INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DE CADEIAS INFLAMATÓRIAS E DA SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE CXCL12 NA HEMATOPOIESE DE MODELOS EXPERIMENTAIS EXPOSTOS A DOSES LETAIS OU SUBLETAIS DE RADIAÇÃO GAMA.

DANIEL PEREZ VIEIRA

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.

São Paulo

2007

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, Heitor e Elizabeth, por sempre terem se dedicado de todas as formas possíveis para que este trabalho fosse realizado, porque sabiam da importância dele para mim e acreditaram, por vezes mais do que eu, que ele era possível. Muito obrigado, pai e mãe. Graças a vocês eu posso escrever estas linhas neste momento.

Ao Heitor, por ter me ensinado, mesmo com a minha resistência e teimosia, o que é fazer ciência de verdade. Espero um dia ter ao menos uma parte de sua sabedoria.

À D. Fran, que sempre foi um exemplo de perseverança e vontade. Espero um dia ter ao menos uma parcela da sua coragem.

Ao Luciano, por ter me ensinado o que é trabalhar com seriedade. Espero um dia ter ao menos um pouco de sua força.

Ao Andrés, que me acompanha desde a faculdade e por quase todas as disciplinas da pós-graduação, e sempre me ajudou em tudo que precisei, além de ter ensinado que devemos ter confiança no próprio trabalho.

Ao Franco, por ter proporcionado a descontração necessária à manutenção da seriedade, e a ter me ensinado a não me importar com qualquer pequenez que encontramos na vida.

Aos meus amigos de longa data, Carlos, Antônio, Marcus e Gisele, que me ajudaram muito a manter a sanidade durante a redação deste trabalho. Espero um dia poder retribuir na mesma medida.

AGRADECIMENTOS

À Roselaine Pereira Alvim Cardoso e à Solange Fernandes Monteiro dos Santos por prestarem ajuda sempre indispensável, tanto na bancada quanto na escrivania.

Aos Drs. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto e André Tempone Gustavo Cardoso por terem me dado as noções iniciais sobre o que é efetivamente uma tese de doutorado, bem como do esforço necessário para que ela se concretize.

Ao Prof. Dr. Claudio Sergio Panutti pelo apoio recebido desde os tempos de minha iniciação científica.

À Prof^a Dr^a Nanci do Nascimento pela generosidade ao receber-me no Centro de Biologia Molecular/IPEN.

Ao Dr. Patrick Jack Spencer, pela inesgotável fertilidade de idéias e pelo companheirismo singular.

À Dr^a Ligia Ely Morganti Ferreira Dias por ajuda inestimável nas primeiras fases deste projeto.

À Dr^a Eufrosina Setsu Umezawa pelo empréstimo de muitos equipamentos utilizados neste trabalho.

Aos engenheiros Carlos G. da Silveira e Elizabeth S.R. Somessari pela preciosa ajuda técnica recebida por mim durante as irradiações e pela generosidade ao receber-me nas instalações do Centro de Tecnologia das Radiações/IPEN.

A todos os funcionários e estudantes que conheci nestes anos no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela

colaboração e principalmente pela compreensão que recebi nesses anos de estudo.

A todos os funcionários e estudantes do Centro de Biologia Molecular/IPEN pela recepção sempre simpática e amigável que sempre recebi.

A todos os funcionários e estudantes do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela compreensão ao ceder a estrutura do seu laboratório, ajuda sem a qual este trabalho não estaria terminado.

À Comissão de Pós-Graduação do IPEN pelo auxílio sempre prestado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao LIMHCFMUSP49 e à Divisão de Radiobiologia / IPEN pelo suporte ao trabalho.

SE

Rudyard Kipling

Se és capaz de manter tua calma, quando todo mundo ao redor
já a perdeu e te culpa.
De crer em ti quando todos duvidam, e para esses, no entanto,
achar uma desculpa.
Se és capaz de esperar sem te desesperares, e enganado, não
mentir ao mentiroso.
Ou, sendo odiado, ao ódio te esquivares, e não ser bom demais
nem pretensioso.
Se és capaz de pensar, sem que a isso só te atires, e de sonhar,
sem fazer dos sonhos teus senhores.
Se, encontrando a Desgraça e o Triunfo, tratar da mesma forma
a esses dois impostores.
Se és capaz de sofrer a dor de ver transformadas em armadilhas
as verdades que disseste.
E estraçalhadas as coisas por que deste a vida, e refazê-las com
o bem pouco que te resta.
Se és capaz de arriscar numa única parada tudo quanto
ganhaste em toda tua vida.
E perder e, ao perder, resignado e sem dizer nada, recomeçar
do início
De forçar coração, nervos, músculos, tudo, e dar seja o que for
que neles ainda existe.
E persistir quando, exausto, ainda te resta a vontade que te
ordena: Persiste!
Se és capaz de, entre a plebe não te corromperes, e entre reis
não perder a naturalidade.
E de amigos, bons ou maus, te defenderes, e a ambos poder ser
de alguma utilidade.
Se és capaz de dar, segundo por segundo, ao minuto fatal todo
valor e brilho.
Tua é a terra com tudo que nela existe, e – o que é muito mais
– és um Homem, meu filho!

RESUMO

Avaliação dos efeitos da inibição de cadeias inflamatórias e da suplementação exógena de CXCL12 na hematopoiese de modelos experimentais expostos a doses letais ou subletais de radiação gama.

Daniel Perez Vieira

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inibição das cadeias inflamatórias reguladas pela ação do interferon-gama (IFN- γ) e da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) no dano radioinduzido após exposição a dose letal (8 Gy) ou moderada a severa (4 Gy) nos tecidos hematopoiéticos (baço e medula) de modelos experimentais irradiados nestas doses. Grupos de camundongos isogênicos C57Bl/6j foram expostos à radiação correspondente a 4 ou 8 Gy em exposições de corpo inteiro em fonte panorâmica de ^{60}Co . Da mesma forma, foram irradiados camundongos cuja expressão de IFN- γ ou iNOS é ausente ou indetectável. Outros grupos receberam via oral por toda a duração do experimento um inibidor atividade de iNOS, aminoguanidina, ou via intraperitoneal uma quimiocina primordial promotora da hematopoiese, CXCL12, até o quarto dia após a exposição. Outra divisão experimental recebeu os dois agentes concomitantemente. Os animais foram sacrificados nos dias 2º, 4º e 8º após a irradiação, e fragmentos dos baços e fêmures foram preservados para histologia. Os esplenócitos e células não aderentes da medula óssea femoral foram removidos e divididos, fornecendo alíquotas para posterior RT-PCR e suspensões celulares apropriadas para ensaios de citometria de fluxo específicos para a detecção da frequência de populações CD34⁺. Nestes mesmos dias de experimento, alíquotas de sangue caudal foram coletadas para contagem de hemácias e plaquetas periféricas. Os resultados mostraram que a ausência da produção de interferon-gama no local irradiado aumenta a sobrevivência e a quantidade de células progenitoras hematopoiéticas e que a ausência de iNOS ou seu bloqueio funcional diminuem a extensão do dano radioinduzido nos tecidos hematopoiéticos. Além disso, foi possível observar que a suplementação com CXCL12 sintética aumenta a frequência do fenótipo CD34⁺ nos baços dos modelos testados, e que seu efeito parece antagonizar com a inibição da produção de NO pela aminoguanidina.

P.chave: radiação ionizante; medula óssea; óxido nítrico; aminoguanidina

ABSTRACT

Assessment of the effects of inhibition of inflammatory cascades and exogenous supplementation of CXCL12 in hematopoiesis of experimental models exposed to sublethal and lethal doses of gamma radiation.

Daniel Perez Vieira

This study aimed to evaluate the effect of inhibition of the inflammatory chains governed by the action of interferon-gamma (IFN- γ) and the enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) in damage after radiation exposure to lethal dose (8 Gy) or moderate /severe dose (4 Gy) in hematopoietic tissues (spleen and bone marrow) of experimental models irradiated at these doses. Groups of isogenic C57Bl/6j mice were exposed to radiation (4 or 8 Gy) in whole-body exposures in a ^{60}Co panoramic source. Similarly, were irradiated mice whose iNOS or IFN- γ expression was absent or undetectable. Other groups received orally in all days of experiments an inhibitor of iNOS activity, aminoguanidine, or CXCL12, a primordial chemokine known as an hematopoiesis promoter intraperitoneally by days 0 to 4th after radiation events. Another groups received the two agents concomitantly. The animals were sacrificed on days 2nd, 4th and 8th after irradiation, and fragments of the spleens and femurs were preserved for histology. Splenocytes and non-adherent cells from femoral bone marrow were removed and divided, providing aliquots for subsequent RT-PCR and cell suspensions suitable for flow cytometry experiments specific to the detection of the frequency of CD34⁺ cell populations. In same days of experiment, tail blood samples were collected for counting of peripheral red blood cells and platelets. The results showed that the absence of the production of interferon-gamma at the irradiated sites increases the survival and the amount of hematopoietic progenitor cells and that the absence of iNOS or its functional blockade reduces the extent of radioinduced damage in tested hematopoietic tissues. Furthermore, it was possible to observe that supplementing with synthetic CXCL12 increases the frequency of CD34⁺ phenotype in the spleens of tested models, and that its effect seems to antagonize the inhibition of the production of NO by aminoguanidine.

Keywords: ionizing radiation, bone marrow, nitric oxide, aminoguanidine

SUMÁRIO

	Página
1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	4
2.1 Geral	4
2.2 Especificamente	4
3.ESTADO DA ARTE	5
3.1 Radiação Ionizante	5
3.2 Células-mãe Hematopoiéticas	7
3.3 Regulação da Hematopoiese	7
3.4 SDF-1	8
3.5 CXCR4	10
3.6 Efeitos Inflamatórios Após a Exposição à Radiação	11
4.MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Modelo Experimental de Exposição à Radiação Ionizante	12
4.2 Divisão Experimental dos Grupos Irradiados	14
4.3 Contagem de Hemácias e Plaquetas do Sangue Periférico	14
4.4 Histologia Convencional (Hematoxilina - Eosina)	15
4.5 RT-PCR Semi-Quantitativa Específica para CXCL12 Murina	15
4.6 Citometria de Fluxo para Detecção de Fenótipo CD34 ⁺	18
5.RESULTADOS	20
5.1 Dano Hematopoiético Pós-Irradiação em Camundongos	20
5.2 Dano Hematopoiético Pós-Irradiação em Animais Deficientes em IFN- γ (IFN- γ ^{-/-})	28
5.3 Dano hematopoiético pós-irradiação em animais deficientes em iNOS (iNOS ^{-/-})	32
5.4 Dano hematopoiético pós-irradiação em animais tratados com aminoguanidina (AG).	38
5.5 Dano hematopoiético pós-irradiação em animais tratados com CXCL12	45
5.6 Dano hematopoiético pós-irradiação em animais tratados com CXCL12 e Aminoguanidina	49
6.DISSCUSSÃO	53
7.CONCLUSÕES	67
7.1 Geral	67
7.2 Especificamente	67
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	
Anexo I: Certificado da aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo	

ANEXO II: SBI 2004
ANEXO III: INAC 2005
ANEXO IV: INAC 2007 1
ANEXO V: INAC 2007 2
ANEXO VI: INAC 2007 3

1. INTRODUÇÃO

A exposição à radiação ionizante induz diversas alterações nos sistemas biológicos, atingindo as várias macromoléculas biológicas, que apresentam diferentes impactos em cada tipo de célula atingida (RADFORD, 1994). Em animais unicelulares, o efeito é facilmente identificável, mas num organismo animal com múltiplos grupos celulares, a sobrevivência depende da conservação das populações celulares mais radio-sensíveis após a exposição a uma fonte radioativa (UNSCEAR, 1993). Assim, em acidentes nucleares com grandes exposições, como em Chernobyl, na Ucrânia em 1986, a morte dos pacientes ocorre principalmente por falha hematológica, pois um dos grupos celulares mais sensíveis à radiação é o formador do sangue ou hematopoiético, na medula óssea (CHAMPLIN *et al.*, 1988).

Após exposição de sistemas celulares à radiação ionizante, são afetadas as células em mais alta taxa de divisão celular, como as hematopoiéticas, com indução de morte por apoptose, no momento da mitose, induzida por quebras duplas cromossômicas e efeitos clastogênicos nas células filhas (JONATHAN *et al.*, 1999). A intensa morte celular leva a uma agressão paralela às células em repouso, menos afetadas pela radiação, mas indiretamente atingidas pela migração de macrófagos e monócitos, atraídos pelos restos necróticos. Estas células de defesa inespecífica induzem a morte celular em células-mãe, não afetadas pela radiação, por mediadores celulares (JONES *et al.*, 1996). O mecanismo desencadeado foi desenvolvido para eventos restritos e localizado, promovendo a rápida reconstrução da área afetada (LI *et al.*, 2000), o que necessitaria o bloqueio da fisiologia normal até que o processo agressor seja suspenso. Porém, o efeito da radiação é sistêmico, agredindo todo o organismo, o que leva a destruição de grandes segmentos celulares indispensáveis para a vida.

Estes eventos fazem com que os produtos destas células de “limpeza” sejam indutores de morte celular em células que não estão em repouso, por mecanismos receptor-específicos (LI *et al.*, 2000; GREAVES & SCHALL, 2000). Assim, mecanismos que são utilizados em fenômenos localizados podem gerar condições de morte do hospedeiro se o processo for generalizado para todo o organismo. Entre estes fatores, as citocinas inflamatórias, como o IFN- γ , induzem a ativação de

macrófagos residentes ou em atividade migratória em reação à necrose (ZHAO *et al.*, 2007). Esta ativação resulta na produção local de radicais livres, como os de nitrogênio, pela produção de enzimas induzíveis específicas, como a iNOS, resultando na produção de radicais livres envolvidos diretamente na indução de apoptose, pela ativação local de p53 (MATSUMOTO *et al.*, 2004)

Os processos descritos de morte e ativação de células-mãe são controlados por um grupo de células mesenquimais, com várias denominações, que são “sensores” da destruição tecidual e que, após cessar o evento agressor, são capazes de promover a ativação de células-mãe em repouso e recuperação do tecido (KOLLET *et al.*, 2001). Isto ocorre em vários tipos celulares, denominados genericamente de células mesenquimais dendríticas, mas também como reticulares, foliculares ou estromais. Estas células ocorrem em baixa prevalência nos tecidos, geralmente servindo como suporte para muitas células efectoras. Para sua função ser adequada, dependem do envio de mensagens que atraiam ou ativem as células alvos, sempre em perfeita relação ambiental e em contato com muitas outras células, o que lhes dá esse caráter dendrítico (SOZZANI *et al.*, 1997).

Um dos principais produtos destas células é o SDF-1 (*Stromal cell-derived factor*, Fator derivado de células estromais), denominação de um grupo de quimiocinas CXC que se apresenta principalmente sob duas formas, α e β (TASHIRO *et al.*, 1993), derivadas de transcrições diferenciadas de um único gene, o SDF-1, localizado no cromossomo 10 (SHIROZU *et al.*, 1995), diferentemente das outras quimiocinas induzidas por processos inflamatórios, localizadas no cromossomo 4 e 17 (TASHIRO *et al.*, 1993).

A ação do SDF-1 α está relacionada à presença de seu receptor específico, CXCR4, que ao ser ativado induz uma cascata de fosfoquinases C, promovendo a ativação e a colonização adequada de células mesenquimais primordiais (WANG *et al.*, 2000) quer sejam elas linfóides (MOSER & LOETSCHER, 2001) ou mielóides (HODOHARA *et al.*, 2000; GREAVES & SCHALL, 2000).

A importância dada a esta quimiocina tem aumentado pela comprovação de que sua ação incrementa a implantação de células-mãe em transplantes de medula óssea (VOERMANS *et al.*, 2000). Nestes casos, a administração de SDF-1 α em modelos experimentais permitiria o uso de menor quantidade de células-mãe transplantadas, ou ainda a diminuição do período de “nadir” do receptor. Além disso, em algumas doenças parasitárias que afetam sistemicamente a hematopoiese como a

malária, a administração exógena desta quimiocina favorece o controle da infecção, aumentando a sobrevivência dos animais e diminuindo a morbidade da doença (GARNICA *et al.*, 2002). Nestes estudos, dados preliminares mostraram que a produção desta quimiocina ocorre de forma precoce em modelos de malária não-letal, mas sua síntese é ausente em modelos de malária letal, onde há grande produção inicial de óxido nítrico (GARNICA *et al.*, 1996), um dos mediadores mais produzidos durante os fenômenos inflamatórios decorrentes dos processos de reposição de populações celulares induzidos pela morte celular, observável também em modelos expostos à radiação ionizante.

Assim, o modelo de exposição à radiação ionizante, por apresentar um grande comprometimento inflamatório da hematopoiese, justifica a pesquisa dos efeitos biológicos da administração exógena desta quimiocina em modelos experimentais da síndrome hematopoiética derivada da exposição à radiação. Além disso, o desenvolvimento de modelos murinos com genes cuja atividade traducional é deficiente oferecem a possibilidade de estudo dos efeitos da radiação na ausência de produtos de genes, como o IFN- γ (OPPENHEIM & NETA, 1994) e a iNOS (OHTA *et al.*, 2007), permitindo eliminar os efeitos advindos destes produtos sem manipulação farmacológica, mas não tem uma aplicação direta na terapia após a exposição a radiação ionizante. Os estudos bioquímicos das enzimas resultaram na seleção de algumas drogas com potencial inibidor de várias enzimas terminais do processo de produção de NO, como a aminoguanidina, específica da iNOS (SOUTHAN & SZABÓ, 1996) ou da eNOS como L-NAME (SALERNO *et al.*, 2002), que tem uma aplicação direta na terapia de situações onde a produção aumentada do NO pode estar envolvida (ASTOLFI *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Estudar as fases iniciais do dano radioinduzido na sobrevivência e hospedagem de células hematopoiéticas em medula óssea e baço, dissecando os efeitos da inflamação pela ação do IFN- γ , da iNOS ou de CXCL12, esta quimiocina em associação ou não com um inibidor de iNOS, aminoguanidina.

2.2 Especificamente:

- Padronizar modelos murinos de exposição à radiação gama de forma sub letal (4 Gy) e letal (8 Gy), quanto à sua evolução hematológica, da histologia e composição dos órgãos hematopoéticos estudados, pela estudo das células hematopoiéticas primordiais CD34⁺ e pela produção de CXCL12.
- Avaliar o dano radioinduzido em animais geneticamente deficientes em IFN- γ , na sobrevivência e a quantidade de células progenitoras hematopoiéticas, em medula como no baço
- Avaliar o dano radioinduzido em animais geneticamente deficientes em óxido nítrico sintase induzível na sobrevivência e a quantidade de células progenitoras hematopoiéticas, em medula como no baço.
- Estudar o efeito da inibição da iNOS pela administração de Aminoguanidina na sobrevivência e a quantidade de células progenitoras hematopoiéticas, em medula como no baço.
- Estudar o efeito da administração de CXCL12 na sobrevivência e a quantidade de células progenitoras hematopoiéticas, em medula como no baço.
- Estudar o efeito da administração concomitante de inibidor da iNOS e CXCL12 na sobrevivência e a quantidade de células progenitoras hematopoiéticas, em medula como no baço.

3. ESTADO DA ARTE

3.1 Radiação Ionizante

Recebe o nome de radiação o conjunto de fenômenos que se caracterizam pelo trânsito de fótons e/ou de partículas, transferindo energia eletromagnética ou e/ou cinética à matéria.

Fundamentalmente, a radiação pode ser dividida em dois tipos, as não-ionizantes (ondas de radiofrequência de estações de rádio e televisão, telefonia móvel, microondas) e ionizantes. Esta última classe apresenta diversas formas, de acordo com a sua origem e massa, e é subdividida em um grupo denominado como corpuscular, como as partículas α , β , nêutrons, elétrons, prótons, e em outro que se apresenta compreendido no espectro de ondas eletromagnéticas como os raios gama e X.

Ao se chocar com as diversas formas de matéria organizada, estes diversos tipos de radiação induzem alterações pela produção de instabilidades na eletrosfera dos átomos atingidos, provocando ionizações cuja intensidade e quantidade são diretamente dependentes da taxa de transferência de energia envolvida nestas interações. A *Transferência Linear de Energia* é a grandeza física que quantifica esta taxa, e a partir da sua quantificação a radiação ionizante pode ser subclassificada em espécies de alto *LET* (baixo poder de penetração e alto poder de ionização, como as partículas alfa e os nêutrons) e baixo *LET* (alto poder de penetração e menor poder de ionização, como os raios gama) (MUROYA *et al.*, 2006).

Os efeitos da radiação ionizante sobre a matéria dependem, portanto, primordialmente da absorção de energia doada pela radiação incidente. Essa interação pode ocorrer de forma direta, como quando os fótons ou partículas incidem diretamente na matéria, gerando a ionização ou excitação da molécula; ou de forma indireta, quando moléculas do meio absorvem a energia e sofrem modificações físicas que propiciam a geração de novas entidades químicas reativas, por vezes biologicamente nocivas devido ao seu potencial oxidante ou redutor, dependendo da espécie química formada neste processo (RILEY, 1994).

A exposição de unidades celulares e tecidos vivos à radiação ionizante pode provocar morte celular pelo desenvolvimento de mutações gênicas e aberrações cromossômicas, induzidas pelos danos diretos e indiretos da transferência de energia para as moléculas orgânicas. O efeito principal da radiação sobre as células é na molécula de DNA, que provoca a fragmentação das fitas duplas, gerando aberrações cromossômicas ou mutações gênicas, durante o processo de reparo enzimático ou durante a replicação de DNA (LORIMORE *et al.*, 2003).

Quando incidem em meio aquoso, as espécies de radiação ionizante induzem uma série de alterações estruturais nas moléculas de água, num processo denominado radiólise de água, quando ocorre a formação de radicais fortemente reativos capazes de transferir a energia adquirida para moléculas orgânicas. (O'NEILL & DAVIES, 1987). Neste panorama, a produção de dano radioinduzido deve-se prioritariamente à ação destas espécies reativas, e são considerados os principais responsáveis pelo dano celular, devido aos efeitos produzidos em lipídios, ácidos nucleicos e proteínas. (LORIMORE *et al.*, 2001)

Experimentos usando análises usando espectrometria de massa em moléculas de água irradiadas revelam a presença de espécies químicas $\text{OH}^\cdot$ (hidroxila), $e^-_{(aq)}$ (elétron aquoso), e $\text{HO}^\cdot$, além do peróxido de hidrogênio e superóxido de hidrogênio, moléculas com alto potencial oxidativo e de reconhecido efeito deletério em diversas biomoléculas, destacando-se o dano ao DNA celular (JONATHAN *et al.*, 1999). Estes radicais também são originados naturalmente pelo metabolismo, nas reações metabólicas secundárias, porém nas células existem outras moléculas que servem para limitar a duração de sua atividade e a sua disponibilidade, através de sua conversão enzimática, ou captação que é feita por moléculas denominadas *scavengers*, que são captadores específicos para radicais livres (FEINENDEGEN, 2002).

Devido os efeitos nocivos que são provocados, estes radicais são considerados os responsáveis pelas maiores consequências da irradiação. Em organismos vivos, a presença de substâncias antioxidantes, pode bloquear a atividade destes produtos e reduzir parcialmente alguns de seus efeitos. Entre estas substâncias, as que podem ser encontradas naturalmente no organismo,

são o Ácido Ascórbico (Vitamina C) e Tocoferol (Vitamina E) (ZBIKOWSKA *et al.*, 2001)

Atualmente a radiação vem adquirindo importância crescente, possuindo um papel fundamental na Medicina, e destacando-se em diversas aplicações: A esterilização de materiais médicos cirúrgicos e descartáveis, com doses acima de 20 KGy (GRECZ *et al.*, 1987); a inativação de venenos para uso em imunógenos devido a capacidade de a radiação ionizante induzir modificações estruturais em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (CARDI *et al.*, 1998); no desenvolvimento de vacinas, utilizando a capacidade da radiação de estimular a capacidade de processamento de antígenos pelo sistema imune (EDELMAN *et al.*, 1993) ou inativação de microorganismos patogênicos (KIM & THAYER, 1995), a exemplo do *Toxoplasma gondii*, onde a radiação ionizante provoca o bloqueio de sua capacidade reprodutiva dentro do hospedeiro (HIRAMOTO *et al.*, 2002).

3.2 Células-Mãe Hematopoiéticas

A característica que pode definir uma célula totipotente (ou ainda; célula-tronco, *stem cell*) é a sua capacidade irrestrita de manutenção de sua linhagem durante toda a vida do indivíduo (SCHWARZENBERGER *et al.*, 2002) via reprodução mitótica, como também sua habilidade multipotencial de diferenciação, resultando em linhagens distintas e não auto-reproducentes após algumas etapas de especialização celular (WRIGHT *et al.*, 2000).

Dado o constante *turnover* de células provenientes do microambiente medular ao sangue circulante (cerca de 10^{12} células por dia) (PLOEMACHER, 1999), comandado por uma intrincada cadeia de sinalização desencadeada por citocinas (HODOHARA *et al.*, 2000) e quimiocinas (BROXMEYER, 2001), a existência de células-mãe hematopoiéticas pluripotentes foi prevista há algumas décadas, principalmente por Till e McCulloch em 1961 e Metcalf e Moore em 1971 (WEISSMAN *et al.*, 2001).

As células-tronco hematopoiéticas são, portanto um pequeno grupo de células primitivas, auto-reprodutíveis que se diferenciam continuamente para

que o organismo tenha condições homeostáticas de formar e manter todas as linhagens de células sanguíneas funcionais (WEISSMAN *et al.*, 2001).

3.3 Regulação da Hematopoiese

Estudos indicam que os processos conhecidos até hoje, como a ativação de processos apoptóticos e de controle de multiplicação, diferenciação e alojamento (*homing*) de células-mãe no microambiente da medula óssea, por sua vez comandados pela camada estromal dos tecidos hematopoiéticos, agindo como sentinelas das condições fisiológicas do tecido, e que são ativadas durante as fases iniciais após a exposição à radiação. São populações celulares capazes de promover a ativação de células progenitoras para o início do processo de recuperação da celularidade normal do tecido (KOLLET *et al.*, 2001). Deste fato resulta a importância do processo denominado “Irradiação Total do Corpo” (*Total Body Irradiation, TBI*) precedente do transplante de medula óssea em pacientes leucêmicos. Como as células tumorais apresentam maiores taxas de divisão mitótica, estas são, portanto, mais suscetíveis a danos de material genético causados pela exposição à radiação. Então, a função da irradiação de um paciente antecedendo o processo de transplante apresenta função maior do que a imunodepressão desejada para reduzir o risco de rejeição; na verdade, o processo denominado *TBI* gera espaços no parênquima medular, possibilitando o alojamento das células transplantadas no hospedeiro (PONOMARYOV *et al.*, 2000).

Desta forma, alguns tipos celulares, denominados genericamente de células mesenquimais dendríticas, mas também como reticulares, foliculares ou estromais são ativados na ocasião da destruição do tecido, desenvolvendo em resposta à agressão um mecanismo de manutenção da homeostase (SOZZANI *et al.*, 1997).

3.4 SDF-1

SDF-1 (*Stromal cell-derived factor*, Fator derivado de células estromais) ou CXCL12 é uma das moléculas derivadas das células estromais e que possuem como função principal a participação em processos quimiotáticos inflamatórios ou homeostáticos (ALLEN *et al.*, 2007). A denominação serve para uma classe de quimiocinas CXC que pode ser expressa em seis isoformas, sendo as principais α e β

(TASHIRO *et al.*, 1993) e formas menos expressivas, como γ , δ , ε e ϕ , (YU *et al.*, 2006) derivadas de transcrições diferenciadas de um único gene, o SDF-1, localizado em humanos no cromossomo 10 (SHIROZU *et al.*, 1995) e em camundongos no cromossomo 6. Sua isoforma mais relevante para o processo de hematopoiese é a SDF-1 α (BROXMEYER, 2001).

O efeito de *homing*, que neste caso consiste no alojamento preferencial de células-tronco hematopoiéticas internamente à medula óssea é caracterizado pela expressão de integrinas de adesão no endotélio dos capilares sinusóides medulares. As principais moléculas de adesão envolvidas no processo são VLA-4 (*Very Late Activating Antigen 4*), LFA-1 (*Leukocyte Function Antigen 1*) (JO *et al.*, 2000) e VLA-5 (DENNING-KENDAL *et al.*, 2003), presentes no endotélio e seus respectivos ligantes VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) e ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) (JO *et al.*, 2000). A expressão destes últimos é aparentemente aumentada pela liberação de IL-11 (MAUCH *et al.*, 1995).

A inativação gênica da produção de SDF-1 α induz morte fetal, com grandes efeitos na organogênese, como ausência do coração e malformações cerebrais (McCGRATH *et al.*, 1999). A hematopoiese nesta fase do desenvolvimento e nestas condições é deficitária pela falha na migração de células-mãe hematopoiéticas do fígado fetal e pré- e pró-células B ao microambiente medular, em detrimento às *stem cells* do saco embrionário e da região mesonéfrica-aórtica-gonadal, não afetadas pelo SDF-1 (JO *et al.*, 2000). Outro fato que comprova a importância desta quimiocina é o alto grau de conservação do gene SDF-1 entre os vertebrados (MOEPPS *et al.*, 2000).

Em seres humanos adultos e normais, a produção basal de SDF-1 está relacionada ao controle da migração de células T e monócitos (GREAVES & SCHALL, 2000) em mecanismo independente da presença ou não de processos inflamatórios ou de resposta hematopoiética contra perda ou destruição de medula óssea.

Outro fato importante é a capacidade que células estromais da medula óssea que expressam SDF-1 α têm de atrair células com potencial de diferenciação (CD34⁺) do sangue periférico ao ambiente medular ósseo (YOUN *et al.*, 2000). Além disto, há um promissor uso de SDF-1 α na “mobilização” (ativação) de pequenas quantidades de células-tronco hematopoiéticas presentes no sangue periférico, que após o contato com a quimiocina *in vitro* e em conjunto com outras citocinas podem passar a constituir grande contingente celular, aumentando as chances de implantação do tecido no hospedeiro (LATAILLADE *et al.*, 2000).

No entanto, dados mais recentes sobre a utilização de coquetéis de citocinas e fatores de crescimento hematopoiéticos em modelos experimentais de exposição à radiação apresentam ótimos resultados, mas custos elevados devido ao uso de moléculas sintéticas ou recombinantes, inviabilizando seu uso em grande escala (HÉRODIN & DROUET, 2002).

Por este fato o processo denominado “Irradiação Total do Corpo” ou ainda “Irradiação de Corpo Inteiro” (*Total Body Irradiation, TBI*) pode ser usado como precedente do transplante de medula óssea em pacientes leucêmicos segundo grande parte dos protocolos vigentes. Como as células tumorais apresentam radiosensibilidade mais expressiva que a encontrada em células sadias (ALDRIGE & RADFORD 1998), estas são, portanto, mais suscetíveis a danos de material genético causados pela exposição à radiação, o que justifica o uso da radioterapia em tumores.

As células-tronco hematopoiéticas são um grupo pouco numeroso de células não-diferenciadas, auto-reprodutíveis e que se especializam continuamente para que o organismo tenha condições homeostáticas de formar e manter todas as linhagens de células sangüíneas funcionais (WEISSMAN *et al.*, 2001).

Entre as subpopulações de células-tronco hematopoiéticas, destaca-se a que apresenta a sialomucina denominada CD34 na superfície externa da membrana, por estar presente num grande número de fenômenos relacionados (FURNESS & MCNAGNY, 2006). Suspensões de células mononucleares do sangue periférico enriquecido para obtenção de maiores proporções de células CD34⁺ podem induzir a um incremento da capacidade de alojamento das células no microambiente medular de pacientes submetidos a transplantes de medula óssea, além de minimizar algumas complicações pós-operatórias (GOODELL, 1999).

Vários outros marcadores identificados como característicos de células com potencial de repopulação da medula óssea em transplantes ou após exposição à radiação ionizante têm sido descritos. Atualmente, estas células podem ser isoladas do sangue do cordão umbilical, fígado fetal, medula óssea fetal ou de adultos, e em menor escala, no sangue periférico, sendo freqüentemente caracterizadas pelo fenótipo CD34⁺/Thy-1⁺/Lin⁻/c-kit^{lo}/CD38⁻,

o que significa que são pertencentes a linhagens mielóides e pouco responsivas ao SLF (*Steel Factor*) (WEISSMAN *et al.*, 2001).

3.5 CXCR4

Outro marcador cuja importância é crucial no desenvolvimento hematopoiético, tanto fetal quanto maduro, é o CXCR4, receptor da quimiocina SDF-1- α ou CXCL12 (MURPHY, 2002). Entre as moléculas envolvidas nos processos de alojamento na medula e na migração de *stem cells* do sangue periférico aos sítios hematopoiéticos, o receptor CXCR4 parece ser a mais importante, pois é indispensável ao alojamento de células progenitoras hematopoiéticas na medula óssea (PELED *et al.*, 1999), é a única molécula da classe funcional das selectinas que possui expressão diferencial entre células da medula óssea e do sangue periférico (VOERMANS *et al.*, 1999) e sua ativação é um pré-requisito importante para a ativação das integrinas VLA-4 e VCAM-1 (HIRAYAMA *et al.*, 2003), importantes fatores de quimiotaxia e *homing* celular.

A importância da administração exógena da quimiocina CXCL12 foi elucidada por dados preliminares que mostraram que a produção desta quimiocina ocorre na fase aguda de infecções em modelos experimentais de malária não-letal e apresenta produção indetectável ou ausente nos modelos letais, caracterizados por grande produção de óxido nítrico nesta mesma fase (GARNICA *et al.*, 2002), fenômeno observável também em modelos expostos à radiação ionizante (DAINIYAK, 2002).

3.6 Efeitos Inflamatórios Após a Exposição à Radiação

Eventos inflamatórios pós-exposição à radiação ionizante foram descritos em modelos já bem caracterizados, como nos pulmões (RABBANI *et al.*, 2005) e intestinos (MOLLA *et al.*, 2005), e se apresentam relacionados em proporção direta à ativação de macrófagos mediada pela estimulação

por citocinas e conseqüente produção aumentada de NO (IBUKI & GOTO, 2004).

A liberação de NO, por sua vez, é ligada ao disparo da apoptose pela ativação da p53. (CHOI *et al.*, 2002). Sua produção durante a inflamação é realizada pela iNOS (Óxido Nítrico Sintase-Indutível), numa cadeia de eventos iniciada pela ativação do fator de transcrição NF- κ B (ZHANG *et al.*, 2005), por meio da oxidação da L-arginina e induzida por citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (IBUKI & GOTO, 2004) e IFN- γ (HELD *et al.*, 1999).

O presente estudo tem, portanto, o objetivo de determinar e caracterizar a produção de CXCL12 em órgãos hematopoiéticos de modelos experimentalmente expostos à radiação ionizante, relacionando-os com a produção de óxido nítrico atrelada a apoptose induzida pela radiação ionizante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo Experimental de Exposição à Radiação Ionizante.

Toda a água utilizada na dissolução de reagentes foi deionizada numa resistividade de $18,2\text{M}\Omega / \text{cm}^2$, e todos os reagentes utilizados foram adquiridos de fornecedores idôneos e de qualidade reconhecida.

Foram utilizados grupos de camundongos isogênicos fêmeas da linhagem C57Bl/6j, de 6 a 8 semanas de idade, criados pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e mantidos pelo biotério de experimentação do Laboratório de Protozoologia em câmaras com condições de temperatura, umidade e luminosidade adequadas, controladas e monitoradas, contidos em gaiolas plásticas com meio absorvente estéril, devidamente supridas com água e ração específica *ad libitum*.

Os processos de irradiações de corpo inteiro (*Total-Body Irradiation - TBI*) foram realizados numa fonte panorâmica de radiação gama contendo ^{60}Co (Yoshizawa Kiko Co.), presente no Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN – SP), com taxa de dose média $11,22 \text{ kGy/h}$, no período compreendido entre maio de 2003 a maio de 2007, a 70cm da fonte e usando atenuadores de chumbo metálico equivalentes à blindagem de 70% de bloqueio. Após padronização, as doses utilizadas foram 4 Gy (moderada a severa) ou 8 Gy (letal), dependendo das necessidades de estudo do modelo em questão. O tempo de exposição dos camundongos na câmara de irradiação variou de 15 a 40 minutos, dependendo da dose e da atividade da fonte vigente nas datas dos procedimentos.

Para garantir a imobilização dos animais sem a utilização de anestésicos, os camundongos foram contidos em mini-câmaras ventiladas de PVC (cloreto de polivinila), como mostra a Figura1.

Figura 1: Fotografia das câmaras de contenção. (a) Câmara ventilada de PVC, fixada em suporte, pronta para irradiação; (b) Câmaras contendo os camundongos, dispostas na sala de irradiação. As câmaras foram dispostas equidistantemente em relação à fonte de irradiação, de maneira que todos os animais recebessem a mesma dose de radiação gama.

As cápsulas foram construídas a partir de tubos próprios para condução de água fria em instalações hidráulicas domésticas com as dimensões de 6 cm de comprimento e 1,905 cm (3/4 de polegada) de diâmetro. Em cada uma delas foram abertos oito orifícios de 5 mm de diâmetro para possibilitar a respiração dos animais durante os eventos de irradiação. Cada tubo foi fechado com tampas apropriadas (*caps*) adquiridas comercialmente.

Também foram irradiados camundongos *knockout* para a produção de interferon gama ($\text{IFN-}\gamma^{-/-}$) e Óxido Nítrico-Sintase Induzível ($\text{iNOS}^{-/-}$), adquiridos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP, sempre mantidos seguindo os mesmos parâmetros utilizados para os camundongos *wild-type*.

Os camundongos irradiados desta forma foram sacrificados por anestesia respiratória em câmara de CO_2 , nos dias 2º, 4º, e 8º após o evento da irradiação, seguindo os princípios éticos de experimentação de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (CLARK, 1996) e com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 Divisão Experimental dos Grupos Irradiados.

Os grupos de animais irradiados (n=3) foram divididos de acordo com o seu genótipo e/ou a veiculação ou não de tratamento com aminoguanidina-hemissulfato, um inibidor da produção ($EC_{50\%}$: 50 μ g / kg) (LASZLO *et al.*, 1995) da enzima Oxido Nítrico-Sintase Induzível (iNOS)

Adquirida na forma carbonatada (pouco solúvel em meio aquoso), a aminoguanidina foi diluída na concentração 2g / L com solução devidamente titulada com H_2SO_4 até o pH = 2,0, produzindo a forma de hemissulfato (solúvel). Após correção de pH (7,0), a solução foi oferecida aos animais do grupo tratado como água potável, seguindo o protocolo de administração previamente padronizado no nosso laboratório, cujo sucesso na aceitação e tolerância pelos animais experimentais mostraram-se maiores comparando com a administração intraperitoneal (i.p.).

Outros grupos igualmente distribuídos foram inoculados com CXCL12 murina sintética (Prof. Nobutaka Fujii, Univ. de Kyoto) via intraperitoneal nos dias 0 a 4 após a irradiação, em injeções de 100 μ L contendo 1 μ g da quimiocina. Além destes grupos, outros camundongos receberam aminoguanidina e CXCL12 concomitantemente da mesma forma que os outros grupos tratados.

4.3 Contagem de Hemácias e Plaquetas do Sangue Periférico.

Nos dias de experimento, foram coletadas amostras de 2 μ L pela remoção da extremidade final das caudas dos animais com pipetas com ponteiros devidamente tratadas (imersão por 10 minutos) em solução anticoagulante de citrato e dextrose (0,1 M $Na_3C_6H_5O_7$; 0,11 M $C_6H_{12}O_6$; 71 mM $C_6H_8O_7$). As alíquotas receberam igual volume de suspensão de hemácias de peru (gênero *Meleagris*) fixadas em formaldeído tamponado e diluídas com soro fetal bovino na concentração de 3×10^7 hemácias / mL. A concentração de hemácias e plaquetas foi então determinada a partir da proporção entre as contagens obtidas e o número de células de peru encontradas em 25 campos.

Após este tratamento foram feitos esfregaços em lâminas de vidro com as amostras, coradas logo em seguida segundo Leishman, e o número de hemácias e plaquetas foi determinado para cada um dos animais testados com o objetivo de avaliação hematológica dos efeitos decorrentes das exposições à radiação testadas.

4.4 Histologia Convencional (Hematoxilina - Eosina).

Fragmentos dos baços e um dos fêmures dos animais foram extraídos e conservados em formol 10% tamponado segundo Sorensen para a confecção de lâminas de histologia convencional.

Após inclusão em parafina, os órgãos foram seccionados em micrótomo (5 µm de espessura) e corados pelo método da hematoxilina-eosina. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico nos aumentos de 400 e 1000 X com o objetivo de se avaliar a disseminação de destruição tecidual, bem como efeitos localizados nos órgãos estudados.

4.5 RT-PCR Semi-Quantitativa Específica para CXCL12 Murina.

Fragmentos dos baços dos animais utilizados foram extraídos e conservados a -80°C em 1 mL de solução comercial conservante (TRIzol[®]) até o momento da extração do RNA total seguindo as instruções do fabricante. Fragmentos dos fêmures dos mesmos camundongos foram extraídos, e o interior dos canais medulares foram lavados com 1 mL uma solução salina tamponada (PBS + 5% soro fetal bovino + 5 mM EDTA trissódico, pH = 7,4) utilizando uma seringa hipodérmica estéril. Após dissociação dos tecidos por sucessivas pipetagens, as suspensões celulares foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos a 4° C e conservada a -80° C em solução apropriada para posterior extração do RNA total como descrito.

Após realização da extração, o RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro de UV (260 / 280 / 320 nm), sua concentração ajustada para 5 µg / µL e utilizado como molde para a construção de bibliotecas de cDNA correspondente, utilizando iniciadores (Oligo-dT₍₁₂₋₁₈₎), em reação catalisada pela transcriptase reversa

derivada do vírus da leucemia murina Moloney (*Moloney Murine Leukemia Vírus*, M-MuLV).

As cadeias de cDNA obtidas foram utilizadas como *template* (molde) para a amplificação de um fragmento de 416 pares de bases pertencente ao gene *sdf-1*, codificador da CXCL12 murina (*GenBank*: NM_021704, 1837 pb) por reações de PCR utilizando tampão específico (7,5 mM Tris-HCl, pH 9.0; 0,2 mM MgCl₂; 5 mM KCl; 2 mM (NH₄)₂SO₄), dNTP's (2,5 µM), *Taq* DNA polimerase (5 U / µL). Os iniciadores específicos utilizados foram: CTCGGTGTCTCTTGCTGTCCA (Sense) e GGCCCTCCTCCCCACCACT (Anti-Sense), na concentração de 1,5µM. As reações seguiram-se por 35 ciclos com temperatura de anelamento a 72,2° C. Como controles de amplificação foram realizadas da mesma forma reações com *primers* específicos para a β-actina murina: TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC (Sense) e TAAACGCAGCACAGTAACAGTCCG (Anti-Sense), também por 35 ciclos e na temperatura de anelamento a 55,6° C (349 pb). Os produtos destas amplificações foram submetidos a eletroforeses em géis de poliacrilamida a 6% em TBE (Tris-Borato EDTA, pH = 8,0), corados por impregnação por nitrato de prata e oxidação por NaOH e formaldeído.

Os géis foram fotografados por meios digitais e a densidade óptica relativa, obtida pela medição da intensidade de coloração individual das bandas foi quantificada pelo *software ImageJ* (v. 1.36). A quantificação de cada banda representativa da expressão de CXCL12 foi dada em unidades de densidade óptica relativa em relação à densidade óptica obtida da medição das bandas de β-actina de cada amostra, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2: Quantificação da intensidade óptica das bandas eletroforéticas pelo *software* ImageJ. O algoritmo renderiza a intensidade dos tons escuros, em relação ao fundo da imagem. A área dos picos é integrada e valores numéricos são obtidos. O valor relativo da expressão de mRNA de CXCL12 foi obtido a partir da relação entre a densidade da banda de β -actina da mesma amostra. As figuras mostram as bandas de β -actina (*) e CXCL12 (\$).

4.6 Citometria de Fluxo para Detecção de Fenótipo CD34⁺.

Fragmentos dos baços dos animais utilizados foram mecanicamente dissociados de forma a obter-se uma suspensão de esplenócitos em solução salina tamponada estéril (PBS + 5% soro fetal bovino + 5 mM EDTA trissódico, pH = 7,4). As hemácias foram removidas após processamento das suspensões por gradiente de centrifugação (Ficoll - Paque PLUS[®]) em solução comercial específica (2400 rpm, 15 minutos, 4°C).

A fração celular obtida foi novamente diluída na solução salina para a obtenção de alíquotas com a concentração de 4×10^5 células / mL num volume total de 200 µL. As amostras foram hibridizadas contra anticorpos monoclonais (clone MEC 14.7, Santa Cruz Biotechnologies) produzidos em ratos, conjugados com ficoeritrina (PE) e com reatividade anti-camundongo, específicos para a detecção do domínio transmembrana da sialomucina CD34, presente na superfície extracelular de células progenitoras hematopoiéticas, em tubos imersos em gelo e em recipiente com ausência de luz por 30 minutos.

O interior do canal dos fêmures dos camundongos foi lavado com 1 mL da solução salina tamponada descrita com o auxílio de uma seringa hipodérmica estéril. As suspensões celulares obtidas desta forma foram processadas da mesma forma que as suspensões de células esplênicas.

Após a reação com os anticorpos específicos, as amostras foram fixadas pela adição de 800 µL de etanol 70% a -20° C e conservadas na mesma temperatura e em ambiente escuro até o momento da aquisição dos eventos por citometria de fluxo.

Foram adquiridos 10 000 a 50 000 eventos de cada amostra, e a quantidade de células positivas para o fenótipo estudado foi determinada utilizando uma versão adaptada para a análise de material murino do protocolo Milan-Mulhouse (GRATAMA *et al.*, 1998) e detalhada na Figura 3.

Figura 3: Diagrama esquemático das áreas de corte (*gates*) determinadas para a obtenção das proporções de células CD34⁺ em suspensões celulares obtidas a partir dos baços e medulas ósseas dos animais utilizados. Em (a) (baço) e (d) (medula óssea) estão representadas as áreas de corte de exclusão de células mortas e *debris* celular, baseada nos parâmetros de tamanho (FSC) e rugosidade (SSC) dos eventos adquiridos. Em (b) (baço) e (e) (medula óssea) estão mostradas as áreas de identificação das células CD34⁺, baseadas na análise do log da intensidade da fluorescência (CD34 PE) e rugosidade dos eventos adquiridos. Em (c) e (f) estão mostradas isoladamente as populações que atendem a estes critérios, em baços e medulas, respectivamente. As áreas mostradas foram delimitadas baseadas no protocolo Milan-Mulhouse, com modificações para o uso em células de camundongos. As figuras acima representam suspensões celulares de animais controle não-irradiados.

5. RESULTADOS

5.1 Dano Hematopoiético Pós-Irradiação em Camundongos

Inicialmente, foram avaliados modelos de dano hematopoiético clássico, utilizando animais irradiados em doses letais e moderadas a severas, sem nenhum tipo de tratamento protetor que pudesse obliterar os efeitos da radiação ionizante na hematopoiese dos animais, relacionando o decréscimo das quantidades absolutas de hemácias e plaquetas no sangue periférico dos animais. Em estudos iniciais, observamos que as doses acima de 8 Gy provocavam uma letalidade que impedia estudos subsequentes confiáveis. Desta forma, utilizamos dois modelos de irradiação, um considerado de maior gravidade e outro de menor impacto hematopoiético, ainda que significativo. Na Figura 1 estão representados os índices hematimétricos de camundongos irradiados com dose letal (8 Gy) e dose moderadamente severa (4 Gy). As contagens de hemácias mostram queda abrupta até o 2º dia, seguido de recuperação no número de células para os camundongos irradiados a 4 Gy, e queda constante em camundongos irradiados a 8 Gy. As contagens de plaquetas apresentaram queda semelhante entre as doses estudadas, atingindo níveis baixos, provavelmente devido à falha de produção hematopoiética, além de lesão vascular e conseqüente adesão periférica, decorrente de inflamação e consumo periférico.

Figura 1: Índices hematimétricos de camundongos C57Bl/6j irradiados a 4 ou 8 Gy. Em (a) contagens de hemácias em função do tempo. Em (b) contagens de plaquetas em função do tempo. Barras representam EPM (erro padrão médio) e a área sombreada os valores normais.

Figura 2: Histologia de baços de camundongos C57Bl/6J irradiados a 8 Gy. Os animais foram sacrificados nos marcos temporais indicados na figura (2º, 4º e 8º dias após a irradiação). As setas (→) indicam sítios de destruição tecidual decorrentes da irradiação

e os asteriscos (*) indicam presença de hemossiderina.

Para corroborar os achados hematimétricos, foi estudada a evolução histológica dos principais órgãos hematológicos, baço e medula óssea, para avaliar a ação da radiação nos locais de hematopoiese. Cabe ressaltar que para o baço, houve uma significativa redução de seu volume com a radiação, estando nas doses de 8 Gy em torno de 20% de seu volume original.

A análise histológica dos modelos de irradiação proposta mostrou que a destruição tecidual foi disseminada e variou de acordo com a radiosensibilidade específica de cada tecido estudado, sendo mostrada na Figura 2.

Não foi possível identificar outros fatores eventuais de agressão associado a lesões, como ativação infecciosa ou crescimento de patógenos específicos, sendo que a lesão parecia ser apenas dependente do processo de irradiação. O baço dos animais controles antes da irradiação apresentava uma celularidade normal, com polpa branca bem delimitada, sem folículos linfóides reacionais. A polpa vermelha apresentava celularidade normal, com citoplasma geralmente eosinófilo das células, mostrando estabilidade sem atividade proliferativa local. A partir do 2º dia da irradiação, notamos uma queda maciça da celularidade esplênica, que parece associada à presença de focos de destruição indicados pelas setas, no aumento 400x. No maior aumento, a queda da celularidade foi intensa e observou-se uma população celular escassa, com disseminação de locos muito fracamente povoados, ou ainda, não povoados, no órgão. Interessante notar que o efeito na polpa branca foi tanto destrutivo como desagregador, com diminuição e desorganização das populações celulares da parte linfóide do órgão. A polpa vermelha teve uma perda de celularidade menos evidente, com manutenção de células do estroma e diminuição da presença de sangue no meio das traves de células.

Este quadro inicial parece tornar-se regenerativo a partir do 4º dia após a irradiação, onde observamos um início de repopulação do órgão, com aparecimento de grupos celulares geralmente próximos a vasos, mostrando características pouco similares às dos tecidos linfóide ou hematopoiético. Estas populações celulares próximas a vasos parecem dar origem ou lugar a alguns grupos de células, visualizáveis claramente no 8º dia após a irradiação do órgão. No 8º dia de experimento, o tecido esplênico se mostra em elevado nível de desorganização morfológica, porem ainda mantendo alguns vestígios dos limites entre polpa branca e a vermelha. Uma das características mais marcantes desta fase é a intensa deposição de hemossiderina decorrente da destruição de hemácias, indicada pelos asteriscos, que significa uma manutenção da atividade fagocítica local e da função parcial da

polpa vermelha. Em tempos subseqüentes, a reação local de macrófagos aumentou e deu lugar à uma substituição tecidual por fibrose disseminada, com redução das polpas branca e vermelha.

Os territórios de medula óssea foram processados para histologia após descalcificação, o que levou ao aparecimento de alguns artefatos provindos da preparação, mas permitiu a identificação de áreas onde os fenômenos celulares puderam ser identificados claramente.

Figura 3: Histologia de medulas ósseas femorais de camundongos C57Bl/6J irradiados a 8 Gy. Os animais foram sacrificados nos marcos temporais indicados na figura (2°, 4° e 8° dias após a irradiação). Asteriscos (*) indicam a presença de elementos nucleados;

setas (➔) indicam cordões formados por células estromais e círculos cheios (●) marcam a posição de um megacariócito encontrado no tecido no 8º dia após a irradiação.

Os cortes das medulas ósseas femorais mostraram maior impacto da radiação na destruição tecidual. A Figura 3 mostra que no 2º dia de experimento, a celularidade da medula óssea dos animais utilizados mostrou-se muito baixa, praticamente ausente, em relação aos controles não-irradiados, nos dois aumentos observados. Os achados histológicos no 4º dia após a irradiação mostram aparecimento de uma rede de células de aparência dendrítica ou estromal, formando uma rede de suporte com alguns elementos nucleados proliferativos visíveis. No 8º dia após irradiação, esta rede de células estromais mostra-se ampliada e ramificada, com maior hospedagem de células hematopoiéticas, mostrando resposta compensatória, inclusive com presença de megacariócitos.

Figura 4: Produção de mRNA de CXCL12 (SDF-1 α) em relação à produção de β -actina em camundongos irradiados a 8 Gy. (a): mRNA em baço dos animais irradiados. (b): mRNA em medulas ósseas dos animais irradiados.

Em outros grupos de animais experimentais submetidos ao mesmo protocolo de irradiação, procedemos a purificação de RNA total, para identificação e quantificação de mRNA de CXCL12, uma quimiocina primordial ligada à recuperação hematopoiética e hospedagem celular. A quantidade de mRNA codificador de CXCL12 foi expressa em função da quantidade de mRNA β -actina, uma proteína de produção constante ou constitutiva da célula, determinado por quantificação óptica relativa de bandas eletroforéticas de produtos de RT-PCR utilizando iniciadores específicos como descrito em métodos. A Figura 4a mostra a evolução da quantidade relativa de mRNA

de CXCL12 em baços de animais expostos a 8 Gy de radiação. No 2º dia após a irradiação, a quantidade de mRNA atinge o menor valor após a irradiação, seguida de expressivo aumento observado no 4º e 8º dias, mais intenso no primeiro tempo. O fenômeno também ocorre em menor intensidade nas medulas ósseas femorais obtidas dos mesmos animais. Assim como observado nos baços, a produção de mRNA específico para CXCL12 nas medulas sofre queda no 2º dia, associada à grande perda da celularidade local nos dois órgãos. A pequena celularidade da medula óssea não nos dá parâmetros significativos, mas há atividade fagocítica no baço no 2º dia após irradiação, o que não afasta uma atividade inflamatória tecidual local neste momento do processo.

Na medula óssea, ocorre uma recuperação seguida de aumento da produção de CXCL12, ainda que em menor escala do que no tecido esplênico, no 4º dia e com desaparecimento no 8º dia após irradiação, apesar da maior celularidade do órgão neste ponto temporal. Em comparação com os cortes histológicos dos controles, observa-se que no 2º dia de experimento, a alta frequência de destruição tecidual coincide com a redução na expressão de mRNA para CXCL12, nos dois tecidos analisados. Também para ambos os tecidos observa-se certa restauração na celularidade no 4º dia de experimento, coincidindo com o aumento na produção de mRNA para CXCL12. Ainda nota-se que o aumento muito mais expressivo da produção de mRNA da quimiocina no tecido esplênico coincide com nível de celularidade mais expressivo do que o encontrado na medula, onde a expressão do RNA da quimiocina foi menos notável, aproximando-se dos níveis do controle não-irradiado. No 8º dia após a irradiação, mesmo com a expressão da quimiocina mantendo-se em níveis superiores ao controle, a presença de destruição tecidual volta a ser visível no baço. Na medula óssea, alternativamente, a baixa expressão de CXCL12 acontece junto a uma recuperação da celularidade, com a presença de células diferenciadas e produção de sangue, o que é uma fase posterior da diferenciação e hospedagem, vinculada à diferenciação de células que originalmente estavam envolvidas na expressão e produção de CXCL12.

Figura 5: Frequência de células de fenótipo CD34⁺ em baços (a) e medulas ósseas femorais (b) de camundongos irradiados a 4 ou 8 Gy, em relação às frequências observadas em controles não-irradiados. A área sombreada mostra a faixa de valores de animais controle não-irradiados e normais.

Foi investigada a frequência de células CD34⁺, precursoras hematopoiéticas não aderentes, em baço e medula óssea de camundongos irradiados com 4 e 8 Gy, como descrito em métodos. A eficiência do restabelecimento da capacidade hematopoiética total pode ser avaliada pela quantificação das proporções de células de fenótipo CD34⁺ infiltradas nos tecidos esplênico e medular. Para isto, suspensões celulares obtidas a partir dos dois tecidos foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para CD34 e submetidas à citometria de fluxo. Após aquisição dos eventos, foram utilizados parâmetros de tamanho e rugosidade, considerando-se que as células de linhagens precursoras hematopoiéticas são células livres que apresentam superfícies lisas com tamanho médio, estimado durante os experimentos como sendo cerca de 20 μm de diâmetro, em relação às outras populações CD34⁺ dos órgãos estudados, maiores, aderentes e rugosas. Desta forma, utilizou-se protocolo descrito em métodos para adequá-lo aos modelos murinos estudados, utilizando como parâmetros físicos o médio tamanho relativo e a baixa rugosidade relativa, além da fluorescência detectada. Utilizando-se estes parâmetros, as proporções de células CD34⁺ encontradas em animais controle não irradiados, e sua evolução em animais irradiados com 4 e 8 Gy podem ser vistas na Figura 5. O valor normal para animais não irradiados saudáveis variou entre 0,3 a 0,7% com

média de 0,5% em baços. Os valores medulares para os mesmos animais foram mais elevados com 4,5% de média e variação entre 3 e 5%,

Nos animais irradiados a 4 Gy, observa-se manutenção da proporção de células CD34⁺ no 2º dia, com grande aumento no 4º dia, seguido de queda a um patamar baixo no 8º dia. Nos animais irradiados a 8 Gy, não houve este aumento da proporção de células CD34⁺ no 4º dia, com queda discreta, lenta e progressiva destas células nos baços. Na Figura 5b estão exibidas as contagens nas medulas ósseas dos camundongos irradiados a 4 e 8 Gy. Em animais irradiados com 4 Gy observa-se que a proporção de células CD34⁺ aumenta no 2º e 4º dia do experimento, para apresentar-se a níveis indetectáveis no 8º dia de experimento. Nas irradiações a 8 Gy, a proporção de células CD34⁺ só decai flutuando em níveis muito baixos até encontrar-se desaparecer no 8º dia de experimento.

Não foi observada correlação estatística entre os parâmetros hematológicos do sangue periférico estudados e as proporções de células CD34⁺ obtidas a partir dos dois órgãos, e em nenhum dos modelos estudados

5.2 Dano Hematopoiético Pós-Irradiação em Animais Deficientes em IFN- γ

(IFN- γ ^{-/-}).

Avaliamos o dano hematopoiético em animais deficientes geneticamente em IFN- γ , de forma semelhante ao utilizado para a definição do modelo de dano hematopoiético da radiação apresentado no item anterior.

Figura 6: Índices hematimétricos de camundongos IFN- γ ^{-/-} irradiados a 4 ou 8 Gy. Em (a) contagens de hemácias dos animais testados e em (b), contagens de plaquetas. Barras representam EPM e a área sombreada os valores normais.

Os valores hematimétricos de grupos de animais IFN- γ ^{-/-} podem ser vistos na Figura 6, em duas doses de irradiação, 4 e 8 Gy. Em animais irradiados com 4 Gy, observa-se queda do número de hemácias até o quarto dia, atingindo um patamar mínimo constante até o final do experimento. Em animais irradiados a 8 Gy observou-se que a quantidade de hemácias do sangue periférico dos animais sofreu queda até o 2º dia e manteve-se constante até o 4º dia, prosseguindo em declínio até o final do experimento. A quantidade de plaquetas encontradas no sangue periférico destes animais sofreu declínio estatisticamente semelhante tanto no modelo de dose letal quanto no modelo de dose moderada a severa. No 8º dia de experimento os animais irradiados a 8 Gy mostraram quantidade de plaquetas periféricas inferior à encontrada nos

animais irradiados a 4 Gy. A ausência de IFN- γ parece não alterar a frequência de hemácias do sangue periférico.

Figura 7: Contagens de hemácias do sangue periférico obtidas de camundongos IFN- γ ^{-/-} irradiados a 4 (a) ou 8 Gy (b) em comparação com grupos controle nas mesmas doses. Barras representam EPM e a área sombreada os valores normais.

A quantidade de hemácias circulantes dos animais variou pouco em relação aos controles no modelo de 4 Gy até o 2º dia após a irradiação. As contagens obtidas a partir dos animais IFN- γ ^{-/-} mostram leve queda até o 4º dia e manutenção do número em um patamar mais baixo que o encontrado nos animais controle no 8º dia de experimento. Nos animais irradiados a 8 Gy, o declínio das contagens ocorreu de maneira similar aos controles irradiados na mesma dose.

Figura 8: Contagens de plaquetas do sangue periférico obtidas de camundongos IFN- γ ^{-/-} irradiados a 4 (a) ou 8 Gy(b) em comparação com grupos controle nas mesmas doses. Barras representam EPM e a área sombreada os valores normais.

As contagens de plaquetas dos animais irradiados são mostradas na Figura 8. Animais irradiados com 4 Gy, mostram queda nas contagens de plaquetas até o 4^o dia, semelhante aos controles. Esta queda continua a ocorrer nos animais controle no 8^o dia, mas os animais IFN- γ ^{-/-} conseguem manter uma maior estabilidade destes elementos. A irradiação a 8 Gy de animais IFN- γ ^{-/-} mostra uma queda mais lenta inicial seguida de valores equivalentes a controles no 8^o dia da irradiação. Estes valores mostram que a presença de IFN- γ parece interferir nos elementos de dano mais precoce da radiação, entre o 2^o e 4^o dias.

Figura 9: Frequência de células de fenótipo CD34⁺ em baços (a) e medulas ósseas femorais (b) de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ irradiados a 4 ou 8 Gy, expressa em porcentagem de células não aderentes. A área sombreada mostra a faixa de valores de animais controle não-irradiados e normais.

Para esclarecer estes fenômenos, procedemos a identificação de células progenitoras hematopoiéticas nos dois órgãos, nas doses estudadas, por citometria de fluxo usando o marcador CD34. Não foi possível dispor de material para a histologia dos órgãos ou mensuração de mRNA de CXCL12.

As proporções de células esplênicas CD34⁺ dos animais podem se vistas na Figura 9. Animais IFN- $\gamma^{-/-}$ irradiados a 4 Gy apresentavam no baço e na medula um grande incremento na população celular CD34, com grande aumento no 2º dia e 4º dia no baço e no 2º dia na medula óssea. Animais IFN- $\gamma^{-/-}$ irradiados a 8 Gy também mostraram incremento semelhante com menor magnitude, mas mantendo o mesmo tipo de distribuição temporal. Estes resultados confirmam os achados hematológicos da participação do IFN- γ nos períodos iniciais do dano radioinduzido.

5.3 Dano Hematopoiético Pós-Irradiação em Animais Deficientes em iNOS (*iNOS*^{-/-})

A partir da avaliação histológica dos modelos estudados, observou-se que a inflamação é evento freqüente após irradiação, em especial nos territórios hematopoéticos como o baço. Para dissecar este fenômeno, estudamos os efeitos da irradiação em camundongos *iNOS*^{-/-}, geneticamente deficientes em iNOS, mediadora final de inflamação.

Figura 10: Índices hematimétricos de camundongos *knockout* para a enzima Óxido-Nítrico Sintase Induzível (iNOS) irradiados em dose letal (8 Gy). Em (a) estão mostradas as contagens de hemácias e em (b), plaquetas. Barras representam EPM e a área sombreada os valores normais.

Os valores hematimétricos de animais *iNOS*^{-/-} foram acompanhados seqüencialmente após a exposição a 8 Gy de radiação podem ser vistos na Figura 10. Como pode ser observado, ao contrário dos controles sem deficiência genética, o número de hemácias permanece constante durante o experimento. A contagem de plaquetas destes animais foi inferior ao controle sem deficiência genética, mostrando padrão mais baixo de produção em estado normal (Figura 6b), mas após a irradiação, o número de plaquetas circulantes seguiu em declínio a níveis indetectáveis até o último dia após a irradiação.

Figura 11: Histologia de baços de camundongos irradiados $iNOS^{-/-}$ a 8 Gy. Os animais foram sacrificados nos marcos temporais indicados na figura (2º, 4º e 8º dias após a irradiação). Setas (→) indicam hemácias aderidas no parênquima esplênico dos animais;

asteriscos (*) indicam regiões matéria fibrosa e basófila.

A histologia dos órgãos dos animais iNOS^{-/-} submetidos ou não à irradiação pode ser vista nas Figuras 11 e 12. O baço dos animais não irradiados apresenta maior evidência de proliferação celular, com polpa branca abundante e polpa vermelha com proporção levemente reduzida. Após a irradiação com 8 Gy, já no 2º dia, nota-se uma redução da celularidade da polpa branca e sinais de ativação na polpa vermelha. Neste e nos tempos subseqüentes pôde-se identificar uma maior celularidade da polpa branca e da polpa vermelha, quando comparada a baços de animais controles irradiados com mesma dose. Ainda observou-se aumento de tecido fibroso, amorfo e bastante basófilo nos cortes analisados, que foi associado à fibrose tecidual após a irradiação. Não foi observada a destruição tecidual e sítios inflamatórios, como observado no modelo sem deficiência genética.

A esperada redução das polpas branca e vermelha mostrou-se em bem menor intensidade do que em controles, e a perda de definição entre estas unidades esplênicas mostrou-se bem menos evidente. Observou-se ainda uma grande quantidade de hemácias em trânsito pela polpa vermelha, de maneira semelhante aos controles iNOS^{-/-} não-irradiados. No entanto, apesar de em menor escala que a encontrada em controles, a redução constante da polpa branca até o 8º dia de experimento é evidente, mostrando uma susceptibilidade presente, mas reduzida do tecido esplênico deste modelo à dose letal.

Em todos os cortes desta figura, os baços dos animais iNOS^{-/-} apresentaram alta celularidade e baixa freqüência de destruição tecidual, de maneira alternativa aos controles. Apesar deste fato, a distinção entre os limites das polpas branca e vermelha perdeu a definição durante os dias de experimento. Os cortes histológicos mostram desorganização tecidual, agregados de hemácias no 4º dia de experimento e depósitos fibrosos freqüentes, mais definidamente observáveis ao 8º dia de experimento. Assim a ausência de produção de iNOS parece estar relacionada com menor destruição tecidual nos dois tecidos hematopoiéticos estudados, mesmo a 8 Gy.

Figura 12: Histologia de medulas ósseas femorais de camundongos $iNOS^{-/-}$ irradiados a 8 Gy. Os animais foram sacrificados nos marcos temporais indicados na figura (2°, 4° e 8° dias após a irradiação). Setas (→) indicam as regiões de regeneração estromal, com a

formação de cordões celulares; asteriscos (*) indicam regiões de agregação de hemácias infiltradas no tecido.

Os achados histológicos de medulas ósseas femorais de animais iNOS^{-/-} podem ser vistos na Figura 12, antes e depois da irradiação com 8 Gy. Assim como observado nos cortes histológicos das medulas ósseas femorais dos controles, as medulas ósseas femorais dos animais iNOS^{-/-} exibem redução aguda da celularidade no 2º dia após a irradiação, mas com maior número e preservação de células ainda residentes no tecido quando comparado aos controles, com formação mais intensa de cordões estromais durante o decorrer do experimento, sendo bastante expressiva no 8º dia após a irradiação. Também foi observada adesão de hemácias no tecido em torno das células estromais, provavelmente associados a ativação local de plaquetas, em escala maior que em controles, praticamente sem células na medula neste período.

No 2º dia de experimento observa-se perda de elementos nucleados e presença de hemácias livres, sugerindo quadro hemorrágico pós-irradiação, com certa desorganização do tecido, com estroma difuso. No 4º dia após a irradiação, os cortes ainda mostraram alta frequência de hemácias livres, mas o número de elementos nucleados tem intensa participação, formando lagos de hemácias, com revestimento de células estromais. Há início de organização estromal, representada por cordões celulares em formação. As figuras referentes ao 8º dia de experimento mostram organização tecidual em ascensão, com número reduzido de hemácias, provavelmente devido à contenção das micro hemorragias pós-irradiação e elevada frequência de células nucleadas. Há claramente a reconstituição da camada estromal adjacente ao perióstio, bem como o aumento do número e da ramificação dos cordões de células estromais. A celularidade é expressivamente maior que a encontrada nos animais controle.

Figura 13: Produção de mRNA de CXCL12 em relação a β -actina, em camundongos $iNOS^{-/-}$ irradiados a 8 Gy. Em (a) baços dos camundongos e (b) medulas ósseas femorais.

A avaliação da expressão de mRNA codificador para CXCL12 também foi avaliada no modelo com ausência de $iNOS$, na intenção de relacionar a produção de óxido nítrico e a capacidade de alojamento de células tronco ativada por CXCL12.

A Figura 13 mostra a evolução da produção de mRNA codificador para CXCL12 nos camundongos $iNOS^{-/-}$. Observa-se no 2º dia após a irradiação, aumento considerável da expressão de mRNA de CXCL12, retornando a níveis próximos ao do controle até o final do experimento, mas sem desaparecimento. Nos animais controle irradiados, este aumento é mais tardio, no 4º dia de experimento, com manutenção nos períodos subsequentes a um patamar acima do normal no 8º dia. Nas medulas ósseas femorais dos camundongos $iNOS^{-/-}$ há aumento mais constante até o 4º dia após irradiação, atingindo novamente um patamar de normalidade no 8º dia pós-irradiação. Em ambos os órgãos hematopoiéticos, pôde-se observar claramente um aumento da produção de mRNA para CXCL12 a partir do 2º dia pós irradiação, atingindo um pico no 4º dia e declinando para valores basais no 8º dia pós irradiação. Este aumento foi mais precoce nos animais $iNOS^{-/-}$ que em seus controles.

5.4 Dano Hematopoiético Pós-Irradiação em Animais Tratados com Aminoguanidina (AG).

A inibição da síntese de iNOS pode ser obtida pela administração oral de aminoguanidina (AG), um inibidor competitivo e seletivo para a enzima induzível de macrófagos. Como descrito em métodos, grupos de animais irradiados receberam aminoguanidina via oral em todos os dias do experimento, buscando avaliar o efeito da inibição da iNOS no dano hematopoiético induzido pela radiação. Camundongos foram irradiados a 4 e 8 Gy, e o impacto das exposições nos parâmetros hematimétricos foi representado na Figura 14.

Figura 14: Índices hematimétricos de camundongos C57Bl/6J com aminoguanidina e irradiados a 4 ou 8 Gy. Em (a) observa-se as contagens de hemácias dos animais testados, e (b) exibe as contagens de plaquetas. Barras representam EPM e a área sombreada os valores normais.

Na Figura 14a, observou-se que a contagem de hemácias do sangue periférico dos camundongos tratados e irradiados difere no 2º dia após a irradiação. Animais irradiados a 4 Gy apresentam aumento do número de hemácias neste ponto, enquanto que os animais irradiados com 8 Gy apresentam um decréscimo mais linear desta população. Os dois modelos mostram uma evolução semelhante a partir do 4º dia,

com valores hematimétricos inferiores a controles saudáveis irradiados. As contagens de plaquetas do sangue periférico, mostradas na Figura 14b, mostraram que em geral, o número de plaquetas mostra uma queda menos evidente com o uso de AG após a irradiação, sendo o fenômeno mais evidente nos primeiros períodos após a irradiação, entre o 2º e 4º dias, inclusive com alguma resposta compensatória no 4º dia em animais irradiados com 4 Gy. Assim, os dados hematimétricos mostram uma discreta proteção contra perda de plaquetas com a administração de AG após a exposição à radiação.

Figura 15: Histologia de baços de camundongos C57Bl/6J tratados via oral com aminoguanidina-hemissulfato (2g/L *ad libitum*) irradiados 8 Gy. Os animais foram sacrificados nos marcos temporais indicados na figura (2°, 4° e 8° dias após a

irradiação). Setas (➡) indicam regiões de destruição tecidual; asteriscos (*) indicam regiões de depósitos fibrosos e estrelas (★) indicam a presença de hemossiderina

A avaliação histológica dos órgãos hematopoiéticos colhidos dos animais tratados com aminoguanidina e irradiados a 8 Gy, é mostrada nas Figuras 15 e 16.

Os baços dos animais AG (Figura 15) apresentaram menor destruição tecidual do que a observada nos animais controle irradiados na mesma dose. Da mesma forma que os animais $iNOS^{-/-}$, o grupo tratado apresentou (ainda que em menor número) a presença de regiões de fibrose, observáveis até o 2º dia de experimento. A presença de hemossiderina, indicando atividade macrofágica e de destruição de hemácias também foi presente no 8º dia após a irradiação. A celularidade esplênica sofreu queda significativa no 2º dia de experimento, mas com recuperação considerável no 4º dia. Há um aumento relativo da polpa vermelha a partir do 4º dia, com atividade fagocítica importante e início de atividade hematopoiética esplênica neste e no 8º dia.

A desorganização e queda de celularidade da polpa branca foi evidentemente menor do que a encontrada nos animais-controle já descrita, como certa manutenção da distinção entre as polpas branca e vermelha, e em menor escala, no 8º dia.

Apesar da presença de focos de destruição tecidual, a queda de celularidade e o aparecimento de locais com caráter morfológico inflamatório foi bem menos freqüente que nos controles. No 2º dia após a irradiação, observa-se ainda uma estrutura morfológica vascular endotelial íntegra, mostrando que a destruição vascular foi menos significativa que a observada em animais controle. Houve menor quantidade de hemácias agrupadas e infiltradas no tecido, mais freqüentes no modelo $iNOS^{-/-}$ e de focos de hematopoiese identificados por áreas de proliferação celular bastante organizadas observáveis a partir do 4º dia após a irradiação. A ocorrência de fibrose foi bem menos intensa que em animais $iNOS^{-/-}$. O baço mostrou menor evidência de dano relacionado à radiação do que nos controles analisados, suportando a importância da inibição de iNOS nos processos de recuperação esplênica observados.

Figura 16: Histologia de medulas ósseas femorais de camundongos C57Bl/6J tratados via oral com aminoguanidina-hemissulfato (2g/L *ad libitum*) irradiados a 8 Gy. Os animais foram sacrificados nos marcos temporais indicados na figura (2°, 4° e 8° dias após a

irradiação). As setas (➔) mostram a presença de células estromais organizadas em cordões no tecido; asteriscos (*) indicam a presença de elementos nucleados.

A histologia das medulas ósseas femorais dos camundongos AG pode ser vista na Figura 16. Observa-se queda de celularidade em todos os dias de experimento, mas em menor escala que a observada em animais não tratados. No 2º dia de irradiação foi possível observar poucos, porém bem distintos, elementos nucleados dispostos em cordões estromais, encontrados em animais não tratados apenas no 4º dia. A recuperação da celularidade segue até o 8º dia de experimento, quando o tecido apresenta estas estruturas estromais semelhantes a medulas dos animais *iNOS*^{-/-}. A exemplo do observado nos baços, a frequência de hemácias aderidas no estroma é baixa, ao contrário dos animais *iNOS*^{-/-}. A administração de aminoguanidina tem efeito protetor sobre a recuperação da medula óssea no modelo letal de exposição à radiação ionizante, aparentemente possibilitando o crescimento de estroma novo, servindo de suporte para o alojamento e diferenciação celular.

Figura 17: Produção de mRNA de CXCL12 em relação à β-actina em camundongos C57Bl/6J tratados via oral com aminoguanidina e irradiados a 8 Gy. Em (a) baços dos camundongos e em (b) medulas ósseas femorais.

A expressão de mRNA de CXCL12 foi avaliada no grupo AG e irradiado a 8 Gy. Em baço, ocorre um aumento da produção de mRNA em onda a partir do 2º dia após a irradiação, menos evidente na medula óssea. Este padrão foi semelhante ao encontrado no modelo *iNOS*^{-/-}, onde a produção da quimiocina ocorre já no 2º dia, diferente dos controle, onde o início da produção é no 4º dia. Os valores produzidos de

mRNA de CXCL12 foram proporcionalmente elevados, mas não ocorreram da mesma forma na medula óssea onde uma produção maior foi detectada apenas no 4º dia após irradiação.

Figura 18: Proporção de células de fenótipo CD34⁺ em baços e medulas ósseas femorais de camundongos C57Bl/6J tratados com aminoguanidina e irradiados a 4 ou 8 Gy, em relação às frequências observadas em controles irradiados. Em (a) observa-se as frequências observadas nos baços dos animais tratados e em (b), nas medulas ósseas femorais. A área sombreada mostra a faixa de valores de animais controle não-irradiados e normais.

O estudo da proporção de células CD34⁺ em animais tratados com AG e expostos a radiação pode ser vista na Figura 18. Nas duas doses utilizadas, a proporção de células cresceu rapidamente no 2º dia e 4º dia no baço, antes dos achados em animais não tratados e de forma mais intensa. Esta proporção manteve-se mais elevada nos baços até mesmo no 8º dia após a irradiação com 4 Gy. Doses maiores de radiação provocaram fenômenos semelhantes de menor intensidade e com comprometimento terminal da população CD34⁺ após 8 dias de irradiação. Em medula óssea, a onda de células CD34⁺ foi mais curta e intensa, estando significativa apenas no 2º dia da irradiação. Nos dias subsequentes houve uma queda da proporção destas células, neste órgão hematopoiético.

5.5 Dano Hematopoiético Pós-Irradiação em Animais Tratados com CXCL12

A administração da forma sintética de CXCL12 murina foi utilizada como fator de recuperação hematopoiética, para avaliar se uma suplementação da quimiocina interferiria com alojamento e proliferação celular em sítios hematopoiéticos. Grupos de animais normais foram irradiados com 4 e 8 Gy e suplementados com a quimiocina, na dose de 1 µg/animal/dia, realizada entre os dias 1º e 4º após a irradiação sendo que seus valores hematimétricos podem ser observados na Figura 19. A evolução da queda dos valores hematimétricos foi semelhante nas nos dois modelos de exposição experimentados, mantendo-os em níveis próximos. Houve uma queda brusca no número de hemácias periféricas dos camundongos até o 2º dia, seguida de estabilização leve entre o 4º dia e o 8º dia de experimento, tanto para 4 quanto para 8 Gy. As plaquetas mostraram uma evolução semelhante, com redução acelerada no número de plaquetas do sangue periférico até o 2º dia, seguida de suave e constante recuperação até o final do experimento nas duas doses experimentadas. As curvas de contagens, tanto de hemácias quanto de plaquetas, apresentam certa semelhança estatística aparentemente pouco dependente da dose de exposição, mostrando que a suplementação da quimiocina tem um efeito de redução da morbidade decorrente da exposição a doses letais de radiação, mantendo os índices hematimétricos próximos aos níveis observados nos animais irradiados em dose moderada a severa.

Figura 19: Índices hematimétricos de camundongos C57Bl/6J tratados com CXCL12 e irradiados a 4 ou 8 Gy. Em (a) observa-se as contagens de hemácias dos animais

testados, e (b) exibe as contagens de plaquetas. Barras representam EPM e a área sombreada os valores normais.

Em comparação com os controles, as contagens de hemácias do sangue periférico dos camundongos tratados exibiram diferenças significantes. Na Figura 20a estão representadas as contagens de hemácias de camundongos irradiados a 4 Gy, e pode-se observar que até o 2º dia houve queda brusca nas contagens, discreta recuperação até o 4º dia e manutenção do número em patamar semelhante aos controles até o 8º dia após a irradiação. Nos camundongos irradiados a 8 Gy (Figura 20b), observou-se que as variações nas contagens exibiram perfil diferenciado ao com maior número de hemácias no 8º dia após irradiação. O número de hemácias periféricas estabilizou-se num nível maior que o observado nos controles nos animais irradiados a 8 Gy, mostrando certa capacidade positiva da administração de CXCL12 na restauração da celularidade sangüínea ou produção suficiente de CXCL12 em doses menores de irradiação.

Figura 20: Contagens de hemácias do sangue periférico obtidas de camundongos C57Bl/6J tratados com CXCL12 e irradiados a 4 (a) ou 8 Gy (b) em comparação com grupos controle nas mesmas doses. Barras representam EPM e a área sombreada os valores normais.

A exemplo das contagens de hemácias, também observamos redução aguda no número de plaquetas periféricas até o 2º dia após a irradiação, tanto em animais irradiados a 4 Gy (Figura 21a) quanto a 8 Gy (Figura 21b). Novamente, as contagens obtidas a partir dos camundongos apresentaram grande similaridade, de maneira aparentemente independente da dose de radiação. Tanto a 4 Gy quanto a 8 Gy, as contagens de plaquetas do sangue periférico exibiram leve recuperação a partir do 4º

dia após a irradiação, terminando ao 8º dia em níveis superiores aos observados nos animais controle. O efeito da quimiocina foi mais marcante sobre a capacidade de produção de plaquetas.

Figura 21: Contagens de plaquetas do sangue periférico obtidas de camundongos C57Bl/6J tratados com CXCL12 e irradiados a 4 (a) ou 8 Gy(b) em comparação com grupos controle nas mesmas doses. Barras representam EPM e a área sombreada os valores normais.

Na Figura 22, observamos as proporções de células CD34⁺ encontradas em baços e medulas de animais suplementados com CXCL12. A suplementação de CXCL12 induziu uma resposta quantitativamente maior na instalação de células CD34⁺ em baços, em ambas as doses estudadas, mas o efeito foi mais evidente na dose de 8 Gy. Em medula óssea, houve uma disparidade de resultados, já que a irradiação por si só já induziu um aumento na proporção de células CD34⁺ que foi amplificado pela suplementação de CXCL12 em tempos maiores, como no 8º dia após a irradiação. O efeito não foi evidente na dose de 8 Gy, talvez pela menor celularidade medular encontrada nestes animais, que pode ter dificultado os estudos de citometria de fluxo.

Figura 22: Proporção de células CD34⁺ em baços e medulas ósseas femorais de camundongos C57Bl/6J tratados com CXCL12 e irradiados a 4 ou 8 Gy, em relação a controles irradiados, sem tratamento. Em (a) baços dos animais e em (b), nas medulas ósseas femorais. A área sombreada mostra a faixa de valores de animais controle não-irradiados e normais.

5.6 Dano Hematopoiético Pós-Irradiação em Animais Tratados com CXCL12 e Aminoguanidina

Para completar as intervenções terapêuticas sobre os animais, estudamos os efeitos conjuntos da administração do inibidor de iNOS e da suplementação da quimiocina em grupos de animais irradiados com 4 e 8 Gy, como descrito em métodos.

Os valores hematimétricos sequenciais destes animais podem ser vistos na Figura 23. As contagens de hemácias (Figura 23a) mostraram um padrão similar aos dos animais que receberam apenas a suplementação da quimiocina. A queda expressiva da celularidade até o 2º dia é seguida de estabilização até o 8º dia para as duas doses utilizadas, com discreto aumento no 4º dia encontrado nos animais irradiados a 8 Gy. Os valores semelhantes para hemácias independentemente da dose de radiação reforçam o conceito de que a quimiocina é mais importante nas doses maiores de radiação.

As contagens de plaquetas exibiram padrões diferentes de dano hematopoiético, como pode ser visto na Figura 23b. Os animais irradiados a 4 Gy exibiram queda até o 4º dia após a irradiação, seguida de manutenção do número até o 8º dia de experimento. Os animais irradiados a 8 Gy não mostraram queda no número de plaquetas periféricas até o 2º dia após a irradiação. No entanto, exibiram em seguida uma redução no número de plaquetas periféricas, levando a valores próximos aos dos obtidos nos animais irradiados a 4 Gy até o final do experimento. A administração concomitante de CXCL12 sintética e aminoguanidina parece ter efeito relevante no número de plaquetas do sangue periférico em animais irradiados a doses letais de radiação ionizante, mas não um efeito sinérgico, mas uma somatória de eventos.

Figura 23: Índices hematimétricos de camundongos C57Bl/6J tratados com CXCL12 e aminoguanidina, irradiados a 4 ou 8 Gy. Em (a) contagens de hemácias dos animais testados, e (b) contagens de plaquetas. Barras representam EPM e a área sombreada os valores normais.

Figura 24: Contagens de hemácias do sangue periférico obtidas de camundongos C57Bl/6J tratados com CXCL12 e aminoguanidina, irradiados a 4 (a) ou 8 Gy (b) em comparação com grupos controle nas mesmas doses. Barras representam EPM e a área sombreada os valores normais.

Observou-se também as quantidades de hemácias periféricas dos camundongos tratados, em relação aos controles. A Figura 24a mostra que, nas irradiações a 4 Gy, o número de hemácias sofre queda até o 2º dia após a irradiação e mantém-se constante até o 8º dia em nível mais baixo que o encontrado nos controles.

A 8 Gy (Figura 24b) observa-se o mesmo efeito, mas com manutenção do número de hemácias numa quantidade superior a dos controles no final do experimento.

Figura 25: Contagens de plaquetas do sangue periférico obtidas de camundongos C57Bl/6J tratados com CXCL12 e aminoguanidina, irradiados a 4 (a) ou 8 Gy (b) em comparação com grupos controle nas mesmas doses. Barras representam EPM e a área sombreada os valores normais.

A análise do número de plaquetas periféricas dos camundongos tratados mostra pouca diferença estatística entre animais controle e tratados nas irradiações a 4 Gy (Figura 25a), com queda constante e redução do número de plaquetas a um nível semelhante ao do controle no 8º dia após a irradiação. A 8 Gy (Figura 25b), a quantidade de plaquetas do sangue periférico mantém-se constante até o 2º dia após a irradiação nos animais tratados. A partir deste dia, as contagens entram em declínio, igualando-se no 8º dia aos níveis encontrados no controle.

Figura 26: Proporção de células de fenótipo CD34⁺ em baços e medulas ósseas femorais de camundongos C57Bl/6J tratados com CXCL12 e aminoguanidina, irradiados a 4 ou 8 Gy, em relação a controles não-tratados. Em (a) baços dos animais, em (b), medulas ósseas femorais. A área sombreada mostra a faixa de valores de animais controle não-irradiados e normais.

Os estudos de proporção de células CD34⁺ em baços e medulas ósseas de animais tratados com os dois agentes podem ser vistos na Figura 26. Os resultados mostraram apenas que a associação da suplementação da quimiocina e AG não teve o mesmo efeito que cada um dos agentes isolados, pelo contrário parece ter havido uma interação negativa dos agentes, resultando em menor número de células CD34⁺ nos animais tratados conjuntamente, na dose de 4 Gy de irradiação, tanto para baço como para medula óssea. Na dose maior de radiação com 8 Gy, os efeitos benéficos iniciais da dose isolada de cada agente foi ineficiente na celularidade esplênica, embora com efeito transitório na medula óssea. Os estudos utilizando apenas a proporção de células podem ser ineficientes na tradução dos efeitos de cada um dos agentes estudados, já que os valores hematimétricos globais mostram uma resposta mais favorável dos que os achados específicos em baço e medula.

6. DISCUSSÃO

A irradiação de corpo inteiro possibilitou a padronização de modelos experimentais murinos com observação das respostas proliferativas de células CD34⁺ encontradas nos órgãos hematopoiéticos estudados. Os modelos mostraram-se reprodutíveis mesmo com certa variação na celularidade dos órgãos dos animais irradiados.

Nos dados obtidos por este estudo, as doses de 4 Gy e 8 Gy mostraram um comprometimento medular e esplênico divergente, com mortalidade mais expressiva entre os animais irradiados nas doses maiores, sendo que na dose letal todos os animais morriam após a irradiação, enquanto que a 4 Gy, a grande maioria dos animais sobrevivia, concordante com os achados semelhantes na literatura, considerando que a linhagem murina utilizada apresenta certa radorresistência, no tocante à regulação da apoptose radioinduzida (LINDSAY *et al.*, 2007).

Os valores hematimétricos nestes modelos mostraram queda acentuada após a irradiação, com recuperação evidente somente nos modelos não letais, ou tratados ou deficientes para a expressão de iNOS e IFN- γ . Dada a ausência de material genético, o número de hemácias e plaquetas circulantes após a exposição à irradiação depende da reposição pelo *turnover* celular e do consumo periférico a que estas entidades hematológicas possam estar submetidas. Os dados histológicos obtidos mostraram baixa celularidade nos tecidos analisados, o que levou ao quadro de redução da função hematopoiética geral nos modelos utilizados, não sendo possível o *turnover* normal de células maduras para a circulação periférica tanto a partir do baço (HARRINGTON *et al.*, 1997) quanto da medula óssea (FLIEDNER *et al.*, 2002). Em humanos adultos, o ambiente esplênico caracteriza-se como espaço de diferenciação e proliferação de populações celulares de funções polarizadas a respostas imunológicas adaptativas (BRENDOLAN *et al.*, 2007), mostrando pobre caráter hematopoiético global, salvo em casos de hematopoiese extramedular (O' MALLEY, 2007), enquanto que hematopoiese esplênica é típica de camundongos durante todo o curso da vida do animal (MOORE, 2004).

A meia-vida dos eritrócitos murinos no sangue periférico é estimada sendo entre 20 a 30 dias (CAR & ENG, 2001), e a taxa de destruição eritrocítica no órgão responsável, o baço, foi descrita numa faixa compreendida entre 6,7 (LINDSEY *et al.*, 1966) e 10% (OLDENBORG *et al.*, 2001) no espaço de 24h. Durante os oito dias de

experimentos, a quantidade de hemácias circulantes dos animais testados foi reduzida mais rapidamente que a taxa convencional acima descrita, o que pressupõe um aumento no consumo periférico. Isto poderia ser devido a deformação da membrana dos eritrócitos, como as decorrente de danos ao citoesqueleto, e descritas na infecção malárica (SHELBY *et al.*, 2003), fato que aumentaria a retenção de hemácias no tecido esplênico (KRÜCKEN *et al.*, 2005). No entanto, a queda no número de eritrócitos dos animais controle não pode ser relacionada a alterações na membrana celular, uma vez que as doses utilizadas são significativamente menores que o limite de dose que acarreta este fenômeno (AMÂNCIO, 1998). Nos estágios finais dos experimentos analisados, houve ocorrência de bilirrubina aumentada na urina dos animais (dados não mostrados) e deposição de pigmento no baço, sugerindo que há uma perda aumentada de eritrócitos talvez por uma maior captura de eritrócitos no baço, mas que não se correlaciona diretamente com a queda na contagem no sangue periférico.

Por sua vez, as plaquetas do sangue periférico possuem vida média de aproximadamente cinco dias no sangue circulante (AULT & KNOWLES, 1995), espaço de tempo em que sua população é submetida a uma taxa homeostática de destruição de cerca de 10% ao dia (BERGER *et al.*, 1998). A queda de cerca de 50% nas contagens até o 2º dia após a irradiação nos animais controle também não mostra relação com a baixa função hematopoiética dos modelos estudados, pois, a exemplo dos eritrócitos, as quedas no número de plaquetas ocorrem em taxa bem maior que a esperada em animais não-irradiados, sobrepujando a falta de *turnover* e indicando seqüestro e/ou inativação destas entidades hematológicas em eventos sistêmicos pós-irradiação. Doses letais de radiação ionizante causam rompimento dos capilares sinusóides da medula óssea cranial em camundongos, levando ao derramamento de células hematopoiéticas ao interior das trabéculas ósseas medulares, além do fato de que o aumento agudo no aporte celular nestes sítios reduz consideravelmente o fluxo sangüíneo e o calibre venular, causando acúmulo celular ainda maior (MAZO *et al.*, 1998). Além disso, pode haver vasoconstrição local devido à liberação de sinalizadores inflamatórios (MAZO *et al.*, 2002), também reduzindo o débito vascular e conseqüentemente a circulação dos elementos sangüíneos.

Em modelos experimentais de exposição à radiação foram descritos danos na camada endotelial dos capilares, desencadeados pela exposição a este agente, (ROTH *et al.*, 1999), levando à exposição da matriz extracelular e conseqüentemente à adesão de plaquetas, com queda dos valores circulantes. Além deste fato, a irradiação de corpo inteiro em dose moderada a severa induz expressão aumentada de E-selectina até 3 horas após a irradiação, e VCAM-1 (*Vascular cell adhesion*

molecule-1), ativando mecanismos de adesão celular e levando ao consumo periférico encontrado (QUARMBY *et al.*, 1999) com duração de ao menos 48 horas após a exposição. Estas alterações endoteliais poderiam explicar o consumo de plaquetas observado nos primeiros dias após a irradiação em nossos modelos.

A radiação ionizante é um reconhecido agente deletério das funções hematopoiéticas, tanto em humanos quanto em modelos experimentais. Todos os modelos propostos apresentaram queda significativa do número de hemácias e plaquetas até o 2º dia após as irradiações, tanto nos animais irradiados a 4 Gy quanto a 8 Gy, demonstrando um tempo de resposta compensatória hematopoiética divergente entre os grupos irradiados nas diferentes doses durante o decorrer do experimento.

A celularidade total dos dois órgãos observados sofreu queda expressiva durante as primeiras 48 horas após a irradiação. Observou-se que a queda na celularidade esplênica foi menor que a medular, tendo em vista o menor compartimento proliferativo deste órgão, composto tanto de parte linfóide como de rede de filtração. Isto está em conformidade com a lei de Bergonie-Tribondeau, que cita a maior capacidade de reprodução mitótica como fator de incremento de radiosensibilidade. Por ser um órgão composto por vários tipos celulares (MEBIUS & KRAAL, 2005), a radiosensibilidade do tecido como um todo varia. As populações linfocíticas e precursoras hematopoiéticas apresentam-se com menor radiorresistência que a mostrada pelas populações macrófágicas, localizadas na zona marginal e na rede estromal da polpa vermelha (LYONS & PARISH, 1995).

Mesmo com a medula óssea sendo um órgão difuso, estudos utilizando apenas a medula óssea femoral possuem alto grau de representatividade, pois existe forte relação de equilíbrio fisiológico entre todas as subunidades ósseo-hematopoiéticas (SCHWARZENBERGER *et al.*, 2002). Desta forma, o uso das amostras obtidas das células da medula femoral utilizados em nossos experimentos fornecem dados consistentes sobre a hematopoiese pós-irradiação.

Já foram descritos modelos de aumento de atividade macrófágica em órgãos parenquimatosos após a irradiação, provavelmente pela indução de apoptose maciça em grupos celulares (LORIMORE *et al.*, 2001), levando à ativação de macrófagos no intuito de retirada de restos celulares (IBUKI & GOTO, 2004). Porém, a atividade e número de macrófagos esplênicos após a exposição à radiação ionizante não varia de forma significativa em doses até 7Gy, ou seja, em doses em que já há um compromisso intenso das suas frações linfóides e hematopoiéticas (PECAUT *et al.*,

2001). A radiorresistência deste tipo celular é bem conhecida, chegando a aproximadamente 100Gy para macrófagos peritoneais (TASAT *et al.*, 2002). Além deste fato, são células capazes de produzir uma cascata de eventos inflamatórios efetores como liberação de IL-1 β (ISHIHARA *et al.*, 1995), TNF- α (MCKINNEY *et al.*, 1998) e ativação por IFN- γ (HELD *et al.*, 1999), por estímulos variados, incluindo a radiação ionizante.

No caso da exposição à radiação ionizante, a ativação destas células é diretamente ligada à liberação de NO. Além disso, a região promotora do gene que codifica a iNOS possui regiões homólogas às ativadas pela ligação de fatores de transcrição inflamatórios, em especial NF- κ B. A liberação deste fator é também responsável pela ativação da produção de IFN- γ , constituindo um sistema significativo de retro alimentação. Neste contexto, a liberação de NO e IFN- γ por macrófagos resulta em maior ativação destes (YOO *et al.*, 2000).

Uma das evidências observadas da ativação de macrófagos ou atividade fagocítica nos tecidos analisados foi a presença de intensa fagocitose de pigmento de hemossiderina em baço, visível no 8º dia após exposição a 8 Gy

Os dados histológicos mostraram que doses letais de radiação ionizante são responsáveis por vasta destruição tecidual e conseqüente disseminação de focos de inflamação, relacionados provavelmente à atividade fagocítica local, ativada pela destruição tecidual *per se*.

Os achados esplênicos são discretos em relação ao comprometimento da medula óssea induzido pela radiação. Há um completo despovoamento de populações reprodutivas observado até o 2º dia, restando apenas a população óssea, seguida de recuperação parcial com focos hematopoéticos até no grupo letal, mas aparentemente insuficiente para a demanda de reposição de elementos celulares.

Após a irradiação a 8 Gy, o tecido esplênico mostrou que existe retomada da celularidade a partir do 4º dia, ou seja, ao mesmo tempo em que a expressão de CXCL12 atingiu seu valor máximo durante o experimento. A indução de dano ao DNA celular, seja por quimioterápicos ou por dose moderada de radiação ionizante (3,75 Gy) leva à expressão aumentada de CXCL12 em linhagens estromais murinas, atingindo seu máximo em 48h após o estímulo (PONOMARYOV *et al.*, 2000), mostrando fenômenos que remetem ao efeito de estímulo de hospedagem celular. Esta cadeia de eventos pode corroborar os dados da irradiação em dose moderada dos animais do grupo controle, que apresenta máxima frequência de fenótipo CD34⁺

nas medulas ósseas femorais, exatamente neste dia após a irradiação. Em algumas circunstâncias apresentadas, o dano radioinduzido ao DNA pode indiretamente estimular a migração de populações progenitoras hematopoiéticas a sítios de proliferação e diferenciação, mas isso depende da sobrevivência deste grupo celular.

Apesar da severidade ou letalidade das doses utilizadas, pode-se inferir que o aumento de células CD34⁺ nos órgãos hematopoiéticos dos modelos irradiados a 4 Gy deve-se à expressão aumentada de CXCL12, atraindo células que possuem este fenótipo, mas apresentam radorresistência aumentada e expressão ativada de uma grande diversidade de genes antiapoptóticos, assim como demonstrado por outro trabalho utilizando um modelo de exposição moderada (2,5Gy) de primatas não-humanos. Isto foi analisado em estudos de conjuntos de genes ativados após a radiação onde os genes relacionados ao eixo CXCL12 tiveram aumento expressivo (MAHMUD *et al.*, 2005)

De forma alternativa, as medulas ósseas femorais apresentam celularidade mais expressiva apenas no 8º dia, quando o nível de expressão da quimiocina mostrou-se menor que nos controles não-irradiados. A inversão da relação entre nível de expressão de CXCL12 e celularidade entre os órgãos estudados deve-se ao fato de que, na medula óssea, a atração e permanência de células não dependem apenas da ligação do eixo CXCL12-CXCR4, mas como também das interações entre VCAM-1 – VLA-4, CD44 – Ácido Hialurônico ICAM-1 – LFA-1 (STEIDL *et al.*, 2003), cuja expressão é reconhecidamente afetada após a irradiação, assim como descrito anteriormente. A função da CXCL12 é dependente de gradiente de concentração, que em intensidades baixas ampara a hospedagem de células mas com o aumento de concentração induz a saída de populações celulares por competição com os receptores celulares (MURPHY *et al.*, 2007). A expressão de CXCL12 na medula óssea pode ter o efeito de mobilização de células progenitoras, liberando-as para a corrente sangüínea (NERVI *et al.*, 2006). Alternativamente, no tecido esplênico, a menor concentração relativa de CXCL12 tem o efeito de promover o alojamento, ancorando as populações progenitoras no estroma, onde, sob condições normais, seguiriam com os processos de diferenciação e proliferação celulares em níveis fisiológicos (SUGIYAMA *et al.*, 2006; LI & LI, 2006).

Após a exposição à radiação e para eficiência, o efeito de CXCL12 aumentada no organismo deve dispor de células passíveis de serem hospedadas ou pode tornar-se deletério, fazendo com que as células mobilizadas a partir da medula óssea alojem-

se no tecido esplênico, que se encontra sob forte atividade inflamatória, tornando o nicho agressivo para a proliferação celular.

A frequência de células CD34⁺ não sofreu alterações significativas nos baços dos animais controles irradiados a 8 Gy até o final do experimento, exceto discreto aumento no 4º dia. No entanto, uma resposta proliferativa compensatória foi observada até o 4º dia após a irradiação a 4 Gy, em concomitância com o dia de maior expressão esplênica de CXCL12, observada mas inconseqüente nos animais irradiados a 8 Gy. Estes eventos foram também evidentes na medula óssea.

Aparentemente, a variação do número de células progenitoras hematopoiéticas livres nos órgãos hematopoiéticos não está diretamente relacionada ao número de células maduras circulantes, mas à reposição deste contingente, que ocorre em fases subseqüentes do processo. A população de células CD34⁺ participa nas fases iniciais da reposição de células do sangue, com rápida diferenciação e perda do fenótipo. Isto dificulta a relação quantitativa dos eventos iniciais hematológico com as fases subseqüentes com células diferenciadas, mas é fenômeno importante na demonstração inicial dos eventos de repopulação dos órgãos hematopoéticos após a exposição, sendo parâmetro importante na avaliação da capacidade hematológica dos modelos durante a fase aguda dos efeitos desencadeados após a exposição à radiação ionizante.

Estudos sobre colonização de células pós-danos hematopoiéticos causados por irradiação ionizante mostraram que existe uma resposta emergencial de ampliação da capacidade hematopoiética em camundongos que receberam células-mãe hematopoiéticas por via intravenosa. Utilizando experimentos de 30 dias, foi demonstrado que existem duas subpopulações distintas em relação à sua morfologia e à expressão de marcadores de superfície específicos (LANZKRON *et al.*, 1999). A proliferação de certos tipos celulares de *stem cells* na medula óssea destes animais se inicia mais tardiamente, cerca de 24h após a irradiação (SZILVASSY *et al.*, 1999). Nos baços dos animais testados observou-se o início da proliferação de células CFU-S (*Colony Forming Units – Spleen* ; Unidades Formadoras de Colônia no Baço) poucas horas após o transplante, processo que perdura por 8 a 12 dias (SCHWARZENBERGER *et al.*, 2002).

Em nossos modelos, a produção de CXCL12 manteve uma relação adequada com o alojamento de células no baço, mas seu comportamento foi mais discreto na medula óssea. A suplementação de CXCL12 resultou num

aumento de alojamento de células CD34⁺ nos baços, mostrando efeito mais discreto em animais irradiados com doses maiores. Na medula óssea a suplementação somente auxiliou na doses menores de radiação, mantendo níveis semelhantes aos dos controles nos animais irradiados na dose letal.

Este efeito é compatível com os achados descritos, que dizem que um gradiente da quimiocina pode tanto promover o alojamento como a mobilização das células precursoras, dependente de cada órgão e do gradiente de quimiocina associado a matriz extracelular (RATAJCZAK *et al.*, 2006)

Os valores hematimétricos obtidos na suplementação de CXCL12 mostram que tanto na dose moderada quanto na severa, o número de hemácias e plaquetas mantêm-se em níveis próximos nos animais tratados e controles, fenômeno observado a partir da contagem de partículas e células no sangue periférico circulantes, mesmo com efeitos marcantes no número de células progenitoras CD34⁺ presentes nos ambientes hematopoiéticos estudados. Isto pode ser devido ao fato de que estas células vão gerar os precursores que vão repor as células perdidas, num processo temporal que ultrapassa o período de estudo utilizado, mostrando a urgência da recuperação hematopoiética precoce. Apesar de equiparar os efeitos da radiação ionizante em diferentes doses nos parâmetros hematimétricos, a suplementação de CXCL12 não mostrou vantagem na evolução do quadro hematopoiético no que se refere às proporções de populações progenitoras CD34⁺ nos estágios finais do período de estudo.

A suplementação de CXCL12 mostrou vantagem pouco efetiva na resposta hematológica após a exposição à radiação em medula óssea. Observou-se que nos controles não-tratados irradiados a 4 Gy houve uma resposta compensatória que aumentou a proporção de células CD34⁺ na medula óssea no 2º dia após a irradiação e o uso de CXCL12 inibiu este efeito, postergando este aumento até o 4º dia após a exposição, num nível menos intenso. Em baços, o efeito de alojamento de células CD34⁺ induzido pela suplementação de CXCL12 é mais evidente, tanto no período inicial como final em ambas as doses.

Poucos estudos têm sido feitos sobre estas quimiocinas ou mesmo células CD34⁺ em modelos de radiação, o que dificulta a compreensão dos fenômenos atribuíveis a sua ação, mas é possível que o gradiente de CXCL12 pode ser diferente

nos dois órgãos estudados, medula óssea e baço, que explicaria o aparente efeito discrepante da suplementação da quimiocina na medula óssea e no baço. Este gradiente diferente poderia estar relacionado ao conteúdo de matriz extracelular de cada órgão, muito maior em medula óssea, que é descrito como crucial na ação da quimiocina (NETELENBOS *et al.*, 2002).

Todos os eventos acima relacionados mostram que a sobrevivência das células precursoras é grandemente afetada após a exposição à radiação ionizante e que a quimiocina CXCL12 participa do processo. Um dos efeitos mais complexos da radiação são os efeitos colaterais que ocorrem, como uma resposta patológica do organismo ao efeito da radiação envolvendo um contingente celular que não foi afetada pela radiação, mas que será afetado pelos mecanismos de resposta do hospedeiro ao insulto.

A principal população celular responsável pelo alojamento de células precursoras na medula óssea está vinculada ao eixo macrofágico-osteoclástico, como as populações de células estromais esplênicas. Estas células têm um potencial de diferenciação mediado por quimiocinas e citocinas, em especial o IFN- γ (KHAPLI *et al.*, 2003).

Após definido o comportamento do animal normal, foi avaliada a exposição a radiação de animais deficientes em IFN- γ com uma menor perda da celularidade nos modelos de radiação não letal e uma onda de implantação de células CD34⁺ nos períodos iniciais após a exposição letal, mostrando que uma parte dos efeitos que levam à morte celular radioinduzida estava associada à ação desta citocina. Além de ser freqüentemente associado a cadeias inflamatórias, IFN- γ foi descrito recentemente como ativador de populações CD34⁺ responsivas ao CXCL12, aumentando a sua capacidade de sobrevivência e proliferação, sem, no entanto, alterar a capacidade de alojamento (HWANG *et al.*, 2006).

Isto demonstra que esta citocina é responsável por um efeito colateral da exposição à radiação, com destruição decorrente ou ligada à inflamação em sítios de grupos celulares alijados, principalmente em baços, onde camundongos irradiados em doses não letais mostram uma rápida repopulação por células hematopoiéticas, na ausência da citocina. O efeito por encontrado no estudo refere-se à fase aguda da radiação, onde eventos celulares de ativação de células NK e de macrófagos já foram descritos. O uso de interferon-gama em contraposição aos efeitos do TGF- β na fibrose após radiação é um fenômeno muito diferente e está relacionado a conseqüências da

ativação imunológica inicial da radiação ionizante. Muitos modelos usam drogas anti-TNF- α , como a pentoxifilina (DELANIAN & LEFAIX, 2007), e outros antiinflamatórios durante a fase aguda após a exposição à radiação, para diminuição destes efeitos. Todos estes trabalhos apenas mostram que os efeitos ditos colaterais ou testemunha, efeitos indiretos da radiação têm participação de agentes efetores da resposta imune e são responsáveis por perdas significativas nos processos hematopoiéticos do organismo irradiado. Interessante notar que nos modelos apresentados, doses maiores de radiação mostraram que a importância do IFN- γ estava relacionada ao modelo com sobrevida e não a uma irradiação mais agressiva e que resulta na perda de todas as células por efeito direto da radiação. Assim, para que o efeito colateral de aumento na frequência de populações de fenótipo CD34⁺ observado após a irradiação deste modelo *knockout* seja notado é importante que haja celularidade mínima após os eventos de irradiação.

Dentro da cascata inflamatória, a ativação para a produção de IFN- γ no tecido, é seguida de uma produção efetiva de óxido nítrico, produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível, expressa em macrófagos. Expondo à radiação animais geneticamente deficientes na produção de iNOS, foram encontradas evidências de que a produção de óxido nítrico desta enzima é importante para a formação da patologia induzida pela radiação, tanto por achados histológicos, hematimétricos e de populações de células estromais, com produção de CXCL12. Os achados são semelhantes aos anteriormente descritos para iNOS, exceto pelo fato de que neste modelo foi possível acompanhar a produção em onda da quimiocina CXCL12, com aumento logo após a exposição.

Também num curto espaço de tempo, a presença de nitrato sérico em camundongos irradiados a 26 Gy aumenta consideravelmente (OHTA *et al.*, 2007), indicando expressão aumentada de iNOS. A quantidade relativa de mRNA codificador para esta enzima no cólon intestinal é aumentada por no mínimo 3 dias após irradiação de corpo inteiro a 10 Gy em camundongos, indicando a ativação da sua expressão como associada a efeitos agudos pós-irradiação (FREEMAN & MACNAUGHTON, 2000), sendo a expressão de iNOS também associada à inibição da adesão plaquetária em vasos sangüíneos injuriados (YAN *et al.*, 1996), em conforme com a queda no número de plaquetas circulantes observada nos modelos com ausência de produção de iNOS.

A avaliação dos índices hematimétricos dos camundongos iNOS^{-/-} mostra que não há redução significativa da quantidade de hemácias do sangue periférico em

animais irradiados a 8 Gy no período estudado. Foi observada a ocorrência aumentada de hemácias na medula óssea destes animais ao 8º dia de experimento por evidências histológicas. O número de plaquetas circulantes nestes animais encontrado nestes modelos experimentais é de cerca de 50% do encontrado em animais *wild-type* antes da irradiação, mostrando a importância do NO gerado pela atividade da iNOS, que por sua vez foi associado à apoptose de linhagens megacariocíticas (BATTINELLI *et al.*, 2001).

Estes dados são esperados, por relatos anteriores mostrando a importância do NO na indução do dano da radiação, mas utilizando modelos isolados ou em que a exposição era feita em doses muito superiores, observando-se os efeitos diretos da produção de óxido nítrico, numa visão voltada para radicais radioinduzidos (NAKAGAWA *et al.*, 2001). Nos modelos estudados, a dose de radiação é menor e acredita-se que o principal gerador de NO é a enzima iNOS, já que na sua ausência, ocorrem fenômenos mais brandos de lesão tanto medular como esplênica, com produção de CXCL12, uma quimiocina com efeito antiapoptótico.

Aparentemente, os dados obtidos dos grupos que receberam administração de aminoguanidina mostraram efeitos deletérios decorrentes do evento da irradiação com menor expressividade, como descrito por outros autores (JONATHAN *et al.*, 1999), mas foi mostrado que nas células mesenquimais esplênicas, este inibidor pode agir postergando o pico de expressão de CXCL12, que age como fator quimiotático para a atração de células-tronco hematopoiéticas do sangue periférico ($CD34^+/Thy-1^+/Lin^-/c-kit^{lo}/CD38^-$) para o ambiente esplênico, onde ocorreria a diferenciação em células formadoras de colônia (CFU-S) (KOLLET *et al.*, 2001). Este retardo temporal parece ser significativo como protetor das células-tronco hematopoiéticas em baço, que assim ficariam preservadas do efeito inflamatório pós-irradiação (VAN der MEEREN *et al.*, 2002).

A inibição de iNOS pela aminoguanidina mostrou ter importância no restabelecimento da hematopoiese esplênica entre os dias 2 e 4 após a irradiação, independentemente do modelo de severidade aplicado. No modelo severo, o 4º dia após a irradiação apresentou maior produção de mRNA codificador para CXCL12 nos baços dos animais utilizados, ou seja, ao mesmo tempo em que a queda da frequência de $CD34^+$ se intensificou, tanto no modelo severo como no moderado. A expressão de CXCL12, portanto, está

relacionada à migração destas células em direção de saída do tecido esplênico. O quarto dia também se caracterizou por significativa recuperação da celularidade nos baços dos animais irradiados pelo modelo letal, indicando que está de alguma forma desvinculada à população hematopoiética estudada, estando relacionado à migração e/ou proliferação de outros tipos celulares.

Como norma geral, os achados deste estudo mostram que o processo inflamatório, quer seja pela ação do IFN- γ , da iNOS ou de inibição da iNOS pela AG, interferem com as fases iniciais do dano radioinduzido, geralmente interferindo com a sobrevivência e hospedagem de células hematopoiéticas nos órgãos e afetando sempre mais a medula óssea do que o baço.

A expressão da enzima Oxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) vem sendo associada à danos teciduais que não ocorrem simultaneamente ao evento de irradiação, mas sim como parte da resposta face à destruição tecidual. Além disso, a enzima é associada à inflamação em infecções patogênicas (GARNICA *et al.*, 2003). Interessante ressaltar que a produção de óxido nítrico também se associa a fenômenos de adesão de células CD34⁺ em processos de neovascularização (SEGAL *et al.*, 2006), mas como também na inibição de adesão endotelial plaquetária em outros modelos (OVECHKIN *et al.*, 2005).

A ativação da quimiotaxia após eventos pró-inflamatórios seria de grande valia nos processos de recuperação da homeostase sangüínea, uma vez que assim as células hematopoiéticas estariam protegidas de efeitos danosos causados pela própria resposta inflamatória sistêmica.

Por receber fluxo sangüíneo rico e constante, o baço pode apresentar a função de armazenamento de células sangüíneas, sendo estas liberadas à corrente sangüínea em situações de *stress* anaeróbico (KWAK, 2006). Sendo assim, supõe-se que células progenitoras hematopoiéticas presentes no sangue periférico obrigatoriamente transitam pela estrutura esplênica. A presença de moléculas de adesão nestas populações progenitoras (OBINATA & YANAI, 1999), associadas às suas contrapartes na camada estromal, e em diversos compartimentos esplênicos (MEBIUS & KRAAL, 2005) leva a crer que este trânsito depende não só do influxo sangüíneo no órgão, mas sim da expressão de moléculas específicas.

A expressão fisiológica esplênica de quimiocinas inflamatórias, como, CXCL13 e CCL19 (OHL *et al.*, 2003), propõe que este trânsito seja coordenado por cadeias de eventos efetores, que no caso da exposição à radiação ionizante é a destruição

tecidual. A expressão de CXCL12, uma quimiocina crucial na hematopoiese (LATAILLADE *et al.*, 2004) mostra-se alterada nos modelos estudados.

A elevação da síntese de mRNA de CXCL12 nas amostras de medula óssea dos animais tratados sugere uma tentativa do ambiente medular em atrair células hematopoiéticas do sangue periférico após estabilização das condições ambientais, ou melhor dizendo, cessação de eventos danosos à proliferação celular. Esta produção parece ser dependente de células radorresistentes, visto que a suplementação de quimiocina foi pouco efetiva, sugerindo uma produção local suficiente pra a recuperação. Um possível efeito benéfico da aminoguanidina foi bloqueado pela suplementação da quimiocina, mostrando que a recuperação tem uma sintonia fina e que intervenções sobre o processo podem ter efeitos discordantes.

O aumento e posterior estabilização da expressão de mRNA de CXCL12 a partir do sétimo dia nas amostras dos animais tratados com aminoguanidina sugere que nos animais não-tratados, a população de células estromais pode estar lesada pelo óxido nítrico, um potente agente de apoptose, ou incapaz de produzir o fator quimiotático. A elucidação destes processos implica em novos experimentos, envolvendo a identificação das células da medula óssea e esplênicas, bem como a avaliação da inflamação local, a fim de se determinar até que ponto estes eventos estão interferindo na recuperação da hematopoiese fisiológica mediada pelo eixo CXCR4/CXCL12. O efeito destas variações no mais importante fator quimiotático para células-tronco hematopoiéticas (PELED *et al.*, 1999) não pôde ser observado pela quantificação das hemácias do sangue periférico nos experimentos descritos.

As medulas ósseas femorais dos animais irradiados em doses letais e severas não apresentaram células progenitoras CD34⁺ até o 2º dia, indicando a agressividade dos eventos de morte celular. A administração de CXCL12 em modelos experimentais expostos à radiação como agente de recuperação hematopoiética já foi descrita por outros autores (HÉRODIN *et al.*, 2003), mas com resultados significantes apenas quando em uso concomitante com outras citocinas e/ou quimiocinas (DROUET *et al.*, 2004). Aparentemente, a suplementação exógena intraperitoneal de CXCL12 causa desequilíbrio no gradiente de concentração existente na matriz extracelular dos sítios hematopoiéticos medulares, fazendo com que as células progenitoras alojem-se

preferencialmente no tecido esplênico, sem consequências significantes para os valores hematimétricos.

O uso de outras citocinas, como G-CSF e GM-CSF foi estudado em conjunto com o uso de CXCL12 (HÉRODIN & DROUET, 2005) com resultados mais eficientes, indicando que a recuperação hematológica pós-irradiação depende da ativação da proliferação e/ou diferenciação de populações celulares que precisam de estímulos efetores além daqueles ativados exclusivamente por CXCL12.

Apesar de apresentar efeitos bastante promissores, o uso de coquetéis de fatores de proliferação e diferenciação celular tentando abranger todas as linhagens hematopoiéticas (HÉRODIN *et al.*, 2007) ainda não constitui alternativa viável à recuperação hematopoiética de indivíduos expostos à radiação, dado o alto custo de produção, estocagem e manuseio destas substâncias.

Uma das características dos efeitos da irradiação em nossos modelos é a importância do conjunto de fenômenos biológicos colaterais ao dano direto ou indireto induzido pela radiação sobre as células, mas que podem significar a sobrevivência ou morte do hospedeiro. A presença de dano ao genoma de populações celulares com consequências à sua progênie é conhecida, mas com mecanismos ainda não inteiramente elucidados, mas com evidente envolvimento da expressão aumentada de iNOS e p53, mas ainda com a liberação de NF- κ B para o meio extracelular, indicando que o dano tecidual é relacionado à comunicação intercelular (COATES *et al.*, 2004), inclusive com envolvimento de junções tipo *gap* (AZZAM *et al.*, 1998).

Estes estudos indicam que a suplementação com fatores quimiotáticos, a inativação de genes ligados à inflamação ou o bloqueio de cadeias inflamatórias importantes são procedimentos de grande valia na tentativa de recuperação da função hematopoiética após a exposição à radiação, mas que seu sucesso depende do estudo de fases da exposição à radiação posteriores à observada no presente estudo, observando os denominados *bystander effects* (LORIMORE *et al.*, 2001), que parecem afetar gravemente os processos hematopoiéticos logo após o término da fase aguda da síndrome hematopoiética da exposição à radiação.

Neste levantamento, fica claro que a exposição à radiação e sua terapia, apesar de ser um real problema de saúde pública, como nos casos de Chernobyl e Goiânia, não tem a repercussão correta no desenvolvimento científico atual. Apesar da possibilidade cada vez maior de uso para geração de energia, e da ampliação da produção e uso de radiofármacos terapêuticos e diagnósticos, a questão da utilização da

energia nuclear para fins pacíficos ainda constitui tabu obscurantista ao impedir ou menosprezar os estudos na área.

A busca do “soma” (HUXLEY, 1998) que proteja contra os efeitos da radiação, sejam eles físicos ou provenientes do medo incondicional da população em relação à radiação ionizante é uma meta onírica, dado o medo atávico da radiação que tem levado a um círculo perverso de situações que levaram a um aparente distanciamento da qualidade da pesquisa em outras áreas da biologia do que o estudo dos efeitos da exposição à radiação ionizante, como em acidentes nucleares.

A ínfima quantidade de artigos científicos com tecnologia recente sobre o tema, todos envoltos freqüentemente em questões de segurança e sempre de caráter quase milagroso e secreto dificultam a compreensão dos fenômenos relacionados à radiação e apenas mostram a face perversa do processo, como se o domínio do conhecimento sobre os efeitos da radiação em doses mais altas pudessem resultar em alguma vantagem para o povo que a dominasse.

7. CONCLUSÕES

7.1 Geral:

O processo inflamatório quer seja pela ação do IFN, da iNOS ou de produção de CXCL12, interferem com as fases iniciais do dano radioinduzido, geralmente interferindo com a sobrevivência e hospedagem de células hematopoiéticas nos órgãos hematopoéticos estudados, afetando sempre mais a medula óssea do que o baço.

7.2 Especificamente:

- Foi possível padronizar modelos murinos de exposição à radiação gama de forma sub letal (4 Gy) e letal (8 Gy), quanto à sua evolução hematológica, da histologia e composição dos órgãos hematopoéticos estudados, pela estudo das células hematopoiéticas primordiais CD34⁺ e pela produção de CXCL12.
- A ausência da produção de interferon-gama no local irradiado aumenta a sobrevivência e a quantidade de células progenitoras hematopoiéticas, tanto na medula como no baço, pela exposição de animais geneticamente deficientes em IFN.
- A ausência de óxido nítrico sintase induzível no local irradiado diminui a extensão do dano radio induzido, tanto na medula como no baço, pela exposição de animais geneticamente deficientes em iNOS.
- A inibição da iNOS pela administração de Aminoguanidina aumenta a sobrevivência e a quantidade de células progenitoras hematopoiéticas, tanto na medula como no baço,
- A administração de CXCL12 em modelos murinos irradiados aumenta o numero de células hematopoiéticas progenitoras em baço
- A administração concomitante de inibidor da iNOS e CXCL12 resulta em efeito antagônico, inibindo os efeitos protetores isolados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akyurek, L.M.; Fellstrom, B.C.; Yan, Z.Q.; Hansson, G.K.; Funa, K.; Larsson, E., (1996), Inducible and endothelial nitric oxide synthase expression during development of transplant arteriosclerosis in rat aortic grafts. **Am. J. Pathol.**, **149(6)**:1981-90.
- Aldridge, D.R.; Radford, I.R., (1998), Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. **Cancer Res.**, **58(13)**:2817-24.
- Allen, S.J.; Crown, S.E.; Handel, T.M., (2007), Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. **Annu. Rev. Immunol.**, **25**:787-820.
- Amâncio, F.F. **Ação da radiação ionizante sobre hemácias humanas e suas proteínas de membrana.** 1998. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- Astolfi, R.S.; Khouri, D.G.; Brandizzi, L.I.; Avila-Campos, M.J.; de Andrade Jr., H.F., (2007), Antagonic effect of the inhibition of inducible nitric oxide on the mortality of mice acutely infected with *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **40(3)**:317-22.
- Ault, K.A.; Knowles, C., (1995), In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. **Exp. Hematol.**, **23(9)**:996-1001.
- Azzam, E.I.; de Toledo, S.M.; Gooding, T.; Little, J.B., (1998), Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. **Radiat. Res.**, **150(5)**:497-504.

- Battinelli, E.; Willoughby, S.R.; Foxall, T.; Valeri, C.R.; Loscalzo, J., (2001), Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, **98(25)**:14458-63.
- Berger, G.; Hartwell, D.W.; Wagner, D.D., (1998), P-Selectin and platelet clearance. **Blood**, **92(11)**:4446-52.
- Brendolan, A.; Rosado, M.M.; Carsetti, R.; Selleri, L.; Dear, T.N., (2007), Development and function of the mammalian spleen. **Bioessays**, **29(2)**:166-77.
- Broxmeyer, H.E.,(2001), Regulation of hematopoiesis by chemokine family members. **Int. J. Hematol.**, **74(1)**:9-17.
- Car, B.D.; Eng, V.M., (2001), Special considerations in the evaluation of the hematology and hemostasis of mutant mice. **Vet. Pathol.**, **38(1)**:20-30.
- Cardi, B.A.; de Andrade Jr, H.F.; Rogero, J.R.; Nascimento, N., (1998), Differential biodistribution of native and 2 kGy ⁶⁰Co irradiated crotoxin in tissues of CBA/J mice. **Nat. Toxins.**, **6(1)**:19-25.
- Champlin, R.E.; Kastenber, W.E.; Gale, R.P.; (1988), Radiation accidents and nuclear energy: medical consequences and therapy. **Annals Intern. Med.**, **109(9)**: 730-744.
- Clark, J.D., (1996), **Guide for care and use of Laboratory Animals**, Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences. National Research Council, Washington, D.C.: National Academy Press.
- Choi, B.M.; Pae, H.O.; Jang, S.I.; Kim, Y.M.; Chung, H.T., (2002), Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. **J. Biochem. Mol. Biol.**, **35(1)**:116-26.

Coates, P.J.; Lorimore, S.A.; Wright, E.G., (2004), Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation. **Mutat. Res.**, **568(1)**:5-20.

Dainiak, N., (2002), Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation, **Exper. Hematol.**, **30**: 513-528.

Delanian, S.; Lefaix, J.L., (2007), Current management for late normal tissue injury: radiation-induced fibrosis and necrosis. **Semin. Radiat. Oncol.**, **17(2)**:99-107.

Denning-Kendall, P.; Singha, S.; Bradley, B.; Hows, J., (2003), Cobblestone area-forming cells in human cord blood are heterogeneous and differ from long-term culture-initiating cells. **Stem Cells**, **21(6)**:694-701.

Drouet, M.; Mourcin, F.; Grenier, N.; Leroux, V.; Denis, J.; Mayol, J.F.; Thullier, P.; Lataillade, J.J.; Herodin, F., (2004), Single administration of stem cell factor, FLT-3 ligand, megakaryocyte growth and development factor, and interleukin-3 in combination soon after irradiation prevents nonhuman primates from myelosuppression: long-term follow-up of hematopoiesis. **Blood**, **103(3)**:878-85.

Edelman, R.; Hoffman, S.L.; Davis, J.R.; Beier, M.; Sztein, M.B.; Losonsky, G.; Herrington, D.A.; Eddy, H.A.; Hollingdale, M.R.; Gordon, D.M., (1993), Long-term persistence of sterile immunity in a volunteer immunized with X-irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites. **Journ. Inf. Dis.**, **168(4)**:1066-70.

Feinendegen, L.E., (2002), Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. **Hum. Exp. Toxicol.**, **21(2)**:85-90.

Flidner, T.M.; Graessle, D.; Paulsen, C.; Reimers, K., (2002), Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. **Cancer Biother. Radiopharm.**, **17(4)**:405-26.

Freeman, S.L.; MacNaughton, W.K., (2000), Ionizing radiation induces iNOS-mediated epithelial dysfunction in the absence of an inflammatory response. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, **278(2)**:G243-50.

Furness, S.G.; McNagny, K., (2006), Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. **Immunol. Res.**, **34(1)**:13-32.

Garnica, M.R.; Hiramoto, R.M.; Andrade Jr., HF, (1996), Nitrogen free radical in experimental malaria as detected as serum nitrite, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **91**: 89.

Garnica, M.R.; Souto, J.T.; Silva, J.S.; de Andrade, H.F. Jr., (2002), Stromal cell derived factor 1 synthesis by spleen cells in rodent malaria, and the effects of in vivo supplementation of SDF-1 α and CXCR4 receptor blocker., **Immunol. Lett.**, **83(1)**: 47-53.

Garnica, M.R.; Silva, J.S.; de Andrade Junior, H.F., (2003), Stromal cell-derived factor-1 production by spleen cells is affected by nitric oxide in protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi CR in C57BL/6j mice. **Immunol. Lett.**, **89(2-3)**:133-42.

Goodell, M. A., (1999), CD34⁺ or CD34⁻: Does it Really Matter?, **Blood**, **94(8)**:2545-7.

Gratama, J.W.; Orfao, A.; Barnett, D.; Brando, B.; Huber, A.; Janossy, G.; Johnsen, H.E.; Keeney, M.; Marti, G.E.; Preijers, F.; Rothe, G.; Serke, S.; Sutherland, D.R.; Van der Schoot, C.E.; Schmitz, G.; Papa, S., (1998), Flow cytometric enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. **Cytometry**, **34(3)**:128-42.

Greaves, D.R.; Schall, T.J., (2000), Chemokines and myeloid cell recruitment. **Microb. And Infect.**, **2**. 331-336.

Harrington, N.P.; Chambers, K.A.; Ross, W.M.; Fillion, L.G., (1997), Radiation damage and immune suppression in splenic mononuclear cell populations. **Clin. Exp. Immunol.**, **107(2)**:417-24.

Held, T.K.; Weihua, X.; Yuan, L.; Kalvakolanu, D.V.; Cross, A.S., (1999), Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. **Infect. Immun.**, **67(1)**:206-12.

Herodin, F.; Drouet, M., (2002), Autologous cell therapy as a new approach to treatment of radiation-induced bone marrow aplasia: preliminary study in a baboon model. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **80(7)**:710-6.

Herodin, F.; Bourin, P.; Mayol, J.F.; Lataillade, J.J.; Drouet, M., (2003), Short-term injection of antiapoptotic cytokine combinations soon after lethal gamma -irradiation promotes survival. **Blood**, **101(7)**:2609-16.

Herodin, F.; Drouet, M., (2005), Cytokine-based treatment of accidentally irradiated victims and new approaches. **Exp. Hematol.**, **33(10)**:1071-80.

Herodin, F.; Roy, L.; Grenier, N.; Delaunay, C.; Bauge, S.; Vaurijoux, A.; Gregoire, E.; Martin, C.; Alonso, A.; Mayol, J.F.; Drouet, M., (2007), Antiapoptotic cytokines in combination with pegfilgrastim soon after irradiation mitigates myelosuppression in nonhuman primates exposed to high irradiation dose. **Exp. Hematol.**, **35(8)**:1172-81.

Hiramoto, R.M.; Galisteo Jr., A.J.; do Nascimento, N.; de Andrade Jr, H.F., (2002), 200 Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. **Vaccine**, **20(16)**:2072-81.

Hirayama, F.; Yamaguchi, M.; Yano, M.; Yasui, K.; Horie, Y.; Matsumoto, K.; Nagao, N.; Ikebuchi, K.; Azuma, H.; Ikeda, H.; Tani, Y, (2003). Spontaneous and rapid reexpression of functional CXCR4 by human steady-state peripheral blood CD34⁺ cells. **Internat. J. Hematol.**, **78(1)**: 48-55.

Hodohara, K.; Fujii, N.; Yamamoto, N.; Kaushansky, K., (2000), Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with trombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK), **Blood**, **95(3)**: 769-75.

Huxley, A., **Admirável Mundo Novo**, 24^a Ed., São Paulo, S.P.: Globo, 1998.

Hwang, J.H.; Kim, S.W.; Lee, H.J.; Yun, H.J.; Kim, S.; Jo, D.Y., (2006), Interferon gamma has dual potential in inhibiting or promoting survival and growth of hematopoietic progenitors: interactions with stromal cell-derived factor 1. **Int. J. Hematol.**, **84(2)**:143-50.

Ibuki, Y.; Goto, R., Ionizing radiation-induced macrophage activation: augmentation of nitric oxide production and its significance. (2004), **Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)**, **50 Online Pub**:OL617-26.

Ishihara, H.; Tanaka, I.; Nemoto, K.; Tsuneoka, K.; Cheeramakara, C.; Yoshida, K.; Ohtsu, H., (1995), Immediate-early, transient induction of the interleukin-1 β gene in mouse spleen macrophages by ionizing radiation. **J. Radiat. Res. (Tokyo)**, **36(2)**:112-24.

Jo, D.Y.; Rafii, S.; Hamada, T.; Moore, M., (2000), Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1, **J. Clin. Invest.**, **1(105)**: 101-111.

Jonathan, E.C.; Bernhard, E.J.; McKenna, W.G., (1999), How does radiation kill cells? **Curr. Opin. Chem. Biol.**, **3(1)**:77-83.

Jones, D.T.; Morris, M.D.; Hasan, J.S., (1996), Modeling marrow damage from response data: evolution from radiation biology to benzene toxicity. **Environ. Health Perspect.**, **104(6)**: 1293-1301.

Khapli, S.M.; Mangashetti, L.S.; Yogesha, S.D.; Wani, M.R., (2003), IL-3 acts directly on osteoclast precursors and irreversibly inhibits receptor activator of NF- κ B ligand-induced osteoclast differentiation by diverting the cells to macrophage lineage. **J. Immunol.**, **171(1)**:142-51.

Kim, A.Y.; Thayer, D.W., (1995), Radiation-induced cell lethality of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028: cooperative effect of hydroxyl radical and oxygen. **Rad. Res.**, **144(1)**:36-42.

Kollet, O.; Spiegel, A.; Peled, A.; Petit, I.; Byk, T.; HersHKoviz, R.; Guetta, E.; Barkai, G.; Nagler, A.; Lapidot, T., (2001), Rapid and efficient homing of human CD34(+)CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. **Blood**, **97(10)**:3283-91.

Krucken, J.; Mehnert, L.I.; Dkhil, M.A.; El-Khadragy, M.; Benten, W.P.; Mossmann, H.; Wunderlich, F., (2005), Massive destruction of malaria-parasitized red blood cells despite spleen closure. **Infect. Immun.**, **73(10)**:6390-8.

Kwak, Y.S., (2006), Effects of training on spleen and peritoneal exudate reactive oxygen species and lymphocyte proliferation by splenocytes at rest and after an acute bout of exercise. **J. Sports Sci.**, **24(9)**:973-8.

Lanzkron, S.M.; Collector, M.I.; Sharkis, S.J., (1999), Hematopoietic stem cell tracking in vivo: a comparison of short-term and long-term repopulating cells. **Blood.**, **93(6)**:1916-21.

Lataillade, J.J.; Clay, D.; Dupuy, C.; Rigal, S.; Jasmin, C.; Bourin, P.; Le Bousse-Kerdiles, M.C., (2000), Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. **Blood**, **95(3)**:756-68.

Lataillade, J.J.; Domenech, J.; Le Bousse-Kerdiles, M.C., (2004), Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)\CXCR4 couple plays multiple roles on haematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: survival, cell cycling and trafficking. **Eur. Cytokine Netw.**, **15(3)**:177-88.

Laszlo, F.; Evans, S.M.; Whittle, B.J., (1995), Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature in vivo. **Euro. J. Pharmacol.**, **272 (2-3)**: 169-75.

Li, W.M.; Huang, W.Q.; Huang, Y.H.; Jiang, D.Z.; Wang, Q.R., (2000), Positive and negative haematopoietic cytokines produced by bone marrow endothelial cells. **Cytokine**, **12(7)**: 1017-1023.

Li, Z.; Li, L., (2006), Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. **Trends Biochem. Sci.**, **31(10)**:589-95.

Lindsay, K.J.; Coates, P.J.; Lorimore, S.A.; Wright, E.G., (2007), The genetic basis of tissue responses to ionizing radiation. **Br. J. Radiol.**, **80 Spec No 1**:S2-6.

Lindsey, E.S.; Donaldson, G.W.; Woodruff, M.F., (1966), Erythrocyte survival in normal mice and in mice with autoimmune haemolytic anaemia. **Clin. Exp. Immunol.**, **1(1)**:85-98.

Lorimore, S.A.; Coates, P.J.; Scobie, G.E.; Milne, G.; Wright, E.G., (2001), Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? **Oncogene**, **20(48)**:7085-95.

Lorimore, S.A.; Coates, P.J.; Wright, E.G., (2003), Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. **Oncogene**, **22**: 7058–7069.

Lyons, A.B.; Parish, C.R., (1995), Are murine marginal-zone macrophages the splenic white pulp analog of high endothelial venules? **Eur. J. Immunol.**, **25(11)**:3165-72.

Mahmud, N.; Rose, D.; Pang, W.; Walker, R.; Patil, V.; Weich, N.; Hoffman, R., (2005), Characterization of primitive marrow CD34+ cells that persist after a sublethal dose of total body irradiation. **Exp. Hematol.**, **33(11)**:1388-401.

Matsumoto, H.; Takahashi, A.; Ohnishi, T., (2004), Radiation-induced adaptive responses and bystander effects. **Biol Sci Space.**, **18(4)**:247-54.

Mauch, P.; Lamont, C.; Neben, T.Y.; Quinto, C.; Goldman, S.J.; Witsell, A., (1995), Hematopoietic stem cells in the blood after stem cell factor and interleukin-11 administration: evidence for different mechanisms of mobilization. **Blood**, **86(12)**:4674-80.

Mazo, I.B.; Gutierrez-Ramos, J.C.; Frenette, P.S.; Hynes, R.O.; Wagner, D.D.; von Andrian, U.H., (1998), Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. **J. Exp. Med.**, **188(3)**:465-74. *Erratum in: J Exp Med 1998 Sep.*

Mazo, I.B.; Quackenbush, E.J.; Lowe, J.B.; von Andrian, U.H., (2002), Total body irradiation causes profound changes in endothelial traffic molecules for hematopoietic progenitor cell recruitment to bone marrow. **Blood**, **99(11)**:4182-91.

MacGrath, K.E.; Koniski, A.D.; Maltby, K.M.; McGann, J.K.; Palis, J., (1999), Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4, **Dev. Biol.**, **213(2)**: 442-456.

McKinney, L.C.; Aquilla, E.M.; Coffin, D.; Wink, D.A.; Vodovotz, Y., (1998), Ionizing radiation potentiates the induction of nitric oxide synthase by IFN- γ and/or LPS in murine macrophage cell lines: role of TNF- α . **J. Leukoc. Biol.**, **64(4)**:459-66.

- Mebius, R.E.; Kraal, G., (2005), Structure and function of the spleen. **Nat. Rev. Immunol.**, **5(8)**:606-16.
- Moepps, B.; Braun, M.; Knopfle, K.; Dillinger, K.; Knochel, W.; Gierschik, P., (2000), Characterization of a *Xenopus laevis* CXC chemokine receptor 4: implications for hematopoietic cell development in the vertebrate embryo. **Eur. J. Immunol.** **(10)**:2924-34.
- Molla, M.; Gironella, M.; Salas, A.; Closa, D.; Biete, A.; Gimeno, M.; Coronel, P.; Pique, J.M.; Panes, J., (2005), Protective effect of superoxide dismutase in radiation-induced intestinal inflammation. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, **61(4)**:1159-66.
- Moore, M.A., (2004), Commentary: the role of cell migration in the ontogeny of the lymphoid system. **Stem Cells Dev.**, **13(1)**:1-21.
- Moser, B.; Loetscher, P., (2001), Lymphocyte traffic control by chemokines. **Nat. Immun.**, **2(2)**: 123-128.
- Muroya, Y.; Plante, I.; Azzam, E.I.; Meesungnoen, J.; Katsumura, Y.; Jay-Gerin, J.P., (2006), High-LET ion radiolysis of water: visualization of the formation and evolution of ion tracks and relevance to the radiation-induced bystander effect. **Radiat. Res.**, **165(4)**:485-91.
- Murphy, J.W.; Cho, Y.; Sachpatzidis, A.; Fan, C.; Hodsdon, M.E.; Lolis, E., (2007), Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 alpha) binding to heparin. **J. Biol. Chem.**, **282(13)**:10018-27.
- Murphy, P.M., (2002), International Union of Pharmacology. XXX. Update on Chemokine Receptor Nomenclature. **Pharm. Reviews**, **54(2)**: 227-9.
- Nakagawa, H.; Ikota, N.; Ozawa, T.; Kotake, Y., (2001), Dose- and time-dependence of radiation-induced nitric oxide formation in mice as quantified with electron paramagnetic resonance. **Nitric Oxide**, **5(1)**:47-52.

Nervi, B.; Link, D.C.; DiPersio, J.F., (2006), Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. **J. Cell. Biochem.**, **99(3)**:690-705.

Netelenbos, T.; Zijderduijn, S.; Van Den Born, J.; Kessler, F.L.; Zweegman, S.; Huijgens, P.C.; Drager, A.M., (2002), Proteoglycans guide SDF-1-induced migration of hematopoietic progenitor cells. **J. Leukoc. Biol.**, **72(2)**:353-62.

O'Malley, D.P., (2007), Benign extramedullary myeloid proliferations. **Mod. Pathol.**, **20(4)**:405-15.

O'Neill, P.; Davies, S.E., (1987), Pulse radiolytic study of the interaction of $\text{SO}_4^{\cdot-}$ with deoxynucleosides. Possible implications for direct energy deposition. **Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.**, **52(4)**:577-87.

Obinata, M.; Yanai, N., (1999), Cellular and molecular regulation of an erythropoietic inductive microenvironment (EIM). **Cell. Struct. Funct.**, **24(4)**:171-9.

Ohl, L.; Bernhardt, G.; Pabst, O.; Forster, R., (2003), Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs. **Semin. Immunol.**, **15(5)**:249-55.

Ohta, S.; Matsuda, S.; Gunji, M.; Kamogawa, A., (2007), The role of nitric oxide in radiation damage. **Biol. Pharm. Bull.**, **30(6)**:1102-7.

Okazaki, Y.; Furuno, M.; Kasukawa, T.; Adachi, J.; Bono, H.; Kondo, S.; Nikaido, I.; Osato, N.; Saito, R.; Suzuki, H.; Yamanaka, I.; Kiyosawa, H.; Yagi, K.; Tomaru, Y.; Hasegawa, Y.; Nogami, A.; Schonbach, C.; Gojobori, T.; Baldarelli, R.; Hill, D.P.; Bult, C.; Hume, D.A.; Quackenbush, J.; Schriml, L.M.; Kanapin, A.; Matsuda, H.; Batalov, S.; Beisel, K.W.; Blake, J.A.; Bradt, D.; Brusic, V.; Chothia, C.; Corbani, L.E.; Cousins, S.; Dalla, E.; Dragani, T.A.; Fletcher, C.F.; Forrest, A.; Frazer, K.S.; Gaasterland, T.; Gariboldi, M.; Gissi, C.; Godzik, A.; Gough, J.; Grimmond, S.; Gustincich, S.; Hirokawa, N.; Jackson, I.J.; Jarvis, E.D.; Kanai, A.; Kawaji, H.; Kawasaki, Y.; Kedzierski, R.M.; King, B.L.; Konagaya, A.; Kurochkin, I.V.; Lee, Y.;

Lenhard, B.; Lyons, P.A.; Maglott, D.R.; Maltais, L.; Marchionni, L.; McKenzie, L.; Miki, H.; Nagashima, T.; Numata, K.; Okido, T.; Pavan, W.J.; Perte, G.; Pesole, G.; Petrovsky, N.; Pillai, R.; Pontius, J.U.; Qi, D.; Ramachandran, S.; Ravasi, T.; Reed, J.C.; Reed, D.J.; Reid, J.; Ring, B.Z.; Ringwald, M.; Sandelin, A.; Schneider, C.; Semple, C.A.; Setou, M.; Shimada, K.; Sultana, R.; Takenaka, Y.; Taylor, M.S.; Teasdale, R.D.; Tomita, M.; Verardo, R.; Wagner, L.; Wahlestedt, C.; Wang, Y.; Watanabe, Y.; Wells, C.; Wilming, L.G.; Wynshaw-Boris, A.; Yanagisawa, M.; Yang, I.; Yang, L.; Yuan, Z.; Zavolan, M.; Zhu, Y.; Zimmer, A.; Carninci, P.; Hayatsu, N.; Hirozane-Kishikawa, T.; Konno, H.; Nakamura, M.; Sakazume, N.; Sato, K.; Shiraki, T.; Waki, K.; Kawai, J.; Aizawa, K.; Arakawa, T.; Fukuda, S.; Hara, A.; Hashizume, W.; Imotani, K.; Ishii, Y.; Itoh, M.; Kagawa, I.; Miyazaki, A.; Sakai, K.; Sasaki, D.; Shibata, K.; Shinagawa, A.; Yasunishi, A.; Yoshino, M.; Waterston, R.; Lander, E.S.; Rogers, J.; Birney, E.; Hayashizaki, Y.; FANTOM Consortium; RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team, (2002), Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. **Nature**, **420(6915)**:563-73.

Oldenborg, P.A.; Gresham, H.D.; Lindberg, F.P., (2001), CD47-signal regulatory protein α (SIRP α) regulates Fc γ and complement receptor-mediated phagocytosis. **J. Exp. Med.**, **193(7)**:855-62.

Oppenheim, J.J.; Neta, R., Pathophysiological roles of cytokines in development, immunity, and inflammation. (1994), **FASEB J.**, **8(2)**:158-62.

Ovechkin, A.V.; Lominadze, D.; Sedoris, K.C.; Gozal, E.; Robinson, T.W.; Roberts, A.M., (2005), Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates platelet adhesion in subpleural arterioles caused by lung ischemia-reperfusion in rabbits. **J. Appl. Physiol.**, **99(6)**:2423-32.

Pecaut, M.J.; Nelson, G.A.; Gridley, D.S., (2001), Dose and dose rate effects of whole-body gamma-irradiation: I. Lymphocytes and lymphoid organs. **In Vivo**, **15(3)**:195-208.

Peled, A.; Grabovsky, V.; Habler, L.; Sandbank, J.; Arenzana-Seisdedos, F.; Petit, I.; Ben-Hur, H.; Lapidot, T.; Alon, R., (1999), The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. **J. Clin. Invest.**, **104(9)**:1199-211.

Ploemacher, R.E., Characterisation and biology of normal human haematopoietic stem cells, (1999), **Haematologica**, **84 Suppl EHA-4**:4-7.

Ponomaryov, T.; Peled, A.; Petit, I.; Taichman, R.S.; Habler, L.; Sandbank, J.; Arenzana-Seisdedos, F.; Magerus, A.; Caruz, A.; Fujii, N.; Nagler, A.; Lahav, M.; Szyper-Kravitz, M.; Zipori, D.; Lapidot, T., (2000), Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. **J. Clin. Invest.**, **106(11)**:1331-9.

Quarmby, S.; Kumar, P.; Kumar, S., (1999), Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions. **Int. J. Cancer**, **82(3)**:385-95.

Rabbani, Z.N.; Anscher, M.S.; Folz, R.J.; Archer, E.; Huang, H.; Chen, L.; Golson M.L.; Samulski, T.S.; Dewhirst, M.W.; Vujaskovic, Z., (2005), Overexpression of extracellular superoxide dismutase reduces acute radiation induced lung toxicity. **BMC Cancer**, **5(1)**:59.

Radford, I.R., (1994), Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part I: Sensivity to killing by ionizing radiation, rate of loss of viability, and cell type of origin. **Internat. J. Radiat. Biol.**, **65(2)**: 212-227.

Ratajczak, M.Z.; Zuba-Surma, E.; Kucia, M.; Reca, R.; Wojakowski, W.; Ratajczak, J., (2006), The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. **Leukemia**, **20(11)**:1915-24.

Riley, P.A., (1994), Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **Intern. Journ. Radiat. Biol.**, **65 (1)**:27-33

Roth, N.M.; Sontag, M.R.; Kiani, M.F., (1999), Early effects of ionizing radiation on the microvascular networks in normal tissue. **Radiat. Res.**, **151(3)**:270-7.

Salerno, L.; Sorrenti, V.; Di Giacomo, C.; Romeo, G.; Siracusa, M.A., (2002), Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. **Curr. Pharm. Des.**, **8(3)**:177-200.

Schwarzenberger, P.; Kolls, J.K.; La Russa, V., (2002), Hematopoietic stem cells. **Cancer Invest.**, **20(1)**:124-38.

Segal, M.S.; Shah, R.; Afzal, A.; Perrault, C.M.; Chang, K.; Schuler, A.; Beem, E.; Shaw, L.C.; Li Calzi, S.; Harrison, J.K.; Tran-Son-Tay, R.; Grant, M.B., (2006), Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes. **Diabetes.**, **55(1)**:102-9.

Shelby, J.P.; White, J.; Ganesan, K.; Rathod, P.K.; Chiu, D.T., (2003), A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, **100(25)**:14618-22.

Shirozu, M.; Nakano, T.; Inazawa, J.; Tashiro, K.; Tada, H.; Shinohara, T.; Honjo, T.; (1995), Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. **Genomics**, **28**: 495-500.

Southan, G.J.; Szabó, C., (1996), Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. **Biochem. Pharmacol.**, **51(4)**:383-94.

Sozzani, S.; Luini, W.; Borsatti, A.; Polentarutti, N.; Zhou, D.; Piemonti, L.; D'Amico, G.; Power, C.A.; Wells, T.N.C.; Gobbi, M.; Allavena, P.; Mantovani, A.; (1997), Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. **The J. Immun.**, **159**: 1993-2000.

Steidl, U.; Kronenwett, R.; Martin, S.; Haas, R., (2003), Molecular biology of hematopoietic stem cells. **Vitam. Horm.**, **66**:1-28.

Sugiyama, T.; Kohara, H.; Noda, M.; Nagasawa, T., (2006), Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. **Immunity**, **25(6)**:977-88.

Szilvassy, S.J.; Bass, M.J.; Van Zant, G.; Grimes, B., (1999), Organ-selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by Ex vivo expansion. **Blood**, **93(5)**:1557-66.

Tasat, D.R.; Mancuso, R.; Evelson, P.; Polo, J.M.; Llesuy, S.; Molinari, B., (2002), Radiation effects on oxidative metabolism in young and aged rat alveolar macrophages. **Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)**, **48(5)**:529-35.

Tashiro, K.; Tada, H.; Heilker, R.; Shirozu, M.; Nakano, T.; Honjo, T.; (1993), Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. **Science**, **261**: 600-603.

UNSCEAR. **United Nations Scientific Committee on the effects of atomic radiation to the general assembly, New York, 1-30, 1993.**

Van der Meeren, A.; Mouthon, M.A.; Gaugler, M.H.; Vandamme, M.; Gourmelon, P., (2002), Administration of recombinant human IL11 after supralethal radiation exposure promotes survival in mice: interactive effect with thrombopoietin. **Radiat. Res.**, **157(6)**:642-9.

Voermans, C.; Gerritsen, W.R.; von dem Borne, A.E.; van der Schoot, C.E., (1999), Increased migration of cord blood-derived CD34⁺ cells, as compared to bone marrow and mobilized peripheral blood CD34⁺ cells across uncoated or fibronectin-coated filters. **Exper. Hematol.**, **27(12)**: 1806-14.

Voermans, C.; Rood, P.M.L.; Hordijk, P.L.; Gerritsen, W.R.; van der Schoot, C.F.; (2000), Adhesion molecules Involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells, **Stem Cells**, **18**: 435-443.

Wang, J.F.; Park, I.W.; Groopman, J.E., (2000), Stromal cell-derived factor 1 alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. **Blood**, **95(8)**: 2505-2513.

- Weissman, I.L.; Anderson, D.J.; Gage, F., (2001), Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. **Ann. Rev. Cell and Dev. Biol.**, **17**: 387-403.
- Wright, D.E.; Wagers, A.J.; Gulati, A.P.; Johnson, F.L.; Weissman, I.L., (2001), Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. **Science**, **294(5548)**:1933-6.
- Yoo, J.C.; Pae, H.O.; Choi, B.M.; Kim, W.I.; Kim, J.D.; Kim, Y.M.; Chung, H.T., (2000), Ionizing radiation potentiates the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma (Ifn- γ) or Ifn-gamma and lipopolysaccharide in bnl cl.2 murine embryonic liver cells: role of hydrogen peroxide. **Free Radic. Biol. Med.**, **28(3)**:390-6.
- Youn, B.S.; Mantel, C.; Broxmeyer, H.E., (2000), Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. **Immunol. Rev.**, **177**:150-74.
- Yu, L.; Cecil, J.; Peng, S.B.; Schrementi, J.; Kovacevic, S.; Paul, D.; Su, E.W.; Wang, J., (2006), Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. **Gene.**, **374**:174-9. Epub 2006 Apr 19.
- Zbikowska, H.M.; Nowak, P.; Wachowicz, B., (2006), Protein modification caused by a high dose of gamma irradiation in cryo-sterilized plasma: protective effects of ascorbate. **Free Radic. Biol. Med.**, **40(3)**:536-42.
- Zhang, S.Y.; Park, K.W.; Oh, S.; Cho, H.J.; Cho, H.J.; Park, J.S.; Cho, Y.S.; Koo, B.K.; Chae, I.H.; Choi, D.J.; Kim, H.S.; Lee, M.M., (2005), NF- κ B decoy potentiates the effects of radiation on vascular smooth muscle cells by enhancing apoptosis. **Exp. Mol. Med.**, **37(1)**:18-26.
- Zhao, W.; Diz, D.I.; Robbins, M.E., (2007), Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury. **Br. J. Radiol.**, **80 Spec No 1**:S23-31.