



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

HELENIANA MARIA MIRANDA DE CARVALHO

**ANÁLISE IMUNOLÓGICA E GENOTÓXICA EM *Rattus Novergicus* DA LINHAGEM
WISTAR TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA**

**BELÉM – PARÁ
2016**

HELENIANA MARIA MIRANDA DE CARVALHO

**ANÁLISE IMUNOLÓGICA E GENOTÓXICA EM *Rattus Novergicus* DA LINHAGEM
WISTAR TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA**

Dissertação de mestrado submetido ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará para a obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular- Área de concentração em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano, ICB-UFPA.

**BELÉM – PARÁ
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Carvalho, Heleniana Maria Miranda de, 1985-
Análise imunológica e genotóxica em *Rattus*
Novvergicus da linhagem Wistar tratados com
ciclofosfamida / Heleniana Maria Miranda de Carvalho. -
2016.

Orientador: Rommel Mario Rodriguez Burbano.
Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências
Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2016.

1. Sistema Imunológico. 2. *Rattus norvegicus*
- Aspectos imunológicos. 3. Toxicologia genética
- *Rattus norvegicus*. I. Título.

CDD 22. ed. 616.079

HELENIANA MARIA MIRANDA DE CARVALHO

**ANÁLISE IMUNOLÓGICA E GENOTÓXICA EM *Rattus Novergicus* DA LINHAGEM
WISTAR TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA**

Defesa do mestrado submetido ao programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular - área de concentração Biologia Celular.

Banca examinadora

Orientador: Professor Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA

Membro da banca: Professor Dr. Diego Di Felipe Alcântara
Escola Superior da Amazônia - ESAMAZ

Membro da banca: Dra. Leticia Martins Lamarão
Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará - HEMOPA

**BELÉM – PARÁ
2016**

Este trabalho foi realizado no laboratório de citogenética Humana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará sob orientação Professor Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano. A realização da pesquisa contou com o apoio das seguintes instituições: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Evandro Chagas.

Aos meus amados pais, que se dedicaram ao máximo investindo em minha educação e me preparando para ser cada dia uma melhor pessoa, ao meu esposo, grande amigo e incentivador, aos meus irmãos que com seus exemplos sempre me motivaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, quem me sustém em cada etapa da minha vida, dando-me sabedoria e dircionamento, sendo o melhor Guia.

À minha linda família, que sempre me apoiou e incentivou meu crescimento. Mãezinha “mainha”, obrigada por me fazer mais forte e por me assegurar uma base sólida de família. Paizinho “painho”, seu grande incentivo me direcionou. Queridos irmãos, Mirandinha e Netinho, como é maravilhoso tê-los como meus amigos, companheiros e grandes exemplos. Esposo encantador, Andrey de Athayde, amo você cada dia mais, grande homem de Deus, que me apoiou em todos os momentos, você é o meu grande amor, amigo e companheiro.

Agradeço, imensamente, ao meu orientador Prof. Dr. Rommel Burbano, que é um grande professor, com um caráter admirável, pela nova oportunidade dada com a realização deste trabalho e pelo grande apoio. Mas acima de tudo, por sua amizade e compreensão.

Ao Cnpq, que disponibilizou a bolsa e fomentou a pesquisa.

Ao Diego Alcântara que se disponibilizou e ajudou na construção do trabalho.

A todos do Laboratório de Citogenética Humana que me ajudaram.

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

RESUMO

O desenvolvimento deste trabalho, deu-se devido a necessidade de se compreender melhor o sistema imune, levando-se em consideração a diversidade dos modelos experimentais de imunossupressão, bem como a variedade de respostas imunológicas e genotóxicas, diferenças estas, relacionadas às espécies, ao medicamento e doses utilizadas. Desta maneira, objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos no sistema imunológico e os efeitos genotóxicos em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, após a inoculação do agente alquilante Ciclofosfamida (CY). A administração de 50 mg/kg de CY nos roedores, possibilitou observar uma significativa diminuição dos parâmetros de celularidade e peso relativo dos órgãos linfóides. A imunidade humoral dos roedores sofreu supressão, visto que foi realizada a análise da titulação de anticorpos, o ensaio sobre as células formadoras de placa e o teste de hemólise. Foram realizadas quatro inoculações desse imunossupressor e a periodicidade entre as inoculações foi determinada pela recuperação dos níveis de normalidade dos parâmetros supracitados. Nas duas vezes que foi administrada a droga, houve redução no número de linfócitos e posteriormente diminuição de neutrófilos, porém somente no segundo contato com a CY foi observada a imunossupressão. A análise da genotoxicidade da ciclofosfamida (CY) foi analisada através do ensaio cometa e foi de suma importância, pois detectamos danos genômicos ocorridos no DNA, expostos às diferentes doses da ciclofosfamida (CY), que foram de 50 mg/kg nas duas primeiras fases e de 25 mg/kg nas duas últimas fases do experimento. Além disso, foi verificado que os efeitos genotóxicos são cumulativos a cada dose de CY aplicada, pois mesmo sendo administrado na terceira fase, a metade da concentração (25 mg/kg) das duas inoculações iniciais CY, o índice de danos não correspondeu a metade dos índices de danos da primeira e da segunda administração. Entretanto, ao analisarmos imunologicamente e genotoxicamente os roedores, nosso trabalho possibilitará testar novos esquemas terapêuticos de imunossupressão.

Palavras-chave: Ratos Wistar, Imunologia, Ciclofosfamida, Ensaio Cometa.

ABSTRACT

The development of this work has given up due to the need to better understand the immune system, taking into account the diversity of experimental immunosuppression models as well as the variety of immunological responses and genotoxic differences these, related species, the drug and doses used. Thus, aim of this study was to analyze the effects on the immune system and genotoxic effects in *Rattus norvegicus* Wistar, after inoculation of the alkylating agent cyclophosphamide (CY). The administration of 50 mg / kg in rodents CY, possible to observe a significant decrease in the parameters of cellularity and relative weight of lymphoid organs. The humoral immunity of rodents has undergone deletion, since the analysis of the antibody titration was performed on the test plate forming cells and hemolysis testing. four inoculations that immunosuppressant and the intervals between the inoculations was determined by recovery of normal levels of the above parameters were performed. Both times the drug was administered, there was a reduction in the number of lymphocytes and neutrophils subsequently decreased, but only the second contact CY was observed immunosuppression. The analysis of the genotoxicity of cyclophosphamide (CY) was analyzed using the comet assay and was of paramount importance because dectamos genomic damage occurring in DNA exposed to different doses of cyclophosphamide (CY), which were 50 mg / kg in the first two phases and 25 mg / kg during the last two phases of the experiment. Furthermore, it was found that the genotoxic effects are cumulative with each CY dose applied, because even being administered in the third phase, the middle concentration (25 mg / kg) of the two inoculations initial CY the damage index does not correspond to half damage indices of the first and second vaccination. However, the analysis and immunologically genotoxicamente rodents, our work will enable testing new therapeutic immunosuppression regimens.

Keywords: Wistar rats, Immunology, Cyclophosphamide, Comet assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fórmula estrutural da ciclofosfamida.....	8
Figura 2 -	CYP2B6 e o metabolismo da ciclofosfamida.....	10
Figura 3 -	Exemplar da espécie <i>Rattus norvegicus</i> da linhagem Wistar. Observar o padrão albino, orelhas alongadas, cabeça grande e comprimento da cauda menor que o comprimento corporal.....	12
Figura 4 -	Fluxograma do grupo experimental em <i>Rattus norvegicus</i> da linhagem Wistar.....	16
Figura 5 -	Classes de Cometas e seus respectivos scores na determinação dos Danos no DNA. Classificação de danos ao DNA (efeito genotóxico) detectados por meio do Ensaio Cometa.....	19
Figura 6 -	Supressão da imunidade humoral induzida pela ciclofosfamida analisada através do ensaio sobre células formadoras de placa. Os valores são médias 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.....	24
Figura 7 -	Supressão da imunidade humoral induzida pela ciclofosfamida analisada através do teste de hemólise. Os valores são médias 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.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre o peso dos órgãos em <i>Rattus norvegicus</i> da Linhagem Wistar.....	22
Tabela 2- Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre a celularidade dos órgãos linfoides de <i>Rattus norvegicus</i> da Linhagem Wistar.....	23
Tabela 3- Efeito supressor da ciclofosfamida sobre a titulação de anticorpos em <i>Rattus norvegicus</i> da Linhagem Wistar.....	23

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Relaciona a quantidade de animais do grupo controle com a quantidade de animais que foram monitorados durante seis meses após as quatro fases do experimento e seus respectivos desvio padrão..... 26

Gráfico 2 - Análise do índice de danos do DNA nas três primeiras fases do tratamento com ciclofosfamida relacionado com o número de dias em *Rattus norvegicus* da Linhagem Wistar..... 26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALDH	Aldeído Deshidrogenase
PCBs	Bifenilos Policlorado
PFC	Células formadoras de placa
CY	Ciclofosfamida
CN	Controle Normal
CEPAE	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará
SRBC	Eritrócitos de carneiro (Sheep Red Blood Cells)
NCE	Eritrócitos normocromáticos
PCE	Eritrócitos policromáticos
PHA	Fitohemaglutinina
g	Gramma
4-OHCY	4- Hidroxiciclofosfamida
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
NK	Natural Killer
LPS	Lipopolissacarídeo
µg	Micrograma
µL	Microitro
mL	Mililitros
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PRR	Padrão de Reconhecimento do Receptor
pH	Potencial hidrogênioônico

CMoP	Progenitor Comum de Monócitos
Kg	Quilograma
rpm	Rotações por minuto
PBS	Solução Tampão Fosfato
HSCT	Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	SISTEMA IMUNE.....	1
1.2	IMUNOTOXICOLOGIA.....	2
1.3	IMUNOSSUPRESSÃO.....	3
1.4	TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA.....	6
1.5	CICLOFOSFAMIDA.....	7
1.6	RATOS DA LINHAGEM WISTAR (<i>Rattus norvegicus</i>).....	11
1.7	MODELOS EXPERIMENTAIS DE IMUNOSSUPRESSÃO.....	12
2	OBJETIVO.....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	ANIMAIS.....	15
3.2	DOSAGEM E APLICAÇÃO DE CY.....	15
3.3	ANESTESIA E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	17
3.4	PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS E CELULARIDADE EM <i>Rattus norvegicus</i> DA LINHAGEM WISTAR.....	17
3.5	AVALIAÇÃO DAS FUNÇÕES DA IMUNIDADE HUMORAL EM <i>Rattus</i> <i>norvegicus</i> DA LINHAGEM WISTAR.....	17
3.5.1	HEMOAGLUTINAÇÃO.....	17
3.5.2	ENSAIO SOBRE AS CÉLULAS FORMADORAS DE PLACA EM <i>Rattus</i> <i>norvegicus</i> DA LINHAGEM WISTAR.....	18
3.5.3	TESTE DE HEMÓLISE.....	18
3.6	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DA CICLOFOSFAMIDA.....	19
3.7	ENSAIO DO COMETA (VERSÃO ALCALINA).....	19
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
5	RESULTADOS.....	21

5.1	IMUNOSSUPRESSÃO EM RATTUS NOVERGICUS DA LINHAGEM WISTAR.....	21
5.2	EFEITO DA CY SOBRE O PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS E CELULARIDADE EM <i>Rattus novergicus</i> DA LINHAGEM WISTAR.....	22
5.3	FEITO DA CICLOFOSFAMIDA SOBRE A IMUNIDADE HUMORAL DE <i>Rattus novergicus</i> DA LINHAGEM WISTAR.....	23
5.4	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DA CICLOFOSFAMIDA.....	24
5.4.1	ANÁLISE DO ENSAIO COMETA EM <i>Rattus norvegicus</i> DA LINHAGEM WISTAR.....	24
6	DISCUSSÃO.....	27
6.1	ANÁLISE IMUNOLÓGICA EM <i>Rattus norvegicus</i> DA LINHAGEM WISTAR	27
6.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DA CICLOFOSFAMIDA.....	29
7	CONCLUSÕES.....	31
8	REFERÊNCIAS.....	33
9	ANEXO (PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA).....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA IMUNE

O sistema imune dos vertebrados é constituído por duas camadas interligadas de defesa contra a infecção, sendo uma controlada pelo inato (não antígeno específico) e pelo adaptativo (específicas para o antígeno), respectivamente (MURPHY *et al.*, 2012). Levando em consideração o primeiro, os fagócitos profissionais são como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. As células imunitárias inatas fornecem a primeira linha de defesa, aprisionando e destruindo patógenos, os quais se identificam pela expressão de estruturas evolutivas conservadas, conhecidos como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) (IWASAKI *et al.*, 2010). Estes incluem componentes da parede celular de bactérias e fungos, tais como Lipopolissacarídeo (LPS) e β -glucanos (IWASAKI *et al.*, 2010). Na superfície da célula hospedeira existe um receptor que detecta um PAMP é conhecido como um Padrão de Reconhecimento do Receptor (PRR) e não é específico do antígeno (IWASAKI *et al.*, 2010). Outras células que compõem o sistema imune inato, são os neutrófilos, que possuem papel crítico na depuração bacteriana, na inflamação e na cicatrização de feridas e este é bem reconhecido, porém, quando o desenvolvimento de neutrófilos, migração ou função é defeituoso, conduz a efeitos deletérios graves para o hospedeiro (MAYADAS *et al.*, 2014). No entanto, além de destruir agentes patogênicos de maneira direta, as células imunitárias inatas, incluindo os neutrófilos, desempenham uma função importante na iniciação e modulação das respostas imunes adaptativas subsequentes (IWASAKI *et al.*, 2010; IWASAKI *et al.*, 2015).

A segunda linha de defesa imune, a imunidade adaptativa, é mediada por células T específica de antígeno e linfócitos B presentes nos órgãos linfóides tais como o baço e nódulos linfáticos (QI *et al.*, 2014). Neste caso, atuando em conjunto com antígenos de sinais co-estimuladores são entregues por células imunitárias inatas para as células T e B específicas do antígeno raras (RANDOLPH *et al.*, 2008). A resposta imunitária resultante conduz à geração de duas classes de células ativadas, isto é, as células efetoras, incluindo uma gama de células assassinas (HICKMAN *et al.*, 2008) e as células secretoras de anticorpos (WU *et al.*, 1997), bem como células de memória (MCHEYZER-WILLIAMS *et al.*, 1995) responsáveis pela proteção de longa duração contra a reinfeção.

As células dendríticas, em conjunto com os macrófagos, atuam como o principal responsável pelo transporte celular de antígenos do local da infecção para os linfonodos regionais (RANDOLPH *et al.*, 2008).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrar para os órgãos linfóides secundários, transportando partículas bacterianas (ABADIE *et al.*, 2005; HAMPTON *et al.*, 2015), que podem ser processados e apresentados aos linfócitos T e B . Isto coloca neutrófilos em uma posição única para participar nos estágios iniciais de ambas as respostas imunes inata e adaptativa na drenagem dos linfonodos. Diversos estudos *in vitro* têm caracterizado o diálogo cruzado entre os neutrófilos e as células do sistema imunológico inato e adaptativo em humanos (COSTANTINI *et al.*, 2011; PUGA *et al.*, 2012) e foram revistos em outros lugares (SCAPINI *et al.*, 2014; MANTOVANI *et al.*, 2011).

Os monócitos são cada vez mais reconhecidos como constituintes celulares críticos de respostas imunitárias inatas e adaptativa contra uma ampla gama de micróbios (SERBINA *et al.*, 2008), além de desempenharem a função de estado estável na semeadura dos fagócitos mononucleares em tecidos periféricos durante a vida pós -natal (YONA *et al.*, 2013).

Monócitos circulantes são originados a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes, isto ocorre através de um progressivo comprometimento de uma série de progenitores oligopotentes na medula óssea (FOGG *et al.*, 2006; GINHOUX *et al.*, 2014). O Progenitor Comum de Monócitos (CMoP) representa um progenitor proliferativo comprometido que é restrito a monócitos e macrófagos derivados de monócitos em condições homeostáticas (HETTINGER *et al.*, 2013).

1.2 IMUNOTOXICOLOGIA

É definida como sendo a ciência que estuda a ação deletéria de xenobióticos sobre o sistema imune. Sendo um dos ramos mais recentes da toxicologia, seu início está 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).

A imunotoxicologia adquiriu credibilidade quando produtos químicos, tais como toxafeno (ALLEN *et al.*, 1982), pentaclorofenol (KERKVLIT *et al.*, 1982), de chumbo, e dos chamados Bifenilos Policlorado - PCBs (Polychlorinated Biphenyls) (KOLLER *et al.*, 1982) foram utilizados em dosagens mais baixas, em comparação com os índices toxicológicos, visando produzir imunossupressão. Esta técnica foi fundamental para revelar que o sistema imunológico era de fato, um indicador sensível para detectar efeitos químicos induzidos e, na verdade, ser um órgão alvo desses efeitos. Além disso, tornou-se claro que ao

identificar a imunossupressão, esta poderia ser responsável não só por um aumento na susceptibilidade a agentes infecciosos, mas também um aumento no risco de desenvolver câncer. Estudos enfatizaram os efeitos das substâncias químicas sobre a resposta imune e a sua relação com a patogênese de vírus e agentes cancerígenos oncogênicos (KOLLER, 1975; KOLLER, 1977; KERKVLIT *et al.*, 1979 ; TALCOTT *et al.*, 1984; PARNELL *et al.*, 1986 ; TALCOTT *et al.*, 1990).

Atualmente, existem 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 ao 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. Uma vez que envolvem mão de obra especializada, um grande número de animais, reagentes e sistemas caros, e ainda, devido à 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

A imunossupressão é uma disfunção do sistema imune, que pode ser desencadeada através de uma diversidade de agentes biológicos (vírus, bactérias, fungos, parasitas), fatores químicos (contaminação da água e de alimentos por animais, antibióticos, metais pesados, desinfetantes) e fatores físicos (estresse, temperatura abaixo do ideal, concentrações excessivas de poeira e gases nocivos). Entretanto, a exposição prolongada a estes fatores adversos, pode levar à deterioração da saúde, à reduzidos ganhos de peso corporal, à menor eficácia da vacinação preventiva, maior susceptibilidade ao câncer, doenças infecciosas e

parasitárias, indução de latente infecções (HOERR, 2010; BORASCHI *et al.*, 2013; DEVAUD *et al.*, 2013; LA HOZ *et al.*, 2013; SUNDAR *et al.*, 2013) e consequentemente, ao aumento da mortalidade que contribui de maneira direta para perdas econômicas. Para neutralizar efetivamente os efeitos adversos, os pesquisadores estão à procura de substâncias que aumentem a resposta imune do corpo. Essas substâncias são conhecidas como imunoestimulantes e podem acelerar, aumentar ou prolongar a resposta imune, dependendo do estado imunitário do hospedeiro, a via de administração e a dose aplicada (BLECHA, 2001; NELSON *et al.*, 2003; FOSTER, 2004; THACKER, 2010; WHITLEY *et al.*, 2011).

Uma das principais funções 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 resposta específica, flexível e mais eficaz à invasão de agentes estranhos ao organismo é uma habilidade que está relacionada a filogenia 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 essencial dos 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 Brutton (ou a gamaglobulinemia ligada ao sexo), a deficiência isolada da IgA, a síndrome de Di George (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).

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 Di George, 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).

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 macrófaga. 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 fitohemaglutinina 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 TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA

Além do grande interesse em relação à investigação dos efeitos adversos mediados por substâncias imunossupressoras; há um forte ímpeto pelodesenvolvimento 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). Houve um considerável avanço, nas duas últimas décadas, 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).

Os agentes citotóxicos fazem parte de um grupo de substâncias químicas com propriedade farmacológica de destruir células capazes de auto-replicação, entre elas linfócitos imuno-competentes. Em 1959, estes fármacos foram originalmente introduzidos na medicina clínica como agentes anti-neoplásicos. Porém, 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).

De acordo com Stites *et al.*, (2000) 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.

De acordo com Michinori *et al.*, (2016), os efeitos dos agentes quimioterapêuticos sobre células natural killer são ajustados de acordo com o tipo de doença e intensidade da quimioterapia.

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).

1.5 CICLOFOSFAMIDA (CY)

A Ciclofosfamida (figura 1) comumente empregada na quimioterapia de pacientes com câncer (MONGA, 1983; SMITH *et al.*, 1994; CENCI *et al.*, 1998; CHILLER *et al.*, 2002; MEHRAD *et al.*, 2002; SELVAKUMAR *et al.*, 2006). Ela 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). Funciona, também, como uma droga supressora do sistema imune para estudos envolvendo transplante de órgãos; e é utilizada no tratamento do lúpus eritematoso sistêmico e da esclerose múltipla, além de ser administrada em outras doenças benignas (SELVAKUMAR *et al.*, 2006). Esta substância é um agente de alquilação que tem propriedades imunossupressoras potentes e atividade antineoplásica. Conseqüentemente, altas doses de CY é um amparo na maioria dos regimes condicionados para o Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas (HSCT) (SANTOS *et al.*, 1972; NAGLER *et al.*, 2013). Sua utilização pelos pesquisadores, ocorre devido à sua capacidade de desencadear resultados confiável e repetível dentro de um curto período de tempo. Ela também influencia nas células de tecidos normais, incluindo células do sistema imunológico, osso células da medula (em particular as células sanguíneas em desenvolvimento), ativados linfócitos (que proliferam e produzem anticorpos), as células fetais, células foliculares do cabelo e as células epiteliais intestinais (DANYSZA *et al.*, 1996). A Ciclofosfamida

enfraquece tanto a resposta imune celular como a resposta imune humoral. Seu efeito dependente da dose, mas mesmo uma única administração pode prejudicar temporariamente o sistema imune (AL-GHAZLAT, 2009).

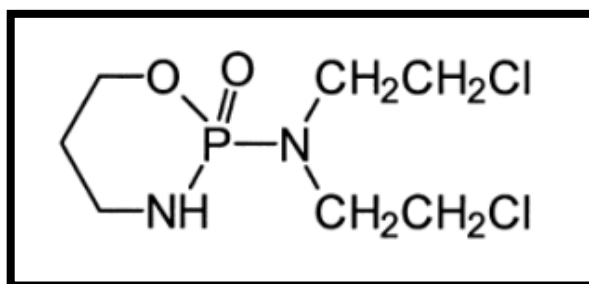


Figura 1 - Fórmula estrutural da ciclofosfamida. Fonte: Modificado de Germanas, Pandya (2002).

A ciclofosfamida é oxidativamente metabolizada pelo citocromo P450 hepático em dois poderosos metabólitos, mostarda de fosforamida e acroleína e impede divisão celular por reticulação de cadeias de DNA. Apesar da alquilação, o efeito dos metabólitos ativos ocorre ao longo do ciclo celular, que é mais pronunciado durante a G1 e S as fases da divisão celular (EMADI *et al.*, 2009). Além destes dois metabólitos produzidos na biotransformação da ciclofosfamida, ocorre a produção de outros metabólitos farmacologicamente ativos e citotóxicos (CHANG *et al.*, 1993).

A CY é metabolizada principalmente por isoenzimas CYP2B1, com participação significativa de CYP2C6 e CYP2C11 em ratos. Já em humanos, a ativação ocorre, sobretudo, por CYP2B6, com participação de CYP2A6, -2C8 e -2C9 (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 existirem evidências de sua ativação por outras enzimas em outros órgãos (SMITH & KEHRER, 1991).

A fosforamida de mostarda possui um papel importantíssimo, atuando como mediador do principal efeito da ciclofosfamida. Este metabólito só se forma em células com baixos níveis de Aldeído Deshidrogenase (ALDH). A fosforamida mostarda forma entre e dentro do DNA reticulações, bem como em ambas as vertentes e dentro das cadeias de DNA em posição guanina N-7 (conhecidas como enrolamento transversal-reticulação, interfilamentoso e intrafilamentoso, respectivamente). Este evento é irreversível e leva a apoptose celular (HALL *et al.*, 1992).

A ciclofosfamida apresenta níveis relativamente baixos de toxicidade típica da quimioterapia, quando os níveis de ALDH presentes nas células da medula óssea, fígado e epitélio haste intestinal, estão relativamente elevados. As enzimas ALDH atuam protegendo estes tecidos proliferantemente ativos, contra os efeitos tóxicos fosforamida mostarda e acroleína e isto ocorre, pois através da conversão na aldofosfamida carboxifosfamida, o que impede a formação de metabólitos tóxicos e acroleína. A ciclofosfamida induz efeitos imunomoduladores que beneficia a imunoterapia adaptativa. Os mecanismos sugeridos incluem (SISTIGU *et al.*, 2011):

1. A eliminação de células T-reguladoras (células T CD4 + CD25 +) em hospedeiros sem tratamento prévio e portadores de tumor.
2. Indução de fatores de crescimento de células T, tal como interferon (IFN) do tipo I.
3. Enxerto do tumor reativo melhorada de células T efectoras, eventualmente transferidas através da criação de um nicho imunológico espacial.”

Em consequência do pré-condicionamento com a ciclofosfamida de hospedeiros destinatários (de células T de um doador) tem sido usadas para melhorar a imunidade dos hospedeiros sem tratamento prévio e melhorar os regimes de imunoterapia adaptativa baseada em células T, assim como em estratégias de vacinação ativa e para induzir a imunidade antitumoral objetiva.

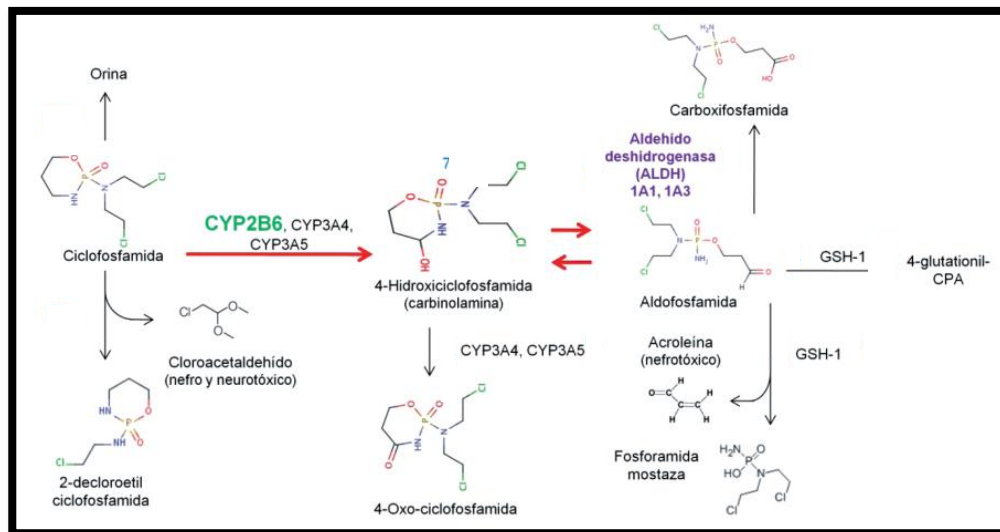


Figura 2 – CYP2B6 e o metabolismo da ciclofosfamida. Fonte: Adaptado por Tamayo-Chuc a partir de McDonald *et al.*, 2003; Emadi A. *et al.*, 2009.

Após sua metabolização, os efeitos citotóxicos da CY são primariamente devidos a sua capacidade de ligar-se a cadeias de DNA e efetuar ligações cruzadas. Contudo, 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 (DANTAS *et al.*, 2006).

Sabe-se que tanto em nível experimental quanto clínico, este fármaco ciclo-específico é um importante imunossupressor linfocitotóxico. Pode, porém, apresentar uma alta toxicidade, ocasionando uma série de quadros clínicos como por exemplo, 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 sobrevivência 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).

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).

1.6 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, cabeça grande, orelhas alongadas, e comprimento da cauda menor que o comprimento corporal. Fonte: Biotério Central-UFSJ, 2016.

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 (BIOTÉRIO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DA FCF-IQ/USP, 2016). 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 (BIOTÉRIO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DA FCF-IQ/USP, 2016).

1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DE IMUNOSSUPRESSÃO

Mediante a necessidade de se conhecer melhor o sistema imune, os modelos experimentais de imunossupressão vêm sendo estabelecidos há muitos anos, 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).

De acordo com Garcia *et al.*, (2004), diversas drogas tem sido empregadas sem 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. Por fim, Minton & Blecha (1991) e Garcia *et al.*, (1999) também não conseguiram demonstrar tal efeito em ovinos.

Neste trabalho, analisamos fatores imunológicos e genotóxicos em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar imunossuprimidos com o agente alquilante CY.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as respostas imunológicas e a ação genotóxica em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, após a administração do agente alquilante CY.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer e caracterizar um modelo de imunossupressão com o agente alquilante CY, em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar;
- Identificar o momento exato do início da depressão imune nestes animais;
- Identificar o período de tempo em que a depressão imune se sustenta;
- Identificar o período em que esses animais recobram sua resposta imunológica;
- Avaliar os efeitos genotóxicos da CY através do Ensaio Cometa.

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. 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

Bin-Hafeez *et al.* (2001) utilizaram a concentração de CY de 50 mg/kg (uma única dose) em camundongos Suíços albinos e avaliaram alguns parâmetros de imunossupressão. Parêntros estes que também foram avaliados neste trabalho.

Neste projeto, foi utilizado CY na forma de Cytosan®, ampolas contendo uma 1g, (Bristol – Meyers Oncology, Princenton, NJ). Para os testes de imunossupressão em *Rattus 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 pesorelativo 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 receberam o mesmo volume em solução salina. As soluções de CY foram preparadas no dia da inoculação.

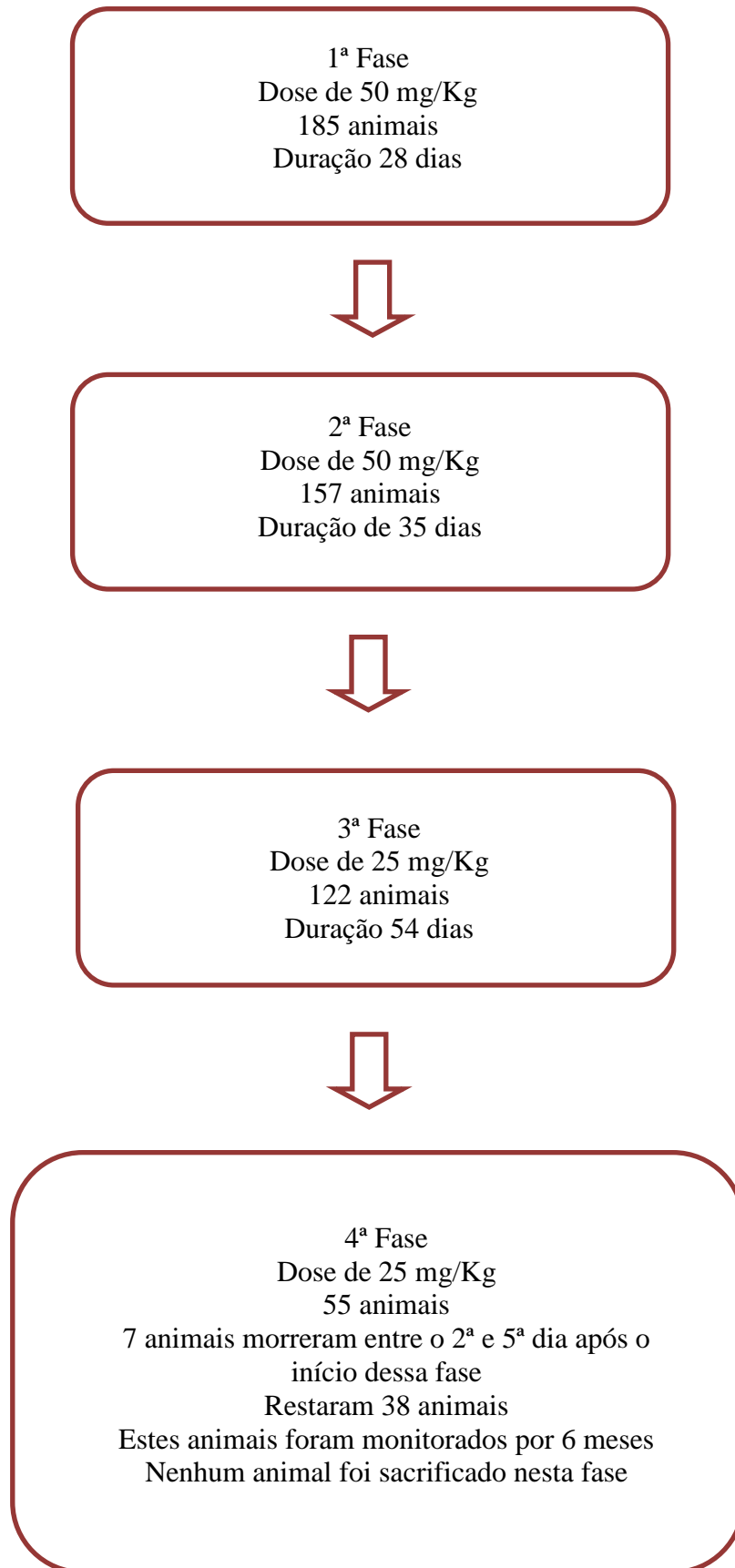


Figura 4–Fluxograma do grupo experimental em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar.

3.3 ANESTESIA E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os *Rattus 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 *Rattus 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).

3.4 PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS E CELULARIDADE EM *Rattus norvegicus* DA LINHAGEM WISTAR

Nos ratos Wistar, foi analisado 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).

3.5 AVALIAÇÃO DAS FUNÇÕES DA IMUNIDADE HUMORAL EM *Rattus 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 três parâmetros seguintes.

3.5.1 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 xifopúbica 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 fosfatosalino, 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.

3.5.2 ENSAIO SOBRE AS CÉLULAS FORMADORAS DE PLACA EM *Rattus 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 câmaras de Cunningham foram preparadas utilizando pedaços de vidro, as bocas foram cobertas e marcadas em ambos os lados. As câmaras 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 106 células do baço. Os outros órgãos, timo e fígado, seguiram o mesmo protocolo.

3.5.3 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.

3.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DA CICLOFOSFAMIDA

3.6.1 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa alcalino foi executado de acordo com o trabalho (SPEIT *et al.*, 2006), com pequenas alterações (PICADA *et al.*, 2007). As amostras de sangue (50 ul) foram colocadas em 5 mL de anticoagulante (heparina de sódio, 25000 UI, Liquaemin®). As suspensões de células do sangue (5 ul) foram embebidas em 95 mL de 0,75% de agarose de baixo ponto de fusão (Gibco BRL) e espalhada sobre lâminas de microscópio previamente revestidas de agarose. Após a solidificação, as lâminas foram colocadas em tampão de lise (2,5 mol / L de NaCl, 100 mmol / L de EDTA, e 10 mmol / L de Tris, pH 10,0), adicionado fresco com 1% de Triton X-100 (Sigma) e 10% de DMSO durante 48 h a 4 °C. As lâminas foram subsequentemente incubadas em tampão alcalino (300 mmol / l de NaOH e 1 mmol / L de EDTA, pH > 13) durante 20 min a 4 °C. Uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V / cm) foi aplicado durante 15 min para realizar a eletroforese do DNA. As lâminas foram então neutralizadas (0,4 mol / L de Tris, pH 7,5), corada com prata, e visualizados sob um microscópio. Foram selecionadas aleatoriamente 100 células e depois analisadas (50 células de cada uma das duas lâminas replicadas) a partir de cada animal. As células também foram visualmente classificadas de acordo com o tamanho da cauda em cinco classes, que vão desde não danificado (0) a um máximo de danificado (4), resultando em um único ponto de dano de DNA para cada animal e, conseqüentemente, para cada grupo estudado. O índice de dano (ID), variam de 0 (completamente intatas, 100 células × 0) 400 (Máxima danificado, 100 células × 4). A frequência da lesão (%) foi calculada com base no número de cauda contra células sem cauda.

De acordo com García (2004), o ensaio cometa possui cinco categorias para classificação dos resultados, mostrados na Figura 3, a seguir:

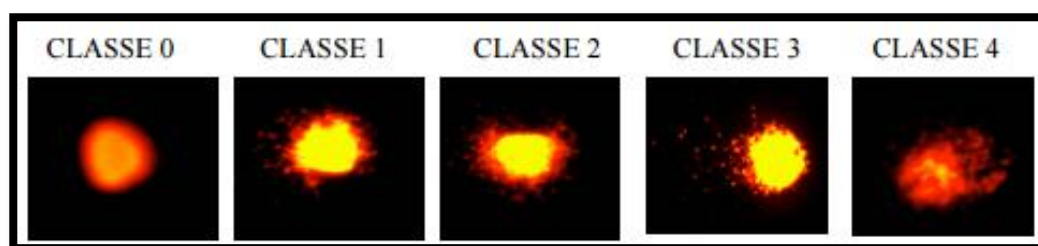


Figura 5 - Classes de Cometas e seus respectivos scores na determinação dos Danos no DNA. Classificação de danos ao DNA (efeito genotóxico) detectados por meio do Ensaio Cometa. Fonte: Malagutti-Ferreira, 2016.

4 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.

5 RESULTADOS

5.1 IMUNOSSUPRESSÃO EM *Rattus 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 1 e 2.

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.

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 1 e 2.

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 55roedores 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 avaliada 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 e em seguida foram eutanasiados.

5.2 EFEITO DA CY SOBRE O PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS E CELULARIDADE EM *Rattus 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 1). Para o fígado, o peso relativo, somente foi inferior, significativamente, em relação ao controle somente a partir da terceira administração de CY (Tabela 1). Não houve redução significativa de peso nos rins dos animais tratados com CY em relação ao grupo controle ($P > 0.05$).

Tabela 1 – Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre o peso dos órgãos em *Rattus norvegicus* da 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±0,29	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 quinto dia após a administração de CY.

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

^c $P < 0,05$ 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 2).

Tabela 2 – Efeito do tratamento com ciclofosfamida sobre a celularidade dos órgãos linfoides de *Rattus norvegicus* da Linhagem Wistar^a.

Tratamento	Peso relativo dos órgãos (Média ± Desvio Padrão) em gramas		
	Baço	Timo	Fígado
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 eutanaziados entre o primeiro e 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.

5.3 EFEITO DA CICLOFOSFAMIDA SOBRE A IMUNIDADE HUMORAL DE *Rattus norvegicus* DA LINHAGEM WISTAR

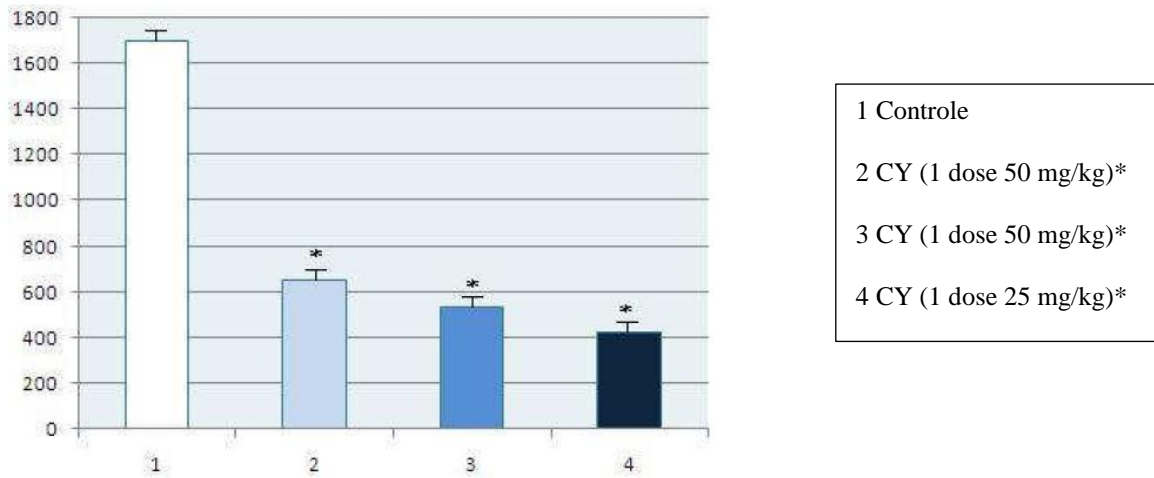
A administração de CY induziu uma significativa redução em todos os parâmetros da imunidade humoral dos animais tratados em relação ao grupo controle (P<0.05). Como já foi descrito anteriormente, esses parâmetros incluem: os títulos do anticorpo (Tabela 3), a formação de PFC (Figura 5) e o teste de hemólise (Figura 6).

Tabela 3 – Efeito supressor da ciclofosfamida sobre a titulação de anticorpos em *Rattus norvegicus* da Linhagem Wistar.

Tratamento	Título
Controle	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

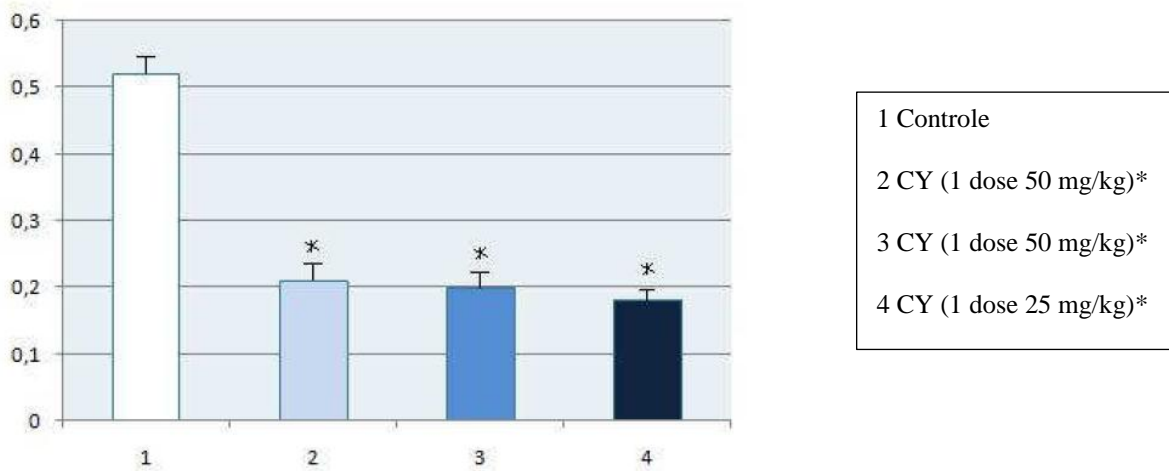
*Valores referentes ao quinto dia após a inoculação de CY.

Figura 6 – Supressão da imunidade humoral induzida pela ciclofosfamida analisada através do ensaio sobre células formadoras de placa. Os valores são médias 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.

Figura 7 – Supressão da imunidade humoral induzida pela ciclofosfamida analisada através do teste de hemólise. Os valores são médias 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.

5.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DA CICLOFOSFAMIDA

5.4.1 ANÁLISE DO ENSAIO COMETA EM *Rattus norvegicus* DA LINHAGEM WISTAR

O ensaio cometa permitiu a detecção de danos genômicos ocorridos no núcleo das células sanguíneas, expostos às diferentes doses da ciclofosfamida (CY), que foram de 50 mg/kg nas duas primeiras fases e de 25 mg/kg nas duas últimas fases do experimento. O gráfico 2 apresenta o desvio padrão do grupo controle e dos grupos que participaram do tratamento com CY.

O desvio padrão do índice de dano no genoma observado no núcleo das células sanguíneas do grupo controle foi de $\pm 1,68$. Já o desvio padrão do grupo participante da quarta fase, foi de $\pm 12,24$ (Gráfico 1). Dados estes que nos possibilita inferir que mesmo os animais da quarta fase ficando 6 meses em observação, sem administração de imunossupressor, mesmo tendo a imunidade reestabelecida e lesões genômicas reduzidas, Estas alterações não se mostraram completas, ou seja, eles ainda demonstraram um nível considerável de índice de danos.

A administração de CY aumentou significativamente o índice de danos no DNA e provocou efeito genotóxico, o qual ficou evidente ao analisarmos as células sanguíneas através do ensaio cometa (Gráfico 2).

Os índices de danos se apresentaram de maneira muito expressiva nas três primeiras fases do experimento, nos primeiros dias da administração da ciclofosfamida e com o tempo, estes índices eram reduzidos, pois havia uma recuperação e/ou renovação das células sanguíneas. Esta recuperação pode estar relacionada ao tipo de dano, pois o ensaio cometa identifica lesões pré-mutagênicas, lesões estas, que podem ser reversíveis.

Gráfico 1–Relação entre a quantidade de animais do grupo controle, do grupo dos animais monitorados durante seis meses e seus respectivos desvios padrão referente aos seus índices de danos.

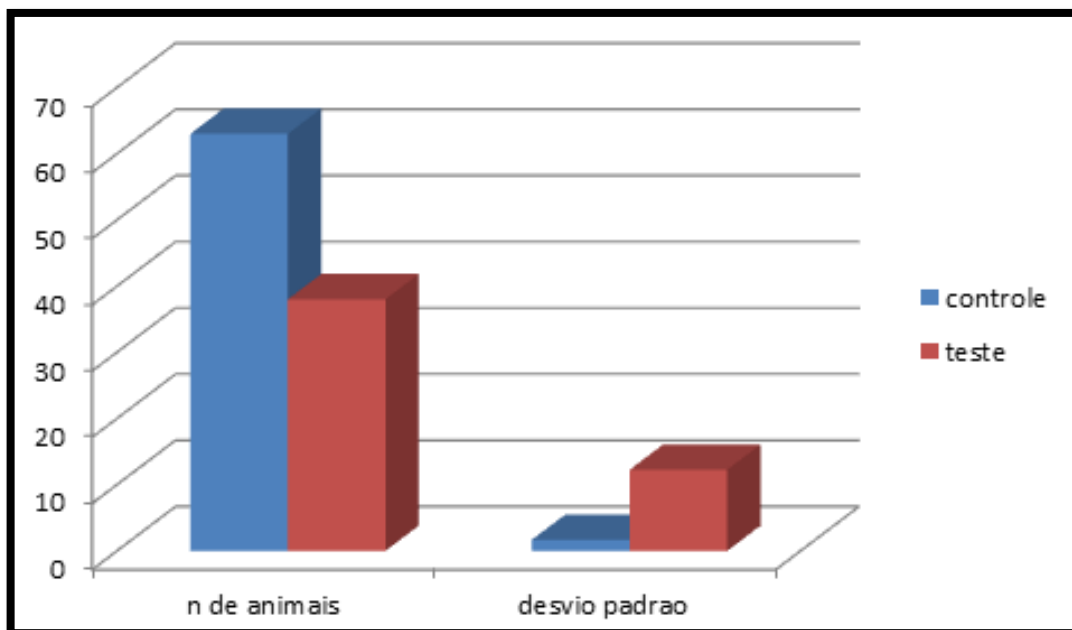
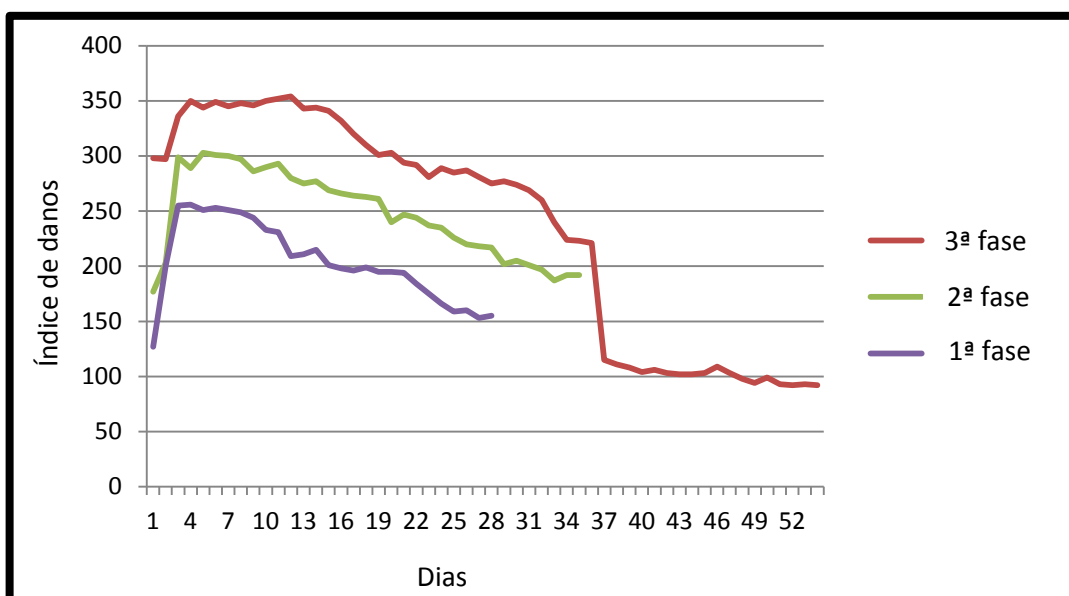


Gráfico 2 - Análise do índice de danos do DNA nas três primeiras fases do tratamento com ciclofosfamida relacionado com o número de dias em *Rattus norvegicus* da Linhagem Wistar.



6 DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE IMUNOLÓGICA EM *Rattus 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 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar ser um roedor de pesocorporal 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 *Rattus 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 segunda e da primeira 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 *Rattus 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.

6.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DA CICLOFOSFAMIDA

A redução da funcionalidade dos órgãos reprodutivos é uma das consequências fundamentais da quimioterapia e acomete tanto mulheres quanto homens (BINES; OLESKE; COBLEIGH, 1996; BLUMENFELD; HAIM, 1997; GHOSH *et al.*, 2001; GREENBERG; URBACH, 2006; IHA *et al.*, 2001; MARHHOM; COHEN, 2006; OKTAY *et al.*, 2007; SKLAR *et al.*, 2006; SÖNMEZER; OKTAY, 2006; WALLACE; ANDERSON; BAIRD, 2004). A Falência Ovariana Prematura (FOP) ou a perda da função ovariana durante ou logo após o tratamento ocorre em número alto de mulheres que são submetidas à quimioterapia, principalmente quando o tratamento é realizado com agentes alquilantes como a ciclofosfamida. Esses agentes agem quimicamente, com o ácido desoxirribonucleico (DNA) desses tecidos, provocando queda na fertilidade e diminuição da reserva folicular, em consequência ao dano no tecido gonadal. Mulheres pré-púberes são menos sensíveis aos efeitos deletérios da quimioterapia sobre as gônadas (ABSOLOM *et al.*, 2006; RIVKEES; CRAWFORD, 1988; WALLACE *et al.*, 1993), provavelmente porque os danos são maiores nas células germinativas em maturação (MALTARIS *et al.*, 2006; TILLY, 1998).

Estudos com ratas observaram que a administração de ciclofosfamida é capaz de levar à redução no volume uterino, número total de folículos e células da granulosa (ATAYA; VALERIOTE; RAMAHI-ATAYA, 1989; MULLER; COLE, 1970; PLOWCHALKB; MATTISON, 1992).

Em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar as três administrações de CY aumentaram significativamente o índice de danos no DNA das células e isto foi verificado ao avaliarmos o ensaio cometa nos animais do experimento, comprovando o efeito genotóxico. 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; SELVAKUMAR *et al.*, 2006; OLIVEIRA-MARTINS & GRISOLIA, 2007; VIKRAM *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2008).

Nossos resultados revelaram que a média do índice de danos dos 5 primeiros dias de cada fase experimental, foi de 217,8 na primeira, 254,2 para a segunda e 325 para a terceira fase, dados estes que superam 6 vezes o valor do índice de danos no grupo controle, que foi de 32. Deixando claro, os efeitos genotóxicos da ciclofosfamida.

Embora a terceira administração de CY tenha ocorrido com a metade da concentração (25 mg/kg) das duas inoculações iniciais, o índice de danos não corresponde a metade dos dados dos índices de danos da primeira e da segunda administração. Esta observação sugere que existe um efeito genotóxico cumulativo a cada dose de CY aplicada.

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.

7 CONCLUSÕES

Ao realizarmos as análises imunológicas e genotóxicas, após a inoculação de CY, em *Rattus 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 *Rattus 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 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar imunodeprimidos.

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

a) Em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, as três administrações de CY aumentaram significativamente o índice de danos do DNA nas células.

b) Existe um efeito genotóxico cumulativo a cada dose de CY aplicada em ratos Wistar.

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) Ao realizarmos as análises imunológicas e genotóxicas, nos 38 animais da quarta fase do experimento, observamos que mesmo após os seis meses, os animais se recuperam

imunologicamente, mas não conseguiram se recuperar totalmente geneticamente, apresentando efeitos genotóxicos.

Os resultados encontrados neste estudo reforçam a possibilidade de danos futuro na fertilidade em animais, devido ao potencial genotóxico da ciclofosfamida, associada a dosagem administrada. Devemos salientar que os dados obtidos, em experiências com roedores, podem ser úteis para os seres humanos devendo ser utilizados com cuidado, principalmente, levando em consideração as diferenças entre a foliculogênese dos roedores e humanos.

8 REFERÊNCIAS

- ABADIE V., BADELL E., DOUILLARD P., ENSERGUEIX D., LEENEN P.J., TANGUY M., ET AL., **Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes**, Blood 106 (5) 1843–1850, 2005.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Tradução da 6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 564p, 2008.
- ABSOLOM, K. *et al.* **Predictors of clinic satisfaction among adult survivors of childhood câncer**. Europ J Cancer, v.42, n.10, p.1421-1427, 2006.
- AL-GHAZLAT S. **Immunosuppressive therapy for canine immune-mediated hemolytic anemia**. Compend Contin Educ Vet 31: 33-41, 2009.
- ALLEN, A.C., KOLLER, L.D., POLLOCK, G.A. **Effect of toxaphene exposure on immune responses in mice**. J. Toxicol. Environ. Health 11, 61–69, 1982.
- 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.
- ATAYA, K.M.; VALERIOTE, F.A.; RAMAHI-ATAYA, A.J. **Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary**. Cancer Res, v.49, p.1660-4, 1989.
- 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.
- BINES, B.J.; OLESKE, D.M.; COBLEIGH, M.A. **Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer**. J Clin Oncol, v.14, n.5, p.1718-1729, 1996.

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.

BIOTÉRIO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DA FCF-IQ/USP: Disponível em: <http://www.unifal-mg.edu.br/bioterio/?q=ratos>. Acessado em: 07 de setembro de 2016.

BIOTÉRIO CENTRAL-UFSJ: Disponível em: <http://www.ufsj.edu.br/nucal/animais.php>. Acessado 08 de setembro de 2016.

BLECHA F. **Immunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals.** Vet Clin North Am Food Anim Pract 17: 621-633, 2001.

BLUMENFELD, Z.; HAIM, N. **Prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy.** Ann Med, v.29, n.2, p199-206, 1997.

BORASCHI D., PENTON-ROL G. **Perspectives in immunopharmacology: The future of immunosuppression.** Immunol Lett doi, 2013.

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 & Doulls 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.

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 YuPing-Feng-Powder in cyclophosphamide-treated mice.** Am J Chin Med. 34: 631- 41. 2006.

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

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: . Acessado em: 06 Mar. 2016.

COSTANTINI C., CALZETTI F., PERBELLINI O., MICHELETTI A., SCARPONI C., LONARDI S., *et al.*, **Human neutrophils interact with both 6-sulfo LacNAc⁺ DC and NKcells to amplify NK-derived IFN γ : role of CD18, ICAM-1, and ICAM-3**, Blood 117 (5) 1677–1686, 2011.

COSTA, R. N. **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.

DANYSZA A., KLEINROK Z. **Fundamentals of pharmacology for doctors, pharmacists and students of medicine.** Volumed, Wroclaw, 1996.

DEVAUD C., JOHN LB, WESTWOOD JA, *et al.* : Immune modulation of the tumor microenvironment for enhancing cancer immunotherapy. Oncoimmunology 2: e 25961, 2013.

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.

EMADI A, JONES RJ, BRODSKY RA. **Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary.** Nat Rev Clin Oncol.;6:638-647, 2009.

FOGG D.K., SIBON C., MILED C., JUNG S., AUCOUTURIER P., LITTMAN D.R., *et al.*, **A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells,** Science 311: 83–87, 2006.

FOSTER A.P. **Immunomodulation and immunodeficiency.** Vet Dermatol 15: 115-126, 2004.

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.

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.

GERMANAS, J; PANDYA, A.G. **Alkylating agents.** Dermatologic Therapy, Copenhagen, v. 15, p. 317-324, 2002.

GHOSH, S. *et al.* **Effect of human chorionic gonadotrophin coadministration on ovarian steroidogenic and folliculogenic activities in cyclophosphamide treated albino rats.** Reprod Toxicol, v.15, p.221-5, 2001.

GINHOUX F., JUNG S., **Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis.** Nat. Rev. Immunol. 14: 392–404, 2014.

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.

GREENBERG, M.; URBACH, S. **Preserving the fertility of children with cancer.** Med J Aust, v.185, n.10, p.532-3, 2006.

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

HALL AG, TILBY MJ. **Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies.** Blood Rev.;6:163-73, 1992.

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.

HAMPTON H.R., BAILEY J., TOMURA M., BRINK R., CHTANOVA T., **Microbe-dependent lymphatic migration of neutrophils modulates lymphocyte proliferation in lymph nodes.** Nat. Commun. 6: 7139, 2015.

HETTINGER J., RICHARDS D.M., HANSSON J., BARRA M.M., JOSCHKO A.C., KRIJGSVELD J., ET AL., **Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor.** Nat.Immunol. 14: 821–830, 2013.

HICKMAN H.D., TAKEDA K., SKON C.N., MURRAY F.R., HENSLEY S.E., LOOMIS J. *et al.* **Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes,** Nat. Immunol. 9 (2) 155–165, 2008.

HOERR F.J.: Clinical aspects of immunosuppression in poultry. Avian Dis 54: 2-15, 2010.

IHA, T. *et al.* **Restoration of menstruation after chemotherapy-induced amenorrhoea in a patient with ovarian immature teratoma.** Europ J Obstet Gynecol. v.98, p.249-250, 2001.

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.

IWASAKI A., MEDZHITOV R., **Regulation of adaptive immunity by the innate immune system.** Science 327 (5963): 291–295, 2010.

IWASAKI A., MEDZHITOV R., **Control of adaptive immunity by the innate immune system.** Nat. Immunol. 16 (4): 343–353, 2015.

KERKVLiet, N.I., BEACHER-STEPPAN, L., CLAYCOMB, A.T., CRAIG, A.M., SHEGGEBy, G.G. **Immunotoxicity of technical pentachlorophenol PCP-T; depressed hormonal immune responses to T-dependent and T-independent antigen stimulation in PCP-T exposed mice.** Fund. Appl. Toxicol. 2, 90–97, 1982.

KERKVLiet, N.I., KOLLER, L.D., BAECHEr, L.G., BRAUNER, J.A. **Effect of cadmium exposure on primary tumor growth and cell-mediated cytotoxicity in mice bearing MSB sarcomas.** J. Natl. Cancer Inst. 63, 479–483, 1979.

KOLLER, L.D. **Methylmercury: effect on oncogenic and non-oncogenic viruses in mice.** Am J. Vet. Res. 36: 1501– 1504, 1975.

KOLLER, L.D. **Enhanced polychlorinated biphenyl lesions in Moloney leukemia virus-infected mice.** Clin. Toxicol. 11: 107–116, 1977.

KOLLER, L.D., EXON, J.H., MOORE, S.A., WATANABE, P.G. **Evaluation of ELISA for detecting in vivo chemical immunomodulation.** J. Toxicol. Environ. Health 11: 15–22, 1982.

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

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.

LA HOZ R.M., BADDLEY J.W. **Infectious complications of immune modulatory agents.** Curr Infect Dis Rep 15: 465-471, 2013.

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.

MALAGUTTI-FERREIRA, M.J. **Analysis of genomic integrity through the and micronucleus test in mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. 2016. 61.f Dissertation (Master em Biosciences).** – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

MALTARIS, T. *et al.* **Gonadal damage and options for fertility preservation in female and male cancer survivors.** *Asian J Androl*, v.8, n.5, p.515-533, 2006.

MANTOVANI A., CASSATELLA M.A., COSTANTINI C., JAILLON S. **Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity.** *Nat. Rev. Immunol.* 11 (8): 519–531, 2011.

MARHHOM, E.; COHEN, I. **Fertility preservation options for women with malignancies.** *Obstetrical and Gynecological Survey*, v. 62, n.1, p.58-72, 2006.

MAYADAS T.N., CULLERE X., LOWELL C.A., **The multifaceted functions of neutrophils,** *Annu. Rev. Pathol.*(9) 181–218, 2014.

MCDONALD, G. B. *et al.* **Cyclophosphamide metabolism , liver toxicity , and mortality following hematopoietic stem cell transplantation.** v. 101, n. 5, p. 2043–2048, 2003

MCHEYZER-WILLIAMS M.G., DAVIS M.M. **Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo.** *Science* 268 (5207): 106–111, 1995.

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.

MICHINORI O., TAKASHI ISHIDA, KUNIHIRO TSUKASAKI, TAKESHI TAKAHASHI, ATAE UTSUNOMIYA. **Effects of rst-line chemotherapy on natural killer cells in adult T**

cell leukemia–lymphoma and peripheral T cell lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 78:199–207, 2016.

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. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. A.* 254: 552–560. 1983.

MULLER, J.; COLE, I. **Changes in mouse ovarian after prolonged treatment with cyclophosphamide.** *Proc Soc Exp Biol Mol*, v.133, p.190-193, 1970.

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.

MURPHY K., P. TRAVERS, M. WALPORT, C. JANEWAY, *JANEWAY’S Immunobiology, Garland Science, New York*, pp. 1–888, 2012.

NAGLER A., ROCHA V., LABOPIN M., UNAL A., BEN OTHMAN T., CAMPOS A. *et al.*, **Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for acute myeloid leukemia in remission: comparison of intravenous busulfan plus cyclophosphamide (Cy) versus total-body irradiation plus Cy as conditioning regimen—a report from the acute leukemia working party of the European group for blood and marrow transplantation.** *J Clin Oncol.* 31: 3549–3556, 2013.

NELSON R.P. JR., BALLOW M. **Immunomodulation and immunotherapy: drugs, cytokines, cytokine receptors, and antibodies.** *J Allergy Clin Immunol* 111 (2 Suppl): 720-743, 2003.

OKTAY, K. *et al.* **Absence of conclusive evidence for the safety and efficacy of gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in protecting against chemotherapy-induced gonadal injury.** *Oncologist*, v.12, p.1055-1066, 2007.

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.

PARNELL, M.J., KOLLER, L.D., EXON, J.H., ARNZEN, J.M. **Trichloroacetic acid effects on rat liver peroxisomes and enzyme-altered foci.** *Environ. Health Perspect.* 69,: 73–79, 1986.

PEREIRA AD, ANDRADE SF, SWERTS MSO, MAISTRO EL. **First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test.** *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2580-2584, 2008.

PICADA J.N., FLORES D.G., ZETTLER C.G., MARRONI N.P., ROESLER R., HENRIQUES J.A. **DNA damage in brain cells of mice treated with na oxidized form of apomorphine.** *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 114: 80-85 [PMID: 12782396 DOI: 10.1016/S0169-328X(03)00127-X] PRADO, C. F.; RAMOS, J.; VALLE R. J.; CARVALHO, T.B. **Atualização Terapêutica.** 23 ed. Artes Médicas: São Paulo, p. 33 – 43. 2007.

PLOWCHALK, D.R.; MATTISON, D.R. **Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1.Effects on ovarian structure and function.** *Reprod Toxicol*, v.6, n.5, p.411-421, 1992.

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.

PUGA I., COLS M., BARRA C.M., B. HE, L. CASSIS, M. GENTILE, ET AL. **B cell-helperneutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen.** *Nat. Immunol.* 13 (2):170–180, 2012.

QI H., KASTENMULLER W., GERMAIN R.N. **Spatiotemporal basis of innate and adaptive immunity in secondary lymphoid tissue,** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (30) 141–167, 2014.

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.

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.

- RANDOLPH G.J., OCHANDO J., **Partida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors**, *Annu. Rev. Immunol.* (26) 293–316, 2008.
- REY, L. **Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde**. Brasil: Guanabara Koogan. 1999.
- RIVKEES, S.A.; CRAWFORD, J.D. **The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage**. *JAMA*, v.259, p.2123-2125, 1988.
- ROITT, I. M. **Imunologia**. 5 ed. Rio de Janeiro, São Paulo: Livraria Ateneu. 73, 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.
- SANTOS G.W., SENSENBRENNER L.L., BURKE P.J., MULLINS G.M., BLAS W.B., TUTSCHKA P.J. *et al.* **The use of cyclophosphamide for clinical marrow transplantation**. *Transplant Proc.* 4: 559–564, 1972.
- 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.
- SCAPINI P., CASSATELLA M.A. **Social networking of human neutrophils within the immune system**. *Blood* 124 (5): 710–719, 2014.
- 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.
- SERBINA, N.V. T. JIA, T.M. HOHL, E.G. **Pamer, Monocyte-mediated defense against microbial pathogens**, *Annu. Rev. Immunol.* (26) 421–452, 2008.

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.

SISTIGU A, VIAUD S, CHAPUT N, ET AL. **Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design**. Semin Immunopathol.:33:369-83, 2011.

SKLAR, C.A. *et al.* **Premature menopause in survivors of childhood cancer: A report from the childhood cancer survivor study**. J Natl Cancer Inst, v.98, n.13, p.890-6, 2006.

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 an lung toxicity**. Cancer reseach, 51: 542-548. 1991.

SÖNMEZER, M.; OKTAY, K. **Fertility preservation in young womem undergoing breast cancer therapy**. Oncologist, v.11, n.5, p.422-434,2006.

SPEIT G, HARTMANN A. **The comet assay: A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair**. **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocola. Mammalian Systems: Second Edition**; 314: 275-286, 2006.

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

SUNDAR K.M., SIREs M. **Sepsis induced immunosuppression: Implications for secondary infections and complications**. Indian J Crit Care Med 17: 162-169, 2013.

TALCOTT, P.A., EXON, J.H., KOLLER, L.D. **Alteration of natural killer cell-mediated cytotoxicity in rats treated with selenium, diethylitrosomine and ethylnitrosourea**. Cancer Lett. 23:313–322, 1984.

TALCOTT, P.A., EXON, J.H., MATHER, G.G., KOLLER, L.D. **The effects of methylnitrosourea (MNU) on natural killer (NK) cell cytotoxicity and cytokine production in rats.** *Carcinogenesis* 11: 829–834, 1990.

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

THACKER E.L. **Immunomodulators, immunostimulants, and immunotherapies in small animal veterinary medicine.** *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40: 473-483, 2010.

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

THE WISTAR INSTITUTE, 2007. Disponível em: . Acessado em: 06 Mar 2016.

TILLY, J.L. **Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells.** *Toxicol Lett*, v.102, n.3, p.497-501, 1998.

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.

WALLACE, W.H. *et al.* **Ovarian function following the treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia.** *Med Pediatr Oncol*, v.21, p.333-9, 1993.

WALLACE, W.H.; ANDERSON, R.; BAIRD, D. **Preservation of fertility in young women treated for cancer.** *Lancet Oncol*, v.5, p. 269-0, 2004.

WHITLEY N.T., DAY M.J. **Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease.** *J Small Anim Pract* 52: 70-85, 2011.

WU H.Y., NIKOLOVA E.B., BEAGLEY K.W., ELDRIDGE J.H., RUSSELL M.W., **Development of antibody-secreting cells and antigen-specific T cells in cervical lymph nodes after intranasal immunization,** *Infect. Immun.* 65 (1)227–235, 1997.

YONA S., KIM K.W., WOLF Y., MILDNER A., VAROL D., BREKER M., ET AL., **Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis.** *Immunity* 38: 79–91, 2013.

9 ANEXO



PARECER MED002/2007

Projeto: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BIOPRODUTO *MÉTODO CANOVA* EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER GÁSTRICO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS E RATOS WISTAR.

Coordenador: Rommel Mario Rodríguez Burbano

Área Temática: Medicina

Vigência: 01-01-2008 a 31-12-2009

O Projeto intitulado “*AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BIOPRODUTO MÉTODO CANOVA EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER GÁSTRICO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS E RATOS WISTAR*” foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) e os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para manipulação e uso de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das suas atribuições, resolve APROVAR a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora deste período devem receber nova autorização deste comitê.



Prof. Dr. Antônio Pereira
Presidente do CEPAE/UFPA