IANA SULY SANTOS KATZ

**HEMATOTOXICIDADE POR XENOBIÓTICOS
DO TIPO HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS EM
CAMUNDONGOS AIRMAX E AIRMIN**

IANA SULY SANTOS KATZ

HEMATOTOXICIDADE POR

XENOBIÓTICOS DO TIPO

HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS EM

CAMUNDONGOS AIRMAX E AIRMIN

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biomédicas.

São Paulo

2007

IANA SULY SANTOS KATZ

HEMATOTOXICIDADE POR

XENOBIÓTICOS DO TIPO

HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS EM

CAMUNDONGOS AIRMAX E AIRMIN

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Orlando Garcia Ribeiro filho

São Paulo

2007

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Isaac e Oneida, que me ensinaram a ter tantos dos predicados que eles possuem. Agradeço pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Aos meus irmãos, Igor e Ismar Samuel, que sempre me apoiaram em tudo e que são e serão sempre os meus melhores amigos.

A minha tia Ozani, pelo amor, amizade e incentivo nessa longa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Orlando Garcia Ribeiro, que foi essencial para que este trabalho fosse realizado. Meus sinceros agradecimentos.pela paciência, boa vontade, sapiência e carinho.

À Dra. Olga Ibañez que sempre me atendeu com muita atenção e carinho

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunogenética Dra. Wafa Cabrera, Dra. Nancy Starobinas, Dr. Marcelo de Franco, Dra. Milene de Franco, Dra. Solange Massa e Dra. Solange Carbonare pela amizade e convívio que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e companheiros de jornada, Patrícia, Vinícius, Layra, Luciana, Andrea Borrego, Andrea Arruda, Zé Ricardo, Ludmilla, Débora, Tatiana, Alessandra e Simone. O meu muito obrigada pela ajuda preciosa nos diversos momentos, pela amizade e risadas.

Às funcionárias do Laboratório de Imunogenética: Sandra Ottoboni pela amizade, Neusa Miranda e Marinalva Lima pelo constante carinho e pela preparação de todos os materiais utilizados.

À todos funcionários do infectório e biotério, que através de seu trabalho, me proporcionaram material e animais, para que eu pudesse fazer a minha pesquisa: Neusa, Mari Lima, Mari Santos, Sergio, Celso, Seu Juca, Vilma e Ronaldo.

Às secretárias Jotelma e Valéria do Departamento de Imunologia do ICBIV-USP, por pacientemente nos socorrerem pelos caminhos da burocracia.

A minha grande amiga Carla pela amizade, pelos momentos divertidos e pelos momentos nem tão divertidos.

A todos meus amigos que de alguma forma colaboraram para que o stress não predominasse nessa difícil e longa jornada..

As demais pessoas que de alguma forma me ajudaram, rezando, orando e torcendo por mim. Todos estão no meu coração de uma maneira muito especial.

*“Navegadores antigos tinham uma frase gloriosa:
"Navegar é preciso, viver não é preciso*

*Quero para mim o espírito desta frase,
transformada a forma para a casar como eu sou:*

*Viver não é necessário, o que é necessário é criar.
Não conto gozar a minha vida; nem em gozá-la penso.
Só quero torná-la grande,
ainda que para isso tenha de ser o meu corpo e a (minha alma) a lenha desse fogo.*

*Só quero torná-la de toda a humanidade;
ainda que para isso tenha de a perder como minha.
Cada vez mais assim penso.*

*Cada vez mais ponho da essência anímica do meu sangue
o propósito impessoal de engrandecer a pátria e contribuir
para a evolução da humanidade.*

É a forma que em mim tomou o misticismo da nossa Raça.”

Fernando Pessoa

RESUMO

KATZ, I. S. S. **Hematotoxicidade por xenobióticos do tipo hidrocarbonetos aromáticos em camundongos AIRmax e AIRmin.** 94 f.. 2007. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Hidrocarbonetos aromáticos (HAs) são contaminantes ambientais envolvidos em algumas desordens hematológicas. Em camundongos, o tratamento com HAs diminui a celularidade na medula óssea (MO) e a celularidade do baço resultando em um estado de imunossupressão. Este processo envolve o metabolismo dos HAs que depende da ativação do receptor aryl hidrocarboneto (AHR). Diferente susceptibilidade para os HAs são descritos em linhagens de camundongos isogênicos. Camundongos susceptíveis, C57BL/6, possuem o receptor *Ahr* de alta afinidade cujo alelo é *Ahr^{b1}*, enquanto camundongos resistentes, DBA2, que possuem o receptor AHR de baixa afinidade possuem o alelo *Ahr^d*. Duas linhagens de camundongos geneticamente selecionados para a alta ou baixa reatividade inflamatória aguda (AIR) para uma substância não imunogênica (Biogel P100) diferem quanto à susceptibilidade a tumorigênese induzida por HAs, como o DMBA. Estas linhagens apresentam polimorfismo no gene *Ahr*, com fixação do alelo *Ahr^d* em AIRmax e de *Ahr^{b1}* em camundongos AIRmin. Neste estudo nós examinamos os efeitos do DMBA e dos metabólitos do benzeno nas células da MO e da circulação dos camundongos AIRmax e AIRmin e avaliamos a expressão do mRNA dos membros da família do citocromo P450 após ativação da MO por HAs. Camundongos AIRmax e AIRmin foram tratados com uma única dose de 50mg/kg ip de DMBA em óleo de oliva ou 75mg/Kg da associação de fenol e hidroquinona em PBS durante 3 dias duas vezes ao dia. Após tempos variados, o número de células da medula óssea e do sangue periférico foi determinado e as células identificadas. Ensaio de proliferação foram realizados com células da MO estimuladas com GM-CSF e esplenócitos estimulados com LPS ou ConA obtidas dos camundongos tratados previamente com DMBA. O total de RNA da medula óssea foi extraído para a quantificação do RNA mensageiro dos genes *AHR*, *CYP1B1* e *CYP1A1* por PCR em Tempo-Real. Após aplicação de DMBA observamos hipocelularidade da medula óssea em camundongos AIRmin após 12 e 24 horas do tratamento, refletindo no total de leucócitos do sangue periférico. O tratamento com fenol e hidroquinona induziu significativa hipocelularidade na MO de ambas as linhagens de camundongos quando comparadas com os respectivos grupos controles tratados com PBS. Células mielóides dos camundongos AIRmin tratados com DMBA apresentaram baixa proliferação após tratamento *in vitro* com GM-CSF, enquanto células dos camundongos AIRmax proliferam normalmente. O mesmo perfil foi observado em culturas de células do baço após o estímulo com LPS. Observamos um aumento de expressão do *CYP1A1* e do *AHR* nos AIRmin após 12hs e repressão nas células da MO dos AIRmax após 24hs do tratamento com DMBA. A diminuição da hematopoiese e das células da circulação pode ser devido ao efeito seletivo dos HAs ou seus metabólitos para um tipo celular individual por direcionar a toxicidade para os precursores mielóides. Camundongos AIRmax e AIRmin são igualmente susceptíveis aos efeitos tóxicos dos metabólitos do benzeno (fenol e hidroquinona) ultrapassando a ativação do *Ahr*. Por outro lado o DMBA induziu depleção da medula óssea somente em camundongos AIRmin. A expressão de *Ahr* e principalmente de *CYP1A1* podem estar relacionadas com a mediação da toxicidade do DMBA nas células da MO dos AIRmin.

Palavras Chaves: Inflamação. Imunogenética. Camundongos. Hidrocarboneto. Medula óssea.

ABSTRACT

KATZ, I. S. S. **Hematotoxicity for xenobiotics of the type polycyclic aromatic hydrocarbon in mice AIRmax and AIRmin.** 94 f. 2007. Master thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are environmental pollutants that induce hematological alterations. In mice the *in vivo* PAHs treatment decreases the bone marrow (BM) and spleen cellularity resulting in an immunosuppressive state. This process involves the metabolism of the PAHs that depends on the activation of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). Differential susceptibility to PAH was described in inbred lines of mice. C57BL/6 susceptible mice presenting high affinity Ah receptor have the allele named *Ahr^{b1}* while the resistant DBA2 mice that present a low affinity receptor have the allele named *Ahr^d*. Two lines of mice genetically selected for maximal (AIRmax) or minimal (AIRmin) local Acute Inflammatory Response (AIR) to a non immunogenic substance (polyacrylamide gel) differ in susceptibility to carcinogenesis induced by PAHs, such as DMBA. In this study we examined the effects of DMBA and Benzene metabolites on BM and circulating cell numbers of AIRmax and AIRmin mice and the AHR and CYP1 family members mRNA expression following activation by PAHs in the bone marrow of these selected AIR mice. AIRmax and AIRmin mice were treated with a single ip dose of 50mg/kg DMBA in olive oil or 75mg/Kg phenol and hydroquinone in PBS during 3 days twice a day. The BM and blood cells were identified and enumerated. Proliferation index of BM and spleen cells was determined in response to GM-CSF and to LPS or ConA, respectively after *in vivo* treatment with DMBA. Total RNA was extracted from bone marrow cells after DMBA treatment to quantify the expression levels of the *AHR*, *CYP1B1* and *CYP1A1* genes by Real-time PCR. We observed a BM hypocellularity produced by DMBA in AIRmin mice at 12 and 24 hours post treatment reflecting on the circulating leukocyte number. The treatment with Phenol and Hydroquinone induced a significant BM hypocellularity in both line mice when compared to control groups treated with PBS. Myeloid cells from DMBA treated AIRmin mice showed impaired proliferation after *in vitro* GM-CSF treatment whereas cells from AIRmax mice presented normal proliferation. The same profile was observed in spleen cells cultures after LPS stimulus. An increase in *CYP1A1* and *Ahr* expression in AIRmin at 12h and a suppression in AIRmax BM cells were observed after 24h of DMBA treatment. The loss of hematopoietic and circulating cells may be due to the selective effects of the PAHs or their metabolites to individual cell types by direct toxicity to the myeloid precursors. AIRmax and AIRmin mice are equally susceptible to the toxic effects of the Benzene metabolites (Phenol and Hydroquinone) which bypass the AHR activation. On the other hand, DMBA induces BM depletion in AIRmin mice only. *Ahr* and mostly *CYP1A1* mediate the toxicity of DMBA for AIRmin BM cells.

Key words: Inflammation. Immunogenetic. Mice. Hydrocarbons. Bone marrow.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmula estrutural do benzeno.....	22
Figura 2 - Fórmula estrutural do do 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA).....	24
Figura 3 - Gráfico da divergência entre as linhagens AIR no número médio de leucócitos infiltrates e extravasamento protéico no sítio de injeção do Biogel.....	30
Figura 4 - Os gráficos mostram os respectivos “Cycle Threshold” (Ct), (A) e a curva de Melt (B) do gene cyclofilina.....	39
Figura 5 - Hematotoxicidade da medula óssea (A) e do sangue periférico (B) nos camundongos AIRmax e AIRmin, após 24 do tratamento com dose variadas de DMBA (25, 50 ou 100 mg/kg) ou óleo (controle).....	42
Figura 6 - Cinética da celularidade na medula óssea durante 14 dias nos camundongos A- AIRmax e B- AIRmin tratados com 50mg/Kg de DMBA ou com óleo.....	44
Figura 7 - Reação inflamatória aguda local medida 24 horas após a injeção intraperitoneal de óleo ou DMBA em camundongos AIRmax e AIRmin.....	45
Figura 8 - Cinética da concentração de leucócitos totais (A), mononucleares (B) e polimorfonucleares (C) do sangue durante 14 dias nos camundongos AIRmax e AIRmin tratados com 50mg/Kg de DMBA ou óleo, controle.....	47
Figura 9 - Cinética do número de hemácias do sangue periférico durante 14 dias nos camundongos AIRmax e AIRmin tratados DMBA ou com óleo.....	48
Figura 10 - Fotomicrografia dos cortes histológicos do esterno obtidos dos camundongos AIRmax e AIRmin tratados com óleo (A e B) ou DMBA (C e D) por 24hs.....	49
Figura 11 - Análise por citometria de fluxo de sub-populações de células linfóides mielóides da Medula Óssea.....	50
Figura 12 - Análise por citometria de fluxo de sub-populações de células linfóides da Medula Óssea.....	51
Figura 13 - Análise por citometria de fluxo das populações de células mielóides da medula óssea.....	52
Figura 14 - Análise proliferativa de células totais da medula óssea tratadas <i>in vivo</i> com óleo ou DMBA após 1 (A) ou 7 (B) dias, após 7 dias de cultura.....	55
Figura 15 - Resposta inflamatória aguda (24 horas) ao biogel em camundongos AIRmax e AIRmin tratados previamente com 50mg/Kg de DMBA ou óleo de oliva.....	56

Figura 16 - Proliferação de células esplênicas, após 72 horas do estímulo <i>in vitro</i> com 100µg/mL de LPS.....	58
Figura 17 - Proliferação das células esplênicas, após 72 horas do estímulo <i>in vitro</i> com 2,5µg/mL de ConA.....	59
Figura 18 - Hematotoxicidade da medula óssea em após 24 horas do tratamento com 75mg/Kg ip de FN e/ ou 75 mg/kg HQ.....	61
Figura 19 - Hematotoxicidade da medula óssea e sangue periférico após 24 do tratamento com 75mg/Kg ip de FN e dose variadas de HQ (25 ,50 ou 75 mg/kg).....	62
Figura 20 - Cinética da celularidade na medula óssea durante 14 dias nos camundongos A- AIRmax e B- AIRmin tratados com 75mg/kg de FN/HQ ou salina.....	63
Figura 21 - Cinética da concentração de leucócitos totais (A), células mononucleadas (B) e células polimorfonucleadas (C) do sangue durante 14 dias nos camundongos AIR tratados com com 75mg/kg de FN/HQ ou salina.....	65
Figura 22 - Cinética da concentração de hemácias durante 14 dias nos camundongos AIR tratados com 75mg/Kg da associação de FN e HQ ou salina, controles.....	66
Figura 23 - Cortes histológicos dos esternos de AIRmax e AIRmin tratados com salina (A e B) ou com F/H (Fenol/ Hidroquinona) (C e D).....	67
Figura 24 - Análise por citometria de fluxo de sub-populações de células linfóides da Medula Óssea.....	68
Figura 25 - Análise por citometria de fluxo das populações de células mielóides.....	70
Figura 26 - Efeito do DMBA na expressão do gene <i>AHR</i> na medula óssea.....	72
Figura 27 - Efeito do DMBA na expressão do gene <i>CYP1B1</i> na medula óssea	73
Figura 28 - Efeito do DMBA na expressão do gene <i>CYP1A1</i> na medula óssea.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das seqüências sintéticas (primers) dos genes <i>CYCLOFILINA</i> , <i>AHR</i> , <i>CYP1B1</i> e <i>CYP1A1</i> na orientação 5' - 3'	38
Tabela 2 - Efeito do DMBA sobre as populações celulares da linhagem linfóide na medula óssea de camundongos AIR após 24 horas do tratamento.....	51
Tabela 3 - Efeito do DMBA sobre as populações celulares da linhagem mielóide na medula óssea de camundongos AIR após 24 horas do tratamento.....	53
Tabela 4 - Efeito do DMBA na celularidade dos camundongos da linhagens AIR após 24hs de tratamento.....	57
Tabela 5 - Efeito do FN/HQ nas células da linhagem linfóide na medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin.....	69
Tabela 6 - Efeito do tratamento de FN/HQ sobre as populações de mielóides da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ahr - Receptor Aryl Hidrocarboneto

AIR - Reação Inflamatória Aguda

BaP - Benzopireno

ConA - Concavalina-A

CYP - Citocromo da família P450

DMBA - 7,12-dimetilbenzantraceno

FN - Fenol

HA - Hidrocarbonetos Aromáticos

HPA - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HQ - Hidroquinona

LPS - Lipolissacarídeo

mEH – Microssomal Epoxido Hidrolase

MO – Medula óssea

SMD - Síndromes Mielodisplásicas

TCDD - 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador - Beta

TNF α - Fator de Necrose Tumoral-Alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVO GERAL	32
2.1 Objetivos específicos	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Camundongos	34
3.2 Tratamentos	34
3.3 Obtenção de células da medula óssea	34
3.4 Citometria de fluxo	34
3.5 Proliferação de células da medula óssea obtidas de animais tratados ou não com DMBA, resultante do estímulo com GM-CSF	35
3.6 Indução e quantificação da Inflamação	35
3.7 Obtenção de células do sangue periférico	35
3.8 Proliferação de células do baço induzidas por LPS e ConA	36
3.9 Extração de RNA	36
3.10 Obtenção de DNA complementar (cDNA)	36
3.11 Quantificação do RNA mensageiro por PCR em tempo real	37
3.12 Análise estatística	37
4- RESULTADOS	41
4.1 Hematotoxicidade da medula óssea e circulação induzida por DMBA em camundongos AIRmax e AIRmin	41
4.1.1 Avaliação do efeito de doses variadas de DMBA	41
4.1.2 Cinética do efeito do DMBA sobre a celularidade da medula óssea e circulação em camundongos da linhagem AIR	43
4.1.3 Análise histológica da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin	48
4.1.4 Análise por citometria de fluxo das células da medula óssea dos camundongos AIR após 24hs do tratamento com DMBA	49
4.1.5 Capacidade de proliferação das células da medula óssea de AIRmax e AIRmin após tratamento com DMBA	53
4.2 Hematotoxicidade do baço induzida por DMBA em camundongos AIRmax e AIRmin	56
4.2.1 Efeito do tratamento do DMBA sobre a proliferação da células B e T do baço dos camundongos AIR	57

4.3 Hematotoxicidade da medula óssea e circulação induzida pela associação de Fenol e Hidroquinona em camundongos AIRmax e AIRmin.....	60
4.3.1 Avaliação do efeito de doses variadas de FN/HQ nos camundongos da linhagem AIR.....	61
4.3.2 Cinética do efeito do FN/HQ sobre a celularidade da medula óssea e circulação em camundongos da linhagem AIR.....	62
4.3.3 Análise histológica da medula óssea dos camundongos AIR.....	66
4.3.4 Análise por citometria de fluxo das células da medula óssea dos camundongos AIR após 24hs do tratamento com FN/HQ.....	67
4.4 Análise do efeito do DMBA na expressão do RNA mensageiro dos genes AHR, CYP1B1 e CYP1A1.....	71
4.4.1 Expressão do RNA mensageiro do gene AHR.....	72
4.4.2 Expressão do RNA mensageiro do gene CYP1B1.....	73
4.4.3 Expressão do RNA mensageiro do gene CYP1A1.....	74
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS.....	84

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O sistema hematopoiético, devido às suas características biológicas, pode sofrer alterações quando exposto à ação de fatores ou substâncias nocivas presentes no ambiente (GOLDESTEN, 1998). Dentre os fatores agressores do sistema hematopoiético, são bem conhecidos os hidrocarbonetos aromáticos (HAs), as radiações ionizantes e os agrotóxicos. Estes fatores podem lesar as células tronco, reduzindo seu número, provocando alterações estruturais ou citogenéticas, as quais têm como consequência a redução na produção celular e/ou o surgimento de linhagens de células anormais (RUIZ, VASSALO e SOUZA, 1993; JAMRA e LORENZI, 1997).

Os principais quadros hematológicos decorrentes da ação de fatores referidos são: leucopenia, leucemias, síndromes mielodisplásicas e anemia aplástica. A leucopenia refere-se a um decréscimo na contagem do número total de células leucocitárias decorrentes da diminuição de um ou mais elementos que compõem a série branca, e que são mensurados a partir de valores de referência utilizados como padrão de normalidade.

Leucemias são neoplasias malignas das células primitivas hematopoiéticas que se originam na medula óssea e se distribuem pela circulação e órgãos. As leucemias mais freqüentes são classificadas segundo: o grau de diferenciação das células (agudas ou crônicas) e a linhagem predominante de células (mielóide ou linfóide), como por exemplo, Leucemia Mieloblástica Aguda, Leucemia Linfoblastica Aguda, Leucemia Mielóide Crônica e Leucemia Linfocítica Crônica (JAMRA e LORENZI, 1997; GOLDSTEIN, 1998). A incidência varia de acordo com a idade, o tipo de leucemia e o sexo acometido. Algumas condições genéticas podem também aumentar o risco de leucemia ou anomalias cromossômicas, como a Síndrome de Down (GOLDESTEN, 1998).

As síndromes mielodisplásicas (SMD) é um grupo de transtornos hematológicos clonais adquiridos pela célula primordial hematopoiética (stem cell) que têm como consequência a ineficaz proliferação e diferenciação celulares. Esses distúrbios se caracterizam pela ocorrência de uma baixa de uma série hematológica no sangue periférico, citopenia, associados à hiperplasia da medula óssea (JAMRA e LORENZI, 1997; DEISS, 1998; YOUNG, 2002).

As anemias aplásticas são caracterizadas pelos seguintes achados diagnósticos: pancitopenia periférica e alterações na medula óssea (depleção celular e presença de hipoplasia grave ou aplasia). Nesses quadros há substituição das células hematopoiéticas por tecido adiposo. Há evidências clínicas de que os casos de anemia aplástica desenvolvam-se

como consequência de um defeito qualitativo em uma população de células-tronco (YOUNG, 2002).

Os hidrocarbonetos aromáticos (HÁs) são uma classe de substâncias amplamente distribuídas no ambiente, muitas das quais com potencial tóxico. São formados principalmente em processos de combustão incompleta de matérias orgânicas e encontram-se na natureza como contaminantes de solos, ar e alimentos. São utilizados nas indústrias petroquímicas, químicas e em siderurgias. Por tratarem-se de compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico, são também conhecidos como xenobióticos.

A dioxina (tetraclorodibenzodioxina ou 2,3,7,8-TCDD), o benzeno, o 7,12-dimetilbenzo(a)ntraceno (DMBA) e o benzopireno são exemplos de xenobióticos que causam hipocelularidade na medula óssea, carcinogênese e imunossupressão, conforme resultados obtidos experimentalmente (KAWABATA e WHITE, 1987; LADICS *et al.*, 1991; KERKVLIT e BRAUNER, 1990; LUSTER e ROSENTHAL, 1993; GALVAN *et al.*, 2003; YOON *et al.*, 2002)

A hipocelularidade na medula óssea é provocada pelos produtos finais desses compostos. Estes HAs são metabolizados por enzimas da família do citocromo P450 presentes de maneira variável no citosol das células dos vários tecidos (ALLAN *et al.*, 2006). Os produtos intermediários da metabolização desses xenobióticos entram na célula e podem ligar-se covalentemente a alvos nucleofílicos do DNA formando uma estrutura conhecida como *aducto* de DNA. Esta estrutura molecular é definida como a ligação de um grupo funcional de uma substância química a uma base nitrogenada da molécula do DNA, intercalando-a, o que acarreta danos no DNA por meio de mutação genética resultando em eventuais tumores (UMEMOTO *et al.*, 2001). Desta maneira, metabólicos reativos, podem interferir na transcrição ou na replicação do DNA interferindo na síntese protéica. Quando essa mutação não é eliminada pelo processo de apoptose, as células começam a se malignizar, resultando na multiplicação descontrolada e irreversível dessas células alteradas, gerando um câncer. (GALVAN *et al.*, 2003; BOSTRÖM *et al.*, 2002). Algumas células são alvos preferenciais desses agentes químicos tais como as do ovário, útero, pele, pulmão e medula óssea (QING *et al.*, 1997; DIPPLE *et al.*, 1999; HEIDEL *et al.*, 2000; BUTERS *et al.*, 2003).

Em modelo murino é também bem conhecido o efeito imunossupressor desses hidrocarbonetos, afetando, principalmente, a celularidade do baço ou da medula óssea. (DEAN *et al.*, 1985; WARD *et al.*, 1984). Camundongos tratados com HAs apresentam diminuição acentuada na citotoxicidade mediada por célula T, na resposta proliferativa ao mitógeno T dependente e na indução da produção de citocinas. Ocorre também uma queda no

número de linfócitos B, provavelmente devido à depleção de *stem cell* na medula óssea afetando assim o número de células B precursoras, como células pré B, interferindo na fisiologia normal de células B situação crítica para a expansão dos linfócitos B antígeno-específicos durante a seleção clonal. Com isto o desenvolvimento das células produtoras de anticorpos e de memória fica prejudicado, resultando na ineficácia da resposta imune humoral (ALLAN *et al.*, 2006; DEAN *et al.*, 1986; THURMOND *et al.*, 1987; YAMAGUCHI *et al.*, 1997; HEIDEL *et al.*, 1999). Estes processos que afetam a imunidade adquirida induzem a diminuição de resistência dos animais expostos aos HAs, a agentes infecciosos e a tumores transplantados (WARD *et al.*, 1984; DEAN *et al.*, 1986).

2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)

A 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) esta dentre as substância mais tóxicas já sintetizadas pelo homem, apresentando uma alta toxicidade mesmo em baixas concentrações, dificultando o estabelecimento de um nível mínimo de exposição seguro. Foi identificada em experimentos com animais a toxicidade aguda e crônica nos sistemas endócrino, imunológico e reprodutivo, além de impacto no desenvolvimento, teratogenicidade, carcinogenicidade e outros efeitos como toxicidade hepática, perda de peso, diabetes e cloracne. (BIRNBAUM, 1994; PAUSTENBACH, 2002; COLE *et al.*, 2003). Os efeitos da TCDD são produzidos pela ligação a um receptor específico, o receptor AHR (*aryl hydrocarbon receptor*). Este hidrocarboneto tem uma grande afinidade para o AHR, sem a existência do qual não se verificariam os efeitos tóxicos das dioxinas (SILBERGELD e GASIEWICZ, 1989). Uma vez formado, o complexo Ah-dioxina, é transportado para o núcleo celular onde ativa a produção de citocromo P450 e genes que regulam o crescimento e divisão celular. Os hormônios esteróides como a progesterona e a testosterona, e os agonista do AHR regulam a proliferação epitelial do trato urogenital feminino e masculino e das glândulas mamárias de fêmeas (CUNHA, COOKE e KURITA, 2004).

Benzeno

O benzeno é um líquido, incolor, de odor peculiar, menos denso que a água e muito volátil, cuja fórmula química é C_6H_6 (**Figura 1**). Esse composto é utilizado como solvente químico na indústria para fabricação de tinta, óleo mineral, gás natural e para fabricação de calçados. É também resultado da combustão dos combustíveis fósseis, constituindo um dos poluentes ambientais emitidos na atmosfera (MARTINS e SIQUEIRA, 2002).

Figura 1 – Fórmula estrutural do benzeno

Foi demonstrado que o benzeno produz um considerável número de efeitos biológicos, tais como, irritação moderada das mucosas e, quando inalado em altas concentrações, causa edema pulmonar. A sua absorção provoca toxicidade sobre o sistema nervoso central, causando, dependendo da quantidade absorvida, narcose e excitação seguida de sonolência, tonturas, cefaléia, náuseas, taquicardia, dificuldade respiratória, tremores, convulsões, perda da consciência e morte. A exposição crônica pode resultar em alterações hematológicas graves como leucopenia, linfocitopenia, anemia, trombocitopenia, leucemia e linfoma. Diversos tipos de neoplasias podem ser relacionados com a inalação ou ingestão de benzeno, designadamente: linfomas, leucemias e, principalmente, carcinomas de origem epitelial (fígado, glândula mamária e cavidade oro-nasal). Efeitos neuro-psicológicos também foram constatados em indivíduos expostos ao benzeno, como alterações na atenção, percepção, memória, habilidade motora, função executiva, raciocínio lógico, linguagem, aprendizagem e humor. Um outro tipo de impacto biológico é a toxicidade reprodutiva, embriotoxicidade e a produção de respostas teratogênicas tais como aberrações cromossômicas, trocas de cromátídeos e micronúcleos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003)

A biotransformação do benzeno é essencial para produzir sua toxicidade. No fígado o benzeno é metabolizado em fenol (FN), hidroquinona (HQ), catechol, resorcinol, 2,4-benzenotriol, trans-muconaldeído e ácido trans-muconico pela ação de enzimas do citocromo P450, particularmente a CYP2E1 e a *microsomal epoxide hydrolase* (da sigla em inglês: mEH). O efeito tóxico do benzeno na medula óssea e sangue periférico tem sido atribuído à interação de metabólitos fenólicos (EASTMOND *et al.*, 1987). O fenol e a hidroquinona são considerados os principais metabólitos na indução de mielotoxicidade com supressão da celularidade geral do organismo, como verificado experimentalmente em linhagens de camundongos sensíveis ou resistentes a esses efeitos do benzeno (EASTMOND *et al.*, 1987; YOON *et al.*, 2002). O aumento da conversão da hidroquinona para 1,4-benzoquinona pela mieloperoxidase na presença do fenol produz inibição do processo celular na medula óssea

(IRONS *et al.*, 1981; IRONS, 1985). Através de estudos realizados em camundongos, foi verificado que a desordem hematopoiética causada pelo benzeno é atribuída ao efeito da 1,4-benzoquinona nas *stem cell* da medula óssea, que sofrem danos no DNA, podendo levar a apoptose (FAIOLA *et al.*, 2004).

Benzopireno

O benzopireno (BaP) é um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) constituído por cinco anéis de benzeno, formado pela combustão incompleta do tabaco, hulha e óleo. O benzopireno está presente também em carnes fortemente grelhadas sobre carvão e em peixe defumado, assim como na atmosfera sobre grandes cidades, onde eles são poluentes do ar (BADGER, 1962; NAS, 1972). Ele é encontrado no alcatrão da fumaça do cigarro e pode ser um fator na relação entre fumo e câncer de pulmão, câncer de laringe e da cavidade oral, e possivelmente câncer de bexiga e pâncreas. Quando o BaP é inalado causa efeitos crônicos no pulmão, como bronquite crônica, enfisema pulmonar e câncer de pulmão (STELLMAN, KABAT e HOFFMANN, 1978). Seus efeitos são observados após sua metabolização pelas enzimas do citocromo P450, em reativos intermediários como o benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) que é capaz de reagir com os ácidos nucleicos e as proteínas celulares formando aductos que causam mutações e danos no DNA. BaP é um carcinógeno cujo efeito seja realçado ou promovido por várias outras substâncias químicas. BaP quando administrado transplacentariamente, em uma única dose predispõem o aparecimento de câncer após o nascimento (YU *et al.*, 2006). Outros estudos demonstraram que a indução do câncer é um processo por 2 fases, onde uma única dose baixa de BaP na pele do rato não produziu nenhum tumor, enquanto o tratamento subsequente com um promotor (ester do forbol) produziu o carcinoma de pele (BERENBLUM, 1975). Alguns trabalhos também demonstram o efeito imunossupressor do BaP onde o tratamento com esse HPA resulta na supressão da linfopoiese das células B (HARDIN, HINOSHITA e SHERR, 1992; GALVAN *et al.*, 2006)

7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA)

O DMBA é um HPA, cuja fórmula é $C_{20}H_{16}$ (**Figura 2**). Este xenobiótico está presente no ar e em alguns alimentos ou ainda no cigarro. É conhecido como sendo um potente carcinógeno e um eficaz imunossupressor para humanos e outras espécies de animais após ser oxidado para a sua forma ativa, DMBA-3,4-dihydrodiol (DEAN *et al.*, 1985; LADICS *et al.*, 1991; GALVÁN *et al.*, 2003). Alguns estudos em linhagens celulares associam o DMBA a distúrbios na formação do fuso durante a divisão celular com a indução

de aneuploidias, poliploidia e instabilidade cromossômica, em linhagens celulares (WU *et al.*, 1997; MATSUOKA *et al.*, 1998). Tais alterações cromossômicas estão associadas não somente à carcinogênese (RADMAN *et al.*, 1982; OSHIMURA e BARRET, 1986), mas também ao aumento da taxa de esterilidade, abortamentos espontâneos e morte neonatal, assim como de anomalias congênitas, sendo um importante alvo de estudo, já que o DMBA é um carcinógeno químico ambiental (MATSUOKA *et al.*, 1998).

Figura 2 – Fórmula estrutural do 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA).

O DMBA é primeiramente, metabolizado no fígado pelo citocromo P450 (CYP1A1), formando 3,4-DMBA-dihydrodiol. Na medula óssea este composto é transformado em DMBA-3,4 diol-1,2-epóxido pela enzima CYP1B1 produzida pelas células do estroma desse compartimento. Este metabólito forma aductos no DNA, podendo levar a depleção dessas células da medula óssea ou causar mutações, gerando uma transformação maligna (NEBERT *et al.*, 1990; HEIDEL *et al.*, 2000; RUNDLE *et al.*, 2000; GALVAN *et al.*, 2003). Camundongos *knockout* para o gene *CYP1B1*, tratados com DMBA, não sofrem os efeitos tóxicos, como apoptose de células pré B ou imunossupressão, demonstrando que essa enzima é essencial na metabolização e efeitos desse HPA. (HEIDEL *et al.*, 1999; GAO *et al.*, 2005).

No mesmo sentido, camundongos que não possuem o gene p53, cuja proteína é relatada como sendo anti-tumoral por regular os mecanismos de apoptose, não apresentam formação de aductos no DNA e depleção das células na medula óssea após tratamento com DMBA (GIONO e MANFREDI, 2006). Isso demonstra que a p53 é importante também nos mecanismos de supressão da medula óssea causada por esse xenobiótico (PAGE *et al.*, 2002).

O receptor AHR localiza-se no citosol como parte de um complexo formado por algumas proteínas estabilizadoras como *heat-shock protein* 90 (hsp90), proteína 23 e *immunophilin* como AIP/ARA9/XAP2 de massa molecular próxima de 280kDa. Quando ocorre a ligação dos HPAs com o receptor este se dissocia do complexo e dirige-se para o núcleo onde é heterodimerizado com uma proteína estruturalmente relacionada, a ARNT (Translocador Nuclear de AHR). O complexo heterodimérico liga-se a uma sequência denominada XRE (elemento responsivo ao xenobiótico), 5'-GCGTG-3', localizada na região

flanqueante 5'- aos genes alvos do gene *Ahr*, que irão codificar as enzimas envolvidas no metabolismo dos HPAs como as da família do citocromo P450 (HANKISON, 1995). Essas enzimas metabolizantes da fase 1 (biotransformação) e fase 2 (excreção) é responsáveis pela transformação desses xenobióticos em produtos tóxicos (VRZAL; ULRICHOVÁ e DVORÁK, 2004).

Além de regular a expressão de uma variedade de genes que codificam as enzimas P450, o gene *Ahr* regula alterações relacionadas com proliferação celular, produção de quimiocinas e citocinas, apoptose, diferenciação de fagócitos, funções imunológicas e reprodutivas (MARLOWE e PUGA, 2005; KNAAPEN *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos mostraram que o receptor AHR além de se ligar a compostos exógenos como DMBA, benzeno ou, dioxina liga-se também com alta afinidade aos compostos endógenos como por exemplo os aminoácidos derivados do triptofano (indolo[3,2-b]carbazole), sugerindo que este receptor seja sítio de ligação para diferentes tipos de compostos (HELFERICH e DENISON 1991; PERDEW e BABBS 1991). Esse receptor liga-se também ao hormônio de crescimento, responsável pelo desenvolvimento e crescimento normal de embriões de roedores e humanos, sugerindo assim função fisiológica do *Ahr* (ABBOTT *et al.* 1994; PETERS e WILEY 1995).

Verificou-se um importante papel do *Ahr* na resposta inflamatória. Os mediadores lipídicos, os leucotrienos, as prostaglandinas, e o fator ativador plaquetário (PAF) têm um papel importante no processo inflamatório e em doenças alérgicas como a asma. Neste sentido estudo com cultura de células hepáticas de rato, Hepa1c1c7 induzidas com prostaglandina (PG) tiveram aumento de expressão do *Ahr* (SEIDEL *et al.*, 2001). Yang e Bleich demonstraram que a indução de células pancreáticas β , do tipo RINm5F, com agonista do AHR, TCDD, aumenta a expressão de COX-2 (YANG e BLEICH, 2004).

Nesse sentido, alguns estudos apontam para mecanismos interativos entre o receptor AHR e o fator de transcrição *NF-kB*, que está relacionado com as respostas fisiológicas e patológicas, incluindo modulação imune, resposta inflamatória e apoptose (TIAN, RABSON e GALLO, 2002), pela regulação de expressão de genes por meio de citocinas. Estudos realizados em humanos e em modelos experimentais mostraram que durante infecções por bactérias (*Escherichia coli*), vírus (Influenza), ou protozoários (Plasmodium) ou ainda durante processos inflamatórios (hepatite, colite), ocorre diminuição na expressão ou na atividade das enzimas do citocromo P450 (CYP), responsáveis pela metabolização dos HAs (MORGAN, 1997). Esta regulação negativa pode ser atribuída, por exemplo, ao LPS (Lipoproteína) presente nas bactérias Gram negativas. O LPS estimula os macrófagos a liberarem citocinas

que regulam a atividade enzimática das CYPs. Esses efeitos observados *in vivo* foram mimetizados em ensaios biológicos, utilizando citocinas como ativadores. Preparações de hepatócitos isolados quando estimulados com citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 Beta (IL-1 β) ou fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) apresentaram redução das enzimas do citocromo P450 e da capacidade de metabolizar os xenobióticos (MORGAN, 1997; TARA, PATON e RENTON, 1998; CHENG, WANG e MORGAN, 2003; RENTON, 2005). O estresse oxidativo é também capaz de modular negativamente a expressão do *CYP1A1* em linhagens celulares originárias de hepatomas de ratos, a H4 II EC3, e de tumores humanos, a HepG2 (MOREL e BAROUKI, 1998). Portanto não parece haver um único mecanismo para a modulação das atividades do sistema do citocromo P450 durante a infecção e a inflamação. Entretanto, o mecanismo mais freqüente parece envolver alterações da síntese de novo das enzimas moduladas e a mudança nos níveis de RNAm e da apoproteína (MORGAN, 1997).

No mesmo sentido, Thatcher e colaboradores estudaram em camundongos *Knockout* para o gene *Ahr* os efeitos da fumaça de cigarro ou de endotoxina bacteriana (LPS) no desenvolvimento de uma reação inflamatória. Os autores verificaram que, após inalação dos produtos, estes animais desenvolveram reação inflamatória aguda severa no pulmão, com aumento da atividade do *NF-kB*, quando comparados com os animais normais. Nesse estudo os autores sugerem que na ausência do AHR há ativação exacerbada do *NF-kB*, resultando no aumento de múltiplos produtos pró-inflamatórios detectados no lavado bronco-alveolar e na circulação, indicando, com isso, que o AHR e *NF-kB* estão envolvidos em mútua regulação (THATCHER *et al.*, 2007).

Análise filogenética da evolução molecular do AHR tem revelado que esta proteína tem origem ancestral, 450–510 milhões de anos atrás, e é presente em todos os grupos de vertebrados e alguns invertebrados (HAHN *et al.*, 1997). O locus *Ahr* é polimórfico em camundongos e em humanos. Estudos em 13 diferentes linhagens de camundongos, incluindo 8 linhagens isogênicas, 2 subespécies *Mus musculus* e três espécies adicionais *Mus*, demonstraram polimorfismo genético representado por 4 alelos onde o alelo *Ahr^d* que codifica o receptor de baixa afinidade, está presente nas linhagens DBA/2, SJL, CAST/Ei e 129/SvJ; o alelo *Ahr^{b1}* que codifica o receptor de alta afinidade está presente na linhagem C57Bl/6; *Ahr^{b2}* codifica o receptor de alta afinidade presente em Balb/cB4, C3H/HeJ, A/J e CBA/J e *Ahr^{b3}*, codifica um receptor de alta afinidade presente em camundongos MOLF/Ei, SPRETUS/E, PANCEV/Ei^b, CAROLI/E (THOMAS *et al.*, 2002). Estes alelos são definidos por variações no exon 7, estrutural e no exon 9, funcional (SCHMIDT *et al.*, 1993; THOMAS *et al.*, 2002).

O polimorfismo no exon 7 é observado por RFLP, ou seja, encontramos a perda do sítio de uma enzima de restrição Eco47III por variação no nucleotídeo 752 (AGCGCT→AGCACT) (SCHMIDT *et al.*, 1993). Assim camundongos C57BL/6 que apresentam receptores AHR de alta afinidade apresentam o alelo *Ahr*^{b1} que é digerível pela enzima de restrição Eco47III, enquanto os camundongos DBA/2 que apresentam receptor de baixa afinidade têm o alelo *Ahr*^d (SCHMIDT *et al.*, 1993). O polimorfismo do exon 9 resulta numa troca de aminoácidos alanina por valina na posição 375 do sítio de ligação do receptor, o que leva a uma diminuição de afinidade (THOMAS *et al.*, 2002).

A regulação positiva das enzimas dependentes do AHR resulta no aumento do metabolismo de alguns ligantes de AHR como os HPAs e a produção de carcinógenos intermediários, como as epóxide hidrolases ((BUTERS *et al.*, 1999) Existe também uma interrelação entre o AHR com sinais celulares de transdução que são conectados em cascata para conduzir as células em sentidos alternativos de proliferação, de repressão, ou de apoptose (MARLOWE e PULGA, 2005). Tem sido muito estudado a ligação do AHR com o crescimento de células normais e em células tumorais na ausência de ligantes exógenos (CHANG e PUGA, 1998; LEVINE-FRIDMAN *et al.*, 2004). Por exemplo, o *Ahr* tem alta expressão em fibroblastos e linfócitos ativados por mitógenos (MARCUS *et al.*, 1998) e nos diversos tipos de tumores em roedores e humanos, incluindo leucemias e tumor mamário (TROMBINO *et al.*, 2000; ABDELRAHIM *et al.*, 2003; HAYASHIBARA *et al.*, 2003).

Na pesquisa de fatores de predisposição a carcinogênese, têm sido amplamente utilizadas linhagens de camundongos que, casualmente ou por seleção genética, apresentam de resistência ou de susceptibilidade ao desenvolvimento tumoral em um dado tecido. Utilizando linhagens de camundongos isogênicas susceptíveis, C3H, e resistentes, A/J e M. spretus, aos tumores hepatocelulares Dragani e colaboradores identificaram seis regiões diferentes, nos cromossomos 2, 5, 7, 8, 12, e 19, que mostraram-se associados susceptibilidade ao desenvolvimento do tumor hepatocelular (DRAGANI *et al.*, 1995). Já Bangrazi estudou em de camundongos geneticamente selecionados segundo as características de susceptibilidade (CAR-S) e resistência (CAR-R) à carcinogênese de pele em dois estágios. Além disso o impacto da regulação genética da imunidade adquirida e inata na predisposição ao desenvolvimento de tumores tem sido estudado em linhagens de camundongos “bons” e “maus” respondedores produzidos por processo de seleção genética bidirecional (BANGRAZI *et al.*, 1990).

Variações na sensibilidade à carcinogênese foram observadas nas várias linhagens, evidenciando a interrelação genética destas características:

Camundongos selecionados para alta ou baixa produção de anticorpos apresentaram diferenças na sensibilidade à carcinogênese de pele em protocolo em dois estágios DMBA/TPA: Camundongos maus respondedores mostraram-se mais resistentes do que os bons produtores de anticorpos, sugerindo que alelos relevantes para baixa resposta poderiam constituir para resistência a tumorigênese cutânea (IBAÑEZ *et al.*, 1999).

Em linhagens de camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda, tratados com DMBA/TPA ou com Uretana; apresentaram diferenças na sensibilidade a estes carcinógenos, indicando uma associação entre a resistência à carcinogênese e o fenótipo de alta reatividade inflamatória aguda (BIOZZI *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2003).

Seleção genética de linhagens segundo a reatividade inflamatória aguda

A regulação genética da resposta inflamatória vem sendo estudada pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan por meio da produção de linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para a alta ou baixa reatividade inflamatória aguda (AIR) a corpo estranho (IBAÑEZ *et al.*, 1992).

Estas linhagens foram obtidas por Seleção Genética Bidirecional a partir de uma população geneticamente heterogênea (F0) constituída por cruzamentos equilibrados entre oito linhagens isogênicas, híbridos F1 e segregantes F2, conforme esquema:.

A partir da população F0 foram selecionados aqueles animais que apresentaram alta ou baixa reatividade inflamatória aguda (AIR), segundo o número de leucócitos infiltrados e o teor de proteínas extravasadas em resposta à injeção subcutânea de Biogel P100 (partículas de poliacrilamida), agente flogístico quimicamente inerte e não imunogênico (STIFFEL *et al.*, 1990).

Os acasalamentos dos animais escolhidos nos extremos de resposta máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) foram repetidos em gerações consecutivas, até ser atingido o limite

máximo de separação entre as duas linhagens ao redor da vigésima geração de acasalamentos seletivos. Observou-se a conservação dos fenótipos extremos nas gerações posteriores, indicando que os genes relacionados aos caracteres selecionadores fixaram-se em homozigose em cada linhagem, mantendo-se, entretanto um fundo genético heterogêneo (IBAÑEZ *et al.*, 1992; RIBEIRO FILHO, 1994).

Durante o processo seletivo houve aumento progressivo da diferença fenotípica entre as linhagens AIR indicando que este caráter é quantitativamente regulado pela interação aditiva de vários genes que segregam independentemente e cujos alelos de efeito de máxima ou mínima resposta inflamatória aguda foram acumulados progressivamente durante o processo de seleção. Por métodos de genética clássica foi estimada a participação de 9 a 12 loci gênicos independentes, comumente denominados de QTL (*Quantitative Trait Loci*) (IBAÑEZ *et al.*, 1992; BIOZZI *et al.*, 1998).

A diferença entre as duas linhagens no número médio de leucócitos migrantes ao sítio de injeção do Biogel é de aproximadamente 20 vezes a favor da linhagem AIRmax, sendo os leucócitos polimorfonucleares (PMN) as células predominantes no exsudato (**Figura 3**). Esta diferença é um fenômeno geral que afeta todos os tecidos vascularizados em resposta a vários agentes flogísticos, tais como carragenina, zimosan e bactérias vivas ou inativas (IBAÑEZ *et al.*, 1992, ARAUJO *et al.*, 1998). Este maior número de neutrófilos encontrado no exsudato dos camundongos AIRmax é decorrente de três fatores: 1) maior atividade da medula óssea em produzir neutrófilos maduros em consequência de alta resposta para citocinas granulopoiéticas como IL-3, IL-5 e fator de estimulação de colônia granulocítica e monocítica (GM-CSF); 2) maior produção de fatores quimiotáticos, como C3a e C5a formados pela ativação do sistema complemento e proteína inflamatória do macrófago 2 (MIP-2), pelas células residentes ou infiltrantes para atrair neutrófilos após tratamento com Biogel e 3) maior resistência a apoptose espontânea das células do exsudato avaliada pela contagem de núcleos apoptóticos, mediado de fluorescência de iodeto de propídio e uma menor quantidade de células marcadas com anexina (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Figura 3 - Gráfico da divergência entre as linhagens AIR no número médio de leucócitos infiltrantes e extravasamento protéico no sítio de injeção do Biogel.

FONTE: Modificado de BIOZZE et al., 1998, com permissão

A resposta imune específica dos camundongos AIRmax e AIRmin não foi afetada pelo processo seletivo, uma vez que estas linhagens produzem níveis equivalentes de anticorpos contra antígenos complexos (eritrócitos, proteínas heterólogas e bactérias inativadas). Igualmente, as reações de hipersensibilidade tardia a eritrócitos de carneiro ou à *Salmonella* entérica, sorotipo *S. Typhimurium*, foram idênticas nas duas linhagens. Por outro lado, camundongos AIRmax são significativamente mais resistentes a infecções por patógenos intracelulares facultativos (*Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*) do que os AIRmin. Esta maior resistência dos AIRmax está diretamente relacionada com a sua habilidade em controlar o crescimento bacteriano no baço, à resposta inflamatória local e à produção de citocinas (ARAÚJO et al., 1998).

Neste modelo, foram constatadas diferenças significativas em estudos sobre os mecanismos inflamatórios e imunes que interferem no desenvolvimento de doenças auto-imunes sendo os AIRmax mais susceptíveis. (VIGAR et al, 2000).

Estes animais foram também analisados quanto à sua capacidade em desenvolver tumores quimicamente induzidos ou transplantados. Um protocolo de carcinogênese química em dois estágios foi utilizado no sentido de avaliar o comprometimento epidérmico nestes animais. Camundongos AIRmax apresentaram maior resistência ao desenvolvimento dessas lesões do que os AIRmin, tanto no número de papilomas (multiplicidade) como na porcentagem de animais acometidos (incidência) (BIOZZI et al., 1998). O desenvolvimento de massa tumoral decorrente da implantação de células de melanoma humano (SKMEL-28) e

murinos (B16F10 e S91) no tecido subcutâneo e a carcinogênese química pulmonar provocada por uretana, metilcolantreno, ou por DMBA, também discriminou estas duas linhagens, sendo AIRmax mais resistentes que AIRmin. (MARIA *et al.*, 2001; MARIA *et al.*, 2003).

Estes camundongos, por se diferenciarem quanto à capacidade de desenvolver tumores quimicamente induzidos por HAs constituem, portanto, um modelo apropriado e original para serem utilizados no estudo da influência dos caracteres inflamatórios selecionados na hematotoxicidade da medula óssea causada pelos PAH, por estes compostos.

Neste projeto estudamos os efeitos tóxicos do DMBA na medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin, verificando como essa droga pode afetar as populações de células mielóide e linfóide no que concerne ao número e a capacidade proliferativa dessas células. Simultaneamente verificamos a expressão de alguns genes transcritos em decorrência do tratamento.

Finalmente, como o processo de metabolização dos HPAs envolve a ligação ao Ahr, iniciando uma cascata de eventos que irá culminar com a transcrição de uma variedade de genes, avaliamos a importância da metabolização dos xenobióticos nas linhagens AIR na indução da toxicidade das células da medula óssea por meio da comparação entre o tratamento com DMBA ou com a associação de fenol e hidroquinona, cujos efeitos diretos dependem ou não, respectivamente, da ligação ao receptor AHR. (EASTMOND *et al.*, 1987).

OBJETIVOS

2 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos tóxicos do DMBA na medula óssea comparativamente em animais AIRmax e AIRmin.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar as modificações qualitativas e quantitativas da celularidade periférica e da medula óssea decorrente do tratamento com DMBA, bem como a proliferação das células da medula óssea;
- Avaliar a capacidade de proliferação das células do baço após tratamento com DMBA
- Avaliar a importância da metabolização dos xenobióticos na indução da toxicidade após o tratamento com os metabólitos do benzeno, fenol e hidroquinona;
- Avaliar a expressão, na medula óssea, dos genes *Ahr* e das enzimas da família do citocromo 450 envolvidas no metabolismo do DMBA.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos, machos ou fêmeas, das linhagens AIRmax e AIRmin, da 43^a geração de Seleção Genética produzidos e mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética sob regime alimentar convencional e água *ad libitum*. Os experimentos foram parovados pelo Conselho de Ética do Butantan, nº 043 nas fls. 15 do livro 2.

3.2 Tratamentos

Fenol/Hidroquinona: Grupos de animais foram injetados com 75mg/kg de peso corpóreo de Fenol e 25 à 75mg/kg de peso corpóreo Hidroquinona isoladamente ou em associação diluídos em salina, por via intra-peritoneal duas vezes ao dia em intervalos de 6 horas, durante 3 dias consecutivos. Animais controles foram injetados com salina (YOON *et al.*, 2002).

DMBA: Grupos de animais foram injetados intra-peritonealmente com 25, 50 ou 100 mg/kg de peso corpóreo de DMBA, dissolvido em óleo de oliva, em uma única dose. Os animais controles foram tratados com volume equivalente de óleo de oliva. Esta dose foi escolhida por apresentar citotoxicidade acentuada na medula óssea de camundongos (HEIDEL *et al.*, 2000).

3.3 Obtenção de células da medula óssea

Após sacrificar os animais por deslocamento cervical e realizar assepsia da pele com álcool 70%, os fêmures foram expostos e excisados. As extremidades foram cortadas e os fêmures foram perfundidos com 2ml de RPMI 1640 suplementado com 2mM de L-Glutamina, 20µg/ml de Gentamicina e 10% Soro Fetal Bovino inativado. As células da medula óssea obtidas foram transferidas para tubos de 15ml (Falcon), com auxílio de agulha fina. O número total e a viabilidade das células foram determinados em câmara hemocitométrica de Malassez por exclusão com Azul de Tripan.

3.4 Citometria de fluxo

Células viáveis da medula óssea, após lise das hemácias (4,15g de cloreto de amônia, 0,84g bicarbonato de sódio, 1ml de EDTA 0,5M pH 8,0) foram numeradas em câmara hemocitométrica. Uma alíquota de 100µl de uma suspensão celular a 10⁷ células/ml foi marcada com anticorpos monoclonais dirigidos contra: granulócitos-Ly-6G (GR-1, clone:

RB6), cadeia α de β -integrina CD11b (clone: Mi/70), CD45/B220 (clone RA3-6B2), IgM (clone R4-22) e CD3 (clone 145-2C11). Como isótipos controles foram utilizados: IgG2b, de rato (clone: A95-1) marcado com Ficoeritrina (PE) ou Isotiocianato de fluoresceína (FITC). Todos os anticorpos foram obtidos da PharMingen. O registro de 10000 células foi considerado, utilizando FACScalibur e analisado pelo programa Cellquest (Becton-Dickinson).

3.5 Proliferação de células da medula óssea obtidas de animais tratados ou não com DMBA, resultante dos estímulos com GM-CSF

Após 24 horas do tratamento com DMBA foram obtidas as células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin utilizando o mesmo protocolo descrito do item 3.3. As suspensões celulares foram tratadas com tampão de lise e ressuspensas em 1 ml de meio RPMI 1640 suplementado com 2mM de glutamina, 1mM de piruvato de Sódio, 20 μ g/ml de gentamicina, 50 μ M de mercaptoetanol e 10% de soro fetal bovino inativado. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, na concentração de 5x10⁵/ml e estimuladas *in vitro* com 50 η g/ml de GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor) (Prepotech). Após 5 ou 7 dias de incubação a 37 °C e 5% CO₂, as células foram cuidadosamente recolhidas e determinadas as concentrações em câmara hemocitométrica de Malassez.

3.6 Indução e quantificação da Inflamação

Os animais foram previamente depilados na região dorsal onde foram injetados 0,75ml de uma suspensão de Biogel P100 em PBS. Vinte e quatro horas após a injeção, o compartimento subcutâneo formado foi lavado com 1 ml de PBS contendo 20 U/ml de Calciparina e o exsudato obtido foi deixado em repouso por 3 minutos para a sedimentação das partículas. O número total de células foi determinado em câmara hemocitométrica de Malassez. (STIFFEL *et al.*, 1990; IBAÑEZ *et al.*, 1992; RIBEIRO, 1994).

3.7 Obtenção de células do sangue periférico

Amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital por meio de pipeta Pasteur embebida em Citrato de Sódio a 3% (3g de citrato de sódio anidro, 1ml de solução de formaldeído comercial~37%, 100ml de água destilada). O número total de leucócitos e de hemácias foi determinado por meio de contagem em câmara hemocitométrica (Malassez). Para os leucócitos, foi feita uma diluição do sangue na proporção de 1:20 em Azul de Metileno 1% em ácido acético a 1%. Para eritrograma as amostras foram diluídas na

proporção de 1:4000 em Citrato de Sódio a 3%. Esfregaços para a caracterização do tipo celular foram corados com Diff-Quick.

3.8 Proliferação de células do baço induzidas por LPS e ConA

As células esplênicas foram isoladas individualmente dos camundongos em meio RPMI 1640 completo suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM L-Glutamina, 50µg/mL de gentamicina, centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. Os precipitados foram ressuspendidos e mantidos em 2mL de RPMI completo no gelo. As suspensões foram expostas aos mitógenos por três dias em placas de cultura de 96 poços (200µL na concentração de 1×10^6 /ml) em replicatas de 6 poços contendo 50µL de 50µg/mL de LPS (Sigma) ou 5µg/mL de Conavalina A (Sigma). As suspensões foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas e pulsadas com 20µL de 50µCi/mL de [3H] –Timidina e incubadas nas mesmas condições por adicionais 24 horas. O nível de incorporação de timidina, que define a proliferação celular, foi medido em contador de cintilação (β Counter).

3.9 Extração de RNA

As células da medula óssea colhidas em 2ml de PBS foram centrifugadas por 15 min a 1000 rpm e o precipitado foi ressuspendido em 0,75 ml de solução de Trizol (Invitrogen). A essa solução foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio (MERCK) para cada 0,75 ml de Trizol e este foi incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Após o período de incubação a amostra foi centrifugada a 11000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante (incolor, que contém o RNA) foi transferido para outro tubo eppendorf para precipitação com 0,5 ml de álcool isopropílico (MERCK) para cada 0,75 ml de Trizol. A mistura da solução foi feita por inversão e a solução foi centrifugada a 11000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O precipitado de RNA foi lavado com 1 ml de etanol 75% gelado para cada 0,75 ml de Trizol. Após a secagem, o pellet foi dissolvido em 50µl de água livre de RNase. A concentração do RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro a 260/280 nm e a integridade e qualidade das preparações foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE (Tampão Brometo de Etídio).

3.10 Obtenção do DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi feita por meio de reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para tanto, 10µl contendo 1µg do RNA foram adicionados a 1µl de Oligo(dT) (50µM), 2µl de água livre de RNase e 1µl de oligonucleotídeos dNTP (10 µM). A mistura foi homogeneizada e submetida à temperatura de 65 °C por 5 minutos. Após este período, a

mistura permaneceu no gelo por 1 minuto. Em seguida foram adicionados 4µl de tampão específico 5X concentrado (250 mM Tris-HCL pH 8,3, 375 mM KCL e 15 mM MgCl₂), 1µl de DTT (0,1M) e 1µl da enzima SuperScript III RNase H- Reverse Transcriptase-Invitrogen (200 U/ml). As amostras foram aquecidas à 50 °C por 50 minutos e inativadas à 70 °C por 15 minutos. As reações foram incubadas em aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200.

3.11 Quantificação do RNA mensageiro por PCR em Tempo-Real

Avaliamos a quantidade de RNA mensageiro do receptor AHR e dos citocromos CYP1B1 e CYP1A1 presentes nas células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin 12 e 24 horas após o tratamento com DMBA ou óleo de oliva ou de animais que não receberam tratamento algum. A cada amostra de cDNA foi adicionada as seqüências de primers (5µM); 6,25 µl do Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen), e água para ajustar o volume final de reação em 25µl por tubo. As reações foram incubadas no aparelho Chromo 4 (MJ Research), e submetidas a uma fase inicial de incubação à 50 °C por 2 minutos, seguido da fase de ativação da enzima (“hot start”) 95 °C por 2 minutos. As seqüências alvo foram então amplificadas durante 39 ciclos constituídos de etapas sucessivas de denaturação (95 °C por 15 segundos) e de anelamento (60 °C durante 1 minuto). A aquisição da fluorescência incorporada ao material dupla-fita amplificado a cada ciclo foi efetuada na etapa de extensão.

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase “Melt” onde a temperatura variou de 60 °C a 95 °C. A fluorescência foi adquirida a cada 1 °C, registrando-se a temperatura de dissociação, ou denaturação da dupla fita do material amplificado, o que indica o tamanho e, portanto, a especificidade do produto amplificado em cada reação.

Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa “Opticon Monitor Analysis Software 2.03”, conforme indicado.

Esse sistema detecta o aumento da quantidade de fitas de DNA marcado com SYBR Green, molécula fluorescente. À medida que a reação ocorre, a fluorescência emitida pela amostra excitada por um laser ou por uma lâmpada de halogênio associada a um filtro específico, é detectada a cada ciclo e enviada para uma unidade processadora.. A cada amostra, foi atribuído um valor de cT (*Cycle Threshold*) referente ao número de ciclos necessários para que a fluorescência incorporada às duplas fitas amplificadas comece a aumentar acima da fluorescência de fundo.

Os resultados são, então, expressos pela normalização dos valores de cT do gene em estudo (alvo), no caso *AHR*, *CYP1A1* e *CYP1B1*, com um gene constitutivo, método

comumente utilizado para as correções de pequenas variações devido à diferença na quantidade do RNA total. Um gene constitutivo ideal deve ser aquele cuja expressão ocorra em níveis constantes em diferentes tecidos do organismo, em todos os estágios do desenvolvimento e não deve ser afetado pelo tratamento experimental (GIULIETTI *et al.*, 2001).

Em seguida normatizamos a expressão dos genes estudados utilizando como calibrador do experimento, o camundongo AIRmin normal, isto é não tratado, já que esse grupo apresentou o valor do cT maior, portanto a expressão mais baixa de mRNA em relação aos outros grupos estudados. Portanto o delta cT do gene estudado foi subtraído do delta ct do calibrador. O índice de variação de expressão é representado por $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Descrevemos na **tabela 1** as seqüências sintéticas (*primers*) que foram usadas para amplificar a partir dos cDNA específicos. Está incluído a *cyclofilina* como controle positivo e para normalização dos resultados. Estes primers foram desenhados para éxons que flanqueiam íntrons de grande tamanho (≥ 1000 pb), evitando assim a amplificação do DNA genômico.

Tabela 1 - Relação das seqüências sintéticas (primers) dos genes *CYCLOFILINA*, *AHR*, *CYP1B1* e *CYP1A1* na orientação 5' - 3'.

PRIMER	SENSE (3')	ANTISENSE (5')	Tamanho do produto
<i>CYCLOFILINA</i>	AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT	AAATGCCCCGCAAGTCAAAAG	91pb
<i>AHR</i>	AGAATCCCACATCCGCATGA	TGCAAGAAGCCGGAAACTG	64pb
<i>CYP1B1</i>	TGGCTGCTCATCCTCTTTAC	AGGTTGGGCTGGTCACTCAT	113pb
<i>CYP1A1</i>	TGGAGACCTTCCGGCATTTC	GCCATTCAGACTTGTATCTCTTGTG	77pb

Na **figura 4** representamos, como um exemplo, o perfil da análise da expressão do mRNA do gene constitutivo *cyclofilina* após 24hs de tratamento com DMBA ou com óleo de oliva. Em **A** estão os valores de cT do gene constitutivo que se manteve inalterado. Em **B** a respectiva curva de Dissociação, mostrando que o nível de fluorescência em função da temperatura não variou, o que revela a especificidade do *primer* devido à amplificação de um único produto.

Figura 4 - Os gráficos mostram os respectivos “*Cycle Threshold*” (Ct), (A) e a curva de *Melt* (B) do gene *cyclofilina*.

A curva com cor azul clara indica o material branco (sem inclusão de cDNA na reação)
 Ensaio realizado no Chromo 4 (MJ Research) utilizando Platinum SYBR Green qPCR
 Supermix UDG

3.12 Análise Estatística

A diferença entre as médias de dois grupos experimentais foi determinada pelo teste *t* de *student*. Foram considerados significantes os valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Hematotoxicidade induzida por DMBA em camundongos AIRmax e AIRmin

Para caracterizarmos quantitativamente os efeitos supressores do DMBA sobre a celularidade periférica e da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin, realizamos experimentos de dose-resposta e de cinética, avaliando o número de células totais bem como a caracterização histológica da arquitetura da medula óssea a partir de preparações do osso esterno.

4.1.1 Avaliação do efeito de doses variadas de DMBA

Nesse experimento, utilizamos três doses diferentes de DMBA (25, 50 ou 100 mg/kg de peso corpóreo) em grupos de quatro animais, machos ou fêmeas de cada linhagem, para determinar a melhor dose indutora de toxicidade no que concerne à celularidade da medula óssea e da circulação sanguínea. Animais controles foram tratados somente com o veículo, óleo de oliva.

Após 24 horas do tratamento intraperitoneal com DMBA verificamos que as doses de 50 e 100 mg/kg provocaram efeitos tóxicos sobre a medula óssea apenas dos animais AIRmin, revelando uma diferença interlinhagens significativa, $p \leq 0,05$, para ambas as dosagens. Estas doses provocaram uma depleção de cerca de 4 vezes na medula óssea dos animais AIRmin quando comparado com seu respectivo controle, enquanto que o mesmo efeito não foi observado nos animais AIRmax. **(Figura 5)**. A dose de 25 mg/Kg não produziu efeitos tóxicos, sendo os níveis de celularidade dos animais tratados com DMBA semelhante aos do grupo controle tratados apenas com óleo de oliva.

A variação de doses de DMBA utilizada em AIRmax e AIRmin não provocou alterações significativas na circulação destes animais no período de 24 horas analisado. Alterações foram detectadas em períodos posteriores à 24 horas, como será mostrado adiante. Assim, baseados nos resultados da medula óssea, escolhemos a dose de 50mg/kg de peso do animal, como a dose a ser utilizada nos experimentos subsequentes por ser a menor dose que produziu supressão celular na medula óssea, confirmando dados da literatura (GALVAN *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2005).

Figura 5 - Hematotoxicidade da medula óssea (A) e do sangue periférico (B) nos camundongos AIRmax e AIRmin, após 24 do tratamento com dose variadas de DMBA (25, 50 ou 100 mg/kg) ou óleo (controle). Os resultados dos camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—) estão expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de quatro animais por grupo. * $p \leq 0,05$ Diferença entre os animais controles (C) e os tratados com DMBA.

4.1.2 Cinética do efeito do DMBA sobre a celularidade da medula óssea e circulação em camundongos AIRmax e AIRmin

Após avaliarmos a dose ideal para tratarmos os animais com DMBA, verificamos o comportamento destes durante um período de 14 dias após tratamento intraperitoneal de DMBA, no que concerne à celularidade da medula óssea e sangue. Para isso, tratamos grupos de 8 animais em média, de ambos os sexos, com 50mg/kg de peso corpóreo de DMBA e comparamos com os respectivos grupos controles que receberam apenas óleo de oliva. Determinamos o número total de células da medula óssea, obtidas pela perfusão de dois fêmures, depois de 12 horas, 1, 2, 3, 7 e 14 dias do tratamento com DMBA. O número de células foi normalizado pelo peso corpóreo, para corrigirmos a variação do tamanho do fêmur entre as duas linhagens.

Nos resultados da **figura 6** verificamos, nos grupos não tratados (tempo zero), que os animais AIRmax apresentaram maior número de células na medula óssea do que os AIRmin, fato já constatado em estudos anteriores (IBAÑEZ *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.* 2003). Após 12 horas do tratamento com DMBA verificamos uma redução significativa na celularidade nos camundongos AIRmax, de 54%, e nos AIRmin de 53%, quando comparadas ao grupo normal. A partir deste tempo, os animais AIRmax tratados com DMBA mantiveram seus níveis inalterados durante toda a cinética, ao passo que os animais controles desta linhagem apresentaram uma recuperação da celularidade.

Esta diminuição seguida de uma recuperação em AIRmax tratados apenas com óleo pode ser decorrente de uma reação inflamatória instalada no peritônio (**Figura 7**) que podem ter gerado um esgotamento inicial da medula óssea maior nestes animais. O mesmo não ocorreu nos animais AIRmin já que estes camundongos apresentaram depleção menor (15%) do número de células (**Figura 6B**). Esta interpretação pode ser coerente uma vez que é descrito que o óleo de oliva induz uma reação inflamatória local (SILVA, 2004).

Os camundongos AIRmin apresentaram diferenças significativas de celularidade entre os grupos controles e os tratados com DMBA em todos os tempos avaliados. Esta diferença é atribuída apenas a uma diminuição acentuada nos valores celulares dos animais tratados com DMBA (**Figura 6B**).

Figura 6 - Cinética da celularidade na medula óssea durante 14 dias nos camundongos **A**-AIRmax e **B**- AIRmin tratados com DMBA ou com óleo.

Os camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—) foram tratados com 50mg/Kg de DMBA (—) ou com óleo (---). O grupo **controle basal (dia 0)** corresponde aos animais AIRmax e AIRmin normais sem tratamento algum. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais em cada grupo. * $p \leq 0,05$ representa a significância da diferença entre os animais tratados com óleo e DMBA e [#] $p \leq 0,05$ entre os grupos tratados com DMBA e o grupo basal (dia 0).

Figura 7 - Reação inflamatória aguda local medida 24 horas após a injeção intraperitoneal de óleo ou DMBA em camundongos AIRmax e AIRmin.

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$ é a diferença entre animais AIRmax (—) ou AIRmin (—) tratados com DMBA e com óleo e # $p \leq 0,05$ diferença entre os animais tratados com DMBA e os normais (basal)

Para avaliarmos se a queda de celularidade observada na medula óssea teve reflexo na circulação sanguínea, coletamos amostras de sangue do plexo retro-orbital após diferentes tempos (1, 2, 7 e 14 dias) para análise do hemograma. Pudemos observar que os animais AIRmin tratados com DMBA apresentaram uma diminuição de 67% no número de leucócitos já nos primeiros 3 dias após o tratamento. Os camundongos AIRmax, que receberam apenas óleo, aumentaram significativamente a quantidade de leucócitos presentes na circulação ao longo da cinética, da mesma maneira que na medula óssea da **figura 6**. Os animais AIRmax tratados com DMBA apresentaram valores totais de células inalterados durante os 14 dias analisados. Nesta linhagem observamos que os animais controles tratados apenas com óleo apresentaram aumento significativo no número total de células, determinando, com isso, diferenças significativas com relação aos grupos que receberam DMBA(**Figura 8A**). Este aumento da celularidade dos controles pode ser explicado pela alta reatividade inflamatória produzida no peritônio (**Figura 7**) além da recuperação da medula óssea

A análise diferencial de leucócitos revelou uma queda, após o 3º dia de tratamento com DMBA, na porcentagem das células mononucleares nos AIRmax e AIRmin de 46% e 82%, respectivamente quando comparado aos respectivos controles. (**Figura 8B**). Por outro lado, os polimorfonucleares tiveram um aumento na sua porcentagem de 8 e 4 vezes nos AIRmax e AIRmin, respectivamente. (**Figura 8C**). Este perfil na porcentagem de células

mostra uma inversão entre as populações de mono e polimorfunucleares, sendo mais nítida nos camundongos AIRmin, após tratamento com DMBA. É sabido que no processo inflamatório há um aumento de células polimorfonucleadas, principalmente neutrófilos, é possível que o óleo de oliva, por ser um adjuvante inflamatório, mude o perfil na celularidade, aumentando assim células polimorfonucleadas. Por outro lado nenhuma alteração foi observada na população de eritrócitos (**Figura 9**).

Figura 8 - Cinética da concentração de leucócitos totais (A), mononucleares (B) e polimorfonucleares (C) do sangue durante 14 dias nos camundongos AIRmax e AIRmin tratados com 50mg/Kg de DMBA ou óleo, controle

Os resultados estão expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais AIRmax (—) ou AIRmin (—). # $p \leq 0,05$ é diferença entre os animais do grupo 0 e após tratamento com DMBA(—); * $p \leq 0,05$ é a diferença entre animais controles(----) e os tratados com DMBA.

Figura 9 - Cinética do número de hemácias do sangue periférico durante 14 dias nos camundongos AIRmax e AIRmin tratados com 50mg/Kg de DMBA ou com óleo (—). Os resultados estão expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais AIRmax (—) ou AIRmin (—).

4.1.3 Análise histológica da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin

Preparações histológicas do tecido da medula óssea foram realizadas a partir dos esternos extraídos dos animais tratados ou não com DMBA. As preparações foram coradas com hematoxilina e Eosina e as imagens registradas sob microscopia óptica com aumento de 100X (**Figura 10**).

Podemos observar que, de acordo com os dados obtidos na contagem de células totais da medula óssea após 24hs de tratamento com DMBA, o padrão normal da arquitetura da medula óssea foi alterado somente nos camundongos AIRmin com evidente hipocelularidade e aumento dos sinusóides (seta). Este padrão histológico é típico de comprometimento da medula óssea. O mesmo não aconteceu nas preparações dos camundongos AIRmin tratado apenas com óleo de oliva e nos AIRmax tratados ou não com DMBA, cujo padrão da medula óssea assemelha-se a animais normais.

Figura 10 - Fotomicrografia dos cortes histológicos do esterno obtidos dos camundongos **AIRmax** e **AIRmin** tratados com óleo de oliva (A e B) ou DMBA (C e D) após 24hs. A seta verde indica a dilatação dos sinusóides. Aumento de 100x.

4.1.4 Análise por citometria de fluxo das células da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin após 24hs do tratamento com DMBA ou óleo de oliva

Foi demonstrado que os camundongos susceptíveis aos HPAs apresentam diminuição das células da série linfóide e mielóide na medula óssea após o tratamento com DMBA (HEIDEL *et al.*, 2000; GÁLVAN *et al.*, 2006).

Para estudarmos o comprometimento destas populações celulares na medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin, grupos de 5 animais foram tratados com 50mg/Kg de DMBA ou óleo de oliva. Após 24hs coletamos as células da medula óssea, pela perfusão do fêmur com RPMI, e seguimos com marcação com anticorpos específicos e análise por citometria de fluxo.

Consideramos a morfologia das células viáveis (marcação negativa para PI-Iodeto de Propídio) da medula óssea selecionadas em duas regiões: as células da série linfóide e aquelas pertencentes à série mielóide, conforme representação na **figura 11**.

Figura 11 - Análise por citometria de fluxo de sub-populações de células linfóides e mielóides da Medula Óssea.
Citogramas representativos das células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin tratados com óleo de oliva.

Para diferenciar as sub-populações linfóides utilizamos marcações com anticorpos específicos dirigidos às moléculas de superfície destas populações, tais como: IgM e CD45/B220 onde os linfócitos pro/pré B são revelados por B220^{low}/IgM⁻, os imaturos por B220^{low}/IgM^{high} e os linfócitos maduros por B220^{high}/IgM^{high} (GALVÁN *et al.*, 2006) (**Figura 12**).

A porcentagem de células B e de suas formas de diferenciação presentes na medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin, após 24 horas de tratamento, está representada na **tabela 2**. Observou-se o efeito do DMBA apenas nos camundongos AIRmin, onde verificamos uma diminuição significativa na proporção das células B imaturas concomitante com um aumento na porcentagem de células maduras. Nos animais AIRmax não observamos variação significativa das populações de células maduras pelo tratamento com DMBA.

Figura 12 - Análise por citometria de fluxo de sub-populações de células linfóides da medula óssea. Citogramas representativos das subpopulações de células linfóides, linfócitos pro/pré B ($B220^{lo}/IgM^{-}$), célula B imaturas ($B220^{lo}/IgM^{hi}$) e célula B maduras ($B220^{hi}/IgM^{hi}$) dos camundongos AIRmax e AIRmin obtidas após 24hs de tratamento com DMBA.

Tabela 2 - Efeito do DMBA sobre as populações celulares da linhagem linfóide na medula óssea de camundongos AIR após 24 horas do tratamento.

	AIRmax		AIRmin	
	Óleo	DMBA	Óleo	DMBA
Células linfóides (B220+)	33,3 ± 15,6 ^a	54,9 ± 26,5	40,9 ± 7,0	46,5 ± 10,2
LB Maduro ($B220^{hi}/IgM^{hi}$)	10,4 ± 3,7	14,6 ± 4,2	13,2 ± 4,0 [*]	24,1 ± 9,6
LB Imaturo ($B220^{lo}/IgM^{hi}$)	9,1 ± 6,2 ^a	28,4 ± 14,6	19,2 ± 5,5 [*]	13,1 ± 2,2
LB pre/pro ($B220^{lo}/IgM^{-}$)	13,8 ± 10,1	11,9 ± 6,7	11,9 ± 4,6	8,4 ± 7,1

Para cada grupo foram tratados 5 animais; média ± desvio padrão da média;

^aOs valores referem-se às porcentagens médias das células viáveis totais.

^{*} diferença entre os animais tratados com DMBA e os controles ($p \leq 0,05$)

A população mielóide foi caracterizada pelas marcações com GR1 e CD11b, para diferenciarmos monócitos ($GR1^{-}/CD11b^{+}$) de neutrófilos ($GR1^{low}/CD11b^{+}$ e $GR1^{high}/CD11b^{+}$) (LAGASSE e WEISSMAN, 1996).

A análise das células mielóides após 24hs de tratamento está representada na **figura 13**. Nesta figura mostramos a análise representativa de dois tipos celulares predominantes: os neutrófilos, GR1^{lo-hi}/CD11b⁺, e os monócitos, GR1⁻/CD11b⁺.

Figura 13 - Análise por citometria de fluxo das populações de células mielóides da medula óssea. Citogramas representativos da marcação GR1 e CD11b das células da Medula Óssea de camundongos AIRmax ou AIRmin obtidas após 24hs do tratamento com DMBA.

A porcentagem de células mielóides presentes na medula óssea após o tratamento com DMBA diminuiu significativamente apenas nos animais AIRmin. Esta diminuição ocorreu principalmente na população de neutrófilos maduros, cerca de 30%. O mesmo tratamento não afetou a composição das células mielóides dos camundongos AIRmax (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Efeito do DMBA sobre as populações celulares da linhagem mielóide na medula óssea de camundongos AIR após 24 horas do tratamento.

	AIRmax (N=5)		AIRmin (N=5)	
	Óleo	DMBA	Óleo	DMBA
Células Mielóide (CD11b⁺)	56,0 ± 3,8 ^a	55,6 ± 3,0	41,2 ± 5,6 *	32,1 ± 8,5
Neutrófilos (GR1^{lo-hi}CD11b⁺)	36,9 ± 4,1	33,8 ± 4,7	29,7 ± 7,2 *	20,5 ± 6,4
Monócitos (GR1⁺CD11b⁺)	10,9 ± 0,7	12,2 ± 3,6	5,3 ± 2,2	6,2 ± 2,5
Outras (GR1⁺CD11b⁻)	38,9 ± 1,4	40,4 ± 2,1	56,9 ± 6,8	64,1 ± 8,6

Para cada grupo foram tratados 5 animais; média ± desvio padrão da média;

^aOs valores referem-se às porcentagens médias das células viáveis totais.

* diferença entre os animais tratados com DMBA e os controles (p≤0,05)

4.1.5 Capacidade de proliferação das células da medula óssea de AIRmax e AIRmin após tratamento com DMBA

A medula óssea é constituída pelo estroma e por células hematopoiéticas constituídas de várias linhagens celulares que se originam das células primitivas pluripotentes ou *stem cells*. Estas quando estimuladas por fatores hematopoiéticos proliferam e diferenciam-se dando origem às várias populações de células mielóides e linfóides circulantes (ZANICHELLI *et al.*, 1995; JAMRA e LORENZI, 1997; GOLDESTSTEIN, 1998).

Quando cultivamos células da medula óssea com GM-CSF, por exemplo, as células progenitoras mielóides são estimuladas a se diferenciarem em granulócitos ou macrófagos. (ZANICHELLI *et al.*, 1995; ZHU *et al.*, 2001). No entanto, quando sofrem a ação dos xenobióticos podem apresentar alterações bioquímicas que leva à perda da capacidade proliferativa e de diferenciação ou podem sofrer apoptose (THURMOND *et al.*, 1987; CHENG *et al.*, 1988).

Para observar o efeito do DMBA na capacidade de proliferação das células mielóides da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin, tratamos 6 camundongos com DMBA ou óleo de oliva e após 1 ou 7 dias do tratamento, avaliamos a capacidade proliferativa das células em cultura por 7 dias, na presença de GM-CSF.

Após o período de cultura, observamos que as células dos camundongos AIRmin, obtidas após 1 dia do tratamento com DMBA (**Figura 14A**), apresentaram diminuição acentuada na proliferação quando comparadas aos seus respectivos controles tratados com óleo de oliva. Por outro lado, constatou-se em cultura de células dos AIRmax tratados nas mesmas condições, que a capacidade proliferativa não foi afetada, já que os animais que receberam o DMBA, óleo ou, ainda, os que não receberam qualquer tratamento, apresentaram níveis equivalentes de células. Em todos os grupos verificamos uma maior proliferação das células dos camundongos AIRmax, fato que confirma a capacidade proliferativa maior da

medula óssea dos camundongos AIRmax em resposta a fatores hematopoiéticos (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Para verificar se este efeito do DMBA está restrito apenas ao período de 1 dia pós-tratamento, realizamos cultura com células da medula óssea provenientes de animais após 7 dias da injeção ip de DMBA. Com este tratamento obtivemos o mesmo perfil de baixa proliferação nos camundongos AIRmin, enquanto os animais AIRmax não apresentaram alterações (**Figura 14B**). Os níveis de proliferação de todos os grupos foram muito inferiores aos obtidos no primeiro experimento (**Figura 14A**), provavelmente devido à variações ambientais muito freqüentes em experimentos de cultura de longa duração.

Para avaliar o efeito do DMBA na reatividade inflamatória aguda produzida por biogel, tratamos camundongos AIRmax e AIRmin com DMBA ou óleo de oliva, nas doses habituais, e após 24 horas administramos 0,75ml de biogel por via subcutânea. Após 24 horas da injeção de biogel determinamos o número de células do exsudato inflamatório formado no tecido subcutâneo. Observamos uma acentuada diminuição na celularidade dos camundongos AIRmin tratados com DMBA na ordem de 51% enquanto que os animais AIRmax apresentaram pouca alteração (11%). Esses resultados, somados àqueles de proliferação *in vitro*, indicam que o comprometimento da medula óssea afeta substancialmente a capacidade proliferativa com consequência no aporte de células em resposta a um estímulo inflamatório local (**Figura 15**).

Figura 14 - Análise proliferativa de células totais da medula óssea tratadas *in vivo* com óleo ou DMBA após 1 (A) ou 7 (B) dias, após 7 dias de cultura. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferença entre os grupos tratados com DMBA e óleo de oliva ou normal, $*p \leq 0,05$ e diferença entre os grupos N = animais normais e os tratados com DMBA $\# p \leq 0,05$.

Figura 15 - Resposta inflamatória aguda (24 horas) ao biogel em camundongos AIRmax e AIRmin tratados previamente com 50mg/Kg de DMBA ou óleo de oliva. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferença entre os grupos tratados com DMBA e óleo de oliva, * $p \leq 0,05$.

4.2 Efeito do DMBA no baço de camundongos AIRmax e AIRmin

Sabendo-se que o DMBA, além de induzir uma hipocelularidade da medula óssea, afeta outros órgãos hematopoiéticos, realizamos experimentos no sentido de avaliar eventual efeito sobre a celularidade do baço dos camundongos AIRmax e AIRmin.

Assim, após 24 horas do tratamento com 50mg/Kg de peso corpóreo de DMBA, os camundongos foram pesados e seus baços retirados para quantificação celular. Os resultados da **tabela 4** mostram que em 24hs, o peso do baço, acompanhado do número de células, apresentou uma redução significativa nos animais AIRmin tratados com DMBA quando comparado aos controles ao redor de 40%. Os camundongos AIRmax tratados não apresentaram redução na celularidade do baço.

Tabela 4 - Efeito do DMBA na celularidade nos camundongos das linhagens AIR após 24hs de tratamento

	AIRmax (N=5)			AIRmin (N=5)		
	Normal	Óleo	DMBA	Normal	Óleo	DMBA
Peso corpóreo (g)	26,1 ± 3,6 ^a	25,7±4	27,1±5,3	24,1 ± 2,9	24,4±3,2	23,6±3,9
Peso do Baço (mg)	107,4 ± 5,8 [#]	108,1±7,5	77,9±14,6*	106,9 ± 9,6 [#]	107,9±12,5	71,2±20,2*
Celularidade do baço (10⁷/ml)	8,5 ± 1.7	6,5 ± 1.8	6,5 ± 2.1	8,3 ± 2,0 [#]	7,8 ± 1.6	4,6 ± 0.6*

^a valores expressos como média ± desvio padrão da média da porcentagem do número de células viáveis

* diferença entre os animais tratados com DMBA e somente com óleo (p≤0,05)

[#]diferença entre os animais tratados com DMBA e os normais, sem nada(p≤0,05)

4.2.1 Efeito do tratamento do DMBA sobre a proliferação da células esplênicas dos camundongos AIRmax e AIRmin.

De acordo com a literatura os animais tratados com DMBA apresentam diminuição acentuada na citotoxicidade mediada por célula T, na resposta proliferativa ao mitógeno T dependente e na produção de citocinas. Esta diminuição também é observada no número de linfócitos B, interferindo na fisiologia normal destas células situação crítica para a expansão antígeno-específica durante a seleção clonal. Com isso o desenvolvimento de células produtoras de anticorpos e das células de memória fica prejudicado, resultando na ineficácia da resposta imune humoral (ALLAN *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que o tratamento com DMBA induz diminuição do peso do baço, como também a supressão significativa de linfócitos B e T, em camundongos sensíveis, em resposta a mitógenos do tipo LPS (Lipolissacarídeo) e ConA (Concavalina A), respectivamente (GAO *et al.*, 2005; UEMATSU, 1981).

Observamos, no experimento anterior, que o tratamento com 50mg/kg de peso corpóreo de DMBA reduziu o número de células esplênicas dos animais AIRmin, mas não alterou o número das células dos AIRmax. A partir destes dados fomos verificar se o tratamento com DMBA modula a resposta proliferativa de linfócitos B estimulados com LPS e de linfócitos T estimulados com ConA.

Para isso tratamos 6 animais de ambas as linhagens com DMBA ou óleo de oliva (controle) e após 24hs obtivemos as células totais do baço. Utilizamos também animais não tratados para que pudéssemos acompanhar uma possível ação moduladora do óleo. As células foram submetidas ao estímulo com LPS ou ConA em cultura e após 72 horas verificamos o nível de proliferação celular.

A resposta proliferativa de células esplênicas ao LPS nos animais AIRmin tratados com DMBA foi reduzida. Observamos uma supressão de 40% e 32% na proliferação comparadas com os AIRmin não tratados ou com os que receberam apenas óleo de oliva, respectivamente. A capacidade proliferativa de linfócitos B dos camundongos AIRmax não foi afetada pelo tratamento (**Figura 16**).

Figura 16 - Proliferação de células esplênicas, após 72 horas do estímulo *in vitro* com 100µg/mL de LPS.

Os valores são expressos como a média ± erro padrão da média do número de CPM de 6 animais por grupo. # p ≤ 0,05= diferença entre animais normais e tratados com DMBA.

*p ≤ 0,05= diferença entre os grupos tratados com óleo e DMBA

A resposta proliferativa de linfócitos T foi verificada em cultura de esplenócitos dos camundongos AIRmax e AIRmin, estimulados *in vitro* com 2,5 µg/mL de Con A. Observamos que a proliferação das células oriundas das duas linhagens foram afetadas pelo tratamento com DMBA. Nos camundongos AIRmax a resposta mitogênica de linfócitos T foi reduzida em 41% e 54% e nos AIRmin em 30% e 31% comparado com os seus respectivos controles, isto é, animais não tratados e aqueles que receberam apenas óleo, respectivamente (**Figura 17**).

Figura 17 - Proliferação das células esplênicas, após 72 horas do estímulo *in vitro* com 2,5µg/mL de ConA.

Os valores são expressos como a média ± erro padrão da média dos valores de CPM de 6 animais por grupo. # $p \leq 0,05$ = diferença entre os grupos tratados com DMBA e normais.

* $p \leq 0,05$ = diferença entre os grupos tratados com óleo de oliva e com DMBA.

4.3 Hematotoxicidade da medula óssea e circulação induzida pela associação de Fenol e Hidroquinona em camundongos AIRmax e AIRmin

Sabe-se que para ocorrer ação tóxica dos compostos aromáticos do tipo benzeno é necessário que ocorra a produção de metabólitos reativos como fenol, hidroquinona, catechol, além de outros. Experimentalmente, o fenol e a hidroquinona são considerados os principais produtos envolvidos no processo de toxicidade da medula óssea (EASTMOND, SMITH e IRONS, 1987).

Assim, para avaliarmos diretamente os efeitos tóxicos do metabólitos do benzeno, os quais sobrepõem as etapas de metabolização dos compostos policíclicos aromáticos, tratamos intraperitonealmente os camundongos AIRmax e AIRmin com 75mg/Kg de peso de hidroquinona (HQ) e fenol (FN) isolados ou associados (FN/HQ), diluídos em salina, por três dias consecutivos, duas vezes ao dia e em intervalos de 6 horas. Após 24 horas da última injeção, determinamos o número total de células presentes na medula óssea. Esta dose foi escolhida com base em dados da literatura que mostraram uma eficaz depleção da medula óssea em camundongos (EASTMOND, SMITH e IRONS, 1987).

O efeito citotóxico foi observado somente quando tratamos os animais com a associação de fenol e hidroquinona, com depleção de 85 e 58% em AIRmax e AIRmin, respectivamente. O tratamento com fenol ou hidroquinona isoladamente não causou supressão da medula óssea (**Figura 18**)

Figura 18 - Hematoxicidade da medula óssea em após 24 horas do tratamento com 75mg/Kg ip de FN e/ ou 75 mg/kg HQ.

Os resultados estão expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de quatro camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—) por grupo. * $p \leq 0,05$ diferença entre os animais controles e os tratados.

4.3.1 Avaliação do efeito de doses variadas de FN/HQ nos camundongos AIRmax e AIRmin

Após constatarmos que o tratamento com a associação de fenol e hidroquinona causou mielotoxicidade nas duas linhagens AIR na dose de 75mg/Kg, realizamos experimentos de efeito dose-resposta para determinar a melhor concentração de hidroquinona que cause efeitos supressores sem induzir mortalidade. A dose de Fenol foi fixada em 75mg/Kg.

Para tanto, utilizamos doses variadas de hidroquinona (25mg a 75mg/Kg) associadas a uma dose fixa de 75mg/kg de Fenol em injeções intraperitoneais, duas vezes ao dia, durante 3 dias consecutivos. Este protocolo em doses variadas de hidroquinona promove considerável supressão da medula óssea com concentrações de fenol superiores a 1mM, conforme proposto por EASTMOND, SMITH e IRONS em 1987. A hidroquinona na presença do Fenol sofre transformação em 1,4-benzoquinona, composto responsável pela mielotoxicidade (ROSS, 2000).

Observamos na **figura 19** o resultado dos tratamentos com a associação de FN/HQ. Verificamos que as doses de 50 e 75mg/Kg promoveram, após 24 horas, uma significativa redução da celularidade da medula óssea e do sangue periférico em ambas as linhagens, porém a dose de 75mg/kg de Hidroquinona foi a mais eficaz na supressão com redução de 70% e 55% na medula óssea e 72% e 56% na circulação em AIRmax e AIRmin, respectivamente. O tratamento com a dose de 25mg/Kg de hidroquinona não induziu efeito.

Figura 19 - Hematotoxicidade da medula óssea e sangue periférico após 24 do tratamento com 75mg/Kg ip de FN e dose variadas de HQ (25 ,50 ou 75 mg/kg) Os resultados dos camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—) estão expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de quatro animais AIRmax ou AIRmin. * $p \leq 0,05$ corresponde à diferença entre os animais controles e os tratados.

4.3.2 Cinética do efeito do FN/HQ sobre a celularidade da medula óssea e circulação em camundongos da linhagem AIR

Numa primeira etapa verificamos que a dose de 75mg/kg de FN/HQ foi a mais adequada para tratarmos os animais. Com estas condições passamos a analisar o efeito da associação de FN/HQ na medula óssea e sangue periférico, ao longo de 14 dias.

A **figura 20** mostra o efeito do tratamento de FN/HQ na medula óssea de oito animais, machos ou fêmeas, de ambas as linhagens quanto ao número de células totais. Grupos equivalentes de camundongos foram tratados com salina. Podemos observar uma supressão celular de 75% nos camundongos AIRmax e AIRmin já nas primeiras 12 horas após o tratamento com FN/HQ. Uma recuperação da celularidade ocorreu a partir do segundo dia de tratamento em ambas as linhagens.

Figura 20 - Cinética da celularidade na medula óssea durante 14 dias nos camundongos **A-AIRmax** e **B- AIRmin** tratados com 75mg/kg de FN/HQ ou salina. Os camundongos **A- AIRmax** (—■) e **B- AIRmin** (—■) foram tratados com 75mg/kg de FN/HQ (—) ou com salina (----). Os resultados são expressos como a média ± erro padrão da média de 8 animais por grupo. * $p \leq 0,05$ refere-se à diferença entre os animais controles e os tratados.

Essa queda de leucócitos na medula óssea é refletida na circulação sanguínea após 24hs do final do tratamento, onde observamos uma redução de leucócitos de 38% nos animais AIRmax e 60% nos AIRmin com relação aos seus respectivos controles, tratados apenas com salina. A partir do segundo dia de tratamento os animais AIRmax e AIRmin apresentaram um aumento na celularidade alcançando ou mesmo superando os níveis basais (**Figura 21A**).

A análise diferencial de leucócitos nos mostrou que a partir das 24 horas do tratamento as células mononucleares sobem 34% enquanto os polimorfonucleares caem 78% nos animais AIRmax tratados em relação aos seus controles. Após esse período houve uma normalização desses tipos celulares. Já os camundongos AIRmin essa diferença foi observada mais

tardamente onde observou-se, aos 7 dias, uma queda de 44% das células mononucleadas enquanto os polimorfonucleares aumentaram em duas vezes nos AIRmin que receberam FN/HQ, sem uma recuperação durante o tempo analisado (**Figura 21 B e C**).

Em resumo, os camundongos AIRmax sofrem os efeitos do FN/HQ sobre as populações de PMN e MON nas fases iniciais pós tratamento enquanto que os AIRmin apresentam alterações significativas após 7 dias do tratamento.

Ao contrário dos leucócitos, o número de hemácias nos animais tratados com FN/HQ ou com salina permaneceu constante durante a cinética, sem qualquer diferença significativa intra ou interlinhagem (**Figura 22**).

Figura 21 - Cinética da concentração de leucócitos totais (A), células mononucleadas (B) e células polimorfonucleadas (C) do sangue durante 14 dias nos camundongos AIR tratados com com 75mg/kg de FN/HQ ou salina.

Os resultados estão expressos como a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais AIRmax (—■—) ou AIRmin (—▲—). # $p \leq 0,05$, diferença entre os animais não tratados, tempo 0, e os tratados com FN/HQ (—); * $p \leq 0,05$, diferença entre animais controles(----) e tratados com DMBA.

Figura 22 - Cinética da concentração de hemácias durante 14 dias nos camundongos AIR tratados com 75mg/Kg da associação de FN e HQ ou salina, controles. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ erro padrão de 8 animais AIRmax ou AIRmin.

4.3.3 Análise histológica da medula óssea

Os efeitos tóxicos produzidos pela associação de FN/HQ foram confirmados em preparações histológicas, coradas por hematoxilina e eosina (HE), dos ossos externos retirados após 24hs do tratamento. A análise revelou, nas duas linhagens tratadas com FN/HQ, uma ruptura da arquitetura normal do estroma da medula óssea, com redução acentuada na densidade celular e aparecimento de sinusóides dilatados, com grande quantidade de hemácias (**Figura 23**).

Figura 23. Cortes histológicos dos esternos de **AIRmax** e **AIRmin** tratados com salina (**A e B**) ou com F/H (Fenol/ Hidroquinona) (**C e D**)
As setas indicam dilatação dos sinusóides e hemorragia. Coloração por HE. Aumento de 100x.

4.3.4 Análise por citometria de fluxo das células da medula óssea dos camundongos **AIRmax** e **AIRmin** após 24hs do tratamento com **FN/HQ**

Verificamos neste experimento o comprometimento das populações de células linfóides e mielóides na medula óssea dos camundongos da linhagem AIR após 24 horas do final do tratamento com 75mg/kg da associação de fenol mais hidroquinona.

Consideramos para a análise as células viáveis (marcação negativa para PI-Iodeto de Propídio) da medula óssea selecionadas em duas populações, linfóides e mileóides, como no experimento com DMBA (**Figura 11**).

Na análise individual das populações linfóides e mielóides utilizamos os mesmos anticorpos específicos empregados nas células de camundongos tratados com DMBA. As células linfóides foram caracterizadas pelas marcações com IgM e CD45/B220 e as células mielóides com GR1 e CD11b.

Com relação à série linfóide, nesta análise encontramos três sub-populações de células B: os linfócito B maduros ($B220^{high}/IgM^{high}$), os imaturos ($B220^{low}/IgM^{high}$) e os linfócitos

pro/pré B ($B220^{low}/IgM^{-}$). Na **figura 24** mostramos os citogramas representativos de cinco animais por grupo experimental.

Figura 24 - Análise por citometria de fluxo de sub-populações de células linfóides da Medula Óssea. As células da medula óssea dos camundongos AIRmax ou AIRmin obtidas após 24hs do tratamento com FN/HQ estão representadas as subpopulações de células linfóides por linfócitos pro/pré B ($B220^{lo}/IgM^{-}$), célula B imaturas ($B220^{lo}/IgM^{hi}$) e célula B maduras ($B220^{hi}/IgM^{hi}$).

A porcentagem de células B e de suas formas de diferenciação presentes na medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin, após tratamento com FN/HQ estão representadas na **tabela 5**. Observamos um aumento significativo de 2 vezes de linfócitos B maduros nos camundongos AIRmin, enquanto os animais AIRmax tiveram um aumento de 2 vezes na população de linfócitos pré/pro B quando comparados aos respectivos controles.

Tabela 5 - Efeito do FN/HQ nas células da linhagem linfóide na medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin

	AIRmax (N=5)		AIRmin (N=5)	
	Salina	FN/HQ	Salina	FN/HQ
Células linfóides (B220⁺)	38,8±19,8 ^a	48,3±10,8	46,5±23,5	55,2±7,4
LB Maduro (B220^{hi}/IgM^{hi})	25,0±20,3	27,8±7,9	19,1±13,9 *	40,6±7,9
LB Imaturo (B220^{lo}/IgM^{hi})	9,2±5,8	9,6±4,8	14,1±8,6	7,3±3,2
LB pré/pro (B220^{lo}/IgM⁻)	4,6±2,9 *	10,9±3,8	13,4±10,3	7,2±2,9

^a valores expressos como média ± desvio padrão da média da porcentagem de células viáveis.

* diferença entre os animais tratados com FN/HQ ou somente com salina (p≤0,05)

Estão representados na **figura 25** citogramas da análise das células mielóides após 24hs de tratamento. Nesta figura mostramos dois tipos celulares predominantes: os neutrófilos, GR1^{lo-hi}/CD11b⁺, e os monócitos, GR1⁻/CD11b⁺ (LAGASSE e WEISSMAN, 1996).

Figura 25 - Análise por citometria de fluxo das populações de células mielóides. Citogramas representativos da marcação GR1 e CD11b das células da Medula Óssea de camundongos AIRmax ou AIRmin obtidas após 24hs do tratamento com FN e HQ.

A porcentagem de células mielóides após o tratamento com FN/HQ diminuiu em ambas as linhagens, quando comparada aos respectivos controles. Esta queda ocorreu principalmente na população de neutrófilos maduros, na ordem de 49 e 42% para AIRmax e AIRmin, respectivamente. A população monocítica não foi significativamente alterada com o tratamento (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Efeito do tratamento de FN/HQ sobre as populações de células mielóides da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin.

	AIRmax (N=5)		AIRmin (N=5)	
	Salina	FN/HQ	Salina	FN/HQ
células Mielóide (CD11b⁺)	65,7±6,0 [*]	43,6±13,3 ^a	61,5±26,5 [*]	38,2±10,8
Neutrófilos (GR1^{lo-hi}CD11b⁺)	60,0±6,4 [*]	30,6±14,3	57,1±12,3 [*]	33,0±22,7
Monócitos (GR1⁺CD11b⁺)	5,7±2,5	5,6±0,9	4,4±1,8	5,1±1,6
Outros (GR1⁺CD11b⁻)	4,0±4,4	18,7±17,2	22,2±27,2	47,2±15,5

^a valores expressos como média ± desvio padrão da média da porcentagem do número de células viáveis.

^{*} diferença entre os animais tratados com FN/HQ ou com salina (p≤0,05)

4.4 Analise do efeito do DMBA na expressão do RNA mensageiro dos genes *AHR*, *CYP1B1* e *CYP1A1*

O receptor aril hidrocarboneto (AHR) é um membro de uma grande superfamília de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (bHLB)-PAS, com a função de mediar, de forma intracelular, as vias sinalizadoras dos xenobióticos. As propriedades moleculares do AHR, como fator de transcrição, são amplamente estudadas e os resultados vêm elucidando o seu papel na expressão de vários genes da superfamília do citocromo P450, tais como CYP1A1 e CYP1B1. Estas enzimas, da família do citocromo P450, promovem a metabolização dos hidrocarbonetos aromáticos (BUTERS *et al.*, 1999; GALVAN *et al.*, 2003).

Devido a importância desses genes no processo de metabolização dos HPAs avaliamos a expressão do gene *Ahr* e dos genes da família P450, CYP1A1 e CYP1B1, sabidamente expressos em células da medula óssea do camundongo. Esta abordagem foi realizada por meio de PCR em tempo real (Q-PCR) em camundongos AIRmax e AIRmin tratados ou não com DMBA.

Os valores de expressão dos genes alvos são calculados a partir da fórmula, $\Delta\Delta cT = \Delta cT_{\text{gene}} (cT_{\text{alvo}} - cT_{\text{constitutivo}}) - \Delta cT_{\text{calibrador}} (cT_{\text{alvo}} - cT_{\text{constitutivo}})$ e expressos como $2^{-\Delta\Delta cT}$, que representam a variação da expressão gênica em relação a um único calibrador (LIVAK e SCHIMTTIGEN, 2001). Como calibrador utilizamos o valor do ΔcT dos animais AIRmin que não receberam tratamento algum.

Grupos de seis camundongos de cada linhagem, machos e fêmeas, foram tratados com 50mg/Kg de peso corpóreo de DMBA ou o volume equivalente de óleo de oliva por via intraperitoneal e após 12, 24 e 48 horas as células da medula óssea foram obtidas para extração de RNA. A partir do RNA total purificado, sintetizamos o cDNA por meio da reação de transcrição reversa, e adicionamos os *primers* específicos para amplificação da região de interesse do cDNA. Todos os experimentos de expressão gênica foram repetidos duas vezes.

Os níveis de expressão dos genes estudados a seguir em animais tratados com óleo e aqueles não tratados são equivalentes.

4.4.1 Expressão do RNA mensageiro do gene *Ahr*

No estudo de expressão do gene *Ahr* verificamos que, após 12 horas do tratamento com DMBA, há um aumento nos níveis de expressão gênica significativa, $p \leq 0,05$, apenas nos animais AIRmin em relação aos camundongos AIRmin tratados apenas com óleo de oliva (valores de 12 e 24 horas agrupados por apresentarem o mesmo nível de expressão). Às 24 horas do tratamento, observamos uma supressão de expressão deste gene na linhagem AIRmax, o que poderia contribuir para a baixa resposta destes animais aos efeitos supressores do DMBA na medula óssea (**Figura 26**).

Figura 26 - Efeito do DMBA na expressão do gene *Ahr* na medula óssea

Os camundongos AIRmax e AIRmin, de ambos os sexos, foram tratados com DMBA por 12 e 24 horas. Os valores foram normalizados pela expressão do mRNA da CYCLOFILINA e calibrados pela expressão dos animais AIRmin normais. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=9$). (a) diferença entre o animal tratado com DMBA e óleo; (b) diferença entre os animais AIRmax e AIRmin tratados com DMBA; (c) diferença entre os animais tratados com DMBA por 12 e 24 horas. $p \leq 0,05$.

4.4.2 Expressão do RNA mensageiro do gene *CYP1B1*

O citocromo CYP1B1 é fundamental para a formação de compostos tóxicos derivados dos xenobióticos que depletam as células da medula óssea e formam aductos no DNA (HEIDEL *et al.*, 2000; GALVAN *et al.*, 2003). Alguns trabalhos mostram aumento deste citocromo após o tratamento com DMBA em animais que possuem o alelo de alta afinidade para o AHR (GALVAN *et al.*, 2003; GALVAN *et al.*, 2006)

Os resultados apresentados na **figura 27** mostram um supressão da expressão de CYP1B1 às 12 horas após administração do DMBA, na linhagem AIRmax, comparando com os seu controle, animal tratado com óleo de oliva, $p \leq 0,05$. Porém a expressão nos AIRmin permaneceu inalterada.

Figura 27 - Efeito do DMBA na expressão do gene *CYP1B1* na medula

Os camundongos AIRmax e AIRmin, de ambos os sexos, foram tratados com DMBA por 12 e 24 horas. Os valores foram normalizados pela expressão do mRNA da CYCLOFILINA e calibrados pela expressão dos animais AIRmin normais. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=9). (a) diferença entre o animal tratado com DMBA e óleo; (b) diferença entre os animais AIRmax e AIRmin tratados com DMBA. $p \leq 0,05$.

4.4.3 Expressão do RNA mensageiro do gene *CYP1A1*

Um outro membro da família dos citocromos P450 importante no metabolismo dos xenobióticos é o CYP1A1. Esse citocromo é preferencialmente induzido quando há ativação do AHR (SHIMADA *et al.*, 2002).

Embora sua expressão seja predominante no fígado (SHIMADA *et al.*, 2003), verificamos que para este gene houve uma expressão aumentada na medula óssea dos camundongos AIRmin após 12 horas do tratamento com DMBA. Às 24 horas esta expressão foi significativamente diminuída, $p \leq 0,05$, voltando aos níveis constitutivos. Já nos camundongos AIRmax verificamos uma significante supressão deste gene após 24 horas do tratamento quando comparado com os animais tratados por 12 horas (Figura 28).

Figura 28 - Efeito do DMBA na expressão do gene *CYP1A1* na medula óssea

Os camundongos AIRmax e AIRmin, de ambos os sexos, foram tratados com DMBA por 12 e 24 horas. Os valores foram normalizados pela expressão do mRNA da CYCLOFILINA e calibrados pela expressão dos animais AIRmin normais. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=9$). (a) diferença entre o animal tratado com DMBA e óleo; (b) diferença entre os animais AIRmax e AIRmin tratados com DMBA; (c) diferença entre os animais tratados com DMBA por 12 e 24 horas. $p \leq 0,05$.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A exposição a níveis elevados de hidrocarbonetos aromáticos aumenta o risco de desenvolver leucemias, linfomas, tumores de ovário e de mama em animais experimentais e também em seres humanos (UEMATSU, 1981; BUTERS *et al.*, 1999; YOON *et al.*, 2002). Esta exposição, associada ao desenvolvimento de processos inflamatórios crônicos, compõe fator de risco relacionado às várias fases da carcinogênese, incluindo transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase (COUSSENS e WERB, 2002; MANTOVANE, 2005).

Linhagens de camundongos selecionados para a reatividade inflamatória aguda (AIR) apresentam diferenças quanto à sensibilidade em desenvolver tumores quimicamente induzidos pelo DMBA. Protocolo de carcinogênese de pele em dois estágios, DMBA/TPA, foi aplicado nestas linhagens e os resultados revelaram uma grande diferença na incidência e multiplicidade de lesões papilomatosas, sendo maior em animais selecionados para a baixa capacidade inflamatória aguda, AIRmin, do que em camundongos selecionados para a alta resposta, AIRmax (BIOZZI *et al.*, 1998). Além desta propriedade, este xenobiótico induz tumores em vários tecidos, particularmente com ação tóxica sobre as células da medula óssea e de outros órgãos hematopoiéticos. Estudos recentes demonstraram que o tratamento com DMBA reduz drasticamente ou não tem efeito sobre o número de células granulocíticas e de linfócitos B na medula óssea de linhagens congênicas de camundongos que expressam diferentemente os alelos do gene do receptor *Ahr* e dos genes das enzimas da família do citocromo P450 (HEIDEL *et al.*, 2000; GALVAN *et al.*, 2006).

Devido à ampla ação tóxica descrita dos hidrocarbonetos aromáticos e seus metabólitos sobre diversos tecidos e a grande diferença de sensibilidade dos camundongos selecionados a estes compostos, nos propomos, neste trabalho, estudar os efeitos do DMBA comparados aos dos metabólitos do benzeno, fenol e hidroquinona, sobre a celularidade de órgãos hematopoiéticos em AIRmax e AIRmin, bem como da atividade proliferativa de linfócitos esplênicos e de células da medula óssea. Estes dois protocolos diferem quanto às fases iniciais de metabolização, sendo que o DMBA para ser metabolizado por enzimas do citocromo P450, dentre outras, as quais são transcritas pela ligação deste xenobiótico e conseqüente ativação do receptor AHR. Portanto, o efeito tóxico do fenol e da hidroquinona associados na medula óssea necessita da ação das enzimas P450 ou da ligação ao AHR.

O estudo da resposta dos animais selecionados ao DMBA mostrou uma alta sensibilidade da linhagem AIRmin, com uma depleção acentuada da celularidade da medula

óssea, dose dependente, desde o início da avaliação (12 horas), perdurando por 14 dias. Este efeito refletiu-se na potencialidade de proliferação das células da medula óssea com consequência na circulação, caracterizada pela do número de leucócitos totais e com alteração da proporção de polimorfonucleares e mononucleares. Além do número, a funcionabilidade das células parece ter sido afetada pelo DMBA, uma vez que a migração para o sítio inflamatório produzido por injeção subcutânea de biogel foi sensivelmente prejudicada. Por outro lado, a diminuição de celularidade observada na medula óssea dos animais AIRmax após 48 horas do tratamento com DMBA não afetou funcionalmente as células, ao menos no que concerne à capacidade de proliferação frente ao fator hematopoiético GM-CSF.

Uma possível explicação para a diferença encontrada entre o número de células da medula óssea dos camundongos AIRmax tratados com óleo de oliva ou DMBA pode ser devido à ação do óleo como agente inflamatório, como constatado na análise da cavidade peritonial. Neste caso, o influxo de células ao local da injeção é maior e poderia ser a causa da diminuição da celularidade da medula óssea, independentemente da ação do DMBA.

A supressão do número de células totais da medula óssea dos camundongos AIRmin em decorrência do efeito do DMBA, atingiu preferencialmente a proporção de neutrófilos e de células B indiferenciadas. Por outro lado, observamos um aumento significativo da porcentagem de linfócitos B maduros. Este perfil celular observado nos camundongos AIRmin corroboram os obtidos por Galvan e colaboradores que utilizaram o DMBA como agente tóxico no estudo de toxicidade em camundongos C57Bl/6 responsivos (GALVAN *et al.*, 2006).

A toxicidade da medula óssea encontrada nos AIRmin pode ser explicada pelos efeitos dos metabólitos do DMBA que danificam as células estromais, alterando a produção de fatores reguladores de proliferação e de sobrevivência de progenitores de linfócitos, tais como TGF- β e TNF- α , levando estas células à apoptose via caspase 8 (LOTTEM *et al.*, 1996, PAGE *et al.*, 2004).

Além de causar depleção nas células da medula óssea, o tratamento dos camundongos com DMBA também afetou o baço diminuindo a celularidade e a capacidade proliferativa de linfócitos B e T em resposta aos mitógenos LPS e ConA, respectivamente. Os efeitos supressores de proliferação de células B foram observados unicamente na linhagem AIRmin. Por outro lado, o DMBA não discriminou as duas linhagens quanto aos efeitos sobre as células T, as quais sofreram diminuição de proliferação em níveis equivalentes nas duas linhagens. Estes resultados foram também descritos por autores em experimentos de proliferação por mitógenos de células T onde constataram o comprometimento destas células

sob a ação do DMBA, tanto em camundongos que apresentam AHR de alta, quanto os de baixa afinidade (THURMOND *et al.*, 1987; YAMAGUCHI *et al.*, 1997; GAO *et al.*, 2005; ALLAN *et al.*, 2006).

Essa diferença interlinhagens, quanto à sensibilidade ao DMBA, pode estar relacionada com a diferente capacidade em metabolizar esse xenobiótico. Foi demonstrado que o DMBA só se torna tóxico para o organismo após a sua biotransformação em metabólitos solúveis em água, como o DMBA-3,4-diol-1,2-epóxido, que pode se ligar covalentemente ao DNA formando aductos que pode levar as mutações e à transformação maligna ou, ainda, induzir apoptose, depletando-as. (NEBERT *et al.*, 1990; HEIDEL *et al.*, 2000; RUNDLE *et al.*, 2000; GALVAN *et al.*, 2003).

Ao contrário do observado na resposta ao DMBA, os camundongos AIRmax e AIRmin reagiram de maneira equivalente após serem submetidos aos efeitos tóxicos de metabólitos do benzeno, Fenol e Hidroquinona co-administrados. Ambas as linhagens apresentaram supressão da celularidade da medula óssea e da circulação, de maneira dose dependente. Embora tenha havido uma supressão importante, esta não foi perene, pois os animais de ambas as linhagens, recuperaram seus níveis normais de celularidade após 48 horas do tratamento. Muitos estudos relatam o papel destes metabólitos na indução de mielotoxicidade em linhagens de camundongos sensíveis ou resistentes ao benzeno, no entanto a maioria deles acompanhou estes efeitos por curtos períodos, de apenas 24 a 48 horas, não sendo relatado alguma recuperação do número de células devido à citotoxicidade. (EASTMOND *et al.*, 1987; YOON *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2006).

A supressão celular transitória da medula óssea afetou preferencialmente a população de neutrófilos, com diminuição significativa na porcentagem destas células observada nas duas linhagens. Este efeito na medula óssea foi observado após 24 horas em ratos *Wistar* tratados apenas com hidroquinona (MACEDO *et al.*, 2006).

Alguns estudos demonstram a importância da metabolização dos HA no processo de toxicidade em camundongos e em humanos. Neste sentido um estudo com células humanas e murinas evidenciaram a importância do AHR no metabolismo dos HA. Estudo com células B humanas tratadas com benzopireno ou dioxinas mostraram haver aumento de expressão do RNA mensageiro do *Ahr* bem como do receptor (ALLAN e SHERR, 2005). Foi demonstrado, também, que linfócitos de camundongos *knockout* para duas enzimas importantes no metabolismo do DMBA, CYP1B1 e mEH, não sofreram os efeitos do DMBA (GAO *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2007).

No nosso modelo, o nível de expressão de RNAm do *Ahr* e da *CYP1A1* esteve aumentado nas células da medula óssea dos camundongos AIRmin, às 12 horas após o tratamento, enquanto que nos animais AIRmax houve supressão destes genes e do *CYP1B1*. A supressão deste gene nos camundongos AIRmax pode ter sido um dos fatores que contribuiu para a baixa sensibilidade desta linhagem aos efeitos tóxicos do DMBA. Embora seja descrito que a *CYP1A1* tenha sua expressão preferencial no fígado (SHIMADA *et al.*, 2003; GALVÁN *et al.*, 2005), os níveis elevados da expressão deste gene encontrados nas células da medula óssea dos camundongos AIRmin sugere um papel de destaque na toxicidade celular desses animais. Portanto, a diferença de sensibilidade ao DMBA entre AIRmax e AIRmin pode estar relacionado com a diferente capacidade na biotransformação deste xenobiótico.

Um fator importante que deve ser considerado é o polimorfismo do gene *Ahr* em camundongos AIRmax e AIRmin. Recentemente, análise realizada em nosso laboratório demonstrou que essas linhagens apresentaram uma completa fixação dos alelos de baixa afinidade (*Ahr^{dl}*) em AIRmax e de alta afinidade (*Ahr^{bl}*) em AIRmin, no locus *Ahr*. Este polimorfismo do *Ahr* nas linhagens pode estar relacionado às características fenotípicas pelas quais elas foram geneticamente selecionadas, reação inflamatória aguda (AIR), uma vez que os alelos foram fixados diferentemente em AIRmax e AIRmin. De fato, estudo de co-segregação em populações de camundongos F2 extremos oriundos das linhagens AIR, F2max e F2min, revelou uma ligação genética entre o genótipo *Ahr* e a intensidade da reação inflamatória ao Biogel, candidatando este gene como participante do controle genético da intensidade da reação inflamatória aguda (¹).

O conjunto dos nossos resultados mostram que a diferença de sensibilidade das linhagens AIRmax e AIRmin ao DMBA se deve à potencial capacidade dos AIRmin em produzir as enzimas envolvidas na metabolização deste hidrocarboneto, principalmente a *CYP1A1*, nos períodos iniciais de toxicidade. Além disso, a expressão do gene *Ahr* também participa deste fenótipo de alta sensibilidade desta linhagem. Não podemos descartar o polimorfismo do receptor AHR que sabidamente determina, total ou parcialmente, a sensibilidade aos xenobióticos ligantes.

O processo de seleção genética nas linhagens AIRmax e AIRmin propiciou um aumento na frequência dos genes relacionados à máxima ou mínima reatividade inflamatória aguda, respectivamente, e esta característica tornou estes animais detentores de uma

¹ Souza V R C, São Paulo, 2006 (Comunicação pessoal)

complexidade genética particular reguladora da AIR. Assim, a capacidade inflamatória dos camundongos AIRmax e AIRmin pode estar relacionada, ao menos em parte, ao alelo de baixa e alta afinidade do *Ahr*, respectivamente. Portanto, este modelo abre perspectivas para novos estudos sobre os mecanismos envolvidos nas modificações dos componentes específicos e não específicos da imunidade decorrente do tratamento com DMBA. Este estudo poderá contribuir para o esclarecimento dos fatores genéticos envolvidos na regulação da AIR e da imunidade específica com influência na resistência ou susceptibilidade à carcinogênese induzida por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Os camundongos AIRmin são mais sensíveis aos efeitos supressores do DMBA do que os animais AIRmax no que concerne à diminuição da celularidade da medula óssea.
- A supressão da celularidade em AIRmin tratados com DMBA ocorre preferencialmente na população de células mielóides.
- As células mielóides dos animais AIRmin, quando estimuladas *in vitro* com GM-CSF, não apresentam proliferação ou diferenciação quando comparada com os animais tratados com o veículo.
- O efeito supressor do DMBA na proliferação das células B esplênicas foi observado somente nos camundongos AIRmin, enquanto que as células T foram afetadas em ambas as linhagens.
- Ambas as linhagens AIRmax e AIRmin são igualmente susceptíveis aos efeitos tóxicos do tratamento com FN/HQ associados, indicando o papel relevante da metabolização dos hidrocarbonetos aromáticos na determinação da susceptibilidade das linhagens a estes compostos.
- O polimorfismo do receptor AHR com conseqüente diminuição de expressão de enzimas do citocromo P450 pode contribuir para a maior resistência dos animais AIRmax aos efeitos tóxicos do DMBA.

6 CONCLUSÕES

- Os camundongos AIRmin são mais sensíveis aos efeitos supressores do DMBA do que os animais AIRmax no que concerne à diminuição da celularidade da medula óssea.
- A supressão da celularidade em AIRmin tratados com DMBA ocorre preferencialmente na população de células mielóides.
- As células mielóides dos animais AIRmin, quando estimuladas *in vitro* com GM-CSF, não apresentam proliferação ou diferenciação quando comparada com os animais tratados com o veículo.
- O efeito supressor do DMBA na proliferação das células B esplênicas foi observado somente nos camundongos AIRmin, enquanto que as células T foram afetadas em ambas as linhagens.
- Ambas as linhagens AIRmax e AIRmin são igualmente susceptíveis aos efeitos tóxicos do tratamento com FN/HQ associados, indicando o papel relevante da metabolização dos hidrocarbonetos aromáticos na determinação da susceptibilidade das linhagens a estes compostos.
- O polimorfismo do receptor AHR com conseqüente diminuição de expressão de enzimas do citocromo P450 pode contribuir para a maior resistência dos animais AIRmax aos efeitos tóxicos do DMBA.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, B. D.; PERDEW, G. H.; BUCKALEW, A. R.; BIRNBAUM, L. S. Interactive regulation of Ah and glucocorticoid receptors in the synergistic induction of cleft palate by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and hydrocortisone. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 128, n. 1, p. 138-50, 1994.

ABDELRAHIM, M.; SMITH, R. 3RD.; SAFE, S. Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells. **Mol Pharmacol.** v. 63, n. 6, p. 1373-81, 2003.

ALLAN, L. L.; SCHLEZINGER, J. J.; SHANSAB, M.; SHERR, D. H. CYP1A1 in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced B lymphocyte growth suppression **Bioch Bioph Res Comm**, v. 342, p. 227-235, 2006

ALLAN, L. L.; SHERR, D. H. Constitutive activation and environmental chemical induction of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor in activated human B lymphocytes. **Mol Pharmacol.** v. 67, n. 5, p.1740-50, 2005.

ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W. H. K.; MOUTON, D.; SEMAN, M; IBAÑEZ, O. M. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 2913-2920, 1998.

BALMAIN, A.; NAGASE, H. Câncer resistance genes in mice: models for study of tumor modifiers. **Trends Genetic.**,v. 14, p. 139-144, 1998.

BANGRAZI, C.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SARAN, A.; COVELLI, V.; DORIA, G; BIOZZI, G. Genetics of chemical carcinogenesis.1-Bidirectional selective breeding of susceptible and resistant lines of mice to two-stage skin carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 11, p. 1711-1719, 1990.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAUJO, L. M.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; SANT'ANNA, O. A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M; IBAÑEZ, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse, **Carcinogenesis**, v. 2, n. 13, p. 337-346, 1998.

BIRNBAUM, L. S.The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment. **Environ Health Perspect.**, v. 102, p. 157-67, 1994

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023:
AInformação e documentação: referências: elaboração. Rio de janeiro, 2002.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. 2006. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>;
<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>.

BOSTROM, C. E.; GERDE, P.; HANBERG, A.; JERNSTROM, B.; JOHANSSON, C.; KYRKLUND, T.; RANNUG, A.; TORNQVIST, M.; VICTORIN, K.; WESTERHOLM, R. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. **Environ Health Perspect.** V. 110, p. 451-88, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Norma de Vigilância da Saúde dos Trabalhadores expostos ao Benzeno.** Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BUTERS, J. T.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; SCHOBBER, W.; SOBALLA, V.J.; HINTERMAIR, J.; WOLFF, T.; GONZALEZ F.J.; GREIM H. CYP1B1 determines susceptibility to low doses of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovarian cancers in mice: correlation of CYP1B1-mediated DNA adducts with carcinogenicity, **Carcinogenesis**, v. 24, n. 2, p. 327-34, 2003.

BUTERS, J. T.; SAKAI, S.; RICHTER, T.; PINEAU, T.; ALEXANDER, D. L.; SAVAS, V.; DOEHMER, J.; WARD, J. M.; JEFCOATE, C. R.; GONZALEZ, F. T. Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lymphomas, **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 96, n. 5, p. 1977-82, 1999.

CHANG, C. Y.; PUGA, A. Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. **Mol Cell Biol.** v. 18, n. 1, 525-35, 1998.

CHENG, P. Y.; WANG, M.; MORGAN, E. T. Rapid transcriptional suppression of rat cytochrome P450 genes by endotoxin treatment and its inhibition by curcumin. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 307, n. 3, p. 1205-12, 2003.

COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; PASTIDES, H.; STARR, T.; MANDEL, J. S. Dioxin and cancer: a critical review. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 38, n. 3, p. 378-88, 2003.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature.** v. 420, p. 860-7, 2002.

CUNHA, G. R.; COOKE, P. S.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. **Arch Histol Cytol.**, v. 67, n. 5, p. 417-34, 2004.

CURRIER, N.; SOLOMON, S. E.; DEMICCO, E.G.; CHANG, D.L.; FARAGO, M.; YING, H.; DOMINGUEZ, I.; SONENSHEIN, G. E.; CARDIFF, R. D.; XIAO, Z. X.; SHERR, D.H. e SELDIN, D.C. Oncogenic signaling pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors. **Toxicol Pathol**, v. 33, n. 6, p. 726-37, 2005.

DEAN, J. H.; WARD, E. C.; MURRAY, M. J.; LAUER, L. D.; HOUSE, R. V. Mechanisms of dimethylbenzanthracene-induced immunotoxicity, **Clin Physiol Biochem**, v. 3, n. 2-3, p. 98-110, 1985.

DEAN, J. H.; WARD, E. C.; MURRAY, M. J.; LAUER, L. D.; HOUSE, R. V.; STILLMAN, W., HAMILTON, T. A.; ADAMS, D. O. Immunosuppression following 7,12-dimethylbenz[a]anthracene exposure in B6C3F1 mice--II. Altered cell-mediated immunity and tumor resistance..**Int J Immunopharmacol**, v. 8, n. 2, p.189-98, 1986.

DEISS, A. Doenças não-neoplásicas, agentes químicos e transtornos hematológicos que podem preceder as neoplasias hematológicas. In: LEE, G. R. et al. **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole. 1998. v. 2, pt. 6, cap. 74, p. 2143-2165.

DIPPLE, A.; KHAN, Q. A.; PAGE, J. E.; PONTEN, I.; SZELIGA, J. DNA reactions, mutagenic action and stealth properties of polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens **Int J Oncol**. v. 14, n. 1, p. 103-111, 1999.

DRAGANI, T. A; MANENTI, G.; PIEROTTU, A. M.. Genetics of murine lung tumors. **Adv.Cancer Res**. v. 67, p. 83-112, 1995.

DRAGANI, T. A e MANENTI, G. Mom 1 leads the pack, **Nat.Genet**, v. 17, p. 7-8, 1997.

EASTMOND, D. A.; SMITH, M. T.; IRONST, R. D. An interaction of Benzene Metabolites reproduces the myelotoxicity observed with Benzene exposure. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v. 91, p. 85-95, 1987.**Environ Health Perspect**. 1994 Nov;102 Suppl 9:157-67.

FAIOLA, B.; FULLER, E. S; WONG, V. A.; PLUTA, L., ABERNETHY, D. J.; ROSE, J.; RECIO, L.; Exposure of hematopoietic stem cells to benzene or 1,4-benzoquinone induces gender-specific gene expression. **Stem Cells**, v. 22, n. 5,p. 750-8, 2004.

GALVAN N.; PAGE T. J.; CZUPRYNSKI C. J.; JEFEOATE C. R. Benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene differentially affect bone marrow cells of the lymphoid and myeloid lineages. **Toxicol Appl Pharmacol**., v. 213, n. 2, p. 105-16, 2006.

GALVÁN, N.; JASKULA-SZTUL, R.; MACWILLIAMS, P. S.; CZUPRYNSKI, C. J.; JEFEOATE, C. R. Bone marrow cytotoxicity of benzo(a)pyrene is dependent on CYP1B1 but is diminished by Ah receptor-mediated induction of CYP1A1 in liver. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 193, p. 84-96, 2003.

GALVAN, N.; TESKE, D. E.; ZHOU, G.; MOORTHY, B.; MACWILLIAMS, P. S.; CZUPRYNSKI, C. J.; JEFEOATE, C. R. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in liver and lung by benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene do not affect distribution of

polycyclic hydrocarbon to target tissue: role of AhR and CYP1B1 in bone marrow cytotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 202, p. 244-257, 2005.

GAO, J.; LAUER, F. T.; DUNAWAY, W.; BURCHIEL, S. W. Cytochrome P450 1B1 Is Required for 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA) Induced Spleen Cell Immunotoxicity. **Toxicol Sciences**, v. 86, p. 68-74, 2005.

GAO, J.; LAUER, F. T.; MITCHELL, L. A.; BURCHIEL, S. W. Microsomal epoxide hydrolase is required for 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced immunotoxicity in mice. **Toxicol Sci**. v. 98, n. 1, p.137-44, 2006.

GIONO, L. E.; MANFREDI, J. J. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. **J Cell Physiol**. v. 209, n. 1, p.13-20, 2006.

GOLDSTEIN, B. D. Haematopoietic and Lymphatic System. In: INTERNATIONAL LABOUR OFFICE (ILO) (4 Ed.). **Encyclopaedia of occupational health and safety**. Geneva: ILO, 1998. v. 1, pt. 1, cap. 1., p. 1.2.-1.9.

HAHN, M. E.; KARCHNER, S. I.; SHAPIRO, M. A.; PERERA, S. A. Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 94, n. 25, p.13743-81, 1997.

HANKINSON, O. The aryl hydrocarbon receptor complex. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** , v. 35, p. 307-40, 1995.

HARDIN, J. A.; HINOSHITA, F.; SHERR, D. H. Mechanisms by which benzo[a]pyrene, an environmental carcinogen, suppresses B cell lymphopoiesis. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 117, n. 2, p. 155-64, 1992.

HASEL K. W.; SUTCLIFFE J. G. Nucleotide sequence of a cDNA coding for mouse cyclophilin. **Nucleic Acids Res**. v. 18, n. 13, p. 4019, 1990.

HAYASHIBARA T, YAMADA Y, MORI N, HARASAWA H, SUGAHARA K, MIYANISHI T, KAMIHIRA S, TOMONAGA M. Possible involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: constitutive activation of AhR in ATL. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 300, n. 1, p.128-34, 2003.

HEIDEL, S. M.; HOLSTON, K.; BUTERS, J. T.; GONZALEZ, F.J., JEFEOATE, C. R.; CZUPRYNSKI, C. J. Bone marrow stromal cell cytochrome P4501B1 is required for pre-B cell apoptosis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. **Mol Pharmacol.** v. 56, n. 6, p. 1317-23, 1999.

HEIDEL, S. M.; MACWILLIANS, P. S.; BAIRD, W. M.; DASHWOOD, W. M.; BUTERS, J. T. M.; GONZALEZ, F. J.; LARSEN, M. C.; CZUPRYNSKI, C. J.; JEFEOATE, C. R. Cytochrome P4501B1 mediates induction of bone marrow cytotoxicity and preleukemia cells in mice treated with 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene. **Cancer Research**, v. 60, p. 3454-3460, 2000.

HELPERICH, W. G.; DENISON, M. S. Ultraviolet photoproducts of tryptophan can act as dioxin agonists. **Mol Pharmacol.**, v. 40, n. 5, p. 674-8, 1991.

IBAÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, H. K.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; SANT'ANNA, O. A.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D. SIQUEIRA, M. e BIOZZI, G. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional Selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 2555-2563, 1992.

IRONS, R. D. Quinones as toxic metabolites of benzene. **J Toxicol. Environ. Health.**, v. 16, n. 5, p. 673-8; 1985. **Mol Cell Biol.**, v. 18, n. 1, p. 525-351, 1998.

IRONS, R. D.; GREENLEE, W. F.; WIERDA, D.; BUSS, J. S. Relationship between benzene metabolism and toxicity: a proposed mechanism for the formation of reactive intermediates from polyphenol metabolites. **Adv Exp Med Biol.**, v. 136, p. 229-43, 1981.

JAMRA, M; LORENZI, T. F. Sistema Hematopoiético. In: PORTO, C. C. *Semiologia Médica*. 3 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1997. p. 763-787

KAWABATA, T. T.; WHITE, K. L. JR. Suppression of the vitro humoral immune response of mouse splenocytes by benzo(a)pyrene metabolites and inhibition of benzo(a)pyrene-induced immunosuppression by alpha-naphthoflavone. **Cancer Res.** v. 47, n. 9, p. 2317-22, 1987.

KERKVLIT, N. I.; BRAUNER, J. A. Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations in the spleen and thymus of mice exposed to an acute immunosuppressive dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). **Environ Res.** v. 52, n. 2, p.146-541, 1990.

KNAAPEN, A. M.; CURFS, D. M.; PACHEN, D. M.; GOTTSCHALK, R. W.; DE WINTHER, M. P.; DAEMEN, M. J.; VAN SCHOOTEN, F. J. The environmental carcinogen benzo[a]pyrene induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in vascular tissue: a possible role in atherogenesis. **Mutat Res.**, 2007.

LADICS, G. S.; KAWABATA T. T.; WHITE, K. L. JR. Suppression of the in vitro humoral immune response of mouse splenocytes by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene metabolites and inhibition of immunosuppression by alpha-naphthoflavone. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 110, n. 1, 31-44, 1991.

LAGASSE, E.; WEISSMAN, I. L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocyte. **J.Immunol. Methods**, v. 197, p. 139-150, 1996.

LEVINE-FRIDMAN, A.; CHEN, L.; ELFERINK, C. J. Cytochrome P4501A1 promotes G1 phase cell cycle progression by controlling aryl hydrocarbon receptor activity. **Mol Pharmacol**. v. 65, n. 2, p. 461-9, 2004.

LIVAK, K. L.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOTEM, J.; SACHS, L.. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. **Leukemia**. v. 10, n. 6, p. 925-31, 1996.

LUSTER, M. I.; ROSENTHAL, G. J. Chemical agents and the immune response. **Environ Health Perspect**. v. 100, p. 219-26, 1993.

MACEDO, S. M.; LOURENCO, E. L.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; FERREIRA, J. M. JR.; FARSKY, S. H. Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. **Toxicology**., v. 220, n. 2-3, p. 126-35, 2006.

MANTOVANI, A. Cancer: inflammation by remote control. **Nature**. p. 435, p. 752-3, 2005.

MARCUS, R. S.; HOLSAPPLE, M. P.; KAMINSKI, N. E. Lipopolysaccharide activation of murine splenocytes and splenic B cells increased the expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 287, n. 3, p. 1113-8, 1998.

MARIA, D. A.; MANENTI, G.; GALBIATI, F.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H. K.; BARRERA, R. G.; PETTINICHIO, A.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA, M.; DRAGANI, T.; IBÁÑEZ, O. M.; Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammation response. **Oncogene**, v. 22, p. 426-432, 2003

MARIA, D.A.; RIBEIRO, O.G.; PIZZOCARO, K.; DE FRANCO, M., CABRERA, W.K., STAROBINAS, N.; GALLOIS, V.; SIQUEIRA, M.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M. Resistance to melanoma metastases in mice selected for high acute inflammatory response. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 337- 42, 2001.

MARLOWE, J. L.; PUGA, A. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. **J Cell Biochem.**, v. 96, n. 6, p. 1174-84, 2005.

MARTINS, I.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Exposição ocupacional ao benzeno: aspectos toxicológicos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 15, n. 1, p. 43-51, 2002.

MATSUOKA, A.; MATSUURA, K.; SAKAMOTO, H.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. Spindle disturbances induced by benzo[a]pyrene and 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene in a Chinese hamster cell line (V79-MZ) and the stability of the numerical chromosome aberrations that follow. **Mutat Res.** v. 419, n. 1-3, p. 1-12, 1998.

MOREL, Y.; BAROUKI, R. Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress: Critical contribution of nuclear factor 1. **J Biol Chem.**, v. 273, n. 41, p. 26969-76, 1998.

MORGAN, E. T. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. **Drug Metab Rev.** v. 29, n. 4, p. 1129-88, 1997

NEBERT, D. W.; PETERSEN, D. D.; FORNACE, A. J. Cellular responses to oxidative stress: the [Ah] gene battery as a paradigm. **Env Health Persp**, v. 88, p. 13-25, 1990.

OSHIMURA, M.; BARRETT, J. C. Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer. **Environ Mutagen.**, v. 8, n. 1, p. 129-59.

PAGE, T. J.; MACWILLIAMS, P. S.; SURESH, M.; JEFEOATE, C. R.; CZUPRYNSKI, C. J. 7-12 Dimethylbenz[a]anthracene-induced bone marrow hypocellularity is dependent on signaling through both the TNFR and PKR. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 198, n. 1, p. 21-8, 2004.

PAGE, T. J.; O'BRIEN, S.; HOLSTON, K.; MACWILLIAMS, P. S.; JEFEOATE, C. R.; CZUPRYNSKI, C. J. 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-induced bone marrow toxicity is p53-dependent. **Toxicol. Sci.** v. 74, n. 1, p. 85-92, 2002.

PAUSTENBACH, D. J. The U.S. EPA Science Advisory Board Evaluation of the EPA dioxin reassessment. **Regul Toxicol Pharmacol.**, v. 36, n. 2, p. 211-9.

PERDEW, G. H.; BABBS, C. F. Production of Ah receptor ligands in rat fecal suspensions containing tryptophan or indole-3-carbinol. **Nutr Cancer**, v.16, n. 3-4, p. 209-18, 1991.

PETERS, J. M.; WILEY, L. M. Evidence that murine preimplantation embryos express aryl hydrocarbon receptor. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.134, n. 2, p. 214-21, 1995.

QING, W. G.; CONTI, C. J.; LABATE, M.; JOHNSTON, D.; SLAGA, T. J.; D MACLEOD, M. C. Induction of mammary cancer and lymphoma by multiple, low oral doses of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in SENCAR mice. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 553–559, 1997.

RADMAN, M.; JEGGO, P.; WAGNER, R. Chromosomal rearrangement and carcinogenesis. **Mutat Res.**, v. 98, n. 3, p. 249-64, 1982.

RENTON, K. W. Regulation of drug metabolism and disposition during inflammation and infection. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 1, n. 4, p. 629-40, 2005.

RIBEIRO FILHO, O. G. Controle Genético da Inflamação, 1994. Dissertação (**Mestrado**) Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1994.

RIBEIRO, O. G.; MARIA, D. A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W. H.; MORISSET, J.; IBAÑEZ, O. M; SEMAN, M. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, n. 4, p. 497-506, 2003.

ROSS, D. The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: evidence and issues. **J Toxicol Environ Health A**, v. 61, n. 5-6, p. 357-72, 2000.

RUIZ, M. A.; VASSALO, J.; SOUZA, C. A. Alterações hematológicas em pacientes expostos cronicamente ao benzeno. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 2, p.145-151, 1993.

RUNDLE, A.; TANG, D.; HIBSHOOSH, H.; ESTABROOK, A.; SCHNABEL, F.; CAO, W.; GRUMET, S.; PERERA, F. P. The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1281–9, 2000.

SCHMIDT, J. V.; CARVER, L.A.; BRADFIELD, C. A. Molecular characterization of the murine Ahr gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. **J Biol Chem** , v. 268, p. 22203-9, 1993.

SEIDEL, S. D.; WINTERS, G. M.; ROGERS, W. J.; ZICCARDI, M. H.; LI, V.; KESER, B. DENISON MS. Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. **J Biochem Mol Toxicol.**, v. 15, n. 4, p.187-96, 2001.

SHIMADA, T.; SUGIE, A.; SHINDO, A.; NAKAJIMA, T.; AZUMA, E.; HASHIMOTO, M.; INOUE, K. Tissue-specific induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in engineered C57BL/6J mice of arylhydrocarbon receptor gene. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 187, n. 1, 1-10, 2003.

SILBERGELD, E. K.; GASIEWICZ, T. A Dioxins and the Ah receptor. **Am J Ind Med.**, v. 16, n. 4, p. 455-74, 1989.

SILVA, A.C.M. Estudo comparativo entre os efeitos imunoadjuvantes e inflamatórios dos óleos de oliva, milho e soja, Fortaleza-CE. Tese (**Doutorado**). Universidade Federal do Ceará, Pernambuco, 2004.

SLAGA, T. J. Overview of tumor promotion in animals. **Environ Health Perspect**, v. 50, p. 3-14, 1983.

STELLMAN, S. D.; MUSCAT, J. E.; THOMPSON, S.; HOFFMANN, D.; WYNDER, E. L. Risk of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung in relation to lifetime filter cigarette smoking.. **Cancer.**, v. 80, n. 3, p. 382-8.

STIFFEL, C.; IBÁÑEZ, O. M.; RIBEIRO, O. G.; DECREUSEFOND, C; MOPUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of acute inflammation: Inflammatory reactions in inbred lines of mice and their interline crosses. **Experimental and Clinical Immunogenetics**, v. 7, p. 221-233, 1990.

TARA, E.; PATON T. A.; RENTON, K. W. Cytokine-mediated down-regulation of CYP1A1 in Hepa1 cells. **Bioch. Pharmacol.** v. 55, p. 1791-1796, 1998.

THATCHER, T. H.; MAGGIRWAR, S. B.; BAGLOLE, C. J.; LAKATOS, H. F.; GASIEWICZ, T. A.; PHIPPS, R. P.; SIME, P. J. Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice develop heightened inflammatory responses to cigarette smoke and endotoxin associated with rapid loss of the nuclear factor-kappaB component RelB. **Am J Pathol.** v. 170, n. 3, p. 855-64, 2007.

THOMAS, R. S.; PEN, S. G.; NELDEN, K.; BRADFIELD, C. A; RANK, D. R. Sequence variation na phylogenic history of the mouse Ahr gene. **Pharmacogenetics**, v. 12, p.151-163, 2002.

THURMOND, L. M.; LAUER, L. D.; HOUSE, R. V.; COOK, J. C.; DEAN, J. H. Immunosuppression following Exposure to 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in Ah-Responsive and Ah-Nonresponsive Mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 91, p. 450-460, 1987.

TIAN, Y.; RABSON, A. B.; GALLO, M. A. Ah receptor and NF-kappaB Interactions: Mechanisms and physiological implications. **Chem Biol Interact.**, v. 141, n. 1-2, p. 97-115, 2002.

TROMBINO, A. F.; NEAR, R. I.; MATULKA, R. A.; YANG, S.; HAFFER, L. J.; TOSELLI, P. A.; KIM, D. W.; ROGERS, A. E.; SONENSHEIN, G. E.; SHERR, D. H. Expression of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor (AhR) and AhR-regulated CYP1 gene transcripts in a rat model of mammary tumorigenesis. **Breast Cancer Res Treat.** v. 63, n. 2, p.117-31, 2000.

UEMATSU, K. Early changes of hematopoietic tissues in mice treated with intravenous pulse-doses of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. **Acata Pathol. Jpn**, v. 31, n. 5, p. 799-814, 1981.

UMEMOTO, A.; KOMAKI, K.; MONDEN, Y.; SUWA, M.; KANNO, Y.; KITAGAWA, M.; SUZUKI, M.; LIN, C. X.; UEYAMA, Y.; MOMEN, M. A.; RAVINDERNATH, A.; SHIBUTANI, S. Identification and quantification of tamoxifen-DNA adducts in the liver of rats and mice. **Chem Res Toxicol.** v. 14, n. 8, p. 1006-13 2001.

VIGAR, N. D.; CABRERA, W. H. K.; ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; OGATA, T. R. P.; SIQUEIRA, M.; IBÁÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, p. 431-437, 2000.

VRZAL, R.; ULRICHOVA, J.; DVORAK, Z. Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 148, n. 1, p. 3-10, 2004.

WARD, E. C.; MURRAY, M. J.; LAUER, L. D.; HOUSE, R. V.; IRONS, R.; DEAN, J. H. Immunosuppression following 7,12-dimethylbenz[a]anthracene exposure in B6C3F1 mice. I. Effects on humoral immunity and host resistance. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 75, n. 2, 299-308, 1984.

WU, Y.; BARNABAS, N.; RUSSO, I. H.; YANG, X.; RUSSO, J. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in chromosomes 9 and 16 in human breast epithelial cells transformed by chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 5, p. 1069-74, 1997.

YAMAGUCHI, K.; MATULKA, R A; SHNEIDER, A. M; TOSELLI, P.; TROMBINO, A. F; YANG, S.; HAFFER, L. J; MANN, K. K; TAO, X. J; TILLY, J. L; NEAR, R. I.; SHERR, D. H. Induction of PreB cell apoptosis by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in long-term primary murine bone marrow cultures. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 147, n. 2, p.190-203, 1997.

YANG, F.; BLEICH, D. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 gene in pancreatic beta-cells. **J Biol Chem.** v. 279, n. 34, p. 35403-11, 2004.

YOON, B.; HIRABAYASHI, Y.; KAWASAKI, Y.; KODAMA, Y.; KANNEKO, T.; KANNO, J.; KIM, D.Y.; FUJII-KURIYAMA, Y; INOUE, T. Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 70, p. 150-156, 2002.

YOUNG, N. S. Acquired aplastic anemia. **Ann Intern Med**, v. 136, n. 7, p. 534-46, 2002.

YU, Z.; LOEHR, C. V.; FISCHER, K. A.; LOUDERBACK, M. A.; KRUEGER, S. K.; DASHWOOD, R. H.; KERKVLIT, N. I.; PEREIRA, C. B.; JENNINGS-GEE, J. E.; DANCE, S. T.; MILLER, M. S.; BAILEY, G. S.; WILLIAMS, D. E. In utero exposure of mice to dibenzo[a,l]pyrene produces lymphoma in the offspring: role of the aryl hydrocarbon receptor. **Cancer Res.**, v. 66, n. 2, p. 755-62, 2006.