



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

PATRÍCIA CARVALHO DE SOUZA

MODELO EXPERIMENTAL DE IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA
EM *Rattus norvegicus* DA LINHAGEM WISTAR E PRIMATAS NÃO
HUMANOS DA ESPECIE *Cebus apella*: ANÁLISE
GENOTOXICOLÓGICA.

BELÉM – PARÁ

2011

PATRÍCIA CARVALHO DE SOUZA

MODELO EXPERIMENTAL DE IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA
EM *Rattus norvegicus* DA LINHAGEM WISTAR E PRIMATAS NÃO
HUMANOS DA ESPECIE *Cebus apella*: ANÁLISE
GENOTOXICOLÓGICA.

Tese apresentada à Universidade Federal do Pará, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração em Biologia Celular, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Rommel M. R. Burbano

BELÉM – PARÁ

2011

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

Souza, Patrícia Carvalho de

Modelo experimental de imunossupressão com ciclofosfamida em *Rattus norvegicus* da linhagem wistar e primatas não humanos da espécie *Cebus apella*: análise genotoxicológica/ Patrícia Carvalho de Souza; orientador, Rommel M. R. Burbano– 2011.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2011.

1. Imunossupressão. 2. Ciclofosfamida. 3. Agentes imunossupressores. 4. Rato como animal de laboratório. 5. Primata como animal de laboratório. I. Título.

CDD – 20. ed. 615.7

PATRÍCIA CARVALHO DE SOUZA

MODELO EXPERIMENTAL DE IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA
EM *Rattus norvegicus* DA LINHAGEM WISTAR E PRIMATAS NÃO
HUMANOS DA ESPECIE *Cebus apella*: ANÁLISE
GENOTOXICOLÓGICA.

Tese apresentada à Universidade Federal do Pará, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração em Biologia Celular, para a obtenção do título de Doutora.

Data: 23 de Dezembro de 2011

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano (Orientador) - UFPA

Prof. Dr. André Salim Khayat – UFPA

Prof. Dr. Ney Pereira dos Santos – UFPA

Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto - UFPI

*Ao meu orientador e grande amigo,
Rommel Mario Rodrigues Burbano.
Obrigada.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente, ao meu marido Gabriel, meu amor e grande companheiro. Meu grande incentivador para o término deste trabalho.

Ao meu anjo Gael, apesar de breve, sua existência foi intensa para mim.

Ao meu outro filho: é por você que este trabalho foi realizado.

Mas agradeço, principalmente, ao meu orientador Prof. Dr. Rommel Burbano, pela nova oportunidade dada com a realização deste trabalho. Mas acima de tudo, por sua amizade, pois você é um grande amigo.

Ao Instituto Evandro Chagas e ao Centro Nacional de Primatas pela disponibilidade dos animais e apoio.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.” (Roberto Shinyashiki)

RESUMO

Foi estabelecido um modelo de imunossupressão em roedores por inoculação do agente alquilante Ciclofosfamida (CY). A administração de 50 mg/kg de CY em ratos Wistar provocou uma significativa diminuição dos parâmetros de celularidade e peso relativo dos órgãos linfóides. Pela análise da titulação de anticorpos, do ensaio sobre as células formadoras de placa e do teste de hemólise foi comprovada que a imunidade humoral dos roedores sofreu supressão. Foram realizadas quatro inoculações desse imunossupressor e a periodicidade entre as inoculações foi determinada pela recuperação dos níveis de normalidade dos parâmetros supracitados. A alteração na contagem diferencial de células sanguíneas brancas representou o maior efeito adverso da CY, observado nos parâmetros de laboratório analisados nos *Cebus apella*. Nas duas vezes que foi administrada a droga houve redução no número de linfócitos e posteriormente diminuição de neutrófilos, porém somente na segunda foi observada a imunossupressão. Visto a proximidade filogenética dos primatas não humanos, este desenho experimental será de suma importância para o estudo de tumores em diversas fases do desenvolvimento e principalmente para testes de novos fármacos e esquemas terapêuticos. Com relação às análises de genotoxicidade da CY podemos concluir que em ratos Wistar, as administrações de CY aumentaram significativamente a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (MN PCEs) e provocaram efeito citotóxico ($P < 0.05$). Em *C. apella*, os linfócitos do sangue periférico, após o tratamento com CY apresentaram um aumento significativo da média de MN/1000 células em relação aos linfócitos controle ($P < 0.05$). A concentração de CY de 50mg/kg, em *C. apella*, corresponde à concentração DL50 da droga, visto que 50% desses animais morreram durante o experimento de imunossupressão. Até o desenvolvimento deste trabalho, não se conhecia a concentração correspondente ao DL50 nessa espécie. Ao comparamos as duas espécies de animais utilizadas neste trabalho, os primatas não humanos têm uma recuperação imune mais rápida em relação aos ratos Wistar. Provavelmente a capacidade de metabolização da droga seja mais eficaz em *C. apella*. Nossos resultados apóiam, portanto, que os primatas não humanos constituem os melhores modelos experimentais devido a sua grande proximidade evolutiva e filogenética com o ser humano.

Palavras-chave: Ratos Wistar, *Cebus apella*, Imunossupressão, Ciclofosfamida.

ABSTRACT

We established a model of immunosuppression in rats by inoculation of the alkylating agent Cyclophosphamide (CY). The administration of 50 mg/kg CY in Wistar rats caused a significant decrease in the parameters of cellularity, and relative weight of lymphoid organs. For analysis of antibody titre of the test on the plaque forming cells and hemolysis test was proven that the humoral immunity of rodents suffered suppression. Four inoculations were carried out and this immunosuppressive intervals between inoculations was determined by recovery of normal levels of the aforementioned parameters. The change in differential counts of white blood cells represented the greatest adverse effect of CY, observed in laboratory parameters analyzed in *Cebus apella*. Both times it was administered the drug decreased the number of lymphocytes and neutrophils subsequently decreased, but only in the second was observed immunosuppression. Since the phylogenetic proximity of non-human primates, this experimental design is of paramount importance for the study of tumors at various stages of development and mainly for testing new drugs and therapeutic regimens. With respect to genotoxicity analysis of CY can conclude that in Wistar rats, the administration of CY significantly increased frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes (MN ECPs) and caused a cytotoxic effect ($P < 0.05$). In *C. apella*, the peripheral blood lymphocytes after treatment with CY showed a significant increase in media MN/1000 lymphocyte cells compared to control ($P < 0.05$). The concentration of 50mg/kg of CY in *C. apella*, LD50 is the concentration of the drug, whereas 50% of these animals died during the trial of immunosuppression. Until the development of this work, do not know the concentration corresponding to the LD50 in this species. In comparing the two species of animals used in this work, non-human primates have a more rapid immune recovery compared to rats. Probably the ability to metabolize the drug is more effective in *C. apella*. Our results support, therefore, that non-human primates are the best experimental models due to its great evolutionary and phylogenetic proximity to humans.

Key-words: Wistar rats, *Cebus apella*, Immunosuppression, Cyclophosphamide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Molécula de CY, um agente alquilante que é ativado enzimaticamente no organismo em mostarda de fosforamida, acroleína e outros metabólitos farmacologicamente ativos e citotóxicos. 25
- Figura 2 - A figura demonstra os genes envolvidos na biotransformação da CY e seus metabólitos e inclui as vias de ativação, desativação e toxicidade. 26
- Figura 3 - Exemplar da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar. Observar o padrão albino, orelhas alongadas, cabeça grande e comprimento da cauda menor que o comprimento corporal. 30
- Figura 4 - Exemplar adulto da espécie *Cebus apella*. A espécie apresenta como característica principal o desenvolvimento de tufo de pelos escuros na cabeça (localizados nas têmporas e ápice) e coloração corporal amarela e dos membros e cauda escuros. 32
- Figura 5 - Ilustração da origem do MN a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro (a); em (b), a formação de uma ponte citoplasmática e de um MN a partir de um fragmento cromossômico acêntrico; ressalta ainda a ação da citocalasina-B que bloqueia a citocinese. 35
- Figura 6 - Ilustração de várias alterações que podem ser avaliadas pelo teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese pela citocalasina-B. 36
- 3.2.1 Fluxograma do grupo experimental em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar 40
- 3.2.2 Fluxograma experimental em *Cebus apella* 41
- Figura 7 - Supressão da imunidade humoral induzida pela ciclofosfamida analisada através do ensaio sobre as células formadoras de placa. Os valores são medias e desvios padrão de cinco ratos eutanaziados entre o primeiro e o quinto dia após a administração de ciclofosfamida.*P<0,05

quando comparado com o grupo controle.

51

Figura 8 - Supressão da imunidade humoral induzida pela ciclofosfamida analisada através do teste de hemólise. Os valores são medias e desvios padrão de cinco ratos eutanaziados entre o primeiro e o quinto dia após a administração de ciclofosfamida. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Incidências de tumores em indivíduos com imunodeficiência	22
Tabela 2 -	Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre o peso relativo dos órgãos em <i>Rattus norvegicus</i> da linhagem Wistar	50
Tabela 3 -	Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre a celularidade dos órgãos linfóides de <i>Rattus norvegicus</i> da linhagem Wistar	50
Tabela 4 -	Efeito supressor da ciclofosfamida sobre a titulação de anticorpos em <i>Rattus norvegicus</i> da linhagem Wistar	51
Tabela 5 -	Contagem de células sanguíneas brancas de <i>Cebus apella</i> submetidos a tratamento com ciclofosfamida	53
Tabela 6 -	Frequência de micronúcleos no sangue periférico de <i>Rattus norvegicus</i> da linhagem Wistar após tratamento com CY	54
Tabela 7 -	Frequência, distribuição dos micronúcleos (MN) em linfócitos binucleados (BN) de quatro <i>Cebus apella</i> expostos e índice de proliferação de célula binucleadas (IPCB)	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitros
g	Gramma
pH	Potencial hidrogênioônico
rpm	Rotações por minuto
Kg	Quilograma
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
CY	Ciclofosfamida
CENP	Centro Nacional de Primatas
CN	Controle Normal
4-OHCY	4- Hidroxiciclofosfamida
MN	Micronúcleo
SRBC	Eritrócitos de carneiro (<i>Sheep Red Blood Cells</i>)
PFC	Células formadoras de placa
PHA	Fitohemaglutinina
PCE	Eritrócitos policromáticos
NCE	Eritrócitos normocromáticos
PBS	Solução Tampão Fosfato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Sistema Imune	14
1.2	Imunotoxicologia	17
1.3	Imunossupressão	19
1.4	Complicações decorrentes de imunossupressão	21
1.5	Terapia Imunossupressora	22
1.5.1	Agentes citotóxicos.....	23
1.6	Ciclofosfamida	25
1.7	Modelos Experimentais de Imunossupressão	28
1.7.1	Ratos da Linhagem Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>).....	29
1.7.2	Primates Não Humanos da Espécie <i>Cebus apella</i>	31
1.8	Teste do Micronúcleo (MN)	32
2	OBJETIVO	38
2.1	Objetivos Específicos	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Animais	39
3.2	Dosagem e Aplicação de CY	39
3.2.1	Fluxograma do grupo experimental em <i>R. norvegicus</i> da linhagem Wistar.....	40
3.2.2	Fluxograma experimental em <i>C. apella</i>	41
3.3	Anestesia e Eutanásia dos Animais	41
3.4	Análise e Avaliações em <i>R. norvegicus</i>	42
3.4.1	Peso Relativo de Órgãos e Celularidade em <i>R. norvegicus</i> da	

Linhagem Wistar.....	42
3.4.2 Avaliação das Funções da Imunidade Humoral em <i>R. norvegicus</i>	
Linhagem Wistar.....	42
3.4.2.1 Hemoaglutinação.....	43
3.4.2.2 Ensaio sobre as células formadoras de placa em <i>R. norvegicus</i> da linhagem Wistar.....	43
3.4.2.3 Teste de hemólise.....	44
3.5 Análises e Avaliação em <i>C. apella</i>.....	44
3.6 Avaliação dos Efeitos Genotóxicos da Ciclofosfamida.....	45
3.6.1 Técnica da cultura temporária de linfócitos.....	45
3.6.2 Teste do micronúcleo.....	46
3.6.3 Análise do micronúcleo.....	47
3.7 Análise Estatística.....	47
4 RESULTADOS.....	48
4.1 Imunossupressão em <i>R. norvegicus</i> da linhagem Wistar.....	48
4.2 Efeito da CY sobre o peso relativo de órgãos e celularidade em <i>R.</i> <i>norvegicus</i> da linhagem Wistar.....	49
4.3 Efeito da ciclofosfamida sobre a imunidade humoral de <i>R.</i> <i>norvegicus</i> da linhagem Wistar.....	51
4.4 Imunossupressão em <i>C. apella</i>.....	52
4.5 Avaliação dos efeitos genotóxicos da ciclofosfamida.....	53
4.5.1 Análise do micronúcleo em <i>R. norvegicus</i> da linhagem Wistar.....	53
4.5.2 Análise do micronúcleo em <i>C. apella</i>	54
5 DISCUSSÃO.....	56
5.1 Imunossupressão e inoculação tumoral em <i>R. norvegicus</i> da	

	Linhagem Wistar.....	56
5.2	Imunossupressão em <i>C. apella</i>.....	58
5.3	Avaliação dos efeitos genotóxicos da ciclofosfamida.....	60
6	CONCLUSÕES.....	63
7	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Imune

O sistema imune consiste em todas as estruturas e processos que provêm uma defesa do organismo multicelular contra potenciais patógenos, sejam eles vírus, bactérias, fungos, parasitas, substâncias tóxicas, neoplasias ou até mesmo medicações cujo objetivo primordial era sua ação terapêutica. É um sistema bastante singular que pode ser dividido em duas categorias com mecanismos de ação distintos, porém que interagem entre si, que são: a imunidade inata ou inespecífica e a imunidade adaptativa ou específica (FOX, 2007; PRADO et al., 2007).

A imunidade inata ou inespecífica (FOX, 2007), também denominada de imunidade natural (ABBAS et al., 2008) inclui mecanismos de defesa inespecíficos, externos e internos, não necessitando de exposição prévia. Os genes necessários para a imunidade inata são herdados, o que limita o número de genes que podem ser dirigidos a essa tarefa, portanto, os mecanismos imunológicos inatos combatem todas as categorias de patógenos (FOX, 2007).

Os principais componentes externos da imunidade inata são: a barreira física e química da pele, a secreção de lisozima, a alta acidez gástrica, a secreção de muco no trato respiratório, a acidez urinária e o ácido láctico vaginal (FOX, 2007). Os principais componentes internos são: os neutrófilos, os fagócitos mononucleares, células dendríticas, células *Natural Killer* (NK) (ABBAS et al., 2008). Além de interferons, proteínas do sistema de complemento e pirogênio endógeno (FOX, 2007).

As defesas imunológicas inatas proporcionam a primeira linha de defesa do hospedeiro contra microorganismos, ou seja, são as primeiras utilizadas para combater a invasão e a disseminação de infecções (FOX, 2007; ABBAS et al., 2008). Quando essas defesas não são suficientes para destruir os patógenos, os linfócitos podem ser requisitados e suas ações específicas utilizadas para reforçar as respostas imunológicas inespecíficas (FOX, 2007; PRADO et al., 2007).

A imunidade adaptativa ou específica (FOX, 2007), ou também denominada adquirida (ABBAS et al., 2008) é estimulada pela exposição aos antígenos. O número de genes necessários para essa tarefa é muito grande para ser herdado. Em

vez disso, a variação é produzida por alterações genéticas dos linfócitos durante a vida de cada pessoa após o nascimento (FOX, 2007).

Os antígenos são moléculas que estimulam a produção de anticorpos e se combinam especificamente com os anticorpos produzidos. A maioria dos antígenos são moléculas ou partes de moléculas, que comumente são grandes, complexas e estranhas ao sangue e a outros líquidos corporais, pois o sistema imune consegue diferenciar suas “próprias” moléculas das de outros organismos, ou seja, “não próprias”, e normalmente fornece uma resposta imunológica somente contra antígenos não próprios. Os antígenos possuem um número de diferentes sítios antigênicos determinantes ou determinantes antigênicos, os quais são áreas da molécula que estimulam a produção de diferentes anticorpos e a combinação com os mesmos (FOX, 2007; ABBAS et al., 2008).

Os anticorpos são proteínas plasmáticas da classe das gama-globulinas denominadas imunoglobulinas. Existem 5 subclasses de imunoglobulinas, abreviadas como Ig: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Estima-se que existem aproximadamente 100 milhões de trilhões (10^{20}) de moléculas de anticorpos em cada indivíduo (FOX, 2007).

A imunidade adaptativa ou específica compreende um sistema composto pelos linfócitos B naïve (células que nunca encontraram antígenos), linfócitos B (células plasmáticas e de memória), linfócitos T naïve, células T (células T assassinas ou citotóxicas, células T auxiliares e supressoras), além das proteínas do sistema do complemento (FOX, 2007).

Os linfócitos são as únicas células do corpo capazes de reconhecer e distinguir de modo específico diversos determinantes antigênicos, e são, conseqüentemente, responsáveis por duas características definidoras da imunidade adaptativa ou específica, a especificidade e memória (ABBAS et al., 2008).

Os linfócitos B combatem infecções bacterianas, assim como infecções virais, secretando anticorpos no sangue e na linfa, denominada de imunidade humoral ou imunidade mediada por anticorpos. Quando um linfócito B naïve é exposto a um antígeno adequado, isso resulta no crescimento celular seguido por muitas divisões celulares, em que parte se torna células de memória e as outras são transformadas em células plasmáticas, responsáveis pela produção dos anticorpos (FOX, 2007; ABBAS et al., 2008).

Os anticorpos secretados pelas células plasmáticas ligam-se aos antígenos de uma maneira específica. Essa ligação estimula uma cascata de reações através da qual um sistema de proteínas plasmáticas, denominada complemento é ativado. Algumas das proteínas do complemento ativadas matam as células que contém o antígeno, outras promovem a fagocitose, proporcionando uma defesa mais eficaz contra patógenos (FOX, 2007).

Diferentemente dos linfócitos B, os linfócitos T provêm uma proteção imunológica específica sem secretar anticorpos. Tais células atacam células hospedeiras que foram infectadas por vírus ou fungos, células humanas transplantadas e células cancerosas. Para que sua função seja realizada, elas devem estar próximas da célula-vítima, ou ter um contato físico real com a célula para que esta seja destruída. Por esta razão, os linfócitos T são responsáveis pela imunidade mediada por células. O mecanismo de imunidade compreende 3 subpopulações de linfócitos T: as células T assassinas ou citotóxicas, os linfócitos T auxiliares e os linfócitos T supressores (FOX, 2007).

As células T assassinas ou citotóxicas realizam a destruição mediada por células de específicas células vítimas, contudo somente são ativadas por antígenos a elas apresentados sobre a superfície de determinadas células apresentadoras de antígenos (FOX, 2007). As principais células apresentadoras de antígenos são os macrófagos e as células dendríticas, as quais são especializadas em capturar microorganismos e outros antígenos, apresentá-los aos linfócitos e fornecer sinais que estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos (ABBAS et al., 2008). Após a ativação, as células T assassinas secretam moléculas denominadas de perforinas e enzimas denominadas granzimas, que provocam a destruição da célula vítima (FOX, 2007).

Os linfócitos T auxiliares e supressores participam indiretamente da resposta imunológica específica regulando as respostas dos linfócitos B e das células T assassinas. A atividade dos linfócitos B e das células T assassinas é aumentada pelos linfócitos T auxiliares e diminuída pelos linfócitos T supressores. A quantidade de anticorpos secretados em resposta a antígenos é, portanto, afetada pela quantidade relativa entre linfócitos T auxiliares e supressores que se desenvolvem em resposta a um determinado antígeno (FOX, 2007).

É importante salientar que este complexo mecanismo também possui falhas as quais repercutem diretamente na qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

As doenças auto-imunes, as leucemias, alergias e imunodeficiências são um exemplo do impacto que essas imperfeições do sistema imunitário podem acarretar à saúde de uma população. Em algumas doenças malignas, como o câncer, a depressão das funções da imunidade ganham especial destaque por seu efeito potencializador. Pacientes portadores de doenças neoplásicas e infiltrativas possuem uma série de defeitos imunológicos, os quais facilitam a progressão daquela entidade (PRADO et al., 2007).

Entre os defeitos no sistema imune daqueles pacientes, citam-se: a perda do reconhecimento da célula tumoral como estranha ao hospedeiro, diminuição no número de linfócitos, redução da resposta de hipersensibilidade retardada, decréscimo na proliferação de linfócitos T, em face de mitógenos, menor produção de imunoglobulinas, menor resposta oxidativa dos monócitos, aumento da atividade supressora dessas células e resposta diminuída às citocinas (PRADO et al., 2007).

Com base nessas informações, torna-se imprescindível a obtenção de conhecimento detalhado acerca da funcionalidade e nuances do sistema imune. Por essa razão a elaboração de modelos experimentais de imunossupressão mostra-se como uma importante forma de avaliação do sistema imunológico. Esses modelos quando bem desenvolvidos e de boa reprodutibilidade, possibilitam a realização de muitos outros experimentos, como por exemplo, o desenvolvimento de técnicas de mensuração da resposta imune, a avaliação de novas substâncias voltadas ao combate à imunossupressão e possibilita também o estudo de condições patológicas potencializadas pela depressão do sistema imune, como o câncer (BIN-HAFEEZ et al, 2001; GARCIA et al, 2004).

1.2 Imunotoxicologia

Imunotoxicologia é a ciência que estuda a ação deletéria de xenobióticos sobre o sistema imune. Sendo um dos ramos mais recentes da toxicologia, esta ciência teve seu início relacionado ao cenário clínico da década de 1960. Neste período observa-se a introdução e ampla utilização de potentes drogas imunossupressoras, resultando nas primeiras descrições de efeitos adversos causados por estes novos tratamentos e, conseqüentemente, estimulando o interesse pela área de imunossupressão induzida por xenobióticos (COSTA, 2001).

De acordo com o mesmo autor, assim sendo, a introdução da terapia imunossupressora foi um marco importante que contribuiu não somente no progresso do campo de transplantes de órgãos, mas também colocou em evidência os efeitos adversos induzidos por substâncias imunossupressoras, gerando a preocupação com a possibilidade de que condições semelhantes de imunossupressão pudessem ser acidentalmente induzidas via exposição ocupacional ou ambiental. Isso fez com que nas décadas de 1970 e 1980, imunologistas e toxicologistas trabalhassem juntos na busca de estratégias para a avaliação não-clínica de imunotoxicidade. O produto final do esforço destas duas áreas foi o desenvolvimento de alguns modelos preditivos de imunossupressão induzida. Neste período, várias substâncias (entre elas, medicamentos, aditivos alimentares, pesticidas etc.) foram avaliados quanto ao seu potencial imunossupressor, enquanto outros aspectos menos estudados, porém de igual importância, isto é, indução de hipersensibilidade e auto-imunidade, foram posteriormente avaliados.

Hoje, há diversos meios de se avaliar a indução de imunossupressão, entre eles, testes relacionados à imunidade não-específica (atividade das células *natural killer* (NK), fagocitose, etc), à imunidade humoral (ensaio das células formadoras de placa, proliferação de células B, etc) ou relacionados à imunidade mediada por células T (proliferação *in vitro* ou *in vivo*). Estas avaliações, via de regra, acompanham testes de toxicidade crônica, em que os animais são submetidos a longo período de exposição ao xenobiótico em questão, e então avaliados por meio dos testes acima relacionados. Tais estudos, além de longos, são bastante complexos. Frequentemente envolvem mão de obra especializada, um grande número de animais, reagentes e sistemas caros, e ainda, devido a longa duração da exposição, representam um investimento alto na manutenção dos animais em teste (COSTA, 2001).

Diante disso, observa-se uma preocupação crescente com o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos modelos que apresentem potencial preditivo para a avaliação de risco em imunotoxicologia. Tais modelos devem ser mais simples e contribuir num primeiro momento para a avaliação de risco de xenobióticos, permitindo uma análise inicial sobre o potencial imunomodulador de determinada substância e, desta forma direcionando estudos posteriores mais complexos. Tais modelos atenderiam às necessidades rotineiras de avaliação de

segurança e teriam aplicação importante, por exemplo, em estudos pré-clínicos de novos produtos (COSTA, 2001).

1.3 Imunossupressão

Abbas et al. (2008) definiu a imunossupressão como a inibição de um ou mais componentes do sistema imune adaptativo ou inato em decorrência de uma doença subjacente ou induzida intencionalmente por fármacos com a finalidade de prevenir ou tratar rejeição de enxertos ou doença auto-imune.

Uma das funções essenciais do sistema imunológico é a defesa contra a infecção. Crianças nascidas com um defeito numa área crítica desse sistema sofrem infecções contínuas e, em muitos casos, dependendo do grau de comprometimento dos componentes imunológicos afetados ao nascimento, podem vir a morrer se não houver acesso à tecnologia médica avançada (COSTA, 2001). A habilidade do organismo em responder de forma específica, flexível e mais eficaz à invasão de agentes estranhos ao organismo está filogeneticamente associada ao aparecimento dos vertebrados. Enquanto animais inferiores possuem os chamados mecanismos imunológicos inatos ou inespecíficos, tais como a fagocitose, animais superiores desenvolveram uma resposta imunológica adaptativa ou adquirida (ABBAS et al. 2008). A característica fundamental de componentes do sistema imune adaptativo, presente em vertebrados é a habilidade desenvolvida por membros deste filo no reconhecimento daquilo que não é próprio e na destruição/eliminação subsequente do corpo estranho que pode representar risco ao organismo. Os mecanismos específicos de resistência do hospedeiro (memória, especificidade e capacidade de discriminar entre o que lhe é próprio e não-próprio) conferem aos organismos superiores importantes vantagens (ABBAS et al., 2008).

Entretanto, esta reatividade imunológica contra agentes estranhos ao organismo pode estar comprometida em diversas situações. Um exemplo é o acometimento de determinados indivíduos com conhecida predisposição genética para imunodeficiências específicas. A doença de Bruton (ou agamaglobulinemia ligada ao sexo), a deficiência isolada da IgA, a síndrome de DiGeorge (hipoplasia tímica), a imunodeficiência combinada grave (de células T e B), a síndrome de Wiskott-Aldrich (imunodeficiência com trombocitopenia), a síndrome do linfócito

exposto, a deficiência de proteína de adesão leucocitária e as deficiências genéticas do sistema complemento são os exemplos deste grupo de doenças, comumente conhecidas como imunodeficiências primárias (REY, 1999) e relacionadas a erros genéticos que afetam a imunidade específica (humoral ou celular) ou os mecanismos imunológicos inespecíficos do hospedeiro (mediados por proteínas do sistema complemento e células como os fagócitos e as células NK). As manifestações clínicas e o tratamento proposto para cada tipo de imunodeficiência primária dependem fortemente do componente do sistema imune por ela afetado. Assim sendo, não causa espanto a constatação de que as deficiências genéticas do sistema complemento, por exemplo, possam predispor o paciente a infecções piogênicas, ou seja, aquelas usualmente causadas por bactérias que só são fagocitadas com sucesso após opsonização (papel do complemento). Por outro lado, pacientes acometidos com deficiência seletiva de células T, isto é, síndrome de DiGeorge, apresentam vulnerabilidade a um padrão acentuadamente mais abrangente de infecções, sendo suscetíveis a aqueles vírus e fungos, que em indivíduos imunocompetentes seriam erradicados por componentes da imunidade do tipo celular. De um modo geral pode-se dizer que o estudo dos casos de imunodeficiência primária vem contribuindo muito para ampliar os conhecimentos sobre imunologia, tendo revelado as causas precisas de grande número de enfermidades devidas a erros genéticos (COSTA, 2001).

Entretanto, erros genéticos não são os únicos fatores que podem levar ao comprometimento de componentes do sistema imune. Também a presença de determinados fatores exógenos pode induzir o aparecimento de imunodeficiências. A imunidade de tipo celular, por exemplo, pode estar comprometida em indivíduos desnutridos (COSTA, 2001). A deficiência de ferro é particularmente importante neste contexto. Por outro lado, animais e pacientes humanos obesos mostram alterações em vários componentes da resposta imune, incluindo citotoxicidade, atividade das células NK e capacidade de fagócitos em destruir bactérias e fungos (ROITT et al., 1999). A imunossupressão é uma característica universal da infecção parasitária e compromete tanto as respostas mediadas por anticorpo como as mediadas por células. Com certa frequência, infecções virais estão igualmente associadas à presença de imunodeficiência secundária. O sarampo no homem, a doença de Newcastle em aves e a peste bovina no gado são exemplos de condições patológicas associadas à imunossupressão, que nestes casos tem sido atribuída a

um efeito citotóxico direto do vírus sobre as células linfóides (ROITT, 1989). Enquanto alguns vírus e outros agentes infecciosos, como por exemplo larvas jovens de *T. spiralis* que liberam um fator solúvel linfocitotóxico, podem causar rompimento das células ou dos tecidos linfóides diretamente, muito da supressão pode resultar da interferência com a função macrófágica. Na hanseníase lepromatosa e na infecção malárica há provas de uma restrição na reatividade imunológica, imposta por uma distorção nas vias de tráfego normal dos linfócitos e, em última análise, a função dos macrófagos parece também ser aberrante. Fatores plasmáticos de pacientes com sífilis secundária bloqueiam *in vitro* a transformação de linfócitos de indivíduos normais pela fitoemaglutinina e podem ser os responsáveis pela redução geral da imunidade do tipo celular observada nesta doença (COSTA, 2001).

Muitos agentes, tais como raio X, drogas citotóxicas e os corticosteróides, embora freqüentemente empregados como agentes terapêuticos num contexto não-imunológico, podem não obstante, ter efeitos adversos severos sobre componentes do sistema imune (COSTA, 2001).

1.4 Complicações decorrentes de imunossupressão

A imunossupressão, sobretudo quando prolongada, pode acarretar em danos estruturais e/ou funcionais com conseqüências irreversíveis ao organismo. Alguns agentes imunossupressores são tóxicos para várias células, além de apresentarem o potencial de ativar infecções latentes e aumentar muito a susceptibilidade à infecções sérias, tais como aquelas provocadas por fungos, bactérias e vírus prevalentes e que ordinariamente apresentam pouca patogenicidade, como por exemplo, *Candida*, *Nocardia*, citomegalovírus e herpesvírus (COSTA, 2001).

Além disso, indivíduos submetidos a terapias que induzem imunossupressão crônica, assim como os que possuem imunodeficiências congênitas, apresentam um aumento de incidência de vários tipos de cânceres, especialmente linfomas e retículo-sarcomas. Embora haja uma incidência elevada de tumores em pacientes imunossuprimidos, o aumento mais drástico ocorre em tumores associados aos vírus oncogênicos (Tabela 1). Tal constatação apoia o conceito de que a vigilância

imunológica provavelmente atue mais eficientemente contra os vírus do que contra os tumores (ROITT et al., 1999).

Tabela 1 – Incidências de tumores em indivíduos com imunodeficiência

Causas da Imunodeficiência	Tipos de tumores	Vírus envolvidos
Imunodeficiência congênita	Linfoma	EBV
Imunossupressão por transplantes de órgãos ou por AIDS	Linfoma Câncer cervical Câncer de pele Hepatoma Sarcoma de Kaposi	EBV Papilomavírus Papilomavírus (?) Vírus da hepatite B Herpes vírus humano 8

Roitt et al., 1999

1.5 Terapia Imunossupressora

Segundo Prado et al. (2007), os agentes imunossupressores podem ser classificados em três grandes grupos: químicos, biológicos e físicos. Os químicos são representados pelas drogas citotóxicas como metotrexato, ciclofosfamida (CY), azatioprina, ciclosporina, tacromus, corticosteróides, antiinflamatórios não-hormonais, anticonvulsivantes, talidomida e dapsona. Já entre os biológicos destacam-se a globulina antitimócito, gamaglobulina, anticorpos monoclonais, citocinase, receptores solúveis de citocinas. Enquanto que os físicos são representados pelas radiações ionizantes.

Somando-se ao interesse em relação à investigação dos efeitos adversos mediados por substâncias imunossupressoras; há um forte ímpeto pelo desenvolvimento de novos fármacos e de esquemas de tratamentos mais seguros e eficazes para a realização de transplantes de órgãos bem sucedidos e tratamento de muitas doenças provocadas por respostas imunológicas aberrantes (COSTA, 2001).

No decorrer das duas últimas décadas, houve considerável progresso na identificação de compostos capazes de produzir inibição inespecífica, ou seja,

inibição da resposta imunológica independente de qual antígeno a inicia (ROITT et al., 1999).

De acordo com Costa (2001), com base em experimentos realizados com estes compostos em animais, descobriu-se que a resposta imunológica primária é mais facilmente inibida que uma reação secundária ou anamnésica, ou seja, fármacos eficazes na supressão da resposta imune em animais não sensibilizados, geralmente só exibem atividade inibidora mínima no animal já sensibilizado. Além disso, a eficácia de um agente imunossupressor numa resposta primária depende fortemente do momento de sua administração em relação ao estímulo antigênico inicial. Com isso, agentes imunossupressores inespecíficos dividem-se em três grupos:

I. Este grupo inclui formas de tratamento que exercem atividade imunossupressora máxima quando o fármaco é administrado imediatamente antes do antígeno, sendo menos eficaz quando utilizado após o estímulo imunológico. Neste grupo estão incluídos os corticosteróides, a irradiação e a citotoxina ciclo-inespecífica mostarda nitrogenada;

II. Este grupo inclui fármacos que só possuem atividade imunossupressora quando administrados imediatamente após o estímulo antigênico. Incluem-se aqui os agentes citotóxicos azatioprina e o metrotexano;

III. Este grupo inclui fármacos que exibem atividade inibidora quando administrados tanto antes quanto após a estimulação antigênica, entretanto possuem maior atividade imunossupressora após estímulo antigênico. A ciclofosfamida (CY) constitui o principal agente imunossupressor deste grupo.

1.5.1. Agentes citotóxicos

Os agentes citotóxicos constituem um grupo de substâncias químicas com propriedade farmacológica de destruir células capazes de auto-replicação, entre elas linfócitos imuno-competentes. Estes fármacos foram originalmente introduzidos na medicina clínica como agentes anti-neoplásicos em 1959. Contudo, estudos posteriores revelaram que muitos destes fármacos possuem também atividade imunossupressora e por conseguinte, seu uso foi ampliado para o tratamento de

doenças do tipo auto-imune e na inibição de reações de rejeição a transplantes (COSTA, 2001).

Os agentes citotóxicos não são seletivamente tóxicos para os linfócitos e podem afetar, em graus variáveis, todas as células imunologicamente competentes, resultando em supressão generalizada do sistema imunológico e, conseqüentemente tornando os pacientes tratados mais suscetíveis a infecções oportunistas, bem como a certas neoplasias (STITES et al., 2000).

As atividades linfocitotóxicas dos diferentes agentes citotóxicos podem estar relacionadas com suas toxicidades para células em fases específicas do ciclo mitótico. Os grupos de fármacos que incluem a azatioprina e o metrotexano são denominados “fase-específicos”, pois são citolíticos para as células apenas quando estas se encontram na fase S (síntese de DNA). A CY e o clorambucil são classificados como “ciclo-específicos”, pois são tóxicos para as células em todas as fases do ciclo mitótico, incluindo linfócitos na fase intermitótica (G₀). Entretanto, o grupo de fármacos “ciclo-específicos” exibem atividades catalíticas diferenciais, sendo mais tóxicos para as células que ativamente se encontram no ciclo celular do que para células em repouso (G₀). Já o terceiro grupo de substâncias, constituído pelos agentes “ciclo-inespecíficos”, é igualmente citotóxico para as células tanto em repouso como em mitose. A radiação é considerada uma modalidade terapêutica “ciclo-inespecífica” (COSTA, 2001).

Como se sabe, os eventos celulares associados a um estímulo antigênico podem ser subdivididos em fase de indução e fase estabelecida ou efetora. A primeira refere-se ao intervalo entre a exposição ao antígeno e a produção de células T sensibilizadas ou de plasmócitos maduros, caracterizando-se pela rápida expansão proliferativa de precursores sensíveis ao antígeno. Posteriormente, a reação passa para uma fase estabelecida. Os agentes citotóxicos são, em sua maioria, eficazes quando o período de administração coincide com a fase de indução, tornando-se consideravelmente menos ativos quando administrados na fase estabelecida da resposta imune (COSTA, 2001).

1.6 Ciclofosfamida

A CY (Figura 1) é um agente alquilante da classe das mostardas nitrogenadas, que foram utilizadas na quimioterapia do câncer a partir de 1942 (CHABNER et al., 1996). E consiste em uma substância comumente empregada na quimioterapia de pacientes com câncer (CENCI et al, 1998; CHILLER et al, 2002; MEHRAD et al, 2002; MONGA, 1983; SELVAKUMAR et al, 2006; SMITH et al., 1994) e provoca diminuição na celularidade e peso de órgãos linfóides (BIN-HAFEEZ et al, 2001), agindo em células com alto índice mitótico e demonstrando propriedades inibitórias sobre as respostas imunes tanto humoral quanto celular (BACH & STROM, 1986).

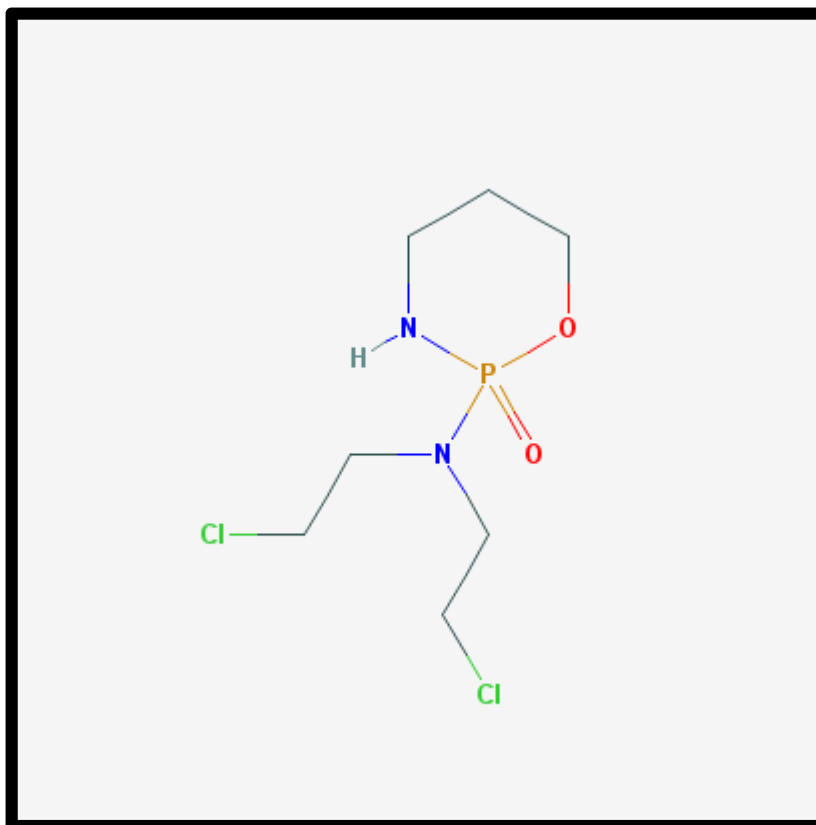


Figura 1: Molécula de CY, um agente alquilante que é ativado enzimaticamente no organismo em mostarda de fosforamida, acroleína e outros metabólitos farmacologicamente ativos e citotóxicos. (Fonte: PUBCHEM COMPOUND, 2011).

Funciona, também, como uma droga supressora do sistema imune para estudos envolvendo transplante de órgãos; e é utilizada no tratamento do lupus

eritematoso sistêmico e da esclerose múltipla, além de ser administrada em outras doenças benignas (SELVAKUMAR et al, 2006).

Este fármaco, assim como outros agentes alquilantes, necessita de ativação metabólica prévia para exercer seus efeitos terapêuticos. As enzimas citocromo P450 hepáticas participam da biotransformação da CY gerando mostarda fosforamida, acroleína e outros metabólitos farmacologicamente ativos e citotóxicos. Em ratos, a CY é metabolizada principalmente por isoenzimas CYP2B1, com participação significativa de CYP2C6 e CYP2C11. Em humanos, a ativação ocorre, sobretudo, por CYP2B6, com participação de CYP2A6, CYP2C8 e CYP2C9 (CHANG et al., 1993) (Figura 2). Tanto no homem como em animais, a ativação da CY pelos citocromos P450 parece ser a principal via de metabolização deste xenobiótico, apesar de existir evidências de sua ativação por outras enzimas em outros órgãos (SMITH & KEHRER, 1991).

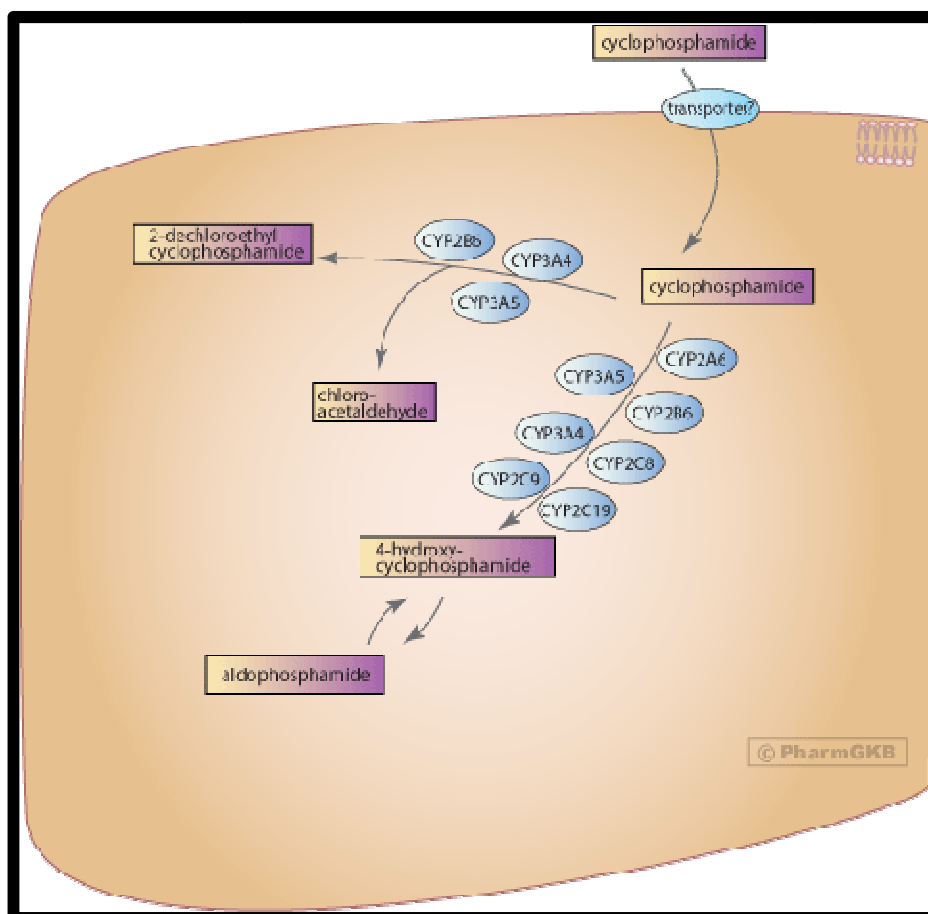


Figura 2: A figura demonstra os genes envolvidos na biotransformação da CY e seus metabólitos e inclui as vias de ativação, desativação e toxicidade. (Fonte: PHARMGKB, 2011).

Após sua metabolização, os efeitos citotóxicos da CY são primariamente devido a sua capacidade de ligar-se a cadeias de DNA e efetuar ligações cruzadas. Porém, a CY também pode reagir e conseqüentemente alterar a função de outras moléculas intracelulares. A atividade alquilante no DNA pode resultar em morte imediata da célula-alvo, ou lesão letal expressa durante a divisão mitótica seguinte. Nesta última circunstância, a célula lesada pode funcionar normalmente na fase intermitótica (G0). Por outro lado, se for possível reparar o DNA, a célula pode sobreviver funcionando normalmente.

Sabe-se que tanto em nível experimental quanto clínico, este fármaco ciclo-específico é um importante imunossupressor linfocitotóxico. Pode, porém, apresentar uma alta toxicidade: depressão da medula óssea, reações gastrointestinais, cistite hemorrágica, esterilidade, malformações congênitas, alopecia, infecções oportunistas, neoplasias (linfoma, carcinoma da bexiga, leucemia mielógena aguda), síndrome de Goodpasture, entre outros (SILVA, 1994).

A CY parece causar supressão mais pronunciada das respostas humorais do que aquelas atribuídas a reações celulares (BURNS et al., 1996). Seus efeitos sobre os componentes da resposta imune celular são extremamente variáveis. A CY pode prolongar a sobrevida de enxertos cutâneos alogênicos quando administrada após o enxerto. Entretanto, quando utilizada antes do transplante, constitui um potente intensificador imunológico, fato que tem sido atribuído, em parte, a uma maior toxicidade para células T supressoras do que para linfócitos T auxiliares (STITES et al., 2000).

Alguns estudos clínicos sugerem que os efeitos sobre diferentes subpopulações de linfócitos é altamente dependente da dose da CY administrada. Assim, doses baixas de CY causam depleção primária das células B e de linfócitos CD8+, enquanto doses mais altas resultam em redução semelhante no número total de linfócitos CD4+ e CD8+ (STITES et al., 2000).

Por ser um potente indutor de alterações no DNA, dados referentes à citotoxicidade provocada por CY não podem ser ignorados. De acordo com Anderson et al. (1995) e Selvakumar et al. (2006), essa citotoxicidade está diretamente relacionada ao seu metabolismo e a 4-Hidroxíciclofosfamida (4-OHCY), fosforamida mustarda e a acroleína são seus maiores metabólitos alquilantes. Os principais alvos daqueles metabólitos são células em rápida divisão, perturbando

dessa maneira o crescimento celular, a atividade mitótica, a diferenciação e a funcionalidade dessas células, via alquilação do DNA na posição N7 da guanina (COLVIN, 1999).

É válido ressaltar que o espectro de citotoxicidade da CY também se aplica às células normais de seres humanos e de animais de experimentação. Os efeitos agudos da citotoxicidade estão associados primariamente a sua genotoxicidade (KRISHNA et al., 2000). Em células somáticas a CY tem mostrado induzir mutações gênicas, aberrações cromossômicas, micronúcleos e trocas de cromátides-irmãs (MADLE et al., 1986). Rao et al. (2005), em estudo utilizando primatas da espécie *Macaca mulatta* defendem que a extensão das aberrações cromossômicas induzidas por agentes quimioterápicos em primatas não humanos depende da dose de administração dessas substâncias.

1.7 Modelos Experimentais de Imunossupressão

Modelos experimentais de imunossupressão vêm sendo estabelecidos há muitos anos com o intuito de melhor avaliar as funções da imunidade, servindo como importante ferramenta para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de técnicas de mensuração da resposta imune, a avaliação de novas substâncias voltadas ao combate à imunodepressão, além de possibilitar os estudos experimentais de transplante de órgãos e, também, o de condições patológicas potencializadas pela supressão do sistema imunológico como o câncer (BIN-HAFEEZ et al, 2001; GARCIA et al, 2004).

A maioria dos estudos descritos tem como substrato de análise ratos e camundongos, entretanto os primatas não humanos constituem excelentes modelos experimentais face sua grande proximidade filogenética com o homem. São considerados animais nobres para as pesquisas científicas e seu uso é restrito, portanto, sendo utilizado somente na impossibilidade de se obter resultados satisfatórios a partir de outros animais de laboratório tradicionalmente reproduzidos para esta finalidade, como os roedores (ANDRADE, 2002).

De acordo com Garcia et al. (2004), diversas drogas tem sido empregadas em modelos de imunossupressão em diferentes espécies, tais como, a dexametasona, a ciclosporina, o metotrexato e a CY. Todavia os efeitos destas

drogas não são os mesmos em todas as espécies. O metotrexato, por exemplo, é capaz de inibir a resposta imune em camundongos tratados com 2,5 mg/Kg em dose única (ROMANYCHEVA et al., 1978). Entretanto, outros autores como Greenwood & Keny (1978), não conseguiram provocar alterações hematológicas em ovinos tratados durante 3 dias com 5 mg/Kg de metotrexato.

Em camundongos, Doherty (1981) demonstrou que a CY inibe a produção de anticorpos, mas não conseguiu demonstrar o efeito da droga na resposta celular cutânea. Já Tarayre et al. (1990) encontraram leucopenia em camundongos tratados com essa droga.

Outro exemplo, desta diversidade de efeito é a dexametasona, um potente glicocorticóide, usado em diversos modelos de imunossupressão. Tal efeito foi bem documentado em várias espécies, como em bovinos (ROTH & KAERBELE, 1985; PRUETT et al., 1987; DOHERTY et al., 1995), ratos (BAKKER et al., 1997) e até galinhas (ISOBE & LILLEHOJ, 1993). Todavia, Saulnier et al. (1991), falharam ao tentar demonstrar o efeito imunossupressor da dexametasona em suínos e Minton & Blecha (1991) e Garcia et al. (1999) também não conseguiram demonstrar tal efeito em ovinos.

Esses resultados ressaltam a necessidade de serem desenvolvidos modelos próprios para cada espécie, já que as conclusões obtidas em uma espécie não podem necessariamente ser os mesmos resultados em outra.

1.7.1 Ratos da Linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*)

Os ratos da linhagem Wistar (Figura 3) são uma linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, desenvolvida no Instituto Wistar na Filadélfia – Estados Unidos. Esta linhagem foi a primeira a ser utilizada como organismo-modelo numa época em que pesquisadores utilizavam primariamente camundongos da espécie *Mus musculus* (CLAUSE, 1998). A maioria das linhagens de ratos de laboratório descende de uma colônia estabelecida no Instituto Wistar em 1906 pelo fisiologista americano Henry Donaldson, pelo administrador científico Milton Greenman e a embriologista Helen Dean King (THE WISTAR INSTITUTE, 2007).



Figura 3 - Exemplar da espécie *Rattus norvegicus* linhagem Wistar. Observar o padrão albino, orelhas alongadas, cabeça grande e comprimento da cauda menor que o comprimento corporal. (Fonte: Mahidol University, 2011)

A linhagem Wistar é uma das mais utilizadas mundialmente em pesquisas de laboratório e sua importância deve-se ao fato de o Dr. Donaldson e sua equipe terem realizado inúmeras pesquisas para obter dados fundamentais, principalmente curvas de crescimento do animal, do crânio, do esqueleto e de vários órgãos individualmente. Todos esses resultados foram reunidos no famoso livro "The Rat: Data and Reference Tables for the Albino Rat (*Mus norvegicus albinus*) and The Norway Rat (*Mus norvegicus*)", cuja primeira edição foi publicada em 1915 (CENTRO DE BIOTERISMO FMUSP, 2011)

Os ratos da linhagem Wistar são caracterizados pelas orelhas alongadas, cabeça grande e comprimento da cauda sempre menor que o comprimento corporal. A gestação dura de 20 a 22 dias e o desmame ocorre com 17 a 19 dias de idade. São considerados animais dóceis, de fácil manipulação e têm boa capacidade de aprendizado. Apresentam, em geral, baixa incidência tumoral e a alopecia, algumas vezes temporária, é uma característica comum. A partir da linhagem Wistar, foram desenvolvidas as linhagens Sprague Dawley e Long-Evans (CENTRO DE BIOTERISMO FMUSP, 2011).

1.7.2 Primatas Não Humanos da Espécie *Cebus apella*

O uso de primatas não humanos como modelos experimentais *in vivo* é de grande importância em trabalhos voltados a área da saúde humana, pela grande proximidade filogenética, anatômica e bioquímica destes organismos com os primatas humanos, gerando resultados que podem ser interpretados de forma mais próxima e segura para o organismo humano. O tamanho dos órgãos torna possível a repetição de diagnósticos, tais como, exames endoscópicos, coleta de amostras de sangue e biopsia de um mesmo animal por um longo período; além disso, a incidência de tumores espontâneos é baixa em comparação aos roedores e a longevidade vital dos macacos permite a exposição à carcinógenos por longos intervalos de tempo, assim como ocorre em humanos (TAKAYAMA, 2008). Assim, são considerados animais nobres para as pesquisas científicas.

Os *Cebus apella* (Figura 4), que são um dos objetos de estudo deste trabalho, por exemplo, se reproduzem em todas as estações do ano, sua gestação dura cerca de 8 meses. Os filhotes pesam aproximadamente 260g enquanto os adultos encontram-se entre 1,1 e 3,3 kg, segundo De Cicco (2009). Esses animais vivem em florestas tropicais, em bandos de 20 macacos, tem hábito diurno e possuem uma longevidade em torno de 40 anos. Atingem a maturidade do aparelho reprodutor em volta dos 4 anos (fêmeas) e 8 anos (machos), a partir de então estão aptos a iniciar sua vida reprodutiva (DE CICCIO, 2009). De acordo com Riviello & Wirz (2001) no que diz respeito à faixa etária, esses primatas são considerados jovens até os 4 anos de idade, dos 5 anos em diante já são tidos como animais adultos.



Figura 4 - Exemplar adulto da espécie *Cebus apella*. A espécie apresenta como característica principal o desenvolvimento de tufos de pelos escuros na cabeça (localizados nas têmporas e ápice) e coloração corporal amarela e dos membros e cauda escuros.

(Fonte: CENP, 2008)

O Brasil é um país privilegiado em relação à fauna primatológica, possuindo a maior diversidade de espécies do mundo, atualmente sendo aceitas, de acordo com Rylands et al. (2000), a ocorrência de representantes de todas as 5 famílias de primatas neotropicais, 16 dos 17 gêneros, sendo 2 gêneros, *Brachyteles* (muriqui) e *Leontopithecus* (micos-leões) de ocorrência exclusiva no Brasil, totalizando 91 espécies, muitas endêmicas. Entretanto, a legislação brasileira, corretamente, exige que somente 4 exemplares dessas espécies sirvam de modelos experimentais e que sejam utilizados apenas os animais nascidos em cativeiros regulamentados pela Lei.

1.8 Teste do Micronúcleo (MN)

Os agentes químicos e físicos que são capazes de induzir mutações em nível cromossômico, ou seja, capazes de gerar quebras no cromossomo, são chamados de agentes clastogênicos. A clastogenicidade pode resultar da interação

direta desses agentes com o DNA ou de mecanismos indiretos que interferem com a replicação e o reparo da molécula (EVANS, 1977).

Existem vários testes para detectar o potencial clastogênico de um agente, e entre estes, o teste do micronúcleo (MN), o qual é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes recomendada para estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001). O teste do MN foi originalmente desenvolvido para conhecer a atividade genotóxica de produtos químicos em mamíferos (HEDDLE et al., 1983), baseia-se na observação de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos que se atrasam em sua migração para os pólos da célula, na anáfase. O teste indica se nas células, houve a atuação de agentes clastogênicos ou que interferem na formação do fuso mitótico.

Em roedores foram observadas correlações entre alterações cromossômicas e o aparecimento de MN em eritrócitos jovens, antes da expulsão do núcleo. Foi verificado que a incidência dessa anomalia era dose dependente, para o composto Trenimon, e que o teste de micronúcleos era similar às tradicionais análises citogenéticas, sendo considerado um método rápido e simples no teste de mutagenicidade (MATTER & SCHMID, 1971).

Hooftman & Raat (1982) empregaram o teste de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico de peixes, para realizar a avaliação do potencial genotóxico de componentes presentes em ambientes aquáticos poluídos. Segundo Manna & Sadhukhan (1986), o teste pode ser útil não somente para detectar aberrações induzidas por agentes genotóxicos, mas para o estudo da radio-sensibilidade relativa e quimiosensibilidade de diferentes tecidos frente às potencialidades mutagênicas de diferentes mutágenos.

Os estudos baseados em micronúcleos podem ser empregados para determinar o potencial genotóxico de componentes do meio ambiente de diferentes regiões, permitindo conhecer os agentes químicos poluidores e o potencial genotóxico dos mesmos. A formação de MN pode ocorrer espontaneamente em células de peixes e com frequência variável (WILLIAMS & METCALFE, 1992). A temperatura é um fator importante na variação da frequência de MN, pois determina variação no ciclo celular (AL-SABT & METCALFE, 1995).

Fatores intraespecíficos podem atuar alterando ocorrência de MN, como: idade, sexo, alimentação, saúde, período de reprodução, e *status* hormonal. Diferenças no número de MN entre machos e fêmeas foram observadas em roedores (URLANDO & HEDDLE, 1990). Nos peixes, a maior sensibilidade aos agentes genotóxicos, ocorre nos estágios iniciais de desenvolvimento. Em mamíferos, indivíduos mais velhos são mais propensos a sofrerem danos genéticos. (CHRISTIE & COSTA, 1983).

Os MNs podem ser formados a partir de aberrações cromossômicas em células de diferentes tecidos que sofrem divisão celular constantemente *in vivo* ou em células que são submetidas a divisões celulares *in vitro*. Trata-se de um pequeno núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado durante a divisão celular por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que se atrasam em relação aos demais. Esta pequena formação resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentalmente induzidas, ou ainda, de falhas no fuso celular, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase. Os MNs podem estar presentes em número de um ou mais por célula, com dimensões de até 1/3 do tamanho do núcleo (Figura 4) (RIBEIRO et al., 1991; RAMIREZ, 2000; TOLBERT et al, 1991, 1992)

Para que os MNs possam ser visualizados é necessária a administração da Citocalasina-B às culturas. As citocalasinas são produtos fúngicos que impedem a polimerização dos filamentos de actina se ligarem as extremidades “mais” dos microfilamentos (ALBERTS, 1997). A Citocalasina-B é um inibidor de polimerização da proteína actina requerida para a formação do anel contrátil, que induzem a contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células filhas (citocinese). Na técnica de MN *in vitro*, utiliza-se a Citocalasina-B para paralisar as células em citocinese (Figura 3), desse modo, permitindo que a célula complete a divisão nuclear e que estas possam aparecer mono, bi ou trinucleadas (FENECH, 1993; OECD GUIDELINE 487, 2004).

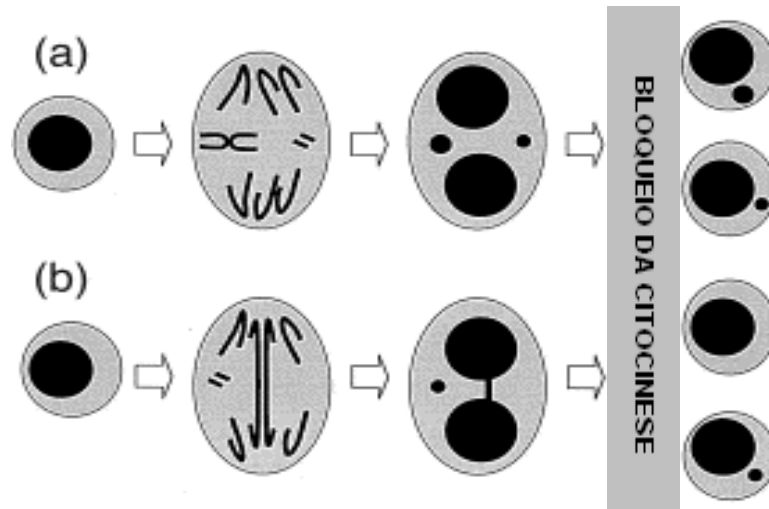


Figura 5- Ilustração da origem do MN a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro (a); em (b), a formação de uma ponte citoplasmática e de um MN a partir de um fragmento cromossômico acêntrico; resalta ainda a ação da citocalasina-B que bloqueia a citocinese.

Fonte: FENECH (2000).

A técnica do MN por bloqueio da citocinese é considerada como um dos métodos preferidos para mensurar danos cromossômicos em células humanas, por ser uma técnica de boa sensibilidade, requerer menor tempo de análise e apresentar uma boa relação dose-resposta frente a vários agentes genotóxicos. Além disso, esta técnica demonstra uma precisão satisfatória, pois os dados obtidos não são confundidos com alterações da divisão celular causadas pela citotoxicidade dos agentes testados. Esta técnica pode prover a mensuração da genotoxicidade, fornecendo boas indicações da ocorrência de diversos tipos de danos, tais como quebras, rearranjos cromossômicos, dentre outros (FENECH, 2000; FENECH & CROTT, 2002).

A análise do MN em células binucleadas, além de permitir a comparação da frequência de danos cromossômicos entre populações celulares que podem diferir em sua cinética de divisão, permite uma medida mais precisa da frequência de células micronucleadas, considerando que seria necessário analisar o dobro de

células mononucleadas para observar o mesmo nível de danos observados em células binucleadas (FENECH, 1997).

O teste do MN com citocalasina-B (MNCtB) pode ser usado para o biomonitoramento genotóxico de populações, para avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos e para estudos específicos como variação interindividual para radiosensibilidade e predição da radiosensibilidade de tumores (FENECH, 2000).

Embora o teste do MN com bloqueio de citocinese tenha sido inicialmente desenvolvido para ser aplicado em cultura de linfócitos humanos (FENECH & MORLEY, 1985), após adaptações, vem sendo também empregado com outros tipos celulares e para a identificação de parâmetros que refletem instabilidade genômica (Figura 6). Assim, o MNCtB é hoje um ensaio bastante utilizado em estudos *in vivo* (monitoramento genotóxico de populações), *in vitro* (avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos e seus possíveis mecanismos de ação) e *in vivo* (radiosensibilidade individual).

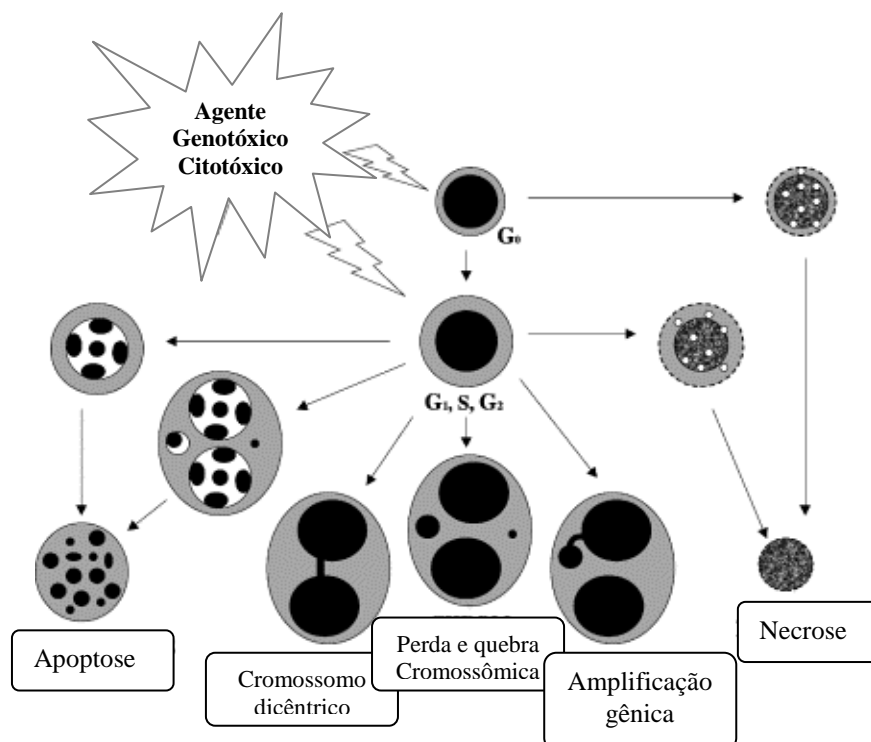


Figura 6 - Ilustração de várias alterações que podem ser avaliadas pelo teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese pela citocalasina-B.

Fonte: FENECH (2000).

Segundo Fenech (2000), para a análise da freqüência de MNs e de células micronucleadas não deve ser incluído na amostra de células analisadas aquelas que apresentam um ou mais de dois núcleos, as células necróticas e aquelas em apoptose. Deve-se contar 1000 células binucleadas por lâmina; levar em consideração somente células com núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais, mesmo padrão de coloração e dentro do limite citoplasmático; membrana celular intacta; células facilmente distinguíveis das células adjacentes.

Os ensaios com MN permitem identificar um aumento na freqüência das mutações cromossômicas, condição *sine qua non* para a carcinogênese, e vem sendo muito utilizado em estudos *in vivo*, no monitoramento genotóxico de populações, e *in vitro*, para a avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos. Os MN são formados durante a telófase, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos e são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Desta forma, a detecção de MN representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou dano no aparelho mitótico (FENECH, 2000).

É importante ressaltar que uma quantidade basal de MN é formada durante a mitose devido aos mais variados tipos de erros, espontâneos ou não, ocorridos durante o ciclo. Isso quer dizer que os possíveis danos ao DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em MN após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. (FENECH, 1997).

Dentre muitos testes de mutagênese, o teste de MN é um ensaio tecnicamente simples, confiável e sensível. Ele propicia a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), podendo ser repetido várias vezes, para a prevenção e monitoramento de indivíduos sob risco carcinogênico, como consumo crônico e abusivo de álcool, tabaco e/ou outras substâncias mutagênicas (RAMIREZ et al. 1999, GATTÁS, 2001).

2 OBJETIVO

Estabelecer e caracterizar um modelo de imunossupressão com o agente alquilante CY, em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar e primatas não humanos da espécie *Cebus apella* da Amazônia brasileira e avaliar a ação mutagênica de CY, sobre estes animais, através do teste do MN.

2.1 Objetivos Específicos

- Estabelecer e caracterizar um modelo de imunossupressão com o agente alquilante CY, em primatas não humanos da espécie *Cebus apella*;
- Identificar o momento exato do início da depressão imune nestes animais, através da análise frequente do leucograma em *C. apella*;
- Identificar o período de tempo em que a depressão imune se sustenta nas duas espécies;
- Identificar o período em que esses animais recobram sua resposta imunológica;
- Avaliar os efeitos da CY através do Teste de MN.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

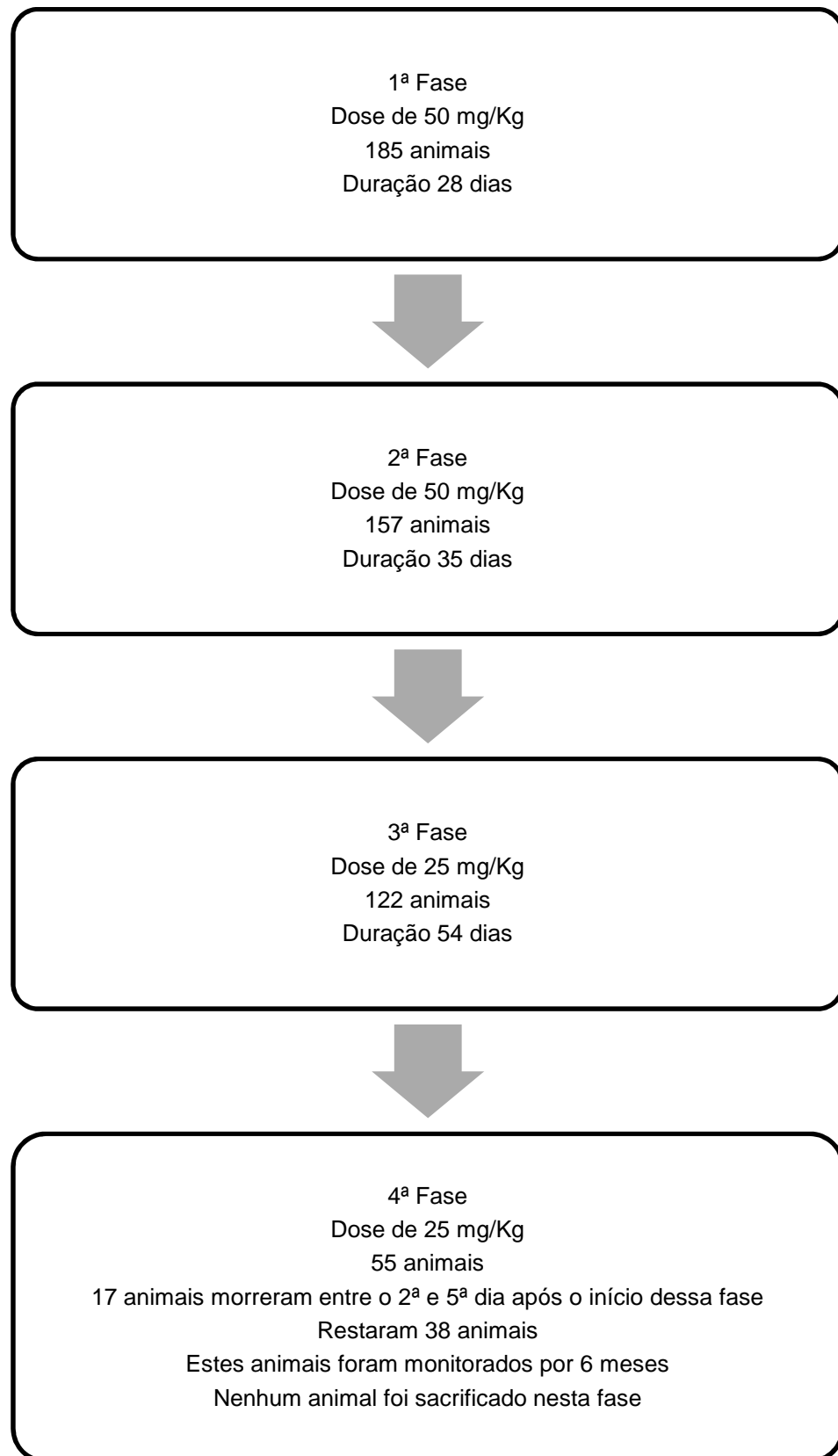
Foram utilizados 248 ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos (0,20 – 0,25 kg), com 90 a 120 dias de idade provenientes do Instituto Evandro Chagas e 4 primatas não humanos da espécie *Cebus apella*, machos (2,80 a 3,20 kg), com 6-8 anos de idade provenientes do Centro Nacional de Primatas (CENP). Os animais foram mantidos sob as condições padrões de laboratório e cada espécie recebeu alimentação adequada. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) (PARECER MED 002/2007).

3.2 Dosagem e Aplicação de CY

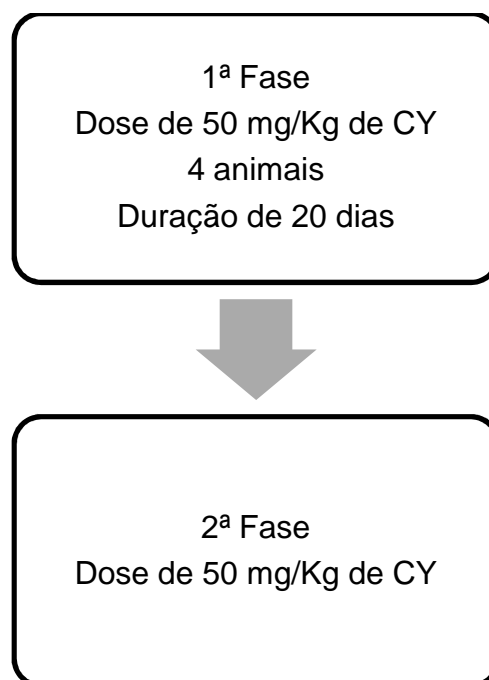
Foi utilizado neste projeto CY, na forma de Cytoxan®, ampolas contendo uma 1g, (Bristol – Meyers Oncology, Princenton, NJ). Para os testes de imunossupressão em *R. norvegicus* da linhagem Wistar foram utilizados 185 animais em 4 fases experimentais, nos quais foram administrados na 1ª e 2ª fase a dose de 50 mg/kg, e, na 3ª e 4ª fase a dose de 25 mg/Kg de CY. Em cada fase foram eutanasiados 1 animal/dia de cada grupo com a finalidade de se obter o peso relativo e a celularidade dos órgãos.

A CY foi suspensa em solução salina, e aplicada por injeção intraperitoneal, no quadrante inferior esquerdo do abdome, visto que nessa área não há órgãos vitais, exceto o intestino delgado. Os animais do grupo controle, composto por 63 indivíduos, receberam o mesmo volume em solução salina.

Na imunossupressão de *C. apella*, a dose utilizada foi de 50 mg/kg de CY, a qual foi diluída em solução salina, e injetada por via endovenosa. As soluções de CY foram preparadas no dia da inoculação.

3.2.1 Fluxograma do grupo experimental em *R. norvegicus* da linhagem Wistar

3.2.2 Fluxograma experimental em *C. apella*



3.3 Anestesia e Eutanásia dos Animais

Os *R. norvegicus* da linhagem Wistar foram anestesiados com Vetanarcol (Cloridrato de Cetamina, 50mg/ml - Sigma®), 0,5ml/kg de Kenzol (Cloridrato de Xilazina, 20mg/ml - Sigma®). A dosagem correspondeu a 1,8ml/kg de Vetanarcol e 0,5ml/kg de Kenzol.

A eutanásia dos *R. norvegicus* da linhagem Wistar foi realizada por inalação de dose letal de éter dietílico, seguindo rigorosamente os princípios internacionais para a pesquisa biomédica envolvendo animais (CIOMS, 1985).

No caso dos *C. apella* com doença terminal por intoxicação, envolvendo sofrimento, foram conduzidos à eutanásia através da administração intravenosa da associação medicamentosa de Ketaral® (Cloridrato de cetamina, 50 mg/kg, anestésico geral de ação rápida), Dormonid® (Midazolam 50 mg/kg agente indutor do sono) e Methotrimeprazine® (Levomepromazine 50 mg/kg, tranqüilizante antipsicótico). A eutanásia aconteceu pela sobre dose desta associação. No CENP, os animais foram submetidos à eutanásia em ambiente apropriado, afastado dos

outros animais que participam deste projeto. Este método é confiável e produz uma morte humanitária ao primata, a qual foi comprovada pelo Médico Veterinário participante do presente projeto. A metodologia atende à Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Após a eutanásia os cadáveres foram submetidos à necropsia. Amostras de órgãos e fluídos biológicos foram coletados para análises laboratoriais. Após estes procedimentos os cadáveres foram incinerados no CENP.

3.4 Análises e Avaliações em *R. norvegicus*

3.4.1 Peso Relativo de Órgãos e Celularidade em *R. norvegicus* da Linhagem Wistar

Para este parâmetro não foram utilizados primatas não humanos visto que seria necessário eutanasiar muitos animais. Em *R. norvegicus* da linhagem Wistar, foram analisados o peso relativo (peso do órgão/ peso corporal em g) do baço, rim, timo e fígado com auxílio de balança de precisão. A celularidade foi avaliada a partir da suspensão celular preparada em meio de cultura RPMI-1640, provenientes da medula óssea (femoral), do baço e do timo, sendo sua contagem realizada usando a câmara de Neubauer (RAISUDDIN et al., 1991).

3.4.2 Avaliação das Funções da Imunidade Humoral em *R. norvegicus* da linhagem Wistar

Os roedores tratados com CY e controles receberam 0,2 ml de 10% de SRBC (eritrócitos de carneiro – *sheep red blood cells*) via intraperitoneal, antes da avaliação dos seguintes parâmetros:

3.4.2.1 Hemoaglutinação

Com a finalidade de coletar o sangue para análise, no momento da eutanásia, os animais foram anestesiados segundo o protocolo já descrito, e foi realizada laparotomia xifo-púbica para posterior punção da Veia Cava Abdominal com agulha 30x8, acoplada em seringa descartável de 3mL. Foram utilizadas seringas e agulhas individuais para cada animal. Este parâmetro foi conduzido segundo o protocolo de Mungantiwar et al. (1999) com modificações de Bin-Hafeez et al. (2001).

O sangue foi armazenado em tubo *Vacutainer*, centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos e armazenado em refrigerador entre 2 e 8°C. Diluições seriadas, em duplicada, de amostras do soro foram realizadas em 50µl de PBS (tampão fosfato salino, pH 7,2), em 96 micro-titulações misturadas com 50µl de 1% SRBC suspenso em PBS. Após mistura, os recipientes foram mantidos a temperatura ambiente por 2 horas. O valor do título do anticorpo foi determinado no soro mais diluído que apresentava visível hemoaglutinação.

3.4.2.2 Ensaio sobre as células formadoras de placa em *R. norvegicus* da linhagem Wistar

O ensaio sobre as células formadoras de placa (PFC) foi executada usando o método de Raisuddin et al. (1991). Foi injetado intra peritonealmente 0,2 ml de 10% de SRBC preparado em solução salina. Os animais foram submetidos à eutanásia a partir do primeiro dia durante 107 dias de imunização. Após a remoção do baço foi feita uma suspensão de 10^6 células/ml a partir daquele órgão em meio RPMI-1640. Para analisar o PFC, foi preparado SRBC à uma densidade celular de 5×10^8 células/ml em PBS. Foi adicionado 1 ml de SRBC e 0,5 ml do complemento do porco guinea diluído (1 ml do soro + 1 ml solução salina) a 1 ml da suspensão de células do baço.

As câmeras de Cunningham foram preparadas utilizando pedaços de vidro, as bocas foram cobertas e marcadas em ambos os lados. As câmeras foram preenchidas com o volume da mistura, seladas com petróleo gelatinoso e incubadas a 37°C por uma hora. As placas foram contadas sob microscopia ótica tomando como unidade a PFC por 10^6 células do baço. Os outros órgãos, timo e fígado, seguiram o mesmo protocolo.

3.4.2.3 Teste de hemólise

Na análise do teste de hemólise foi utilizado o método Simpson & Gozzo (1978) com modificações de Bin-Hafeez et al. (2001). O baço foi removido para se obter uma suspensão de 10×10^6 células/ml de PBS. Um mililitro de SRBC (0,2%) e 1 ml de soro de *guinea pig* (10%) foram misturados com a suspensão e incubados a 37°C por 1 hora. Após centrifugação a 3.000 rpm durante 3 minutos a densidade óptica do sobrenadante foi medida a 413 nm usando espectrofotômetro (Eppendorf Biophotometer). Os outros órgãos, timo e fígado, seguiram o mesmo protocolo.

3.5 Análises e Avaliações em *C. apella*

A imunossupressão foi realizada em duas fases. Para esta avaliação foram utilizados quatro primatas da espécie *C. apella*. Esses animais foram inspecionados diariamente e os sintomas clínicos foram registrados. Em intervalos regulares, durante as fases de tratamento, foi verificado o peso corporal e sangue periférico foi retirado para testes de laboratório, que incluíram bioquímica do soro, hematologia e exposição à CY.

As análises químicas de rotina incluíram glicose, uréia nitrogenada, creatina, proteína total, albumina, globulina, bilirrubina total, colesterol, triglicerídeos, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gamma glutametiltransferase, lactato desidrogenase, creatina kinase, amilase, cálcio, fósforo inorgânico, sódio, potássio e

cloro. A hematologia clínica incluiu a contagem de células sanguíneas vermelhas, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, hemoglobina corpuscular média contagem de reticulócitos, contagem de plaquetas, contagem diferencial de células sanguíneas brancas (contagem de neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos). A metodologia e os valores de referência foram os descritos por Riviello & Wirz (2001).

A alteração nos parâmetros hematológicos, em particular a contagem diferencial de células sanguíneas brancas representa o maior efeito adverso observado nos parâmetros de laboratório analisados em primatas não humanos (SCHUURMAN et al., 2005). Os dados apresentados nesta tese enfocam somente este parâmetro, visto que as outras análises não estão relacionadas com o efeito imunossupressor da droga, além de não detectarmos diferenças significativas, nas análises químicas, entre os grupos controle e tratado com CY.

O experimento de imunossupressão teve duas fases, em cada uma foram administradas 50 mg/kg de CY. Essa concentração foi padronizada de acordo com os experimentos realizados neste projeto com *R. norvegicus* da linhagem Wistar. Todos os quatro animais receberam essa dose de CY. Antes da injeção dessa droga, foi coletado mostras de sangue periférico da veia femoral dos *C. apella*, para análises laboratoriais, as quais serviram como controle negativo do experimento.

3.6 Avaliação dos Efeitos Genotóxicos da Ciclofosfamida.

3.6.1 Técnica de cultura temporária de linfócitos

Células foram cultivadas de acordo com Moorhead et al. (1960) com modificações, em meio completo contendo 76,8% de meio de cultura HAM-F10 (Sigma®) suplementado com 1% de estreptomicina (0,01 mg/ml), 1% penicilina (0,005 mg/ml), 19,2% de soro bovino fetal (Cultilab®) e 2% de fitohemaglutinina.

Colocaram-se os frascos de meio de cultura em estufa a 37° C para o descongelamento e aquecimento, adicionou-se 0,2 ml de fitohemaglutinina (PHA) que provocou a desdiferenciação de linfócitos, transformando-os em blastos e induzindo-os a sucessivas mitoses. Agitou-se com leveza a seringa que continha o sangue para ressuspenderem-se os glóbulos brancos e em cada frasco contendo 5 ml de meio, depositou-se 20 gotas do plasma agora contendo os linfócitos. Após a homogeneização os frascos foram levados à estufa a 37°C durante 72hs.

3.6.2 Teste do micronúcleo

Em *R. norvegicus* da linhagem Wistar, o protocolo utilizado foi o descrito por Schmid et al. (1971), com modificações introduzidas por Heddle (1973). Antes da eutanásia dos animais, controle e tratados com CY, uma amostra de sangue periférico foi coletada por punção cardíaca, a qual foi ressuspendida em 3 ml de soro bovino fetal. Essa suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspendido em 0,5ml de soro bovino fetal. Os esfregaços foram preparados com a solução ressuspendida de modo a se obter uma única camada de células. A coloração foi realizada a fim de diferenciar eritrócitos policromáticos (PCE) de normocromáticos (NCE) usando o corante Giemsa. A análise teve como finalidade identificar PCEs contendo MN, que são estruturas arredondadas ou ovais, com contorno liso e definido, coloração azul-escuro e que devem ter de 1/10 a 1/20 do tamanho da célula. Para cada animal foram examinados dois mil PCEs e dois mil NCEs.

Em *C. apella*, 24 horas após a administração de CY, foi coletado amostras de sangue periférico da veia femoral, dos quatro animais, para o cultivo temporário de linfócitos. Quarenta e quatro horas após início da cultura, adicionou-se a Citocalasina-B, na concentração de 3 µg/ml, deixando agir por 24 horas antes da coleta, nesse momento transferiu-se as culturas para tubos de centrifuga realizando-se centrifugação a 1000 rpm por 5 mim. Após este procedimento, removeu-se o sobrenadante, deixando um *pellet* de 1 ml e ressuspendeu-se o conteúdo em 5 ml de solução isotônica gelada (4°C), no caso Citrato de Sódio 1%, centrifugando-se

novamente a 1000 rpm por 5 minutos. Em seguida, removeu-se novamente o sobrenadante, deixando um *pellet* de 1 ml e ressuspendeu-se em 5 ml de fixador Carnoy (5 metanol:1 ácido acético), adicionando-se gotas de formaldeído no fixador, com posterior centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos. Após este procedimento, realizou-se mais duas lavagens com fixador Carnoy (3 metanol:1 ácido acético), deixando na ultima lavagem apenas 0,3 ml no volume final do *pellet*. A preparação das lâminas iniciou-se com uma limpeza adequada das mesmas e armazenamento em água destilada gelada. Ao final da coleta, foram confeccionadas as lâminas histológicas com posterior coloração com Giemsa.

3.6.3 Análise do micronúcleo

Toda a análise foi realizada em teste cego. Os critérios de identificação do micronúcleo foram os descritos por Sarto et al. (1987) e por Tolbert et al. (1991, 1992), como estruturas que apresentem distribuição cromatínica e coloração igual (ou mais clara) a do núcleo, que estejam no mesmo plano que este, apresentem limites definidos e semelhantes aos nucleares e o seu tamanho não ultrapassar 1/3 do tamanho do núcleo. Foram computadas apenas células que apresentavam citoplasma íntegro. Foram considerados MN somente as estruturas com as características descritas e que se encontravam distintamente separadas do núcleo principal.

3.7 Análise Estatística

O teste de Mann-Whitney (teste-U) foi utilizado para determinar diferenças significativas entre valores encontrados para: a) peso relativo dos órgãos; b) parâmetros da imunidade humoral c) contagem de células sangüíneas brancas e de MN. Nas análises será estabelecido em 5% o nível de significância.

4 RESULTADOS

4.1 Imunossupressão em *R. norvegicus* da linhagem Wistar

A imunossupressão foi realizada em quatro fases, onde os animais foram divididos em dois grupos, um com administração de CY, grupo tratado (185 ratos) e outro sem administração de CY, grupo não-tratado (63 ratos). A primeira fase teve duração de 28 dias a partir do dia zero, quando foi administrada a primeira dose de CY (50 mg/kg). Neste período foram eutanasiados diariamente, um animal de cada grupo com a finalidade de se obter o peso relativo e a celularidade dos órgãos. No terceiro e no quarto dia após a inoculação, os parâmetros de imunossupressão utilizados foram os mais baixos. Não houve morte após intoxicação nesta fase. As médias e os desvios padrão destes parâmetros estão resumidos nas Tabelas 2 e 3.

Na segunda fase foi administrada novamente CY (50mg/kg), nos animais, aos 28 dias após a primeira administração da droga, visto que neste intervalo de tempo os ratos recuperaram a capacidade de resposta imune pela metodologia utilizada. Cento e cinquenta e sete ratos restaram do grupo tratado da primeira fase do experimento. Foi observado pelos parâmetros de celularidade e peso relativo dos órgãos, que o maior efeito imunossupressor da droga aconteceu no segundo dia e ficou estável até o sétimo dia. Da mesma forma que na primeira fase do experimento foram eutanasiados diariamente um animal de cada grupo. Com 35 dias após a administração da segunda dose (63 dias após a administração da primeira dose), os ratos Wistar recuperaram sua capacidade imune (Tabelas 2 e 3).

Na terceira fase do experimento, os 122 ratos Wistar remanescentes receberam a terceira injeção de CY, na metade da concentração (25mg/kg), administrada com 63 dias a partir do dia zero. Nessa fase, no primeiro dia os ratos apresentaram os menores parâmetros de imunodepressão, essa baixa celularidade permaneceu estável por 12 dias, durante esse período 13 roedores morreram por intoxicação.

Independente da morte esporádica dos ratos, todo dia foi eutanasiado um animal do grupo tratado, não foram utilizados animais do grupo controle visto que os valores de celularidade e peso relativo dos órgãos estava estabelecido. Após 54

dias, os 55 ratos remanescentes do grupo tratado tiveram recuperação imune (117 dias após a primeira administração). Os resultados foram sumarizados nas Tabelas 2 e 3.

Foi administrada CY pela quarta vez, após 117 dias do início do experimento, novamente na metade da concentração inicial (25 mg/kg) e 17 dos 55 roedores remanescentes da terceira fase do experimento morreram no período entre o segundo e quinto dia após a inoculação. Nesta fase do experimento não foi eutanasiado nenhum animal. O peso relativo dos órgãos e a celularidade não foi avaliado nos roedores mortos, visto que não se podia definir o momento exato da morte. Assim dos 38 roedores restantes de todo o experimento foram monitorados por seis meses.

4.2 Efeito da CY sobre o peso relativo de órgãos e celularidade em *R. norvegicus* da linhagem Wistar

Não foi detectado ganho de peso corporal, significativo, entre os animais utilizados neste projeto. O peso relativo do baço e do timo do grupo tratado com CY foi significativamente inferior ($P < 0.05$) quando comparado com o grupo controle (tratado com solução salina padrão) nas três fases do experimento (Tabela 2). Para o fígado, o peso relativo, somente foi inferior, significativamente, em relação ao controle somente a partir da terceira administração de CY (Tabela 2). Não houve redução significativa de peso nos rins dos animais tratados com CY em relação ao grupo controle ($P > 0.05$).

Tabela 2 - Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre o peso relativo dos órgãos em *Rattus norvegicus* Linhagem Wistar^a.

Tratamento	Peso relativo dos órgãos (Média ± Desvio Padrão) em gramas			
	Baço	Timo	Fígado	Rim
Controle ^b	0,42±0,41	0,12±0,32	4,2±0,29	0,07±0,37
CY (1 dose 50 mg/kg)	0,19±0,09 ^c	0,04±0,17 ^c	4,0±0,76	0,06±0,06
CY (2 dose 50 mg/kg)	0,14±0,12 ^c	0,03±0,25 ^c	3,8±1,54	0,05±0,12
CY (3 dose 25 mg/kg)	0,14±0,23 ^c	0,03±0,37 ^c	2,1±2,33 ^c	0,06±0,09

^aOs valores são médias e desvios padrão de cinco ratos eutanasiados entre o primeiro e o quinto dia após a administração de CY.

^bOs valores são médias e desvios padrão de 63 ratos controle negativo.

^cP<0.05 quando comparado com o grupo controle.

O tratamento com CY também induziu a um decréscimo da celularidade da medula óssea, do baço e do timo (P<0.001) quando comparado com o grupo controle de animais (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre a celularidade dos órgãos linfóides de *Rattus norvegicus* Linhagem Wistar^a.

Tratamento	Peso relativo dos órgãos (Média±Desvio Padrão) em gramas		
	Baço	Timo	Medula óssea
Controle ^b	305,44±14,57	62,81±9,92	21,33±1,92
CY (1 dose 50 mg/kg)	47,22±9,76 ^c	16,44±5,78 ^c	13,04±1,67 ^c
CY (2 dose 50 mg/kg)	40,41±0,12 ^c	12,59±6,65 ^c	10,81±1,49 ^c
CY (3 dose 25 mg/kg)	39,88±0,23 ^c	12,26±5,74 ^c	9,15±1,22 ^c

^aOs valores são médias e desvios padrão de cinco ratos eutanasiados entre o primeiro e o quinto dia após a administração de CY.

^bOs valores são médias e desvios padrão de 63 ratos controle negativo.

^cP<0.01 quando comparado com o grupo controle.

4.3 Efeito da ciclofosfamida sobre a imunidade humoral de *R. norvegicus* da linhagem Wistar

A administração de CY induziu uma significativa redução em todos os parâmetros da imunidade humoral dos animais tratados em relação ao grupo controle ($P < 0.05$). Como já foi descrito anteriormente, esses parâmetros incluem: os títulos do anticorpo (Tabela 4), a formação de PFC (Figura 5) e o teste de hemólise (Figura 6).

Tabela 4 - Efeito supressor da ciclofosfamida sobre a titulação de anticorpos em *Rattus norvegicus* linhagem Wistar

Tratamento	Título
Controle ^b	1:1456
CY (1 dose 50 mg/kg)	1:4
CY (2 dose 50 mg/kg)	1:2
CY (3 dose 25 mg/kg)	1:1

*Valores referentes ao quinta dia após a inoculação de CY.

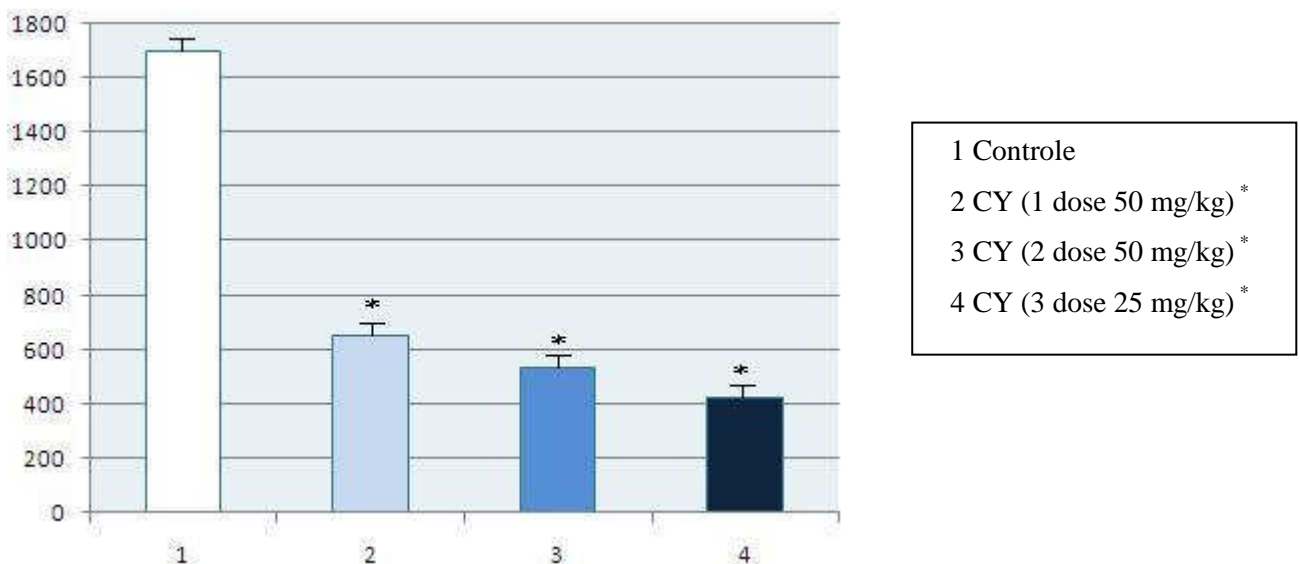


Figura 7 - Supressão da imunidade humoral induzida pela ciclofosfamida analisada através do ensaio sobre as células formadoras de placa. Os valores são medias e desvios padrão de cinco ratos eutanasiados entre o primeiro e o quinto dia após a administração de ciclofosfamida. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

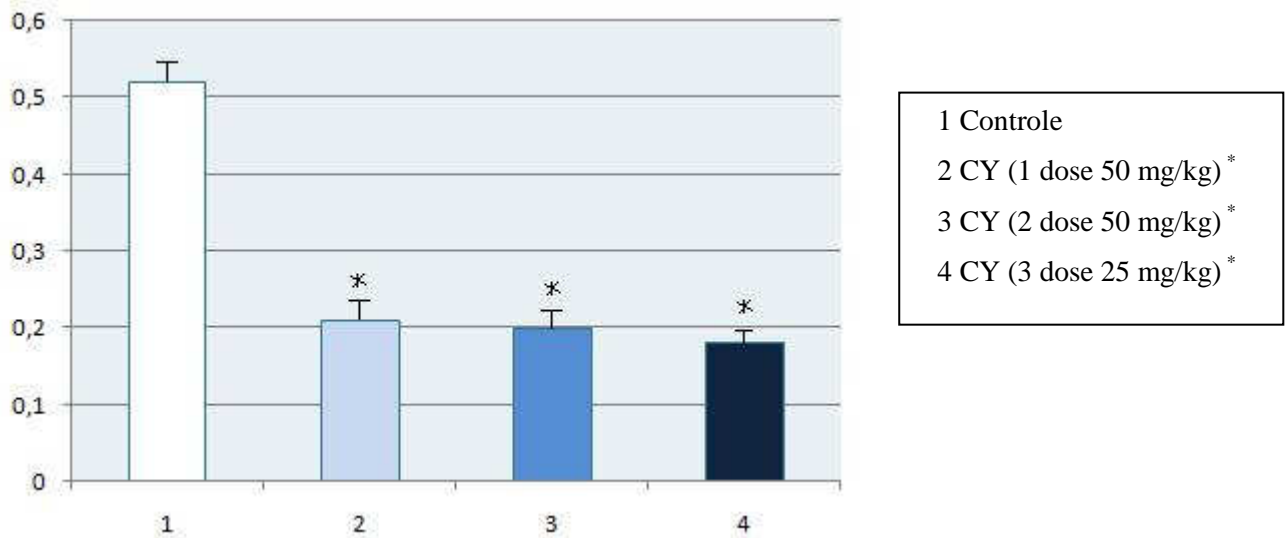


Figura 8 - Supressão da imunidade humoral induzida pela ciclofosfamida analisada através do teste de hemólise. Os valores são medias e desvios padrão de cinco ratos eutanaziados entre o primeiro e o quinto dia após a administração de ciclofosfamida. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

4.4 Imunossupressão em *C. apella*

Os 4 animais foram utilizados como grupo controle antes de serem submetidos à imunossupressão. No D0 do experimento foram inoculados nos 4 animais a dose de 50 mg/Kg de CY. Entre o quarto e o décimo dia após a inoculação de CY, o número de células sanguíneas brancas teve seus menores valores (Tabela 5). Não houve morte após intoxicação nesta fase, também não foi constatada variação significativa no peso corporal dos primatas.

Na segunda fase do experimento foi administrada novamente CY (50mg/kg) aos 20 dias após a primeira administração do imunossupressor, visto que neste intervalo de tempo o número de células sanguíneas brancas aumentou. Os quatro primatas utilizados neste experimento tiveram dieta balanceada, não enriquecida com cloreto de sódio. Nessa fase, no segundo dia os primatas apresentaram os menores valores na contagem de células sanguíneas brancas, essa baixa

celularidade permaneceu estável por 10 dias (Tabela 5). Durante esse período dois primatas morreram por intoxicação.

Tanto na primeira como na segunda fase deste experimento a diminuição das células sanguíneas brancas foi resultado da redução no número de linfócitos e posteriormente pela diminuição de neutrófilos. Não foi constatada mudança significativa no peso corpóreo dos *C. apella*.

Tabela 5 - Contagem de células sanguíneas brancas de *Cebus apella* submetidos a tratamento com ciclofosfamida^a.

CSB	N	Antes do tratamento Média±DP	Primeira dose Média±DP	Segunda dose Média±DP	Teste U	LN
Eritrócitos	4	60,35±6,42	42,42±6,43	38,67±8,52*	P<0.05	41,5-79
Basófilos	4	0	0	0	NS	0
Eosinófilos	4	0	0	0	NS	0
Linfócitos	4	38,7±4,98	22,13±9,33	17,79±7,87*	P<0.05	21-63
Monócitos	4	0	0	0	NS	0

CSB= células sanguíneas brancas, N= número de amostra, DP= Desvio Padrão, U= Teste Mann – Whitney, LN= Limites de normalidade extraídos de Riviello et al. (2001).

^a Média e Desvio Padrão dos dez primeiros dias de tratamento.

*Abaixo dos parâmetros de normalidade.

4.5 Avaliação dos efeitos genotóxicos da ciclofosfamida

4.5.1 Análise do micronúcleo em *R. norvegicus* da linhagem Wistar

A administração de CY aumentou significativamente a freqüência de MN PCEs e provocou efeito citotóxico, o qual ficou evidente pela diminuição da percentagem dos PCEs em relação aos NCEs, no sangue periférico dos ratos Wistar (Tabela 6). A segunda dose inoculada de CY (50 mg/kg) foi a que apresentou maior citotoxicidade e freqüência de MN, dos animais tratados em relação aos controles negativos (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequência de micronúcleos no sangue periférico de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar após tratamento com CY^a

Tratamento	MN PCE (Média±Desvio Padrão)	PCE/NCE (%) (Média±Desvio Padrão)
Controle ^b	1,68±2,45	13,65
CY (1 dose 50 mg/kg)	28,32±6,46 ^c	4,33 ^c
CY (2 dose 50 mg/kg)	30,69±8,65 ^c	3,80 ^c
CY (3 dose 25 mg/kg)	19,52±7,44 ^c	9,32 ^c

^aOs valores são médias e desvios padrão de três ratos eutanaziados entre o primeiro e o terceiro dia após a administração de CY.

^bOs valores são médias e desvios padrão de 63 ratos controle negativo.

^cP<0.05, Mann-Whitney U-test, quando comparado com o grupo controle.

4.5.2 Análise do micronúcleo em *C. apella*

O estudo consta de dois grupos distintos, um controle negativo composto pelos linfócitos dos quatro animais antes da administração de CY e o outro objeto do estudo, composto pelos linfócitos dos mesmos primatas após dois tratamentos de 50 mg/kg de CY. A média de MN/1000 células apresentou um aumento significativo nos linfócitos dos *C. apella* após o tratamento (P<0.05). Houve um ligeiro aumento da frequência de MN da segunda administração de CY em relação à primeira, porém este não foi significativo. A maioria dos linfócitos apresentou apenas um MN por célula binucleada (Tabela 7). Foram analisadas 2000 células binucleadas para cada *C. apella*.

Tabela 7 - Frequência, distribuição dos micronúcleos (MN) em linfócitos binucleados (BN) de quatro *Cebus apella* expostos e índice de proliferação de célula binucleada (IPCB).

Tratamento	Distribuição de MN			Total MN	MN/1000 células BN Média ± S.D.
	1	2	3		
Controle ^a	9	3	0	15	1,85 ± 0,85
CY (1 dose 50 mg/kg)	687	248	118	1537	192,12±11,59 ^b
CY (2 dose 50 mg/kg)	726	274	137	1669	208,62±12,45 ^b

N= Tamanho amostral

^a Sangue periférico de *Cebus apella* antes da administração da CY
2000 células binucleadas foram analisadas/indivíduo

^b estatisticamente diferente dos demais grupos (P<0,05)

5. DISCUSSÃO

5.1 Imunossupressão e inoculação tumoral em *R. norvegicus* da Linhagem Wistar

Para avaliação da imunossupressão foram analisados como parâmetros o peso relativo do baço, rim, timo e fígado e a celularidade da medula óssea, do baço e do timo. Embora seja freqüente na literatura experimentos de imunossupressão em roedores, utilizando CY, não encontramos um desenho experimental semelhante ao realizado neste projeto (FRANCES et al., 1973; CHU et al., 2005; DANTAS et al., 2006; RAMPRASATH et al., 2006; GRAIM et al., 2008).

Bin-Hafeez et al. (2001) utilizaram a mesma concentração de CY (uma única dose de 50 mg/kg) e avaliaram os mesmos parâmetros de imunossupressão, usados neste experimento, em camundongos Suíços albinos. Da mesma forma que os nossos resultados, na primeira e na segunda administração de CY em ratos Wistar, somente o baço e o timo tiveram diminuição significativa do seu peso relativo. Frances et al. (1973) em experimentos com CY (15 mg/kg), em ratos Wistar, avaliaram o efeito dessa droga no baço e também encontraram uma redução significativa do seu peso relativo.

Na terceira aplicação da droga (25 mg/kg), os rins e o fígado também passaram a apresentar diminuição do peso relativo, o que coincide com o início da morte dos roedores, provavelmente uma intoxicação sistêmica tenha provocado esse fenômeno e não o efeito imunossupressor da CY. Por este motivo, na quarta administração da CY mantivemos a mesma concentração (25 mg/kg), porém a morte dos roedores aumentou de 13 para 17 animais, esta observação reforça nossa hipótese de que houve intoxicação letal dos ratos Wistar e que os animais não morreram por qualquer tipo de infecção. Estudos realizados em pacientes revelam que a CY induz toxicidade cardiovascular, a qual pode variar desde arritmias até condições fatais (VIALE & YAMAMOTO, 2008).

Com relação à celularidade dos órgãos, o tratamento com CY também induziu a um decréscimo significativo do número de células da medula óssea, do baço e do timo quando comparado com o grupo controle de animais. Nossos

resultados também são semelhantes aos encontrados em camundongos tratados com a mesma concentração de CY que neste experimento (BIN-HAFEEZ et al., 2001; THARAKAN et al., 2007). Uma observação interessante consiste em que independente do *R. norvegicus* da linhagem Wistar ser um roedor de peso corporal maior que o camundongo Suíço albino, a celularidade dos seus órgãos não é superior.

A administração de CY também induziu uma significativa redução em todos os parâmetros da imunidade humoral dos animais tratados em relação ao grupo controle. O efeito supressor da CY sobre o título dos anticorpos teve valores semelhantes aos encontrados em camundongos (BIN-HAFEEZ et al., 2001) e em humanos (VLACHOYIANNOPOULOS et al., 2008).

O ensaio sobre as PFC, que é um dos melhores testes para prever imunotoxicidade em camundongos, apresentou uma redução significativa da imunidade humoral em todas as três administrações de CY avaliadas neste projeto. Os valores encontrados foram semelhantes aos descritos em camundongos Suíços albinos intoxicados com CY (LADICS, 2007).

O terceiro ensaio que avalia a diminuição da imunidade humoral utilizado neste projeto foi o teste de hemólise. Existem apenas dois relatos na literatura que fazem uso deste teste para avaliar a imunotoxicidade da CY *in vivo* (BIN-HAFEEZ et al., 2001; CHEN et al., 2006) e da mesma forma que os ensaios discutidos anteriormente, os valores encontrados neste trabalho com ratos Wistar, para o teste de hemólise, também são semelhantes aos da literatura com camundongos Suíços, na mesma concentração de CY.

Nos testes de imunossupressão em *R. norvegicus* da linhagem Wistar podemos observar que na terceira dose administrada de CY (25 mg/kg) os valores de todos os experimentos realizados são semelhantes, do ponto de vista da função imune, que os da primeira e da segunda dose, embora a concentração de CY administrada em cada uma das duas primeiras injeções da droga tenha sido o dobro (50 mg/kg).

Estes resultados revelam que embora exista um aumento da celularidade e do peso relativo dos órgãos linfóides, que se equipara numericamente aos dos ratos controle, a recuperação do sistema imune não é completa. Adicionalmente, os

resultados nos levam a concluir que a partir da terceira administração de CY (25 mg/kg), quando os ratos começam a sofrer toxicidade letal, não é mais necessária a administração de altas concentrações da droga para suprimir o sistema imune dos roedores. Uma concentração inferior como a de 25 mg/kg é suficiente para manter os *R. norvegicus* da linhagem Wistar imunodeprimidos.

A nossa hipótese de que não existe recuperação total da função imune e que a CY induz colateralmente toxicidade, pode ser constatada ao observar que os períodos de recuperação dos parâmetros de normalidade, da celularidade e do peso relativo dos órgãos linfóides, nos roedores, aconteceram num intervalo de tempo maior a partir da primeira dose. Na terceira dose, embora os ratos recebessem a metade da quantidade de CY, o tempo de recuperação foi de 54 dias em comparação com os 35 dias da segunda dose e os 28 dias da primeira administração.

5.2 Imunossupressão em *C. apella*

No nosso conhecimento não existem relatos da literatura utilizando esta espécie de primata não humano em experimentos de imunossupressão. Estudos similares ao descrito neste projeto foram realizados em babuínos e *Macaca fascicularis*. A alteração na contagem diferencial de células sanguíneas brancas representou o maior efeito adverso, da CY, observado nos parâmetros de laboratório analisados nesses primatas não humanos (SCHUURMAN et al., 2005).

O experimento de imunossupressão teve duas fases e, em ambas as etapas, houve diminuição significativa das células sanguíneas brancas como consequência da redução no número de linfócitos e posteriormente pela diminuição de neutrófilos. Experimentos utilizando uma única aplicação de 40 mg/kg de CY em babuínos e *M. fascicularis* apresentam resultados semelhantes ao deste trabalho para a primeira administração de CY (SCHUURMAN et al., 2005).

Na primeira dose do imunossupressor administrado nos 4 exemplares de *C. apella*, tanto os valores dos eritrócitos quanto dos linfócitos apresentaram

diminuição, porém não significativa, em relação ao grupo controle e o que é mais importante, somente na segunda aplicação de CY a contagem de células sanguíneas brancas saiu do padrão de normalidade, se estabelecendo assim a imunossupressão nos animais.

Os padrões hematológicos e químicos do sangue da espécie *Cebus apella*, em relação a sexo e idade, foram descritos por Riviello & Wirz (2001) em 36 representantes da espécie. Esta é a única referência da literatura que apresenta o intervalo de normalidade para o número de células sanguíneas brancas e outros parâmetros nesses primatas. Os valores encontrados nas amostras de sangue periférico que foram utilizadas como controle negativo deste trabalho, antes da aplicação da CY, não diferem dos encontrados nessa publicação.

Como citado anteriormente, Schuurman et al., (2005) somente administraram uma única dose de CY em babuínos e *Macaca fascicularis*, porém numa concentração menor (40 mg/kg), provavelmente isso provocou a diminuição no número de células sanguíneas brancas atingindo seu menor valor entre o quinto e o nono dia após a inoculação da droga, em comparação com nossos resultados onde as menores contagens se apresentaram mais cedo e tiveram uma duração maior, entre quarto e o décimo dia após a inoculação da CY.

Em relação à recuperação da imunidade dos *Cebus apella*, os mesmos adquiriram o padrão de normalidade no número de células brancas do sangue aos 20 dias após a primeira administração do imunossupressor e aos 24 dias após a segunda inoculação da CY. Novamente comparando nossos resultados com os de Schuurman et al. (2005), em babuínos, podemos observar que a recuperação destes antropóides aconteceu mais cedo, com 15 dias. Provavelmente esta diferença ocorreu porque os babuínos receberam uma dose menor de CY (40 mg/kg), independentemente de ter um peso corporal superior, de até 35 Kg

O fato da recuperação imune da segunda dose de CY ter sido em um intervalo de tempo maior em relação à recuperação da primeira administração da droga, reforça nossa hipótese levantada a partir dos resultados da imunossupressão com os ratos Wistar, de que embora os valores de referência voltem aos padrões da normalidade, a recuperação imune não é completa, visto que a CY provoca toxicidade sistêmica. Como consequência do efeito citotóxico, que discutiremos

posteriormente, após a segunda administração de CY dois dos quatro primatas que iniciaram o experimento, morreu por intoxicação.

5.3 Avaliação dos efeitos genotóxicos da ciclofosfamida

Em *R. norvegicus* da linhagem Wistar as três administrações de CY aumentaram significativamente a frequência de MN PCEs e provocaram efeito citotóxico, o qual ficou evidente pela diminuição da percentagem dos PCEs em relação aos NCEs, no sangue periférico dos animais. Este efeito era esperado, visto que a CY é utilizada como controle positivo em vários estudos de genotoxicidade descritos na literatura (LI et al., 1988; BORROTO et al., 2002; HAMADA et al., 2003; ACEVEDO et al., 2006; SELVAKUMAR et al., 2006; OLIVEIRA-MARTINS & GRISOLIA, 2007; VIKRAM et al 2007; ANDRADE et al., 2008).

Embora a terceira administração de CY tenha ocorrido com a metade da concentração (25 mg/kg) das duas inoculações iniciais, a frequência de MN PCEs não corresponde a metade das frequências da primeira e da segunda administração. Esta observação sugere que existe um efeito genotóxico cumulativo a cada dose de CY aplicada. Por outro lado este efeito cumulativo é parcial visto que o aumento observado na frequência de MN PCE, da primeira aplicação da droga para a segunda, não é estatisticamente significativo.

Na análise do efeito citotóxico da CY observamos o mesmo fenômeno. O aumento da percentagem dos MN PCEs em relação aos MN NCEs na terceira dose de CY (25 mg/kg), é menor do que o dobro da percentagem MN PCE/NCE obtida na primeira e na segunda administração de CY (50 mg/kg).

O efeito genotóxico cumulativo da CY fica evidente na aplicação da terceira dose do imunossupressor, que coincide com a morte dos roedores. Este efeito se potencializa na quarta inoculação de CY, quando o número de roedores mortos por intoxicação aumentou, em relação a terceira inoculação, de 13 para 17, embora ambas administrações de CY tenham a mesma concentração (25 mg/kg).

Podemos concluir que, para efeitos de imunossupressão de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, a partir da terceira inoculação da droga, concentrações inferiores a 50 mg/kg são aconselháveis para evitar a morte massiva de roedores.

Ao comparamos as duas espécies de animais utilizadas no presente trabalho, podemos observar que os primatas não humanos têm uma recuperação imune mais rápida, de 20 dias, em relação aos 28 dias necessários para que os *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar recuperem a celularidade dos órgãos linfóides, embora a concentração de CY tenha sido a mesma para as duas espécies de animais. Provavelmente a capacidade de metabolização da droga seja mais eficaz nos *Cebus apella*. Por este motivo a extrapolação dos dados obtidos, em experiências com roedores para os seres humanos, deve ser realizada com cuidado. Nossos resultados apóiam a conclusão de que os primatas não humanos constituem excelentes modelos experimentais devido a sua grande proximidade evolutiva e filogenética com o ser humano. Por este motivo, são considerados animais nobres para as pesquisas científicas.

Em *Cebus apella*, comparamos a freqüência de MN de quatro primatas antes e depois do tratamento com CY. Os linfócitos do sangue periférico, após o tratamento com CY apresentaram um aumento significativo da media de MN/1000 células em relação aos linfócitos controle. A freqüência de MN controle dos *Cebus apella* foi semelhante à freqüência controle encontrada em humanos (EHRlich et al., 2008; EVENTI et al., 2009). Trabalhos *in vitro* envolvendo CY e linfócitos humanos são escassos e não servem de parâmetro de comparação com o presente projeto, visto que a CY é um agente clastogênico que precisa da ativação da fração hepática sub celular S9 (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

Os únicos trabalhos da literatura que associam a freqüência de MN com o tratamento de CY, em primatas não humanos, são os de Zúñiga-González et al. (2005) e Hotchkiss et al. (2008) com *Callithrix jacchus* e *Macaca mulatta* respectivamente. Nessas espécies, utilizando citometria de fluxo e microscopia, para uma concentração de CY de 5 mg/kg, a freqüência de MN aumentou significativamente.

Nossos resultados revelaram uma freqüência de MN/1000 células de 192,12 para a primeira administração de CY e de 208,62 para a segunda, estas freqüências

são aproximadamente cem vezes superiores às dos linfócitos controle (1,85). Nossos resultados estão de acordo com os Hotchkiss et al. (2008), que encontraram uma frequência de MN 10 vezes inferior à nossa (29 MN/1000 células), porém numa concentração de CY (5 mg/kg) também 10 vezes inferior à que utilizamos no presente trabalho (50 mg/kg).

Neste experimento podemos observar que, houve um ligeiro aumento da frequência de MN da segunda administração de CY em relação à primeira, porém este não foi significativo. Assim provavelmente, no intervalo de 20 dias entre a primeira e a segunda aplicação de CY, o sistema de reparo celular dos *Cebus apella* foi capaz de repara e/ou eliminar a maioria das células com alterações mutagênicas.

Também podemos concluir que a concentração de CY de 50mg/kg, em *Cebus apella*, corresponde à concentração DL50 da droga, visto que 50% desses animais morreram durante o desenvolvimento do projeto. Até o desenvolvimento desta proposta, não se conhecia a concentração correspondente ao DL50.

6. CONCLUSÕES

No desenvolvimento de um modelo de imunossupressão, através da inoculação de CY, em *R. norvegicus* da linhagem Wistar, observamos que inicialmente o baço e o timo tiveram diminuição do seu peso relativo e posteriormente esse fenômeno se repetiu nos rins e o fígado, concomitante com o início da morte dos roedores, provavelmente por intoxicação sistêmica e não pelo efeito imunossupressor da CY.

O tratamento com CY também induziu a um decréscimo significativo do número de células da medula óssea, do baço e do timo e induziu uma significativa redução em todos os parâmetros da imunidade humoral dos animais tratados em relação ao grupo controle.

Após a análise do efeito imunossupressor das três administrações de CY, nos *R. norvegicus* da linhagem Wistar, podemos concluir que:

- a) Embora exista um aumento da celularidade e do peso relativo dos órgãos linfóides, após um período de recuperação imunológica, que se equipara numericamente aos ratos controle, o restabelecimento do sistema imune não é completo.
- b) A partir da terceira administração de CY, quando os ratos começam a sofrer toxicidade letal, não é mais necessária a administração de altas concentrações de CY, para suprimir o sistema imune dos roedores. Uma concentração inferior como a de 25 mg/kg é suficiente para manter os *R. norvegicus* da linhagem Wistar imunodeprimidos.

A alteração na contagem diferencial de células sanguíneas brancas representou o maior efeito adverso, da CY, observado nos parâmetros de laboratório analisados nos *C. apella*. Nas duas vezes que a droga foi administrada houve redução no número de linfócitos e posteriormente diminuição de neutrófilos, porém somente na segunda administração de CY foi observada a imunossupressão.

Com relação à recuperação da imunidade dos *C. apella* podemos concluir que:

- a) Pelo fato da recuperação imune da segunda dose de CY ter sido em um intervalo de tempo maior em relação à recuperação da primeira

administração da droga, é provável que embora os valores de referência voltem aos padrões da normalidade, a recuperação imune não é completa, visto que a CY provoca toxicidade orgânica.

- b) Como consequência do efeito citotóxico, após a segunda administração de CY, dois dos quatro primatas que iniciaram o experimento, morreram por intoxicação.

Visto a proximidade filogenética dos primatas não humanos, este desenho experimental será de suma importância para o estudo do tumor em diversas fases do desenvolvimento e principalmente para testes de novos fármacos e esquemas terapêuticos.

Com relação às análises de genotoxicidade da CY podemos concluir que:

- a) Em *R. norvegicus* da linhagem Wistar, as três administrações de CY aumentaram significativamente a frequência de MN PCEs e provocaram efeito citotóxico.
- b) Existe um efeito genotóxico cumulativo a cada dose de CY aplicada em ratos Wistar. Porém este efeito é parcial, visto que o aumento observado na frequência de MN PCE não é estatisticamente significativo.
- c) Para efeitos de imunossupressão de ratos Wistar, a partir da terceira inoculação da CY, concentrações inferiores a 50 mg/kg são aconselháveis para evitar a morte massiva de roedores.
- d) Em *C. apella*, os linfócitos do sangue periférico, após o tratamento com CY apresentaram um aumento significativo da média de MN/1000 células em relação aos linfócitos controle.
- e) A frequência de MN controle dos *C. apella* foi semelhante à frequência controle encontrada em humanos.
- f) O sistema de reparo celular dos *C. apella*, no intervalo entre as aplicações de CY, foi capaz de reparar e/ou eliminar grande parte das células com alterações mutagênicas, visto que um houve discreto aumento da frequência de MN, porém não significativo, quando comparamos a segunda administração do imunossupressor em relação à primeira.

- g) A concentração de CY de 50mg/kg, em *C. apella*, corresponde à concentração DL50 da droga, visto que 50% desses animais morreram durante o experimento de imunossupressão. Até o desenvolvimento desta proposta, não se conhecia a concentração correspondente ao DL50.
- h) Ao comparamos as duas espécies de animais utilizadas no presente trabalho, os primatas não humanos têm uma recuperação imune mais rápida em relação aos *R. norvegicus* da linhagem Wistar. Provavelmente a capacidade de metabolização da droga seja mais eficaz nos *C. apella*.

Finalmente devemos salientar que a extrapolação dos dados obtidos, em experiências com roedores, para os seres humanos deve ser realizada com cuidado. Nossos resultados apóiam a conclusão de que os primatas não humanos constituem os melhores modelos experimentais devido a sua grande proximidade evolutiva e filogenética com o ser humano. Por este motivo, são considerados animais nobres para as pesquisas científicas.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Tradução da 6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

AL-SABAT, K.; METCALFE, C. D. **Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water**. Mut. Res. 343: 121-135. 1995.

ANDERSON, D.; BISHOP, J. B.; GARNER, R. C.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; SELBY, P. B. **Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks**. Mutat. Res. 330(1-2): 115-81. 1995.

ANDRADE, A. (org). **Animais de Laboratório**. 1-2; 19-24. 2002. Disponível em: <<http://www.uff.br/animaislab/ap1.doc>>. Acesso em: 20 Fev. 2009.

ANDRADE, L. S.; SANTOS, D. B.; CASTRO, D. B.; GUILLO, L. A.; CHEN-CHEN, L. **Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice**. Braz J Biol. 68: 155-9. 2008.

BACH, J. F.; STROM, T. **The mode of action of immunosuppressive agents**. Amsterdam: Elsevier, 1986.

BAKKER, J. M.; SCHMIDT, E. D.; KROES, H.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C. J.; TILDERS, F. J.; VAN REES, E. P. **Effects of neonatal dexamethasone treatment on hypohalamo-pituitary adrenal axis and immune system of the rat**. J. Neuroimmun. 74 (1-2): 69-76, 1997.

BIN-HAFEEZ, B.; AHMAD, I.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. **Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice**. Journal of Ethnopharmacology. 75: 13–18. 2001.

BORROTO, J. I.; CREUS, A.; MARCOS, R. **Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene in cultured human lymphocytes**. *Mutat Res.* 519: 179-85. 2002.

BURNS, L. A.; MEADE, B. J.; MUNSON, A. E. **Toxic responses of the immune system**. Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons, Ed. Klaassen C.D., International Edition, 355-402, 1996.

CENCI, E. et al. **Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis**. *J. Infect. Dis.* 178: 1750–1760, 1998.

Centro Nacional de Primatas (CENP). **Guia de Espécies. Pesquisas. Macaco Pregado** (*Cebus apella*). Disponível em: http://www.cenp.org.br/guia_ver.php?idConteudo=14. Acessado em 22 Nov. 2008.

CENTRO DE BIOTERISMO FMUSP. Disponível em: http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17&caract=sim. Acessado em: 15 Abr. 2011.

CHABNER, B. A.; ALLEGRA, C. J.; CURT, G. A.; CALABRESI, P. **Antineoplastic agents**. In: Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York, St. Louis, San Francisco, McGraw-Hill, Inc, 9th edition, 1233-1287, 1996.

CHANG, T. K. H.; WEBER, G. F.; CRSPI, C. L.; WAXMAN, D. J. **Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes**. *Cancer Research.* 53: 5629-5637. 1993.

CHEN, X. T.; LI, J.; WANG, H. L.; CHENG, W. M.; ZHANG, L.; GE, J. F. **Immunomodulating effects of fractioned polysaccharides isolated from Yu-Ping-Feng-Powder in cyclophosphamide-treated mice**. *Am J Chin Med.* 34: 631-41. 2006.

CHILLER, T.M.; LUQUE J. C.; SOBEL, R. A.; FARROKHSAD, K.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D. A. **Development of a murine model of cerebral aspergillosis**. *J. Infect. Dis.* 186:574–577. 2002.

CHOY, W. N. **Regulatory genetic toxicology tests**. In: Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment (CHOY, W. N. ed.), Marcel Dekker, Inc, New York. 2001.

CHRISTIE, N. T.; COSTA, M. **In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. L II. Effects of metals on DNA structure and function in intact cells.** Biological Trace Element Research. 5: 55-71, 1983.

CHU, I.; BOWERS, W. J.; CALDWELL, D.; NAKAI, J.; PULIDO, O.; YAGMINAS, A.; WADE, M. G.; MOIR, D.; GILL, S.; MUELLER, R. **Toxicological effects of gestational and lactational exposure to a mixture of persistent organochlorines in rats: systemic effects.** Toxicological Sciences. 88: 645-655. 2005.

CIOMS. **Princípios Internacionais para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais, adaptado do International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals** - Genebra, 1985.

CLAUSE, B. T. **The Wistar Institute Archives: Rats (Not Mice) and History,** Mendel Newsletter, 1998. Disponível em: <<http://www.amphilsoc.org/mendel/1998.htm#Clause>>. Acessado em: 15 Abr. 2010.

COLVIN, O. M. **An overview of cyclophosphamide development and clinical applications.** Curr Pharm Des. 5: 555-560, 1999.

COSTA, Rodrigo Netto. **AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOSSUPRESSOR MEDIADO PELA DEXAMETASONA, CICLOFOSFAMIDA E TALIDOMIDA NO ENSAIO DO LINFONODO POPLITEAL EM RATOS.** 2001. 68f. Monografia - Universidade do Rio de Janeiro. 2001.

DANTAS, J. A.; AMBIEL, C. R.; CUMAN, R. K. N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C. A. **Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná.** Acta Sci. Health Sci. 28: 165-170. 2006.

DE CICCIO, L. H. S. Macaco Prego. **Saúde Animal Zôo Virtual Fauna Brasileira.** Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/extinto13.htm>>. Acesso em: 14 Mar. 2009.

DOHERTY, N. S. **Selective effects of immunosuppressive agents against the delayed hypersensitivity response and humoral response to sheep red blood cells in mice.** Agents Actions. 11: 237-242, 1981.

DOHERTY, M. L.; BASSETT, H. F.; QUINN, P. J.; DAVIS, W. C.; MONAGHAN, M. L. **Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis***. Am. J. Vet. Res. 56(10): 1300-1306, 1995.

EHRlich, V. A.; NERSESYAN, A. K.; HOELZL, C.; FERK, F.; BICHLER, J.; VALIC, E.; SCHAFFER, A.; SCHULTE-HERMANN, R.; FENECH, M.; WAGNER, K. H.; KNASMÜLLER, S. **Inhalative exposure to vanadium pentoxide causes DNA damage in workers: results of a multiple end point study**. Environ Health Perspect. 116: 1689-93. 2008.

EVANS, H. J. **Molecular mechanisms in the induction of chromoso aberrations**. In: Progress genet. toxicologic (Scott, D.; Bridges, B.A. and Sobels, F.H, eds Amsterdam, 2: 57-74, 1977.

EVENTI, A.; LUBRANO, V.; SCARPATO, R.; TURCHI, G. **Protective effects of plicatin B on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by different mutagens**. Food Chem Toxicol. 47: 124-8. 2009.

FENECH, M. **The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations**. Environmental Health Perspectives Supplements. 101 (3): 101- 107. 1993.

FENECH, M. **The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method**. Mutation. Res. 392: 11–18. 1997.

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

FENECH, M.; MORLEY, A. A. **Measurement of micronuclei in lynchocytes**. Mutat. Res. 147 (1-2): 29-36. 1985.

FENECH, M.; CROTT, J. W. **Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclearbuds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage–fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay**. Mutation Research. 504: 131–136. 2002.

FOX, S. T. **Fisiologia Humana**. 7 ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2007. 726p.

FRANCES, J.; BECK, L.; LEVY, M.; WHITEHOUSE, W. **The local graft versus host reaction in the rat as a tool for drug mechanism studies.** Br. J. Pharmac.;49: 293-302. 1973.

GATTÁS, G. J. F. Alterações Citogenéticas em indivíduos expostos a agentes mutagênicos do tabaco e do álcool. In: Carvalho, M. B. **Tratado de cirurgia de cabeça e pescoço e otorrinolaringologia.** São Paulo: Atheneu, 2001. p.1491.

GARCIA, M.; KITAMURA, S. S.; RABELLO, P. A.; FARIA JR, S. P. F.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; SILVA, M. M.; BASTOS, P. A. S.; RAMOS, M. C. C.; CARVALHO, V. M. **Modelo experimental para avaliação da resposta imune em ovinos.** Revta. Inst. Ciênc. Saúde Univ. Paulista. 17(1): 19-26, 1999.

GARCIA, M.; SERTÓRIO, S.P.; ALVES, G. J.; CHATE S. C ; CARNEIRO, R.; LALLO, M. A. **Uso da ciclofosfamida em modelos de imunodepressão experimental em ovinos.** Pesq. Vet. Bras. 24:115 119, 2004.

GRAIM, J. F. S.; LOPES FILHO, G. J.; BRITOMVH MATOS L. T. M. B. **Histologic evaluation of rats' liver after *Croton cajucara Benth* (sacaca) administration.** Acta Cirúrgica Brasileira. 23: 130-34. 2008.

GREENWOOD, B.; KERRY, P. J. **The effects of methotrexate and melphalan in sheep.** Brit. J. Pharmacol. 63: 283-285, 1978.

HAMADA, S.; NAKAJIMA, K.; SERIKAWA, T.; HAYASHI, M. **Mutagenesis The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay.** Mutagenesis. 18: 273-5. 2003;

HEDDLE, J. A. **A rapid in vivo test for chromosomal damage.** Mutat. Res. 18: 187-90. 1973.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. **The Induction of Micronuclei as a Measure of genotoxicity.** Mut. Res. 123: 61-118, 1983.

HOOFTMAN, R. N.; RAAT, W. K. **Introduction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern Mudminnow *umbra pygmaea* by ethyl methanosulphonate.** Mut. Res. 104: 147-152. 1982.

HOTCHKISS, C. E.; BISHOP, M. E.; DERTINGER, S. D.; SLIKKER, W JR.; MOORE, M. M.; MACGREGOR, J. T. **Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes IV: an index of chromosomal damage in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*).** Toxicol Sci. 102: 352-8. 2008.

ISOBE, T.; LILLEHOJ, H. S. **Dexamethasone suppress T cell-mediated immunity and enhances disease susceptibility to *Eimeria mivati* infection.** Vet. Immun. Immunopath. 39(4): 431-446, 1993.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; EICHENLAUB-RITTER, U.; DECORDIER, I. **Indirect mechanisms of genotoxicity.** Toxicol. Lett. 140/141: 63–74. 2003.

KRISHNA, G.; URDA, G.; PAULISSEN, J. **Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats.** Mutat Res. 453: 45–50, 2000.

LAI, M.; WANG, S. M.; ZHANG, W. L.; WANG, Y.; HUANG, S. Q.; DONG, W.; LI, A. **Effects of electroacupuncture on tumor growth and immune function in the Walker-256 model rat.** Zhongguo Zhen Jiu. 28: 607-9. 2008.

LADICS, G. S. **Primary Immune Response to Sheep Red Blood Cells (SRBC) as the Conventional T-Cell Dependent Antibody Response (TDAR).** Test. J Immunotoxicol. 4: 149-52. 2007.

LI, Y. M.; DUNIPACE, A. J.; STOOKEY, G. K. **Genotoxic effects of fluoride: a controversial issue.** Mutat Res. 127-36. 1988.

MADLE, E.; KORTE, A.; BEEK, B. **Species differences in mutagenicity testing. II. Sister-chromatid exchange and micronucleus induction in rats, mice and Chinese hamsters treated with cyclophosphamide.** Mutagenesis. 1: 419–422, 1986.

MAHIDOL UNIVERSITY – NATIONAL LABORATORY ANIMAL CENTRE. Disponível em: <http://www.nlac.mahidol.ac.th/nlacwwwtha/spec_outWR.htm>. Acessado em: 06 Dez. 2011.

MANNA, G. K.; SADHUKHAN, A. **Use of cells of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus teste (MNT)**. Current Science.. 5510: 498-501. 1986.

MATTER, B.; SCHIMID, W. **Treninon - induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test**. Mut, Res.12: 417 – 425, 1971.

MEHRAD, B. M.; WIEKOWSKI, B. E.; MORRISON, S. C.; CHEN, E. C.; CORONEL, D. J.; MANFRA, A.; LIRA, S. A. **Transient lung-specific expression of the chemokine KC improves outcome in invasive aspergillosis**. Am. J. Respir. Crit Care Med. 166: 1263–1268. 2002.

MINTON, J. E.; BLECHA, F. **Cell-mediated immune function in lambs chronically treated with dexamethasone**. J. Anim. Sci. 69: 3225-3229, 1991.

MONGA, D. P. **Studies on experimental aspergillosis in immunodeficient mice**. Zentrbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A. 254: 552–560. 1983.

MOORHEAD, P. S.; NOWEL, P. C.; MELLMAN, J. W.; BATTISPPS, D. M.; HUMGERFORD, D. A. **Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood**. Experimental Cellular Research. 20: 613 – 616, 1960.

MUNGANTIWAR, A. A; NAIR, A. M.; SHINDE, U. A.; DIKSHIT, V. J.; SARAF, M. N.; THAKUR, V. S.; et al. **Studies on the immunomodulatory effects of *B. diffusa* alkaloid fraction**. Journal of Ethnopharmacology. 65: 125–131. 1999.

OECD GUIDELINE 487. **In Vitro Micronucleus Test**. DRAFT GUIDELINE. 1st version. June 14. 2004.

OLIVEIRA, P. F. M.; HENRIQUES, I. A.; RODRIGUES FILHO, F.; ALMEIDA, P. R. C.; MORAES, M. O. **Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato**. Acta Cir. Bras. 13: 242-247. 1994.

OLIVEIRA-MARTINS, C. R.; GRISOLIA, C. K. **Determination of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood reticulocytes of mice treated topically with different lubricant oils and cyclophosphamide.** Genet Mol Res. 6: 566-74. 2007.

PHARMGKB. Disponível em: <<http://www.pharmgkb.org/pathway/PA2034>>. Acessado em: 30 Dez 2011.

PRADO, C. F.; RAMOS, J.; VALLE R. J.; CARVALHO, T.B. **Atualização Terapêutica.** 23 ed. Artes Médicas: São Paulo, p. 33 – 43. 2007.

PRUETT, J. H.; FISHER, W. F.; DELOACH, J. R. **Effects of dexamethasone on selected parameters of bovine immune systems.** Vet. Res. Commun. 11: 305-323, 1987.

PUBCHEM COMPOUND – NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2907&loc=ec_rcs>. Acessado em: 30 Dez 2011.

RAO, V. K. et al. **The extent of chromosomal aberrations induced by chemotherapy in nonhuman primates depends of the schedule of administration.** Mutation Research. 583: 105-119, 2005.

RAISUDDIN, S.; ZAIDI, S. I. A.; SINGH, K. P.; RAY, P. K. **Effect of subchronic aflatoxin exposure on growth and progression of Ehrlich's ascites tumor in mice.** Drug and Chemical Toxicology. 14: 185–206. 1991.

RAMIREZ, A. **Análise de células metanucleadas de alcoólicos portadores de carcinomas orais.** Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. 2000.

RAMIREZ, A.; GATTÁS, G. J.; CARVALHO, M. B.; SALDANHA, P. H. **Clinical implications of micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas.** Oral Oncol. 6: 199-204, 1999.

RAMPRASATH, V. R.; SHANTHI, P.; SACHDANANDAM, P. **Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effects of Semecarpus anacardium LINN.** Nut Milk Extract in Experimental Inflammatory Conditions Biol. Pharm. Bull. 29: 693-700. 2006.

REY, L. **Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde.** Brasil: Guanabara Koogan. 1999.

RIBEIRO, L. R.; SALVARORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental.** Canoas: Ulbra, 2003.

RIVIELLO, M. C.; WIRZ, A. **Haematology and blood chemistry of *Cebus apella* in relation to sex and age.** J Med Primatol. 30: 308-12. 2001.

ROITT, I. M. **Imunologia.** 5 ed. Rio de Janeiro, São Paulo: Livraria Ateneu. 1989.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia,** 5 ed. Brasil: Manole Ltda. 1999.

ROMANYCHEVA, V.; BABICHEV, V. A.; UTESHEV, B. S.; KALINKOVICH, A. G. **The kinetics of inhibition with methotrexate and vincristine of the primary immune response to sheep red blood cells in mice.** Folia Biol. 24: 343-54, 1978.

ROTH, J. A.; KAEBERLE, M. L. **Enhancement of lymphocyte blastogenesis and neutrophil function by avidine in dexamethasone-treated and nontreated cattle.** Am. J. Vet. Res. 46(1): 53-57, 1985.

RYLANDS, A. B.; SCHNEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A. **An assessment of the diversity of new world primates.** Neotropical Primates. 8(2): 61-93. 2000.

SARTO, F.; FINOTTO, S.; GIACOMELLI, L.; MAZZOTTI, D.; TOMANIN, R.; LEVIS, A. G. **The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa.** Mutagenesis. 2: 11-7. 1987.

SAULNIER, D.; MARTINOD, S.; CHARLEY, B. **Immunomodulatory effects of in vivo of recombinant porcine interferon gamma on leukocyte functions of immunosuppressed pigs.** Annales de Recherche Vétérinaires. 22(1): 1-9, 1991.

SCHMID, W.; ARAKAKI, D. T.; BRESLAU, N. A.; CULBERTSON, J. C. **Chemical mutagenesis. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. I. Cytogenetic results on basic aspects of the methodology, obtained with alkylating agents.** Humangenetik. 11: 103-18. 1971.

SCHUURMAN, H. J.; SMITH, H. T.; COZZI, E. **Tolerability of cyclophosphamide and methotrexate induction immunosuppression in nonhuman primates.** Toxicology. 213: 1-12. 2005.

SELVAKUMAR, E.; PRAHALATHAN, C.; SUDHARSAN, P. T.; VARALAKSHMI, P. **Protective effect of lipoic acid on micronuclei induction by cyclophosphamide.** Arch Toxicol. 80: 115-9. 2006.

SILVA, P. **Farmacologia.** 4 ed. Brasil: Guanabara Koogan. 1994.

SIMPSON, M. A.; GOZZO, J. J. **Spectrophotometric determination of lymphocyte mediated sheep red blood cell hemolysis in vitro.** Journal of Immunological Methods. 21: 59-165. 1978.

SMITH, J. M.; TANG, C. M.; VAN NOORDEN, S.; HOLDEN, D. W. **Virulence of *Aspergillus fumigatus* double mutants lacking restrictocin and an alkaline protease in a low-dose model of invasive pulmonary aspergillosis.** Infect. Immun. 62:5247-5254. 1994.

SMITH, R. D.; KEHRER, J. P. **Cooxidation of cyclophosphamide as an alternative pathway for its bioactivation and lung toxicity.** Cancer research, 51: 542-548. 1991.

STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLOW, T. G. **Imunologia Médica.** 9 ed. Guanabara Koogan. 2000.

TAKAYAMA, S.; THORGEIRSSON, U. P.; ADAMSON, R. H. **Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates.** Proc. Jpn. Acad., Ser. B: 84, 2008.

TARAYRE, J.P.; BARBARA, M.; ALIAGA, M.; TISNE-VERSAILLES, J. **Comparative actions of immunosuppressants, glucocorticoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs on various models of delayed hypersensitivity and a non-immune inflammation in mice.** *Arzneimittelforschung.* 40(10): 1125-1131. 1990.

THARAKAN, S. T.; KUTTAN, G.; KUTTAN, R.; KESAVAN, M.; AUSTIN, S.; RAJAGOPALAN, K. **Effect of AC II, an herbal formulation in cyclophosphamide-induced immunosuppression in BALB/c mice--Implication in HIV treatment.** *Immunol Invest.* 36: 147-57. 2007.

THE WISTAR INSTITUTE, 2007. Disponível em: http://www.wistar.org/about_wistar/history.html. Acessado em: 15 Abr 2010.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. **Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users.** *Am. J. Epidemiol.* 134: 840-50. 1991.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. **Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development.** *Mutat. Res.* 271: 69-77. 1992.

URLANDO, C.; HEDDLE, J. A. **On the differential responsiveness of males and females in the micronucleus assay.** *Mut. Res.* 234: 199-204. 1990.

VIALE, P. H.; YAMAMOTO, D. S. **Cardiovascular toxicity associated with cancer treatment.** *Clin J Oncol Nurs.* 12: 627-38. 2008.

VIKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G. **Prior bleeding enhances the sensitivity of peripheral blood and bone marrow micronucleus tests in rats.** *Mutagenesis.* 22: 287-91. 2007.

VLACHOYIANNOPOULOS, P. G.; TOYA, S. P.; KATSIFIS, G.; ZINTZARAS, E.; TZIOUFAS, A. G.; MOUTSOPOULOS, H. M. **Upregulation of antiphospholipid antibodies following cyclophosphamide therapy in patients with systemic lupus erythematosus.** *J Rheumatol.* 35: 1768-75. 2008.

WILLIAMS, R. C.; METCALFE, C. D. **Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout.** Aquatic toxicology. 23: 193-202. 1992.

ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G. M.; GÓMEZ-MEDA, B. C.; ZAMORA-PEREZ, A. L.; RAMOS-IBARRA, M. L.; BATISTA-GONZÁLEZ, C. M.; LEMUS-VARELA, M. L.; RODRÍGUEZ-AVILA, J. L.; GALLEGOS-ARREOLA, M. P. **Micronucleated erythrocyte frequencies in old and new world primates: measurement of micronucleated erythrocyte frequencies in peripheral blood of *Callithrix jacchus* as a model for evaluating genotoxicity in primates.** Environ Mol Mutagen. 46(4): 253-9. 2005.