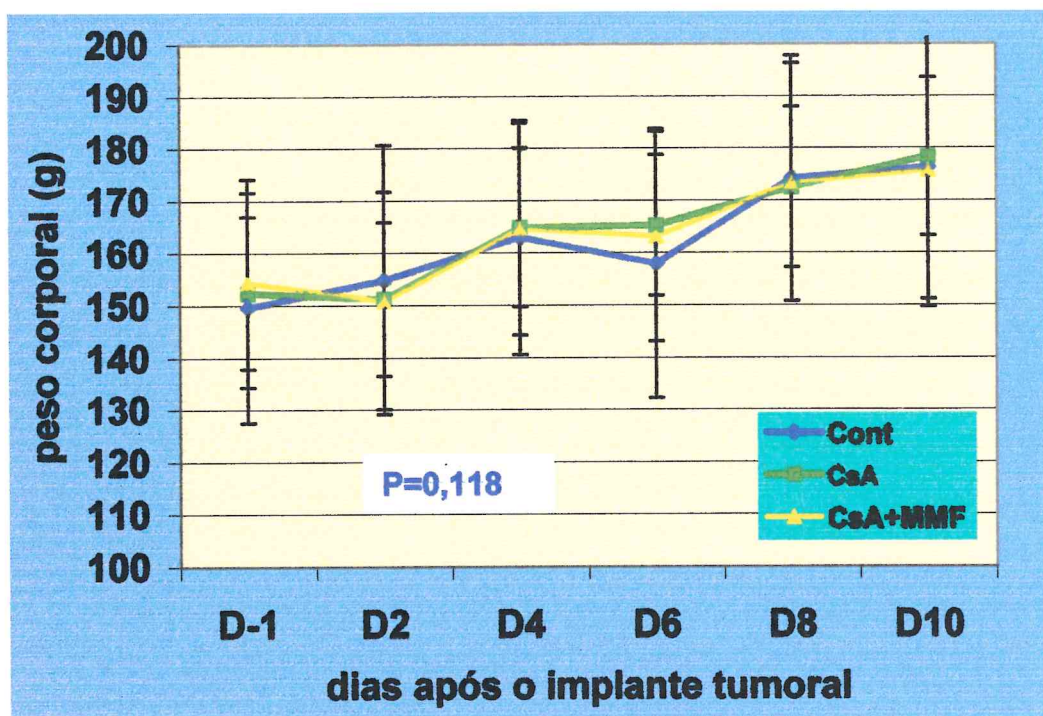
**Figura 34.** Carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea da axila direita, em animais submetidos a tratamento com: a) água mineral; b) Ciclosporina microemulsão (CsA, 10mg/kg/d); c) Ciclosporina microemulsão associada a Micofenolato mofetil (MMF, 10mg/kg/d), todos iniciados 24 horas antes do implante tumoral e administrados durante 10 dias por via oral.

**Tabela 24.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral, Ciclosporina microemulsão, associação Ciclosporina + Micofenolato Mofetil, todos administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral.

Grupos	D-1	D2	D4	D6	D8	D10
<b>Cont *</b> <b>n= 7</b>	149,6 ± 22,0	154,9 ± 25,8	163,0 ± 22,4	158,0 ± 25,7	174,3 ± 23,5	176,4 ± 25,3
<b>CsA *</b> <b>n= 9</b>	152,4 ± 14,6	151,2 ± 14,7	164,9 ± 15,2	165,3 ± 13,5	172,6 ± 15,4	178,4 ± 15,1
<b>CsA + MMF *</b> <b>n= 8</b>	154,3 ± 19,9	150,9 ± 20,8	164,6 ± 20,3	163,1 ± 20,1	173,5 ± 22,8	175,8 ± 26,2

Valores expressos em gramas como média ± desvio padrão; Cont = controle (água destilada); CsA = Ciclosporina microemulsão; MMF = Micofenolato Mofetil; D = dia; \*Não houve diferença entre os grupos ao longo do tempo (p=0,118).

Micofenolato Mofetil (CsA + MMF) administrado por via oral 24 horas antes da inoculação tumoral. Os dados foram coletados em todos os dias do experimento.



**Figura 35.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont, n=7), Ciclosporina microemulsão (CsA, n=9), associação Ciclosporina microemulsão + Micofenolato Mofetil (CsA + MMF, n=8), administrados por via oral e iniciados 24 horas antes da inoculação tumoral. Não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do experimento ( $p=0,118$ ).

## 2. 4. Avaliação do efeito do Rapamicina e do Micofenolato Mofetil sobre a regressão do carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea de ratos Wistar

**Grupos experimentais:** G1 (n=7, Cont): água mineral administrada por via oral; G2 (n=10, Rapa): Rapa, na dose de 1,5mg/kg/dia, administrada por via oral; G3 (n=9, MMF): MMF, na dose de 10mg/kg/dia, diluído em água destilada e administrado por via oral.

Dois ratos do grupo controle morreram no início do experimento, nos dias 5 e 6 após a implantação do tumor.

O tumor se desenvolveu em todos os animais, não havendo diferença no volume tumoral entre os três grupos (Cont,  $14,9 \pm 7,4 \text{ cm}^3$ ; Rapa,  $13,2 \pm 3,2 \text{ cm}^3$ ; MMF,  $12,3 \pm 5,5 \text{ cm}^3$ ;  $p=0,831$ , **tabelas 25 a 27, figuras 36, 37a, 37b, 38**).

O tumor foi dissecado e pesado. Não houve diferença significativa no peso tumoral entre os três grupos: Cont,  $6,3 \pm 3,2 \text{ g}$ ; Rapa,  $5,2 \pm 1,6 \text{ g}$ ; MMF,  $6,9 \pm 2,4 \text{ g}$  ( $p = 0,229$ , **tabela 28, figura 39**).

O peso corporal dos animais foi semelhante nos três grupos (Cont,  $177,3 \pm 28,0 \text{ g}$ ; Rapa,  $162,6 \pm 26,7 \text{ g}$ ; MMF,  $153,7 \pm 25,1 \text{ g}$ ). Todos ganharam peso ao longo do estudo, não havendo diferença entre eles ao final do experimento (Cont,  $188,1 \pm 18,0 \text{ g}$ ; Rapa,  $169,6 \pm 24,8 \text{ g}$ ; MMF,  $166,9 \pm 26,2 \text{ g}$ ;  $p=0,138$ , **tabela 29, figura 40**).

**Tabela 25.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **água mineral** por via oral, iniciada no 4º dia após a inoculação tumoral e administrada durante 7 dias.

Ratos	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
R1	0,04	0,79	4,0	7,8	11,4	25,3	23,9
R2	0,196	1,47	10,2	10,9	14,4	19,1	19,1
R3	0,0	0,0	0,0	0,02	0,6	2,6	5,2
R4	0,006	0,01	0,73	1,47	7,2	9,46	17,4
R5	0,004	0,25	1,18	1,47	9,13	14,9	20,2
R6	0,004	0,02	0,02	0,17	1,37	2,03	4,8
R7	0,004	0,13	0,5	0,67	5,57	7,78	13,5
<b>Média</b>	<b>0,036</b>	<b>0,38</b>	<b>2,38</b>	<b>3,22</b>	<b>7,10</b>	<b>11,60</b>	<b>14,87</b>
<b>DP</b>	<b>0,072</b>	<b>0,55</b>	<b>3,71</b>	<b>4,32</b>	<b>5,06</b>	<b>8,63</b>	<b>7,43</b>
<b>EMP</b>	<b>0,027</b>	<b>0,21</b>	<b>1,40</b>	<b>1,63</b>	<b>1,91</b>	<b>3,26</b>	<b>2,81</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP = erro médio padrão, D = dia.

**Tabela 26.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **Rapamicina**, na dose de 1,5mg/kg/dia por via oral, iniciada no 4º dia após a inoculação tumoral e administrada durante 7 dias.

Ratos	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
<b>R1</b>	0,004	0,45	2,60	4,20	13,5	12,0	17,6
<b>R2</b>	0,004	0,45	1,08	2,14	5,81	8,79	12,6
<b>R3</b>	0,006	0,41	1,47	2,36	11,4	17,4	15,8
<b>R4</b>	0,004	0,22	1,08	1,91	5,07	8,44	12,6
<b>R5</b>	0,000	0,20	1,57	2,30	9,80	9,80	13,0
<b>R6</b>	0,018	0,08	0,86	2,92	9,84	10,6	11,3
<b>R7</b>	0,004	0,55	2,46	4,05	10,6	10,8	10,8
<b>R8</b>	0,004	0,32	2,30	3,40	6,29	9,84	11,7
<b>R9</b>	0,004	0,00	0,05	0,14	1,03	5,81	7,74
<b>R10</b>	0,004	0,03	1,80	2,56	4,80	9,80	18,4
<b>Média</b>	<b>0,0052</b>	<b>0,27</b>	<b>1,53</b>	<b>2,60</b>	<b>7,81</b>	<b>10,33</b>	<b>13,15</b>
<b>DP</b>	<b>0,0047</b>	<b>0,19</b>	<b>0,80</b>	<b>1,17</b>	<b>3,80</b>	<b>2,99</b>	<b>3,23</b>
<b>EMP</b>	<b>0,0015</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>0,37</b>	<b>1,20</b>	<b>0,94</b>	<b>1,03</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

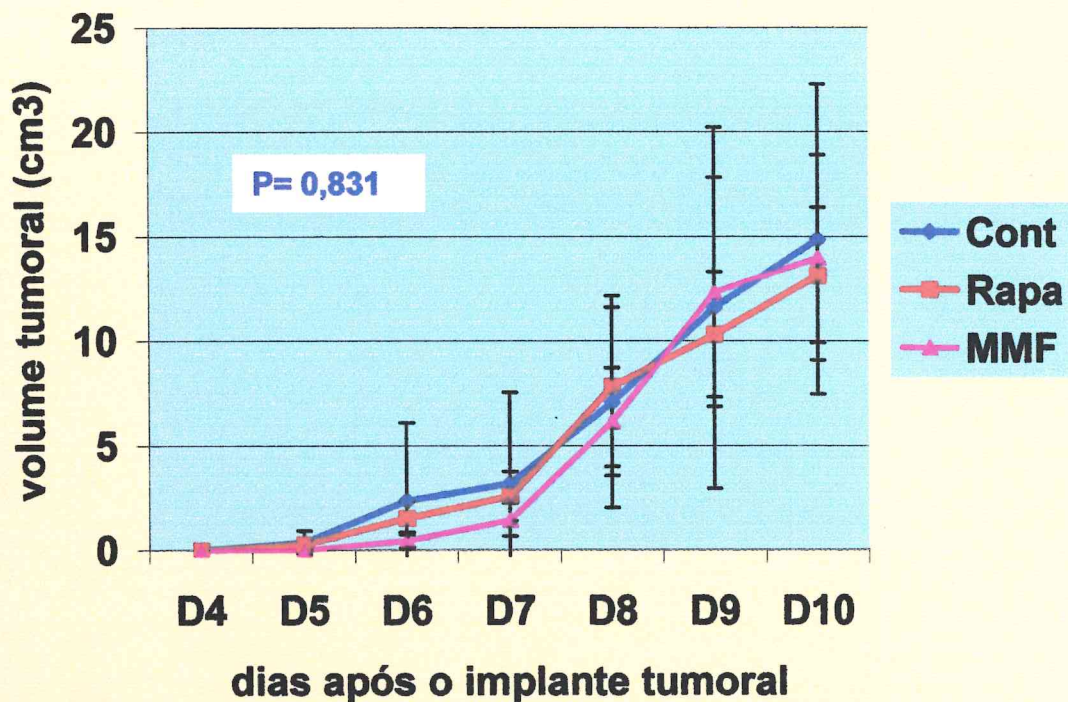
Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

**Tabela 27.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **Micofenolato Mofetil**, na dose de 10mg/kg/dia por via oral, iniciado no 4<sup>o</sup> dia após a inoculação tumoral e administrado durante 7 dias.

Ratos	D4	D5	D6	D7	D8	D10
R1	0,00	0,08	0,09	2,75	6,61	13,00
R2	0,00	0,04	0,94	2,03	9,80	17,30
R3	0,00	0,04	0,85	1,52	9,22	17,90
R4	0,01	0,03	0,13	1,08	5,51	11,20
R5	0,00	0,00	0,01	0,11	0,94	4,33
R6	0,00	0,01	0,01	1,47	5,32	20,20
R7	0,00	0,04	0,65	1,01	6,53	10,90
R8	0,00	0,02	0,55	2,18	6,53	11,20
R9	0,00	0,01	0,95	1,00	4,85	5,00
<b>Média</b>	<b>0,0024</b>	<b>0,03</b>	<b>0,46</b>	<b>1,46</b>	<b>6,15</b>	<b>12,34</b>
<b>DP</b>	<b>0,0024</b>	<b>0,024</b>	<b>0,41</b>	<b>0,78</b>	<b>2,58</b>	<b>5,48</b>
<b>EMP</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,008</b>	<b>0,14</b>	<b>0,26</b>	<b>0,86</b>	<b>1,83</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior, d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.



**Figura 36.** Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont, n=7), Rapamicina (Rapa, n=10), Micofenolato Mofetil (MMF, n=9), iniciados no 4º dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 7 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do experimento.

**Tabela 28.** Peso tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral, Rapamicina ou Micofenolato Mofetil, iniciados no 4<sup>o</sup> dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 7 dias.

<b>Ratos</b>	<b>Cont *</b> <b>(g)</b>	<b>Rapa *</b> <b>(g)</b>	<b>MMF *</b> <b>(g)</b>
<b>R1</b>	11	5	8
<b>R2</b>	3	7	9
<b>R3</b>	6	7	7
<b>R4</b>	9	5	7
<b>R5</b>	3	3	3
<b>R6</b>	-6	5	11
<b>R7</b>	-	7	5
<b>R8</b>	-	4	7
<b>R9</b>	-	3	5
<b>R10</b>	-	6	-
<b>Média</b>	<b>6,33</b>	<b>5,20</b>	<b>6,89</b>
<b>DP</b>	<b>3,20</b>	<b>1,55</b>	<b>2,37</b>
<b>EMP</b>	<b>1,31</b>	<b>0,49</b>	<b>0,79</b>

MMF = Micofenolato Mofetil; Rapa = Rapamicina, Cont = controle g = grama, DP = desvio padrão, EMP = erro médio padrão

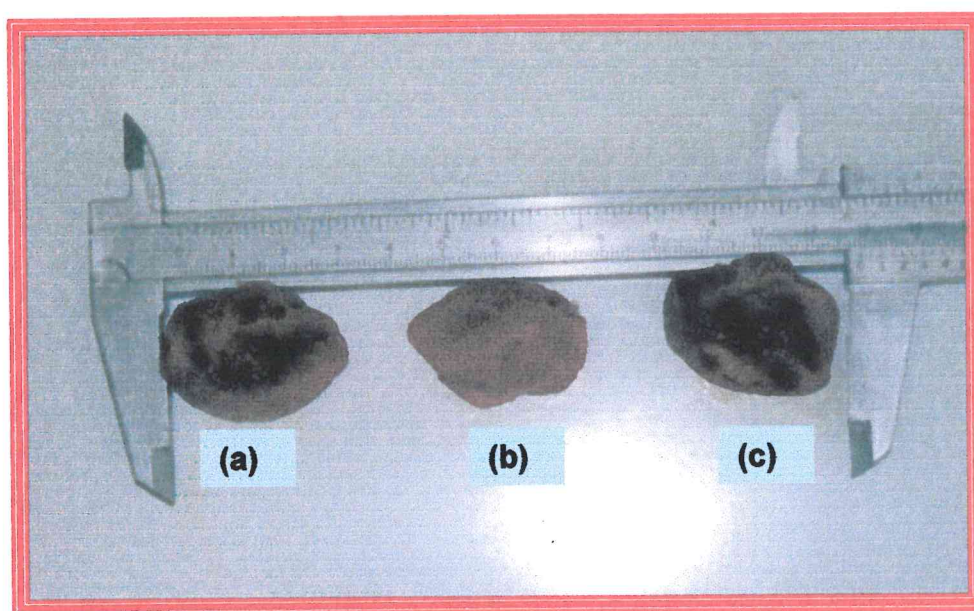
\* Não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do experimento (p=0,229).



**Figura 37.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com: a) água mineral; b) Rapamicina, na dose de 1,5mg/kg/dia, ambas iniciadas no 4º dia após o implante tumoral e administradas durante 7 dias por via oral (foto no 10º dia).



**Figura 38.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com Micofenolato Mofetil, na dose de 10mg/kg/d, iniciado no 4º dia após o implante tumoral e administrado durante 7 dias por via oral (foto no 10º dia).



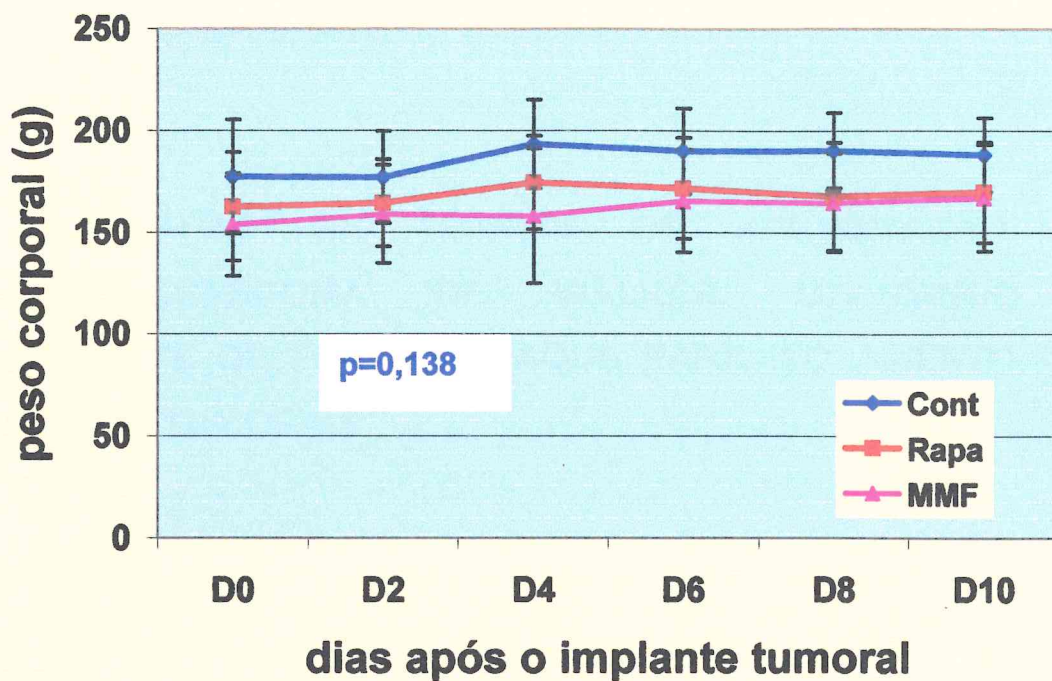
**Figura 39** Carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea da axila direita, em animais submetidos a tratamento com: a) água mineral; b) Rapamicina, 1,5mg/kg/d; c) Micofenolato mofetil, 10mg/kg/d, todos iniciados no 4º dia após o implante tumoral e administrados durante 7 dias por via oral.

**Tabela 29.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com água mineral, Rapamicina ou Micofenolato Mofetil, iniciados no 4º dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 7 dias.

Grupos	D0	D2	D4	D6	D8	D10
<b>Cont *</b> <b>n= 7</b>	177,3 ± 28,0	176,9 ± 22,7	193,3 ± 21,7	189,9 ± 21,2	190,3 ± 18,3	188,1 ± 18,0
<b>Rapa *</b> <b>n= 10</b>	162,6 ± 26,7	164,3 ± 21,5	174,5 ± 22,9	171,5 ± 24,9	167,9 ± 26,5	169,6 ± 24,8
<b>MMF*</b> <b>n= 9</b>	153,7 ± 25,1	158,8 ± 24,1	158,0 ± 33,1	165,4 ± 25,4	164,7 ± 24,1	166,9 ± 26,2

Valores expressos em gramas como média ± desvio padrão; Cont = controle (água destilada), Rapa = Rapamicina; MMF = Micofenolato Mofetil; D = dia;

\* Não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do experimento ( $p=0,138$ ).



**Figura 40.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, segundo o grupo de tratamento: água mineral (cont), Rapamicina (Rapa), Micofenolato Mofetil (MMF), todos iniciados no 4º dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 7 dias. \* Não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do experimento ( $p=0,138$ ).

## SEGUNDA PARTE

### “MODIFICAÇÃO NA TÉCNICA DE IMPLANTAÇÃO DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER, UTILIZANDO O GRADIENTE DE FICOLL-HYPAQUE PARA ISOLAMENTO DAS CÉLULAS TUMORAIS”

## **2. 1. Comparação da curva de crescimento tumoral do carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando ou não o gradiente de Ficoll-Hypaque para isolamento das células tumorais antes da implantação em animais.**

**Grupos experimentais:** G1 (n=10): sem gradiente de ficoll; G2 (n=10): com gradiente de ficoll.

O crescimento tumoral foi observado em todos os animais implantados, independente da técnica utilizada. Não houve diferença significativa no volume tumoral entre as duas técnicas ao longo do tempo (sem ficoll,  $17,9 \pm 3,8 \text{ cm}^3$ ; com ficoll,  $17,2 \pm 4,4 \text{ cm}^3$ ;  $p=0,190$ , **figuras 41 e 42, tabelas 30 e 31**).

O tumor foi dissecado e pesado (**figura 43**). Não houve diferença significativa no peso tumoral entre os dois grupos: sem ficoll,  $7,0 \pm 1,8 \text{ g}$ ; com ficoll,  $7,3 \pm 2,8 \text{ g}$ ; ( $p = 0,569$ , **tabela 32**).

A análise histológica evidenciou padrões semelhantes de intensidade de infiltração de células pequenas indiferenciadas e de necrose nos dois grupos. Entretanto, exsudato granulocítico leve a moderado foi mais acentuado no grupo com ficoll (100%) do que no grupo sem ficoll (80%) e hemorragia leve (50%) a moderada (37,5%) foi observada somente no grupo com ficoll. (**tabela 33**)

O peso corporal dos animais foi semelhante nos dois grupos (sem ficoll,  $157,9 \pm 19,5 \text{ g}$ ; com ficoll,  $157,4 \pm 17,5 \text{ g}$ ). Todos ganharam peso ao longo do estudo, não havendo diferença entre eles ao final do experimento (sem ficoll,  $176,4 \pm 25,7 \text{ g}$ ; com ficoll,  $177,9 \pm 27,0 \text{ g}$ ;  $p=0,106$ , **tabela 34, figura 44**).

**Tabela 30.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando células tumorais isoladas **sem gradiente de Ficoll-Hypaque.**

Ratos	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
R1	0,004	0,41	2,6	3,8	6,6	13	19,1
R2	0	0,006	0,5	1,6	3,2	10,9	12,6
R3	0	0,006	1,4	2,6	4,4	8,6	12,6
R4	0	0,2	2,5	1,8	4,2	14	23,1
R5	0,004	0,02	1,3	3,6	4	10,6	17,4
R6	0	0,04	0,6	2,9	3,2	6,6	16,2
R7	0	0,2	0,8	3,2	6,6	13,5	19,1
R8	0	0,4	0,9	2,3	4,2	14,4	18,5
R9	0	0	2,9	4,5	5,5	14,9	23,9
R10	0	0,300	1,5	3,6	4,2	12,5	16,2
<b>Média</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,16</b>	<b>1,50</b>	<b>2,99</b>	<b>4,61</b>	<b>11,90</b>	<b>17,87</b>
<b>DP</b>	<b>0,0017</b>	<b>0,17</b>	<b>0,87</b>	<b>0,93</b>	<b>1,23</b>	<b>2,70</b>	<b>3,78</b>
<b>EMP</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,05</b>	<b>0,28</b>	<b>0,29</b>	<b>0,39</b>	<b>0,85</b>	<b>1,19</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

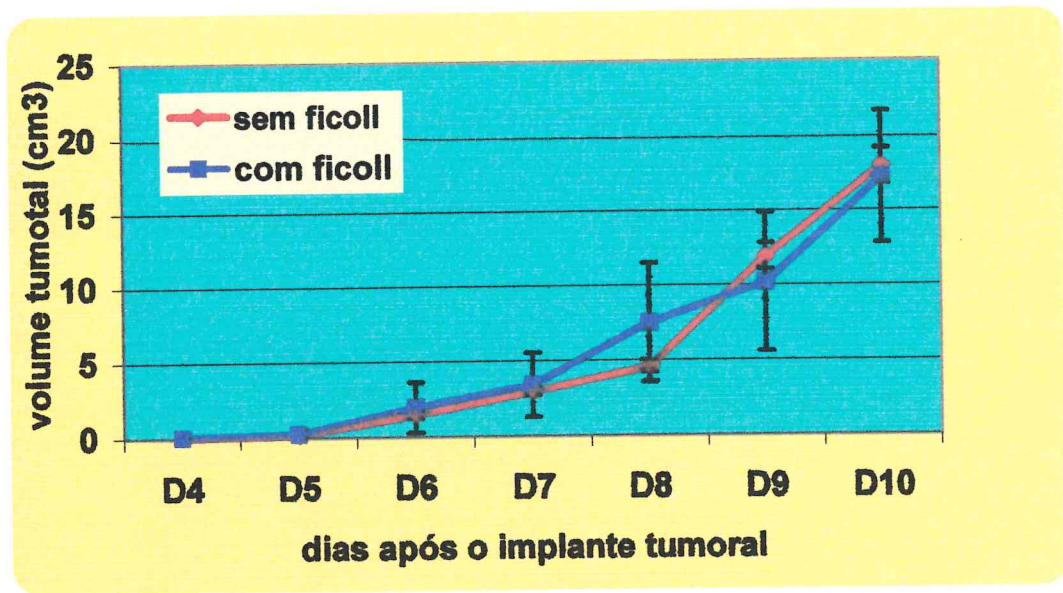
Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

**Tabela 31.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando células tumorais isoladas com gradiente de Ficoll-Hypaque.

Ratos	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
R1	0,00	0,13	1,0	4,6	8,4	13,0	20,5
R2	0,06	0,4	2,8	3,7	10,6	8,4	18,9
R3	0,00	0,2	3,0	4,2	14,0	7,4	21,4
R4	0,04	0,3	0,4	1,3	4,6	6,6	10,2
R5	0,08	0,7	5,3	7,2	11,8	20,2	10,9
R6	0,00	0,006	1,0	4,0	6,4	7,2	21,4
R7	0,13	0,8	3,2	4,4	5,5	13,9	15,4
R8	0,00	0,006	0,6	0,6	4,6	8,8	20,2
R9	0,00	0,006	0,4	0,8	1,9	6,5	15,8
<b>Média</b>	<b>0,03</b>	<b>0,28</b>	<b>1,97</b>	<b>3,42</b>	<b>7,53</b>	<b>10,22</b>	<b>17,19</b>
<b>DP</b>	<b>0,05</b>	<b>0,30</b>	<b>1,70</b>	<b>2,15</b>	<b>3,95</b>	<b>4,61</b>	<b>4,36</b>
<b>EMP</b>	<b>0,02</b>	<b>0,10</b>	<b>0,57</b>	<b>0,72</b>	<b>1,32</b>	<b>1,54</b>	<b>1,45</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.



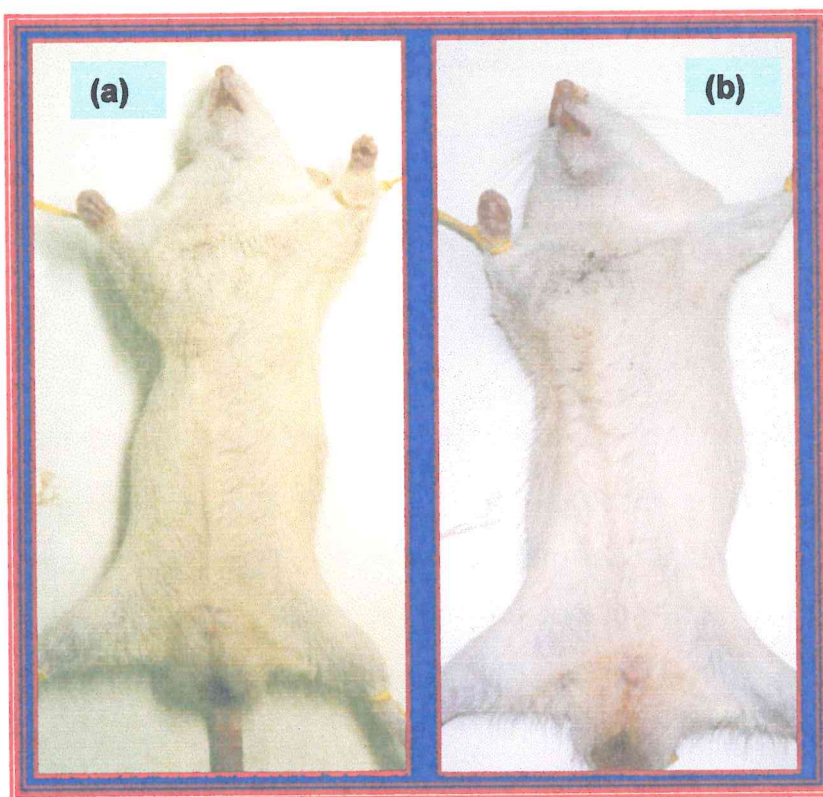
**Figura 41.** Crescimento tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando células tumorais isoladas **com e sem gradiente de Ficoll-Hypaque**.\* Não houve diferença significativa entre os dois grupos ao longo do experimento ( $p=0,190$ ).

**Tabela 32.** Peso tumoral em animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando células tumorais isoladas **com e sem gradiente de Ficoll-Hypaque.**

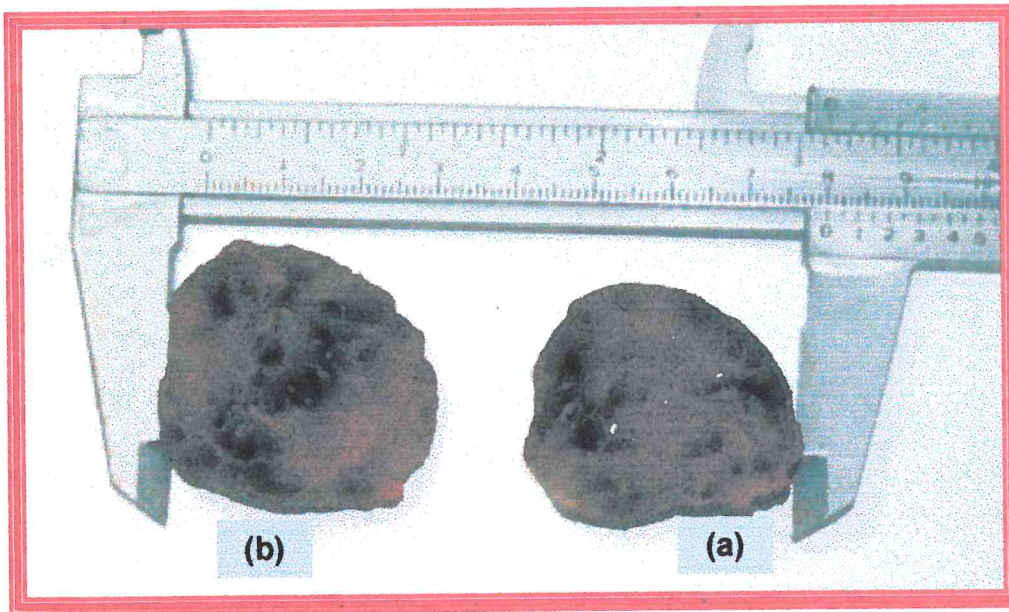
Ratos	Com ficoll *	Sem ficoll *
	(g)	(g)
R1	7,0	7,0
R2	7,0	6,0
R3	14,0	7,0
R4	5,0	6,0
R5	7,0	7,0
R6	8,0	5,0
R7	4,0	6,0
R8	7,0	6,0
R9	7,0	11,0
R10	10,0	9,0
<b>Média</b>	<b>7,30</b>	<b>7,00</b>
<b>DP</b>	<b>2,78</b>	<b>1,76</b>
<b>EMP</b>	<b>0,89</b>	<b>0,57</b>

DP = desvio padrão, EMP = erro médio padrão

\* Não houve diferença significativa entre os dois grupos ao longo do experimento (p=0,569).



**Figura 42.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita a partir de uma suspensão de células tumorais isoladas (a) sem gradiente de ficoll; (b) com gradiente de ficoll (foto no 10<sup>o</sup> dia).



**Figura 43.** Carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea da axila direita, em animais inoculados com 1ml suspensão contendo  $1 \times 10^6$  células isoladas (a) sem gradiente de ficoll; (b) com gradiente de ficoll.

**Tabela 33.** Análise histológica do tumor de Walker no 10º dia após o implante em ratos Wistar, utilizando suspensão celular obtida com ou sem o gradiente de Ficoll-Hypaque.

Parâmetros		Sem ficoll (n=10)	Com ficoll (n=10)
NIPC	leve	40%	14%
	moderado	50%	86%
	intenso	10%	-
necrose	leve	40%	37,5%
	moderado	50%	50%
	intenso	10%	12,5%
Exsudato granulocítico	leve	60%	87,5%
	moderado	20%	12,5%
	intenso	-	-
Hemorragia	leve	-	37,5%
	moderado	-	50%
	intenso	-	-

NIPC = neoplasia indiferenciada de pequenas células

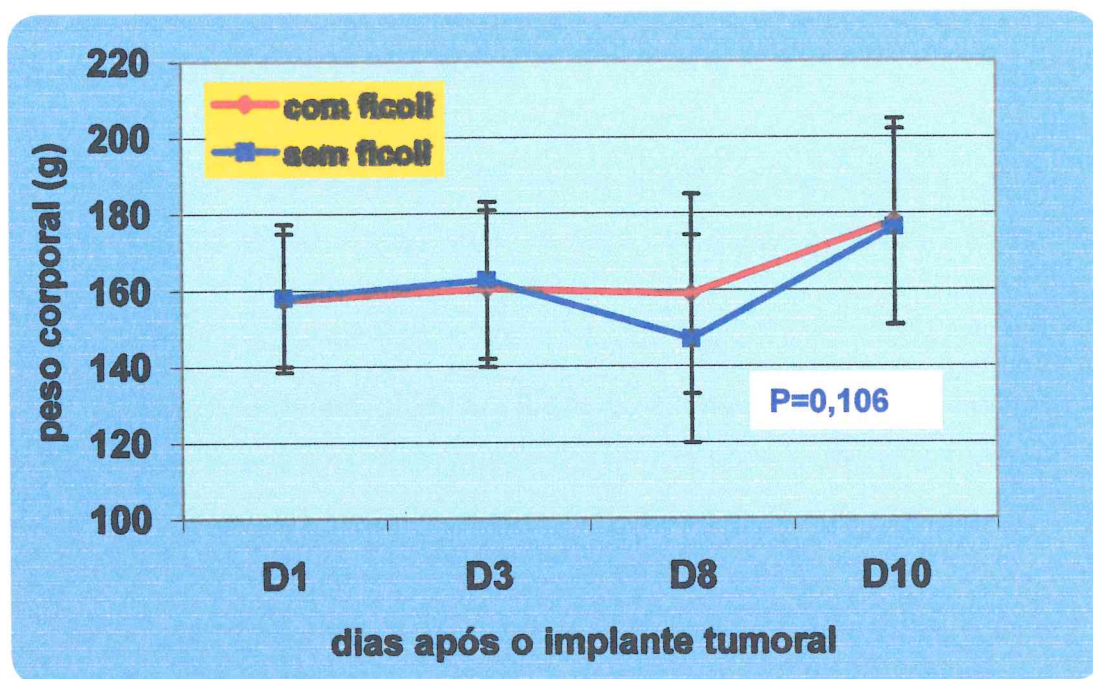
**Tabela 34.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker utilizando células tumorais isoladas **com e sem gradiente de Ficoll-Hypaque.**

Grupos	D1	D3	D8	D10
<b>Com ficoll *</b> <i>n= 7</i>	157,4	160,3	158,9	177,9
	±	±	±	±
	17,5	20,6	26,2	27,0
<b>Sem ficoll *</b> <i>n= 10</i>	157,9	162,5	147,0	176,4
	±	±	±	±
	19,5	20,7	27,3	25,7

Valores expressos em gramas como média ± desvio padrão; D = dia; \* Não houve diferença significativa entre os dois grupos ao longo do experimento ( $p=0,106$ ).

Figura 44. Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando células tumorais isoladas com e sem gradiente de Ficoll-Hypaque.

\* Não houve diferença significativa entre os dois grupos ao longo do experimento ( $p=0,106$ ).



**Figura 44.** Peso corporal de animais inoculados com carcinossarcoma 256 de Walker, utilizando células tumorais isoladas **com e sem gradiente de Ficoll-Hypaque**.

\* Não houve diferença significativa entre os dois grupos ao longo do experimento ( $p=0,106$ ).

## 2. 2. Avaliação do efeito do Rapamicina na regressão do carcinossarcoma 256 de Walker, em modelo animal empregando células tumorais isoladas com gradiente de Ficoll-Hypaque.

**Grupos experimentais:** G1 (n=10, Cont): azeite de oliva administrado por via oral; G2 (n=10, Rapa) Rapa na dose de 1,5mg/kg/dia e administrada por via oral.

O tumor se desenvolveu em todos os animais, não havendo diferença no volume tumoral entre os dois grupos no 13º dia após o implante tumoral: Cont,  $24,9 \pm 6,4$  ; Rapa,  $21,1 \pm 6,0 \text{ cm}^3$  ( $p=0,831$ , **tabelas 35 e 36, figuras 45 e 47**).

Os animais foram sacrificados no 14º dia após o implante tumoral. Não foi detectada metástase tumoral em nenhum animal. O tumor foi dissecado e pesado. Não houve diferença significativa no peso tumoral entre os animais tratados com Rapa e o grupo controle (Rapa,  $9,30 \pm 4,03 \text{ g}$ ; Cont,  $10,0 \pm 2,58 \text{ g}$ ,  $p=0,445$ , **tabela 37, figura 46**).

O peso corporal dos animais foi semelhante nos dois grupos (Cont,  $133,3 \pm 24,2 \text{ g}$ ; Rapa,  $133,8 \pm 23,1 \text{ g}$ ). Todos ganharam peso ao longo do estudo, não havendo diferença entre eles ao final do experimento (Cont,  $148,5 \pm 34,2 \text{ g}$ ; Rapa,  $159,3 \pm 22,3$ ;  $p = 0,445$ , **tabela 38, figura 48**).

**Tabela 35.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com células isoladas do carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **azeite de oliva** administrado, iniciado no **4º dia** após a inoculação tumoral e administrado por via oral durante 10 dias.

Ratos	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
R1	0,00	0,00	0,08	1,57	3,97	7,81	15,40	20,50	36,00	21,40
R2	0,00	0,11	1,37	9,13	12,20	13,00	19,10	-	-	-
R3	0,08	0,29	3,61	8,44	14,90	18,50	22,10	-	-	-
R4	0,00	0,25	0,41	4,60	4,80	10,20	13,00	22,70	28,20	-
R5	0,00	0,41	0,50	4,00	5,95	10,80	20,80	21,40	24,50	-
R6	0,00	0,00	1,18	4,00	4,80	10,00	16,30	18,50	17,10	-
R7	0,008	0,55	2,92	7,20	10,80	14,30	20,70	22,00	24,50	43,60
R8	0,00	0,55	2,30	7,20	7,14	9,84	18,50	18,90	26,00	26,0
R9	0,00	0,00	0,04	0,55	0,86	2,56	5,32	11,00	17,90	17,90
<b>Média</b>	<b>0,018</b>	<b>0,24</b>	<b>1,38</b>	<b>5,20</b>	<b>7,27</b>	<b>10,78</b>	<b>16,80</b>	<b>19,29</b>	<b>24,89</b>	<b>27,23</b>
<b>DP</b>	<b>0,035</b>	<b>0,23</b>	<b>1,30</b>	<b>3,00</b>	<b>4,49</b>	<b>4,40</b>	<b>5,20</b>	<b>3,97</b>	<b>6,396</b>	<b>11,41</b>
<b>EMP</b>	<b>0,014</b>	<b>0,09</b>	<b>0,53</b>	<b>1,00</b>	<b>1,83</b>	<b>1,80</b>	<b>2,12</b>	<b>1,62</b>	<b>2,611</b>	<b>4,66</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior , d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

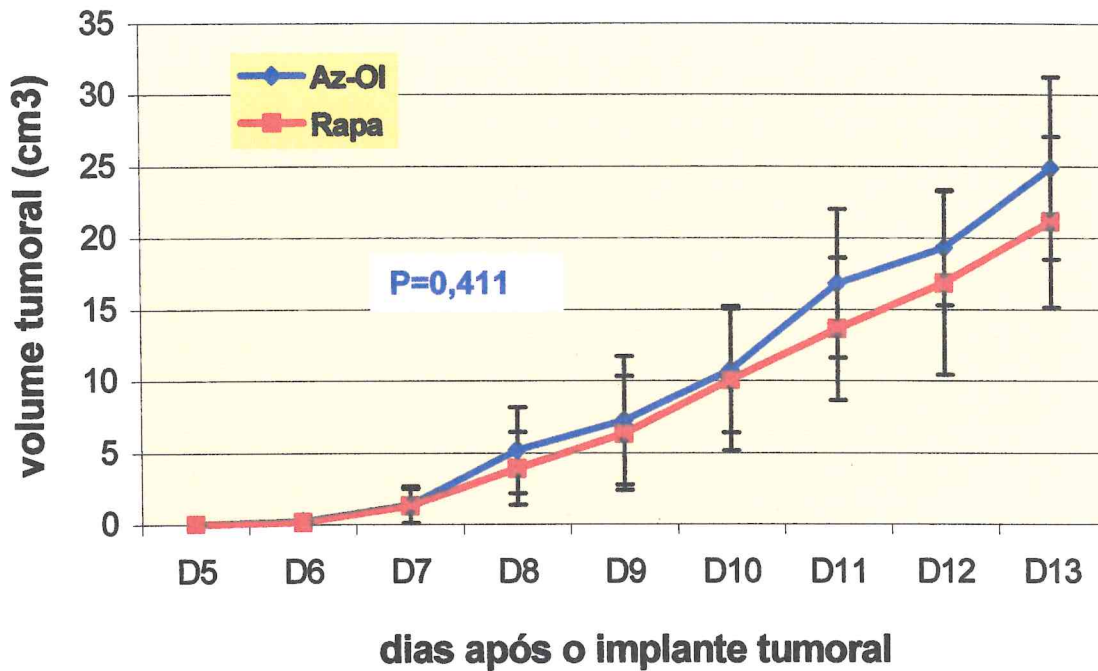
**Tabela 36.** Crescimento tumoral\*, expresso em cm<sup>3</sup>, em animais inoculados com células isoladas do carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com **Rapamicina**, na dose de 1,5mg/kg/dia, iniciada no **4º dia** após a inoculação tumoral e administrado por via oral durante 10 dias.

Ratos	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
R1	0,00	0,14	4,00	8,35	13,50	16,30	18,00	18,70	-	-
R2	0,00	0,09	0,60	3,24	3,79	5,57	16,90	20,70	26,00	26,00
R3	0,00	0,17	0,49	2,18	4,00	5,51	6,35	7,26	15,80	15,80
R4	0,00	0,41	1,57	7,20	10,10	15,40	17,30	18,50	23,90	-
R5	0,00	0,20	0,55	1,80	4,85	11,80	15,40	22,70	28,20	28,70
R6	0,01	0,22	1,01	4,60	8,75	12,60	14,90	23,90	26,70	-
R7	0,00	0,03	0,29	0,50	0,75	2,89	5,07	5,32	11,40	11,40
R8	0,04	0,22	2,25	4,20	7,81	14,00	17,90	16,90	17,90	-
R9	0,00	0,13	1,01	2,92	3,61	6,61	10,90	17,90	19,10	-
<b>Média</b>	<b>0,006</b>	<b>0,18</b>	<b>1,31</b>	<b>3,89</b>	<b>6,35</b>	<b>10,08</b>	<b>13,64</b>	<b>16,88</b>	<b>21,13</b>	<b>20,48</b>
<b>DP</b>	<b>0,013</b>	<b>0,11</b>	<b>1,18</b>	<b>2,54</b>	<b>3,97</b>	<b>4,96</b>	<b>5,00</b>	<b>6,43</b>	<b>5,98</b>	<b>8,21</b>
<b>EMP</b>	<b>0,005</b>	<b>0,04</b>	<b>0,48</b>	<b>0,85</b>	<b>1,62</b>	<b>2,02</b>	<b>2,04</b>	<b>2,63</b>	<b>2,44</b>	<b>3,35</b>

\* Volume tumoral (cm<sup>3</sup>) = (Dm x d<sup>2</sup>)/2

Dm = Diâmetro maior, d = diâmetro menor, DP = desvio padrão, EMP= erro médio padrão, D = dia.

Não houve diferença significativa no crescimento tumoral ao longo do experimento (p=0,411).

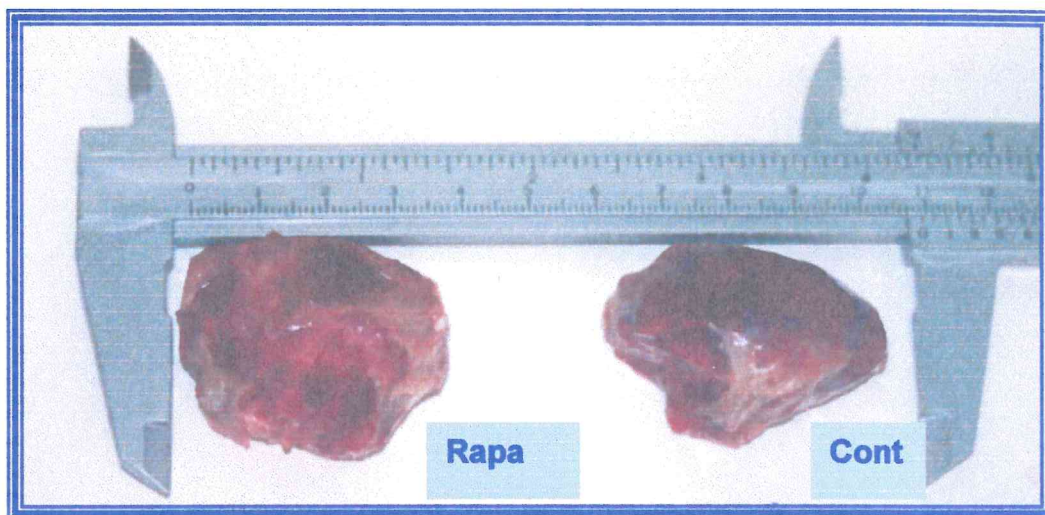


**Figura 45.** Crescimento tumoral em animais inoculados com células isoladas do carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com Rapamicina (Rapa, n=9), na dose de 1,5mg/kg/dia, ou azeite de oliva, (Az-OI, n=9), ambos iniciados no 4º dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 10 dias. Não houve diferença significativa no crescimento tumoral entre os grupos ao longo do experimento (p=0,411).

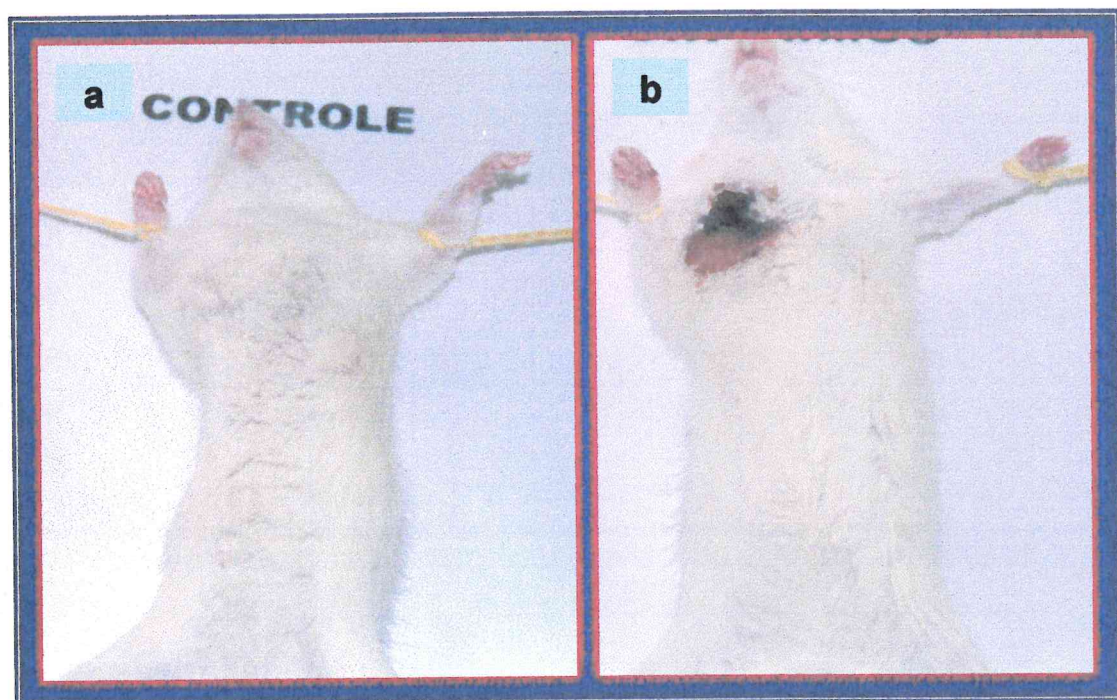
**Tabela 37.** Peso tumoral em animais inoculados com células isoladas do carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com azeite de oliva ou Rapamicina, na dose de 1,5mg/kg/dia, ambos iniciados no 4º dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 10 dias.

Ratos	Azeite de Oliva (g)	Rapa (g)
R1	13,0	11,0
R2	11,0	7,0
R3	7,0	14,0
R4	9,0	5,0
Média	10,0	9,3 *
DP	2,58	4,03
EMP	1,291	2,016

Rapa= Rapamicina; g = grama; DP = desvio padrão; EMP = erro médio padrão; \* não houve diferença significativa entre os grupos.



**Figura 46.** Carcinossarcoma 256 de Walker dissecado da região subcutânea da axila direita, em animais submetidos a tratamento com Rapamicina (Rapa, 1,5mg/kg/d) ou azeite de oliva (Cont), iniciados no 4º dia após o implante tumoral e administrados durante 10 dias por via oral.



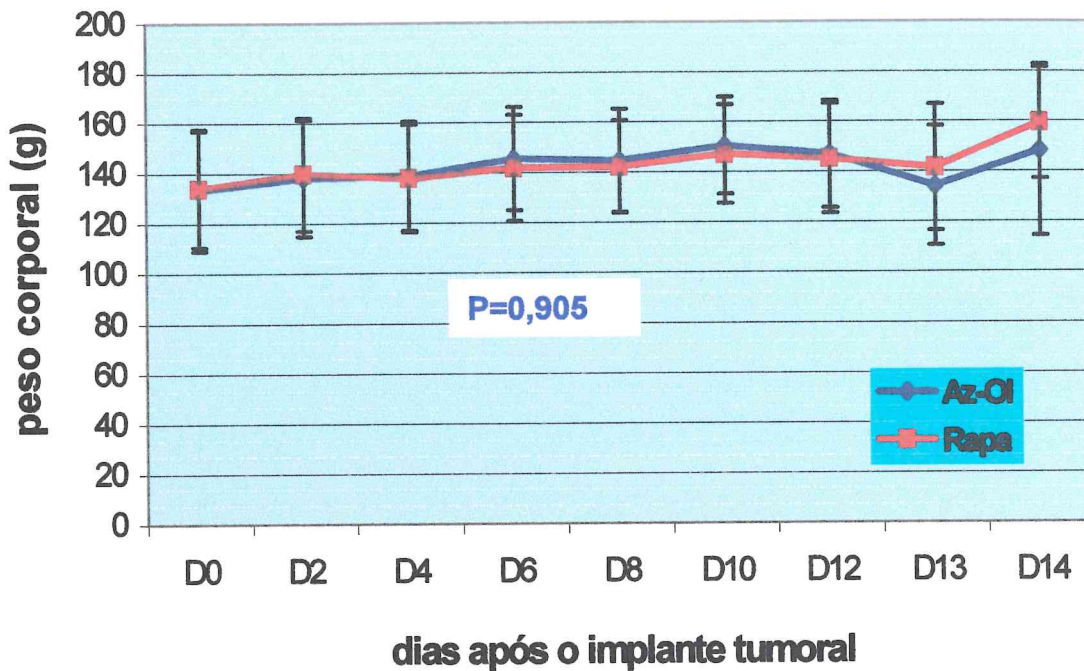
**Figura 47.** Rato Wistar AF macho com carcinossarcoma 256 de Walker implantado na região subcutânea axilar direita e submetido a tratamento com: a) Azeite de oliva por via oral, iniciado no 4º dia após o implante tumoral e administrado durante 10 dias; b) Rapamicina, na dose de 1,5mg/kg/d, iniciada no 4º dia após o implante tumoral e administrada por via oral durante 10 dias (foto no 10º dia)

**Tabela 38.** Peso corporal de animais inoculados com células isoladas de carcinosarcoma 256 de Walker e tratados com azeite de oliva ou Rapamicina, na dose de 1,5mg/kg/dia, ambos iniciados no 4<sup>o</sup> dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 10 dias.

Grupos	D0	D2	D4	D6	D8	D10	D12	D13	D14
<b>Az-Ol *</b> <b>(n=9)</b>	133,3	138,1	138,9	145,6	144,7	150,6	147,1	134,4	148,5
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	24,2	23,3	21,8	20,6	20,6	19,3	21,3	23,9	34,2
<b>Rapa *</b> <b>(n=9)</b>	133,8	139,7	137,9	142,0	142,3	147,1	145,3	141,6	159,3
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	23,1	22,6	21,4	21,2	18,5	19,6	21,7	25,1	22,3

Valores expressos em gramas como média ± desvio padrão; Az-Ol = azeite de oliva; Rapa = Rapamicina; D = dia; \* p = 0,445 entre os grupos ao longo do experimento.

Figura 48. Peso corporal de animais inoculados com células isoladas de carcinosarcoma 256 de Walker e tratados com azeite de oliva ou Rapamicina (Rapa) na dose de 1,5mg/kg/dia, ambos iniciados no 4<sup>o</sup> dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 10 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do experimento.



**Figura 48.** Peso corporal de animais inoculados com células isoladas de carcinossarcoma 256 de Walker e tratados com azeite de oliva (Az-OI, n=9) ou Rapamicina (Rapa, n=9), na dose de 1,5mg/kg/dia, ambos iniciados no 4º dia após a inoculação tumoral e administrados por via oral durante 10 dias. Não houve diferença significativa no peso corporal dos ratos entre os grupos ao longo do experimento (p=0,905).

A literatura em transplante de órgãos descreve a incidência de neoplasias em sobreviventes de transplante de diversos órgãos, sendo que a incidência a longo-prazo tem variado-se um pouco entre os diferentes tipos de órgão transplantado, destacando-se as doenças cardiovasculares, as doenças oportunistas e as neoplasias (HOWARD et al., 2002).

# DISCUSSÃO

Grande número de neoplasias em pacientes submetidos a transplante de órgãos transplantados tem sido relatado em diversos estudos. O primeiro estudo de transplantes (CTTR - Cincinnati Transplant Tumor Registry), iniciado em 1967 por Israel Penn e por ele mantido até sua morte, em 1986, relatou os dados de centros de transplantes de diversos países (PENN, 1990). Através destes dados, foi possível determinar que a incidência de câncer média, 3 a 4 vezes maior nos pacientes submetidos a transplantes de órgãos do que na população em geral (PENN, 1990). Esta incidência não variou de acordo com a região estudada, com o tipo de órgão transplantado ou com o tempo decorrido após o transplante. Assim, o risco calculado de desenvolver um câncer é de aproximadamente 14% após 10 anos de transplante (PENN, 1967), aumentando para 22% após 20 anos (KYLLÖNEN e KOSKINEN, 1985) mostrando que o risco calculado de desenvolver um câncer na população da Yorkshire e Humberáide (UK) após 20 anos de transplante para 40% nos pacientes transplantados.

Rizvi e cols. (2001) observaram uma incidência de 17% de neoplasias em 174 pacientes submetidos a transplante de

O transplante de órgãos é uma modalidade de tratamento destinada a pacientes com doença avançada dos rins, coração, fígado, pâncreas, intestino delgado. Um transplante bem sucedido pode salvar ou melhorar a qualidade de vida do paciente portador de falência orgânica terminal. Esta modalidade de tratamento tem atingido resultados impressionantes nas duas últimas décadas graças à melhor compreensão da imunobiologia básica e aos avanços no tratamento médico e cirúrgico.

A evolução nos transplantes permitiu uma melhora significativa na sobrevida do enxerto e do paciente a curto-prazo. Entretanto, as complicações a longo-prazo tornaram-se um importante fator limitante na sobrevida do paciente, destacando-se as doenças cardiovasculares, as infecções oportunistas e as neoplasias (HOWARD et al., 2002).

Grande parte do conhecimento obtido sobre câncer em pacientes transplantados foi possível graças aos dados do Registro de Tumor em Transplantes (*CTTR - Cincinnati Transplant Tumor Registry*), iniciado em 1968 por Israel Penn e por ele mantido até sua morte, em 1999. Este registro coleta dados de centros de transplantes de diversos países (PENN et al., 1971) e, através destes dados, foi possível determinar que a incidência de câncer é, em média, 3 a 4 vezes maior nos pacientes submetidos a transplantes de órgãos do que na população em geral (PENN, 1990). Esta incidência pode variar de acordo com a região estudada, com o tipo de órgão transplantado e com o tempo decorrido após o transplante. Assim, o risco calculado de desenvolver um câncer é de aproximadamente 14% após 10 anos de transplante (PENN, 1987), aumentando para 22% após 20 anos (KYLÖNEN, 2000). London e cols. (1995) mostraram que o risco calculado de desenvolver neoplasia na população de Yorkshire e Humberside (UK) após 20 anos aumentou de 6% para 40% nos pacientes transplantados.

Rinaldi e cols. (2001) observaram uma incidência de 11,6% de neoplasias em 174 pacientes submetidos a transplante cardíaco em Pávia.

A incidência de linfomas é, geralmente, maior nos receptores de transplante cardíaco do que em receptores de transplante renal (OPELZ et al., 1993). Esta diferença pode ser explicada pela imunossupressão mais agressiva usada nos transplantes cardíacos, com o objetivo de evitar as graves conseqüências acarretadas pela rejeição neste tipo de transplante.

Sheil e cols. (1985b) analisaram 155 pacientes transplantados com órgãos de doadores cadáveres que apresentaram neoplasia. Estes autores observaram, excluindo os tumores de pele, uma mortalidade de 46,5% atribuída à neoplasia, enquanto que esta taxa foi de 2% para as neoplasias de pele do tipo não melanoma e de 25% para os melanomas.

Krikorian e cols (1978) detectaram 7 pacientes com neoplasia do total de 127 submetidos a transplante cardíaco e, analisando a probabilidade atuarial, identificaram o risco de desenvolver esta complicação como sendo de  $2,7 \pm 1,9\%$  a 1 ano e de  $25,6 \pm 11,0\%$  a 5 anos, com mortalidade global de 57%.

O tumor de pele do tipo não melanoma, o mais freqüente em pacientes transplantados, determina uma mortalidade global de 6% em receptores adultos e de 9% na população pediátrica (PENN, 1984; 1994).

Desta forma, as neoplasias representam uma causa importante de morbidade e mortalidade após dez anos de transplante. Este risco justifica todo o esforço científico para proporcionar uma adaptação mais adequada do receptor ao enxerto, provavelmente através da utilização de uma imunossupressão mais específica e o emprego de drogas imunossupressoras com menor potencial oncogênico.

Para avaliar o potencial oncogênico das drogas imunossupressoras utilizadas na imunossupressão de manutenção nos pacientes submetidos a transplantes de órgãos, escolhemos o modelo experimental do implante do carcinossarcoma de Walker em ratos. Ao contrário do que ocorre nos modelo *in vitro*, este modelo não exclui do processo oncogênico a participação do sistema imune do animal, inicialmente intacto no processo de implantação do tumor e a

seguir exposto aos efeitos das drogas imunossupressoras, de forma similar ao que ocorre com os pacientes transplantados.

Uma grande variedade de tumores pode ser transplantados em animais para realização de estudos farmacológicos (STEWART et al., 1959). A escolha do carcinossarcoma de Walker para testar os imunossupressores advém do fato de ser este um modelo de neoplasia bem caracterizado, facilmente mantido em laboratório, de crescimento rápido e uniforme, que raramente apresenta regressão espontânea e tem índice de “pega” de 100% em ratos Wistar inoculados por via intramuscular (FONTELES et al., 1978; MORAES FILHO et al., 1980). Além do mais, este modelo já foi anteriormente utilizado para avaliar o efeito de agentes citotóxicos (SMITH, 1969).

A utilização do gradiente de ficoll-hypaque permitiu preparar uma suspensão tumoral isenta de hemácias, leucócitos, plaquetas e pequenos fragmentos de tecido que não são retirados com a filtração. Apesar da toxicidade do ficoll-hypaque, a viabilidade celular não foi comprometida, conforme constatado pelo azul trypan. O crescimento tumoral foi semelhante nos animais implantados com suspensão celular obtida pela técnica padrão e pelo uso do gradiente de ficoll-hypaque. Entretanto, a análise histológica mostrou maior infiltração granulocítica e hemorragia nos tumores do grupo com ficoll.

A CsA foi iniciada 24 horas antes da inoculação de um milhão de células do carcinossarcoma 256 de Walker por via subcutânea. Os resultados mostraram que a CsA induziu um crescimento de 20,5%, porém este efeito não foi significativo, fato confirmado pela semelhança entre o volume e peso tumoral dos animais controles e daqueles tratados com CsA.

A primeira justificativa para a ausência de efeito da CsA seria a não absorção da droga. Esta hipótese é rejeitada pelos níveis sanguíneos da droga, que mostraram uma boa absorção nos experimentos com CsA utilizada isoladamente ( $307,9 \pm 142,3$  ng/ml) ou associada a Rapa ( $446,93 \pm 166,97$  ng/ml e  $345,9 \pm 194,9$  ng/ml). Entretanto, níveis mais baixos foram observados

no experimento com CsA associada ao MMF (CsA =  $48,3 \pm 26,4$  ng/ml e MMF + CsA =  $51,0 \pm 24,5$  ng/ml). Não há uma explicação para estes baixos níveis, uma vez que não houve modificação no modo de administração da droga. É possível que problemas técnicos na dosagem da CsA justifiquem este fato, uma vez que houve um longo intervalo entre os experimentos.

A CsA foi introduzida no tratamento dos transplantes de órgãos em 1982. O fato mais marcante após a sua introdução foi a constatação do aumento na incidência de linfomas (LANG et al., 1994), que se elevou de 11% com o esquema imunossupressor clássico associando AZA + PRED para 26% com a CsA (PENN, 1987). Além disso, os linfomas apareceram mais precocemente nos pacientes tratados com CsA (20 meses) quando comparados com aqueles recebendo o esquema clássico (60 meses) (PENN, 1987). Além dos linfomas, posteriormente também foi constatada uma maior incidência no sarcoma de Kaposi (8,4%) e carcinoma renal (6,5%) nos pacientes tratados com CsA em relação àqueles recebendo AZA (2,6% e 3,2%, respectivamente) (PENN, 1996). Porém, esta análise apresenta um fator de confusão, uma vez que a CsA não era o único fator de risco para o desenvolvimento destes tumores. Outros fatores importantes foram a utilização de OKT3, ALG ou ATG para o tratamento e profilaxia de rejeições agudas (PENN, 1987; SWINNEN et al., 1990, OPELZ et al., 1993).

Beveridge e cols. (1984) analisaram 5.550 transplantados tratados com CsA e verificaram que a incidência de linfoma e doenças linfoproliferativas foi de 0,4% quando a CsA era administrada isoladamente ou associada a baixas doses de PRED. Porém, esta incidência aumentou para 8% quando a CsA foi associada a outros imunossupressores.

Estudos *in vitro* com células humanas mostraram que a CsA é mutagênica, induzindo alterações nas cromátides irmãs. Entretanto, a concentração de CsA utilizada nos experimentos ( $1\mu\text{l/ml}$ ) foi maior do que aquela usada clinicamente (YUZAWA et al., 1986).

Reitz e cols. (1982) relataram o desenvolvimento de linfomas em 12 de 97 primatas não humanos submetidos a transplante de coração ou coração-pulmão que receberam CsA em doses variadas por mais de duas semanas.

Este aumento preferencial nos linfomas induzidos pela CsA pode ser explicado pela inibição dos sinais dos linfócitos T em resposta aos antígenos, permitindo excessiva resposta das células B e acarretando doenças linfoproliferativas. Entretanto, estudos experimentais também mostraram que a CsA favorece a disseminação de linfomas T. O linfoma de células T L5178YE é imunogênico e raramente induz metástase em animais imunocompetentes. No entanto, camundongos portadores deste tumor tratados com CsA apresentaram disseminação linfomatosa, mostrando que, apesar da CsA inibir a proliferação das células T, estimulou o potencial metastático das células “adormecidas” (WHITE et al, 1979; ECCLES et al, 1980).

Entretanto, Dantal e cols. (1998) avaliaram, entre 1989 e 1994, a incidência de rejeição aguda e de neoplasias em pacientes submetidos a transplante renal recebendo doses baixas ou normais de CsA. Os autores constataram que a incidência de neoplasias foi significativamente menor no grupo de pacientes tratados com dose-baixa de CsA (25/116) do que naqueles tratados com dose-normal (40/115), sendo a redução mais importante evidenciada nas neoplasias de pele e nas doenças linfoproliferativas. O modelo semiparamétrico de Cox confirmou que o grupo dose-normal apresentou maior risco de desenvolver neoplasia do que o grupo dose-baixa ( $p < 0,026$ ). Entretanto, os pacientes do grupo dose-baixa apresentaram maior incidência de rejeição aguda do que o grupo dose-normal (9 vs 1,  $p < 0,02$ ), embora a curva de sobrevivência do enxerto não fosse diferente entre os grupos após seis anos de seguimento (89% vs 82%).

Apesar destes dados, não existe concordância na literatura médica sobre a influência da CsA na ocorrência de neoplasias após transplantes de órgãos. Hiesse e cols. (1997) avaliaram, entre 1970 e 1996, 1.710 receptores de transplantes renais e constataram que não houve diferença na incidência global de neoplasias no grupo tratado com o esquema clássico (8,2%) em

relação àquele recebendo CsA (7,5%), e que a taxa de doenças linfoproliferativas também foi semelhante (14,3% e 14,9%, respectivamente). Porém, o risco cumulativo de neoplasia em 10 anos foi significativamente maior no grupo tratado com CsA em relação ao grupo convencional (13,86 vs 8,37,  $p < 0,0001$ ). Os autores concluíram que os fatores de risco para o aparecimento das neoplasias foram idade avançada e menor tempo de hemodiálise pré-transplante, e que o uso de ALG ou OKT3 não foram fatores significativos. London e cols. (1995) também não encontraram nenhuma evidência de risco aumentado de neoplasia em pacientes transplantados tratados com CsA, destacando como fatores de riscos aqueles mesmos observados por Hiesse e cols.

Eccles e cols. (1980) mostraram que a taxa de crescimento do sarcoma FS6 implantado em camundongos e do sarcoma MC24 implantado em ratos não foi modificada pela administração de CsA nas doses de 20 ou 80mg/kg/dia. Entretanto, estes autores também avaliaram o padrão de metástase espontânea dos sarcomas FS6 e FS29 em camundongos tratados com CsA. Estes tumores são imunogênicos e têm taxa de metástase relativamente baixa, geralmente confinada aos pulmões. A administração da CsA acarretou significativo aumento na incidência de metástases e, no caso do sarcoma FS6, também alterou a sua distribuição.

Van der Elst e cols. (1986) investigaram a influência da CsA na ocorrência e crescimento de metástases hepáticas após a injeção intraportal de agregados celulares de carcinoma colônico (DHD/K12), em ratos singênicos. Metástase hepática foi observada em 40% dos animais controles e em 100% daqueles tratados com CsA. Além disso, o volume total do tecido metastático foi 2.000 vezes maior no grupo CsA ( $22.176,0 \pm 2.046,0 \text{ mm}^3$ ) quando comparado com o grupo controle ( $9,46 \pm 5,11 \text{ mm}^3$ ).

Bonavides de Castro (2000) avaliou a influência de imunossupressores no desenvolvimento de metástases em ratos inoculados por via subcutânea com fibro-histiocitoma maligno de baixo índice metastático (T.E.G.S. 2047). Ela demonstrou que, nos animais tratados com CsA (10mg/kg/dia), o índice de

metástase pulmonar aumentou significativamente (72,72%), quando comparado os animais controles (0%). Este aumento também foi significativamente maior em relação ao grupo tratado com azatioprina (43,75%) e metilprednisolona (50%). Entretanto, MMF, na dose de 20mg/kg/dia, não causou o desenvolvimento de metástase nesse modelo experimental. CsA e metilprednisolona induziram crescimento tumoral significativo, enquanto os animais tratados com MMF ou AZA não diferiram do grupo controle.

Assim, embora existam evidências mostrando que a CsA desempenhe um papel oncogênico, nosso experimento mostra que esta ação não pode ser extensiva a todos os tipos de tumores, uma vez que não induziu crescimento significativo do carcinossarcoma 256 de Walker.

O **MMF** inibiu o crescimento do carcinossarcoma de Walker em 28,2%. Ao final do experimento, o volume e o peso tumoral foram menores nos animais tratados com MMF quando comparados com os animais controles e aqueles tratados com CsA. Entretanto, este efeito somente foi observado quando a droga foi iniciada 24 horas antes do implante tumoral. Quando o tratamento com MMF foi retardado até o 4º dia, nenhum efeito sobre o crescimento tumoral foi detectado.

O MMF é uma droga que foi introduzida recentemente para uso clínico no tratamento imunossupressor e existe pouca experiência acumulada sobre seus efeitos na incidência de neoplasias após transplantes de órgãos. O *Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group* comparou pacientes em uso de MMF nas doses de 2g/dia e 3g/dia com pacientes tratados com AZA e relatou uma incidência de morte por neoplasia após 3 anos de 0%, 0,6% e 2,4%, respectivamente. Os tumores mais frequentes foram os cutâneos não melanomas (AZA=13,6%, MMF 2g=11,1% e MMF 3g=4,3%), seguidos dos linfomas/PTLD (0,6%, 1,2% e 1,8%, respectivamente) (MATHEW, 1998). Estes resultados foram semelhantes aos do estudo europeu, onde a incidência de morte por neoplasias em três anos foi de 0% no grupo placebo, 0,6% no grupo MMF-2g e 1,9% no grupo MMF-3g (MYCOPHENOLATE MOFETIL..., 1999). Entretanto, no estudo multicêntrico

americano, nenhuma mortalidade acarretada por neoplasia foi observada nos pacientes submetidos a transplante renal recebendo MMF após três anos (MYCOPHENOLATE MOFETIL ..., 1999).

O rato é mais sensível à toxicidade pelo MMF do que o camundongo, com  $DL_{50}$  de 400 a 450mg/kg/dia. Estudos de toxicidade mostraram que a dose utilizada neste estudo (10mg/kg/dia) é bem tolerada por esta espécie de animal (SWEENEY et al., 1972).

O MPA tem mostrado significativa atividade antineoplásica contra vários tipos de tumores transplantáveis em camundongos, entre eles o carcinoma ascítico de Ehrlich implantado por via subcutânea (-60%), carcinoma ascítico mamário MM2, hepatoma intraperitoneal MH134 (superior -100%), hepatoma C3H/He (-72,6%), sarcoma SR-C3H/He Th62 (-50%) (SUZUKI et al., 1969). Da mesma forma, alguns derivados do MPA apresentaram potente atividade antineoplásica, com nenhuma ou pouca atividade imunossupressora (OHSUGI et al., 1976).

Estudos demonstraram que o carcinossarcoma 256 de Walker é sensível ao MPA quando a droga é administrada 24 horas após o implante tumoral, porém utilizaram doses mais elevadas (entre 25 e 50mg/kg/dia) do que aquela empregada em nosso experimento (10mg/kg/dia) (CARTER et al., 1969; SWEENEY et al., 1972).

O MPA é um inibidor seletivo da IMPDH com afinidade cinco vezes maior para a isoforma tipo II ( $K_i=7$  nM), que é expressa nos linfócitos ativados, do que na isoforma tipo I, expressa nos linfócitos em repouso (NATSUMEDA et al., 1993).

A atividade da IMPDH é positivamente ligada à transformação celular e progressão tumoral. Inibição desta enzima resulta em depleção celular do nucleotídeo guanina, através do bloqueio da síntese de purina pela "via de novo" (LOWE et al., 1977). A atividade desta enzima está aumentada nas células transformadas, da mesma forma que a atividade da GMP sintetase

(JACKSON et al., 1975; WEBER, 1977). A concentração de GMP, particularmente de dGMP, está elevada de modo importante nas células cancerosas. Nucleotídeos guanina são necessários como substratos, ativadores ou reguladores de muitas vias de metabolismo celular, incluindo síntese de DNA, RNA e proteínas (WEBER, 1983; Weber et al., 1991). O efeito antiproliferativo dos inibidores da IMPDH sobre as células tumorais já é conhecido desde os experimentos *in vitro* realizado por Smith e cols. (1974), utilizando células de tumor ascítico de Ehrlich. Mais recentemente, Lee e cols. (1985) mostraram que inibidores da IMPDH, como MPA, ribaravina, selenazofurina e tiazofurina, inibiram o crescimento das células de timoma T (S-49) de camundongos, a captação de [<sup>3</sup>H]-timidina pelo DNA e [<sup>3</sup>H]-uridina pelo RNA, e demonstraram que a adição de guanosina exógena reverteu o efeito antiproliferativo destas quatro drogas. Este mesmo resultado foi observado por Sidi e cols. (1988) utilizando células MCF-7 e T-47D do câncer mamário.

O efeito anti-tumoral do MMF também tem sido demonstrado em modelos experimentais de tumores humanos xenogênicos, entre eles o linfoma de células B (Daudi), leucemias de células T (Molt-4), adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de cólon (LS174T e T84) e adenocarcinoma pulmonar. O MMF ainda produziu significativa inibição do crescimento dos tumores de células B e tumor de cólon LS174T, mesmo quando iniciado após o tumor tornar-se palpável (TRESSLER et al., 1994).

Os estudos demonstram que o efeito antiproliferativo do MMF ocorre pela inibição da enzima IMPDH resultando no bloqueio da síntese de novo das purinas. Entretanto, nosso estudo mostra que, em animais com implante do carcinossarcoma 256 de Walker, este efeito é perdido quando a droga é iniciada após o tumor encontrar-se em fase de crescimento. Esta falha do inibidor da IMPDH pode ser explicada, pelo menos em parte, pela reciclagem dos precursores da biossíntese das purinas pela "via de recuperação". Natsumeda e cols. (1984) mostraram um aumento na atividade das enzimas adeninafosforibosiltransferase (APRT), hipoxantinafosforibosiltransferase (HPRT) e guaninafosforibosiltransferase (GPRT) no carcinoma de pulmão,

carcinoma de células renais e hepatoma implantados em camundongos. Estas “vias de recuperação” poderiam aumentar a concentração do nucleotídeo guanosina e reverter o efeito antiproliferativo dos inibidores da IMPDH. Isto pode explicar, em parte, a aparente falha dos inibidores da via da síntese de novo das purinas em fornecer resultados quimioterapêuticos duradouros.

Os resultados de Weber e cols. (1991) reforçam esta hipótese. Estes autores observaram uma ação antiproliferativa sinérgica incubando células de hepatoma na presença de acivina, um inibidor da síntese de novo das purinas, e dipiridamol, bloqueador do transporte de nucleotídeos e nucleobases.

Outro mecanismo provável de ação do MMF é indução de apoptose. Cohn e cols. (1999) examinaram o efeito do MPA na linhagem de células linfocíticas T humanas (Molt-4) e linhagens precursoras de células monocíticas humanas (U937 e THP-1). Eles observaram que MPA induziu apoptose em cada uma destas linhagens e que a adição de guanosina exógena inibiu a apoptose das células U937 e THP-1. As três linhagens celulares progrediram através da fase G1 do ciclo celular e se acumularam na fase S. Porém, é possível que a apoptose tenha sido causada pela privação do GTP na fase S do ciclo celular ou durante a síntese de DNA.

Em resumo, o carcinossarcoma 256 de Walker mostrou-se, em nosso modelo, sensível ao tratamento com MMF, desde que a droga seja introduzida precocemente. No entanto, uma vez o tumor já estabelecido, este efeito antiproliferativo é abolido. O mecanismo mais provável de escape destas células tumorais à ação da droga é a ativação da “via de recuperação” da síntese de purinas, com aumento nos estoques do nucleotídeo guanosina e progressão do ciclo celular para a fase S.

A Rapa apresentou um importante efeito antiproliferativo, com valores mais elevados do que aquele observado para o MMF, embora esta diferença não fosse significativa (Rapa, 49,3% e MMF, 28,2%). No entanto, da mesma forma que o MMF, este efeito é abolido quando a droga é iniciada com o tumor já em fase de crescimento. Esta perda do efeito antiproliferativo é mantida

mesmo quando os animais são acompanhados por tempo mais prolongado. Utilizando a suspensão celular obtida a partir do gradiente de ficoll-hypaque pudemos observar que não houve diferença significativa no volume e peso tumorais entre os animais controles e aqueles tratados com Rapa, iniciada no 4º dia após o implante tumoral e administrada durante 10 dias.

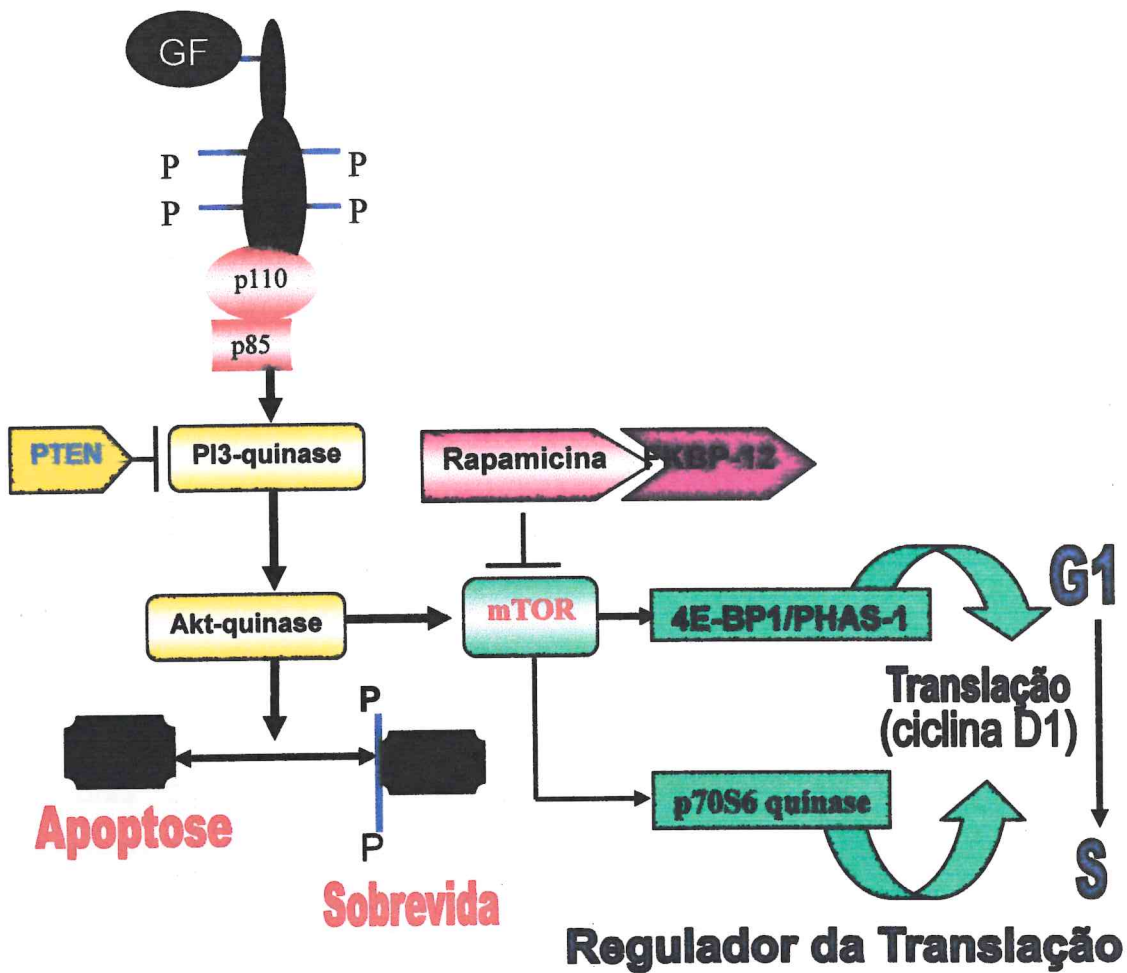
A Rapa foi isolada em Montreal, em 1972, no Laboratório de Pesquisas da Ayerst. Ela começou a ser desenvolvida como uma droga antifúngica, mas logo os pesquisadores perceberam sua atividade imunossupressora. Amostras desta nova droga foram enviadas pelo Dr. Sehgal ao Instituto Nacional do Câncer (NCI) para ser avaliada como nova droga antineoplásica (GARBER, 2001). No programa do NCI, o produto é inicialmente testado contra células leucêmicas P388, a menos que existam evidências de sua ação antitumoral. Os compostos que mostrarem atividade preliminar são reavaliados, utilizando a mesma linhagem. Com a confirmação da atividade, em seguida, a droga e/ou seus compostos parentes são testados contra um painel de células tumorais. Compostos apresentando nível de atividade DN2, aqueles que inibem um ou mais tumores do painel, são considerados para desenvolvimento pré-clínico (produção, formulação e toxicologia). Desde a sua criação até 1981, aproximadamente 180.000 culturas foram testadas *in vivo* contra tumores murinos, visando à produção de novas drogas antineoplásicas. Deste total, somente 8,5% destes produtos mostraram-se ativos. A Rapa (NSC 22080) havia sido selecionada pela NCI por apresentar boa atividade antitumoral contra o câncer mamário e de cólon, tumor de cérebro e ependimoblastoma (DOUROS; SUFNESS, 1981). O grupo de Sehgal mostrou que a Rapa apresentava modesta atividade antitumoral contra as células leucêmicas P388 e era ativa contra melanocarcinoma B16 e tumor de cólon 38, quando utilizada nas doses entre 100 a 400mg/kg/d, durante nove dias por via intraperitoneal. Além disso, os autores avaliaram a atividade da Rapa no tumor de cólon 38, na dose de 400mg/kg/d, e compararam três vias de administração: intraperitoneal, subcutânea e oral. Os resultados mostraram que a via oral produziu menor atividade antitumoral (64,8%) em relação às outras vias (84,8% na subcutânea e mais de 90% na intraperitoneal) e esta diferença foi significativa (ENG et al.,

a sobrevivência celular, como a UAD.

1984). No entanto, o programa da Rapamicina foi abortado pela Ayerst e somente reativado seis anos mais tarde (GARBER, 2001).

Inúmeros pesquisadores se interessaram em compreender os mecanismos que controlam o crescimento e o ciclo celular. Estes conhecimentos foram importantes para elucidar, pelo menos em parte, o mecanismo de ação da Rapa.

Conforme mostrado na **figura 49**, mTOR, também conhecida como FRAP (*FKBP-rapamycin associated protein*), RAFT1 (*Rapamycin-FKBP target 1*) e RAP1 (*Rapamycin associated protein 1*), é membro de uma família de proteinoquinas, recentemente identificada e denominada quinases relacionadas ao fosfoinositídeo 3-quinase (PIKKs). A mTOR está envolvida em muitas funções reguladoras críticas relacionadas à progressão do ciclo celular, pontos de controle do ciclo celular que comandam as respostas ao DNA lesado (*checkpoint*), reparo do DNA e recombinação de DNA (HIDALGO; ROWINSKY, 2000; SCHALM; BLENIS, 2002). Em resposta ao estímulo de crescimento, células quiescentes aumentam a translação de um subgrupo de mRNA, cujo subproduto protéico é necessário para a progressão celular através da fase G1 do ciclo. A mTOR regula essencialmente o sinal de transdução e está envolvida no acoplamento entre o estímulo de crescimento e a progressão do ciclo celular. O fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / proteinoquinase B(Akt) (PI3K/Akt) parece ser o fator modulador chave através do qual a interação do fator de crescimento e seu receptor afeta o estado de fosforilação da mTOR (**figura 49**). O PI3K tem um papel central na proliferação celular, motilidade, neovascularização, viabilidade e senescência e é regulado positivamente nas células cancerosas. Embora o papel da PI3K não esteja claro, a atividade desta enzima sobre as tirosinoquinas induz mitogênese, crescimento e transformação celular. PI3K e Akt são considerados proto-oncogenes e sua via é inibida pelos genes supressores de tumores PTEN. Existem outras vias que são ativadas pelo PI3K, mas a via da Akt é de particular interesse por causa de seu papel na inibição da apoptose e na indução da proliferação celular, através da alteração do estado de fosforilação de proteínas que regulam a apoptose ou a sobrevivência celular, como a BAD (BLUME-JENSEN; HUNTER, 2001).



**Figura 49.** Mecanismo de transdução de sinal sensível à Rapamicina.

Rapa e CCI-779 ligam-se à imunofilina FKBP-12. O complexo FKBP12-Rapa bloqueia a atividade da quinase mTOR (*mammalian target of Rapamycin*). Este bloqueio inibe os reguladores da translação 4E-BP1/PHAS e p70<sup>s6k</sup>, acarretando redução na translação do mRNA de proteínas específicas essenciais para a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S.

FG= fator de crescimento; AKT= proteinoquinase B; PI3K=fosfatidilinositol 3 quinase; FKBP12= FK-binding protein 12; 4EBP1= proteína 1 de ligação do fator iniciador 4E; PHAS-1=*phosphorilated heat- and acid-stable protein*; p70<sup>s6k</sup>= proteína ribossomal de 40S proteína S6 quinase

(HIDALGO; ROWSINSKY, 2000)

A ativação do mTOR modula duas vias que controlam a translação de subgrupos específicos de RNA mensageiro (mRNA): proteína 1 de ligação do fator iniciador 4E (4E-BP1), também chamada de PHAS-1 (*phosphorilated heat- and acid-stable protein*) e a proteína ribossomal de 40S proteína S6 quinase (p70<sup>S6k</sup>). Existem evidências indicando que a ativação do PI3K ou da Akt é suficiente para induzir a fosforilação do 4E-BP1/PHAS-1 e da p70<sup>S6k</sup>, através da mTOR (HALLORAN, 2000; HIDALGO; ROWSINKY, 2000).

A primeira via reguladora modulada pelo estado de fosforilação da mTOR, a 4E-BP1/PHAS-1, inibe o início da translação através de sua associação com a eIF-4E. A ligação da 4E-BPs ao eIF-4E é dependente do estado de fosforilação da 4E-BP. No estado não fosforilado, que predomina nas células quiescentes, a 4E-BP1/PHAS-1 liga-se ao eIF-4E, inibindo sua atividade. Em resposta ao estímulo proliferativo, a 4E-BP1/PHAS-1 torna-se fosforilada e diminui sua afinidade pelo eIF-4E. Esta dissociação aumenta a translação do mRNA. Este subgrupo de mRNA codifica proteínas importantes para a proliferação celular, como *c-MYC* e a ciclina D1 (BLUME-JENSEN, HUNTER, 2001; SCHALM; BLENIS, 2002). Polunovsky e cols. (2000) mostraram que tratamento de fibroblastos Ras-transformado com Rapa aumenta a susceptibilidade a apoptose induzida por drogas citostáticas.

A segunda via modulada pela mTOR é a quinase p70<sup>S6k</sup>. Existem duas isoformas da p70<sup>S6k</sup>: a  $\alpha$ I de localização nuclear e a  $\alpha$ II predominantemente citoplasmática. Estas diferentes localizações têm claras implicações para os tipos de substratos-alvo das isoformas das quinases. A p70<sup>S6k</sup> é fosforilada no estado basal em todos os tipos de células quiescentes. Estimulação mitogênica induz fosforilação em múltiplos novos sítios dentro da quinase resultando na sua ativação. Com a ativação pelo estímulo proliferativo mediado pela via de transdução do sinal PI3K/Akt, a mTOR fosforila a p70<sup>S6k</sup>, que por sua vez fosforila a proteína ribossomal de 40S proteína S6, aumentando a translação do mRNA, incluindo aquele que codifica as proteínas ribossomais, fatores de alongação e IGF-II (CHOU; BLENIS, 1995; HIGALGO; ROWINSKY, 2000).

Estudos mostram que a fosforilação do S6 ocorre em duas fases, uma mais precoce em 10 a 15 minutos, seguida de outra mais longa, que atinge o máximo em 30 a 45 minutos e a retorna aos níveis basais em 120 minutos. A regulação negativa desta segunda fase acarreta redução na capacidade do fator de crescimento epidérmico em fosforilar a S6 (FERRARI; THOMAS, 1994).

A Rapa resulta em rápida e profunda desfosforilação da p70<sup>S6k</sup>, suprimindo a sua atividade (HIDALGO; ROWINSKY, 2000). A Rapa também promove desfosforilação da 4E-BP1/PHAS-1, com aumento na ligação do eIF-4E e concomitante diminuição na translação do mRNA para progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S (HIDALGO; ROWINSKY, 2000). Este bloqueio da proliferação celular na fase G1 é a base da sua atividade imunossupressora, impedindo a proliferação de linfócitos T e B. Entretanto, esta não parece ser sua única ação benéfica na prevenção da rejeição dos transplantes. Outra importante ação da Rapa parece ser seu efeito sobre as células dendríticas. Woltman e cols. (2001) mostraram que este imunossupressor induziu apoptose nas células dendríticas humanas derivadas dos monócitos e das células CD34, e este efeito foram dose e tempo-dependentes, mas não evidenciou atividade sobre os macrófagos alveolares ou células mielóides.

A inibição da translação do mRNA acarreta interrupção do ciclo celular na transição G1/S e o mecanismo preciso responsável por este efeito é ciclo celular e tipo celular específico.

Agentes antiproliferativos exercem seus efeitos através da modulação dos componentes da maquinaria do ciclo celular. Progressão da fase G1 para a fase S requer uma seqüência de ações das ciclinas D, E e A com suas quinases ciclinas-dependentes (cdks). A Rapa aumenta o *turnover* na ciclina D1, inibe a atividade da quinase ciclina A-dependente e também bloqueia a eliminação do p27, inibidor das cdks, facilitando a formação do complexo ciclina/cdks-p27. Dependendo do tipo de célula, a Rapa interrompe o ciclo celular no meio para o final da fase G1, correspondendo ao período quando o

complexo ciclina D-cdk4 torna-se ativo (CHOU; BLENIS, 1995; HIGALGO; ROWINSKY, 2000).

A Rapa inibe o crescimento tumoral provavelmente por inibir a translação do mRNA envolvido na transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular em resposta à estímulo mitogênico e por interferir no balanço ciclina/cdks/inibidores das cdks na fase precoce do ciclo celular (HIGALGO; ROWINSKY, 2000).

Em 1994, Dilling e cols. (1994) mostraram que três de quatro linhagens de rabdomyosarcoma infantil apresentaram elevado grau de sensibilidade à Rapa, enquanto que seis linhagens de carcinoma colônico testadas foram relativamente resistentes. Os autores investigaram se esta sensibilidade das células do rabdomyosarcoma estava ligada à via do IGF-1R. Células de rabdomyosarcoma embrionário (Rh1 e Rh30) resistentes à Rapa foram incubadas durante cinco dias com anticorpos monoclonais ( $\alpha$ -IR-3), que bloqueiam a via de sinalização da IGF-1R. As células Rh30 foram altamente sensíveis ao  $\alpha$ -IR-3, mostrando uma dependência da via IGF-1R na atividade antiproliferativa (DILLING et al, 1994).

A indução de apoptose foi o mecanismo proposto para explicar a atividade inibitória da Rapa contra linhagens de células T de camundongo IL2-dependente, células da leucemia promielocítica humana HL-60 e do câncer ovariano humano SKOV3 (SHI et al., 1995). Este mecanismo é corroborado com os experimentos de Seufferlein e Rozengurt (1996) utilizando neoplasia de pequenas células de pulmão. Estes autores mostraram que a Rapa bloqueia a progressão desta linhagem celular na fase G1 do ciclo celular, através da inibição da ativação da p70/p85 kDa S6 quinase, coletivamente chamadas de p70<sup>S6k</sup>. Esta enzima pode regular diversos processos intracelulares envolvidos na resposta mitogênica, incluindo a síntese protéica, a translação de subgrupos específicos de mRNA, progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular.

Em 1997, Metcalfe e cols. (1997) mostraram que a Rapa age através de uma via independente do p53 para inibir o ciclo celular na fase G1, resultados

confirmados mais tarde por Huang e cols. (2001). Segundo estes autores, linhagens de células de rhabdomyosarcoma humano (Rh1 e Rh30) tratadas com a Rapa apresentaram um aumento na taxa de apoptose de 8% para 25%. Além disso, a Rapa foi capaz de induzir apoptose nas células que continuaram a progredir ao longo do ciclo celular. Eles concluíram que a interrupção do ciclo celular na fase G1 protegeria a célula da apoptose. No entanto, crescentes evidências têm mostrado que a apoptose é frequentemente associada com a célula na fase G1 do ciclo celular e que a interrupção na fase G1 tardia ou na fase S pode induzir ou acelerar a apoptose (WOLTMAN et al., 2001).

Yamamoto-Yamaguchi e cols. (2001) mostraram que o tratamento de células promielocíticas humanas HL-60 com Rapa, em doses inferiores a 12 $\mu$ M, acarretou interrupção do ciclo na fase G1, não induziu alterações apoptóticas, porém foi capaz de inibir o crescimento celular. Este efeito antiproliferativo foi observado também para as células mieloblásticas ML1, mas não para as células da leucemia monocítica humana NB4 e U937, mostrando que a atividade antineoplásica era específica para o tipo de célula testada.

Outras linhagens celulares têm mostrado sensibilidade à ação antiproliferativa da Rapa e de seu análogo CCI-779, um éster similar à Rapa com relação à potência e inibição da sinalização da mTOR, porém apresentando maior solubilidade em água e podendo ser administrado por via endovenosa. Entre estas linhagens estão o rhabdomyosarcoma Rh18 e Rh30, adenocarcinoma de cólon, meduloblastoma humano DAOY e glioma maligno 251 (DUDKIN et al., 2001; GEOERGER et al., 2001).

A indução da apoptose não é o único mecanismo proposto para explicar a ação antineoplásica da Rapa, podendo também apresentar uma ação antiangiogênica tumoral. Guba e cols (2002) utilizaram o modelo da criação de câmara dorsal em camundongos, implantada com carcinossarcoma de cólon CT-26, para avaliar a atividade angiogênica da Rapa e CsA. A Rapa acarretou inibição do crescimento tumoral em paralelo à redução da neoangiogênese, enquanto que a CsA produziu precoce neovascularização e acelerada taxa de crescimento tumoral. Estudos *in vitro*, utilizando CT-26 ou melanoma B26,

demonstraram que a Rapa inibiu a secreção de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), um dos reguladores centrais do crescimento vascular, enquanto que a CsA não apresentou efeito significativo.

Em nosso experimento, a Rapa inibiu o crescimento do carcinossarcoma de Walker quando introduzida precocemente. Os estudos mais recentes da literatura indicam que o mecanismo de ação mais provável da Rapa é a indução da apoptose. Entretanto, estes estudos foram realizados *in vitro*, sem a participação do sistema imune e não considerando os mecanismos de defesas tumorais. Novamente, nós observamos que quando o imunossupressor foi introduzido numa fase em que o tumor já se encontrava em fase de crescimento, o efeito antiproliferativo da Rapa foi completamente abolido.

Estudos *in vivo* na literatura com utilização deste imunossupressor são escassos. Dudkin e cols. (2001) avaliaram a sensibilidade do xenoenxerto rabdomyossarcoma Rh18 ao CCI-779, análogo da Rapa. Camundongos implantados com este tumor foram tratados com doses variando de 8,7 a 20mg/kg/dia durante 5 dias, perfazendo 2 ciclos com intervalo de 21 dias. O CCI-779 induziu significativa inibição do crescimento tumoral, independente da dose administrada, porém o crescimento foi retomado com a interrupção da droga. Este mesmo esquema mostrou ser sensível para animais implantados com tumor de próstata, glioma e carcinoma ovariano, mas não para a linhagem tumoral OVCAR5, cujo retardo do crescimento não foi significativo (DUDKIN et al., 2001). Uma possível explicação para sensibilidade diferencial é que nas células intrinsecamente resistentes à Rapa, a atividade da p70<sup>S6k</sup> é inibida, embora seja incapaz de suprimir a translação do c-MYC após estimulação da IGF-1. Outra possibilidade é que estas células regulam negativamente os níveis de 4E-BPI, desregulando a translação 4-dependente, sem alterar significativamente os níveis ou a atividade da p70<sup>S6k</sup> (HOSOI et al., 1998; DILLING et al., 2000). Esta última alternativa é corroborada pelo experimento de Dumont e cols. (1994) mostrando que linhagens de linfoma de células T resistentes à Rapa continuaram a proliferar e mantiveram a atividade da p70<sup>S6k</sup> em presença da droga.

A questão chave do problema é que a grande maioria dos protocolos de imunossupressão dos diversos tipos de transplantes de órgãos e tecidos utilizam associações de drogas e os efeitos antineoplásicos de cada droga individual podem ser modificados quando elas são empregadas de forma associada. Tendo em vista este objetivo, nós avaliamos o efeito da associação de imunossupressores sobre o crescimento do carcinossarcoma 256 de Walker. Nosso estudo mostra que o efeito inibidor do crescimento tumoral apresentado pelo MMF é abolido quando associado a CsA. Este resultado é de suma importância, pois esta associação de drogas imunossupressoras é freqüentemente utilizada em transplantes de órgãos, seja MMF com CsA ou outro inibidor da calcineurina, o FK506. Se esta observação for extensível a outros tipos de tumores, com maior tempo de experiência com o uso de MMF, será de se esperar que a incidência de tumores em geral não seja diferente daquela observada em pacientes utilizando esquema duplo de CsA e PRED, provavelmente o mesmo ocorra com a incidência de linfomas.

Ao contrário do MMF, a Rapa manteve sua atividade antineoplásica quando associada à CsA.

Muthukkumar e cols. (1995) mostraram que a Rapa induziu profunda inibição do crescimento de linhagens de linfomas de células B imaturas (L1.2, NFS.1. e WEHI-279) e de células de timoma. Esta inibição foi antagonizada quando a Rapa foi associada ao FK506, mas não com doses crescentes de CsA.

Como a Rapa é uma droga que foi introduzida recentemente, seu tempo de uso clínico é insuficiente para avaliar a incidência de neoplasias. Entretanto, MacDonald (2001) relatou a incidência de linfomas/PTLD em pacientes recebendo Rapa+CsA+PRED, como sendo de 0,4% após o primeiro ano, com dose de 2 mg/dia, e de 2,3% com dose de 5mg/dia. Dois pacientes do grupo Rapa-5mg haviam recebido OKT3 e MMF+AZA previamente. A incidência de outras neoplasias foi de 1,8% em cada grupo da Rapa e de 1,5% no grupo placebo+CsA+PRED. O Estudo Multicêntrico Americano avaliou pacientes em uso de CsA, Pred, e Rapa, nas doses de 2 mg ou 5 mg, e comparou com

controles, em uso de Aza+CsA+Pred. A incidência de neoplasia após um ano foi de 0,4% no grupo Rapa-2mg, de 0% no grupo Rapa-5mg e de 0,3% nos controles, não havendo diferença na incidência de linfomas entre os três grupos (0,4%, 2,9% e 2,5%, respectivamente) (KAHAN, 2000).

Luan e cols. (2002) avaliaram o efeito da associação de Rapa com CsA sobre o crescimento do carcinossarcoma renal implantado por via subcutânea em camundongos. A CsA foi administrada por via subcutânea, na dose de 20mg/kg em dias alternados, e Rapa, 2 mg/kg/d, por gavagem, ambas iniciadas no 3º dia após o implante tumoral ou quando o tumor atingisse um volume de 50mm<sup>3</sup>. Resultado semelhante ao nosso estudo foi observado, ou seja, a Rapa isoladamente ou associada à CsA inibiu significativamente o crescimento tumoral no 24º dia (Rapa = 308 ± 66 mm<sup>3</sup>; Rapa + CsA = 268 ± 55 mm<sup>3</sup>, CsA = 3103 ± 305 mm<sup>3</sup>, controle = 3103 ± 305 mm<sup>3</sup>). A Rapa também foi eficaz quando o tumor foi inoculado na região subcapsular do rim. A sobrevida dos animais foi significativamente maior nos animais tratados com Rapa (controle = 28,6 ± 0,9 dias, CsA = 27,8 ± 1,3 d; Rapa = 67,7 ± 2,7 d, Rapa + CsA = 75,2 ± 2,1 d, sendo Rapa estatisticamente diferente de CsA e controle, e Rapa + CsA diferente de todos os grupos). Este efeito antineoplásico da Rapa isolada ou associada à CsA foi confirmado em camundongos imunodeficientes (SCID) inoculados com adenocarcinoma renal e carcinoma transicional de bexiga T24 humano. Estudos *in vitro* realizados por estes mesmos autores mostraram que o tratamento das células do adenocarcinoma renal com Rapa transformou o fenótipo celular invasivo em não invasivo e acarretou aumento no nível e na expressão da E-caderina, molécula que aumenta a adesão intercelular.

E, finalmente, não observamos, em nosso estudo, sinergismo no efeito antineoplásico na associação da Rapa com o MMF.

Os resultados deste estudo são importantes, pois nos mostram uma opção terapêutica valiosa em determinadas situações. A Rapa é uma droga que ainda não tem ampla aceitação nos centros de transplantes, principalmente pelos seus efeitos colaterais relacionados ao metabolismo dos

lipídeos e à ausência de estudos a longo-prazo na sobrevida dos enxertos. Entretanto, a sua ação antineoplásica pode ampliar a sua indicação terapêutica. Duas situações podem ser de particular interesse para a indicação da Rapa como droga de escolha no esquema da imunossupressão. Na primeira, o paciente apresenta neoplasia e necessita de um enxerto, porque seu órgão terminal não pode ser substituído por outra modalidade terapêutica ou porque, no caso do rim, o paciente não dispõe de acesso para manter o tratamento dialítico. Na segunda possibilidade, o paciente é transplantado e desenvolveu neoplasia.

Um dos primeiros princípios no tratamento das neoplasias pós-transplantes é a redução ou interrupção das drogas imunossupressoras, visando restaurar a resposta imune dirigida contra as células tumorais. Infelizmente esta estratégia pode trazer como consequência a perda do órgão transplantado e, nos casos em que o órgão não pode ser substituído por outra modalidade terapêutica, como por exemplo nos transplantes de coração e fígado, a manutenção da imunossupressão torna-se indispensável. Neste caso, a utilização da Rapa pode ser uma alternativa, embora devamos ter em mente que, como mostrado em nosso estudo experimental, a resposta antiproliferativa pode não ocorrer quando o tumor já se encontra em fase de crescimento. A melhor opção para o esquema imunossupressor a ser utilizado deve ter em conta o tipo de neoplasia e o órgão transplantado, devendo ser lembrado, como sugerem os nossos resultados, que não há evidências de efeito antineoplásico aditivo na associação da Rapa com o MMF.

# CONCLUSÕES

O estudo experimental desenvolvido com a inoculação de carcinossarcoma 256 de Walker em ratos Wistar, com o intuito de avaliar o efeito de drogas imunossupressoras, isoladas ou em associação, sobre o crescimento ou a regressão tumoral nos permitiu concluir:

1. A Rapamicina, utilizada isoladamente ou em associação com a ciclosporina, apresentou efeito antiproliferativo somente quando introduzida antes do implante tumoral;
2. O Micofenolato Mofetil apresentou efeito antiproliferativo somente quando introduzido antes do implante tumoral. A associação de Micofenolato Mofetil com Ciclosporina aboliu o efeito antitumoral do Micofenolato;
3. A Ciclosporina A não induziu crescimento tumoral significativo do Carcinossarcoma 256 de Walker;
4. Não foi verificado sinergismo da associação Rapamicina + Micofenolato Mofetil na inibição do crescimento tumoral;
5. O isolamento das células do carcinossarcoma de Walker utilizando o gradiente de Ficoll-Hypaque é uma metodologia eficaz que permite a obtenção de uma suspensão tumoral menos contaminada com outros tipos celulares. Entretanto, o crescimento tumoral é comparável ao observado em animais inoculados com a suspensão obtida pela técnica padrão.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, A. K.; LICHMAN, A. H.; POBER, J. S. Complexo de histocompatibilidade principal. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002a. cap. 4, p. 63-78.

\_\_\_\_\_. Ativação de linfócitos. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002b. cap. 8, p. 161-181.

\_\_\_\_\_. Citocinas. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002c. cap. 11, p. 235-269.

\_\_\_\_\_. Imunologia dos transplantes. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002d. cap. 16, p. 363-383.

ADAMS, A. Mechanisms of liver allograft rejection in man. **Clin. Sci.**, v. 78, p. 343-350, 1990.

ADU, D.; MICHAEL, J.; TURNEY, J.; MCMASTER, P. Hyperkalemia in cyclosporine-treated renal allograft recipients. **Lancet**, v. 2, p. 370-372, 1983.

AHERN, A. T.; ARTRUC, S. B.; DELLA PELLE, P.; COSIMI, A. B.; RUSSELL, P. S.; COLVIN, R. B.; FULLER, T. C. Hyperacute rejection associated of HLA-A, B-identical renal allografts associated with B lymphocyte and endothelial reactive antibodies. **Transplantation**, v. 33, n. 1, p. 103-106, 1982.

ALBELDA, S. M.; BUCK, C. A. Integrins and other cell adhesion molecules. **FASEB J.**, v. 4, p. 2868-2880, 1990.

ALEXANDER, J. R. E.; ARMAND, J. P. La rapamycine et le CCI-779. **Bull. Cancer**, v. 86, n. 10, p. 806-811, 1999.

ALLISON, A. C. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance foward. **Immunopharmacology.**, v. 47, p. 63-83, 2000.

ALLISON, A. C.; EUGUI, E. M. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. **Immunopharmacology**, v. 47, p. 85-118, 2000.

ALLISON, A. C.; KOWALSKI, W. J.; MULLER, C. J.; WATERS, R. V.; EUGUI, E. M. Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. **Transplant. Proc.**, v. 25, n. 3, suppl. 2, p. 67-70, 1993.

ARMSTRONG, M. Y. K.; SCHWARTZ, R. S.; BELDOTTI, L. Neoplastic sequelae of allogenic disease. III Histological events following transplantation of alogenic spleen cells. **Transplantation**, v. 5, p. 1380, 1962.

ATKINSON, K.; BOLAND, J.; BRITTON, K.; BIGGS, J. Blood and tissue distribution of cyclosporine in humans and mice. **Transplant. Proc.**, v. 15: p. 2430-2433, 1983a.

ATKINSON, K.; BIGGS, J. C.; HAYES, J.; RALSTON, M.; DODDS, A. J.; CONCANNON, A. J.; NAIDOO, D. Cyclosporin A associated nephrotoxicity in the first 100 days after allogenic bone marrow transplantation: three distinct syndromes. **Br. J. Haematol.**, v. 54, n. 1, p. 59-67, 1983b.

ATKINSON, K.; BIGGS, J.; DARVENIZA, P.; BOLAND, J.; CONCANNON A.; DODDS, A. Cyclosporine-associated central nervous system toxicity after allogenic bone marrow transplantation. **Transplantation**, v. 38, n. 1, p. 34-37, 1984.

BARR, B. B.; BENTON E. C.; MCLAREN, K.; BUNNEY, M. H.; SMITH I. W.; BLESSING, K.; HUNTER J. A. Human papillomavirus infection and skin cancer in renal allograft recipients. **Lancet**, v. 1, n. 8630, p 124-129, 1989.

BASADONNA, G. P.; MATAS, A. J.; GILLIGHAM, K. J.; PAYNE, W. D.; DUNN, D. L.; SUTHERLAND, D. E.; GORES, P. F.; GRUESSNER, R. W.; ARRAZOLA, L.; NAJARIAN, J. Relationship between early vs late acute rejection and onset of chronic in kidney transplantation. **Transplant. Proc.**, v. 25, p. 910-911, 1993.

BAUMANN, G.; BOREL, J. F. Mécanismes moléculaires de l'action des agents immunosuppresseurs. **Médecine/Sciences**, v. 8, n. 4, p. 366-371, 1992.

BERG, K. J.; FORRE, O.; BJERKHOEL, F.; AMUNDSEN, E.; DJOSELAND, O.; RUGSTAD, H. E.; WESTRE, B. Side effects of cyclosporin A treatment in patients with rheumatoid arthritis. **Kidney Int.**, v. 29, p. 1180-1187, 1986.

BEVERIDGE, T. Cyclosporin A: an evaluation of clinical results. **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 433-437, 1983.

BEVERIDGE, T.; KRUPP, P.; MCKIBBIN, C. Lymphomas and lymphoproliferative lesions under cyclosporin therapy. [Letter] **Lancet**, v. 1, p. 788, 1984.

BIKERLAND, S. A. Malignant tumours in renal transplant patients. **Cancer**, v. 51, p. 1571-1575, 1983.

BISHOP, G. A.; HALL, B. M.; SURANYI, M. G.; TILLER, D. J.; HOERVATH, J. S.; DUGGING, D. J. Expression of HLA antigens on renal tubular cells in culture. I. Evidence that mixed lymphocyte culture supernatants and gamma interferon increase both class I and class II HLA antigens. **Transplantation**, v. 42, p. 671-679, 1986.

BLOHMÉ, I.; LARKÖ, O. Premalignant and malignant skin lesions in renal transplant patients. **Transplantation**, v. 37, n. 2, 165-167, 1984.

BLUME-JENSEN, P.; HUNTER, T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 355-365, 2001.

BONAVIDES DE CASTRO CAMPOS, P. Avaliação da interferência de imunossupressores no desenvolvimento de metástases em ratos inoculados com um fibro-histiocitoma maligno de baixo índice metastático. Fortaleza, 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina.

BOREL, J. F. Comparative study of *in vitro* and *in vivo* drug effects on cell-mediated cytotoxicity. **Immunology**, v. 31, n. 4, p. 631-641, 1976a.

BOREL, J. F.; FEURER C.; GUBLER, H. U.; STAHELIN H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocyte agent. **Agents Actions**, v. 6, p. 468-475, 1976b.

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

BOREL, J. F. Cyclosporin A- present experimental status. **Transplant. Proc.**, v. 13, p. 344-348, 1981.

\_\_\_\_\_. Cyclosporin. In: DALE M. M.; FOREMAN J. C.; FAN, T. P. D. **Textbook of Immunopharmacology**. 3<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1994. chapt. 29, p. 320-329.

BOWER, H. G. A.; HINRICHS, D. J. Cyclosporine effects on mitogen-induced T and B cell proliferation. **Transplant. Proc.**, v. 15, n. 4, suppl. 1, p. 2306-2310, 1983.

BOUWES BAVINCK, J. N.; VERMEER, B. J.; VAN DER WOUDE, F. J.; VANDENBROUCKE, J. P.; SCHREUDER, G. M.; THOROGOOD, J.; PERSIJN, G. G.; CLAAS, F. H. Relation between skin cancer and HLA antigens in renal-transplant recipients. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 843-848, 1991.

BOUWES BAVINCK, J. N.; FELTKARMP, M.; STRUIJK, L.; TER SCHEGGET, J. Human papillomavirus infection and skin cancer risk in organ transplant recipients. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, v. 6, n. 3, p. 207-211, 2001.

BRUNNER, F. P.; LANDAIS, P.; SELWOOD, N. H. Malignancies after renal transplantation: the EDTA-ERA registry experience. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 10 suppl. 1, p. 74-80, 1995.

BULLINGHAM, R. E. S.; NICHOLLS, A.; HALE, M. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil (RS61443): a short review. **Transplant. Proc.**, v. 28, p. 925-929, 1996.

BURCKHARDT, J. J.; GUGGENHEIM, B. Cyclosporine A: in vivo and in vitro suppression of rat T-lymphocyte function. **Immunology**, v. 36, n. 4, p. 753-757, 1979.

BURDICK, J. F. Chronic rejection. **Clin. Transplant.**, v. 5, p. 489-492, 1991.

BURNET, F. M. Immunological aspects of malignant disease. **Lancet**, v. 1, p. 1171, 1967.

BUSCH, G. J.; REYNOLDS, E. S.; GAVALNEK, E. G.; BRAUN, W. E.; DAMMIN, G. J. Human renal allografts. The role of vascular injury in early graft failure. **Medicine**, v. 50, p. 29-83, 1971.

CAILLARD, S.; LACHAT, V.; MOULIN, B. Posttransplant lymphoproliferative disorders in renal allograft recipients: report of 53 cases of a French multicenter study. **Transpl. Int.**, v. 13 suppl. 1, p. S388-S393, 2000.

CALDAROLA, L.; DEI POLI, M.; BIGLIANI, S. Sullo sviluppo del tumore di Walker nella cute e nel tessuto sottocutaneo del ratto-nota. **I. Minerva Chir.**, v. 23, p. 51-55, 1968.

CALNE, R. Y.; WHITE, D. J.; THIRU, S.; DUNN, D. C.; CRADDOCK, G. N.; PENTLOW, B. D.; ROLLES, K. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. **Lancet**, v. 2, n. 81045, p. 1323-1327, 1978.

CAO, W.; MOHACSI, P.; SHORTHOUSE, R.; PRATT, R.; MORRIS, R. E. Effect of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. **Transplantation**, v. 59, p. 390-395, 1995.

CARTER, S. B.; FRANKLIN, T. J.; JONES, D. F.; LEONARD, B. J.; MILLIS, S. D.; TURNER, R. W.; TURNER, W. B. Mycophenolic acid: an anti-cancer compound with unusual properties. **Nature**, v. 223, p. 848-850, 1969.

CELLCEPT (Micofenolato Mofetil). Monografia clínica. Rio de Janeiro: Roche, [199?]. 54p.

CHADBURN, A.; CESARMAN, E.; KNOLES, D. Molecular pathology of post-transplantation lymphoproliferative disorders. **Sem. Diagn. Pathol.**, v. 14, p. 15-26, 1997.

CHOU, M. M.; BLENIS, J. The 70 kDa S6 kinase: regulation of a kinase with multiple roles in mitogenic signalling. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 7, p. 806-814, 1995.

CIANCIO, G.; BURKE, G. W.; ROTH, D.; ZUCKER, K.; ESQUENAZI, V.; ROSE, A.; MILLER, J. Tacrolimus and mycophenolate mofetil as primary immunosuppression for renal allograft recipients. In: RACUSE, L. C.; SOLEZ, K.; BURDICK, J. F. **Kidney transplant rejection. Diagnosis and treatment.** New York: Marcel Dekker, 1998. chapt. 17, p. 519-562.

COHEN, D. J.; LOERTSCHER, R.; RUBIN, M. F.; TILNEY, N. L.; CARPENTER, Ch. B.; STROM, T. B. Cyclosporine: a new immunosuppressive agent for organ transplantation. **Ann. Intern. Med.**, v. 101, p. 667-682, 1984.

COHN, R. G.; MIRKOVICH A.; DUNLAP, B.; BURTON, P.; CHIU, S-H.; EUGUI, E.; CAULFIELD, J. P. Mycophenolic acid, increases apoptosis, lysosomes, and lipid droplets in human lymphoid and monocytic cell lines. **Transplantation**, v. 68, n. 3, p. 411-418, 1999.

COLLIER, D. St. J.; CALNE, R. Y.; POLLARD, S. G.; FRIEND, P. J.; THIRU, S. Rapamycin in experimental renal allografts in primates. **Transplant. Proc.**, v. 23, p. 2246-2247, 1991.

CORY, J. G. Metabolismo de nucleotídeos de purina e pirimidina. In: DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1997. cap. 12, p. 408-436.

COTRAN, S. R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Neoplasias. In:\_\_\_\_\_. **Robbins- Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 8, p. 233-295.

DANTAL, J.; HOURMANT, M.; CANTAROVITCH, D.; GIRAL, M.; BLANCHO, G.; DRENO, B. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomized comparison of two cyclosporin. **Lancet**, v. 351, p. 623-628, 1998.

DEMETRIS, A.; ZERBE, T.; BANNER, B. Morphology of solid organ allograft arteriopathy: identification of proliferating intimal cell populations. **Transplant. Proc.**, v. 21, p. 3665-3666, 1989.

DEMIRHAN, B.; KARAKAYALI, H.; TURAN, M.; GÜNGEN, Y.; BILGIN, N. Hyperacute allograft rejection mediated by IgM antibodies and a negative lymphocyte crossmatch: report two cases. **Transplant. Proc.**, v. 30, p. 732-733, 1998.

DELFINO, V. D. A.; SILVA, S. L.; SOARES, A. E.; MATNI, A. M.; GORDAN, P. A.; MOCELIN, A. J. Neoplasias em transplantados renais. **J. Bras. Nefrol.**, v. XVI, n. 2, p. S212, suppl 1, 1994.

DEVINENI, R.; MCKENZIE, N.; DUPLAN, J.; KEOWN, P.; STILLER, C.; WALLACE, A. C. Renal effects of cyclosporine: clinical and experimental observations. **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 2695-2698, 1983.

DILLING, M. B.; DIAS, P.; SHAPIRO, D. N.; GERMAIN, G. S.; JOHSON, R. K.; HOUGHTON, P. J. Rapamycin selectively inhibits the growth of childhood rhabdomyosarcoma cells through inhibition of signaling via the insulin-like growth factor receptor. **Cancer Res.**, v. 54, p. 903-908, 1994.

DILLING, M. B.; GERMAIN, G. S.; HOUGHTON, P. J. Acquired resistance to rapamycin is mediated by altered of the 4E-BP1/eIF4E pathway. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 41, p. 5110, 2000.

DOUROS, J.; SUFFNESS, W. New antitumor substances of natural origin. **Cancer Treat. Rev.**, v. 8, p. 63-87, 1981.

DUCLOUX, D.; FOURNIER, V.; BRESSON-VAUTRIN, C.; REBIBOU, J-M.; BILLEREY, C.; SAINT-HILLIER, Y.; CHALOPIN, J-M. Mycophenolate mofetil in renal transplant recipients with cyclosporine-associated nephrotoxicity. **Transplantation**, n. 65, n. 11, p. 1504-1506, 1998.

DUDKIN, L.; DILLING, M. B.; CHESHIRE, P. J.; HARWOOD, F. C.; HOLLINGSHEAD, M.; ARBUCK, S. G.; TRAVIS, R.; SAUSVILLE, E. A.; HOUGHTON, P. J. Biochemical correlates of mTOR inhibition by the rapamycin ester CCI-779 and tumor growth inhibition. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p.1758-1764, 2001.

DUMONT, F. J.; ALTMAYER, A.; KASTNER, C.; FISCHER, P. A.; LEMON, K. P.; CHUNG, J.; BLENIS, L.; STARUCH, M. J. Relationship between multiple biological effects of rapamycin and the inhibition of p70 S6 protein kinase activity. Analysis in mutant clones of a T cell lymphoma . **J. Immunol.**, v. 152, p. 992-1003, 1994.

EARLE, W. R. A study of the Walker rat mamary carcinoma 256, in vivo and in vitro. **Am. J. Cancer**, v. 24, p. 566-612, 1935.

ECCLES, S. A.; HECKFORD, S. E.; ALEXANDER, P. Effect of cyclosporine A on the growth and spontaneous metastasis of syngeneic animal tumours. **Br. J. Cancer**, v. 42, p. 252-259, 1980.

EGEL, J.; GREENBERG, A.; THOMPSON, M. E.; HARDESTY, R. L.; GRIFFITH, B. P.; BAHSON, H. F.; BERNSTEIN, R. L.; PUSCHETT, J. B. Renal failure in heart transplant patients receiving cyclosporine. **Transplant. Proc.**, v. 15, n. 4, suppl. 1, p. 2706-2707, 1983.

ENG, C. P.; SEHGAL, S. N.; VÉZINA, C. Activity of Rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. **J. Antibiotics**, v. 37, n. 10, p. 1231-1237, 1984.

EUGUI, E. M.; ALMQUIST, S. J.; MULLER, C. D.; ALLISON, A. C. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. **Scand. J. Immunol.**, v. 33, n. 2, p. 161-173, 1991.

EUROPEAN MULTICENTRE TRIAL GROUP. Cyclosporine in cadaveric renal transplantation: one-year follow-up of a multicenter trial. **Lancet**, v. 2, p. 986-989, 1983.

FISHER, E. R.; FISHER, B. Electron microscopic, histologic and histochemical features of the Walker carcinoma. **Cancer Res.**, v. 21, p. 527-531, 1961.

FONTELES, M. C.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MORAES FILHO, M. O.; MEDEIROS, M. T. G. Avaliação da atividade antitumoral de óleos essenciais do nordeste brasileiro. **Ciênc. Cult.**, v. 30, n. 7, p. 456, 1978.

FONTELES, M. C.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A. Avaliação da atividade anti-tumoral de plumeria bractata A. Dc. **Pesq. Med.**, v. 4/5, n. 1, p. 14-21, 1966.

FERRARI, S.; THOMAS, G. S6 phosphorylation and the p70<sup>s6k</sup>/p85<sup>s6k</sup>. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 29, n. 6, p. 385-413, 1994.

FIRST, M. R.; PEDDI, V. R. Malignant complicating organ transplantation. **Transplant. Proc.**, v. 30, p. 2768-2770, 1998.

FLECHNER, S. M.; VAN BUREN, C.; KERMAN, R. H.; KAHAN, B. D. The nephrotoxicity of cyclosporine in renal transplant recipients. **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 2689-2694, 1983.

FOLEY, R. J.; VAN BUREN, C. T.; HAMNER, R.; WEINMAN, E. J. Cyclosporine-associated hyperkalemia. **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 2726-2729, 1983.

FORBES, R.; GUTTMANN, R. Mechanisms of humoral-mediated cardiac allograft rejection in vivo controlled comparative morphologic studies utilizing inbred rat models. **Heart Transplant.**, v. 1, p. 196-202, 1982.

FREI, U.; TAESCH, S.; NIESE, D. Use of Sandimmun Neoral in transplant patients. **Transplant. Proc.**, v. 26, n. 5, p. 2928-2931, 1994.

FRYER, J. P.; BENEDETTI, E.; PERRY, E. H.; MATAS, A. J. Antibody-mediated rejection of an HLA-identical, ABO-incompatible kidney transplant after two failed cadaver transplants. **Transplantation**, v. 58, n. 6, p.723-755, 1994.

GARBER, K. Rapamycin's resurrection: a new way to target the cancer cell cycle. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 93, n. 20, p. 1517-1519, 2001.

GEOERGER, B.; KERR, K.; TANG, C. B.; FUNG, K. M.; POWELL, B.; SUTTON, L. N.; PHILLIPS, P. C.; JANSS, A. J. Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. **Cancer Res.**, v. 61, p. 1527-1532, 2001.

GIBBS, P.; BERKLEY, L. M.; BOLTON, E. M.; BRIGGS, J. D.; BRADLEY, J. Á. Adhesion molecule expression (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM) in human kidney allografts. **Transplant. Immunol.**, v. 1, p. 109-113, 1993.

GILKS, W. R.; GORE, S. M.; BRADLEY, B. A. Renal transplant rejection. **Transplantation**, v. 50, n. 1, p. 141-146, 1990.

GIRAL, M.; DANTAL, J.; SOULILLOU, J. P. Traitement immunosuppresseur: surveillance, toxicité, perspectives. **Rev. Prat. (Paris)**, v. 44, n. 4, p. 442-448, 1994.

GJERSVIK, P.; HANSEN, S.; MOLLER, B.; LEIVESTAD, T.; GEIRAN, O.; SIMONSEN, S.; PFEFFER, P.; FAUCHALD, P. Are heart transplant recipients more likely to develop skin cancer than kidney transplant recipients? **Transplant. Int.**, v. 13, suppl. 1, p. S380-S381, 2000.

GORAL, S.; FELGAR, R.; SHAPELL, S. Posttransplant lymphoproliferative disorder in a renal allograft recipient. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 30, n. 2, p. 301-307, 1997.

GORDON, M. Y.; SINGER, J. W. Selective effects of cyclosporin A on colony-forming lymphoid and myeloid cells in man. **Nature**, v. 279, p. 433-434, 1979.

GOULDESBROUGH, D. R.; AXELSEN, R. A. Arterial endothelialitis in chronic renal allograft rejection: A histopathological and immunocytochemical study. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 9, p. 35-40, 1994.

GRIDELLI, B.; SPADA, M.; RIVA, M.; COLLEDAN, M.; SEGALIN, A.; LUCIANETTI, A.; SONZOGNI, A.; FURIONE, M.; BALDANTI, F.; TORRE, G. Circulating Epstein-Barr virus DNA to monitor lymphoproliferative disease following pediatric liver transplantation. **Transplant. Int.**, v. 13 suppl. 1, p. S399-S401, 2000.

GROTH, C. G.; BACKMAN, L.; MORALES, J. M.; CALNE, R.; KREIS, H.; LANG, P.; TOURAINE, J. L.; CLAESSEON, K.; CAMPISTOL, J. M.; DURAND, D.; WRAMENER, L.; BRATTSTROM, C.; CHARPENTIER, B., for the Sirolimus European Renal Transplant Study Group. Sirolimus (Rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar and different toxicity compared with Cyclosporine. **Transplantation**, v. 67, n. 7, p. 1036-1042, 1999.

GRUBER, A. S.; GILLINGHAM, K.; SOTHERN, R. B.; STEPHANIAN, E.; CHAVERS, B.; MATAS, A. J.; DUNN, D. L. Cancer development in pediatric primary renal allograft recipients. **Transplant.. Proc.**, v. 26, n. 1, p. 3-4, 1994.

GUBA, M.; VON BREITENBUCH, P.; STEINBAUER, M.; KOEHL, G.; FLEGEL, S.; HORNUNG, M.; BRUNS, C. J.; ZUELKE, C.; FARKAS, S.; ANTHURBER, M.; JAUCH, K. W.; GEISSLER, E. K. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. **Nat. Med.**, v. 8, n. 2, p. 128-135, 2002.

GULANIKAR, A. C.; DAILY, P. P.; KILAMBI, N. K.; HAMRICK-TURNER, J. E.; BUTKUS, D. E. Prospective pretransplant ultrasound screening in 206 patients for acquired renal cysts and renal cell carcinoma. **Transplantation**, v. 66, p. 1669-1672, 1998.

GUTTMANN, R. D.; MEAKINS, J. L. Associations of anergy and the development of cancer in immunosuppressed renal allograft recipients. **Transplant. Proc.**, v. 16, n. 2, p. 495-498, 1984.

HALL, B. M. Cells mediating allograft rejection. **Transplantation**, v. 51, n. 6, p. 1141-1151, 1991.

HALLORAN, P.; SCHLAUT, J.; SOLEZ, K.; SRINVASA, N. The significance of the anti-classe I response: II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. **Transplantation**, v. 53, p. 550, 1992.

HALLORAN, P. F. Sirolimus and ciclosporin for renal transplantation. **Lancet**, v. 356, p. 179, 2000.

HALPERT, R.; BUTT, K. M. H.; SEDLIS, A.; FRUCHTER, R. G.; HONG, J. H.; BRANDON, P.; HANSON, P.; EMMETT, L.; SILLMAN, F. Human papillomavirus infection and lower genital neoplasia in female allograft recipients. **Transplant. Proc.**, v. 17, n. 1, p. 93-95, 1985.

HAMBURGER, J.; VAYSSE, J.; CROSNIER, J.; TUBIANA, M.; LALANNE, C. M.; ANTOINE, B.; AUVERT, J.; SOULIER, J. P.; DORMONT, J.; SALMON, C. H.; MAISONNET, M.; AMIEL, J. L. Transplantation d'un rein entre jumeaux non homozygotes après irradiation du receveur. Bon fonctionnement au quatrième mois. **Presse Méd.**, v. 67, p. 1771, 1959.

HAMBURGER, J.; CROSNIER, J.; DORMONT, J. Á. Observations in patients with a well tolerated homotransplanted. kidney. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 120, p. 558 -577, 1964.

HAMILTON, D. Kidney transplantation: a history. In: MORRIS, J. P. **Kidney transplantation: principles and practice.** 3<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1988. chapt.1, p. 1-14.

HANCOCK, W. H.; WHITLEY, W. D.; TULLIUS, S. G.; HEEMAN, U. W.; WASOWSKA, B.; BALDWIN, W. M. III; TILNEY, N. L. Cytokines, adhesion molecules, and pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. **Transplantation**, v. 56, p. 643-650, 1993.

HARDESTY, R. L.; GRIFFITH, B. P.; DEBSKI, R. F.; BAHNSON, H. T. Experience with cyclosporine in cardiac transplantation. **Transplant.. Proc.**, v. 15, p. 2553-2558, 1983.

HARRIS, N. L.; FERRY, J. A.; SWEDLOW, S. H. Posttransplant lymphoproliferative disorders: summary of Society for Hematopathology Worksshop. **Semin. Diagn. Pathol.**, v. 14, p. 8-14, 1997.

HIDALGO, M.; ROWINSKY, E. K. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. **Oncogene**, v. 19, p. 6680-6686, 2000.

HESS, A. D.; DONNENBERG, A. D.; TUTSCHKA, P.; SANTOS, G. W. Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. V. Analysis of responding T lymphocyte subpopulations in primary MLR with monoclonal antibodies. **J. Immunol.**, v. 130, n. 2, p. 717-721, 1983.

HIESSE, C.; RIEU, P.; LARUE, J. R.; GOUPY, C.; NEYRAT, N.; CHARPENTIER, B. Malignancy after renal transplantation: analysis of incidence and risk factors in 1700 patients followed during a 25-year period. **Transplant. Proc.**, v. 29, p. 831-833, 1997.

HILL, P.; MAIN, I. W.; ATKINS, R. C. ICAM-1 and VCAM-1 in human renal allograft rejection. **Kidney Int.**, v. 47, p. 1383-1391, 1995.

HO, M. Risk factors and pathogenesis of posttransplant lymphoproliferative disorders. **Transplant. Proc.**, v. 27 suppl 1, p. 38-40, 1995.

HOLT, D. W.; MUELLER, E. A.; KOVARIK, J. M.; VAN BREE, J. B.; KUTZ, K. The pharmacokinetics of Sandimmun Neoral: a new formulation of cyclosporine. **Transplant. Proc.**, v. 26, n. 5, p. 2935-2939, 1994.

HORS, J.; ANDRIEU, J. M.; GONY, J. HLA and cancer. **Transplant. Proc.**, v. 16, n. 2, p. 455-457, 1984.

HOSOI, H.; DILLING, M. B.; LIU, L. N.; DANKS, M. K.; SHIKATA, T.; SEKULIC, A.; ABRAHAM, R. T.; LAWRENCE, J. C. JR.; HOUGHTON, P. J. Studies on the mechanisms of resistance of rapamycin in human cancer cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 54, p. 815-824, 1998.

HOSTETTER, T. H. Chronic transplant rejection. **Kidney Int.**, v. 46, p. 266-279, 1994.

HOWARD, R. J.; PATTON, P. R.; REED, A. I.; HEMMING A. W.; VAN DER WERF, W. J.; PFAFF, W. W.; SRINIVAS, T. R.; SCORNIK, J. C. The changing causes of graft loss and death after kidney transplantation. **Transplantation**, v. 73 n. 12, p. 1923-1928, 2002.

HOWS, J. M.; SMITH, J. M.; BAUGHAN, A.; GORDON-SMITH, E. C. Nephrotoxicity in marrow graft recipients treated with cyclosporine. **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 2708-2711, 1983.

HUANG, S.; LIU, L. N.; HOSOI, H.; DILLING, M. B.; SHIKATA, T.; HOUGHTON, P. J. P53/p21<sup>CIP1</sup> cooperate in enforcing rapamycin-induced G1 arrest and determine the cellular response to rapamycin. **Cancer Res.**, v. 61, p. 3373-3381, 2001.

HUME, D. M.; MERRIL, J. P.; MILLER, B. F.; THORN, G. W. Experiences with renal homotransplantations in the human: report of nine cases. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p. 327-328, 1955.

HUNT, S. A. Complications of heart transplantation. **Heart Transplant..**, v. 3, p. 70-74, 1983.

IMBODEN, J. B. Linfócitos T e Células Natural Killer. In: Stites D. P.; Terr, A. I.; Parslow, T. G. **Imunologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 9, p. 101-112.

IWAMA DE MATTOS, M. C. F., MONTENEGRO, M. R., SILVA, C. R. V. Walker 256 carcinossarcoma: pathologic microscopic and ultrastructural features of the tumoral circulating cells. **Ciência e Cultura**, v. 32, n. 7, p. 849-857, 1980.

JACKSON, R. C.; WEBER, G. IMP dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy. **Nature (Lond)**, v. 256, p. 331-333, 1975.

JANEWAY Jr., C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. Manipulação da resposta imune. In: JANEWAY Jr., C. A.; TRAVERS, P. **Imunobiologia**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2002. cap. 14, p. 579-622.

JENSEN, M. K. Chromosome studies in patients treated with azathioprine and amethopterin. **Acta Med. Scand.**, v. 182, p. 445, 1967.

JORDAN, S. C.; YAP, H. K.; SAKAI, R. S.; ALFONSO, P.; FITCHMAN, M. Hyperacute allograft rejection mediated by anti-vascular endothelial cell antibodies with a negative monocyte crossmatch. **Transplantation**, v. 46, n. 4, p. 585-587, 1988.

KAHAN, B. D.; REID, M.; NEWBURGER, J. Pharmacokinetics of cyclosporine in human renal transplantation. **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 446-453, 1983.

KAHAN, B. D.; VAN BUREN, C. T.; LIN, S. N.; ONO, Y.; AGOSTINO, G.; LEGRUE, S. J.; BOILEAU, M.; PAYNE, W. D.; KERMAN, R. H. Immunopharmacological monitoring of cyclosporin A-treated recipients of cadaveric kidney allografts. **Transplantation**, v. 34, n.1, p. 36-45, 1982.

KAHAN, B. D. Cyclosporine pharmacology. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cyclosporine. **Transplant. Proc.**, v. 21, n. 3 suppl. 1, p. 9-15, 1989.

\_\_\_\_\_. Optimization of cyclosporine therapy. **Transplant. Proc.**, v. 25, n. 4 suppl. 3, p. 5-9, 1993.

\_\_\_\_\_. Rapamycin: personal algorithms for use based on 250 treated renal allograft recipients. **Transplant. Proc.**, v. 30, p. 2185-2188, 1998.

\_\_\_\_\_. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomized multicentre study. The Rapamune U. S. Study Group. **Lancet**, v. 356, p. 194-202, 2000.

KAHAN, B. D.; PODBIELSKI, J.; NAPOLI, K. L.; KATZ, S. M.; MEIER-KRIESCHE, H-U.; VAN BUREN, C. T. Immunosuppressive effects and safety of a sirolimus/cyclosporine combination regimen for renal transplantation. **Transplantation**, v. 66, n. 8, p. 1040-1046, 1998.

KAHAN, B. D.; CAMARDO, J. S. Rapamycin: clinical results and future opportunities. **Transplantation**, v. 72, n. 7, p. 1181-1193, 2001.

KALMAN, V. K.; KLIMPEL, G. R. Cyclosporin A inhibits the production of gamma interferon (INF gamma), but does not inhibit production of virus-induced IFN alpha/beta. **Cell. Immunol.**, v. 78, n. 1, p. 122-129, 1983.

KAUFFMAN, H. M.; MCBRIDE, M. A.; CHERIKH, W. S.; SPAIN, P. C.; MARKS, W. H.; ROZA, A. M. Transplant tumor registry: donor related malignancies. **Transplantation**, v. 74, n. 3, p. 358-362, 2002.

KATONA, E. The influence of age on organ size changes due to tumor growth in rats. **Growth**, v. 36, p. 35-43, 1972.

KEAST, D. Immunosurveillance and cancer. **Lancet**, v. 2, p. 710, 1970.

KELLY, G. E.; SHEIL, A. G. R.; MURPHY, A. TAYLER, R. Viral infections in kidney transplant recipients: lack of correlation with skin cancer. **Transplant. Proc.**, v. 17, n. 2, p.1689-1691, 1985.

KELLY, P. A.; GRUBER, S. A.; BEHBOG, F.; KAHAN, B. D. Sirolimus, a new, potent immunosuppressive agent. **Pharmacotherapy**, v. 17, p. 1148-1156, 1997.

KEOWN, P. A.; STILLER, C. R.; ULAN, R. A.; SINCLAIR, N. R.; WALL, W. J.; CARRUTHERS, G.; HOWSON, W. Immunological and pharmacological monitoring in the clinical use cyclosporin A. **Lancet**, v. 1, n. 8222, p. 686-689, 1981.

KEOWN, P. A.; STILLER, C. R.; LAUPACIS, A. L.; HOWSON, W.; COLES, R.; STAWECKI, M.; KOEGLER, J.; CARRUTHERS, G.; McKENZIE, N.; SINCLAIR, N. R. The effects and side effects of cyclosporine relationship to drug pharmacokinetics. **Transplant. Proc.**, v. 14, p. 659-661, 1982.

KINLEN, L.; DOLL, R.; PETO, J. The incidence of tumors in human transplant recipients. **Transplant. Proc.**, v. 15, p.1039, 1983.

KLINTMALM, G. B.; IWATSUKI, S.; STARLZ, T. E. Nephrotoxicity of cyclosporin A in liver and kidney transplant patients. **Lancet**, v. 1, p. 470-471, 1981.

KORANDA, F. C.; LOEFFER, R. T.; KORANDA, D. M.; PENN, I. Accelerated induction of skin cancers by ultraviolet radiation in hairless mice treated with immuno-suppressive agents. **Surg. Forum**, v. 26, p. 154, 1975.

KRIKORIAN, J. G.; ANDERSON, J. L.; BIEBER, C. P.; PENN, I.; STINSON, E. B. Malignant neoplasms following cardiac transplantation. **JAMA**, v. 240, n. 7, p. 639-643, 1978.

KYLLÖNEN, L.; PUKKALA, E.; EKLUND, B. Cancer incidence in a kidney-transplanted population. **Transplant. Int.**, v. 7 suppl. 1, p. S350-S352, 1994.

KYLLÖNEN, L.; SALMELA, K.; PUKKALA, E. Cancer incidence in a kidney-transplanted population. **Transplant. Int.**, v. 13 suppl. 1, p. S394-S398, 2000.

LA TOUR DU PIN, F. Interactions de la ciclosporine avec la thérapie anti-infectieuse. **La Lettre de L'Infectiologue**, v. 4, n. 8, p. 318-322, 1989.

LAMPEN, A.; ZHANG, Y.; HACKBARTH, I.; BENET, L. Z.; SEWING, K. F.; CHRISTIANS, U. Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 285, p. 1104-1112, 1998.

LAND, W.; SCHNEEBERGER, H.; SCHLEIBNER, S.; ILLNER, W. D.; ABENDROTH, D.; HILLEBRAND, G.; GOKEL, J. M.; ALBERT, E. Long-term results in cadaveric renal transplantation under cyclosporine therapy. **Transplant. Proc.**, v. 23, p. 345-352, 1991.

LANG, P.; BARON, C.; CHERQUI, P. Cancer après greffe. **Rev. Prat.**, v. 44, n. 4, p. 463-469, 1994.

LARSSON, E. L. Cyclosporin A and dexamethasone suppress T cell responses by electively acting at distinct sites in the triggering process. **J. Immunol.**, v. 124, p. 2828-2833, 1980.

LAUPACIS, A., FOR THE CANADIAN TRANSPLANT STUDY GROUP. Complications of cyclosporine therapy- a comparison to azathioprine. **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 2748-2753, 1983.

LEE, D. B. N. Cyclosporine and the renin-angiotensin axis. **Kidney Int.**, v. 52, p. 248-260, 1997.

LEE, H-J.; PAWLAK, K.; NGUYEN, B. T.; ROBINS, R. K.; SADÉE, W. Biochemical differences among four inosinate dehydrogenase inhibitors, mycophenolic acid, ribaravin, tiazofurin, and selenazofurin, studied in mouse lymphoma cell culture. **Cancer Res.**, v. 45, p. 5512-5520, 1985.

LEITHNER, C.; SINZINGER, H.; POHANKA, E.; SCHWARZ, M.; KRETSCHMER, G.; SYRE, G. Occurrence of hemolytic uremic syndrome under cyclosporine treatment: accident or possible side effect mediated by a lack of prostacyclin-stimulating plasma factor? **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 2787-2789, 1983.

LOERTSCHER, R.; THIEL, G.; HARDER, F.; BRUNNER, F. P. Persistent elevation of alkaline phosphatase in cyclosporin A treated renal transplant recipients. **Transplantation**, v. 36, p. 115-116, 1983.

LONDON, J. N.; FARMERY, S. M.; WILL, E. J.; DAVISON, A. M.; LODGE, J. P. A. Risk of neoplasia in renal transplant patients. **Lancet**, v. 346, 403-406, 1995.

LORBER, I. M. I. Cyclosporine: lessons learned – future strategies. **Clin. Transplant.**, v. 5, p. 505-516, 1991.

LOWE, J. K.; BROX, L.; HENDERSON, J. F. Consequences of inhibition of guanine nucleotides synthesis of mycophenolic acid and virazole. **Cancer Res.**, v. 37, p. 736-743, 1977.

LOWRY, R. P.; TAKEUCHI, T.; CREMISI H.; KONIECZNY, B.; SOMEREN, A. Chronic rejection of organ allografts may arise from injuries sustained in recurring foci of acute rejection that resolve spontaneously. **Transplant. Proc.**, v. 25, p. 2103-2105, 1993.

LUAN, F. L.; HOJO, M.; MALUCCIO, M.; YAMAJI, K.; SUTHANTHIRAN, M. Rapamycin blocks tumor progression: unlinking immunosuppression from antitumor efficacy. **Transplantation**, v. 73, n. 10, p. 1565-1572, 2002.

MACDONALD A. S. 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**, v. 71, n. 2, p. 271-280, 2001.

MARX, S.; JAYARAMAN, T.; GO, L.; MARKS, A. R. Rapamycin-FKBP inhibit cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, v. 76, p. 421-417, 1995.

MASSY, Z. A.; GUIJARRO, C.; WIEDERKEHR, M. R.; MA, J. Z.; KASISKE, B. L. Chronic renal allograft rejection: imunologic and nonimunologic risk factors. **Kidney Int.**, v. 49, p. 518-524, 1996.

MATAS, A. J.; HERTEL, B. F.; ROSAI, J.; SIMMONS, R. L.; NAJARIAN, J. S. Post-transplant malignant lymphoma. Distinctive morphologic features related to its pathogenesis. **Am. J. Med.**, v. 61, n. 5, p. 716-720, 1976.

MATHEW, T. H. A blinded, long-term, randomized multicenter study of mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation: results at three years. Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. **Transplantation**, v. 65, n. 11, p. 1450-1454, 1998.

MATSUDA, S.; KOYASU, S. Mechanisms of action of cyclosporine. **Immunopharmacology**, v. 47, n. 2-3, p. 119-125, 2000.

MCNALLY, P. G.; FEEHALLY, J. Pathophysiology of cyclosporin A nephrotoxicity: experimental and clinical observations. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 7, p. 791-804, 1992.

MELE, S. T.; HALLORAN, P. F. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. **Immunopharmacology**, v. 47, p. 215-245, 2000.

METCALFE, S. M.; CANMAN, C. E.; MILNER, J.; MORRIS, R. E.; GOLDMAN, S.; KASTAN, M. B. Rapamycin and p53 act on different pathways to induce G1, arrest in mammalian. **Oncogene**, v. 15, n. 14, p. 1635-1642, 1997.

MIHATSCH, M. J.; RYFFEL, B.; GUDAT, F. The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. **Kidney Int.**, v. 48, suppl. 52, p. S63-S69, 1995.

MOHANAKUMAR, T.; RHODES, C.; MENDEZ-PICON, G.; GOLDMAN, M.; MONCURE, C.; LEE, H. Renal allograft rejection associated with presensibilization to HLA-DR antigens. **Transplantation**, v. 31, n. 1, p. 93-95, 1981.

MOOLENAAR, W.; BRUIJN, J. Á.; SCHRAMA, E.; FERONNE, S.; DAHA, M. R.; ZWINDERMAN, A. H.; HOEDEMAKER, P. J.; VAN ES, L. A.; VAN DER WOUDE, F. J. T-cell receptors and ICAM-1 expression in renal allografts during rejection. **Transplant. Int.**, v. 4, p. 140-145, 1991.

MORAES FILHO, M. O.; FONTELES, M. C.; MATOS, F. J. A.; MORAES M. E. A. ; Atividade antitumoral de plantas do Nordeste Brasileiro. **Ciênc. Cult.**, v. 32, n.7, p. 776-777, 1980.

MORLEY, A. R. Pathology and pathogenesis of rejection. **Transplant. Immunol.**, v. 2, p. 116-143, 1994.

MORRIS, R. Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. **Ther. Drug. Monit.**, v. 17, p. 564-569, 1995.

MUELLER, E. A.; KOVARIK, J. M.; VAN BREE, J. B.; LISON, A. E.; KUTZ, K. Pharmacokinetics and tolerability of a microemulsion formulation of cyclosporine in renal allograft recipients- a concentration controlled comparison with the comercial formulation. **Transplantation**, v. 57, n. 8, p. 1178-1182, 1994.

MUTHUKKUMAR, S.; RAMESH, T. M.; BONDADA, S. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. **Transplantation**, v. 60, n. 3, p. 264-270, 1995.

MYCOPHENOLATE mofetil in renal transplantation: 3-years results from the placebo-controlled trial. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. **Transplantation**, v. 68, n. 3, p. 391-396, 1999.

Mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplant. U. S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 34, n. 2, p. 296-303, 1999.

MYRON, H. M.; MCBRIDE, M. A.; CHERIKH, W. S.; SPAIN, P. C.; MARKS, W. H.; ROZA, A. M. Transplant tumor registry: donor related malignancies. **Transplantation**, v. 74, n. 3, p.358-362, 2002.

NAJARIAN, J. S.; STRAND, M.; FRYD, D. S. Comparison of cyclosporine versus azathioprine-antilymphocyte globulin in renal transplantation. **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 2463-2468, 1983.

NATSUMEDA, Y.; CARR, S. F. Human type I and type II IMP dehydrogenases as drug targets. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 696, p. 88-93, 1993.

NATSUMEDA, Y.; PRADJA, N.; DONOHUE, J. P.; GLOVER, J. L.; WEBER, G. Enzymic capacities of purine de novo and salvage pathways for nucleotide synthesis in normal and neoplastic tissues. **Cancer Res.**, v. 44, p. 2475-2479, 1984.

NEILD, G. H.; TAUBE, D. H.; HARTLEY, R. B.; BIGNERDI, L.; CAMERON, J. S.; WILLIAMS, D. G.; OGG, C. S.; RUDGE, C. J. Morphological differentiation between rejection and cyclosporin nephrotoxicity in renal allografts. **J. Clin. Pathol.**, v. 39, p. 152-159, 1986.

NEMLANDER, A.; AHONEN, J.; WIKTOROWICZ, K.; VON WILLEBRAND, E.; HEKALI, R.; LALLA, M.; HAYRY, P. Effect of cyclosporine on wound healing. **Transplantation**, v. 36, n. 1, p. 1-6, 1983.

NIERDERBERGER, W.; LEMAIRE M.; MAURER G.; NUSSBAUMER G.; WAGNER K. Distribution and binding of cyclosporine in blood and tissues. **Transplant. Proc.**, v. 15: p. 2419-2421, 1983.

ODE-HAKIM, S.; DOCKE, W.; KERN, F.; EMMRICH, F.; VOLK, H.; REINKE, P. Delayed-type hypersensitivity-like mechanisms dominate late acute rejection episodes in renal allograft recipients. **Transplantation**, v. 61, p. 1233-1240, 1996.

OHSUGI, Y.; SUZUKI, S.; TAKAGAKI, Y. Antitumor and immunosuppressive effects of mycophenolic acid derivatives. **Cancer Res.**, v. 36, p. 2923-2927, 1976.

OPELZ, G.; HENDERSON, R. Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. **Lancet**, v. 342, p. 1514-1516, 1993.

OPELZ, G.; SCHWARZ, V.; WUJCIAK, T. Analysis of non-Hodgkin's lymphomas in organ transplant recipients. **Transplant. Rev.**, v. 231-240, 1995.

OYER, P. E.; STINSON, E. B. JAMIESON, S. W.; JAMIESON, S. W.; HUNT, S. A.; PERLROTH, M.; BILLINGHAM, M.; SHUMWAY, N. E. Cyclosporine in cardiac transplantation: a 2½ year follow-up. **Transplant. Proc.**, v. 15, n. 4 suppl. 1, p. 2546-2552, 1983.

PAAVONEN, T.; HAYRY, P. Effect of cyclosporin A on T-dependent and T-independent immunoglobulin synthesis in vitro. **Nature**, v. 287, p. 542-544, 1980.

PÁDUA NETO, M. V. Aspectos Imunológicos da rejeição aguda ao aloenxerto renal. **Medicina On Line**, v. 2, n. 5, p. 1-10, 1999.

PAGANO, J. S. DNA tumor viruses. **Transplant. Proc.**, v. 16, n. 2, p. 419-427, 1984.

PALACIOS, R.; MOLLER, G. Cyclosporin A receptors for HLA-DR antigens on T cells. **Nature**, v. 290, n. 5809, p. 792-794, 1981.

PALESTINE, A. G.; AUSTIN, H. A.; BALOW, J. E.; ANTONOVYCH, T. T.; SABNIS, S. G.; PREUSS, H. G.; NUSSENBLATT, R. B. Renal histopathologic alterations in patients treated with cyclosporine for uveitis. **N. Engl. J. Med.**, v. 314, p. 1293-1298, 1986.

PANAJOTOPOULUS, N.; GUGLIELME, L.; COELHO, V.; KALIL, J. Importância do sistema HLA em transplantes. In: NEUMANN, J.; ABBUD FILHO, M.; DURO GARCIA, V. **Transplante de órgãos e tecidos**. São Paulo: Sarvier, 1997. cap. 4, p. 58-65.

PAUL, L. C.; VAN ES, L. A.; RIVEIRE G. B.; EERNISSE, G.; DE GRAEFF, J. Blood group B antigen on renal endothelium as the target for rejection in an ABO-incompatible recipient. **Transplantation**, v. 26, p. 268-271, 1978.

PAUL, L. C.; BALDWIN, W. M.; VAN ES, L. A. Vascular endothelial alloantigens in renal transplantation. **Transplantation**, v. 40, p. 117-123, 1985.

PAUL, L. C. Chronic renal transplant loss. **Kidney Int.**, v. 47, p. 1491-1499, 1995.

\_\_\_\_\_. Chronic allograft nephropathy: an update. **Kidney Int.**, v. 56, n. 3, p. 783-793, 1999.

PENN, I.; HALGRIMSON, C. G.; STARLZ, T. E. De novo malignant with tumors in organ transplant recipient. **Transplant. Proc.**, v. 3, n. 1, p. 773-778, 1971.

PENN, I. Development of cancer as a complication of clinical transplantation. **Transplantation Proc.**, v. 9, p.1121, 1977.

\_\_\_\_\_. Cancer in immunosuppressed patients. **Transplant. Proc.**, v. 16, p. 492-494, 1984.

\_\_\_\_\_. Cancers following cyclosporine therapy. **Transplantation**, v. 43, n. 1, p. 32-35, 1987.

\_\_\_\_\_. Cancers complicating organ transplantation. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 1767-1769, 1990

\_\_\_\_\_. The changing pattern of posttransplant malignancies. **Transplant. Proc.**, v. 23, p. 1101-1103, 1991.

\_\_\_\_\_. Malignancy in transplanted organs. **Transplant. Int.**, v. 6, n. 1, p.1-3, 1993a.

\_\_\_\_\_. The effect of immunosuppression on pre-existing cancers. **Transplantation**, v. 55, n. 4, p. 742-747, 1993b.

\_\_\_\_\_. De novo tumors in pediatric organ transplant recipients. **Transplant. Proc.**, v. 26, n. 1, p. 1-2, 1994.

\_\_\_\_\_. Cancers in cyclosporine-treated vs azathioprine-treated patients. **Transplant. Proc.**, v. 28, n. 2, p. 876-878, 1996.

\_\_\_\_\_. Posttransplant malignancies. **Transplant. Proc.**, v. 31, p. 1260-1262, 1999.

PERICO, N.; REMUZZI, G. Cyclosporine-induced renal dysfunction in experimental animals and humans. **Transplant. Rev.**, n. 5, p. 63-80, 1997.

PETCHER, T. J.; WEBER, H. P.; RUEGGER, A. Crystal and molecular structure of an iodo-derivative of the cyclic undecapeptide cyclosporin A. **Helv. Chim. Acta**, v. 59, n. 5, p. 1480-1489, 1976.

PISETSKY, D. S.; HAUGHTON, G. Cyclosporine inhibition of a murine B cell lymphoma. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 63, n. 3, p. 549-554, 1986.

POLUNOVSKY, V. A.; GINGRAS, A. C.; SONENBERG, N.; PETERSON, M.; TAN, A.; RUBINS, J. B.; MANIVEL, J. C.; BITTERMAN, P. B. Translational control of the antiapoptotic function of Ras. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 32, p. 24776-24780, 2000.

POWELL-JACKSON, P. R.; YOUNG, B.; CALNE, R. Y.; WILLIAMS, R. Nephrotoxicity of parenterally administered cyclosporine after orthotopic liver transplantation. **Transplantation**, v. 36, p. 505-508, 1983.

QUNIBI, W. Y.; BARRI, Y.; ALFURAYH, O.; ALMESHARI, K.; KHAN, B.;TAHER, S.; SHETH, K. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients: a report on 26 cases from a single institution. **Transplant. Proc.**, v. 25, p. 1402-1405, 1993.

RANDHAWA, O. S.; DEMETRIS, A. J.; PIETRZAK, B.; NALESNIK, M. Histopathology of renal posttransplant lymphoproliferation: comparison with rejection using the Banff schema. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 28, p. 578-584, 1996.

RANDOMIZED clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation. THE CANADIAN MULTICENTRE TRANSPLANT STUDY GROUP. **N. Engl. J. Med.**, v. 309, p. 809-815, 1983.

RAPAMUNE. Monografia do produto. Wyeth, São Paulo, 2000. p. 5-67.

REICHEL, C. L.; GRAUDENZ, M. Patologia da rejeição. In: NEUMANN, J.; ABBUD FILHO, M.; DURO GARCIA, M. **Transplante de órgãos e tecidos**. São Paulo: Sarvier, 1997. cap. 5, p.66-76.

REITZ, B. A.; BIEBER C. P. Cancer after the use of cyclosporin-A in animals. **Cancer Surv.**, v. 1, p. 613, 1982.

REMUZZI, G.; PERICO, N. Cyclosporine-induced renal dysfunction in experimental animals and humans. **Kidney Int.**, v. 48, suppl. 52, p. S70-S74, 1995.

RINALDI, M.; PELLEGRINI, C.; D'ARMINI, A. M.; AIELLO, M.; NEGRI, M.; ARBUSTINI, E.; IPPOLITI, G.; VIGANO, M. Neoplastic disease after heart transplantation: single center experience. **Eur. J. Cardiothor. Surg.**, v. 19, n. 5, p. 696-701, 2001.

RODGER, R. S.; TURNEY, J. H.; HAINES, I.; MICHAEL, J.; ADU, D.; McMASTER, P. Cyclosporine and liver function in renal allograft recipients. **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 2754-2756, 1983.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. Receptores das células T e moléculas do MHC. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999. cap. 7, p. 83-92.

RUSH, D. N.; HENRY, S. F.; JEFFERY, J. R.; SCHOEDER, T. J.; COUGH, J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. **Transplantation**, v. 57, p. 208-211, 1994.

RYFFEL, B. Mechanisms of action of immunosuppressive agents: cyclosporine/FK506/rapamycin. In: RACUSEN, L. C.; SOLEZ, K.; BURDICK, J. F. **Kidney transplant rejection. Diagnosis and treatment**. 3<sup>th</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 1998. chapt. 15, p. 477-529.

SABERS, C. J.; MARTIN, M. M.; BRUNN, G. J.; WILLIAMS, J. M.; DUMONT, F. J.; WIEDERRECHT, G.; ABRAHAM, T. Isolation of a protein target of the FKBP12-Rapamycin complex in mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 2, p. 815-822, 1995.

SABLINSKI, T.; HANCOCK, W.; TILNEY, N.; KUPIEC-WEGLINSKI, J. CD4 monoclonal antibodies in organ transplantation-a review of progress. **Transplantation**, v. 52, p. 579, 1991.

SALOMON, D. R. A molecular basis for transplantation immunity. In: RACUSEN, L. C.; SOLEZ, K.; BURDICK, J. F. **Kidney transplant rejection. Diagnosis and treatment**. New York: Marcel Dekker, 1998. chapt. 1, p. 1-31.

SANFILIPPO, F.; VAUGHAN, W. K.; BOLLINGER, R. R.; SPEES, E. K. Comparative effects of pregnancy, transfusion, and prior graft rejection on sensitization and renal transplant results. **Transplantation**, v. 34, n. 6, p. 360-366, 1982.

SATLLER, M.; GUENGERICH, F. P.; YUN, C-HCHRISTIANS, U.; SEWING, K. F.; Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biodisponible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. **Drug Metab. Dispos.**, v. 20, p. 753-761, 1992.

SAUNDERS, R. N.; METCALFE, M. S.; NICHOLSON, M. L. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. **Kidney Int.**, v. 59, p. 3-16, 2001.

SCHALM, S. S.; BLENIS, J. Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. **Curr. Biol.**, v. 12, p. 632-639, 2002.

SCHRAMA, Y. C.; JOLES, J. A.; VAN TOL, A.; BOR, P.; KOOMANS, H. A.; HENÉ, R. J. Conversion to mycophenolate mofetil in conjunction with stepwise withdrawal of cyclosporine in stable renal transplant recipients. **Transplantation**, v. 69, n. 3, p. 376-383, 2000.

SCHWARTZ, R. S.; BELDOTTI, L. Malignant lymphomas following allogenic disease: transition from an immunological to a neoplastic disorder. **Science**, v. 149, p. 1511, 1965.

SCHWARTZ, R. S. Immunoregulation, oncogenic viruses and malignant lymphomas. **Lancet**, v. 1, p. 1266, 1972.

SCHWEITZER, E. J.; MATAS, A. J.; GILLINGHAM, K. J.; PAYNE, W. D.; GORES, P. F.; DUNN, D. L.; SUTHERLAND, D. E. R.; NAJARIAN, J. S. Causes of renal allograft loss. **Ann. Surg.**, v. 241, p. 679-688, 1991.

SEHGAL, S. N.; MOLNAR-KIMBER, K.; OCAIN, T.; WEICHMAN B. M. Rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide. **Med. Res. Rev.**, v. 14, p. 1-22, 1994.

SEHGAL, S. N. Rapamune (Sirolimus, Rapamycin): an overview and mechanism of action. **Ther. Drug. Monit.**, v. 17, p. 660-665, 1995.

\_\_\_\_\_. Rapamune: mechanism of action immunosuppressive effect results from blockage of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. **Clin. Biochem.**, v. 31, p. 335-340, 1998.

SEHGAL, S. N.; BAKER, H.; VÉZINA, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. **J. Antibiotic.**, v. 28, p. 727-732, 1975.

SEUFFERLEIN, T.; ROZENGURT, E. Rapamycin inhibits constitutive p70<sup>s6k</sup> phosphorylation, cell proliferation, and colony formation in small cell lung cancer cells. **Cancer Res.**, v. 56, p. 3895-3897, 1996.

SHAW, L. M.; KAPLAN, B.; BRAYMAN, K. L. Introduction and overview. **Clin. Ther.**, v. 22, n. [suppl. B], p. B1-B13, 2000.

SHEIL, A. G. R.; DISNEY, A. P. S.; MATHEW, T. H.; AMISS, N. De novo malignancy emerges as a major cause of morbidity and late failure in renal transplantation. **Transplant. Proc.**, v. 25, p. 1383-1384, 1993.

SHEIL, A. G. R.; FLAVEL, S.; DISNEY, A. P. S.; MATHEW, T. H. Cancer development in patients progressing to dialysis and renal transplantation. **Transplant. Proc.**, v. 17, n. 2, p. 1685-1688, 1985a.

\_\_\_\_\_. Cancer in dialysis and transplant patients. **Transplant. Proc.**, v. 17, n 1, p. 195-198, 1985 .

SHEILL, A. G.; HALL, B. M.; TILLER, D. J.; STEPHEN, M. S.; HARRIS, J. P.; DUGGIN, G. G.; HORVATH, J. S.; JOHNSON, J. R.; ROGERS, J. R.; BOULAS, J. Australian trial of cyclosporine (CsA) in cadaveric donor renal transplantation. **Transplant. Proc.**, v. 15, n. 4 suppl 1, p. 2485-2489, 1983.

SHI, Y.; FRANKEL, A.; RADVANYI, L. G.; PENN, L. Z.; MILLER, R. G.; MILLS, G. B. Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin *in vitro*. **Cancer Res.**, v. 55, p. 1982-1988, 1995.

SIDI, Y.; PANET, C.; WASSERMAN, L.; CYJON, A.; NOVOGRODSKY, A.; NORDENBERG, J. Growth inhibition and induction of phenotypic alterations in MCF-7 breast cancer cells by an IMP dehydrogenase inhibitor. **Br. J. Cancer**, v. 58, p. 61-63, 1988.

SMITH, G. M. A comparison of the effects of cytotoxic agents on the Walker 256 tumour growing in the rat and at the hamster cheek pouch. **Br. J. Cancer**, v. 23, n. 1, p. 88-94, 1969.

SMITH, G. M.; FONTENELLE, C. M.; MUZIK, L. J.; PATERSON, A. R. P.; UNGER, H.; BROX, L. W.; HENDERSON, J. F. Inhibitors of inosinate dehydrogenase activity in Ehrlich ascites tumor cells *in vitro*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 23, p. 2727-2735, 1974.

SMITH, J.; HOWS, J.; GORDON-SMITH, E. C. In vitro stability and storage of cyclosporine in human serum and plasma. **Transplant. Proc.**, v. 15: p. 2422-2425, 1983.

SMITHERS, D. W.; FIELD, E. O. Immunosuppression and cancer. **Lancet**, v. 1, n. 7596, p. 672, 1969

SOLEZ, K.; AXELSEN, R. A.; BENEDIKTSSON, H.; BURDICK, J. F.; COHEN, A. H.; COLVIN, R. B.; CROKER, B. P.; DROZ, D.; DUNNILL, M. S.; HALLORAN, P. F.; HÄYRY, P.; JENNETTE, J. C.; KEOWN, P. A.; MARCUSSEN, N.; MIHATSCH, M. J.; MOROZAMI, K.; MYERS, B. D.; NAST, C. C.; OLSEN, S.; RACUSEN, L. C.; RAMOS, E. L.; ROSEN, S.; SACHS, D. H.; SALOMON, D. R.; SANFILIPPO, F.; VERANI, R.; VON WILLEBRAND, E.; YAMAGUCHI, Y. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. **Kidney Int.**, v. 44, p. 411-422, 1993.

STARLZ, T. E.; KLINTMALM, G. B.; WEIL, R. 3rd; SCHROTER, G. P.; FERNANDEZ-BUENO, C.; MACHUGH, N. Cyclosporine and steroid therapy in sixty-six cadaver kidney recipients. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 153, n. 4, p. 486-494, 1981.

STARLZ, T. E.; BOEHMIG, H. J.; AMEMYA, H.; WILSON, C. B.; DIXON, F. J.; GILES, G. R.; SIMPSON, K. M.; HALGRIMSON, C. G. Clotting changes, including disseminated intravascular coagulation, during rapid renal-homograft rejection. **N. Engl. J. Med.**, v. 283, p. 383-390, 1970.

STELL, G. G. Growth kinetics of tumors – cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. Oxford: Claredon, 1977. p. 5-55.

STEPKOWSKI, S. M.; CHEN, H.; DALOZE, P.; KAHAN, B. D. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug for vascularized heart, kidney, and small bowel transplantation in the rat. **Transplantation**, v. 51, p. 22-26, 1991.

STEWART, H. L.; SVELL, K. C.; DUHAM, L. J.; SCHLYEN, M. S. **Transplantable and transmissible tumors of animals.** Washington: Armed Forces Institute Pathology, 1959.

STREILEIN, J. W. Immunogenetic factors in skin cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 884-887, 1991.

SUZUKI, S.; KIMURA, T.; ANDO, K.; SAWADA, M.; TAMURA, G. Antitumor activity of mycophenolic acid. **J. Antibiot.**, v. 22, n. 7, p. 297-302, 1969.

SUZUKI, S.; TANAKA, K.; OHSAKA, I.; NAKAI, T.; YASUMURA, Y.; OHMORI, Y.; OKA, T. Development of de novo malignancies following renal transplantation: a single-center study. **Transplant. Proc.**, v. 26, n. 2, p. 938-940, 1994.

SWEENEY, M. J.; GERZON, K.; HARRIS, P. N.; HOLMES, R. E.; POORE, G. A.; WILLIAMS, R. H. Experimental antitumor activity and preclinical toxicology of mycophenolic acid. **Cancer Res.**, v. 32, p. 1795-1802, 1972.

SWINNEN, L. J.; COSTANZO-NORDIN, M. R.; FISHER, S. G.; O'SULLIVAN, E. J.; JOHNSON, M. R.; HEROUX, A. L.; DIZIKES, G. J.; PIFARRE, R.; FISHER, R. I. Increased incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac-transplant recipients. **N. Engl. Med.**, v. 323, n. 25, p. 1723-1728, 1990.

TESI, R. J.; HENRY, M. L.; ELKHAMMAS, E. A.; FERGUSON, R. M. Predictors of long-term primary cadaveric renal transplant survival. **Clin. Transplant.**, v. 7, p. 345-352, 1993.

THOMAS, J.; THOMAS, F.; KAPLAN, A.; LEE, H. Antibody-dependent cellular cytotoxicity and chronic renal allograft rejection. **Transplantation**, v. 22, p. 94-100, 1976.

THOMAS, J.; CARVER, M.; CUNNINGHAM, P.; SASH, C.; PARK, K.; THOMAS, F. Promotion of incompatible allograft acceptance in rhesus monkeys given posttransplant antithymocyte globulin and donor bone marrow; II. Effects of adjuvant immunosuppressive drugs. **Transplantation**, v. 47, n. 2, p. 209-215, 1989.

THOMPSON, M. E.; SHAPIRO, A. P.; JOHNSEN, A. M.; REEVES, R.; ITZKOFF, J.; GINCHEREAU, E.; HARDESTY, R. L.; GRIFFITH, B. L.; BAHNSON, H. T.; MCDONALD JR., R. New onset of hypertension following cardiac transplantation: a preliminary report and analysis. **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 2573-2577, 1983.

THORP, M.; DE MATTOS, A.; BENNETT, W.; BARRY, J.; NORMAN, D. The effect of conversion from cyclosporine to tacrolimus on gingival hyperplasia, hirsutism and cholesterol. **Transplantation**, v. 69, n. 6, p. 1218-1220, 2000.

TRAEGER, J.; DUBERNARD, J. M.; BOSI, E. A.; EL YAFI, S.; SECCHI, A.; POZZA, G.; TOURRAINE, J. L. Cyclosporine in clinical pancreatic transplantation. **Transplant. Proc.**, v. 15, n. 4 suppl. 1, p. 2602-2605, 1983.

TRESSLER, R. J.; GARVIN, L. J.; SLATE, D. L. Anti-tumor activity of mycophenolate mofetil against human and mouse tumors in vivo. **Int. J. Cancer**, v. 57, p. 568-573, 1994.

TRPKOV, K.; CAMPBELL, P.; PAZDERKA, F.; CPCKFIELD, S.; SOLEZ, K.; HALLORAN, P. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibodies. **Transplantation**, v. 61, p. 1586-1592, 1996.

TULLIUS, S. G.; TILNEY, N. L. Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. **Transplantation**, v. 59, n. 4, p. 313-318, 1995.

VAN DER ELST, J.; DE GREVE, J.; GEERTS, F.; DE NEVE, W.; STORME, G.; WILLEMS, G. Quantitative study of liver metastases from colon cancer in rats after treatment with cyclosporine A. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.77, p. 227-232, 1986.

VILARDELL, J.; OPPEINHEIMER, F.; TALBOT-WRIGHT, RICART, M. J.; ALCARAZ, A.; CARRETERO, P. Increased risk of malignant tumors in renal transplant recipients receiving cyclosporine. **Transplant. Proc.**, v. 24, n. 5, p. 1948, 1992.

WADHWA, N. K.; SCHROEDER, T. J.; PESCE, A. J.; MYRE, S. A.; CLARDY, C. W.; FIRST, M. R. Cyclosporine drug interactions: a review. **Ther. Drug. Monit.**, v. 9, p. 399-406, 1987.

WALFORD, R. L. Increased incidence of lymphoma after injections of mice with cells differing at weak histocompatibility loci. **Science**, v. 152, p. 78, 1966.

WALKER, R. C.; MARSHALL, W. F.; STRICKLER, J. G.; WIESNER, R. H.; VELOSA, J. A.; HABERMANN, T. M.; MCGREGOR, C. G. A.; PAYA, C. V. Pretransplant assessment of the risk of lymphoproliferative disorders. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 1346-1353, 1995.

WALLWORK, J.; CORY-PEARCE, R.; ENGLISH, T. A. Cyclosporine for cardiac transplantation the United Kingdom trial. **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 2559-2566, 1983.

WALZ, M. K.; ALBRECHT, K. H.; NIEBEL, W.; EIGLER, F. W. De novo malignant tumours during drug immunosuppression: the findings following 1245 cadaveric kidney transplants in 1080 patients. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, v. 117, p. 927-934, 1992.

WATERS, R.; WEBSTER, D.; ALLISON, A. C. Mycophenolic acid and some antioxidants induce differentiation of monocytic lineage cells and augment production of the IL-1 receptor antagonist. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 696, p. 185-196, 1993.

WEBER, G. Enzymology of cancer cells (second of two parts). **N. Engl. J. Med.**, v. 296, n. 10, p. 541-551, 1977.

\_\_\_\_\_. Enzymes of purine metabolism in cancer. **Clin. Biochem.**, v. 16, p. 57-63, 1983.

WEBER, G.; NAGAI, M.; NATSUMEDA, Y.; ICHIKAWA, S.; NAKAMURA, H.; EBLE, J. N.; JAYARAM, H. N.; ZHEN, W.; PAULIK, E.; HOFFMAN, R.; TRICOT, G. Regulation of de novo and salvage pathways in chemotherapy. **Adv. Enzyme Regul.**, v. 31, p. 45-67, 1991.

WEINTRAUB, J.; WARNKE, R. A. Lymphoma in cardiac allotransplant recipients. **Transplantation**, v. 33, n. 4, p. 347-351, 1982.

WHITE, D. J. G.; PLUMB, A. M.; PAWELEC, G.; BRONS, G. Cyclosporin A: an immunosuppressive agent preferentially active against proliferating T cells. **Transplantation**, v. 27, p. 55-58, 1979.

WILLIAMS, M. G.; HUME, D. M.; HUDSON, R. P.; MORRIS, P. J.; KANO, K.; MILGROM, F. "Hyperacute" renal-homograft rejection in man. **N. Engl. J. Med.**, v. 279, n. 12, p. 611-618, 1968.

WINGEN, A. M.; WIESEL, K.; MÖHRING, K.; SCHÄRER K.; MEHLS, O. Malignancies in children with renal replacement therapy. **Transplant. Proc.**, v. 26, n. 1, p. 5 -6, 1994.

WOLTMAN, A. M.; DE FIJTER, J. W.; KAMERLING, S. W.; VAN DER KOOIJ, S. W.; PAUL, L. C.; DAHA, M. R.; VAN KOOTEN, C. Rapamycin induces apoptosis in monocytes- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages. **Blood**, v. 98, n. 1, p. 174 -180, 2001.

WOOD, A. J.; MAURER, G.; NIEDERBERGER, W.; BEVERIDGE, T. Cyclosporine: pharmacokinetics, metabolism and drugs interactions. **Transplant. Proc.**, v. 15, p. 2409 -2415, 1983.

WOODRUFF, M. The transplantation of homologous tissue and its surgical applications. **Ann. R. Coll. Surg. Engl.**, v. 11, p. 173 -195, 1952.

YAMAMOTO-YAMAGUCHI, Y.; OKABE-KADO, J.; KASUKABE, T.; HONMA, Y. Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by immunosuppressant macrolides (rapamycin and FK 506) and calcium/calmodulin-dependent kinase inhibitors. **Exp. Hematol.**, v. 29, n. 5, p. 582-588, 2001.

YAMASHITA, N.; BULLINGTON, R.; CLEMENT, L. T. Equivalent helper function of human "naive" and "memory" CD4+ T cells for the generation of alloreactive cytotoxic T lymphocytes. **J. Clin. Immunol.**, v. 10, n. 5, p. 237-246, 1990.

YATSCOFF, R.; LEGATT, D.; KEENAN, R.; CHAKOWSKY, P. Blood distribution of rapamycin. **Transplantation**, v. 56, p. 1202-1206, 1993.

YEE, G. C.; LENNON, T. P.; GMUR, D. J.; KENNEDY, M. S.; DEEG, H. J. Age-dependent cyclosporine pharmacokinetics in marrow transplant recipients. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 40, p. 438-441, 1986.

YEE, G. C.; MCGUIRE, T. R. Pharmacokinetic drug interactions with cyclosporin (part I). **Clin. Pharmacokinet.**, v. 19, n. 4, p. 319-332, 1990.

YOUNG, B. A.; BURDMANN, E. A.; JOHNSON, R. J.; ALPERS, C. E.; GIACHELLI, C. M.; ENG, E.; ANDOH, T.; BENNETT, W. M.; COUSER, W. G. Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. **Kidney Int.**, v. 48, p. 439-448, 1995.

YUZAWA, K.; KONDO, I.; FUKAO, K.; IWASAKI, Y.; HAMAGUCHI, H. Mutagenicity of cyclosporine. Induction of sister chromatid exchange in human cells. **Transplantation**, v. 42, n. 1, p. 61-63, 1986.

ZANKER, B.; SCHNEEBERGER H.; ROTHENPIELER U.; HILLEBRAND, G.; ILLNER, W-D.; THEODORAKIS, I.; STANGL, M.; LAND, W. Mycophenolate mofetil-based, cyclosporine-free induction and maintenance immunosuppression. **Transplantation**, v. 66, n. 1, p. 44-49, 1998.