



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

HELOÍSA LIZOTTI CILIÃO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E
MUTAGENICIDADE DE IMUNOSSUPRESSORES EM
CÉLULAS HUMANAS *IN VITRO* E ANÁLISE DE
EXPRESSÃO GÊNICA**



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

HELOÍSA LIZOTTI CILIÃO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E
MUTAGENICIDADE DE IMUNOSSUPRESSORES EM
CÉLULAS HUMANAS *IN VITRO* E ANÁLISE DE
EXPRESSÃO GÊNICA**

HELOÍSA LIZOTTI CILIÃO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E
MUTAGENICIDADE DE IMUNOSSUPRESSORES EM
CÉLULAS HUMANAS *IN VITRO* E ANÁLISE DE
EXPRESSÃO GÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C572a Cilião, Heloísa Lizotti.

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de imunossuppressores em células humanas *in vitro* e análise de expressão gênica / Heloísa Lizotti Cilião. – Londrina, 2013.
92 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Células T– Teses. 2. Toxicologia genética – Teses. 3. Mutagenese – Teses. 4. Genética – Expressão – Teses. 5. Imunologia de transplantes – Teses. 6. Câncer – Teses. I. Cólus, Ilce Mara de Syllos. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônômico do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 577.27:616

HELOÍSA LIZOTTI CILIÃO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E
MUTAGENICIDADE DE IMUNOSSUPRESSORES EM CÉLULAS
HUMANAS *IN VITRO* E ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de P
Graduação em Genética e Biologia Molecular
da Universidade Estadual de Londrina, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilce Mara de Syllos
Cólus
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Aparecida
Varanda
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof^a. Dr^a. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina 20 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de prestar meus agradecimentos:

À Universidade Estadual de Londrina.

Ao Departamento de Biologia Geral.

Ao Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina

À minha orientadora, professora e amiga Dr^a. Ilce Mara de Syllos Cólus, que me deu a grande oportunidade de fazer parte do seu laboratório, me ensinando muito do que hoje sei e que muito contribuiu para a realização deste trabalho, uma orientadora a quem eu muito admiro.

Ao meu co-orientador e amigo Dr^o. Marcelo Tempesta de Oliveira que me ajudou muito no desenvolvimento deste trabalho, principalmente nas etapas finais deste trabalho, com muita paciência e dedicação.

Aos meus amigos de laboratórios, Anaih Cardin Bezerra, André van Helvoort Lengert, Adeline Limberger, Ana Flávia Leal Specian, Dimitrius Tansini Pramio, Diego Luis Ribeiro, Hellen Kuasne, Katuska, Juliana Mara Serpeloni, Ligia, Lucas Milanez Benicio, Maressa Cristiane Malini de Lima, Mariana Bizarro dos Reis, Marilesia Ferreira de Souza, Milene Nobrega, Rossana Godoy, Valéria Belo, Vickline Namba pela ajuda e trocas de ensinamento, por todas as horas que passamos juntos no laboratório e fora dele.

Aos amigos e voluntários que doaram sangue possibilitando a realização dos experimentos.

Aos professores e colegas do curso.

À Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Dias coordenadora do curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

À técnica administrativa Sueli Trindade.

Aos Técnicos, Dário e Melissa.

Aos membros da banca examinadora.

A todos os meus familiares, em especial meus pais, Mário Sanches Cilião e Maria Matilde Lizotti Cilião, minha querida irmã Luciana Lizotti Cilião e minha avó Helena Sanches Cilião, que são meu apoio, sempre estão a meu lado e são meus maiores incentivadores.

Ao meu futuro marido, Gilberto Araújo Brandina, pelo amor, dedicação, paciência no período de finalização deste trabalho e por ter me acompanhado em todos os momentos.

A toda família Brandina pelo apoio e pelo carinho em especial à Tereza Cristina Araújo Brandina e ao Lauro Brandina.

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu fiel companheiro Habib Harry.

E especialmente à Deus.

MUITO OBRIGADA

CILIÃO, H. L. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de imunossupressores em células humanas *in vitro* e análise de expressão gênica.** 2013. 92 f. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

O presente trabalho avaliou os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos imunossupressores ciclosporina e tacrolimo, além da análise da expressão de genes relacionados com o surgimento de câncer. Os possíveis efeitos genotóxicos da ciclosporina foram avaliados sobre linfócitos humanos normais nas concentrações de 300; 600; 1200; 2400 e 4800 ng/mL por meio dos ensaios do cometa, micronúcleo e índice de divisão nuclear (IDN). Os efeitos dos imunossupressores ciclosporina e tacrolimo foram testados em linhagem celular de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5), sendo escolhidas as concentrações de 135, 300, 675 e 1520 ng/mL de ciclosporina e de 8; 16; 24; 32 ng/mL de tacrolimo, por não terem induzido diminuição da viabilidade das células após 24 horas de exposição no teste MTT. Foram realizados os ensaios do cometa, IDN, micronúcleo e curva de crescimento celular. Os resultados destes ensaios sugerem que concentrações menores que 300 ng/mL de ciclosporina e de 16 ng/mL de tacrolimo são mais seguras para o uso, já que não induziram danos genotóxicos ou mutagênicos. A análise da regulação da expressão gênica em linfócitos humanos submetidos a tratamento *in vitro* com ciclosporina e tacrolimo indicou que os genes *CYLD* e *XPC* apresentaram variações significativas de expressão nos grupos tratados com as drogas em relação ao controle. Os resultados de expressão mostraram que as respostas em relação aos medicamentos e às doses testadas foram indivíduo-dependente e que os genes diferencialmente expressos poderão auxiliar na escolha de terapias imunossupressoras adequadas a cada indivíduo.

Palavras-chave: Células T. Imunologia de transplantes. Mutagênese. Genética-Expressão. Imunologia. Câncer.

CILIÃO, H. L. **Cytotoxicity evaluation, genotoxicity and mutagenicity of immunosuppressive drugs in human cells in vitro and analysis of gene expression.** 2013. 92 p. Dissertation (Master's degree in Genetic and Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ABSTRACT

This study evaluated the possible cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of immunosuppressive cyclosporine and tacrolimus, as well the expression analysis of genes related to the appearance of cancer. The possible mutagenic effects of cyclosporine were evaluated on normal human lymphocytes at concentrations of 300, 600, 1200; 2400 and 4800 ng/mL by the comet assay, micronucleus test and nuclear division index (IDN). The effects of immunosuppressive cyclosporine and tacrolimus were tested in line cell of human lung fibroblasts (MRC-5), being chosen the concentrations of 135, 300, 675 and 1520 ng/mL of cyclosporin and 8, 16, 24, 32 ng/mL tacrolimus, by not induce decreasing cell viability after 24 hours of drug exposure in MTT test. The assays performed were the comet assay, IDN, micronucleus test and cell growth curve. The results of these trials suggest that concentrations less than 300 ng/mL of cyclosporine and 16 ng/mL of tacrolimus are safer to use, since no genotoxic and mutagenic damage were induced. The analysis of the regulation of gene expression in human lymphocytes undergoing *in vitro* treatment with cyclosporine and tacrolimus indicated that *CYLD* and *XPC* genes showed significant variations in the expression of the drug-treated groups compared to control group. The results showed that expression of the responses in relation to drugs and doses tested were individual-dependent and that differentially expressed genes may help in the choice of immunosuppressive therapies appropriate to each individual.

Keywords: T cells. Transplantation immunology. Mutagenesis. Cyclosporine Immunology. Câncer.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Imunossupressores.....	12
2.2	Ensaio de Viabilidade Celular e Citotoxicidade	15
2.2.1	Teste de viabilidade celular - MTT.....	16
2.2.2	Ensaio de exclusão com Azul de Tripan.....	16
2.3	Ensaio de Genotoxicidade e Mutagenicidade	16
2.3.1	Ensaio do cometa	17
2.3.2	Ensaio do micronúcleo.....	18
2.4	Estudo da Expressão Gênica por PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR).....	19
2.4.1	MYC ou c-MYC (v-myc Myelocytomatosis viral oncogene homolog).....	20
2.4.2	CCND1 (Cyclin D1).....	21
2.4.3	TP53 (Tumor protein p53).....	22
2.4.4	CYLD (Cylindromatosis – turban tumor syndrome).....	22
2.4.5	XPC (Xeroderma Pigmentosum, complementation group C).....	23
3	JUSTIFICATIVA	24
4	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivos gerais	25
4.2	Objetivos específicos	25
5	ARTIGO - Genotoxicidade e mutagenicidade da ciclosporina em linfócitos humanos in vitro	26
	RESUMO	27
1	Introdução	28
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	29

2.1	Agentes Químicos.....	29
2.2	Cultura de Linfócitos	29
2.3	Ensaio do Cometa.....	30
2.4	Ensaio do Micronúcleo (MN).....	31
2.5	Índice de Divisão Nuclear (IDN).....	32
2.6	Análise Estatística	32
3	RESULTADOS	32
3.1	Ensaio do Cometa.....	32
3.2	Ensaio do Micronúcleo e IDN.....	33
4	DISCUSSÃO.....	33
	Agradecimentos	36
	REFERÊNCIAS.....	36
6	ARTIGO - Efeitos citotóxicos e genotóxicos dos imunossupressores ciclosporina e tacrolimo em fibroblastos humanos in vitro.....	41
	RESUMO	42
1	INTRODUÇÃO.....	43
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
2.1	Condições de cultura e delineamento experimental.....	44
2.2	Ensaio de viabilidade celular– MTT.....	46
2.3	Curva de proliferação celular.....	46
2.4	Ensaio do Cometa.....	47
2.5	Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN).....	48
2.6	Índice de divisão nuclear (IDN).....	49
2.7	Análise estatística.....	49
3.	RESULTADOS	50
3.1	Levantamento das concentrações plasmáticas.....	50
3.2	Ensaio de citotoxicidade	50
3.3	Curva de proliferação celular.....	50
3.4	Ensaio do Cometa.....	51
3.5	Ensaio do Micronúcleo e Índice de Divisão Nuclear.....	51
4	DISCUSSÃO.....	53

Agradecimentos	55
Referência Bibliográfica	55
7 ARTIGO - Expressão diferencial de genes relacionados ao câncer em resposta a concentrações não citotóxicas dos imunossupressores ciclosporina e tacrolimo	64
RESUMO	65
INTRODUÇÃO	66
MATERIAL E MÉTODOS	67
Obtenção e cultura de linfócitos primários humanos	67
Viabilidade Celular pelo Ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico)	67
Quantificação de mRNA por PCR em Tempo Real (RT-qPCR)	68
Análises estatísticas	70
RESULTADOS	71
Viabilidade celular pelo ensaio de MTT	71
Quantificação de mRNA por RT-qPCR	71
DISCUSSÃO	71
AGRADECIMENTOS	75
Referência Bibliográfica	75
CONCLUSÕES GERAIS	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

Após a realização do transplante é necessário que o paciente faça uso constante de drogas imunossupressoras a fim de diminuir a resposta imunológica, e conseqüentemente evitar que seu organismo reconheça o enxerto como um corpo estranho e desencadeie um processo de rejeição. No entanto é observado que cada paciente apresenta diferentes respostas aos medicamentos imunossupressores, tanto em decorrência ao tipo do medicamento quanto à dosagem utilizada. Muitos efeitos adversos são observados em decorrência da utilização prolongada destes medicamentos, entre estes as neoplasias.

Com o intuito de diminuir os efeitos adversos decorrente da utilização dos medicamentos imunossupressores e ao mesmo tempo evitar a ocorrência de episódios de rejeição e possível perda do órgão transplantado, estes pacientes realizam exames periódicos monitorando as concentrações plasmáticas dos imunossupressores.

Dentre os imunossupressores utilizados, os inibidores de calcineurinas (ciclosporina e tacrolimo) são os mais relacionados com o desenvolvimento de instabilidade genética e conseqüente acarretam em maior risco para o desenvolvimento de câncer.

Dentre as neoplasias mais corriqueiramente observadas nos pacientes transplantados destaca-se o câncer de pele, que em decorrência ao uso prolongado de imunossupressores promove riscos de até 250 vezes em desenvolver esta neoplasia em relação à população geral. Esta incidência também é proporcional ao nível de imunossupressão a qual cada indivíduo é submetido.

Portanto, estudos para uma melhor compreensão da atuação de drogas imunossupressoras no organismo humano são necessários, a fim de proporcionar melhora na qualidade de vida destes pacientes.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Imunossupressores

Os medicamentos imunossupressores são administrados a pacientes transplantados (OLIVEIRA, ZANKL, RATH, 2004) e a pacientes com doenças auto-imune (YOCUM, 1996), pois diminuem a atividade do sistema imunológico reduzindo, no primeiro grupo, a taxa de rejeição (GARCIA et al., 2004) e no segundo, a atividade de células auto-reativas, melhorando em ambos os casos, a sobrevida destes pacientes.

No início da terapia imunossupressora, entre os anos de 1960 a 1986, eram utilizadas drogas como azatioprina e prednisona, cujos efeitos não eram monitorados (GARCIA et al., 2004). No final da década de 70 surgiram novas drogas, como a ciclosporina, que revolucionou o transplante de órgãos, aumentando a sobrevida do enxerto (RYFFER, 1998; LASMAR et al., 2005). Porém, a concentração plasmática era incerta devido à sua imprecisa absorção. Assim, o monitoramento se tornou necessário. A partir de então, os pacientes são submetidos a um monitoramento constante destes fármacos ou de seus derivados presentes em fluidos biológicos, a fim de manter uma concentração estável dessas drogas, pois uma dosagem baixa pode resultar na perda do enxerto, enquanto uma dosagem elevada pode ser tóxica para os indivíduos (GARCIA et al., 2004).

No início dos anos 90 foi criada uma nova microemulsão da ciclosporina (Neoral), que apresentou melhor farmacocinética e eficiência quando comparada com a formulação anterior, resultando na redução significativa do risco de rejeição de transplante (PONTICELLI, 2005).

No ano de 1987 surgiu o medicamento tacrolimo (FK506), que possui ação imunossupressora mais potente que a ciclosporina, sendo utilizado atualmente em 30% dos transplantados renais (GARCIA et al., 2004).

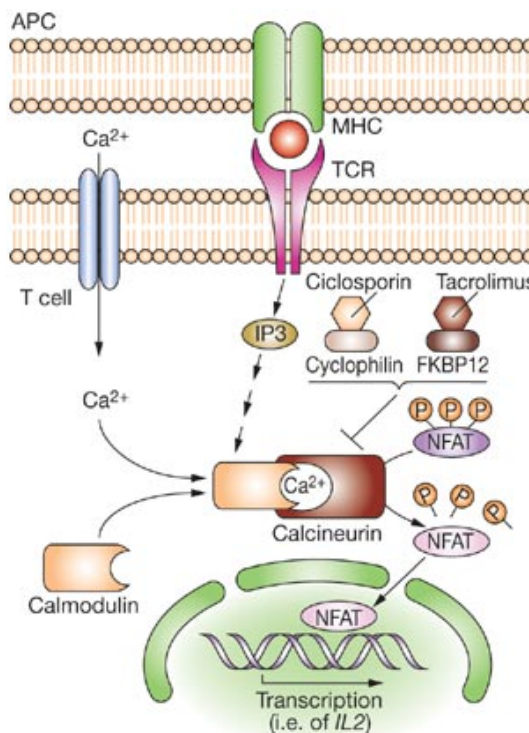
Atualmente os pacientes transplantados fazem uso de uma combinação de medicamentos imunossupressores; esta combinação consiste em inibidor de calcineurina, agentes antiproliferativos (que limitam a expansão clonal dos linfócitos) e corticóide (KASISKE et al., 2010).

Dentre os inibidores de calcineurina a ciclosporina e o tacrolimo possuem semelhante mecanismo de ação (Figura 1), atuando no bloqueio da proliferação de

células T, devido à formação de um complexo com as imunofilinas (ciclofilina e FKBP, respectivamente), inibindo a transdução das calcineurinas fosfatases (BRAZELTON, MORRIS, 1996). Tal inibição impede a desfosforilação do fator nuclear de ativação de células T (NFAT), diminuindo a transcrição de genes dependentes de NFAT (MATSUDA, KOYASU, 2000; OEKJEN, et al., 2003), impedindo sua translocação para o núcleo, inibindo a expressão de genes alvos, incluindo genes de citocinas, entre elas a interleucina 2 (IL-2) e interleucina 4 (IL-4), que estão envolvidas na ativação de células T (MATSUDA, KOYASU, 2000; TEDESCO, HARAGSIM, 2012).

As interleucinas são citocinas sintetizadas por leucócitos (macrófagos e células T), que atuam em outros leucócitos, sendo importantes mediadores do sistema imunológico. Elas estimulam diversas respostas envolvidas na imunidade e inflamação, incluindo o estímulo para o crescimento e proliferação dos linfócitos e ativação das células efetoras para eliminar microrganismos e outros antígenos. (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008).

Figura 1 - Mecanismo de ação das drogas imunossupressoras ciclosporina e tacrolimo, que possibilita o bloqueio da transcrição de interleucinas.



Fonte: Fantini et al. (2006)

A utilização dessas drogas imunossupressoras em longo prazo tem acarretado um aumento na expectativa de vida de pacientes transplantados, mas também uma maior incidência de doenças resultantes do seu uso prolongado, como hipertensão arterial, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hipercolesterolemia, diabetes mellitus e neoplasias (FRAILE et al., 2009).

Pacientes submetidos à terapia imunossupressora por longo período apresentam alto risco de desenvolverem câncer e de recidivarem neoplasias existentes antes do transplante (OLIVEIRA, ZANKL, RATH, 2004; FRAILE et al., 2009). Segundo lanhez (2001), a incidência de câncer nos transplantados renais é de 1 a 16% maior do que no restante da população. O autor relatou também que, de 85 tumores malignos observados em transplantados brasileiros, 81% eram provenientes de linhagem epitelial e 19% de linhagem mesenquimal.

Wisgerhof et al. (2011) observaram que em 1906 pacientes transplantados renais, 327 (17%) desenvolveram algum tipo de câncer, sendo que destes, 142 desenvolveram câncer visceral, 178 carcinoma de células escamosas e 138 carcinoma de células basais; alguns destes pacientes desenvolveram mais de um tipo de câncer.

Segundo Rath, Oliveira-Frick (2009), o desenvolvimento de neoplasias malignas é estimado em 20% após 10 anos de imunossupressão crônica. Isto pode ser explicado principalmente pelo uso de imunossupressores que acarretam distúrbios no sistema imunológico, juntamente com outros fatores de risco adicionais, como a predisposição genética, fatores ambientais, ativação de vírus oncogênicos, número de drogas imunossupressoras usadas e suas concentrações sanguíneas, idade, tempo de diálise, tabagismo, cânceres pré existentes, assim como as possíveis propriedades oncogênicas desses imunossupressores (OLIVEIRA, ZANKL, RATH, 2004; FISCHEREDER, 2008).

Segundo Wisgerhof et al. (2011), estima-se que, após 30 anos de imunossupressão, 50% dos pacientes transplantados renais irão desenvolver pelo menos um tipo de câncer.

Trabalho realizado por Engels et al. (2011) demonstra que o risco de desenvolvimento de neoplasias decorrentes da perda do controle do sistema imune sobre vírus oncogênicos é extremamente alto nos pacientes transplantados. Dentre estas neoplasias encontram-se o linfoma não-Hodgkin e linfoma Hodgkin, causados pelo vírus Epstein-Barr; Sarcoma de Kaposi causado pelo herpes vírus humano 8 e o câncer de fígado, causado pelo vírus das hepatites B e C.

O câncer de pele é a neoplasia mais comum associada com a imunossupressão (O'CALLAGHAN, 2008). Contribuem também para isso a exposição aos raios ultravioleta, predisposição genética e tempo pós-transplante. As neoplasias de pele mais comuns nos pacientes imunossuprimidos são os carcinomas espinocelular, seguido pelo carcinoma basocelular; ambos mais agressivos nestes pacientes do que no restante da população, com altas taxas de metástase e mortalidade (IANHEZ, 2002).

Apesar da frequência de câncer de pele ser extremamente alta, é observada uma maior taxa de sobrevivência dos pacientes portadores deste câncer do que em pacientes com câncer visceral. Trabalho realizado por Wisgerhof et al. (2011) com pacientes holandeses mostrou uma taxa de sobrevivência de 57% após 10 anos do diagnóstico de câncer de pele, sendo que em câncer visceral esta taxa de sobrevivência foi de 22%.

Como os pacientes transplantados são considerados de alto risco para o desenvolvimento de câncer e este está relacionado à alta morbidade e mortalidade (VASUDEV, HARIHARAN, 2007), é indicada a realização de exames de rastreio, como citologia urinária, ultrassom e exames dermatológicos de pele e lábio, possibilitando a detecção de carcinoma nas fases iniciais e melhorando o prognóstico do paciente (ZUUREN, VISSCHER, BAVINCK, 1998; FISCHEREDER, 2008).

O tratamento de câncer nos transplantados é muito complicado, pois necessita de diminuição ou suspensão da imunossupressão, podendo levar à rejeição do enxerto, o que torna o câncer uma das principais causas de mortalidade nestes pacientes (OLIVEIRA, ZANKL, RATH, 2004).

Diante do exposto, é inegável a importância do uso de imunossupressores em pacientes transplantados e também a definição de doses adequadas que impeçam tanto os processos de rejeição como de carcinogênese. Para verificar se dois medicamentos imunossupressores (ciclosporina e tacrolimo) induzem alterações no material genético de células humanas normais, se faz necessária a realização de testes para avaliar os potenciais citotóxicos e genotóxicos destas drogas.

2.2 Ensaios de Viabilidade Celular e Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade permitem avaliar a sobrevivência e proliferação de células mediante tratamentos com substâncias testes (MOSMANN, 1993).

2.2.1 Teste de viabilidade celular - MTT

O teste do MTT foi primeiramente descrito por Mosmann (1983) e consiste na redução do sal de tetrazolium (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase das células viáveis, formando cristais de formazan.

A quantidade de formazan produzida está diretamente relacionada à quantidade de células viáveis, metabolicamente ativas, uma vez que a atividade de redução do MTT é atribuída à atividade da cadeia respiratória mitocondrial (BERNHARD et al., 2003). Estes cristais são então solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma coloração roxa. O resultado deste ensaio é obtido pela leitura em espectrofotômetro; quanto mais intensa a coloração roxa produzida, maior a quantidade de células viáveis.

Este ensaio é um método rápido para avaliar a viabilidade celular a partir do efeito tóxico de um composto em culturas de células submetidas a tratamento agudo (GERLIER e THOMASSET, 1986).

2.2.2 Ensaio de exclusão com Azul de Tripan

O teste de exclusão pelo Azul de Tripan é um ensaio rápido para mensurar a diminuição do número de células viáveis como uma medida direta da citotoxicidade, por meio da avaliação de danos à membrana plasmática (FRESHNEY, 2001), refletindo com precisão a citotoxicidade induzida por drogas (KIM et al., 2009). Este corante penetra apenas nas células com danos irreversíveis na membrana, ou seja, nas células não viáveis, enquanto as células viáveis têm a membrana intacta e não permitem a entrada do corante (FORNELLI et al., 2004). A leitura das células é realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se microscópio invertido.

Este ensaio pode ser utilizado previamente à realização de ensaios de genotoxicidade e/ou mutagenicidade para se determinar a porcentagem de células viáveis após a realização do tratamento, a porcentagem de células não viáveis deve ser menor que 30%, de forma a evitar resultados falsos positivos originados da fragmentação do DNA devido, à morte celular (SASAKI et al, 2007).

2.3 Ensaio de Genotoxicidade e Mutagenicidade

Mutagenicidade refere-se à indução de alterações permanentes e transmissíveis na estrutura do DNA, ou seja, mutações, que podem ser gênicas,

alterando o funcionamento de um único gene, ou cromossômicas, afetando vários genes (PIERCE, 2004).

Se as mutações não forem detectadas ou causarem a morte celular vão passar despercebidas, assim as mutações não reparadas vão se propagar pelo corpo em crescimento (MALUF e ERDTMANN, 2003). O acúmulo destas mutações pode levar à perda do controle da divisão celular, desencadeando o estágio inicial do processo de formação do tumor, principalmente quando estas mutações estão relacionadas com a ativação dos proto-oncogenes ou com a perda da função dos genes supressores de tumor (RIBEIRO e MARQUES, 2003).

A genotoxicidade se refere a lesões genômicas passíveis de reparo, mas que se não reparadas resultam em mutações (GONTIJO, TICE, 2003).

Os testes de genotoxicidade e de mutagenicidade são importantes para se avaliar danos causados no material genético por produtos químicos, como os medicamentos, assim como para o monitoramento de populações ocupacionalmente expostas a xenobióticos. Tais avaliações têm sido importantes para se estimar o risco do desenvolvimento câncer (AU, BADARY, HEO, 2001).

2.3.1 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa, também conhecido como SCGE (*“single cell gel electrophoresis”*) é o mais utilizado para identificar agentes com atividade genotóxica, detectando quebras de fita simples, de fita dupla, “crosslinks”, sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis no DNA de células individuais (FIKROVÁ et al., 2011).

Este teste consiste em fixar as células em agarose e lisar as membranas e proteínas nucleares (incluindo as histonas) com detergentes e altas concentrações de sais, permanecendo inalteradas apenas as proteínas da matriz nuclear, o que permite que o DNA permaneça retido em uma estrutura residual semelhante a um núcleo, conhecida como nucleóide (ÖSTLING, JOHANSON et al., 1984).

Caso existam quebras na molécula de DNA a estrutura do nucleóide sofre mudanças (TICE et al., 2000). De acordo com o dano ocorrido na molécula, as células com maior frequência de ruptura no DNA apresentam maior migração, resultando em um nucleóide com uma cauda de fragmentos de DNA com a aparência de um cometa (TICE et al., 2000). Assim, este teste permite determinar a exposição e a reatividade do DNA, por meio da indução de lesões que geram

segmentos que migram durante a eletroforese do núcleo para o pólo positivo (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). Deve-se salientar que as principais lesões observadas no teste do cometa podem ser corretamente reparadas sem resultar em alterações genéticas permanentes. Desta forma, o reparo do DNA pode ser observado, dependendo do tipo de indução de dano primário ao DNA e do tempo de tratamento, por meio da redução da migração dos fragmentos, devido à eliminação de algumas lesões (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005).

Diferentes variações metodológicas foram desenvolvidas para o teste do cometa, que foi inicialmente descrito por Östling e Johanson (1984), os quais desenvolveram a técnica de eletroforese em microgel para a detecção de danos no DNA em nível celular em condições neutras. Nos anos seguintes Singh et al. (1988) introduziram a técnica do microgel em pH alcalino, que oferece maior sensibilidade para identificar danos no DNA, já que desfaz as pontes de hidrogênio, permitindo maior migração dos fragmentos de DNA no gel. A grande vantagem da utilização deste método é a sua alta sensibilidade em detectar danos no DNA em células individuais, requerer um pequeno número de células, ter baixo custo, ser de fácil aplicação e fornecer resultados rapidamente (TICE et al., 2000; BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005).

Atualmente o ensaio do cometa vem sendo utilizado em experimentos de genética toxicológica e ecotoxicológica para o monitoramento humano e ambiental, avaliando danos causados ao material genético em decorrência da exposição a diferentes compostos que podem trazer consequências significativas à saúde humana após curtos ou longos períodos de exposição (JHA, 2008). Além disso, o ensaio do cometa também tem sido empregado para detectar a cinética de reparo do DNA; em avaliações de genotoxicidade, tanto *in vitro* como *in vivo*, de danos induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes, entre outros (McKELVEY-MARTINS et al., 1993; GONTIJO e TICE, 2003; VILLELA et al., 2003).

2.3.2 Ensaio do micronúcleo

O ensaio do micronúcleo (MN) *in vitro* foi proposto por Heddle (1976) para avaliar agentes mutagênicos, utilizando cultura de linfócitos periféricos humanos. Este ensaio permite detectar efeitos aneugênicos, devido a danos no fuso mitótico que levam à perda de cromossomos inteiros durante a anáfase, e efeitos clastogênicos, originados da ruptura de cromossomos em fragmentos acêntricos,

que são perdidos durante a divisão celular (FENECH, 2000). Também pode haver formação de micronúcleos pela ruptura de pontes cromossômicas, que são puxadas para os pólos opostos durante a anáfase (TERRADAS et al., 2010). Portanto, os micronúcleos podem ser definidos como pequenos corpos extranucleares formados por material cromossômico não incorporado no núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos (VILLELA et al., 2003).

As principais características para diferenciar o micronúcleo do núcleo principal são sua morfologia idêntica ao núcleo principal, diâmetro entre 1/16 até, no máximo, 1/3 dos núcleos principais, mesma coloração dos núcleos, ausência de refringência, não estar conectado ou sobreposto a um dos núcleos principais (FENECH, 1993).

O micronúcleo tem sido utilizado como um biomarcador de danos cromossômicos, instabilidade genética e risco de câncer; no monitoramento dos efeitos da radioterapia e também no biomonitoramento de várias doenças, (SAMANTA e DEY, 2010).

2.4 Estudo da Expressão Gênica por PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

Todas as células de um organismo possuem os mesmos genes porém, estes são expressos de maneira diferente dependendo do estado fisiológico, patológico ou de desenvolvimento da célula. Assim, o estudo dos RNAs mensageiros (mRNAs) fornece informações importantes sobre os genes que estão sendo expressos em determinado momento nas células (BUSTIN, NOLAN, 2004).

A técnica RT-qPCR em tempo real é utilizada para analisar a expressão de mRNA. A sigla “RT” refere-se à reação de transcriptase reversa que consiste em transformar o mRNA em DNA complementar (cDNA). A expressão “em tempo real” refere-se ao princípio da técnica de monitorar constantemente o acúmulo de produto, sendo possível a estimativa da quantidade inicial de mRNA, devido à fluorescência produzida, que é proporcional ao número de cópias do amplicon depois de cada ciclo (SKRZYPSKI, 2008). Esta fluorescência é resultado da adição de um corante fluorescente à reação, sendo o SYBR Green amplamente utilizado devido à sua capacidade de se ligar à dupla fita de DNA, emitindo fluorescência (PFAFFL, 2001).

A reação de RT-qPCR tem alta sensibilidade e permite a quantificação de transcritos raros e detecção de pequenas mudanças na expressão de genes (PFAFFL, 2001).

Os genes estudados neste trabalho (Tabela 1), estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de cânceres:

- Genes de reparo de DNA que atuam como barreira protetora contra alterações deletérias ao material genético, mantendo a integridade do genoma (PINTO, FELZENSWALB, 2003).
- Genes supressores de tumor que codificam proteínas inibidoras da replicação celular. Para que estes genes percam a ação supressora, ambos os alelos têm que estar inativos (CAVENEY, WHITE, 1995).
- Proto-oncogenes são responsáveis por codificar proteínas que estimulam as células a se replicarem. Estes genes são expressos nas células normais, contudo, quando alterado em apenas um dos alelos, transformam-se em oncogenes. O produto dos oncogenes é capaz de manter o estímulo permanente para a divisão celular, mesmo com ausência de estímulos externos (CAVENEY, WHITE, 1995, PINTO, FELZENSWALB, 2003).

Tabela 1 - Genes relacionados com o desenvolvimento de tumor e estudados no presente trabalho.

REPARO DE DNA	SUPRESSOR TUMORAL	PROTO-ONCOGENE
<i>XPC (xeroderma pigmentosum, complementation group C)</i>	<i>CYLD (cylindromatosis)</i> <i>TP53 (Tumor protein p53)</i>	<i>CCND1 (cyclin D1)</i> <i>MYC (myelocytomatosis viral oncogene)</i>

2.4.1 MYC ou c-MYC (v-myc Myelocytomatosis viral oncogene homolog)

O proto-oncogene *MYC* foi inicialmente descoberto em estudos com retrovírus causadores de mielocitomatose em aves, sendo denominado de *v-MYC (viral avian myelocytomatosis)*. O homólogo celular humano *c-MYC* foi descoberto posteriormente, sendo sua superexpressão observada em vários tipos de cânceres (DANG, 1999).

Dos genes pertencentes à família *MYC*, destacam-se *c-MYC*, *l-MYC* (nos carcinomas do pulmão) e *n-MYC* (nos neuroblastomas) uma vez que estes

apresentam potencial neoplásico em seres humanos (FARIA, RABENHORST, 2006).

O gene *c-MYC* está localizado na região cromossômica 8q24.1 e participa da regulação do ciclo celular por meio da promoção da transição da fase G1 para a fase S, em decorrência da ativação do complexo ciclinas/CDK. Especula-se também que este gene seja responsável por inibir a transcrição de supressores tumorais como *p21*, *p57*, *p15* e *p16*, acarretando divisão celular descontrolada, não permitindo o eficiente reparo do material genético antes da replicação, ocasionando novas mutações e, conseqüentemente, o surgimento de instabilidade genética (FARIA, RABENHORST, 2006).

A proteína expressa pelo gene *c-MYC* está presente na proliferação normal de células somáticas. No entanto, em células cancerosas a expressão deste gene geralmente é desregulada e elevada. Sabe-se que *c-MYC* é um fator de transcrição que modula a expressão de genes alvos da replicação celular, todavia, ainda não se sabe ao certo os mecanismos moleculares que promovem a transformação maligna (LITTLEWOOD, KREUZALER, EVAN, 2012).

Este gene parece ser um amplificador geral de qualquer estado de transcrição em que a célula se encontra no momento de sua ativação, o que pode ajudar a compreender o papel do gene *c-MYC* em diversas vias biológicas como metabolismo, crescimento celular, diferenciação celular, proliferação e apoptose, dependendo dos níveis celulares em que a proteína *C-MYC* está expressa (LITTLEWOOD, KREUZALER, EVAN, 2012; NIE et al., 2012).

2.4.2 CCND1 (Cyclin D1)

O gene *CCND1* é um proto-oncogene localizado na região cromossômica 11q13 e desempenha um importante papel na passagem do ponto de restrição em G1 (LUKAS et al., 1995). A proteína resultante deste gene age como reguladora do ciclo celular, uma vez que seu padrão de expressão e degradação contribuem para a coordenação do tempo de cada evento mitótico, por meio da fosforilação da proteína retinoblastoma (supressora tumoral). Nas células normais, as ciclinas D1 têm um tempo de meia vida de aproximadamente 20 minutos, pois elas são rapidamente ubiquitinizadas. A diminuição de qualquer dos fatores responsáveis por esta ubiquitinação resulta em maior estabilidade e acúmulo das ciclinas D1.

Geralmente observa-se aumento da expressão de *CCND1* devido à perda do *checkpoint* G1/S, que faz com que a célula se divida continuamente, mesmo sem estímulos externos (CURTIN et al., 2005). Além do acúmulo de ciclina D1 decorrentes da sua maior estabilidade, algumas lesões genômicas como translocações ou ampliações cromossômicas do gene *CCND1*, resultam na superexpressão deste gene, alterando a progressão do ciclo celular e contribuindo para o surgimento de vários tipos de cânceres (BARBASH, DIEHL, 2008; YAN et al., 2011), como os linfóides e tumores sólidos, incluindo os de mama, próstata, estômago, esôfago, cabeça e pescoço, mielomas múltiplos, adenoma de paratireóide, pulmão e bexiga (TAJARA, 2004; SHAN, ZHAO, GU, 2009).

2.4.3 TP53 (Tumor protein p53)

O gene *TP53* é um supressor tumoral que expressa uma proteína de extrema importância para a célula devido à sua capacidade de bloquear o ciclo celular na presença de danos no DNA. Dessa forma, o sistema de reparo pode atuar evitando a perpetuação do dano e o estabelecimento de mutações. Se o dano não puder ser reparado, a proteína p53 tem a capacidade de induzir a apoptose (MARTINEZ et al., 2006; YAN et al., 2011).

Mutações no gene *TP53* estão entre as alterações mais frequentes encontradas no câncer, ocorrendo em cerca de 50% de todos os tumores malignos (MARTINEZ et al., 2006).

A inativação deste gene pode induzir o surgimento do câncer de pele pela exposição à radiação UV. Cerca de 90% das células de carcinomas espinocelular e 50% das células de carcinomas basais possuem mutações no gene *TP53* (MARTINEZ et al., 2006; BENJAMIN, ANANTHASWAMY, 2007).

2.4.4 CYLD (Cylindromatosis – turban tumor syndrome)

O gene *CYLD* pertence à família cilindromatose e localiza-se na região cromossômica 16q12-13. Possui função de supressor tumoral e codifica a enzima CYLD deubiquitinase, que regula negativamente a sinalização do fator nuclear Kappa B (NF-KB), contribuindo assim, para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (ZHENG et al., 2004).

Sua baixa expressão está relacionada ao desenvolvimento de vários tipos de cânceres humanos, incluindo câncer de pulmão, cólon, rim, melanoma e carcinoma

hepatocelular. Regula ainda a progressão do câncer de pele não melanoma devido ao controle da diferenciação tumoral, angiogênese e sobrevivência celular (ALAMEDA et al., 2011).

A perda dos dois alelos do gene *CYLD* ou a inativação destes está relacionada com o surgimento de cilindromas (neoplasias benignas múltiplas de pele). Stegmeier et al. (2007) demonstraram que a perda da atividade deste gene está relacionada com a perda do controle do ciclo celular e aumento da resistência à apoptose. Os autores sugeriram que o defeito na progressão do ciclo celular causa uma instabilidade genética que pode contribuir com a tumorigênese.

Trabalho realizado por Alameda et al. (2011), mostra que o aumento da expressão do gene *CYLD* leva à diminuição da malignidade de carcinoma de células escamosas em humano. Já a inibição funcional deste gene aumenta a agressividade do tumor, o potencial invasivo, resultando também na resistência à apoptose e angiogênese.

2.4.5 XPC (Xeroderma Pigmentosum, complementation group C)

O gene *XPC* codifica proteínas específicas da via do reparo por excisão de nucleotídeos (NER – *Nucleotise excision repair*). Mutações neste gene estão associadas à doença Xeroderma pigmentoso, rara doença autossômica recessiva, que tem como característica aumentar a sensibilidade à luz solar, com consequente desenvolvimento de cânceres de pele em idade prematura (MADAM, LEAR, SZEIMIES, 2010).

Herman-Edelstein et al. (2012) demonstraram que drogas imunossupressoras que agem pelo bloqueio da calcineurina, como a ciclosporina e o tacrolimo, diminuem a atividade do sistema de reparo por excisão de bases e, conseqüentemente, aumentam o desenvolvimento de câncer nos pacientes transplantados que utilizam estes medicamentos.

2 JUSTIFICATIVA

A terapia imunossupressora é fundamental após a realização do transplante para diminuir o risco de rejeição do órgão. Os medicamentos imunossupressores aumentam a expectativa de vida dos pacientes transplantados e, conseqüentemente, acarretam em maior incidência de doenças resultantes do uso prolongado dessas drogas, como por exemplo, as neoplasias, mais frequentes nestes pacientes do que no restante da população. Portanto, estudos que visem melhor compreensão da atuação de drogas imunossupressoras no organismo humano são necessários a fim de proporcionar melhora na qualidade de vida destes pacientes.

Neste contexto, os ensaios *in vitro* com células humanas submetidas a tratamentos com imunossupressores corriqueiramente utilizados na prática clínica, a fim de avaliar suas possíveis citotoxicidade, genotoxicidade e regulação de genes relacionados com o desenvolvimento de neoplasias, podem contribuir auxiliando na determinação da concentração mais segura para o uso de imunossupressores em pacientes transplantados, assim como para o estabelecimento de perfis transcricionais (assinaturas gênicas) característicos, de forma a diferenciar o indivíduo sadio do doente, tornando os diagnósticos, prognósticos e condutas terapêuticas mais seguras e eficazes.

3 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Contribuir para o conhecimento sobre os efeitos do uso dos imunossuppressores ciclosporina e tacrolimo em pacientes que fazem uso destes medicamentos, por meio da avaliação do seu potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico em células humanas *in vitro*, bem como da quantificação da expressão de alguns genes envolvidos no desenvolvimento de câncer.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os possíveis efeitos genotóxico, mutagênico e índice de proliferação celular (IDN) em linfócitos humanos normais tratados com ciclosporina.

Realizar ensaios com cultura de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) tratados com ciclosporina e tacrolimo para:

- ✓ Avaliar seus possíveis efeitos citotóxicos por meio do ensaio do MTT em cinco diferentes tempos de tratamento 24, 48, 72, 96 e 120 horas;
- ✓ Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos por meio do ensaio do Cometa nos tempos de 3 e 24 horas de exposição aos medicamentos;
- ✓ Avaliar os possíveis efeitos mutagênicos por meio do ensaio do micronúcleo *in vitro*, com tempo de exposição de 24 horas aos medicamentos;
- ✓ Quantificar, em linfócitos tratados com os imunossuppressores ciclosporina e tacrolimo, a expressão de genes relacionados com o surgimento de tumores malignos, empregando a técnica de PCR quantitativa em tempo real.

4 ARTIGO**Genotoxicidade e mutagenicidade da ciclosporina em linfócitos humanos *in vitro***

Cilião, H.L.^a; Namba, V.^a; Camargo-Godoy, R.B.O.^a; Nobrega, M.^a; Cólus, I.M.S.

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina

Revista a ser submetido: *Toxicology in vitro*

Fator de Impacto – 2,775

Correspondência para:

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

Laboratório de Mutagênese e Oncogenética – Departamento de Biologia Geral,
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, Paraná, Brasil

CEP: 86.057-970

Telefone: 3371-4608

e-mail: colus@sercomtel.com.br

RESUMO

No presente trabalho foram avaliados os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos do imunossupressor ciclosporina em linfócitos de indivíduos saudáveis expostos às concentrações de 300; 600; 1200; 2400 e 4800 ng/mL de ciclosporina. As três menores concentrações são próximas às concentrações plasmáticas observadas em pacientes e as concentrações acima foram avaliadas para se estabelecer uma margem de segurança do uso da droga. A avaliação da genotoxicidade foi realizada por meio do ensaio do cometa após 2 ou 24 horas de exposição das células ao imunossupressor e a avaliação da mutagenicidade foi realizada pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese após 48 horas de exposição. A ciclosporina apresentou atividade genotóxica apenas quando avaliada nas concentrações de 2400 e 4800 ng/mL, em ambos os tempos de tratamento e na concentração de 1200 ng/mL apenas no tempo de 2 horas. Atividade mutagênica foi observada somente para a maior concentração do imunossupressor (4800 ng/mL). Com os resultados deste trabalho podemos sugerir que a ciclosporina deve ser utilizada nos pacientes transplantados nas menores concentrações possíveis, a fim de evitar a rejeição do enxerto e minimizar ao máximo seus efeitos adversos.

Palavras chave: Ciclosporina, imunossupressor, ensaio do cometa, transplantados renais, ensaio do micronúcleo, linfócitos.

1 Introdução

A ciclosporina é um medicamento imunossupressor amplamente utilizado pelos pacientes transplantados para reduzir a taxa de rejeição e melhorar a sobrevida dos pacientes (Garcia et al., 2004; Oliveira et al., 2004; Ponticelli, 2005).

Os danos ao material genético estão entre os efeitos adversos já descritos após o uso de imunossupressores (Yuzawa et al., 1986, Ianhez, 2001, Engels et al., 2011, Kurtoglu e Yuksel, 2012). Devido ao potencial mutagênico da droga, os pacientes submetidos à terapia imunossupressora apresentam alto risco de desenvolver câncer e de recidiva de neoplasias existentes antes do transplante (Oliveira et al., 2004; Fraile et al., 2009). Segundo Ianhez (2001), a incidência de câncer nos transplantados renais chega a ser 16% maior do que no restante da população. O autor relatou também que, de 85 tumores malignos observados em transplantados, 81% eram provenientes de linhagem epitelial.

Segundo Rath e Oliveira-Frick (2009), o desenvolvimento de neoplasias malignas é estimado em 20% após 10 anos de imunossupressão crônica. Isto pode ser explicado principalmente pelo uso de imunossupressores que acarretam distúrbios no sistema imunológico, diminuição da vigilância imune (Hanahan e Weinberg, 2011), juntamente com outros fatores de risco adicionais, como a predisposição genética, fatores ambientais, ativação de vírus oncogênicos, número de drogas imunossupressoras usadas e suas concentrações plasmáticas, idade, tempo de diálise, tabagismo, cânceres pré existentes, assim como as propriedades mutagênicas já mencionadas desses imunossupressores (Oliveira et al., 2004; Fischerederl, 2008).

Zuuren et al. (1998) mostraram que na década de 90 o transplante de órgãos sólidos vinha se tornando uma alternativa de tratamento frequente e de sucesso e sugeriram que o número de doenças resultantes das terapias imunossupressoras aumentaria nos anos subsequentes. Esta previsão foi confirmada, pois atualmente se observa um aumento na incidência de câncer nos pacientes transplantados em comparação com a população em geral, sendo que este aumento pode ser decorrente de maneira direta ou indireta do uso de medicamentos imunossupressores (Vajdic e Leeuwen, 2009). Neste caso, torna-se de extrema importância o monitoramento dos pacientes, assim como a determinação de doses de imunossupressores que sejam eficazes, mas que apresentem o menor efeito adverso possível.

Por esta razão, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos da ciclosporina em diferentes concentrações. Para este propósito foram empregados o ensaio do cometa e o ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) em cultura de linfócitos humanos *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agentes Químicos

A ciclosporina (SANDIMMUN®, 50mg/mL, Novartis Farma – CAS: 59865-13-3), foi cedida ao nosso Laboratório pelo Setor de Farmácia do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (Londrina, Paraná – Brasil).

O cloridrato de doxorubicina - DXR (Adriamycin, Sigma-Aldrich, CAS: 23214-92-8), foi utilizado como controle positivo no ensaio do cometa, na concentração de 0,75 µg/mL. A bleomicina - Bleo (Aché, CAS: 9041-93-4), foi utilizada no ensaio do micronúcleo como indutor de danos no DNA, na concentração de 15 µg/mL. A fitohemaglutinina (PHA) (Gibco™, CAS: 10576-015) e a citocalasina-B (Sigma-Aldrich; CAS: 14930-96-2) foram utilizadas, respectivamente, nas concentrações finais de 0,2 µg/mL e 3 µg/mL de meio de cultura.

2.2 Cultura de Linfócitos

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, parecer CEP/UEL: 004/2010, CAAE: 0211.0.268.000-09, foram coletados 10 mL de sangue periférico de 6 voluntários saudáveis, sendo 3 homens e 3 mulheres, na faixa de 20 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumantes, não etilistas, que não faziam uso de nenhuma medicação e sem exposição recente à radiação e a praguicidas, com o intuito de reduzir a detecção de danos no DNA que não fossem resultantes dos tratamentos empregados neste trabalho.

Os linfócitos foram isolados utilizando-se Ficoll-Paque, como descrito por Boyum (1968). Foram utilizadas amostras de 6 indivíduos para a realização do ensaio do cometa e 3 indivíduos para o ensaio do micronúcleo.

Aproximadamente 10^6 células foram semeadas em tubos cônicos contendo 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco™, CAS: 31800-014), 2,0 g/L de NaHCO_3

(MERCK), HEPES 25mM (Sigma-Aldrich, CAS: 7365-45-9), 0,06 g/L de penicilina G (Sigma-Aldrich, CAS: 113-98-4), 0,10 g/L de sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich, CAS: 3810-74-0), 20% de soro bovino fetal (Gibco™, CAS: 12657-029) e 2% de fitohemaglutinina A (Gibco™).

Depois de estabelecida a cultura, as células foram incubadas por 48 horas em estufa tipo B.O.D a 37°C e em seguida receberam o tratamento com diferentes concentrações de ciclosporina, escolhidas a partir de relatos da literatura: 300, 600, 1200, 2400 e 4800 ng/mL (Yuzawa et al., 1986; Ianhez, 2002; Oliveira et al., 2004; Rath e Oliveira-Frick, 2009).

2.3 Ensaio do Cometa

A versão alcalina do ensaio do cometa foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Singh et al. (1988). Os linfócitos isolados de seis doadores saudáveis foram incubados em meio completo com PHA por 48 horas, permitindo, assim, a estabilização e o aumento do número celular. Após este período, o meio de cultura foi substituído por meio completo sem PHA e realizados os seguintes tratamentos: PBS (*phosphate saline buffer*) (controle negativo), doxorrubicina (controle positivo) e cinco diferentes concentrações de ciclosporina. Alíquotas da suspensão celular foram retiradas após 2 e 24 horas para a realização do ensaio, pois segundo Sasaki et al. (2007), a quantidade de danos observada no ensaio do cometa pode variar de acordo com o tempo de exposição.

As células foram centrifugadas a 200 g por 5 minutos e logo em seguida foi retirado o sobrenadante, deixando-se 20 µL desta suspensão celular, aos quais foram adicionados 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP - *low melting point*) 0,5% diluída em PBS. A mistura foi homogeneizada e espalhada sobre lâminas pré preparadas com uma camada de agarose (NMP – *normal melting point*) 1,5% diluída em PBS.

As lâminas foram mantidas em solução de lise de membrana (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 10% DMSO, 1% Triton-X) pH 10, por 90 minutos a 4°C. Após a lise as lâminas foram incubadas por 20 minutos em tampão de eletroforese (200 mM EDTA, 10N NaOH) pH 13, e então submetidas à corrida de eletroforese (25 V e 300 mA) por 20 minutos neste mesmo tampão a 4 °C.

As lâminas foram neutralizadas com solução de TRIS (0,4 M – pH 7,5), por 15 minutos, secas e fixadas com etanol absoluto por 5 minutos e estocadas a 4 °C

até a análise. A coloração foi realizada com 45 µL de solução de gel red 30x (BIOTIUM, CAS: 41003) imediatamente antes da análise em microscópio de fluorescência (Nikon), com objetiva de 40X, em filtro de excitação 515-560 nm de comprimento de onda e filtro de barreira de 590 nm, sendo analisadas 100 células por indivíduo, totalizando 600 células por tratamento.

O critério utilizado para a quantificação dos danos no DNA foi baseado em observações visuais do tamanho da cauda em proporção ao nucleóide, sendo atribuído um valor numérico a cada classe de migração, que variou de classe 0 para nucleóides com ausência de cauda a classe 3, para os nucleóides com cauda maior que dois diâmetros do nucleóide (Kobayashi et al., 1995).

O escore foi calculado de acordo com a fórmula proposta por Manoharan e Banerjee (1985), multiplicando-se o número de nucleóides observados em cada classe, representado na fórmula por n, pelo valor da classe correspondente (0, 1, 2, 3).

$$\text{Escore} = \frac{(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)}{100}$$

2.4 Ensaio do Micronúcleo (MN)

O ensaio do micronúcleo foi realizado em linfócitos do sangue periférico de três doadores saudáveis (duas mulheres e um homem), selecionados aleatoriamente dentre os indivíduos analisados no ensaio do cometa, seguindo-se a técnica descrita por Countryman e Hedlle (1976) Aproximadamente 500 µL de sangue periférico foram transferidos para tubos cônicos contendo meio de cultura completo e PHA. As culturas foram incubadas em meio completo para estabilização por 24 horas e após este período foram tratadas por 48 horas com PBS (controle negativo) e bleomicina (controle positivo) e cinco diferentes concentrações de ciclosporina. Após 24 horas de tratamento foi adicionada citocalasina B na concentração final de 3 µg/mL, que agiu por 28 horas. Em seguida as culturas foram centrifugadas a 64,4 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionados 5 mL de solução hipotônica a 37°C (KCl 0,075M) e 20 µL de formaldeído 1%. A suspensão celular foi homogeneizada e novamente centrifugada a 64,4 g por 5 minutos, retirado o sobrenadante e adicionados 3 mL de fixador Carnoy (metanol/ácido acético 3:1) recém preparado. Esta última etapa com fixador foi repetida duas vezes.

Após a fixação, as lâminas foram preparadas e coradas por 5 minutos com Giemsa (Nuclear, CAS: 1810) 5% diluído em tampão fosfato (NaHPO_4 0,06M e KH_2PO_4 0,06M - pH=6,84) a 25°C. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz visível (Nikon Eclipse E200) com aumento de 40x, sendo contadas 1000 células binucleadas por indivíduo, totalizando 3000 células por tratamento, anotando-se a frequência de micronúcleos encontrados.

2.5 Índice de Divisão Nuclear (IDN)

Para a determinação do índice de divisão nuclear (IDN) foram contadas 500 células por indivíduo, totalizando 1500 células por tratamento e anotadas a frequência de células que continham de 1 a 4 núcleos.

O IDN foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker (1989), utilizando-se a fórmula:

$$\text{IDN} = \frac{\mathbf{N1} + 2 (\mathbf{N2}) + 3 (\mathbf{N3}) + 4 (\mathbf{N4})}{\mathbf{N}}$$

onde N_1 - N_4 representam o número de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos, respectivamente e N representa o total de células contadas.

2.6 Análise Estatística

As análises estatísticas dos resultados obtidos no ensaio do Cometa e no ensaio do Micronúcleo foram realizadas por meio do Programa GraphPad InStat (versão 3.05 GraphPad Software, Inc.), utilizando-se o teste de Análise de Variância (One way - ANOVA), seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$). O teste de Tendência Linear foi realizado utilizando-se os valores médios obtidos nos ensaios do cometa (escore), micronúcleo e índice de divisão nuclear.

3 RESULTADOS

3.1 Ensaio do Cometa

A Ciclosporina na concentração de 1200 ng/mL foi genotóxica em linfócitos expostos apenas a 2 horas de tratamento, enquanto que as concentrações de 2400 e 4800 ng/mL induziram danos genotóxicos após 2 e 24 horas de tratamento das células, como demonstrado na Figura 1.

Sobre os valores de escore médio obtidos no ensaio do cometa após 2 e 24 horas de tratamento, foi aplicado o teste estatístico de tendência linear, que indicou uma tendência significativa de aumento dos escores dose-depedente após 2 horas ($F = 10.0598$; $P < 0.0031$) ou 24 horas ($F = 7.1408$; $P < 0.0114$) de exposição à Ciclosporina.

3.2 Ensaio do Micronúcleo e IDN

No ensaio do micronúcleo foi observado que apenas a concentração de 4800 ng/mL de ciclosporina aumentou significativamente a frequência de células micronucleadas. Não foram observadas alterações no índice de proliferação celular nas culturas controles e nas tratadas com diferentes concentrações de ciclosporina, como observado na Tabela 1.

4 DISCUSSÃO

Vários grupos de pesquisa têm estudado os efeitos mutagênicos das drogas imunossupressoras, entre elas a ciclosporina, cujos resultados são bastante contraditórios, o que dificulta o estabelecimento de uma concentração segura para sua utilização (Yuzawa et al., 1986; Oliveira et al., 2004; Rath e Oliveira, 2009).

Tolou-Ghamari e Palizban (2003) determinaram, por radioimunoensaio, a concentração plasmática da ciclosporina em 647 pacientes transplantados renais e obtiveram valores que variaram de 18 ng/mL a 1400 ng/mL. Segundo os autores, os resultados obtidos podem estar relacionados a diferentes fatores, como o tempo após o transplante, idade, alimentação, metabolismo, entre outros. Portanto, é necessário um monitoramento constante para que esta droga seja suficiente para evitar a rejeição do enxerto, mas não atinja concentrações muito elevadas no plasma dos pacientes, evitando, assim, a indução de efeitos adversos, como por exemplo, danos ao DNA.

No presente estudo, das cinco concentrações de ciclosporina avaliadas, as três menores são próximas às observadas por Tolou-Ghamari e Palizban (2003) no sangue dos pacientes e as duas maiores foram avaliadas para se estabelecer uma margem de segurança do uso da droga.

No ensaio do cometa as células foram tratadas com ciclosporina por 2 ou 24 horas, para verificar se o tempo de exposição alteraria o efeito genotóxico desta droga, pois, segundo Albertini et al. (2000), a frequência de danos no DNA em

linfócitos pode diminuir com um maior tempo de exposição devido a processos de reparo do DNA, à renovação celular ou à perda de células fortemente danificadas por meio de apoptose ou necrose. Os dados do presente estudo confirmaram parcialmente esta hipótese, pois somente a concentração de 1200 ng/mL, que se apresentou genotóxica para linfócitos submetidos a duas horas de tratamento mas não às células submetidas a 24 horas de tratamento. Deve-se ressaltar que o emprego do teste estatístico de tendência linear mostrou que a concentração de 1200 ng/mL apresentou uma tendência à genotoxicidade em linfócitos tratados por 24 horas. Desta forma, estudos adicionais serão necessários para verificar se o tratamento de linfócitos humanos *in vitro* com 1200 ng/mL de ciclosporina leva ou não a uma diminuição da genotoxicidade em tempos de exposição maiores. Nos tempos de exposição de 2 e 24 horas, as concentrações de 2400 e 4800 ng/mL foram altamente genotóxicas, mas estas concentrações de ciclosporina não foram detectadas por Tolou-Ghamari e Palizban (2003) no sangue dos pacientes transplantados renais.

O ensaio do cometa avalia danos passíveis de reparo, enquanto o ensaio do micronúcleo determina danos já fixados. Neste trabalho somente a maior concentração de ciclosporina apresentou atividade mutagênica, sugerindo que nas concentrações de 1200 e 2400 ng/mL possa ter ocorrido o reparo e a não fixação do dano genotóxico observado no ensaio do cometa.

Oliveira et al., (2004) observaram tanto em linfócitos humanos de doadores saudáveis tratados com ciclosporina em concentrações clinicamente relevantes (200-400ng/mL) quanto em linfócitos de pacientes transplantados, indução de aberrações cromossômicas e de trocas entre cromátides irmãs (SCEs).

Alguns estudos (Varga et al., 2006; Samanta e Dey, 2010) suportam a hipótese de uma associação entre o aumento na frequência de MN em linfócitos e o desenvolvimento do câncer. Os resultados do projeto HUMN "Human Micronucleus" indicaram que indivíduos com maior frequência de micronúcleos foram mais propensos ao desenvolvimento de câncer (Mateuca et al., 2006).

Esta associação entre frequência de lesões cromossômicas em linfócitos de indivíduos transplantados renais e câncer foi demonstrada por Kelly e Sheil (1983). Os autores observaram que 22% dos receptores de transplante apresentaram elevadas taxas de trocas entre cromátides irmãs, que têm sido observadas em maior frequência nos transplantados que desenvolveram câncer. Em estudo realizado por

Yuzawa et al. (1986), foi observado que a ciclosporina induziu trocas entre cromátides irmãs (SCEs) *in vitro*, em concentrações maiores que 1000 ng/mL.

Oliveira et al. (2004) demonstraram uma relação dose-dependente entre a frequência de micronúcleo em linfócitos humanos de indivíduo saudáveis tratados com ciclosporina nas concentrações de 200 e 400 ng/mL. No entanto, a concentração de 300 ng/mL foi avaliada no presente estudo e não induziu aumento de micronúcleos. O mesmo trabalho citado acima demonstrou maior frequência de micronúcleos nas células dos pacientes transplantados renais submetidos à terapia imunossupressora, quando comparados com culturas de linfócitos de pessoas saudáveis, o que, segundo os autores, indica que, *in vitro*, a ciclosporina tem menor potencial mutagênico do que quando usada clinicamente. Isto remete à possibilidade de seus metabólitos gerados *in vivo* serem mais mutagênicos do que o composto original.

No presente trabalho, quando analisado o índice de divisão nuclear, não foi observada alteração significativa na proliferação dos linfócitos em nenhuma das concentrações de ciclosporina avaliadas (300 a 4800 ng/mL). Estes dados corroboram os de Oliveira et al. (2004), que também observaram proliferação normal de linfócitos de doadores saudáveis tratados *in vitro* com 100, 200, 400 e 2000 ng/mL de ciclosporina. Contrariamente, Yuzawa et al. (1986) observaram em linfócitos de doadores saudáveis, diminuição na proliferação celular em tratamentos empregando as concentrações de 1000 e 5000 ng/mL de ciclosporina.

Uma redução notável do índice de proliferação celular foi observada por Oliveira et al. (2004) em linfócitos de pacientes transplantados em comparação com células de doadores saudáveis tratadas com drogas imunossupressoras. A diferença encontrada por estes pesquisadores para os índices de proliferação celular de linfócitos provenientes de pacientes e controles submetidos à ciclosporina pode ser resultado da exposição crônica dos pacientes ao imunossupressor, pois Rath e Oliveira-Frick (2009) afirma que a capacidade de proliferação celular nos pacientes submetidos à terapia imunossupressora é reduzida após três semanas de imunossupressão.

Portanto, a maior concentração deste imunossupressor é tanto genotóxica quanto mutagênica. No entanto, esses efeitos genotóxicos e mutagênicos provavelmente não apresentarão consequências deletérias para a maior parte dos pacientes que fazem uso destas drogas, pois, normalmente, as concentrações para

as quais se obteve tais resultados não são detectadas no plasma de pacientes sob tratamento com este imunossupressor.

Agradecimentos

Ao Programa PPSUS (Pesquisas para o Sistema Único de Saúde) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pelo suporte financeiro. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de mestrado a H.L.Cilião e de produtividade a I.M.S.Cólus.

REFERÊNCIAS

- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* 463, 111-172.
- Boyum, A. 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, 77-90.
- Countryman, P.I., Heddle, J.A. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 41, 321-332.
- Eastmond, D.A., Tucker, J.D. 1989. Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 13, 34-43.
- Engels, A., Pfeiffer, R.M., Fraumeni, J.F., Kasiske, B.L., Israni, A.K., Snyder, J.J., Wolfe, R.A., Goodrich, N.P., Bayakly, A.R., Clarke, C.A., Copeland, G., Finch, J.L., Fleissner, M.L., Goodman, M.T., Kahn, A., Koch, L., Lynch, C.F., Madeleine, M.M., Pawlish, K., Rao, C., Williams, M.A., Castenson, D., Curry, M., Parsons, R. Fant, G.; Lin, M. 2011. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients, *J. Amer. Med. Assoc.* 306, 1891-1901.
- Fischereder, M. 2008. Cancer in patients on dialysis and renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23, 2457-60.
- Fraile, P., Garcia-Cosmes, P., Martin, V., Garcia-Bernalt, V., Tabernerero, J.M. 2009. Non-skin solid tumors as a cause of morbidity and mortality after liver transplantation. *Transplant Proc.* 4, 2433-4.
- Garcia, S.C., Lopes, L.S., Schott, K.L., Beck, S.T., Pomblum, V.J. 2004. Ciclosporina A e Tacrolimo: uma revisão. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 40, 393-401.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 646-73.

Ilanhez, L.E. 2001. Transplante renal: aspectos clínicos e práticos. Primeira ed. São Paulo, Brazil.

Ilanhez, L.E. 2002. Transplante renal: Seguimento a longo prazo. Primeira ed. São Paulo, Brazil.

Kelly, G.E., Sheil, A.G.R. 1983. Sister chromatid exchange in lymphocytes from renal transplant recipients with and without cancer. *Br. J. Cancer*, 48, 797-801.

Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashy, M., Sofuni, T. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Communication*, 3, 103-15.

Kurtoglu, E.L., Yuksel, S. 2012. Genotoxic Effects of Tacrolimus on human lymphocyte cells. *Hum. Genet.* 48, 651-655.

Manoharan, K., Banerjee, M. R. 1985. b-Carotene reduces sister chromatid exchange induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biol. Int. Rep.* 9, 783-89.

Mateuca, R., Lombaert, P.V., Aka, I., Decordier, M., Kirsch-Volders, M. 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie.* 88, 1515-31.

Oliveira, V.D., Zankl, H., Rath, T. 2004. Mutagenic and cytotoxic effects of immunosuppressive drugs on human lymphocyte culture. *Exp. Clin. Transplant.* 2, 273-9.

Ponticelli, C. 2005. Cyclosporine: from renal transplantation to autoimmune diseases. *Ann. NY Acad. Sci.* 1051, 551-8.

Rath, T., Oliveira-Frick, V. 2009. Mutagenicity of immunosuppressive medications among renal transplant recipients. *Am. J. Nephrol.* 30, 514-420.

Samanta, S., Dey, P. Micronucleus and its applications. 2010. *Diagn Cytopathol.* 40, 84-90.

Sasaki, Y. F., Nakamura, T., Kawaguchi, S. What is better experimental design for in vitro comet assay to detect chemical genotoxicity? *Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences*, p. 499-504, 2007.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-91.

Tolou-Ghamari, Z., Palizban, A.A. 2003. Laboratory monitoring of Cyclosporine pre-dose concentration (C0) after kidney transplantation in Isfahan. *Isr. J. Med. Sci.* 28, 81-5.

Vajdic, C.M., Leeuwen, M.T. 2009. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int. J. Cancer.* 125, 1747-54.

Varga, D., Hoegel, J., Maier, C., Jainta, S., Hoehne, M., Patino-Garcia, B., Michel, I., Schwarz-Boeger, U., Kiechle, M., Kreienberg, R., Vogel, W. 2006. On the difference of micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes between breast cancer patients and controls. *Mutagenesis.* 21, 313-320.

Yuzawa, K., Kondo, I., Fukao, K., Iwasaki, Y., Hamauchi, H. 1986. Mutagenicity of Cyclosporine. induction of sister chromatid exchange in human cells. *Transplant.* 42, 61-3.

Zuuren, E.J.Z., Visscher, J.G.A.M., Bavinck, J.N.B. 1998. Carcinoma of the lip in kidney transplant recipients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 38, 497-9.

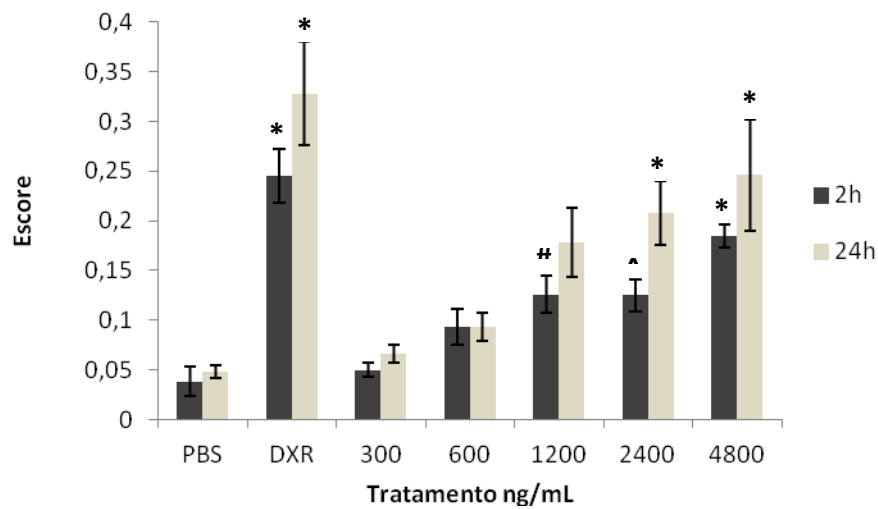
Legendas das Figuras

Figura 1 – Médias dos escores obtidos no ensaio do cometa realizado em linfócitos humanos de seis indivíduos expostos a 2 ou 24 horas de tratamento com cinco diferentes concentrações de ciclosporina.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Frequência de micronúcleos (MN) e índice de divisão nuclear (IDN) observados em linfócitos humanos de 3 indivíduos tratados *in vitro* com ciclosporina por 48 horas.

Figura 1



PBS: *phosphate saline buffer*. DXR: Doxorubicina

Valores estatisticamente diferentes do controle negativo, ^($p < 0,05$), #($p < 0,01$), *($p < 0,001$). Os dados representam média \pm erro padrão.

Tabela 1

X±SD= média ± desvio padrão; PBS (*phosphate saline buffer*) = controle negativo.

Tratamentos (em cultura)	Frequência de MN (1000 células/ indivíduo)				IDN (500 células/ indivíduo)			
	Indivíduos				Indivíduos			
	I	II	III	X±SD	I	II	III	X±SD
PBS	04	05	05	4,66±0,57	1,633	1,540	1,410	1,527±0,11
bleomicina (15 µg/mL)	41	45	47	44,33±3,05***	1,190	1,204	1,100	1,164±0,05**
ciclosporina (ng/mL)								
300	05	10	10	8,33±2,88	1,678	1,380	1,464	1,507±0,15
600	04	13	12	9,66±4,93	1,633	1,360	1,484	1,492±0,13
1200	07	09	12	9,33±2,51	1,570	1,430	1,406	1,468±0,08
2400	08	08	14	10,0±3,46	1,418	1,312	1,406	1,378±0,05
4800	12	13	15	13,3±1,52*	1,384	1,250	1,304	1,312±0,06

Valores estatisticamente diferentes do controle negativo *(p<0,05), ***(p<0,01) ***(p<0,001).

5 ARTIGO**Efeitos citotóxicos e genotóxicos dos imunossupressores ciclosporina e tacrolimo em fibroblastos humanos *in vitro***

Cilião, H.L.^a, Ribeiro, D.L.^a, Serpeloni, J.M.^b, Oliveira, M. T. ^a, Cólus, I.M.S^a.

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina

^b Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

Revista a ser submetido: Mutagenesis

Fator de Impacto – 3.183

Correspondência para:

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

Laboratório de Mutagênese e Oncogenética – Departamento de Biologia Geral,
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, Paraná, Brasil

CEP: 86.057-970

Telefone: 3371-4608

e-mail: colus@sercomtel.com.br

Palavras chave: ciclosporina, tacrolimo, células MRC-5, ensaio do cometa, ensaio MTT, ensaio do micronúcleo.

RESUMO

O presente trabalho avaliou os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos medicamentos imunossupressores ciclosporina e tacrolimo sobre fibroblastos humanos normais (células MRC-5), expostos às concentrações comumente observadas no plasma dos pacientes transplantados renais. Para isso foi realizado um levantamento das concentrações plasmáticas destes imunossupressores nos prontuários de pacientes transplantados renais do Instituto do Rim de Londrina-PR / Brasil. A partir destes dados foram escolhidas 11 concentrações de cada imunossupressor para avaliar a viabilidade celular usando o ensaio do MTT. Baseados nestes resultados foram escolhidas as concentrações de 135, 300, 675 e 1520 ng/mL de ciclosporina e de 8; 16; 24; 32 ng/mL de tacrolimo para a realização do ensaio do cometa, índice de divisão nuclear (IDN), teste do micronúcleo (MN) e curva de proliferação celular. A ciclosporina diminuiu a viabilidade celular a partir de 48 horas de exposição das células MRC-5 às concentrações de 1520 a 3420 ng/mL; apresentou efeito genotóxico na concentração de 1520 ng/mL após 3 horas de exposição e nas concentrações de 675 e 1520 ng/mL após 24 horas de exposição; induziu mutagenicidade na concentração de 1520 ng/mL após 24 horas de exposição. O tacrolimo apresentou diminuição da viabilidade celular a partir de 72 horas de exposição às concentrações de 20 a 36 ng/mL; atividade genotóxica nas concentrações de 16 a 32 ng/mL em ambos os tempos de tratamento; e efeito mutagênico nas concentrações de 24 e 32 ng/mL. As curvas de proliferação demonstraram que estes medicamentos não apresentaram efeito citostático, dados estes confirmados pelos IDN obtidos. Estes resultados sugerem que as concentrações menores que 300 ng/mL de ciclosporina e de 16 ng/mL de tacrolimo são mais seguras para o uso, já que não induziram danos genotóxicos, mutagênicos e não interferiram na viabilidade e proliferação celular.

1. INTRODUÇÃO

A terapia imunossupressora é amplamente utilizada por pacientes transplantados com a finalidade de evitar a rejeição de órgãos sólidos (1) e por pacientes com doenças auto-imune (2), melhorando, desta forma, a sobrevida destes pacientes.

Embora os imunossupressores sejam fundamentais para diminuir a taxa de rejeição nos transplantados e aumentar a sobrevida do enxerto, a longo prazo eles diminuem a sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes, por apresentarem forte toxicidade para as células (3).

Os efeitos adversos causados por estes medicamentos são mais preocupantes nos transplantados do que nos pacientes com doenças auto-imunes, pois estes, além de fazerem uso de concentrações menores, podem interromper o tratamento e retornar após intervalos adequados (4), o que não é possível para os transplantados.

Dentre os medicamentos imunossupressores utilizados pelos pacientes transplantados, encontram-se a ciclosporina e o tacrolimo, que possuem potente atividade imunossupressora e semelhante mecanismo de ação. Estes medicamentos agem como imunoreguladores no bloqueio da proliferação de linfócitos T. A ciclosporina se complexa com ciclofilinas enquanto o tacrolimo se liga às imunofilinas-FKBPs, e ambos agem inibindo a transdução das calcineurinas fosfatases (5). A inibição da atividade de fosfatase da calcineurina impede a desfosforilação do fator nuclear de células T ativadas (NFAT), resultando na diminuição da transcrição de genes dependentes de NFAT (6, 7), dentre eles as interleucinas, importantes para a ativação da resposta imunológica.

Devido à diferença na estrutura entre estes dois medicamentos, o tacrolimo possui maior ação imunossupressora, potencializando a ação de glicocorticóides e progesterona, por se ligar a receptores que inibem a degradação destes (8, 9). Ambos os medicamentos possuem uma estreita relação entre as doses terapêutica e tóxica; assim, as concentrações plasmáticas dos pacientes que fazem uso destes, precisam ser periodicamente monitoradas (10, 11).

Pacientes transplantados apresentam diferentes efeitos adversos em decorrência do uso destes medicamentos, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade,

distúrbios gastrointestinais, aumento do colesterol e triglicerídeos, resistência periférica à insulina no diabetes *mellitus*, entre outros (4, 11, 12). No entanto, os efeitos adversos causados pelo tacrolimo parecem ser menores que os causados pela ciclosporina. Pratschike et al.(13) demonstraram redução dos efeitos adversos em 84% dos pacientes transplantados após a substituição pelo período de 3 meses do imunossupressor ciclosporina pelo tacrolimo, com estabilização da função do enxerto, além de redução da nefrotoxicidade, hipertensão, neurotoxicidade e diminuição das concentrações de creatinina e triglicerídeos.

De modo geral, os medicamentos imunossupressores também levam a um aumento da suscetibilidade a infecção e ao surgimento de neoplasias (14). A suscetibilidade a infecções é decorrente da diminuição da imunidade, assim como a maior incidência de câncer, pois a diminuição da vigilância imune dificulta o reconhecimento e eliminação de células cancerosas (15). Lesões no material genético induzidas pelos imunossupressores, assim como a diminuição da atividade do sistema de reparo, também podem aumentar a suscetibilidade às infecções e ao câncer. Alguns cânceres também têm sido associados às infecções virais (16). Diante do exposto, os pacientes transplantados são considerados indivíduos com alto risco para o desenvolvimento de câncer, doença que apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade (17). Segundo Wisgerhof et al. (18), estima-se que, após 30 anos de imunossupressão, 50% dos pacientes transplantados renais irão desenvolver pelo menos um tipo de câncer.

Diante dos efeitos adversos apresentados pelos pacientes que fazem uso constante destes medicamentos imunossupressores pretende-se com este trabalho investigar os possíveis efeitos, citotóxicos, genotóxico e mutagênico da ciclosporina e do tacrolimo sobre células humanas normais, a fim de contribuir para a escolha de doses adequadas e que apresentem menos efeitos adversos e, conseqüentemente, menor risco para surgimento de neoplasias.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Condições de cultura e delineamento experimental

As células MRC-5 (fibroblasto pulmonar de feto humano normal) foram cultivadas em estufa B.O.D. a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂, em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com glicose (CAS: 12100-038, Gibco), suplementado com 15% de soro bovino fetal e 1% de penicilina (CAS: 113-98-4,

Sigma-Aldrich - St. Louis- USA) e estreptomicina (CAS: 3810-74-0, Sigma-Aldrich - St. Louis- USA), em frascos de polietileno para cultura celular de 25cm² (TPP). Para a realização dos experimentos as células foram utilizadas entre a 3^a e 8^a passagem após o descongelamento.

As concentrações de ciclosporina e tacrolimo utilizadas neste trabalho foram selecionadas a partir de levantamento das concentrações plasmáticas dosadas por radioimunoensaio em 567 pacientes transplantados renais do Instituto do Rim de Londrina (PR - Brasil) e obtidas por meio da análise de prontuários (Tabela 1).

Foram selecionadas 11 concentrações de cada medicamento para a realização do ensaio do MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico). A ciclosporina (SANDIMMUN®, Novartis Farma - CAS 59865-13-3) foi avaliada nas concentrações de 60; 90; 135; 200; 300; 450; 675; 1100; 1520; 2280 ou 3420 ng/mL e o tacrolimo (CAS: 109581-93-3 Sigma-Aldrich – St. Louis- USA) nas concentrações de 1; 2; 4; 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32 ou 36 ng/mL. O ensaio do MTT foi realizado em cinco diferentes tempos de tratamento (24, 48, 72, 96 ou 120 horas). Os resultados obtidos após 24 horas de exposição das células aos medicamentos imunossupressores foram utilizados para escolher as concentrações que não diminuem a viabilidade celular, para a realização dos ensaios posteriores. Os maiores tempos de exposição foram empregados a fim de simular a exposição contínua do paciente às drogas em tratamentos sub-agudos.

A partir dos resultados obtidos foram selecionadas quatro concentrações de ciclosporina (135, 300, 675 e 1520 ng/mL) e do tacrolimo (8, 16, 24 e 32 ng/mL) para a realização do ensaio do cometa, micronúcleo, índice de proliferação celular e apoptose. Para a análise da curva de proliferação foram utilizadas 3 concentrações de cada medicamento: 135, 300 e 675 ng/mL de ciclosporina e 8, 16 e 24 ng/mL de tacrolimo.

Os experimentos com os dois imunossupressores foram realizados de maneira independente, sendo todos os tratamentos realizados em triplicata. Como controle negativo foi utilizada solução salina tamponada com fosfato (PBS) e como agente indutor de danos foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina (DXR - CAS: 25316-40-9, Sigma-Aldrich - St. Louis- USA) na concentração de 750 ng/mL para os ensaios do cometa, curva de proliferação celular e a concentração de 100 ng/mL foi utilizada nos ensaios do micronúcleo e índice de divisão nuclear.

2.2 Ensaio de viabilidade celular– MTT

O ensaio do MTT foi realizado seguindo o protocolo descrito por Mosmann (19). Foram semeadas 10^4 células por poço, em placas de cultura de 96 poços, que permaneceram incubadas para estabilização com meio de cultura completo por 24 horas.

Após este período o meio de cultura foi retirado e foram adicionados os tratamentos em meio sem soro bovino fetal por 24, 48, 72, 96 ou 120 horas. Cada tratamento foi realizado em 7 replicatas. Decorrido o período de tratamento as células foram lavadas com PBS e incubadas com solução de MTT - CAS: 298-93-1 Sigma-Aldrich - St. Louis- USA) na concentração final de 5 mg/mL em cultura, por 4 horas a 37°C.

Após a retirada da solução de MTT foram adicionados 200µL de DMSO (Dimetilsulfóxido – CAS: 67-68-5 Invitrogen), e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Uniscience) a 550 nm.

Este ensaio também foi realizado com doxorrubicina - DXR (Adriamycin, CAS: 2314-92-8) em diferentes concentrações: 48,8; 97,6; 195,3; 390,6; 781,2; 1562,5; 3125; 6250; 12500; 25000; 50000 ng/mL, em tratamentos de 24 horas em meio sem soro bovino fetal, a fim de determinar uma concentração não citotóxica deste composto para ser utilizada nos ensaios posteriores.

2.3 Curva de proliferação celular

Aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células foram semeadas por poço em placa de cultura de 24 poços contendo 2 mL de meio de cultura completo, sendo realizados tratamentos com os imunossupressores, além dos controles positivo (doxorrubicina – 750 ng/mL) e negativo (PBS). Após o tempo de cultivo de 24, 48, 72, 96 ou 120 horas, as células foram tripsinizadas e contadas na Câmara de Neubauer.

Além da construção da curva de proliferação celular por meio da contagem de células, uma nova curva foi feita, baseada na determinação da quantidade de proteínas totais conforme proposto por Lopes et al. (20). Após a retirada de uma alíquota (20 µL) para a contagem das células, as placas foram novamente incubadas por 90 minutos para a adesão celular. Após este período as proteínas foram extraídas com ácido tricloroacético (TCA) 5% durante 15 minutos e coradas por 30

minutos com azul de bromofenol 1% diluído em ácido acético 1%. As células aderidas na placa foram lavadas três vezes com água destilada, para remover o excesso de corante e as células não viáveis. A placa foi vertida em papel absorvente para secagem e em seguida foram adicionados 400 µL de Tris base (10 mM) para extração da cor. A solução de Tris foi transferida para uma placa de 96 poços para a determinação da absorbância a 550 nm em espectrofotômetro (Uniscience).

2.4 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado seguindo o protocolo descrito por Singh et al. (21). Aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células foram semeadas por poço, em placas de 24 poços, e estabilizadas por 24 horas com meio completo. Após este período as células foram tratadas com os imunossupressores por 3 ou 24 horas em meio sem soro, tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 64,4 g. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

Desta suspensão celular foram retiradas duas alíquotas, uma para avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de exclusão com Azul de Tripán e outra para a realização do ensaio do cometa.

Para avaliar a citotoxicidade 10 µL da suspensão celular foram homogeneizados com 10 µL da solução de Azul de Tripán (CAS: 72-571, Acros) na concentração de 0,04% e realizada a contagem de 200 células por tratamento, calculando-se a porcentagem de células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas em azul), conforme recomendado por Barile (22).

Para a realização do ensaio do Cometa, 20 µL da suspensão celular foram homogeneizados com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (*low melting point* – LMP) e aplicada em lâminas pré preparadas com uma camada de agarose normal 1,5% (*normal melting poin* - NMP). As lâminas foram colocadas em solução de lise alcalina (2,5 M NaCl; 100 mM ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA); 10 mM Tris; 10% DMSO; 1% Triton X-100, pH 10) a 4°C por 90 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas por 20 minutos em tampão de eletroforese (0,3 M NaCl; 1 mM EDTA, pH 13) (4°C) para a desnaturação e então submetidas à eletroforese (0,78V/cm; 300mA) por igual período. Após a corrida as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 M; pH 7,5) por 5 minutos, repetindo-se três vezes esta etapa, e fixadas em álcool etílico por 5 minutos. As lâminas foram conservadas a 4°C e, antes da análise, foram coradas individualmente com 45 µL de Gelred™ (CAS:76544-02-0,

Biotium) 10000 X diluído em solução de NaCl 0,1M para a obtenção de uma concentração final de 30 X e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon), com filtro de excitação de 450-490nm e filtro de emissão (barreira) de 515 nm, em objetiva de 40x.

O critério utilizado para a quantificação dos danos no DNA foi baseado em observações visuais do tamanho da cauda em relação ao nucleóide segundo Kokayashi et al. (23), sendo atribuído um valor numérico para cada classe de migração, que variou de classe 0 para nucleóides com ausência de danos a classe 3 com dano máximo. A frequência de células danificadas foi calculada pela somatória do número de células com dano (classe 1 a 3) dividido pelo total de células contadas. O escore total foi calculado para cada tratamento de acordo com (24), multiplicando-se o número de nucleóides observados em cada classe, representado na fórmula por n, pelo valor da classe correspondente (0, 1, 2, 3).

$$\text{Escore} = \frac{(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)}{100}$$

$$\text{Frequência de Danos} = \frac{n_1 + n_2 + n_3}{100}$$

2.5 Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN)

O protocolo utilizado para o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese se baseou no descrito por Fenech e Morley (25).

Foram semeadas 10^6 células da linhagem MRC-5 em frascos de cultura de 25 cm³, incubadas para estabilização por 24 horas em meio completo. Ao final da estabilização o meio foi substituído por meio sem soro e as células foram expostas por 24 horas a quatro diferentes concentrações de cada imunossupressor, PBS como controle negativo e doxorubicina (100 ng/mL) como controle positivo. Após este período o meio sem soro bovino fetal foi substituído por meio completo e adicionada citocalasina B (CAS: 14930-96-2, Acros) na concentração de 4,5 µg/mL por 30 horas. Ao término deste período as culturas foram lavadas com PBS, tripsinizadas (500 µL a 0,0625% Trypsin-EDTA - Gibco) e as suspensões celulares foram centrifugadas a 64,4g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e

adicionados ao sedimento celular 1,5 mL de solução hipotônica (citrato de sódio 1%) a 37 °C e incubado por 12 minutos com subsequente adição de 25 µL de formol 5%.

As culturas foram novamente centrifugadas a 64,4g por 5 minutos e a fixação das células foi realizada com 3 mL de fixador Carnoy (metanol/ácido acético 3:1) recém preparado e repetida esta última etapa por mais 2 vezes.

Após a fixação, as lâminas foram preparadas e coradas com corante Giemsa (Merck®) 5 % diluído em tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,06M e KH_2PO_4 0,06M – pH 6,8), por 8 minutos, lavadas com água destilada e secas a 25 °C. A análise das lâminas foi realizada em microscopia de luz visível (Nikon Eclipse E200), com objetiva de 40X, sendo analisadas por tratamento 3000 células binucleadas com citoplasma íntegro, seguindo-se os critérios descritos por Fenech (26).

2.6 Índice de divisão nuclear (IDN)

Foram analisadas 500 células com citoplasma preservado em cada repetição experimental, utilizando-se microscópio de luz visível (Nikon Eclipse E200), com aumento de 40X, sendo anotados os números de células que continham 1, 2, 3 ou 4 núcleos. O IDN foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker (27):

$$\text{IDN} = \frac{M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4)}{N}$$

Onde: M1 a M4 = número de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos, respectivamente. N = número total de células contadas (500).

2.7 Análise estatística

Para os dados obtidos no ensaio do MTT foram utilizados os testes não-paramétricos Kruskal-Wallis/Dunn ($p \leq 0,05$). Para os dados obtidos nos ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade foram utilizados os testes paramétricos ANOVA seguido do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O teste de Tendência Linear foi realizado utilizando-se os valores médios obtidos nos ensaios do cometa (score), micronúcleo e índice de divisão nuclear. As análises foram realizadas por meio do Programa GraphPad InStat (versão 3.05 GraphPad Software, Inc.).

3. RESULTADOS

3.1 Levantamento das concentrações plasmáticas

A partir de levantamentos efetuados das concentrações plasmáticas dos imunossupressores em pacientes transplantados do Instituto do Rim de Londrina (PR – Brasil), estas concentrações foram classificadas em 4 grupos, como demonstrado na Tabela 2. Foi observado que, embora as concentrações destes medicamentos no plasma dos pacientes transplantados sejam extremamente variadas, na maioria dos pacientes são detectadas as menores concentrações plasmáticas de ambas as drogas.

3.2 Ensaio de citotoxicidade

Como demonstrado na Figura 1, houve uma diminuição da viabilidade das células MRC-5 expostas às maiores concentrações (1520, 2280 e 3420 ng/mL) de ciclosporina (Figura 1A) a partir de 48 horas de exposição e às concentrações iguais ou maiores a 20 ng/mL de tacrolimo (Figura 1B) a partir de 72 horas de exposição.

No ensaio do MTT realizado com a doxorubicina (Figura 2) nenhuma das concentrações testadas apresentou atividade citotóxica. Desta forma, a concentração de 750 ng/mL foi escolhida para realização dos experimentos posteriores, exceto no ensaio do micronúcleo, onde foi utilizada a concentração de 100 ng/mL devido à ação citostática apresentada pela doxorubicina na concentração de 750 ng/mL sobre as células MRC-5 (Figura 3).

3.3 Curva de proliferação celular

A Figura 3 mostra as curvas de crescimento por número de células (Figura 3A) e quantidade de proteínas totais (Figura 3B) obtidas após tratamento das células MRC-5 com três diferentes concentrações de ciclosporina (135, 300 e 675 ng/mL) e tacrolimo (8, 16, 24 ng/mL) e respectivos controles positivo (DXR) e negativo (PBS).

A realização das curvas de proliferação celular tanto pela contagem do número de células quanto pela quantidade de proteínas totais demonstrou que as concentrações dos imunossupressores avaliadas não causaram citotoxicidade e não inibiram o crescimento celular, em nenhum dos tempos de tratamento.

3.4 Ensaio do Cometa

Apenas a maior concentração de ciclosporina (1520 ng/mL) avaliada em células MRC-5 por 3 horas apresentou atividade genotóxica, com escore estatisticamente semelhante ao observado para o agente indutor de danos, a doxorrubicina. Efeito genotóxico também foi observado quando as células foram expostas por 24 horas às concentrações de ciclosporina de 675 e 1520 ng/mL sendo o escore obtido com o tratamento com 1520 ng/mL novamente semelhante ao controle positivo (Tabela 3). Foi observada ainda uma tendência significativa de aumento dos escores médios obtidos, sendo este aumento dose-dependente, tanto no tratamento de 3 horas ($F = 48,9554$; $P < 0,0001$) quanto no de 24 horas ($F = 69,1518$; $P < 0,0001$).

A exposição das células MRC-5 ao tacrolimo em ambos os tempos de tratamento demonstrou que as concentrações de 16, 24 e 32 ng/mL apresentaram atividade genotóxica (Tabela 3). Os valores de escore médio obtidos neste ensaio mostraram uma tendência significativa de aumento dose-dependente, no tratamento de 3 horas ($F = 51.8299$; $P = 0,0001$) e de 24 horas ($F = 12.0460$; $P = 0,0046$).

No ensaio de exclusão com azul de tripan, realizado concomitantemente ao ensaio do cometa, foi observada viabilidade celular superior a 90% nas células MRC-5 tratadas com diferentes concentrações dos imunossupressores e também para os grupos controle em ambos os tempos de tratamentos.

3.5 Ensaio do Micronúcleo e Índice de Divisão Nuclear

Apenas a maior concentração de ciclosporina (1520 ng/mL) aumentou significativamente a frequência de micronúcleos em relação ao controle negativo, enquanto que as células tratadas com tacrolimo apresentaram efeitos mutagênicos nas duas maiores concentrações avaliadas (24 e 32 ng/mL). Estes resultados indicaram uma tendência linear estatisticamente significativa de dose-resposta no tratamento com ciclosporina ($F = 37.5037$; $P < 0,001$) e no tratamento com o tacrolimo ($F = 53.5808$; $P < 0,0004$).

Os dados obtidos pelo índice de divisão nuclear (IDN) indicaram que, tanto os imunossupressores estudados, quanto a DXR, não promoveram alterações na proliferação celular em nenhuma das concentrações avaliadas, conforme demonstrado na Tabela 5.

4. DISCUSSÃO

Os pacientes pós-transplante fazem uso de medicamentos imunossupressores para diminuir a resposta do sistema imunológico. Entretanto, é observada uma grande variação das concentrações destes medicamentos no plasma destes indivíduos atribuída a diferenças interindividuais na absorção dos mesmos. O tempo de transplante também interfere nas concentrações plasmáticas, pois, logo após a realização deste, o paciente geralmente faz uso de uma quantidade maior de imunossupressores. Com o passar do tempo as concentrações plasmáticas são diminuídas de acordo com a resposta do paciente com o objetivo de serem mantidas as menores concentrações do medicamento capazes de evitar a rejeição e de minimizar os efeitos adversos (28).

Como esses medicamentos são considerados “drogas de dose crítica”, ou seja, em baixas concentrações podem não ser suficientes para inibir a rejeição, enquanto que em concentrações elevadas resultam em efeitos tóxicos, se faz necessário um monitoramento constante de suas concentrações plasmáticas (8), com o objetivo de manter as menores concentrações associadas ao estado clínico desejado, individualizando a posologia dos pacientes e otimizando a resposta farmacológica (29).

No presente estudo o ensaio do MTT foi realizado com o intuito de escolher as concentrações a serem utilizadas nos ensaios subsequentes com as células MRC-5. Estas foram tratadas com 11 diferentes concentrações de cada um dos medicamentos imunossupressores por 24 horas. No entanto, além deste tempo tradicionalmente empregado para a avaliação da viabilidade celular, as células também foram submetidas a tratamentos de 48, 72, 96 e 120 horas, com o objetivo de se avaliar o potencial citotóxico das drogas em maiores tempos de exposição, já que estes medicamentos são utilizados de forma crônica na terapêutica. O que se observou foi uma redução significativa da viabilidade celular a partir de 48 horas de tratamento com as três maiores concentrações de ciclosporina e a partir de 72 horas com as cinco maiores concentrações de tacrolimo. Em ambos os casos as concentrações não haviam sido citotóxicas no tratamento de 24 horas. Portanto, tais efeitos citotóxicos não teriam sido detectados se tivéssemos empregado apenas os tempos convencionais de 3 e 24 horas de tratamento. A realização do MTT com maiores tempos de exposição aos medicamentos imunossupressores também nos permitiu demonstrar uma relação dose-tempo-dependente, já que maiores tempos

de exposição resultaram em diminuição da viabilidade celular nas maiores concentrações avaliadas.

No ensaio de exclusão por azul de tripan, realizado previamente ao ensaio do cometa, foi observado que, após 3 e 24 horas de exposição das células MRC-5 à ciclosporina e ao tacrolimo, a viabilidade celular foi superior a 90%. Segundo a OECD Guideline 487 (30), neste ensaio a viabilidade celular tem de ser superior a 80%, pois uma elevada citotoxicidade pode induzir resultados que não refletem com precisão a genotoxicidade induzida pelo composto avaliado.

A realização das curvas de proliferação celular confirmou que as concentrações avaliadas realmente não causaram citotoxicidade e não inibiram o crescimento celular. Porém, observamos que a DXR (controle positivo), embora não tenha apresentado efeito citotóxico no ensaio do MTT e no teste de viabilidade pelo azul de tripan, apresentou um efeito citostático na concentração de 750 ng/mL, já que não permitiu o aumento do número de células e da concentração de proteínas totais na curva de crescimento.

Devido a este efeito citostático apresentado pela doxorrubicina sobre as células MRC-5, utilizamos concentrações menores para a realização do ensaio do micronúcleo, já que este ensaio é dependente de divisão celular. Assim, as concentrações de 500, 250 e 100 ng/mL foram testadas, sendo observado que na concentração de 100 ng/mL, a doxorrubicina, permitiu a divisão celular e induziu danos no DNA.

As células MRC-5 quando avaliadas pelo ensaio de genotoxicidade demonstraram uma maior sensibilidade à ação dos imunossupressores do que quando avaliadas pelo ensaio do micronúcleo. Como os danos no DNA observados no ensaio do cometa são passíveis de reparo (31), possivelmente os danos causados pelas menores concentrações dos imunossupressores foram reparados e não resultaram na formação de micronúcleos.

Nossos resultados sobre a mutagenicidade da ciclosporina não corroboram o trabalho realizado por Oliveira et al. (1), que avaliaram os efeitos mutagênico e citotóxico da ciclosporina nas concentrações de 100 a 2000 ng/mL. Os autores observaram aumento significativo da frequência de MN nas culturas tratadas com concentrações entre 200 e 400 ng/mL, enquanto que no presente trabalho a indução de micronúcleos pela ciclosporina foi observada apenas na concentração de 1520 ng/mL. No entanto, o presente estudo confirmou os dados obtidos por estes mesmo

autores no teste de IDN em que não foram encontradas diferenças entre os valores dos grupos tratados com imunossuppressores e do grupo controle negativo.

O efeito mutagênico do tacrolimo nas concentrações de 24 e 32 ng/mL observado no presente estudo em células MRC-5 corrobora os achados de Oliveira et al.(1) e Kurtoglu e Yuksel (32) em estudos com linfócitos humanos. Estes autores ainda descreveram efeito mutagênico de concentrações maiores de tacrolimo (40, 50 e 100 ng/mL). Deve-se ressaltar que tais concentrações não foram avaliadas no presente estudo por não terem sido detectadas no plasma dos pacientes entrevistados. Os estudos acima citados obtiveram, ainda, resultados positivos no teste do micronúcleo para as concentrações de 5 e 10 ng/mL, dados estes não confirmados no presente estudo, já que as concentrações de 8 e 16 ng/mL não induziram micronúcleos nas células MRC-5. Estes resultados distintos podem ser decorrentes da utilização de diferentes tipos celulares como sistema teste.

Sob as condições do presente estudo observamos que as maiores concentrações de ciclosporina (675 e 1520 ng/mL) observadas no plasma de cerca de 10% dos pacientes transplantados renais, e as concentrações de tacrolimo de 16, 24 e 32 ng/mL, observadas em 12% dos pacientes, apresentaram efeitos genotóxicos e mutagênicos em células humanas normais (MRC-5), o que pode contribuir para a maior incidência de câncer nestes pacientes após longo período de imunossupressão.

Dados sobre o índice de divisão nuclear de células tratadas com tacrolimo são contraditórios. Oliveira et al. (1) não observaram alterações significativas no IDN de linfócitos submetidos a tratamento com concentrações de 5 a 40 ng/mL de tacrolimo, enquanto Kurtoglu e Yuksel (32) observaram diminuição deste parâmetro nas células submetidas a concentrações de 25 a 100 ng/mL. Nossos resultados corroboram os achados de Oliveira et al. (1), pois não foi observada atividade citotóxica do tacrolimo sobre células MRC-5 no teste do IDN. Os resultados da curva de proliferação (Figura 2) reforçam este dado, pois a proliferação das células MRC-5 não foi alterada com a exposição ao tacrolimo.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram a ação dos imunossuppressores ciclosporina e tacrolimo em outros tipos celulares humanos *in vitro*. No entanto, a investigação dos possíveis potenciais genotóxicos e mutagênicos sobre outros tipos celulares é fundamental, já que estes medicamentos são dispersos pela corrente sanguínea e entram em contato com diferentes tipos

celulares. Assim, o conhecimento dos efeitos destes medicamentos sobre outras células se faz necessário, já que há uma maior incidência de câncer de pulmão, cólon, próstata, estômago, pâncreas, ovário, mama, testículo, bexiga, rim, pele, tumores cervicais e vulvovaginal nos indivíduos transplantados em comparação com a população em geral (16).

Os resultados do presente estudo sugerem que os imunossupressores sejam administrados aos pacientes transplantados nas menores concentrações possíveis e mantidos em concentrações plasmáticas menores que 300 ng/mL de ciclosporina e 8 ng/mL de tacrolimo, de modo a manter o estado clínico desejado sem acarretar acúmulo de mutações e possível surgimento de neoplasias.

Agradecimentos

Ao Programa PPSUS (Pesquisas para o Sistema Único de Saúde) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pelo suporte financeiro. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de mestrado a H.L.Cilião e de produtividade a I.M.S.Cólus. Ao Instituto do Rim de Londrina pelo apoio e parceria. À Prof^a. Dr^a. E. N. Itano do laboratório de Imunologia Aplicada da UEL pelo empréstimo do aparelho de espectrofotômetro.

Referência Bibliográfica

1. Oliveira, V.D., Zankl, H.; Rath, T. (2004) Mutagenic and cytotoxic effects of immunosuppressive drugs on human lymphocyte culture. *Experimental and Clinical Transplantation*, 2, 273-279.
2. Yocum, D.E. (1996) Cyclosporine, FK-506, rapamycin, and other immunomodulators. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 22, 133-153.
3. Xiao, Z., Li, C., Shan, J., Luo, L., Feng, L., Lu, J.U.N., Li, S., Long, D., Li, S. (2011) Mechanisms of renal cell apoptosis induced Cyclosporine A: A systematic review of *in vitro* studies. *American Journal of Nephrology*, 33, 558-566.
4. Ponticelli, C. (2005) Cyclosporine: from renal transplantation to autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy Sciences*, 1051, 551-558.
5. Brazelton, T.R., Morris, R.E. (1996) Molecular mechanism of action of new xenobiotic immunosuppressive drugs: Tacrolimus (FK-506), sirolimus (rapamycin), mycophenolate mofetil and leftumide. *Transplantation*, 8, 710-720.

6. Matsuda, S., Koyasu, S. (2000) Mechanisms of action of cyclosporine - Review. *Immunopharmacology*, 47, 119-125.
7. Oekjen, E., Baun, D., Beimesche, S., Krause, D., Cierny, I., Blume, R., Dickel, C., Wehner, S., Knepel, W. (2003) Inhibition of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs Cyclosporin A and Tacrolimus in primary, mature islets of transgenic mice. *Molecular Pharmacology*, 63, 1289-1295.
8. Peters, D.H., Fitton, A., Plosker, G.L., Faulds, D. (1993) Tacrolimus: A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs*, 46, 746-794.
9. Thonson, A.W., Bonham, C.A., Zeevi, A. (1995) Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Therapeutic Drug Monitoring*, 17, 584-591.
10. Plosker, G.L., Foster, R.H. (2000) Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs*, 59, 323-389.
11. Tse, K.C., Chan, T.M. (2002) Nephrotoxicity of immunosuppressives agents in renal transplantation. *Hong Kong Journal of Nephrology*, 4, 65-72.
12. Fraile, P., Garcia-Cosmes, P., Martin, V., Garcia-Bernalt, V., Tabernero, J.M. (2009) Non-skin solid tumors as a cause of morbidity and mortality after liver transplantation. *Transplantation Proceedings*, 4, 2433-2434.
13. Pratschike, J., Neuhaus, R., Tullius, S.G., Haller, G.W., Jonas, S., Steinmueller, T., Bechstein, W.O., Neuhaus, P. (1997) Treatment of cyclosporine-related adverse effects by conversion to Tacrolimus after liver transplantation. *Transplantation*, 64, 938-940.
14. Reichenspumer, H. (2005) Overview of Tacrolimus-based immunosuppression after heart or lung transplantation. *Journal Heart Lung Transplantation*, 24, 119-30.
15. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674.
16. Kasiske, B.L., Gilbertson, D.T., Wang, C. (2004) Cancer after kidney transplantation in the United States. *American Journal of Transplantation*, 4, 905-913.
17. Vasudev, B., Hariharan, S. (2007) Cancer after renal transplantation. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 16, 523-528.
18. Wisgerhof, H.C., Geest, L.G.M., Fijter, J.W.; Haasnoot, G.W., Claas, F.H.J., Cessie, S., Willemze, R., Bavinck, J.N.B. (2011) Incidence of cancer in kidney-transplant recipients: A long-term cohort study in a single center. *Cancer Epidemiology*, 35, 105-111.

19. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
20. Lopes, L.C., Albano, F., Laranja, G.A.T., Alves, L.M., Silva, L.F.M., Souza, G.P., Araujo, I.M., Nogueira-Neto, J.N., Felzenszwalb, I., Kovary, K. (2000) Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. *Toxicology Letters*, 116, 189-198.
21. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damaged individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
22. Barile, F.A. (1994) *In vitro* cytotoxicology. New York: CRC Press, 96.
23. Kokayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashy, M., Sofuni, T. (1995) A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Communication*, 3, 103-115.
24. Manoharan, K., Banerjee, M.R. (1985) b-Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biology International Reports*, 9, 783-789.
25. Fenech, M., Morley, A.A. (1985) Measurement of micronucleus in lymphocytes. *Mutation Research*, 147, 29-36.
26. Fenech, M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity study in human populations. *Mutation Research*, 285, 35-44.
27. Eastmond, D.A., Tucker, J.D. (1989) Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13, 34-43.
28. Tolou-Ghamari, Z., Palizban, A.A. (2003) Laboratory monitoring of Cyclosporine pre-dose concentration (C0) after kidney transplantation in isfahan. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 28, 81-85.
29. Morris, R.G. (2003) Cyclosporin therapeutic drug monitoring an established service. *Clinical Biochemist Reviews*, 24, 33-46.
30. OECD Guideline 487. (2006) *OECD Guideline for the testing chemicals draft proposal for a new guideline 487*.
31. Gontigo, A.M.M.C., Tice, R. (2003) Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. (eds), *Mutagênese Ambiental*. Editora da Ulbra, pp.247-79.

- 32.Kurtoglu, E.L., Yuksel, S. (2011) Genotoxic effects of Tacrolimus on human lymphocytes cells. *Human Genetics*, 48, 651-655.

Tabela 1 - Levantamento das concentrações plasmáticas dos imunossupressores ciclosporina e tacrolimo em pacientes transplantados renais de Londrina (PR – Brasil).

Imunossupressores	Nº de pacientes	Concentração mínima (ng/mL)	Concentração máxima (ng/mL)	Média (ng/mL)
Ciclosporina	231	6	1520,2	279,6
Tacrolimo	336	0,6	44	10
Total	567			

Tabela 2 - Classificação de pacientes transplantados renais, tratados no Instituto do Rim da cidade de Londrina, quanto às concentrações plasmáticas de ciclosporina e tacrolimo.

Imunossupressores	Concentrações (ng/mL)	Nº de pacientes (%)
Ciclosporina	6,0 - 135	104 (45,02)
	135,1 - 300	59 (25,54)
	300,1 - 675	43 (18,61)
	675,1 -1520	25 (10,82)
Tacrolimo	0,6 - 8	150 (44,64)
	8,1 - 16	145 (43,15)
	16,1 - 24	35 (10,41)
	24,1 - 44	6 (1,78)

Figura 1- Viabilidade das células MRC-5 obtidas no ensaio do MTT após 24, 48, 72, 96 ou 120 horas de exposição a 11 diferentes concentrações de ciclosporina (A) e tacrolimo (B).

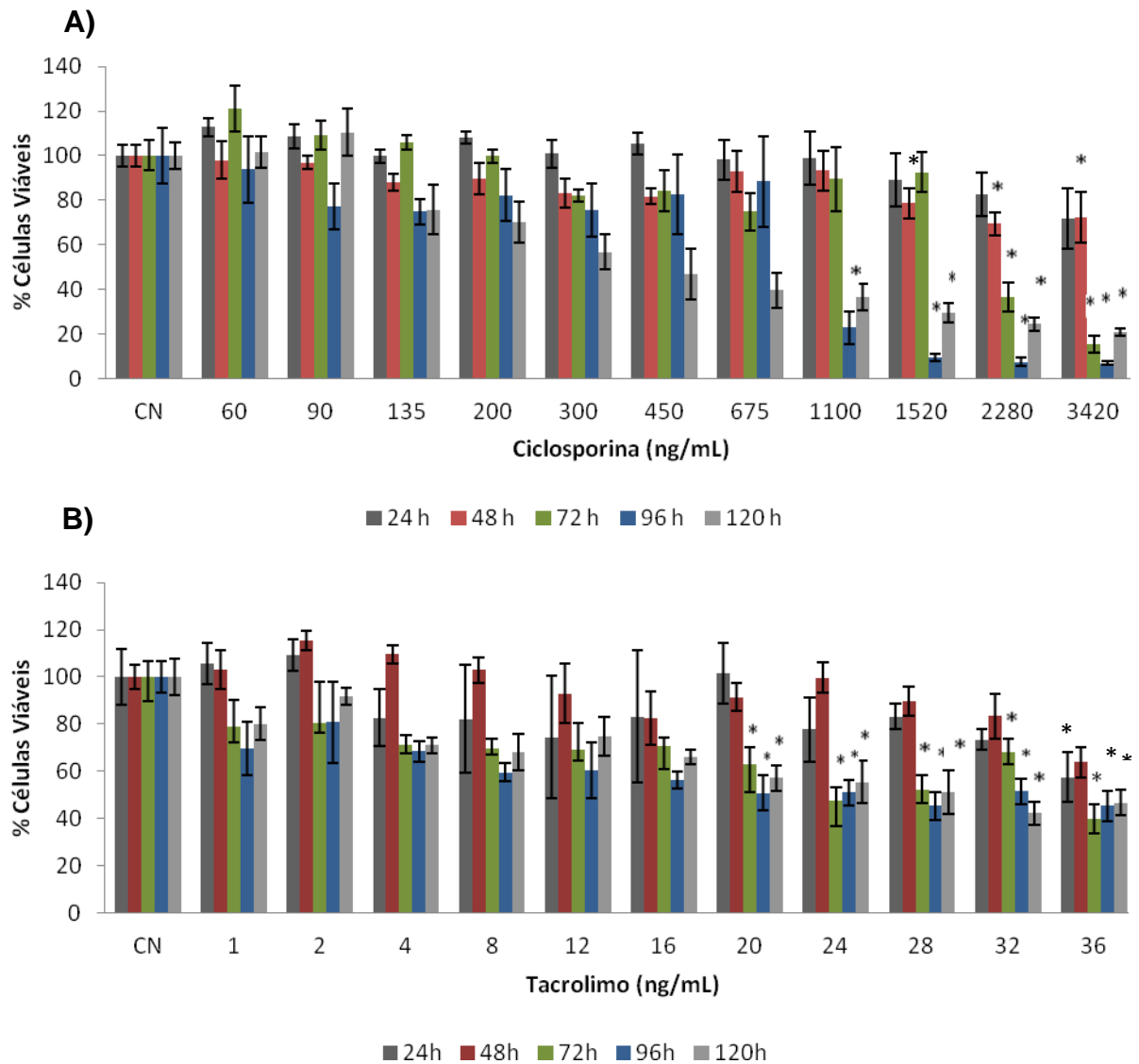
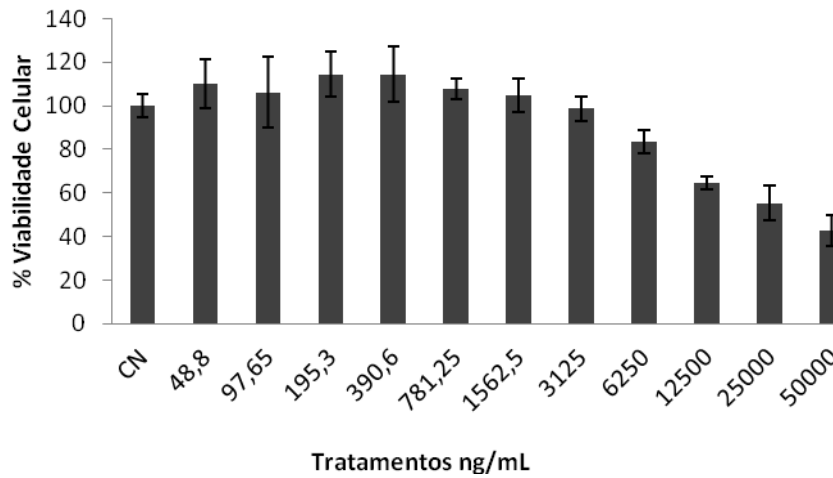


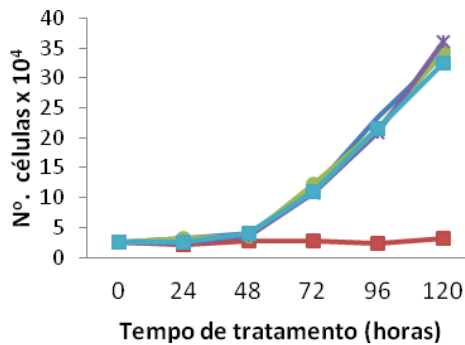
Figura 2 - Viabilidades das células MRC-5 obtidas no ensaio do MTT após 24 horas de exposição a 11 diferentes concentrações de doxorubicina.



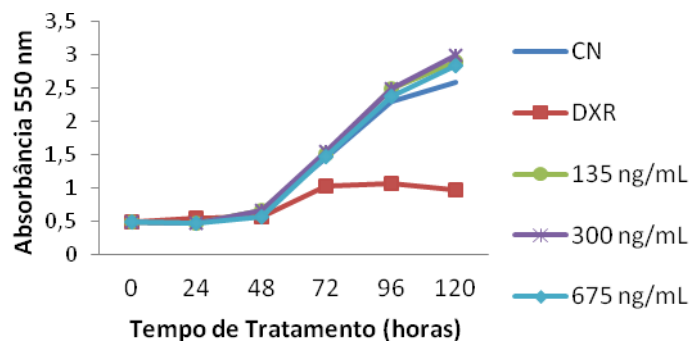
As barras representam valores médios \pm desvio padrão de 7 replicatas.
CN: Controle negativo.

Figura 3 - Curva de proliferação de células MRC-5 tratadas com A) ciclosporina e B) tacrolimo e seus respectivos controles negativo (PBS) e positivo (DXR).

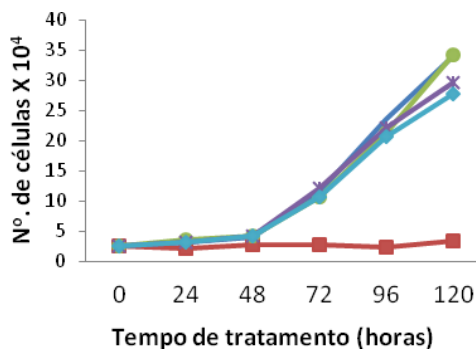
A1)



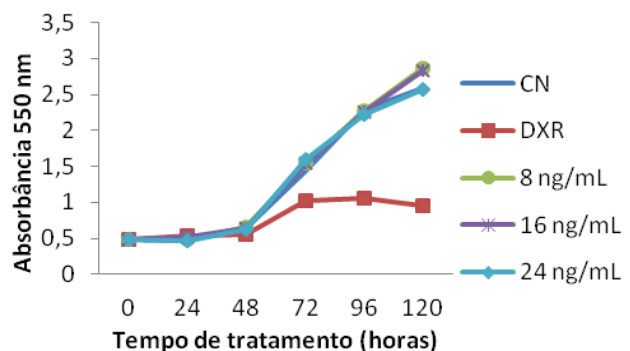
A2)



B1)



B2)



CN: Controle negativo (PBS), DXR: Doxorubicina (750 ng/mL). A1 e B1: curvas por contagem de número de células A2 e B2: curvas por quantificação de proteínas totais

Tabela 3 - Escore e frequência de danos no DNA obtidos no ensaio do cometa após 3 ou 24 horas de tratamento de células MRC-5 com quatro diferentes concentrações de ciclosporina.

	TRATAMENTO OS (ng/mL)	Classes de Danos				Escore (X ± SD)	Frequência de danos (X ±SD)		
		0	1	2	3				
3 horas	CN	53,67±	38,67±	6,33±		0,55±0,0	0,46±0,0		
		9,50	8,14	2,08	0,55±0,10	9 ^a	9 ^a		
	DXR	75	28,00±	33,33±	26,67	12,00±6,2	1,22±0,2	0,72±0,1	
		0	12,77	3,06	±5,51	4	7 ^b	3 ^b	
	Ciclosporina	13	54,67±	33,33±	10,33		0,59±0,0	0,45±0,0	
		5	8,39	9,71	±1,53	1,67±1,15	7 ^a	8 ^a	
		30	53,33±	31,00±	12,67		0,65±0,1	0,47±0,0	
		0	8,33	5,57	±1,00	3,00±1,00	2 ^a	8 ^a	
		67	36,00±	41,33±	16,33		0,93±0,0	0,64±0,0	
		5	8,89	12,58	±3,06	6,33±2,31	3 ^{a,b}	9 ^{a,b}	
	24 horas	CN	15	3,33±3,	48,00±	29,00	19,67±2,5	1,65±0,0	0,97±0,0
			20	21	2,65	±3,61	2	5 ^c	3 ^c
DXR		75	91,67±	8,33±1,	0,00±		0,08±0,0	0,08±0,0	
		0	1,53	53	0,00	0,00±0,00	2 ^a	2 ^a	
Ciclosporina		13	30,00±	41,33±	18,33	10,33±3,2	1,09±0,2	0,70±0,1	
		5	17,09	13,65	±4,16	1	1 ^{b,d}	7 ^{b,d}	
	30	84,00±	16,67±	0,00±		0,17±0,0	0,17±0,0		
	0	8,19	8,02	0,00	0,00±0,00	8 ^a	8 ^{a,c}		
	67	56,00±	40,33±	4,67±		0,50±0,1	0,45±0,1		
	5	16,09	17,67	1,53	0,00±0,00	6 ^{a,c}	7 ^{b,c}		
Ciclosporina	15	31,00±	54,33±	13,00		0,85±0,0	0,69±0,0		
	20	1,73	6,03	±4,58	1,67±0,58	4 ^{b,c}	2 ^b		
	15	15,33±	40,67±	23,00	21,00±8,0	1,50±0,3	0,85±0,1		
	20	18,34	11,85	±1,00	0	3 ^d	8 ^d		

CN: controle negativo (PBS). DXR: Doxorubicina – controle positivo. X±SD= média ± desvio padrão.

Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

Tabela 4: Escores e frequências de danos no DNA obtidos no teste do Cometa após 3 e 24 horas de tratamento de células MRC-5 com quatro diferentes concentrações de tacrolimo.

TRATAMENTO S (ng/mL)	Classes de Danos				Escore (X±SD)	Frequência de danos		
	0	1	2	3				
3 horas	PBS	88,00±8,	12,00±8,	0,00±0,00	0,00±0,	0,12±0,08 ^a	0,12±0,08 ^a	
	DXR	75 25,67±7,	47,00±5,	18,33±3,7	7,67±2,	1,07±0,15 ^b	0,73±0,10 ^b	
	Tacrolimo	8	69,00±2,	30,33±3,	0,67±0,58	0,00±0,	0,32±0,02 ^a	0,31±0,03 ^c
		16	60,00±9,	34,33±3,	4,00±4,36	1,67±2,	0,47±0,17 ^c	0,40±0,09 ^c
	Tacrolimo	24	31,33±2,	44,00±5,	18,33±3,2	5,67±2,	0,98±0,06 ^b	0,68±0,02 ^b
		32	32,00±1,	50,67±5,	12,33±3,2	5,00±4,	0,90±0,09 ^b	0,68±0,01 ^b
	24 horas	PBS	81,00±8,	18,67±8,	0,33±0,58	0,00±0,	0,19±0,08 ^a	0,19±0,08 ^a
		DXR	75 11,67±15	40,67±8,	34,33±16,	13,33±	1,49±0,42 ^b	0,88±0,15 ^b
Tacrolimo		8	44,00±12	44,00±7,	10,67±6,1	1,33±0,	0,69±0,18 ^a	0,56±0,13 ^c
		16	36,33±4,	51,00±4,	9,33±2,08	3,33±1,	0,80±0,05 ^c	0,64±0,04 ^b
Tacrolimo		24	25,33±10	60,33±5,	11,67±1,1	3,67±3,	0,95±0,16 ^b	0,76±0,09 ^b
		32	17,13±5,	55,33±0,	16,67±3,5	10,67±	1,21±0,14 ^b	0,83±0,05 ^b

PBS (*phosphate saline buffer*): controle negativo. DXR: Doxorubicina – controle positivo.
 X±SD= média ± desvio padrão
 Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

Tabela 5 - Frequência de células micronucleadas (MN) e índice de divisão nuclear (IDN) obtidos na determinação de mutagenicidade de quatro diferentes concentrações de ciclosporina e tacrolimo na linhagem celular MRC-5 após 24 horas de exposição.

Imunossuppressores	Tratamentos (ng/mL)	Frequência de MN (1000 cél/repet.) Repetições				IDN (500 céls/repet.) Repetições			
		I	II	III	X±SD	I	II	III	X±SD
Ciclosporina	CN	12	16	17	15,00±2,64 ^a	1,706	1,468	1,602	1,59±0,11
	DXR	74	96	114	94,66±20,0 ^b	1,562	1,450	1,552	1,52±0,06
	135	12	17	17	17,33±2,88 ^a	1,62	1,636	1,586	1,61±0,02
	300	19	16	20	18,33±2,08 ^a	1,592	1,590	1,600	1,59±0,00
	675	17	22	22	20,33±2,88 ^a	1,598	1,492	1,528	1,53±0,05
	1520	34	28	26	29,33±4,16 ^c	1,634	1,546	1,514	1,56±0,06
Tacrolimo	CN	18	15	13	15,33±2,51 ^a	1,568	1,538	1,578	1,56±0,02
	DXR	98	111	74	94,33±18,77 ^b	1,574	1,562	1,498	1,54±0,04
	8	19	16	16	17,00±1,73 ^a	1,552	1,568	1,594	1,57±0,02
	16	24	19	20	21,00±2,64 ^a	1,510	1,564	1,596	1,55±0,04
	24	19	25	24	22,66±3,21 ^c	1,584	1,528	1,588	1,56±0,03
	32	27	32	30	29,66±2,51 ^c	1,550	1,525	1,574	1,54±0,02

CN: Controle Negativo (PBS - *phosphate saline buffer*). DXR: Doxorubicina (100 ng/mL). X±SD= média ± desvio padrão

Valores seguidos de mesmas letras não diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância pelo teste ANOVA seguido de Tukey

6 ARTIGO

Expressão diferencial de genes relacionados ao câncer em resposta a concentrações não citotóxicas dos imunossupressores ciclosporina e tacrolimo

Cilião, H.L., Oliveira, M.T., Cólus, I.M.S.

Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina

Londrina (Paraná) - Brasil

Correspondência para:

Dr. Marcelo Tempesta de Oliveira

Laboratório de Mutagênese e Oncogenética – Departamento de Biologia Geral,
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, Paraná, Brasil

CEP: 86.057-970

Telefone: 3371-4608

e-mail: marcelo_tempesta@hotmail.com

Revista a ser submetido: Experimental Dermatology

Fator de Impacto – 3.543

RESUMO

A imunossupressão em pacientes transplantados vem sendo relacionada com maior risco de desenvolvimento de câncer de pele. Entretanto, a real contribuição de cada imunossupressor para o desenvolvimento de processos tumorais permanece a ser descrita devido ao fato dos regimes terapêuticos envolverem combinações de dois, três e ocasionalmente quatro medicamentos e também à variabilidade individual de respostas farmacológicas. Desta forma, este trabalho teve como objetivo determinar a citotoxicidade dos imunossupressores ciclosporina e tacrolimo em linfócitos humanos normais isolados de diferentes indivíduos e avaliar o efeito de concentrações não citotóxicas dessas drogas na expressão de genes relacionados ao câncer. O ensaio do MTT mostrou que até concentrações igual ou menores que 135 ng/mL de ciclosporina e 20 ng/mL de tacrolimo não diminuíram significativamente a viabilidade celular em nenhum dos indivíduos avaliados. Além disso, foram evidenciadas diferenças na viabilidade celular entre os indivíduos estudados, tanto em função do imunossupressor, como das concentrações em questão. As análises de expressão gênica por RT-qPCR revelaram que a ciclosporina aumentou a expressão do gene *CYLD* em 1,507 vezes ($p \leq 0,001$) na concentração de 135 ng/mL e negativamente o gene *XPC* em 2,227 vezes ($p \leq 0,001$) na concentração de 90 ng/mL no indivíduo 1. Para o indivíduo 2, a concentração de 12 ng/mL de tacrolimo diminuiu a expressão de RNA do gene *XPC* em 11,49 vezes ($p < 0,05$). Nossos resultados mostraram que as respostas em relação aos medicamentos e às doses testadas foram indivíduo dependentes e que os genes expressos diferencialmente podem ser utilizados como novos parâmetros de seleção de terapias imunossupressoras adequadas a cada indivíduo.

Palavras chave: ciclosporina, tacrolimo, linfócitos humanos, gene *XPC*, gene *CYLD*.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a compreensão dos mecanismos moleculares e o desenvolvimento de novas drogas e terapias imunossupressoras tem proporcionado melhorias significativas na evolução clínica de pacientes transplantados. Entretanto, apesar destes avanços, o monitoramento permanente dos níveis da maioria das drogas imunossupressoras para reduzir o risco de rejeição do enxerto, bem como a toxicidade induzida pelas mesmas ainda se faz necessário (1).

Um dos grandes problemas para o sucesso da terapia medicamentosa é a variabilidade de respostas farmacológicas entre indivíduos frente a um determinado delineamento terapêutico. Estas respostas podem ser mais ou menos efetivas, não proporcionarem efeito significativo algum e, em piores instâncias, desencadearem reações adversas de acordo com o paciente em questão (2, 3).

Entre os efeitos não desejados de terapias imunossupressoras está o reconhecido aumento do risco de câncer, principalmente o de pele, após longos períodos de imunossupressão (4-8). Em pacientes transplantados submetidos a terapias com os imunossupressores ciclosporina e tacrolimo este risco chega a ser 65 a 250 vezes maior quando comparado com a população em geral (9, 10).

Apesar destas constatações, é difícil vislumbrar a real contribuição de cada imunossupressor para o desenvolvimento de processos tumorais devido ao fato dos regimes terapêuticos envolverem combinações de dois, três e ocasionalmente quatro medicamentos (4).

Embora ainda não esclarecidos, há dois mecanismos pelos quais os imunossupressores podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de pele: o comprometimento do sistema imune (imunovigilância) e o efeito oncogênico direto (4). A elucidação destes mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de novos parâmetros que auxiliem no prognóstico, diagnóstico e ou conduta terapêutica para este tipo de neoplasia, em pacientes transplantados.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de genes reconhecidamente envolvidos em processos tumorais, dentre estes os supressores tumorais *CYLD* (*cyldromatosis - turban tumor syndrome*) e *TP53* (*Tumor protein p 53*), os proto-oncogenes *CCND1* (*cyclin D1*) e *MYC* (*myelocytomatosis viral oncogene*) e o gene de reparo *XPC* (*xeroderma*

pigmentosum, complementation group C), em cultura de linfócitos primários isolados de diferentes indivíduos submetidas a concentrações não citotóxicas dos imunossupressores, ciclosporina e tacrolimo, Com isso, pretende-se ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de ação destas drogas e contribuir para a adoção de terapias adequadas para cada indivíduo.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e cultura de linfócitos primários humanos

Foram selecionados para o estudo três indivíduos do sexo masculino, na faixa de 20 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumantes, não etilistas, que não faziam uso de nenhuma medicação e sem exposição recente à radiação e a praguicidas. Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, sob o parecer CEP/UEL: 004/2010, CAAE: 0211.0.268.000-09, os três voluntários selecionados assinaram um termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Em seguida 10 mL de sangue periférico foram obtidos de cada um por punção intravenosa com agulhas e tubos vacutainer descartáveis, contendo ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA 6%).

Para o isolamento dos linfócitos primários foi utilizado o reagente Ficoll-Paque®1077 (Sigma-Aldrich) de acordo com a técnica descrita por Boyum (11). Os linfócitos foram cultivados em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco™), contendo 2,0 g/L de NaHCO₃ (MERCK), 25 mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 0,06 g/L de penicilina G (Sigma-Aldrich), 0,10 g/L de sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich), 10% de soro bovino fetal (Gibco™) e 2% de fitohemaglutinina A (Gibco™).

Viabilidade Celular pelo Ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico)

O ensaio do MTT foi realizado para avaliar a viabilidade dos linfócitos de cada indivíduo mediante exposição a 11 diferentes concentrações de cada um dos medicamentos imunossupressores. Para a ciclosporina (SANDIMMUN®, Novartis Farma - CAS 59865-13-3) as concentrações testadas foram de 60, 90, 135, 300, 450, 675, 1100, 1520, 2280 e 3420 ng/mL e para o tacrolimo (CAS: 109581-93-3 Sigma-Aldrich – St. Louis- USA) foram de 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36

ng/mL. Ambas as drogas foram dissolvidas conforme recomendações do fabricante e posteriormente diluídas em PBS (*phosphate saline buffer*) para a obtenção das concentrações desejadas.

Este ensaio foi realizado em placas de 96 poços, seguindo o protocolo descrito por Mosmann (12) com algumas modificações. Foram semeadas 5×10^4 células por poço. As placas foram submetidas a uma incubação inicial de 24 horas a 37°C sob atmosfera de 5 % de CO_2 e 95 % de umidade, para estabilização celular. Após este período, sete replicatas de cada tratamento com as diferentes concentrações dos imunossuppressores foram realizadas sob as mesmas condições de incubação descritas anteriormente. Decorrido o período de 24 horas, foi adicionado em cada poço 50 μL da solução de MTT (Invitrogen) para obtenção da concentração final de 5 mg/mL em cultura. As placas foram incubadas por adicionais 4 horas nas mesmas condições de cultivo e subsequentemente centrifugadas a 2400 g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e 100 μL de DMSO (Invitrogen) foram adicionados ao sedimento celular. Após homogeneização a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Uniscience) a 550 nm.

Os valores de absorbância foram transformados em porcentagem de células viáveis, sendo a viabilidade do controle negativo (CN) considerada 100%.

Quantificação de mRNA por PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

Após o isolamento dos linfócitos, aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células foram semeadas em tubos Falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio de cultura completo. Foram preparados 5 tubos para cada indivíduo, os quais foram submetidos a uma incubação inicial de 24 horas a 37°C sob atmosfera de 5 % de CO_2 e 95 % de umidade para estabilização celular. Após este período, um tubo de cada indivíduo foi mantido apenas com o meio de cultura como controle negativo e os 4 tubos restantes tratados, respectivamente, com duas concentrações não citotóxicas de cada imunossupressor: 90 e 135 ng/mL de ciclosporina e 8 e 12 ng/mL de tacrolimo.

A extração do RNA total foi realizada com o reagente TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) e com o Kit Pure Link[®] RNA mini kit (Ambion), segundo as especificações do fabricante. A qualidade dos RNAs totais extraídos foi avaliada segundo metodologia descrita por Aranda et al. (13).

O cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA total, em reações de 20 μL de volume final, constituído de 2% de tampão de reação 10X, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,5

mM de cada dNTP, utilizando 10 U da enzima SuperScript III e 2 U da enzima RNase Out. Para o anelamento foram utilizados 80 pmol de Oligo dT associados a 25 pmol de Random Primers. Uma mistura constituída apenas por RNA, Oligo dT, Random Primer e dNTP foi submetida a uma pré incubação de 10 minutos a 65°C, seguido de choque térmico em gelo. Os demais contituíntes foram adicionados e submetidos ao seguinte programa de reação: 2 minutos a 25°C, 49 minutos a 50 °C, 15 minutos a 70 °C. Para minimizar variações de desempenho da transcriptase reversa, foram realizadas três reações distintas de síntese de cDNA para cada experimento, cujos produtos foram incorporados para obtenção de uma única mistura referente a cada amostra em sua respectiva condição de cultivo (14, 15). Os cDNAs sintetizados foram analisados por espectrofotometria para quantificação e determinação da razão em 260nm/280nm e ajustados para a concentração final de 50 ng/μL.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados empregando-se o software Gene Runner versão 3.05 (<http://www.generunner.com>). As sequências dos genes alvo *CYLD* (*cylindromatosis - turban tumor syndrome*), *c-MYC* (*myelocytomatosis viral oncogene*), *TP53* (tumor protein p53), *XPC* (*xeroderma pigmentosum, complementation group C*) e *CCND1* (*cyclin D1*) e do gene de referência *GAPDH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) foram obtidas a partir de regiões específicas descritas e depositadas no *National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), considerando-se todos os variantes transcricionais descritos para cada gene. O programa BioEdit Alignment Editor versão 7.09 (16) foi utilizado para o alinhamento das variantes transcricionais de cada gene, determinando suas regiões conservadas para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores, descritos na Tabela 1. A especificidade de cada oligonucleotídeo foi avaliada com o auxílio do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Orientações do *MIQE guidelines* (17) foram consideradas para os experimentos de RT-qPCR, sendo as reações otimizadas seguindo orientações de Bustin et al. (17), tais como testes de gradientes de temperaturas de anelamento. Estas variaram de 54°C a 60°C e permitiram definir as temperaturas que reproduziram a melhor eficiência de reação para os oligonucleotídeos iniciadores a serem utilizados.

Os dados referentes à expressão gênica foram obtidos por RT-qPCR, com a utilização do Termociclador em Tempo Real Quanta (TECHNE, Staffordshire, UK). Para tal, foram utilizados 10 µL do kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UGG (Invitrogen, EUA), 2,5 pmol de cada primer (18), utilizando-se como molde 250 ng de cDNA de cada amostra em suas respectivas condições de tratamento. A mistura de reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 50°C por 2 minutos; 95°C por 2 minutos; 40 repetições de um ciclo de 94°C (desnaturação) por 20 segundos, 58°C (anelamento) por 01 minuto, 72°C (extensão) por 15 segundos, e uma extensão final adicional de 72°C por 15 segundos. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

A especificidade da amplificação foi avaliada para cada amostra assegurando-se que apenas o produto de interesse foi amplificado em cada reação por meio da curva de fusão (*melting curve*), variando-se a temperatura de 50°C a 98°C em 0,5°C/2 segundos. O programa QUANSOFT Software (TECHNE, Staffordshire, UK) foi utilizado para determinação do C_q (*quantification cycle*) de cada reação e para a determinação das curvas de eficiências de amplificação referentes a cada par de oligonucleotídeo iniciador.

Para a determinação da expressão relativa dos genes de interesse nas diferentes condições avaliadas foi utilizado o programa REST versão 2009 (*Relative expression software tool*) (QIAGEN), desenvolvido por Pfaffl et al. (19), baseado em seu próprio modelo matemático de quantificação relativa de dados obtidos por PCR em tempo real (20). Os valores obtidos na situação controle (ausência de imunossupressores) foram utilizados como referência para comparação. Foram considerados apenas valores de C_q com uma variação de $\pm 0,5$ entre as triplicatas de reação.

Análises estatísticas

Os dados obtidos no teste do MTT foram analisados por meio dos testes não-paramétricos Kruskal-Wallis/Dunn ($p < 0,05$), utilizando-se o Programa GraphPad InStat (versão 3.05 GraphPad Software, Inc.). O programa REST versão 2009 (*Relative expression software tool*) (QIAGEN), que utiliza o modelo estatístico denominado *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*, foi utilizado para avaliar os dados obtidos na RT-qPCR, determinando-se quais genes alvo apresentaram expressão diferencial (*up-expressed* ou *down-expressed*). Foram

considerados diferencialmente expressos quando comparados à situação controle os genes cuja alteração foi significativamente diferente pela análise do programa, considerando-se o valor de $p \leq 0,001$ ou alterações maiores de 5 vezes cujo valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Viabilidade celular pelo ensaio de MTT

Os resultados do ensaio de MTT (Figura 1) mostraram que, até a concentração de 135 ng/mL de ciclosporina e de 20 ng/mL de tacrolimo não houve diminuição significativa da viabilidade celular dos linfócitos de nenhum dos indivíduos analisados. Nenhuma das concentrações de ciclosporina e tacrolimo avaliadas diminuiu a viabilidade celular do indivíduo 1. Entretanto, as concentrações de ciclosporina de 1100, 2280 e 3420 ng/mL para o indivíduo 2 e de 200, 450, 2280 e 3420 ng/mL para o indivíduo 3 promoveram uma diminuição significativa na viabilidade celular, assim como as concentrações de 24 e 32 ng/mL de tacrolimo para, respectivamente, os indivíduos 2 e 3. Em adição, foi possível observar que o indivíduo 1 respondeu significativamente diferente aos imunossuppressores em quase todas as concentrações avaliadas, quando comparado com os indivíduos 2 e 3.

Quantificação de mRNA por RT-qPCR

As análises de expressão gênica (Figura 2) revelaram que a ciclosporina promoveu alterações significativas nos genes do indivíduo 1. A concentração de 135 ng/mL aumentou a expressão do gene *CYLD* em 1,507 vezes ($p \leq 0,001$) e na concentração de 90 ng/mL reduziu a expressão do gene *XPC* em 2,227 vezes ($p \leq 0,001$). Para o indivíduo 2, apenas a concentração de 12 ng/mL de tacrolimo promoveu alteração significativa, reduzindo a expressão do gene *XPC* em 11,49 vezes ($p < 0,05$).

Os genes *TP53*, *c-MYC* e *CCND1* não demonstraram variação significativa na expressão dos genes nos linfócitos tratados com os imunossuppressores em relação aos do grupo controle negativo.

DISCUSSÃO

A relação do uso prolongado de imunossuppressores e aumento da incidência de câncer de pele já é bem conhecida, promovendo, em pacientes sob regime

terapêutico com ciclosporina e/ou tacrolimo, riscos de até 250 vezes de desenvolver esta neoplasia em relação à população em geral (9, 10). Esta incidência também é proporcional ao nível de imunossupressão ao qual cada indivíduo é submetido durante a terapia (4-8) e, para alguns tipos de câncer de pele, como o carcinoma de células escamosas, relata-se maior agressividade no desenvolvimento do tumor em relação ao aumento deste nível (21-24).

Comparações entre pacientes com e sem câncer de pele mostrou que não há diferenças qualitativas e quantitativas da imunossupressão gerada por terapias imunossupressoras. Ou seja, a imunossupressão obtida pelo tratamento é a mesma entre os pacientes com e sem câncer, e estar em um maior ou menor grau de imunossupressão não tem relação com ser portador ou não da doença. Isto sugere que outros mecanismos podem estar envolvidos no processo de desenvolvimento do câncer, tais como a suscetibilidade individual para a imunossupressão e consequente resposta a ela (25).

Nossos dados de viabilidade celular obtidos no ensaio do MTT mostraram diferentes níveis de tolerância aos imunossupressores entre os indivíduos estudados, níveis estes que variaram de acordo com a droga em questão e as concentrações utilizadas. Houve dois indivíduos cuja viabilidade celular foi diminuída em resposta a determinadas condições de tratamento e um indivíduo em que a viabilidade permaneceu inalterada independente da droga ou concentração avaliada.

A expressão gênica também evidenciou que os indivíduos responderam diferencialmente quanto ao tipo de imunossupressor utilizado e concentração empregada, alterando mais ou menos a expressão dos genes de acordo com o tratamento aplicado, tanto em função do imunossupressor quanto da concentração testada.

Entre os genes diferencialmente expressos em nosso estudo está o *XPC*. Este gene codifica proteínas específicas da via do reparo por excisão de nucleotídeos (NER – *Nucleotise excision repair*) (26), eliminando uma ampla variedade de danos induzidos pela radiação UV, o que faz desta via a principal linha de defesa contra processos carcinogênicos induzidos por este fator. Quando estas lesões no DNA não são corretamente detectadas e/ou reparadas facilitam a propagação de mutações e o desenvolvimento de neoplasias (27-29). Em adição, o efeito inibitório de imunossupressores sobre a família XP, entre os quais o gene *XPC*, já é bem conhecido (28, 29). No presente estudo, o gene *XPC* apresentou uma

diminuição na expressão nos dois indivíduos estudados. Entretanto, a diminuição dos transcritos do gene *XPC* do indivíduo 1 foi promovida pelo imunossupressor ciclosporina, enquanto no indivíduo 2 foi em resposta ao tacrolimo. Estes dados sugerem que a ciclosporina exerce um efeito prejudicial para o indivíduo 1 que não é observado quando submetido ao tratamento com tacrolimo. O contrário foi observado para o indivíduo 2, que teve o efeito prejudicial exercido pelo imunossupressor tacrolimo.

Outro gene diferencialmente expresso foi o *CYLD*, que foi regulado positivamente apenas no indivíduo 1. Este gene é um supressor tumoral originalmente identificado como um gene mutado na síndrome Cilindromatose Familiar, uma condição genética que predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de diferentes tipos de tumores de pele. Apesar de sua estreita relação com câncer de pele (31, 33, 34, 36, 37, 39), este gene atua como supressor tumoral em muitos outros tipos de cânceres, sendo negativamente regulado em câncer de pulmão (30) e carcinoma hepatocelular (33, 35) e, quando inativado, causa apoptose, inflamação, fibrose e câncer em hepatócitos (38). Em contrapartida, a proteína *CYLD* desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase das células T, bem como na função reguladora das células T normais, controlando, assim, as respostas das células T anormais (40). Desta forma, os linfócitos do indivíduo 1 podem estar compensando uma possível anormalidade funcional promovida pelos imunossupressores testados, como observado no tratamento com 135 ng/mL de ciclosporina, cuja regulação do gene *CYLD* foi aumentada significativamente em 1,507 vezes ($p \leq 0,001$). Esta propensão em regular positivamente o gene *CYLD* poderia justificar a ausência de diminuição de sua viabilidade celular também nas concentrações mais elevadas das drogas. A diminuição do número de transcritos de *CYLD* no indivíduo 2 em todas as condições testadas mostra uma propensão contrária que, apesar de não significativa, reforça esta hipótese, visto que o aumento das concentrações de imunossupressores promoveu a diminuição da viabilidade celular, indicando respostas indivíduo-dependentes.

O aumento da expressão de *CYLD* também inibe o crescimento e progressão de melanomas *in vivo* e *in vitro*, assim como o potencial metastático *in vivo* (37). Em linhagem celular de câncer de pulmão, o aumento da expressão de *CYLD* foi associado com o aumento da apoptose induzida por TRAIL, podendo, segundo os autores, atuar como alvo terapêutico para este tipo de tumor (41). Desta forma,

observa-se o potencial do aumento da expressão de *CYLD* em reverter condições biologicamente desfavoráveis.

A variabilidade de respostas farmacológicas entre indivíduos é motivo da ampla variedade de regimes terapêuticos na imunossupressão. Esta variabilidade é o que faz com que um tratamento seja mais ou menos eficiente, ineficaz ou que, adicionalmente, desencadeie reações adversas (2, 3).

O desenvolvimento e aprimoramento de testes diagnósticos e condutas terapêuticas baseados em técnicas de biologia molecular se tornaram ferramentas indispensáveis para o estudo, compreensão e tratamento de doenças. Assim, o estudo de alterações na regulação da expressão de genes comprovadamente envolvidos em processos patológicos com a finalidade de estabelecer perfis transcricionais (assinaturas gênicas) característicos a uma determinada patologia, de forma a diferenciar o indivíduo sadio do doente, é atualmente o que há de mais promissor para o desenvolvimento de diagnósticos, prognósticos e condutas terapêuticas mais seguras e eficazes (42, 43).

Sabendo-se que cada paciente responde de maneira diferente aos medicamentos imunossupressores, a realização de triagens prévias à terapia imunossupressora seria um bom indicador para avaliar qual a droga mais adequada a cada paciente mediante avaliação de alterações de um perfil de genes específicos. Visto que a identificação precoce do câncer de pele é imperativa para pacientes que recebem terapia imunossupressora ao longo da vida (25), a realização de monitoramentos periódicos com os genes *CYLD* e *XPC*, diferencialmente expressos em nosso estudo, associados a outros supressores tumorais ou proto-oncogenes ainda a serem estabelecidos em estudos futuros, poderá ser aplicada a pacientes durante a terapia imunossupressora. O perfil transcricional encontrado poderia prever precocemente os riscos que a terapia imunossupressora exerceria sobre o desenvolvimento do câncer de pele.

Em resumo, nosso estudo evidenciou respostas individuais - dependentes em consequência da exposição de linfócitos a concentrações não citotóxicas dos imunossupressores ciclosporina e tacrolimo, encontrando alterações transcricionais dos genes *XPC* e *CYLD*. Assim, estes genes poderão ser utilizados futuramente na seleção de terapias imunossupressoras adequadas a cada paciente. Outros genes devem ser estudados para o estabelecimento de um painel que possa ser validado futuramente em estudos do tipo caso-controle.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa PPSUS (Pesquisas para o Sistema Único de Saúde) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pelo suporte financeiro. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de mestrado a H.L.Cilião e de produtividade a I.M.S.Cólus. Ao Instituto do Rim de Londrina pelo apoio e parceria. Ao Setor de Farmácia do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina por ter cedido a ciclosporina ao nosso laboratório.

Referência Bibliográfica

1. Del Tacca M. Prospects for personalized immunosuppression: Pharm tools - A review. *Transplant Proc* 2004; 36: 687-689.
2. Flaherty D N. Single nucleotide polymorphisms, drug metabolism and untoward health effects. *J Med Biol Sci* 2007; 1: 01-08.
3. Allam K V, Cheruku V, Rangu N *et al.* Correlating genetic polymorphisms with the interindividual variability in drug response and toxicity. *Int J Cur Biomed Phar* 2011; 1: 148 -156.
4. Euvrard S, Ulrich C, Lefrancois N. Immunosuppressants and skin cancer in transplant patients: focus on Rapamycin. *Dermatol Surg* 2004; 30: 628-633.
5. Oliveira V D, Zankl H, Rath T. Mutagenic and cytotoxic effects of immunosuppressive drugs on human lymphocyte culture. *Exp Clin Transplant* 2004; 2: 273-279.
6. Gutierrez-Dalmau A, Campistol J M. Immunosuppressive therapy and malignancy in organ transplant recipients: A systematic review. *Drugs* 2007; 67: 1167-1198.
7. Fraile P, Garcia-Cosmes P, Martin V *et al.* Non-skin solid tumors as a cause of morbidity and mortality after liver transplantation. *Transpl. Proc.* 2009; 4: 2433-2434.
8. Hofbauer G F L, Bavinck J N B, Euvrard S. Organ transplantation and skin cancer: basic problems and new perspectives. *Exp. Dermatol.* 2010; 19: 473-482.
9. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers in organ transplant recipients. *New Engl J Med* 2003;348:1681-1691.
10. Carroll R P, Segundo D S, Hollowood K, *et al.* Immune phenotype predicts risk for posttransplantation squamous cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 713-722.

11. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest* 1968; 21: 77-90.
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 1983; 65: 55-63.
13. Aranda P S, Lajoie D M, Jorcyk C L. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 2012; 33: 366-369.
14. Pfaffl M W. Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: *A-Z of Quantitative PCR*. S.A.Bustin, ed. International University Line. La Jolla, 2004: 87-120.
15. Bustin S A, Benes V, Nolan T, Pfaffl M W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol*: 2005; 34: 597-601.
16. Hall T. BioEdit Alignment Editor Version 7.09. Ibis Biosciences, 1997. Disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.
17. Bustin S A, Benes V, Garson J A, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 2009; 55: 611- 622.
18. Nolan T, Hands R E, Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protoc.* 2006; 1: 1559-1582.
19. Pfaffl M W, Horgan G W, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 36.
20. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2002-2007.
21. Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, et al. Aggressive squamous cell carcinomas in organ transplant recipients. *Transplant. Proc.* 1995; 27: 1767-1768.
22. Adamson R, Obispo E, Dychter S, et al. High incidence and clinical course of aggressive skin cancer in heart transplant patients: a single-center study. *Transplant. Proc.* 1998; 30: 1124-1126.
23. Pollard J D, Hanasono M M, Mikulec A A, et al. Head and neck cancer in cardiothoracic transplant recipients. *Laryngoscope* 2000; 110: 1257-1261.
24. Veness M J, Quinn D I, Ong C S, et al. Aggressive cutaneous malignancies following cardiothoracic transplantation: the Australian experience. *Cancer* 1999; 85: 1758 -1764.
25. Gong W, Whitcher G H, Townamchai N, et al. Biomarkers for Monitoring Therapeutic Side Effects or Various Supratherapeutic Confounders after Kidney Transplantation *Transplant. Proc.* 2012; 44: 1265-1269.

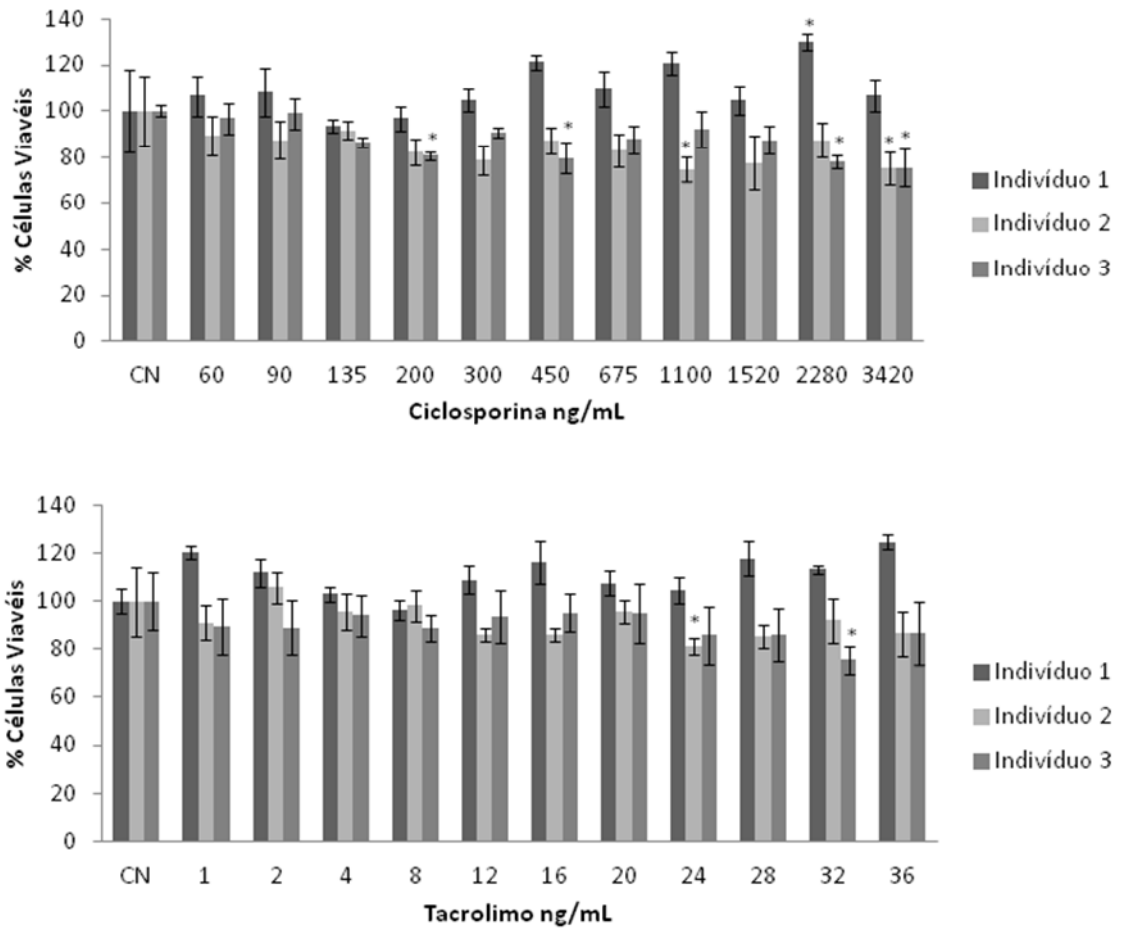
26. Tewari A, Sarkany R P, Young A R. Young1 UVA1 Induces Cyclobutane Pyrimidine Dimers but Not 6-4 Photoproducts in Human Skin In Vivo. *J. Invest. Dermatol.* 2012; 132: 394-400.
27. Gruijl F R, van Kranen H J, Mullenders L H F. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J. Photo. Photobio B.* 2001; 63: 19-27.
28. Kruschal C, Thoms K M, Schubert S, et al. Skin cancer in organ transplant recipients: effects of immunosuppressive medications on DNA repair. *Exp. Dermatol.* 2011; 21, 2-6.
29. Kuschal C, Thoms K M, Boeckmann L, et al. Cyclosporin A inhibits nucleotide excision repair via downregulation of the xeroderma pigmentosum group A and G proteins, which is mediated by calcineurin inhibition. *Exp. Dermatol.* 2011; 20: 795-799.
30. Zhong S, Fields C R, Su N, et al. Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer. *Oncogene* 2007; 26: 2621–2634.
31. Annunziata C M, Davis R E, Demchenko Y, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007; 12: 115-130.
32. Keats J J, Fonseca R, Chesi M, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007; 12: 131-144.
33. Hellerbrand C, Bumès E, Bataille F, et al. Reduced expression of CYLD in human colon and hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 2007; 28: 21-27.
34. Alameda JP, Fernández-Aceñero M J, Moreno-Maldonado R. CYLD regulates keratinocyte differentiation and skin cancer progression in humans. *Cell Death Dis.* 2011; 2: 1-9.
35. Urbanik T, Kohler B C, Boger R J, et al. Down-regulation of CYLD as a trigger for NF-kB activation and a mechanism of apoptotic resistance in hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 2011; 38: 121-131.
36. Masoumi K C, Shaw-Hallgren G, Massoumi R. Tumor suppressor function of CYLD in nonmelanoma skin cancer. *J. Skin Cancer* 2011: 1-10.
37. Ke H, Augustine C K, Gandham V D, et al. CYLD inhibits melanoma growth and progression through suppression of the JNK/AP-1 and β 1-integrin signaling pathways. *J. Invest. Dermatol.* 2013; 133: 221-229.

38. Nikolaou K, Tsagaratou A, Eftychi C, et al. Inactivation of the deubiquitinase CYLD in hepatocytes causes apoptosis, inflammation, fibrosis, and cancer. *Cancer Cell* 2012; 21: 738-750.
39. Ishikawa Y, Tsunoda k, Shibazaki M, et al. Downregulation of cylindromatosis gene, CYLD, confers a growth advantage on malignant melanoma cells while negatively regulating their migration activity. *Int. J. Oncol.* 2012; 41: 53-60.
40. Reissig S, Hövelmeyer N, Weigmann B, et al. The Tumor Suppressor CYLD Controls the Function of Murine Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 2012; 189: 4770-4776.
41. Deng L L, Shao Y X, Lv H F, et al. Over-expressing CYLD augments antitumor activity of TRAIL by inhibiting the NF- κ B survival signaling in lung cancer cells. *Neoplasma* 2012; 59:18-29.
42. Brockmöller J, Tzvetkov M V. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64: 133-157.
43. Schröppel B, Heeger P S. Gazing into a crystal Ball to predict kidney transplant outcome. *J Clin Invest* 2010; 120: 1803-1806.

Tabela 1 - Genes estudados e suas respectivas sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados, tamanho dos produtos de amplificação e eficiências obtidas em cada reação de PCR em tempo real.

Genes	Sequência 5'- 3'	Tamanho dos produtos de amplificação	Eficiência (%)
<i>GAPDH</i>	F: GGGCATCCTGGGCTACACT R: GGTCCAGGGGTCTTACTC	208 pb	91,3
<i>CYLD</i>	F: GTCCAAGAGAGTCCACC R: CAGTTCCAGTCCAGCGA	160 pb	98,4
<i>MYC</i>	F: GGA CTGTATGTGGAGCG R: TCGTTGAGAGGGTAGGG	211 pb	94,7
<i>TP53</i>	F: CCATCCACTACA ACTACAT R: GCACAAACACGCACCTC	136 pb	95,8
<i>CCND1</i>	F: CATTGAACACTTCCTCTCCA R: AACTTCACATCTGTGGCAC	140 pb	100
<i>XPC</i>	F: GAAGACAAGAGAAAGAAGTG R: TGGGATGATGGACAGGC	196 pb	100

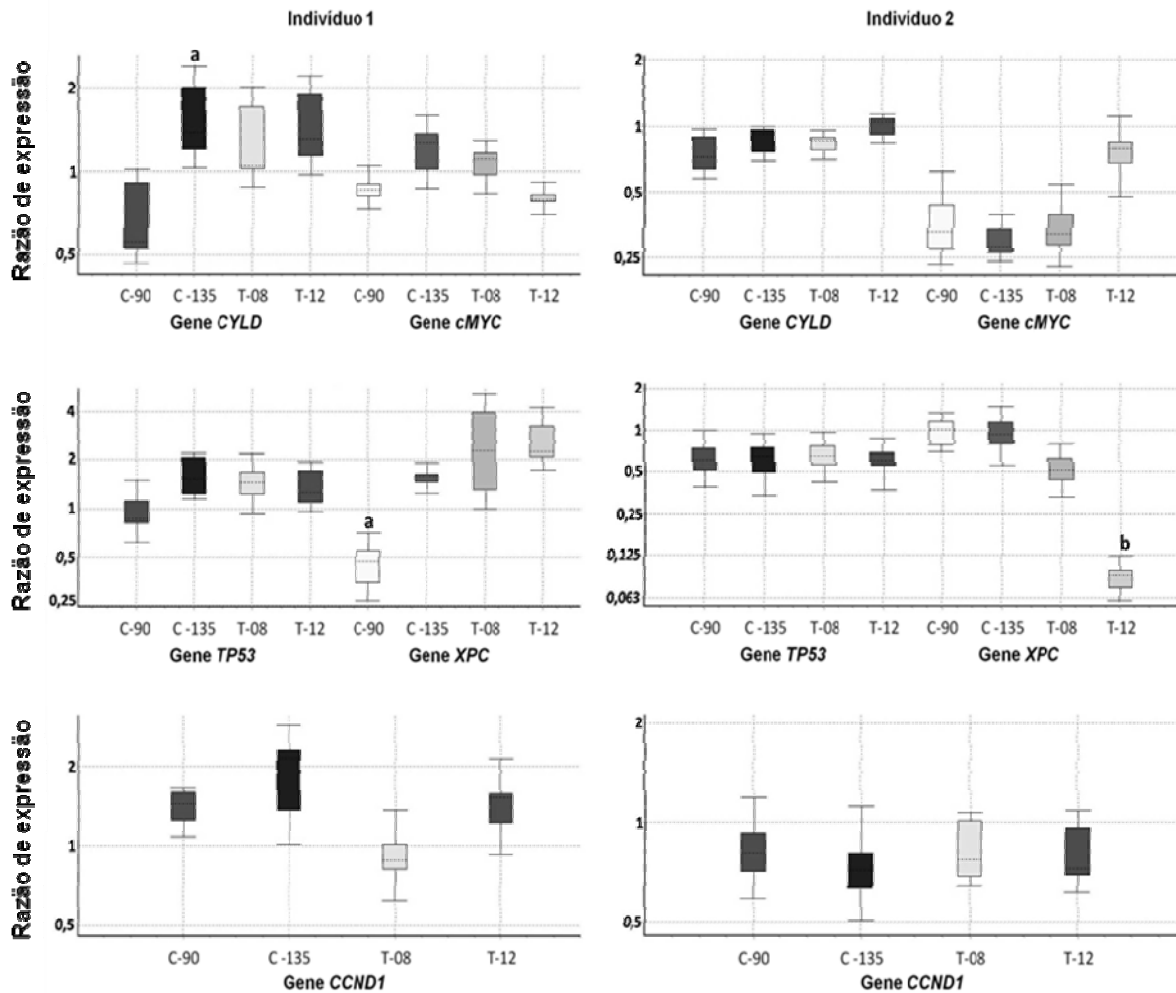
Figura 1 - Viabilidade de linfócitos referente a cada indivíduo obtida pelo ensaio do MTT após 24 horas de exposição *in vitro* a 11 diferentes concentrações de ciclosporina ou tacrolimo.



CN: Controle negativo

* Valores estatisticamente menores que o CN.

Figura 2 - Quantificação relativa dos genes *CYLD*, *c-MYC*, *TP53*, *XPC* e *CCND1* em linfócitos humanos tratados por 24 horas com ciclosporina nas concentrações de 90 (C-90) e 135 ng/mL (C-135) e tacrolimo nas concentrações de 8 (T08) e 12 (T12) ng/mL.



As letras representam valores estatisticamente diferentes do controle negativo, sendo a $p \leq 0,001$ e b $p \leq 0,05$ com alterações na expressão maior que 5 vezes.

CONCLUSÕES GERAIS

Os medicamentos imunossupressores tornaram possível a realização de transplante de órgãos, graças à sua capacidade de reduzir a resposta imunológica e diminuir o risco de rejeição do órgão. No entanto, estes medicamentos causam danos diretos e indiretos às células, proporcionando após longos períodos de uso, um risco elevado de desenvolvimento de neoplasias.

Nosso estudo demonstrou que os imunossupressores ciclosporina e tacrolimo causaram diminuição da viabilidade celular tempo dose dependente, além de danos genotóxicos e mutagênicos nas maiores concentrações avaliadas. A detecção de algumas destas concentrações no plasma de pacientes transplantados indica que estes necessitam de um maior acompanhamento médico, pois a presença das maiores concentrações plasmáticas dos imunossupressores nos pacientes pode aumentar o risco destes desenvolverem neoplasias.

Os dados de regulação gênica demonstraram diferentes respostas entre os indivíduos avaliados, indicando a importância de se realizar uma triagem antes do início da terapia imunossupressora para permitir a escolha da droga imunossupressora mais adequada a cada paciente, além de avaliar como genes relacionados com o desenvolvimento de tumores estão sendo regulados frente à exposição a diferentes imunossupressores.

Desta forma, pretende-se auxiliar no desenvolvimento de novos testes diagnósticos e prognósticos e assim contribuir para a melhora na qualidade de vida dos pacientes que fazem uso destes medicamentos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Citocinas**, In: _____ **Imunologia Celular e Molecular**, 6^a. Ed: Editora. Elsevire, 2008.

ADAMSON, R.; OBISPO, E.; DYCHTER, S.; DEMBITSKY, W.; MORENO-CABRAL, R.; JASKI, B.; GORDON, J.; HOAGLAND, P.; MOORE, K.; ANDREWS, J.; RICH, M.; DAILY, P. O. High incidence and clinical course of aggressive skin cancer in heart transplant patients: a single-center study. **Transplantation Proceeding**, v. 30, p. 1124-1126, 1998.

ALAMEDA, J.P.; FERNÁNDEZ-ACEÑERO, M.J.; MORENO-MALDONADO, R.; NAVARRO, M.; QUINTANA, R.; PAGE, A.; RAMÍREZ, A.; BRAVO, A.; CASANOVA, M.L. CYLD regulates keratinocyte differentiation and skin cancer progression in humans. **Cell Death and Disease**, v. 2, p. 1-9, 2011.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.G.; TICE, R.; WATERS, M.D; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALLAM, K. V.; CHERUKU, V.; RANGU, N.; MANDALA, S.; POGAKU, R.R. Correlating Genetic Polymorphisms With The Interindividual Variability. In Drug Response And Toxicity. **International Journal Current Biomedical Pharmaceutical**, v. 1, p. 148 -156, 2011.

ANNUNZIATA, C. M.; DAVIS, R. E.; DEMCHENKO, Y.; BELLAMY, W.; GABREA, A.; ZHAN, F.; LANZ, G.; HANAMURA, I.; WRIGHT, G.; XIAO, W.; DAVES, S.; HURT, E. M.; TAN, B.; ZHAO, H.; STEPHENS, O.; SANTRA, M.; WILLIAMS, D.R.; DANG, L.; BARLOGIE, B.; SHAUGHNESSY, J. D.; KUEHL, W. M.; STAUDT, L. M. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. **Cancer Cell**, v. 12, p. 115-130, 2007.

ARANDA, P. S.; LAJOIE, D. M.; JORCYK, C. L. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. **Electrophoresis**, v. 33, p. 366-369, 2012.

AU, W.W; BADARY, O. A.; HEO, M. Y. Cytogenetic assays for monitoring populations exposed to environmental mutagens. **Occupational Medicine**, v. 16, n. 2, p. 345-357, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319056> 2001.

BARBASH, O.; DIEHL, J.A. SCF (Fbx4/alphaB-crystallin) E3 ligase: when one is not enough. **Cell Cycle**, v.7, n.19, p.2983-6, 2008.

BARILE, F.A. **In vitro cytotoxicology**. New York: CRC Press, 96, 1994.

BENJAMIN, C.L.; ANANTHASWAMY, H.N. p53 and the Pathogenesis of Skin Cancer. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, p. 241-48, 2007.

BERNHARD, D.; SCHWAIGER, W.; CRAZZOLARA, R.; TINHOFER, I.; KOFLER, R.; CSORDAS, A. Enhanced MTT - reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 195, p.193-9, 2003.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scandinavian Journal Clinical & Laboratory Investigation** v. 21, p. 77-90, 1968.

BRAZELTON, T.R.; MORRIS, R.E.; Molecular mechanism of action of new xenobiotic immunosuppressive drugs: tacrolimus (FK-506), sirolimus (rapamycin), mycophenolate mofetil and leftumide. **Transplantation**, v. 8, p. 710-720, 1996.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 245-54, 2005.

BROCKMÖLLER, J.; TZVETKOV, M. V. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment, **European Journal of Clinical Pharmacology** v. 64, p. 133-157, 2008.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 34, p. 597-601, 2005.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15, p. 155-66, 2004.

CARROLL, R. P.; SEGUNDO, D. S.; HOLLOWOOD, K.; MARAFIOTI, T.; CLARK, T. G.; HARDEN, P. N.; WOOD, K. J. Immune phenotype predicts risk for posttransplantation squamous cell carcinoma. **Journal American Society of Nephrology**, v. 21, p. 713-22, 2010.

CAVENEY, W.E.; WHITE, R.L. The genetic basis of cancer. **Scientific American**, p. 72-80, 1995.

COUNTRYMAN, P.I.; HEDDLE, J.A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 41, p.321-332, 1976.

DANG, C.V. c-MYC target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 1, p. 1-11, 1999.

DEL TACCA, M. Prospects for Personalized Immunosuppression: Pharmacologic Tools - A Review. **Transplantation Proceeding**, v. 36, p. 687-689, 2004.

DENG, L. L.; SHAO, Y. X.; LV, H. F.; DENG, H. B.; LV, F. Z. Over-expressing CYLD augments antitumor activity of TRAIL by inhibiting the NF- κ B survival signaling in lung cancer cells. **Neoplasia**, v. 59, p. 18-29, 2012.

EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody.

Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.

ENGELS, A.; PFEIFFER, R.M.; FRAUMENI, J.F.; KASISKE, B.L.; ISRANI, A.K.; SNYDER, J.J.; WOLFE, R.A.; GOODRICH, N.P.; BAYAKLY, A.R.; CLARKE, C.A.; COPELAND, G.; FINCH, J.L.; FLEISSNER, M.L.; GOODMAN, M.T.; KAHN, A.; KOCH, L.; LYNCH, C.F.; MADELEINA, M.M.; PAWLISH, K.; RAO, C.; WILLIAMS, M.A.; CASTENSON, D.; CURRY, M.; PARSONS, R.; FANT, G.; LIN, M. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients, **Journal of the American Medical Association**, v. 306, n. 17, p. 1891-901, 2011.

EUVRARD, S.; KANITAKIS, J.; POUTEIL-NOBLE, C.; DISANT, F.; DUREAU, G.; VILLAINE, F.; CLAUDY, A.; THIVOLET, J. Aggressive squamous cell carcinomas in organ transplant recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 27, p.1767-1768, 1995.

EUVRARD, S.; KANITAKIS, J.; CLAUDY, A. Skin cancers in organ transplant recipients. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1681-1691, 2003.

FANTINI, M.C.; BECKER, C.; KIESSLICH, R.; NEURATH, M.F. Drug Insight: novel small molecules and drugs for immunosuppression. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v.3, p. 633-44, 2006.

FARIA, M.H.G.; RABENHORST, S.H.B. Impacto do oncogene *C-MYC* no câncer, **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 2, p. 165-71, 2006.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronucleus in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, p. 29-36, 1985.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. **Environ Health Perspect**, v. 101, p. 101-7. 1993

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FIKRAVÁ, P.; STETINA, R.; HRONEK, M.; HYSPLER, R.; TICHÁ, A.; ZADÁK, Z; Application of the comet assay method in clinical studies. **Wiener klinische Wochenschrift – The Central European Journal of Medicine**, v. 123, p. 693-9, 2011.

FISCHEREDER, M. Cancer in patients on dialysis and renal transplantation. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 23, p. 2457-60, 2008.

FLAHERTY, D. N. Single Nucleotide polymorphisms, drug metabolism and untoward health effects. **Journal of Medical and Biological sciences**, v. 1, p. 01-08, 2007.

FORNELLI, F.; MINERVINI, F.; LOGRIECO, A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 74-9, 2004.

- FRAILE, P.; GARCIA-COSMES, P.; MARTIN, V.; GARCIA-BERNALT, V.; TABERNERO, J.M. Non-skin solid tumors as a cause of morbidity and mortality after liver transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 4, p. 2433-4, 2009.
- FRESHNEY, I. Application of cell culture to toxicology. **Cell Biology and Toxicology**, v. 17, p. 213-30, 2001.
- GARCIA, S.C.; LOPES, L.S.; SCHOTT, K.L.; BECK, S.T.; POMBLUM, V.J. Ciclosporina A e Tacrolimus: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 6, p. 393-401, 2004.
- GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of immunological Methods**, v. 94, p. 57-63, 1986.
- GONG, W.; WHITCHER, G. H.; TOWNAMCHAI, N.; XIAO, X.; GE, F. Biomarkers for Monitoring Therapeutic Side Effects or Various Supratherapeutic Confounders after Kidney Transplantation **Transplantation Proceeding**, v. 44, p. 1265–1269, 2012.
- GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. **Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas**. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental, 1ª. edição: Editora da Ulbra, p.247-79, 2003.
- GRUIJL, F. R.; VAN KRANEN, H. J.; MULLENDERS, L. H. F. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, p. 19-27, 2001.
- GUTIERREZ-DALMAU, A.; CAMPISTOL, J. M. Immunosuppressive therapy and malignancy in organ transplant recipients: A systematic review. **Drugs**, v. 67, p. 1167-1198, 2007.
- HALL, T. BioEdit Alignment Editor Version 7.09. Ibis Biosciences, 1997. Disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-73, 2011.
- HEDDLE, J. A. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. In: **Mutation-induced chromosome damage to man**. Ed. by EVANS, H. J.; LLOYD, D. C.; Edinburgh University Press, p. 191 - 200, 1976.
- HERMAN-EDELSTEIN, M.; ROZEN-ZVI, B.; ZINGERMAN, B.; LICHTENBERG, S.; MALACHI, T.; GAFTER, U.; ORI, Y. Effect of immunosuppressive drugs on DNA repair in human peripheral blood mononuclear cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 66, p. 111-15, 2012.
- HELLERBRAND, C.; BUMES, E.; BATAILLE, F.; DIETMAIER, W.; MASSOUMI, R.; BOSSERHOFF, A. K. Reduced expression of CYLD in human colon and hepatocellular carcinomas. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 21-27, 2007.

HOFBAUER, G. F. L.; BAVINCK, J. N. B.; EUVRARD, S. Organ transplantation and skin cancer: basic problems and new perspectives. **Experimental Dermatology**, v. 19, p. 473-482, 2010.

IANHEZ, L.E. **Transplante renal: aspectos clínicos e práticos**. São Paulo: Produtos Roche, 1ª edição, p. 11-155, 2001.

IANHEZ, L.E. **Transplante renal: Seguimento a longo prazo**. São Paulo: Lemos Editorial, 1ª edição, p. 5 – 188, 2002.

ISHIKAWA, Y.; TSUNODA, K.; SHIBAZAKI, M.; TAKAHASHI, K.; AKASAKA, T.; MASUDA, T.; MAESAWA, C. Downregulation of cylindromatosis gene, CYLD, confers a growth advantage on malignant melanoma cells while negatively regulating their migration activity. **International Journal of Oncology**, v. 41, p. 53-60, 2012.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207-221, 2008.

KASISKE, B.L.; GILBERTSON, D.T.; WANG, C. cancer after kidney transplantation in the United States. **American Journal of Transplantation**, v. 4, p. 905-13, 2004.

KASISKE, B.L.; ZEIER, M.G.; CHAPMAN, J.R.; CRAIG, J.C.; EKBERG, H.; GARVEY, C.A.; GREEN, M.D.; JHA, V.; JOSEPHSON, M.A.; KIBERD, B.A.; KREIS, H.A.; McDONALD, R.A.; NEWMANN, J.M.; OBRADOR, G.T.; VICENTI, F.G.; CHEUNG, M.; EARLEY, A.; RAMAN, G.; ABARIGA, S.; WAGNER, M.; BALK, E.M. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. **International Society of Nephrology**, v. 77, p. 299–311, 2010.

KE, H.; AUGUSTINE, C. K.; GANDHAM, V. D.; JIN, J. Y.; TYLER, D. S.; AKIYAMA, S. K.; HALL, R. P.; ZHANG, J. Y. CYLD inhibits melanoma growth and progression through suppression of the JNK/AP-1 and β 1-integrin signaling pathways. **Journal Investigation. Dermatology**, v. 133, p. 221-229, 2013.

KEATS, J. J.; FONSECA, R.; CHESI, M.; SCHOP, R.; BAKER, A.; CHNG, W. J.; VAN WIER, S.; TIEDEMANN, R.; SHI, C. X.; SEBAG, M.; BRAGGIO, E.; HENRY, T.; ZHU, Y. X.; FOGLE, H.; PRICE-TROSKA, T.; AHMANN, G.; MANCINI, C.; BRENTS, L. A.; KUMAR, S.; GREIPP, P.; DISPENZIERI, A.; BRYANT, B.; MULLIGAN, G.; BRUHN, L.; BARRETT, M.; VALDEZ, R.; TRENT, J.; STEWART, A. K.; CARPTEN, J.; BERGSAGEL, P. L.; Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. **Cancer Cell**, v. 12, p. 131-144, 2007.

KELLY, G.E.; SHEIL A.G.R. Sister chromatid exchange in lymphocytes from renal transplant recipients with and without cancer. **British Journal of Cancer**, v. 48, p. 797-801, 1983.

KIM, H.; YOON, S.C.; LEE, T.Y.; JEONG, D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. **Toxicology Letters**, v. 184, p. 13-7, 2009

- KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHY, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Communication**, v. 3, p.103-15, 1995.
- KRUSCHAL, C.; THOMS, K. M.; SCHUBERT, S.; SCHÄFER, A.; BOECKMANN, L.; SCHÖN, M. P.; EMMERT, S. Skin cancer in organ transplant recipients: effects of immunosuppressive medications on DNA repair. **Experimental Dermatology**, v. 21, p. 2-6, 2011.
- KUSCHAL, C.; THOMS, K. M.; BOECKMANN, L.; LASPE, P.; APEL, A.; SCHÖN, M. P.; EMMERT, S. Cyclosporin A inhibits nucleotide excision repair via downregulation of the xeroderma pigmentosum group A and G proteins, which is mediated by calcineurin inhibition. **Experimental Dermatology**, v. 20, p. 795–799, 2011.
- KURTOGLU, E.L.; YUKSEL, S. Genotoxic effects of Tacrolimus on human lymphocytes cells. **Human Genetics**, v. 48, n. 6, p. 651-655, 2011.
- LASMAR, E.P.; LASMAR, M.F.; LASMAR, L.F.; LIMA, P.V.; FUJI, J.B. Análise crítica de pacientes com mais de dez anos de transplante renal. **Jornal Brasileiro de Transplante**, v. 8, p. 435-7, 2005.
- LITTLEWOOD, T.D.; KREUZALER, P.; EVAN, G.I. All things to all people. **Cell**, v. 151, p. 11-3, 2012.
- LOPES, L.C.; ALBANO, F.; LARANJA, G.A.T.; ALVES, L.M.; SILVA, L.F.M.; SOUZA, G.P.; ARAUJO, I.M.; NOGUEIRA-NETO, J.N.; FELZENSZWALB, I.; KOVARY, K. Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology Letters**, v. 116, p. 189-98, 2000.
- MADAM, V.; LEAR, J.T.; SZEIMIES, R. Non-melanoma skin cancer. **Seminar**, v. 375, p. 673-85, 2010.
- MALUF, S.W.; ERDTMANN, B. Biomonitorização do Dano Genético em Humanos. In: RIBEIRO, L.R; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, E.K. **Genética Toxicológica**. Ed. Alcance, p. 183-205, 2003.
- MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. b-Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Reports**, v. 9, p. 783-89, 1985.
- MASOUMI, K. C.; SHAW-HALLGREN, G.; MASSOUMI, R. Tumor suppressor function of CYLD in nonmelanoma skin cancer. **Journal of Skin Cancer**, p. 1-10, 2011.
- MARTINEZ, M.A.R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L.S.; RUIZ, I.R.G.; NETO, C.F. Molecular genetics of non-melanoma skin cancer. **Anais Brasileiro de dermatologia**. v. 81, n. 5, p. 405-19, 2006.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, P.V.; AKA, I.; DECORDIER, M.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v.88, p. 1515-31, 2006.

MATSUDA, S.; KOYASU, S. Mechanisms of action of cyclosporine - Review. **Immunopharmacology**, v. 47, p. 119-25, 2000.

McKELVERY-MARTINS, V. J.; GREEN, M. H. L.; SCHMEZER, P.; POOL-ZOBEL, B. L. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. **Mutation Research**, v. 288, p. 47-63, 1993.

MORRIS, R.G. Cyclosporin therapeutic drug monitoring an established service. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, p. 33-46, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p.55-63, 1983.

NIKOLAOU, K.; TSAGARATOU, A.; EFTYCHI, C.; KOLLIAS, G.; MOSIALOS, G.; TALIANIDIS, I. Inactivation of the deubiquitinase CYLD in hepatocytes causes apoptosis, inflammation, fibrosis, and cancer. **Cancer Cell**, v. 21, p. 738-750, 2012.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1559-1582, 2006.

NIE, Z.; HU, G.; WEI, G.; CUI, K.; YAMANE, A.; RESCH, W.; WANG, R.; GREEN, D.R.; TESSAROLLO, L.; CASELLAS, R.; ZHAO, K.; LEVENS, D. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. **Cell**, v. 151, p. 68-79, 2012.

O'CALLAGHAN, C.A. Kidney transplantation – the long term view. **International Journal of Medicine**, v. 101, p. 985-986, 2008.

OECD Guideline 487, **OECD Guideline for the testing chemicals draft proposal for a new guideline 487**, 2006.

OEKJEN, E.; BAUN, D.; BEIMESCHE, S.; KRAUSE, D.; CIERNY, I.; BLUME, R.; DICKEL, C.; WEHNER, S.; KNEPEL, W. Inhibition of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs Cyclosporin A and Tacrolimus in primary, mature islets of transgenic mice **Molecular Pharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1289-95, 2003.

OLIVEIRA, V.D.; ZANKL, H.; RATH, T. Mutagenic and cytotoxic effects of immunosuppressive drugs on human lymphocyte culture. **Experimental and Clinical Transplantation**, v. 2, n. 2, p. 273-9, 2004.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectroforetic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291-8, 1984.

PETERS, D.H.; FITTON, A.; PLOSKER, G.L.; FAULDS, D. Tacrolimus: A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. **Drugs**, v. 46, n. 4, p. 746-94, 1993.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 29, p. 2004-2007, 2001.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 29, p. 2004-2007, 2001.

PFAFFL M W. Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: *A-Z of Quantitative PCR*. S.A.Bustin, ed. International University Line.La Jolla,p. 87-120, 2004.

PFAFLL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 36, 2002.

PIERCE, B. A. Mutações gênicas e Reparo do DNA. In: **Genética: Um enfoque conceitual**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 456-489, 2004.

PINTO, L.F.R.; FELZENSZWALB, I. **Genética do câncer humano**. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental, 1ª. edição: Editora da Ulbra, p. 29-48, 2003.

PLOSKER, G.L.; FOSTER, R.H. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. **Drugs**, v. 59, n. 2, p. 323-89, 2000.

POLLARD, J. D.; HANASONO, M. M.; MIKULEC, A. A.; LE, Q. T.; TERRIS, D. J. Head and neck cancer in cardiothoracic transplant recipients. **Laryngoscope**, v. 110, p. 1257-1261,2000.

PONTICELLI, C. Cyclosporine: From renal transplantation to autoimmune diseases. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1051, p. 551-558, 2005.

PRATSCHKE, J.; NEUHAUS, R.; TULLIUS, S.G.; HALLER, G.W.; JONAS, S.; STEINMUELLER, T.; BECHSTEIN, W.O.; NEUHAUS, P. Treatment of cyclosporine-related adverse effects by conversion to Tacrolimus after liver transplantation. v. 64, n. 6, p. 938-40, 1997.

RATH, T.; OLIVEIRA-FRICK, V. Mutagenicity of immunosuppressive medications among renal transplant recipients. **Americam Jornal of Nefhrology**, v. 30, p. 514-420, 2009.

REICHENSPUMER, H. Overview of Tacrolimus-based immunosuppression after heart or lung transplantation. **Journal Heart Lung Transplantation**, v. 24, n. 119, p. 119-30, 2005.

REISSIG, S.; HÖVELMEYER, N.; WEIGGMANN, B.; NIKOLAEV, A.; KALT, B.; WUNDERLICH, T. F.; HAHN, M.; NEURATH, M. F.; WAISMAN, A. The Tumor

Suppressor CYLD Controls the Function of Murine Regulatory T Cells. **Journal of Immunology**, v. 189, p. 4770-4776, 2012.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. Ulbra, p. 21-27, 2003.

RYFFER, 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^a ed., New York, Heasquarters, p. 477-498, 1998.

SAMANTA, S.; DEY, P. Micronucleus and its applications. **Diagnostic Cytopathology**. v. 40. p. 84-90, 2010.

SASAKI, Y. F.; NAKAMURA, T.; KAWAGUCHI, S. What is better experimental design for in vitro comet assay to detect chemical genotoxicity? **Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences**, p. 499-504, 2007.

SCHRÖPPEL B, HEEGER P S. Gazing into a crystal Ball to predict kidney transplant outcome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 1803-1806, 2010.

SHAN, F.; ZHAO, W.; GU, W. Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation. **Molecular Cell**, v. 36, n. 3, p. 469-476, 2009.

SKRZYPSKI, M. Quantitative reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in translational oncology: Lung cancer perspective. **Lung Cancer**, v. 59, p. 147-154, 2008.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

STEGMEIER, F.; SOWA, M.E.; NALEPA, G.; GYGI, S.J.; HARPER, W.; ELLEDGE, S.J. The tumor suppressor CYLD regulates entry into mitosis. **Cell Biologic**, v. 104, n. 21, p. 8869-8874, 2007.

TAJARA, E.H. Ciclo Celula. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. 1^a. Edição. São Paulo, 2004. p. 65-76.

TEDESCO, D.; HARAGSIM, L. Cyclosporine: A review. **Journal of Transplantation**. v. 2012, p.1-7, 2012.

TERRADAS, M.; MARTTIN, M.; TUSELL, L.; GENESCA, A. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutation Research**, v. 705, p. 60-67, 2010.

THOMSON, A.W.; BONHAM, C.A.; ZEEVI, A. Mode of action of Tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. **Ther Drug Monit**, v. 17, n. 6, p. 584-591, 1995.

TICE, R.R.; AGURELL E.; ANDERSON D.; BURLINSON B.; HARTMANN A.; KOBAYASHI H.; MIYAMAE Y.; ROJAS E.; RYU J. C.; SASAKI Y. F. The single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-21, 2000.

TOLOU-GHAMARI, Z.; PALIZBAN, A.A. Laboratory monitoring of Cyclosporine pre-dose concentration (C0) after kidney transplantation in Isfahan. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 81-5, 2003.

TSE, K.C.; CHAN, T.M. Nephrotoxicity of immunosuppressives agents in renal transplantation. **Hong Kong Journal of Nephrology**, v. 4, n. 2, p. 65-72, 2002.

URBANIK, T.; KOHLER, B. C.; BOGER, R. J.; WORNIS, M. A.; HEEGER, S.; OTTO, G.; HOVELMEYER, N.; GALLE, P. R.; SCHUCHMANN, M.; WAISMAN, A.; SCHULZE-BERGMANN, H. Down-regulation of CYLD as a trigger for NF- κ B activation and a mechanism of apoptotic resistance in hepatocellular carcinoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 38, p. 121-131, 2011.

VAJDIC, C.M.; LEEUWEN, M.T. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. **International Journal of Cancer**, v. 125, p. 1747-1754, 2009.

VARGA, D.; HOEGEL, J.; MAIER, C.; JAINTA, S.; HOEHNE, M.; PATINO-GARCIA, B.; MICHEL, I.; SCHWARZ-BOEGER, U.; KIECHLE, M.; KREIENBERG, R.; VOGEL, W. On the difference of micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes between breast cancer patients and controls. *Mutagenesis*. v. 21, n. 5, p. 313-320, 2006.

VASUDEV, B.; HARIHARAN, S. Cancer after renal transplantation. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 16, p. 523-528, 2007.

VENESS, M. J.; QUINN, D. I.; ONG, C. S.; KEOGH, A. M.; MACDONALD, P. S.; COOPER, S. G.; MORGAN, G. W. Aggressive cutaneous malignancies following cardiothoracic transplantation: the Australian experience. **Cancer**, v. 85, p. 1758 - 1764, 1999.

VILLELA, I.Z.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H.C.; SILVEIRA, J.D. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Genética Toxicológica**. Ed. Alcance, p. 147-163, 2003.

WISGERHOF, H.C.; GEEST, L.G.M.; FIJTER, J.W.; HAASNOOT, G.W.; CLAAS, F.H.J.; CESSIE, S.; WILLEMZE, R.; BAVINCK, J.N.B. Incidence of cancer in kidney-transplant recipients: A long-term cohort study in a single center. **Cancer Epidemiology**. n. 35, p. 105-111, 2011.

XIAO, Z.; LI, C.; SHAN, J.; LUO, L.; FENG, L.; LU, J.U.N.; LI, S.; LONG, D.; LI, S. Mechanisms of renal cell apoptosis induced Cyclosporine A: A systematic review of *in vitro* studies. **American Journal of Nephrology**, v. 33, p. 558-566, 2011.

YAN, W.; WISTUBA, I.I.; EMMERT-BUCK, M.R.; ERICKSON, H.S. Squamous cell carcinoma – similarities and differences among anatomical sites. **American journal Cancer Research**. v. 1, n.3, p. 275-300, 2011

YOCUM, D.E. Cyclosporine, FK-506, rapamycin, and other immunomodulators. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**. v. 22, p. 133-153, 1996.

YUZAWA, K.; KONDO, I.; FUKAO, K.; IWASAKI, Y.; HAMAQUCHI, H. Mutagenicity of Cyclosporine. induction of sister chromatid exchange in human cells. **Transplantation**, v 42, n1, p. 61-3, 1986.

ZHENG, G.; HU, L.; HUANG, W.; CHEN, K.; ZHANG, X.; YANG, S.; SUN, J.; JIANG, Y.; LUO, G.; KONG, X. CYLD Mutation Causes Multiple Familial Trichoepithelioma in Three Chinese Families. **Mutation in Brief**, v. 23, p. 1-8, 2004.

ZHONG, S.; FIELDS, C. R.; SU, N.; PAN, Y. X.; ROBERTSON, K. D. Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer. **Oncogene**, v. 26, p. 2621–2634, 2007.

ZUUREN, E.J.Z.; VISSCHER, J.G.A.M.; BAVINCK, J.N.B. Carcinoma of the lip in kidney transplant recipients. **Jornal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 3, p. 497-499, 1998.