

**IANA SULY SANTOS KATZ**

**MIELOTOXICIDADE POR 7,12-DIMETILBENZANTRACENO E SUA  
REPERCUSSÃO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DOS  
CAMUNDONGOS AIRMAX E AIRMIN**

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

**São Paulo**

**2012**

**IANA SULY SANTOS KATZ**

**MIELOTOXICIDADE POR 7,12-DIMETILBENZANTRACENO E SUA  
REPERCUSSÃO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DOS  
CAMUNDONGOS AIRMAX E AIRMIN**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho

Versão Original

**São Paulo**

**2012**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Katz, Iana Suly Santos.

Mielotoxicidade por 7,12-Dimetilbenzantraceno e sua repercussão na resposta imunológica dos camundongos AIRmax e AIRmin / Iana Suly Santos Katz. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Orlando Garcia Ribeiro Filho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Influência do controle genético da intensidade das reações inflamatórias na resistência natural a toxicidade induzida por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Versão do título para o inglês: Myelotoxicity by 7,12-Dimetilbenzantraceno and its impact on immune response in AIRmax and AIRmin mice.

Descritores: 1. Medula óssea 2. Camundongos 3. Ciclo celular  
4. Ahr 5.DMBA 6. Toxicidade I. Filho, Orlando Garcia Ribeiro  
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB012/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Iana Suly Santos Katz.

Título da Tese: Mielotoxicidade por 7,12-Dimetilbenzantraceno e sua repercussão na resposta imunológica dos camundongos AIRmax e AIRmin.

Orientador(a): Orlando Garcia Ribeiro Filho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

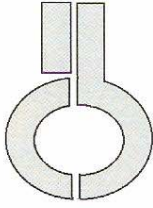
Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.027.11

São Paulo, 23 de setembro de 2011.

**REF.: Protocolo nº87/08.**

*"Modulação da resposta imune específica e inflamatória pelo DMBA em camundongos AIRmax e AIRmin"*

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **estará em vigência até 19.11.2014.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da Comissão de Ética  
no Uso de Animal - ICB /USP

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho  
Departamento de Imunologia  
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*Aos meus pais, Isaac e Oneida, que me ensinaram a ter tantas qualidades.  
Agradeço pelo amor, carinho, incentivo, esforço, dedicação e compreensão.  
Por todas as orações e pela família linda que temos.*

*Aos meus irmãos, Igor e Ismar Samuel, que sempre me apoiaram  
em tudo, pelo amor e carinho. Vocês serão sempre os meus melhores amigos.*

*Ao meu sobrinho Ian que é a alegria de nossas vidas.*

*À minha tia Ozani, pelo amor, amizade e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador, Dr. Orlando Garcia Ribeiro, que muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento intelectual e acadêmico. Meus sinceros agradecimentos pela paciência, incentivo, sapiência, amizade e carinho.*

*À Dra. Olga Ibañez que sempre me atendeu com muita atenção e carinho. Pelos momentos de aprendizado e convivência.*

*Aos pesquisadores do Laboratório de Imunogenética Dra. Wafa Cabrera, Dra. Nancy Starobinas, Dr. Marcelo de Franco, Dra. Milene de Franco, Dra. Andrea Borrego, Dr. José Ricardo Jensen, Dra. Mônica Spadafora, Dra. Solange Massa e Dra. Solange Carbonare pelo carinho e convívio. Por sempre estarem dispostos a ouvir e contribuir com este trabalho.*

*À Layra Lucy Albuquerque e Alessandra Suppa pela amizade de todos esses anos e ajuda preciosa em muitos experimentos.*

*Aos amigos e companheiros de jornada, Tatiana Canhamero, Cristiano Rossato, Mara Correa, Jussara Fernandes, Ludmilla, Débora Siqueira, Aline, Camila Moreira, Mariana Perlati, Priscillia Aguila, Andrea Arruda, e Juliana. O meu muito obrigada pela ajuda preciosa nos diversos momentos e pela amizade.*

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

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

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

*Ao Renato Heidor do Laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer da FCF/USP que me ensinou a técnica do ensaio cometa.*

*À professora Ana Paula de Melo Loureiro pela atenção e por me ajudar na detecção de 8-oxoguanina no DNA.*

*À Graziela Batista, Karina Nakajima e professora Primavera Borelli por terem cedido os anticorpos e me auxiliarem na técnica de Western Blotting e análise morfológica da medula óssea.*

*À Dra. Luciana Carvalho e ao Dr. Osvaldo Sant'Anna por terem cedido o antígeno HGG e o anticorpo IgG anti-HGG, bem como por terem me ajudado na titulação dos anticorpos.*

*À Virgínea Farias e ao Dr. Mariano Almodovar por terem me acolhido tão bem durante meu estágio na Espanha. Pelos grandes momentos de aprendizado e convivência.*

*À minha grande amiga Vivi, pela amizade, incentivo, companherismo e carinho. Por sempre estar disposta a ajudar nos momentos que mais precisei.*

*Às minhas amigas Pati, Lulu, Carla, Márcia e Mari pelos momentos divertidos, carinho e amizade.*

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

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



O sábio está sempre no caminho e sabe que vai chegar à sua meta, não porque a procura, mas porque sabe que continuando no seu caminho firme na sua verdade, irá evoluir e crescer.

Tadashi Kadomoto

## RESUMO

KATZ, I. S. S. **Mielotoxicidade por 7,12-Dimetilbenzantraceno e sua repercussão na resposta imunológica dos camundongos AIRmax e AIRmin.** 2012. 121 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O DMBA é um agente genotóxico que reage diretamente com o DNA, induzindo citotoxicidade, dependente de p53. O processo de metabolismo do DMBA é dependente da ativação de receptor aril hidrocarbonetos (AHR). Camundongos geneticamente selecionados para alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) resposta inflamatória aguda apresentam completa segregação dos alelos de baixa (*Ahr<sup>d</sup>*) ou alta (*Ahr<sup>bl</sup>*) afinidade para HPA, respectivamente. Essas linhagens apresentam diferenças importantes na sensibilidade aos efeitos tóxicos e carcinogênicos do DMBA. Neste trabalho estudamos os efeitos tóxicos do DMBA na medula óssea e sua repercussão na resposta imunológica destes camundongos. Para isso os animais foram tratados com uma única injeção ip de DMBA em óleo de oliva. A produção de anticorpos IgG anti-HGG e a migração celular para o tecido subcutâneo após injeção sc de Biogel, como agente inflamatório, foram suprimidas nos animais AIRmin tratados com DMBA. As células da medula óssea foram enumeradas e caracterizadas por análise morfológica e citometria de fluxo. A hipocelularidade da medula óssea observada em camundongos AIRmin após 24 horas do tratamento com DMBA é reflexo da diminuição principalmente de neutrófilos em estágio final de diferenciação. Por outro lado, houve um aumento no número de blastos e neutrófilos imaturos após o tratamento. A análise da morte celular com PI/Anexina V revelou um aumento de células em apoptose e necrose. Além disso, o tratamento DMBA causou em camundongos AIRmin um bloqueio na progressão do ciclo celular da fase G1 para S em células Lin<sup>-</sup>. Esses resultados condizem com o aumento da expressão das proteínas p53 e p21. A cinética de dano no DNA em células da medula óssea por ensaio cometa revelou que o reparo da lesão foi mais rápido em camundongos AIRmax. Os níveis de expressão do RNAm do gene *parp-1*, cuja função é restaurar a integridade genômica, triplicou em AIRmax, enquanto que nos animais AIRmin aumentou a expressão de *p53* e *caspase-3*. Adicionalmente, observamos perda da capacidade proliferativa e de diferenciação de células da medula óssea de animais AIRmin quando estimuladas in vitro com diferentes fatores hematopoéticos. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com DMBA causa citotoxicidade e genotoxicidade de longa duração nas células da medula óssea de camundongos AIRmin e bloqueio do ciclo celular de células indiferenciadas afetando o desenvolvimento das respostas imunológicas. Por outro lado, camundongos AIRmax são mais resistentes aos efeitos tóxicos do DMBA e apresentaram ainda maior capacidade na remoção da lesão do DNA, o que sugere que essa linhagem pode ter um eficiente mecanismo de reparo do DNA. Finalmente, essa diferença de sensibilidade ao DMBA pode estar também relacionada com o polimorfismo do *Ahr*, indicando que este gene pode ser um candidato na regulação da resposta inflamatória aguda, bem como a sensibilidade aos hidrocarbonetos.

**Palavras-chave:** Medula óssea. DMBA. Ahr. Ciclo celular. Camundongos. Toxicidade.

## ABSTRACT

KATZ, I. S. S. **Myelotoxicity by 7,12-Dimetilbenzantraceno and its impact on immune response in AIRmax and AIRmin mice**. 2012. 121 p. PhD thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

DMBA is a genotoxic agent that reacts with DNA directly, inducing p53-dependent cytotoxicity. The process of DMBA metabolism depends on the activation of the aryl hydrocarbon receptor (Ahr). Mice genetically selected for high (AIRmax) or low (AIRmin) acute inflammatory response presented a complete segregation of Ahr alleles endowed with low (*Ahr<sup>d</sup>*) or high (*Ahr<sup>bl</sup>*) affinity to PAHs, respectively. AIR mice differ in susceptibility to toxic and carcinogenic effects induced by DMBA. Therefore, in this study we investigated the myelotoxic effects of DMBA treatment on the BM and its impact on the immune response. Animals were treated *in vivo* with a single i.p. dose of DMBA in olive oil. Specific IgG anti-HGG antibody production and the cellular migration to the inflammatory site after sc injection of Biogel were suppressed after treatment with DMBA in AIRmin mice. BM cells were characterized by flow cytometry and morphology. Hypocellularity was observed in BM from AIRmin at 24 hours post DMBA treatment, mostly in the terminal neutrophil differentiation. Nevertheless there was an increase of blasts and immature neutrophils at 1 and 50 days after treatment. Cell death analysis with PI/Annexin V revealed high levels of apoptosis and necrosis. Also, DMBA treatment caused in AIRmin mice a blockade in the cell cycle progression from G1 to S phase in Lin<sup>-</sup> cells. These results are consistent with the high levels of p53 and p21 proteins. The kinetics of cell repair demonstrated the early removal of DNA lesion in BM cells from DMBA-treated AIRmax mice. The *parp-1* gene showed 3 fold increased mRNA expression in AIRmax cells 12h after DMBA treatment, however in AIRmin mice there was an increase in *p53* and *caspase-3* mRNA expression. Additionally, we showed low differentiation and proliferation capacities of bone marrow cells from DMBA treated AIRmin after *in vitro* stimulation with different hematopoietic factors. Our results demonstrated DMBA produced long lasting genotoxicity and cytotoxicity in BM cells in AIRmin mice and blocking cell cycle of undifferentiated cells, affecting immune response development. On the other hand, AIRmax mice have larger capacity in the removal of DNA lesion, which suggests that it has an efficient DNA repair mechanism. Finally, the *Ahr* polymorphism might be correlated with the phenotypes of susceptibility to DMBA, suggests *Ahr* as a candidate gene in contributing to the differential inflammatory responses and differential susceptibility to hydrocarbons.

**Key words:** Bone marrow. DMBA. Ahr. Cell cycle. Mice. Toxicity

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Mecanismo molecular da ativação da expressão gênica pelo AHR.....	22
<b>Figura 2</b> - Estrutura do gene <i>parp-1</i> .....	30
<b>Figura 3</b> - Esquema simplificado da hematopoiese .....	32
<b>Figura 4</b> - Processo de geração das linhagens AIRmax e AIRmin.....	36
<b>Figura 5</b> - Gráfico da divergência entre AIRmax e AIRmin.....	37
<b>Figura 6</b> - Experimento de PCR em Tempo Real.....	54
<b>Figura 7</b> - Produção de anticorpos IgG anti-HGG.....	58
<b>Figura 8</b> - Número total de células e concentração protéica .....	60
<b>Figura 9</b> - Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , .....	61
<b>Figura 10</b> - Produção de IL-1- $\beta$ e IL-6.....	62
<b>Figura 11</b> - Expressão de CD62L e CD11b.....	63
<b>Figura 12</b> - Efeito do DMBA sobre a medula óssea.....	65
<b>Figura 13</b> - Sobrevida de camundongos AIRmax e AIRmin.....	66
<b>Figura 14</b> - Número total de células da medula óssea.....	66
<b>Figura 15</b> - Análise das subpopulações de células da medula óssea.....	68
<b>Figura 16</b> - Análise da população de células marcadas com Gr-1, CD11b, c-kit, Lin e Sca-17.....	70
<b>Figura 17</b> - Análise das populações de células da medula óssea.....	71
<b>Figura 18</b> - Análise da circulação sanguínea.....	72
<b>Figura 19</b> - Análise proliferativa de células totais da medula óssea de camundongos tratados com DMBA.....	73
<b>Figura 20</b> - Análise proliferativa de células totais da medula óssea de camundongos tratados com DMBA e $\alpha$ -NF.....	74
<b>Figura 21</b> - Figura representativa dos tipos de colônias em cultura clonal.....	75
<b>Figura 22</b> - Ensaio clonogênico a partir de células totais da medula óssea.....	76
<b>Figura 23</b> - Análise da redistribuição de Fosfatidil-Serina por ensaio de Anexina-V/Iodeto de Propídio.....	78
<b>Figura 24</b> - Comparação entre a genotoxicidade, mensurada por ensaio cometa, e a celularidade <i>ex vivo</i> .....	81
<b>Figura 25</b> - Comparação entre a genotoxicidade, mensurada por ensaio cometa, e a celularidade <i>in vitro</i> .....	82
<b>Figura 26</b> - Efeito do DMBA na expressão do gene <i>caspase-3</i> .....	84
<b>Figura 27</b> - Efeito do DMBA na expressão do gene <i>parp-1</i> .....	85
<b>Figura 28</b> . Representação gráfica das fases do ciclo celular.....	86

<b>Figura 29</b> - Análise de proteínas em células totais da medula óssea.....	90
<b>Figura 30</b> - Análise de proteínas de células Lin negativas da medula óssea.....	92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Sequências sintéticas (primers) dos genes na orientação 5' - 3'.....	55
<b>Tabela 2</b> - Avaliação da medula óssea quanto às subpopulações de células.....	67
<b>Tabela 3</b> - Avaliação das populações de células da medula óssea.....	71
<b>Tabela 4</b> - Tipos de unidades formadoras de colônias (CFU) de células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin estimuladas com GM-CSF por 7 dias.....	76
<b>Tabela 5</b> - Tipos de unidades formadoras de colônias (CFU) de células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin estimuladas com IL-3 + SCF por 7 dias.....	76
<b>Tabela 6</b> - Análise das células totais da medula óssea marcadas com Iodeto de Propídio nas várias fases do ciclo celular.....	87
<b>Tabela 7</b> - Análise das células Lin <sup>-lo</sup> da medula óssea marcadas com Iodeto de Propídio nas várias fases do ciclo celular.....	88
<b>Tabela 8</b> - Correlação dos QTLs com a expressão de proteínas e genes.....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AHR** - Receptor Aryl Hidrocarboneto  
**AIR** - Reação Inflamatória Aguda  
**ARNT** - Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator  
**ATP** - Adenosina trifosfato  
**ATRA** - All-trans Retinoic Acid  
**BCA** - Acido Bincicônico  
**bHLH** - Basic Helix-Loop-Helix  
**BER** - Base Excision Repair  
**BRCA** – Breast Cancet  
**BRCT** - (BRCA-domínio C-terminal)  
**BSA** - Albumina Sérica Bovina  
**CASP3** – Caspase 3  
**CCND1** – Cyclin D1  
**CDK4** - Cyclin-dependent kinase 4  
**CDKN1A** - cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)  
**CDKN1B** - cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27)  
**CLP** - Common Lymphoid Progenitors  
**CMP** - Common Myeloid Progenitors  
**COX-2** - Cyclooxygenase-2  
**CYP** - Citocromo da família P450  
**DMBA** - 7,12-Dimetilbenzantraceno  
**DSS** - Dextran Sodium Sulfato  
**EAE** - Encefalomielite Autoimune Experimental  
**G-CSF** - Granulocyte colony-stimulating factor  
**GM-CSF** - Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor  
**GMP** - Granulocyte Macrophage Progenitors  
**GTP** - Guanosine triphosphate  
**HES-1** - Hairy and Enhancer of Split homolog-1  
**HGG** - Gamaglobulina Humana  
**HPA** - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos  
**HPC** - Hematopoietic Progenitor Cell  
**IL-1 $\beta$**  - Interleucina 1 Beta  
**IL-3** - Interleukin-3

**LMA** - Leucemia Mielóide Aguda  
**LPS** - Lipolissacarídeo  
**MDM - 2** - Murine Double Minute-2  
**mEH** - Microsomal Epoxido Hidrolase  
**MEP** - Megakaryocyte-Erythroid Progenitor  
**MO** - Medula óssea  
**MPP** - Multipotent Progenitor  
**NF- $\kappa$ B** - Nuclear Factor-KappaB  
**NLS** - Nuclear localization signal  
**PARP-1** - Polimerase poli-ADP- ribose 1  
**PG** - Prostaglandina  
**PKR** - Protein kinase RNA-regulated  
**PMSF** - Fenilmetilsulfonilflúo  
**PVDF** - Difluoreto de Polivinildieno  
**RB** - Retinoblastoma  
**SCF** - Stem Cell Factor  
**SMD** - Síndromes Mielodisplásicas  
**SSBR** - Single-strand DNA breaks repair  
**ST-HSC** - Short Term-Hematopoietic Stem Cell  
**TCDD** - 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina  
**TGF- $\beta$**  - Fator de Crescimento Transformador - Beta  
**TNF $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral-Alfa  
**TRP53** - Transformation related protein 53  
**XRCC1** - X-ray repair cross-complementing factor  
**WRN** - Werner syndrome nuclear protein



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS</b> .....	20
<b>1.2 PROCESSO DE METABOLIZAÇÃO DO DMBA</b> .....	21
<b>1.3 POLIMORFISMO DO AHR</b> .....	22
<b>1.4 FUNÇÕES DO AHR</b> .....	23
<b>1.5 CICLO CELULAR</b> .....	25
<b>1.6 MECANISMOS DE MORTE CELULAR</b> .....	27
<b>1.7 GENOTOXICIDADE</b> .....	29
<b>1.8 POLY ADP RIBOSE POLYMERASE (PARP)</b> .....	29
<b>1.9 HEMATOPOIESE E DOENÇAS HEMATOLÓGICAS</b> .....	32
<b>1.10 MODELO ANIMAL NO ESTUDO DA CARCINOGENESE</b> .....	34
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	41
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	41
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
<b>3.1 CAMUNDONGOS</b> .....	43
<b>3.2 TRATAMENTO COM DMBA</b> .....	43
<b>3.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA</b> .....	43
<b>3.4 ANÁLISE FENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	44
<b>3.5 HEMOGRAMA</b> .....	44
<b>3.6 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO E PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS (CÉLULAS LIN NEGATIVA) POR MÉTODO IMUNOMAGNÉTICO</b> .....	45
<b>3.7 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE OU NECROSE ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE FOSFATIDIL SERINA (MARCAÇÃO POR ANEXINA V) E IODETO DE PROPÍDEO (PI)</b> .....	45
<b>3.8 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR UTILIZANDO IODETO DE PROPÍDIO (PI)</b> .....	46
<b>3.9 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE POR ENSAIO COMETA</b> .....	46
<b>3.10 PROLIFERAÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA EM MEIO LÍQUIDO</b> .....	47

<b>3.11 CULTURA CLONOGÊNICA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA.....</b>	<b>47</b>
<b>3.12 INDUÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA PRODUZIDA POR BIOGEL.....</b>	<b>48</b>
<i>3.12.1 Quantificação da produção de óxido nítrico (NO).....</i>	<i>48</i>
<i>3.12.2 Quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).....</i>	<i>48</i>
<i>3.12.3 Determinação da produção de citocinas no exsudato inflamatório .....</i>	<i>49</i>
<b>3.13 DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL APÓS IMUNIZAÇÃO COM GAMAGLOBULINA HUMANA.....</b>	<b>49</b>
<b>3.14 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>50</b>
<b>3.15 WESTERN BLOT PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS REGULATÓRIAS DO CICLO CELULAR.....</b>	<b>50</b>
<b>3.16 EXTRAÇÃO DE RNA .....</b>	<b>52</b>
<b>3.17 OBTENÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (CDNA).....</b>	<b>52</b>
<b>3.18 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO-REAL .....</b>	<b>52</b>
<b>3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>55</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL A GAMAGLOBULINA HUMANA (HGG) EM AIRMAX E AIRMIN APÓS O TRATAMENTO COM DMBA.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA PRODUZIDA POR BIOGEL, APÓS O TRATAMENTO COM DMBA.....</b>	<b>59</b>
<i>4.2.1 Infiltrado Celular e proteína extravazada .....</i>	<i>59</i>
<i>4.2.2. Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</i>	<i>60</i>
<i>4.2.3 Produção de Citocinas inflamatórias.....</i>	<i>61</i>
<i>4.2.4 Expressão de Moléculas de Adesão .....</i>	<i>62</i>
<b>4.3 EFEITO DO DMBA SOBRE A CELULARIDADE DA MEDULA ÓSSEA NOS CAMUNDONGOS AIRMAX E AIRMIN .....</b>	<b>64</b>
<b>4.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM DMBA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE AIRMAX E AIRMIN.....</b>	<b>72</b>
<b>4.5 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR POR APOPTOSE E/OU NECROSE EM ANIMAIS AIRMAX E AIRMIN TRATADOS COM DMBA.....</b>	<b>77</b>

<b>4.6 AVALIAÇÃO DA TAXA DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO COM DMBA POR ENSAIO COMETA .....</b>	<b>79</b>
<b>4.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES OPERANTES NA SINALIZAÇÃO DE APOPTOSE E DE REPARO DE DNA.....</b>	<b>83</b>
<i>4.7.1 Caspase-3e Parp 1 .....</i>	<i>83</i>
<b>4.8 CICLO CELULAR .....</b>	<b>85</b>
<b>4.9 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS REGULADORAS DO CICLO CELULAR .</b>	<b>88</b>
<i>4.9.1 Células Totais da medula óssea .....</i>	<i>88</i>
<i>4.9.2 Células Lin negativas .....</i>	<i>91</i>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>107</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O sistema hematopoiético, devido às suas características biológicas, pode sofrer alterações quando exposto à ação de fatores ou substâncias nocivas presentes no ambiente. Entre os fatores agressores do sistema hematopoiético, são bem conhecidos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), as radiações ionizantes (raios-X e partículas atômicas), radiações ultravioletas e os agrotóxicos.

### 1.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados. Os HPA são uma classe de substâncias amplamente distribuídas no ambiente, muitas das quais com potencial tóxico. São formados principalmente nos processos de combustão incompleta de matérias orgânicas como a exaustão de motores a diesel ou a gasolina, a queima de carvão, a exaustão de plantas de incineração de rejeitos, a fumaça de cigarro (BOSTROM et al., 2002). Por se tratar de compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico, são também conhecidos como Xenobióticos.

A dioxina (tetraclorodibenzodioxina ou 2,3,7,8-TCDD), o benzeno, e o benzopireno são exemplos de HPA encontrados em abundância no meio ambiente. Já o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é um protótipo sintético de HPA. Dentre os vários efeitos, estes xenobióticos causam citotoxicidade, genotoxicidade e conseqüentemente, carcinogênese e imunossupressão, conforme resultados obtidos experimentalmente em modelo murino (KAWABATA; WHITE, 1987; LADICS et al., 1991; LUSTER; ROSENTHAL, 1993; GALVAN et al., 2003; YOON et al., 2002).

Em modelo murino o DMBA tem efeitos profundos sobre o sistema imune, abrangendo, principalmente, diminuição da celularidade no baço ou na medula óssea. (DEAN et al., 1985; WARD et al., 1984; GALVAN et al., 2003, GAO et al., 2008). Conseqüentemente camundongos tratados com esse xenobiótico apresentam diminuição acentuada na citotoxicidade mediada por célula T, na resposta proliferativa ao mitógeno T dependente e na indução da produção de citocinas (DEAN et al., 1985). Ocorre também uma diminuição do número de células pré B, interferindo na fisiologia normal de células B, que leva a uma situação crítica para a expansão dos linfócitos B antígeno-específicos durante a seleção clonal. Com isso, o desenvolvimento das células produtoras de anticorpos e de memória fica prejudicado, resultando na ineficácia da

resposta imune humoral (DEAN et al., 1986; THURMOND et al., 1987; YAMAGUCHI et al., 1997; HEIDEL et al., 1999; GAO et al., 2008). Estes processos que afetam o sistema imune induzem a diminuição de resistência dos animais expostos aos HPAs, a agentes infecciosos e a tumores transplantados (WARD et al., 1984; DEAN et al., 1986).

O DMBA também é conhecido como sendo um potente carcinógeno após ser oxidado para a forma ativa, DMBA-3,4-dihydrodiol (DEAN et al., 1985; LADISCS et al., 1991; GALVAN et al., 2003). Os produtos da metabolização deste xenobiótico ligam-se covalentemente a bases do DNA promovendo ataque a grupamentos nucleofílicos dessa molécula, formando adutos. Estes estão associados a mutações no DNA (NEBERT et al., 1990; HEIDEL et al., 2000; RUNDLE et al., 2000; GALVAN et al., 2003), podendo mediar distúrbios na formação do fuso durante a divisão celular com a indução de aneuploidias, poliploidia e instabilidade cromossômica, em linhagens celulares (WU et al., 1997; MATSUOKA et al., 1998). Tais alterações cromossômicas podem induzir a carcinogênese ou morte da célula (AGRAWAL; PANDEY, 2009).

## 1.2 PROCESSO DE METABOLIZAÇÃO DO DMBA

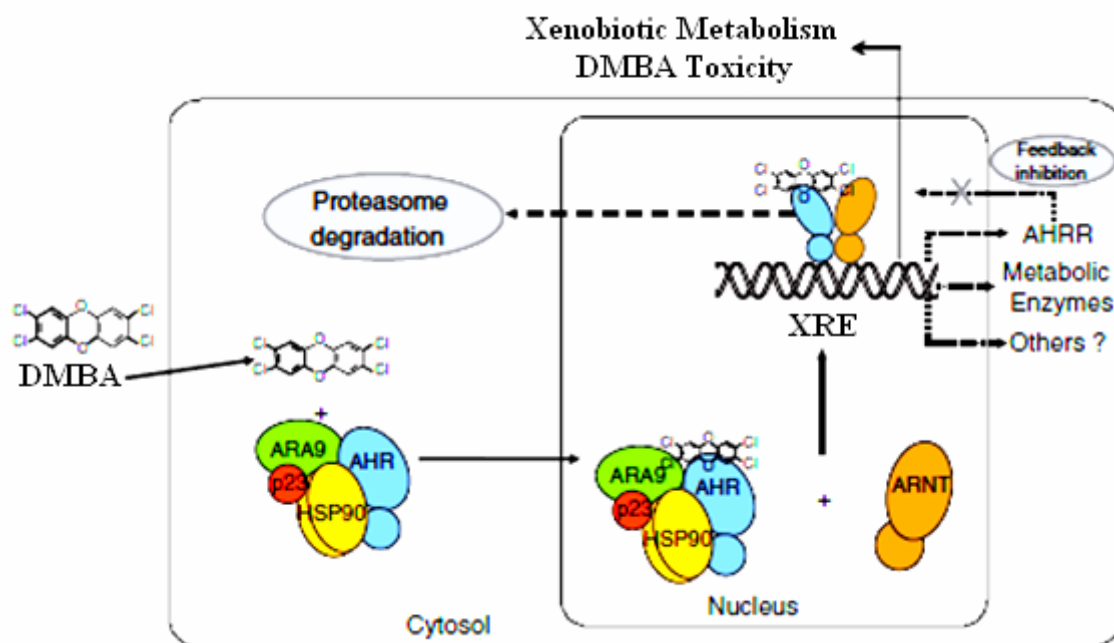
O processo de toxicidade produzida pelo DMBA envolve uma cascata de eventos que se inicia pela sua ligação ao receptor de Aril hidrocarboneto (AHR). Esse receptor é uma proteína básica do tipo hélice-alça-hélice (bHLH) e membro da superfamília PAS (Per-Arnt-Sim), cujo peso molecular varia de 104 a 95 kda (HANKINSON, 1995).

Quando ocorre a ligação dos HPAs com o AHR este se dissocia do complexo de proteínas *heat-shock protein 90* (hsp90) e p23, e dirige-se para o núcleo onde é heterodimerizado com uma proteína estruturalmente relacionada, a ARNT (do inglês: Ah receptor nuclear translocator). O complexo agonista-AHR-ARNT interage com sequências específicas do DNA onde existe o elemento de resposta a xenobióticos (XRE) (do inglês: xenobiotic responsive element), localizado nas regiões promotoras ou nas sequências de genes alvos que irão codificar enzimas metabolizantes da fase 1 (biotransformação) e da fase 2 (excreção), responsáveis pela transformação do DMBA em produtos tóxicos (VRZAL; ULRICHOVÁ; DVORÁK, 2004). A função biológica destas heme-proteínas pertencentes a família do citocromo P450 (CYP) é promover a transformação de várias moléculas lipofílicas, em moléculas hidrossolúveis e de fácil excreção pelo organismo humano (HANKINSON, 1995).

Para regular a função do AHR existe o AHRR (Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor) que compete com o AHR regulando a expressão de genes envolvidos na metabolização de HPA (LAI et al., 1996) (**Figura 1**).

O DMBA é, primeiramente, metabolizado no fígado por uma das enzimas da família do citocromo P450, a CYP1A1, formando 3,4-dihydrodiol. Na medula óssea este composto é transformado em DMBA-3,4 diol-1,2-epoxido pela enzima CYP1B1 que é expressa constitutivamente pelas células do estroma desse compartimento. Camundongos *knockout* para o gene CYP1B1 e tratados com DMBA, não sofrem os efeitos tóxicos, como apoptose de células pré B ou imunossupressão, demonstrando que essa enzima é essencial na metabolização desses HPA. (HEIDEL et al., 1999; GAO et al., 2005).

**Figura 1** - Mecanismo molecular da ativação da expressão gênica pelo AHR.



FONTE: Modificado de Stevens et al., 2009

### 1.3 POLIMORFISMO DO AHR

Análise filogenética da evolução molecular do AHR tem revelado que esta proteína tem origem ancestral, 450–510 milhões de anos atrás, e está presente em todos os grupos de vertebrados e de alguns invertebrados, mostrando que este gene é altamente conservado entre diferentes espécies (HAHN et al., 1997). O locus *Ahr* é polimórfico em camundongos e em humanos. Estudos em 13 diferentes linhagens de camundongos, incluindo 8 linhagens isogênicas, 2 subespécies *Mus musculus* e três espécies adicionais *Mus*, demonstraram polimorfismo genético representado por 4

alelos onde o alelo *Ahr<sup>d</sup>*, que codifica o receptor de baixa afinidade, está presente nas linhagens DBA/2, SJL, CAST/Ei e 129/SvJ; os alelos *Ahr<sup>b1</sup>*, *Ahr<sup>b2</sup>* e *Ahr<sup>b3</sup>* que codificam o receptor de alta afinidade, estão presentes, respectivamente, nas linhagens C57Bl/6, em Balb/cB4, C3H/HeJ, A/J e CBA/J, e em camundongos MOLF/Ei, SPRETUS/E, PANCEV/Ei<sup>b</sup>, CAROLI/E (THOMAS et al., 2002). Estes alelos são definidos por variações no exon 7, estrutural e no exon 9, funcional (SCHIMIDT et al, 1993; THOMAS et al., 2002).

O polimorfismo no exon 7 é observado por RFLP, ou seja, encontramos a perda do sítio de uma enzima de restrição, a Eco47III no nucleotídeo 752 (AGCGCT→AGCACT) (SCHIMIDT et al, 1993). O polimorfismo do exon 9 resulta em uma troca de aminoácidos alanina por valina na posição 375 do sítio de ligação do receptor, o que leva a uma diminuição de afinidade (THOMAS et al., 2002). Assim, camundongos C57BL/6, que apresentam receptores Ah de alta afinidade, possuem o alelo *Ahr<sup>b1</sup>* que é caracterizado por manter o sítio da enzima de restrição no exon 7 e Alanina na posição 375, enquanto que os camundongos DBA/2, que apresentam receptor de baixa afinidade, têm o alelo *Ahr<sup>d</sup>* cuja proteína possui um defeito no sítio de ação da enzima e apresenta a substituição por Valina na posição 375 (SCHIMIDT et al, 1993).

#### 1.4 FUNÇÕES DO AHR

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

Alguns estudos apontam para mecanismos interativos entre o receptor AHR e o fator de transcrição NF-kB, que está relacionado com as respostas fisiológicas e patológicas, incluindo modulação imune, resposta inflamatória e apoptose (TIAN; RABSON; GALLO, 2002). Estudos realizados em humanos e em modelos experimentais mostraram que durante infecções por bactérias (*Escherichia coli*), vírus (Influenza), protozoários (*Plasmodium*) ou ainda durante processos inflamatórios (hepatite, colite), ocorre diminuição na expressão ou na atividade das CYP (MORGAN, 1997).

No mesmo sentido, Thatcher e colaboradores estudaram, em camundongos *Knockout* para o gene *Ahr*, os efeitos da fumaça de cigarro ou de endotoxina bacteriana (LPS) no desenvolvimento de uma reação inflamatória. Os autores verificaram que,



após inalação dos produtos, estes animais desenvolveram reação inflamatória aguda no pulmão, com aumento da atividade do NF- $\kappa$ B, quando comparados com os animais normais. Nesse estudo os autores sugerem que na ausência do AHR há ativação exacerbada do NF- $\kappa$ B, resultando no aumento de múltiplos produtos pró-inflamatórios detectados no lavado bronco-alveolar e na circulação, indicando, com isso, que o AHR e NF- $\kappa$ B estão envolvidos em mútua regulação (THATCHER et al., 2007). Outro estudo demonstra que a ativação do AHR pela dioxina 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) diminui a colite induzida por DSS (do inglês: Dextran Sodium Sulfate) possivelmente pela produção aumentada de Prostaglandina E2 provocada pela dioxina (TAKAMURA et al., 2010).

Além de se ligar a compostos exógenos como DMBA, o receptor AHR liga-se também com alta afinidade aos compostos endógenos como os aminoácidos derivados do triptofano (indolo[3,2-b]carbazole), lipoxina A4 e prostaglandinas, sugerindo que este receptor seja sítio de ligação para diferentes tipos de compostos (HELFERICH; DENISON 1991; PERDEW; BABBS 1991; SCHALDACH et al., 1999; SEIDEL et al., 2001).

Esse receptor liga-se também ao hormônio de crescimento, responsável pelo desenvolvimento e crescimento normal de embriões de roedores e humanos, sugerindo assim função fisiológica do AHR (ABBOTT et al. 1994; PETERS; WILEY 1995). Tem sido muito estudada a ligação do AHR com o crescimento rápido de células normais e tumorais na ausência de ligantes exógenos. Por exemplo, o gene *Ahr* tem alta expressão em fibroblastos e linfócitos ativados por mitógenos (VAZIRI et al., 1996; MARCUS et al., 1998) e nos diversos tipos de tumores em roedores e humanos, incluindo leucemias e tumor mamário (TROMBINO et al., 2000; ABDELRAHIM et al., 2003; HAYASHIBARA et al., 2003). Por essa razão esse receptor pode estar envolvido no crescimento anormal de células tumorais.

Evidências sugerem que o AHR modifica o equilíbrio de células Treg/Th17 através da modificação de citocinas. Em estudos de indução de encefalomielite autoimune (EAE) em camundongos, foi demonstrado que quando o AHR é ativado por um ligante exógeno, como a dioxina, ocorrendo aumento de células Treg. Estas células têm a função de inibir a secreção de IL-12 impedindo ativação e diferenciação de LTCD4<sup>+</sup> efectoras, produzem citocinas inibitórias (como IL-10 e TGF- $\beta$ ) e podem tolerizar células apresentadoras de antígenos por interações célula-célula suprimindo assim a EAE. Por outro lado, a ativação do AHR por um ligante endógeno, 6-formylindolo [3,2-b] carbazol (FICZ) interfere no desenvolvimento das células Treg,

umentando a diferenciação de células TH17 com consequente aumento da severidade da EAE nesses camundongos (QUITANA et al., 2008).

Tem sido relatado que alguns produtos naturais, presentes na dieta, tais como 7,8-dihydroxirutacarpine, dibenzoylmethanes, curcumina e carotenóides podem inativar a via de sinalização do AHR exercendo um efeito antagonista e competindo assim com os ligantes clássicos, como os HPAs (DENISON; NAGY, 2002). Outros compostos como os flavonoides sintéticos, semelhante a  $\beta$ -naftoflavona (5,6-benzoflavone) e  $\alpha$ -naftoflavona (7,8-benzoflavone:  $\alpha$ -NF) são conhecidos também como antagonistas do AHR (LEE et al., 2007). Em murinos e linhagens de hepatócitos humanos o  $\alpha$ -NF impede a toxicidade induzida pela dioxina, competindo com TCDD na ligação com o AHR e impede assim que este receptor medeie a ativação transcricional dos genes da família do citocromo P450 (MERCHANT et al., 1990; WHILHELMSSON et al., 1994; GASIEWICZ; RUCCI, 1991). Além disso, o  $\alpha$ -NF diminui a incidência e a gravidade das malformações fetais causadas pela exposição à dioxina, DMBA ou metilcolantreno (SHIROMIZU; MATTISON, 1985; JANG et al., 2007).

Um estudo recente sugere que na ausência do ligante exógeno, o AHR interage com o complexo Cdk4/Ciclina D1 facilitando a progressão do ciclo celular pela hiperfosforilação da proteína de Retinoblastoma (Rb) (BARHOOVER et al., 2010). Quando essa interação é interrompida por ligante exógeno, como o DMBA ou mesmo a dioxina, o AHR interage com uma Rb hipofosforilada, regulando negativamente a ciclina D1, resultando na repressão da fase G1 do ciclo celular (CURRIER et al., 2005; BARHOOVER et al., 2010).

## 1.5 CICLO CELULAR

O ciclo celular compreende uma seqüência complexa de eventos que garante a transmissão correta, para as células filhas, de uma cópia completa do genoma. É um processo que ocorre em todas as células somáticas e engloba uma série de passos coordenados ao longo do ciclo, assegurando o correto crescimento e desenvolvimento do organismo (VAN DEN HEUVEL, 2005).

Esse processo é dividido em duas fases principais, a intérfase e a mitose. Ao longo da intérfase ocorre a duplicação do DNA e a preparação para a fase seguinte. A intérfase é dividida em quatro fases: fase G0 (Gap 0), onde as células se encontram em repouso; fase G1 (Gap 1), no qual a célula responde a estímulos positivos ou negativos, sendo levada ao crescimento, diferenciação, multiplicação ou apoptose, bem como à produção de enzimas e outras moléculas necessárias para a próxima fase do ciclo; fase S

(síntese), onde ocorre a síntese de DNA; e a fase G2 (Gap 2) que ocorre a síntese de RNA, de proteínas e outras estruturas necessárias para o início da divisão celular. É também na fase G2 onde se inicia a condensação da cromatina, facilitando as fases de metáfase e anáfase da mitose. Durante a mitose ocorre divisão celular propriamente dita. Essa fase é subdividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase, telófase (VAN DEN HEUVEL, 2005).

Na fase G0 é importante haver um balanço de proteínas reguladoras chamadas quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e ciclinas. As CDKs são ativadas no ciclo celular de maneira fase dependente, sendo necessária a associação com as ciclinas para que sejam ativadas. As ciclinas obedecem a um padrão cíclico controlado, aparecendo e desaparecendo durante as fases do ciclo celular. As CDKs ligam-se a ciclinas específicas formando complexos ciclina-CDK, assim, CDK4 une-se à ciclina D, enquanto que a CDK2 une-se às ciclinas E e A. À medida que o ciclo celular progride ocorre a inativação de um tipo de complexo e a consecutiva formação de outro (VAN DEN HEUVEL, 2005).

Quando as células são expostas a agentes danosos ao DNA sofrem bloqueio do ciclo celular para permitir a reparação do DNA danificado e/ou morte celular por apoptose, evitando a fixação de mutações (KASTAN; BARTEK, 2004). Nesses processos, a proteína supressora de tumor, p53 age como indutor de transcrição ligando-se diretamente ao promotor de seus genes alvos envolvidos no bloqueio do ciclo celular. Nesse sentido, p53 é capaz de controlar a expressão de p21, levando ao bloqueio do ciclo celular na fase G1, impedindo as células, que sofreram ação desses agentes, dividirem-se (GARNER; RAJ, 2008). A proteína supressora de tumor, p21, liga-se às ciclinas D e E, inibindo a cinases dependentes destas ciclinas (cdk 2 e cdk 4) necessárias para a progressão do ciclo celular. Além deste papel no controle do “checkpoint” da fase G1, p53 também controla o ciclo celular na fase G2 através da inibição do complexo B/Cdk2 (SAN CAR et al., 2004). A função da p21 nesse processo é ligar-se e inativar o complexo ciclina D1/Cdk4 resultando na hipofosforilação da proteína de retinoblastoma (RB), bloqueando o ciclo celular. Isso ocorre porque o Rb é um regulador negativo do fator de transcrição E2F, necessário para a expressão de genes da fase S do ciclo celular (VAN DEN HEUVEL, 2005; GARNER; RAJ, 2008).

Outro controlador que atua ao término da fase G1 é a p27 (Kip1), que funciona como um bloqueador da atividade de quinase do complexo ciclina E/Cdk2, causando também uma parada no ciclo celular (LEE; KIM, 2009). Nas células em estágio quiescente (G0) do ciclo celular, a concentração de p27 é alta, ao contrário do que

ocorre com as ciclinas D. Quando as células reiniciam o ciclo, passando de G0 para G1, as concentrações de p27 caem, enquanto que as de p21 aumentam (AGAMI; BERNARDS, 2002).

Essa regulação permite à célula iniciar a progressão do ciclo, o crescimento e a multiplicação, a diferenciação celular, ou, ainda, permanecer em condição de latência. Quando ocorrem falhas nesses mecanismos regulatórios, a célula pode ser direcionada à apoptose ou ocasionar o desenvolvimento tumoral (KASTAN; BARTEK, 2004).

## **1.6 MECANISMOS DE MORTE CELULAR**

Kerr, Wyllie e Currie (1972) demonstraram a existência de pelo menos dois tipos distintos de morte celular (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). Um deles é a morte por necrose, uma forma violenta e rápida de degradação celular, que afeta um grande número de células e é caracterizada pelo aumento no volume citoplasmático, destruição de organelas e rompimento da membrana citoplasmática, levando à liberação de fluidos para o meio extracelular desencadeando um processo inflamatório que pode lesar células vizinhas. Outro tipo de morte celular, denominada apoptose, ocorre em células individualizadas e se caracteriza por condensação do citoplasma e núcleo, convulsão da membrana celular seguida pela sua fragmentação e formação de corpos apoptóticos, sem liberação do conteúdo do citoplasma para o meio extracelular e não desencadeia reação inflamatória (CHO et al., 2010; KUSHNAREVA; NEWMeyer, 2010).

A abertura do poro de permeabilidade mitocondrial causa, simultaneamente, ativação das caspases (potencialmente levando à apoptose) e depleção de ATP (potencialmente causando necrose). Quando as caspases são diretamente ativadas pelos receptores da superfície celular ou granzime B e quando o poro de permeabilidade se abre em apenas algumas mitocôndrias, permitindo que as demais sintetizem ATP a célula entra no processo de apoptose. Por outro lado, se o poro de permeabilidade é aberto rapidamente e a célula não pode obter energia suficiente a partir da glicólise anaeróbia, a depleção do ATP leva a célula morrer por necrose (CHO et al., 2010; KUSHNAREVA; NEWMeyer, 2010).

Em condições patológicas, o grande número de células que sofre apoptose pode exceder a capacidade fagocitária. Nessas circunstâncias, os corpos apoptóticos não-fagocitados sofrem processo secundário de necrose, com resposta inflamatória (CHO et al., 2010; FULDA et al., 2010).

O processo de apoptose pode ser deflagrado por estímulos externos através de receptores específicos na superfície celular chamados de “receptores da morte”, como o

CD95 e o receptor TNF- $\alpha$  ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como lesão do DNA ou perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas. Estas diferentes vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases, que têm papel fundamental no processo de morte celular (GUICCIARDI; GORES, 2009).

As caspases estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica à altura de resíduos do ácido aspártico. Uma vez ativada, a maioria das caspases tem a habilidade de catalizar a ativação de múltiplos outros membros dessa família, resultando em amplificação da cascata proteolítica. Alguns membros, tais como a caspase-8 e caspase-9, ocupam posição proximal na cascata proteolítica e agem como reguladores e iniciadores, enquanto outros, como a caspase-3, são mais distais e agem como efetores da fragmentação celular (GUICCIARDI; GORES, 2009). Atualmente sabe-se que a apoptose desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário, na homeostase tecidual e no desenvolvimento do sistema imune. Alterações no processo apoptótico podem levar ao aparecimento de diversas patologias, desde doenças neurodegenerativas até doenças autoimunes e câncer (FULDA et al., 2010). Além disso, tem um papel importante na linfopoiese na medula óssea normal, pois durante o desenvolvimento de linfócitos B, os que são potencialmente auto reativos ou que seus genes são indevidamente reorganizados, são eliminados por apoptose (MÜSCHEN et al, 2002).

Embora a apoptose em células da medula óssea *in vivo* não tenha sido caracterizada após o tratamento com DMBA, um estudo *in vitro* com precursores de células B em co-cultura com células do estroma da medula óssea demonstraram indução de apoptose após tratamento com este xenobiótico (YAMAGUCHI et al., 1997; HEIDEL et al., 2000; PAGE et al., 2003). Neste sentido, quando o DNA dessas células sofre danos pelos metabólitos reativos do DMBA, a célula pode iniciar o processo de apoptose ou o DNA é reparado e a célula se mantém viva. Um processo essencial para mediar a hipocelularidade que ocorre em animais tratados com DMBA seria a ativação do receptor de TNF- $\alpha$  que regula positivamente PKR (do inglês: Protein kinase RNA-activated) este por sua vez fosforila a p53 ativando mecanismos de morte celular e impedindo que as células, que possuem o DNA danificado, proliferem (PAGE et al. 2004, 2003). Esse mecanismo procede primariamente pela ativação da caspase-8 (PAGE et al., 2002).

## 1.7 GENOTOXICIDADE

Uma lesão no ácido nucléico, denominada lesão genotóxica, corresponde a uma alteração na estrutura física da dupla hélice, perturbando as funções que necessitam da integridade conformacional do polímero, tais como a replicação e transcrição. Essas lesões são variadas e incluem quebras simples, quebras duplas, alquilações das bases, perda de bases e oxidações das bases, entre outras (MARNETT; PLASTARAS, 2001; PAGES; FUCHS, 2002; HOUTGRAFF et al. 2006; ROOS; KAINA 2006).

Imediatamente após o estresse genotóxico, as vias de sinalização são ativadas pela presença do dano, reduzindo assim a velocidade de progressão do ciclo celular, a fim de favorecer a reparação do material genético alterado (HOUTGRAAF et al. 2006; BARTEK; LUKAS 2007). No entanto, algumas vezes, o sistema de reparação de DNA permite que a célula tolere o dano no DNA e, embora não consiga corrigir a lesão eficientemente, garanta sua sobrevivência. Desse modo, as lesões removidas de forma ineficiente acabam gerando a restauração imperfeita da sequência de nucleotídeos original, causando mutações (JEGGO; LOBRICH 2006). Estas mutações gênicas podem atingir alvos críticos, como proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes envolvidos na reparação de DNA ou de indução de apoptose, acarretando alterações no ciclo celular, acúmulo de mutações, mutações cromossômicas, podendo desencadear a transformação celular maligna.

O DMBA reage principalmente com as bases de purinas no DNA, formando muitos adutos estáveis ou depurinados, induzindo reparo por excisão de nucleotídeos ou por excisão de base, respectivamente. Quando ocorre um erro no reparo do DNA há formação de mutações heteroduplex que são fixadas nas células filhas após a replicação da célula mutada. Estas mutações ocorrem principalmente nos oncogenes *H-ras*, *K-ras*, *N-ras* e *p53* (HSUE et al., 2008; CHAKRAVARTI et al., 2008). Os genes da família Ras codificam as proteínas G, que se ligam ao GTP para ativar ou inibir a proliferação celular, e quando mutados, estes genes codificam a proteína anormal que não mais depende da presença de GTP ligado para sinalizar e estimular a proliferação celular, e assim as células mutadas proliferam descontroladamente. Geralmente, a mutação que ocorre nesse gene é a troca de apenas um par de bases, isto é, mutação de ponto.

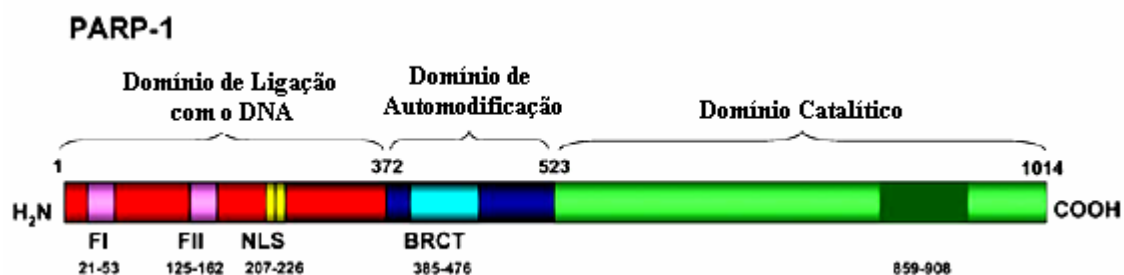
## 1.8 POLY ADP RIBOSE POLYMERASE (PARP)

Proteínas específicas são ativadas em resposta a danos no DNA gerados diretamente por agentes genotóxicos, como radicais de oxigênio, radiações ionizantes e agentes alquilantes. Dentre essas proteínas, está a superfamília de enzimas chamada

poli-(ADP-ribose) polimerase, PARP, (AMÉ et al., 2004), uma proteína nuclear de 116 kDa, que usa a molécula NAD<sup>+</sup> para catalisar a síntese de polímeros de ADP-ribose, que são adicionados a uma série de proteínas nucleares (D'AMOURS et al., 1999)

Dentre as 18 proteínas da família do PARP, a PARP-1 vem sendo muito estudada por ser o membro da superfamília com expressão mais abundante. Essa proteína nuclear possui três domínios funcionais: (**Figura 2**). O domínio de ligação de DNA, localizado na região N-terminal, o qual contém a sequência de localização nuclear (NLS) e dois *Zn fingers*; o domínio de automodificação que medeia a autoribosilação e contém o BRCT (BRCA-domínio C-terminal), o qual medeia interações proteína-proteína; o domínio catalítico C-terminal, que é essencial para a conversão de NAD<sup>+</sup> em ADP-ribose (MEYER-FICCA et al., 2005). Dentro da NLS está o peptídeo DEVD, que pode ser clivado pela caspase-3 e caspase-7. Quando isto ocorre, há o desligamento do domínio catalítico, fazendo com que a enzima perca sua função (OLIVER et al., 1998).

**Figura 2** - Estrutura do gene *parp-1*.



FONTE: Modificado de Meyer-Ficca et al., 2005

O papel da PARP-1 no reparo de DNA deve-se à sua capacidade de modificar bases transitórias, mediante a poli-ADP-ribosilação de proteínas que interferem na estrutura da cromatina, especialmente as histonas (D'AMOURS et al., 1999), tornando acessíveis às proteínas que participam do complexo de reparo do DNA. Além disso, PARP-1 também participa do recrutamento e regulação das proteínas de reparo do DNA como XRCC1 (X-ray repair cross-complementing factor), WRN (Werner syndrome nuclear protein), DNA-polimerase  $\beta$  e DNA ligase III (AMÉ et al., 2004; LEPPARD et al., 2003). A atividade de PARP-1 durante o reparo do DNA ocorre por excisão de bases (BER) (do inglês: Base excision repair) e reparo do dano em cadeia simples (SSBR) (do inglês: Single-strand break repair) (SHALL; MURCIA, 2000).

Muitos estudos apontam para a participação de PARP-1 na regulação da replicação do DNA. Sabe-se que a PARP-1 tem associação física com proteínas envolvidas na replicação do DNA, tais como DNA: polimerases  $\alpha$  e  $\beta$ , DNA helicase, DNA ligase e topoisomerase I e II. Sugere-se que PARP-1 pode desempenhar um papel regulador da replicação do DNA no controle da progressão de replicação ou de algumas enzimas associadas a esse processo (SIMBULAN-ROSENTHAL et al., 1996; DANTZER et al., 1998; BAUER et al., 2001).

Embora o papel da PARP durante o processo de apoptose não esteja bem esclarecido, estudos recentes sugerem que esta proteína poderia estar associada à morte celular. Neste sentido, Kaufmann e colaboradores (1993) mostraram que durante a fase inicial de apoptose, PARP-1 é clivada por caspase-3 em um único local, separando-a do seu domínio catalítico e inativando a enzima. (KAUFMANN et al. 1993). Portanto a clivagem dessa proteína pode promover a desativação de mecanismos essenciais de vigilância genômica. Em contrapartida, a inibição da atividade da caspase pode provocar necrose ao invés de apoptose (HIRSCH et al. 1998). Portanto, a indução de apoptose protege o organismo de danos de tecidos necróticos. Por outro lado, a falha de células para inativar totalmente as PARPs pode levar ao enorme consumo de NAD<sup>+</sup> e depleção de energia, contribuindo para a morte celular por necrose (SZABO et al., 1998).

Alguns estudos demonstraram também a associação do papel da proteína PARP em danos no DNA mediada por p53. Ensaio com esplenócitos, células da medula óssea, células embrionárias e fibroblastos primários de camundongos deficientes de PARP mostraram um acúmulo de p53 após o tratamento com agentes alquilantes (DE MURCIA et al. 1997; OLIVER et al., 1998).

Além desses aspectos, PARP-1 é necessária para ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e para conseqüente expressão dos genes dependentes das respostas a estímulos pró-inflamatórios e ao estresse genotóxico. Na ausência de PARP-1 há translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo, porém não há ligação deste fator de transcrição com as sequências promotoras dos genes por ele regulados. Isto indica que deve existir um controle nuclear de NF- $\kappa$ B por parte de PARP-1, que pode ser por interação direta destas proteínas ou por modificações da poli-ADP-ribolização do NF- $\kappa$ B (HASSA et al., 2005).

Inibidores de PARP-1 vêm sendo testados em alguns tipos de leucemias, com aumento de efeito anti-tumoral. Alguns trabalhos demonstram que inibidores de PARP-1 potencializam os efeitos citotóxicos da temozolomida nos blastos leucêmicos e células leucêmicas (TENTORI et al., 2001; HORTON et al, 2009). Portanto, parece claro que



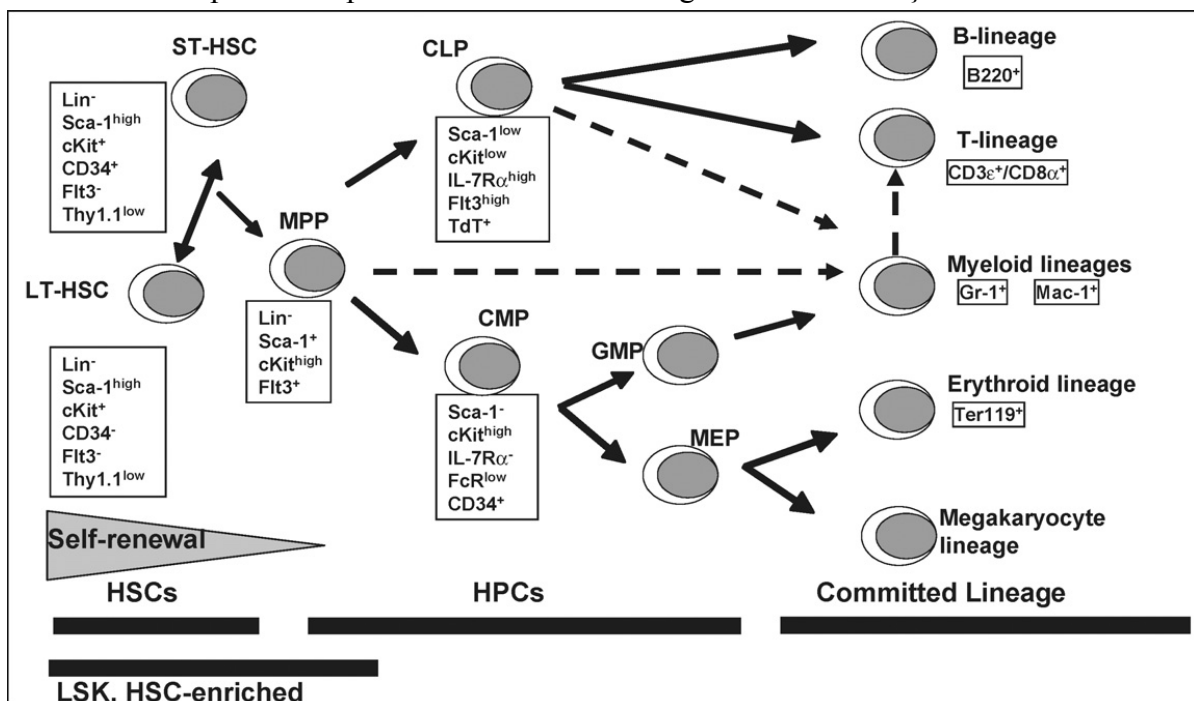
uma terapia com inibidor de PARP-1 pode ser eficaz para controlar o crescimento tumoral e evitar a progressão da doença.

### 1.9 HEMATOPOIESE E DOENÇAS HEMATOLÓGICAS

O processo de formação, desenvolvimento e maturação de células sanguíneas maduras a partir das células-tronco hematopoiéticas (HSC) (do inglês: Hematopoietic Stem Cell) é denominado de hematopoiese. As HSCs possuem a capacidade de diferenciarem-se em todos os tipos de células sanguíneas, sendo assim responsáveis pela manutenção, renovação e proteção do organismo.

Existem dois tipos principais de células progenitoras no sistema hematopoiético: as progenitoras mielóides comuns (CMPs) e as progenitoras linfóides comuns (CLPs). Cada uma destas células irá originar tipos específicos de células precursoras. Sendo que, as CMPs originam os progenitores eritróides-megacariócitos (MEPs) e os granulócitos-macrófagos (GMPs) capazes de gerar eritrócitos, megacariócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos. Enquanto as linfóides originam principalmente as células precursoras de linfócitos (SINGH et al., 2009). Com o processo de amadurecimento as células da medula óssea vão ganhando ou perdendo marcadores de superfície específicos (**Figura 3**).

**Figura 3** - Esquema simplificado da hematopoiese, indicando os marcadores de superfície expressos em diferentes estágios de diferenciação.



FONTE: Original de Singh et al. (2009).

Quando o sistema hematopoiético é exposto a agentes tóxicos como os hidrocarbonetos aromáticos, podem ocorrer algumas perturbações no processo de diferenciação e/ou maturação das células da medula óssea. Dentre os distúrbios hematológicos decorrentes dessa exposição estão leucopenia, anemia aplástica, síndromes mielodisplásicas e leucemias.

A leucopenia refere-se a um decréscimo na contagem do número total de células leucocitárias decorrentes da diminuição de um ou mais elementos e que são mensurados a partir de valores de referência utilizados como padrão de normalidade.

As anemias aplásticas são caracterizadas pelos seguintes achados diagnósticos: pancitopenia periférica e alterações na medula óssea (depleção celular e presença de hipoplasia grave ou aplasia). Nesses quadros há substituição das células hematopoiéticas por tecido adiposo. Há evidências clínicas de que os casos de anemia aplástica desenvolvem-se como conseqüência de um defeito qualitativo em uma população de células-tronco (YOUNG, 2002).

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são um grupo de transtornos hematológicos clonais adquiridos pelas células tronco hematopoiéticas e têm como conseqüência a ineficaz proliferação e diferenciação celular. Estes distúrbios caracterizam-se pela ineficiência na hematopoiese de linhagens celulares que determina uma anormal proliferação e diferenciação destas células como alto risco de evoluir para uma leucemia mieloide aguda. O diagnóstico positivo é dado com a observação de uma ou mais citopenias por pelo menos 2 meses: hipocelularidade na medula óssea acompanhada de apoptose de precursores hematopoiéticos e atipias medulares em pelo menos uma série celular (YOUNG, 2002; NIMER, 2008).

Leucemias são neoplasias malignas das células primitivas hematopoiéticas que se originam na medula óssea e se distribuem pela circulação e órgãos. Representam um grupo de doenças hematológicas malignas caracterizadas pela expansão clonal de células hematopoiéticas com proliferação descontrolada, diminuição de apoptose e bloqueio de diferenciação. As leucemias mais frequentes são classificadas segundo o grau de diferenciação das células (agudas ou crônicas) e a linhagem predominante de células, mielóides ou linfóides. São descritas: Leucemia Mieloblástica Aguda, Leucemia Linfoblástica Aguda, Leucemia Mielóide Crônica e Leucemia Linfocítica Crônica (JAMRA; LORENZI, 1997; GOLDSTEIN, 2010). A incidência varia de acordo com a idade, o tipo de leucemia e o sexo acometido. Algumas condições genéticas podem também aumentar o risco de leucemia. Por exemplo, pessoas com anomalias

cromossômicas como a Síndrome de Down têm maior probabilidade de desenvolver leucemias. (GOLDESTEIN, 2010).

Dentre essas neoplasias a leucemia mielóide aguda (LMA) é a que mais acomete indivíduos expostos aos HPA (KHALADE et al., 2010). É uma doença clonal do tecido hematopoético caracterizada pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mielóide, ocasionando produção insuficiente de células sangüíneas maduras normais (HANAHAN; WEINBERG, 2000). As causas mais comuns são alterações sangüíneas pré-leucêmicas, tais como a síndrome mielodisplásica ou síndrome mieloproliferativa. A LMA é caracterizada por neutropenia, anemia e plaquetopenia e aumento de blastos na medula óssea. O mecanismo que leva a célula progenitora a perder o controle da proliferação celular permanece incerto, mas a ativação de protooncogenes e mutações em genes supressores de tumor que também regulam o ciclo celular parecem estar envolvidas na patogênese das leucemias (NIMER, 2008).

Um estudo feito por Khalade e colaboradores evidenciou que a exposição crônica ao benzeno de trabalhadores de indústria de sapato, de borracha ou de tinta aumenta o risco da LMA com padrão dose resposta, isto é, quanto maior a exposição dessas pessoas ao benzeno maior a chance de desenvolverem a LMA (KHALADE et al., 2010).

### **1.10 MODELO ANIMAL NO ESTUDO DA CARCINOGENÊSE**

Em modelo murino o aumento da incidência de linfomas vem sendo observado em várias linhagens isogênicas quando expostas ao benzeno ou ao DMBA (BUTERS et al., 1999; GOLDSTEIN, 2010). Contudo, tem sido difícil o desenvolvimento de um modelo animal na indução de LMA por exposição a xenobióticos. Um estudo em linhagens de camundongos C3H/He heterozigotos quanto à deficiência de p53 demonstrou que a exposição crônica ao benzeno (300 ppm; 6hs/dia; 5 dias/semana por 26 semanas) aumentou o desenvolvimento da leucemia mielóide em 37,5% nesses animais, enquanto em camundongos selvagens ou homozigotos quanto à deficiência de p53 houve aumento da incidência de linfomas, evidenciando o envolvimento desse gene no processo de transformação maligna em células hematopoiéticas (KAWASAKI et al., 2009).

No estudo da carcinogênese de pele, têm sido amplamente utilizadas linhagens de camundongos que, casualmente ou por seleção genética, apresentam predominância de alelos de resistência ou de susceptibilidade ao desenvolvimento tumoral. Linhagens de camundongos susceptíveis (CAR-S) e resistentes (CAR-R) à carcinogênese de pele

em dois estágios obtidas por Seleção Genética Bidirecional a partir de uma população geneticamente heterogênea, diferem quanto ao desenvolvimento e progressão do tumor de pele quimicamente induzido (BANGRAZI et al., 1990).

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

Neste mesmo sentido, linhagens de camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda (AIR), apresentam diferenças na sensibilidade a carcinógenos. Camundongos AIRmax submetidos ao protocolo de aplicação epicutânea de DMBA/TPA apresentaram maior resistência ao desenvolvimento de tumor de pele do que os AIRmin, tanto no número de papilomas (multiplicidade) quanto na porcentagem de animais acometidos (incidência) (BIOZZI et al., 1998; DE SOUZA et al., 2008). O desenvolvimento de massa tumoral decorrente da implantação de células de melanoma humano (SKMEL-28) e murinos (B16F10 e S91) no tecido subcutâneo e a carcinogênese química pulmonar provocada por uretana também discriminou estas duas linhagens (MARIA et al., 2001; MARIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005). Essas linhagens apresentaram uma completa fixação dos alelos de baixa afinidade (*Ahr<sup>d</sup>*) em AIRmax e de alta afinidade (*Ahr<sup>b1</sup>*) em AIRmin, no locus *Ahr* (DE SOUZA et al., 2008).

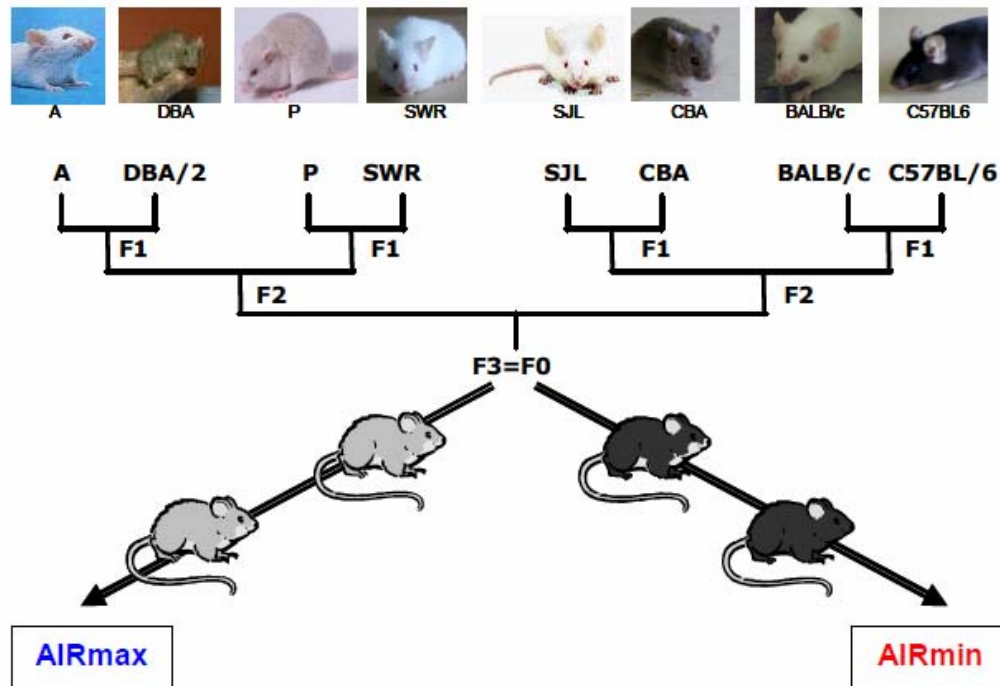
### **1.11 SELEÇÃO GENÉTICA DE LINHAGENS SEGUNDO A REATIVIDADE INFLAMATÓRIA AGUDA.**

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

Estas linhagens foram obtidas por Seleção Genética Bidirecional a partir de uma população geneticamente heterogênea (F0) constituída por cruzamentos equilibrados entre oito linhagens isogênicas A/J, BALB/cJ, C57BL/6J, CBA/J, DBA/2J, P/J, SJL/J e SWR/J (**Figura 4**).

A partir da população F0 foram selecionados aqueles animais que apresentaram alta ou baixa reatividade inflamatória aguda (AIR), segundo o número de leucócitos infiltrados e o teor de proteínas extravasadas em resposta à injeção subcutânea de Biogel, agente flogístico quimicamente inerte e não imunogênico (**Figura 4**) (STIFFEL et al, 1990).

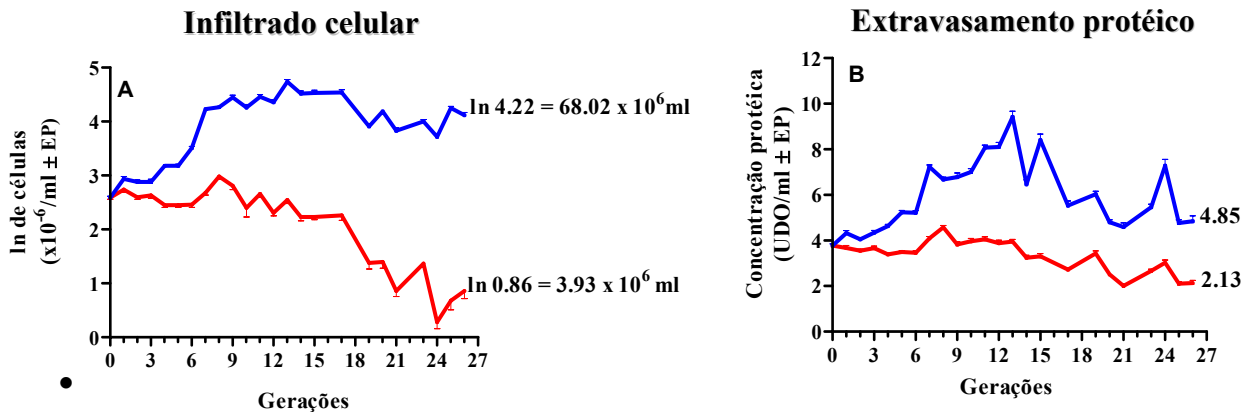
**Figura 4** - Processo de geração das linhagens AIRmax e AIRmin.



FONTE: Katz (2012).

Os acasalamentos dos animais escolhidos nos extremos de resposta máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) foram repetidos em gerações consecutivas, até ser atingido o limite máximo de separação entre as duas linhagens ao redor da vigésima geração destes acasalamentos seletivos. Observou-se a conservação dos fenótipos extremos nas gerações posteriores, indicando que os genes relacionados aos caracteres selecionadores fixaram-se em homozigose em cada linhagem, mantendo-se, entretanto um fundo genético heterogêneo (**Figura 5**) (IBAÑEZ et al., 1992, BIOZZI et al., 1998).

**Figura 5** - Gráfico da divergência entre AIRmax (■) e AIRmin (■) no número médio de leucócitos infiltrantes e extravasamento protéico no sítio de injeção do Biogel



FONTE: Modificado de Biozzi et al. (1998).

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

A diferença entre as duas linhagens no número médio de leucócitos migrantes ao sítio de injeção do Biogel é ao redor de 20 vezes a favor da linhagem AIRmax, sendo os leucócitos polimorfonucleares (PMN) as células predominantes no exsudato. Esta diferença é um fenômeno geral que afeta todos os tecidos vascularizados em resposta a outros agentes flogísticos, tais como carragenina, zimosan e bactérias vivas ou inativas, e veneno de *Bothrops jararaca* (IBAÑEZ et al., 1992; VASQUEZ-BRAVO, 1996 tese; ARAUJO et al., 1998; CARNEIRO, A. et al., 2002). Este maior número de neutrófilos encontrado no exsudato dos camundongos AIRmax é decorrente de alguns fatores como maior produção de substâncias quimiotáticas pelas células residentes ou infiltrantes para atrair neutrófilos, como C3a, C5a e proteína inflamatória do macrófago 2 (MIP-2), após tratamento com Biogel. Outro fator importante é a maior capacidade da medula óssea dos animais AIRmax em produzir neutrófilos maduros devido, em parte, à maior expressão de receptores hematopoiéticos em relação aos camundongos AIRmin. Estas características fenotípicas divergentes entre as linhagens AIRmax e AIRmin podem ser decorrentes do fato de que as linhagens AIR apresentam fixação diferencial de alelos dos genes da subunidade alfa do receptor de IL-3 (IL-3-r  $\alpha$ ). Enquanto a linhagem

AIRmax apresenta fixação preferencial do alelo normal do IL-3R $\alpha$ , que juntamente com o receptor  $\beta$  determina a resposta normal destes camundongos à IL-3, os animais AIRmin possuem alta frequência do alelo que codifica a forma protéica anormal que é associada à baixa resposta dos camundongos A/J. Além disso, a linhagem AIRmax tem maior resistência a apoptose espontânea das células do exsudato do que os animais AIRmin (RIBEIRO et al., 2003).

Conforme apontado anteriormente, estes camundongos por se diferenciarem quanto à capacidade de desenvolver tumores quimicamente induzidos por xenobióticos, incluindo DMBA, constituem, portanto, um modelo apropriado e original para o estudo da influência dos caracteres inflamatórios selecionados na carcinogênese causada pelos HPAs.

Devido à grande diferença de susceptibilidade das linhagens em desenvolver tumores malignos sobre ação desses hidrocarbonetos aromáticos, em nosso trabalho de mestrado estudamos os efeitos do tratamento com DMBA na medula óssea destes animais. Verificamos que apenas os camundongos AIRmin, que exibem *Ahr* de alta afinidade, tiveram depleção na celularidade da medula óssea nas populações mielóide e linfóide. Esta hematotoxicidade refletiu-se na perda da capacidade proliferativa de precursores quando submetidos, *in vitro*, aos estímulos proliferativos de GM-CSF (do inglês: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) (KATZ, 2007).

Além de causar depleção nas células da medula óssea, o tratamento dos camundongos com DMBA também afetou o baço diminuindo a celularidade e a capacidade proliferativa de linfócitos B e T em resposta aos mitógenos LPS e ConA, respectivamente. Os efeitos supressores de proliferação de células B foram observados unicamente na linhagem AIRmin. Por outro lado, o DMBA não discriminou as duas linhagens quanto aos efeitos sobre as células T, as quais sofreram diminuição de proliferação em níveis equivalentes nas duas linhagens (KATZ, 2007).

O nível de expressão de RNAm do *Ahr* e da enzima responsável pela metabolização do DMBA, a *Cyp1a1*, aumentou nas células da medula óssea dos camundongos AIRmin, às 12 horas após o tratamento, enquanto que nos animais AIRmax houve supressão destes genes. O conjunto dos nossos resultados indica que a diferença interlinhagens, de sensibilidade ao DMBA, pode estar relacionada com a diferente capacidade em metabolizar esse xenobiótico (KATZ, 2007).

Portanto, no presente estudo avaliamos a toxicidade do DMBA na medula óssea comparativamente nos animais AIRmax e AIRmin, verificando os efeitos citotóxico e

genotóxico nas células da medula óssea e a repercussão desses efeitos nas respostas imunológicas.





## **2 OBJETIVO GERAL**

Estudar os efeitos mielotóxicos do DMBA comparativamente em animais AIRmax e AIRmin e sua repercussão nas respostas imunológicas.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Avaliar o efeito do DMBA na resposta imune humoral e resposta inflamatória aguda.
  
- ❖ Determinar as modificações qualitativas e quantitativas da medula óssea causadas pelo tratamento.
  
- ❖ Avaliar morte celular na medula óssea.
  
- ❖ Avaliar as diferentes fases do ciclo celular, bem como as proteínas e os genes envolvidos nessa regulação nas células da medula óssea.
  
- ❖ Avaliar expressão dos genes envolvidos com os processos de apoptose e reparo do DNA da medula óssea.
  
- ❖ Avaliar o potencial genotóxico do DMBA na medula óssea.
  
- ❖ Avaliar a capacidade de proliferação das células da medula óssea após tratamento.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CAMUNDONGOS

Foram utilizados camundongos machos das linhagens AIRmax e AIRmin produzidos por seleção genética bidirecional e mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética sob regime alimentar convencional e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os princípios da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (protocolo número 87, folha 60, livro 2).

#### 3.2 TRATAMENTO COM DMBA

*In vivo*: Grupos de animais foram injetados intra-peritonealmente com 50mg de 7,12-Dimetilbenzantraceno (DMBA) por kilo de peso corpóreo (50mg/kg) adquirido da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, Estados Unidos), que dissolvido em óleo de oliva foi injetado em uma única dose. Os animais controles foram tratados com volume equivalente de óleo de oliva. Esta dose foi escolhida por apresentar toxicidade na medula óssea de camundongos isogênicos bem como em camundongos AIR (HEIDEL et al., 2000; KATZ, 2007). O antagonista do AHR,  $\alpha$ -NF (Sigma) foi injetado ip (50mg/kg peso corporal) 24 horas antes do tratamento DMBA e simultaneamente com o tratamento com DMBA.

*In vitro*: As células da medula óssea foram obtidas pela perfusão dos fêmures com 2 mL de RPMI 1640 suplementado (2mM de L-Glutamina, 50 $\mu$ M de  $\beta$ -Mercaptoetanol, 20 $\mu$ g/mL de Gentamicina e 10% Soro Fetal Bovino inativado a 56 °C). As células foram cultivadas em diferentes tempos em placas de 6 poços, na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL e tratadas *in vitro* com 10  $\mu$ M de DMBA dissolvido em DMSO. As suspensões controles foram tratadas somente com DMSO (HEIDEL et al., 1999).

#### 3.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

Após sacrificar os animais por deslocamento cervical e realizar assepsia da pele com álcool 70%, os fêmures foram expostos e excisados. As extremidades foram cortadas e os fêmures foram perfundidos com 2 mL de RPMI 1640 suplementado. O número total e a viabilidade das células foram determinados por meio de contagem em câmara hemocitométrica de Malassez por exclusão com Azul de Tripán 0,2%. Para a

caracterização das populações celulares, lâminas das suspensões foram preparadas em citocentrífugas e coradas com May-Grunwald modificado (ROSENFELD, 1947). As lâminas foram analisadas em microscópio ótico Diaplan Labovert e os tipos celulares determinados pela contagem de no mínimo 200 células.

### **3.4 ANÁLISE FENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Células viáveis da medula óssea, após lise das hemácias (4,15g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,84g  $\text{NaHCO}_2$ , 1mL de EDTA 0,5M pH 8,0), foram numeradas em câmara hemocitométrica de Malassez. Uma alíquota de 100 $\mu\text{l}$  de uma suspensão celular a  $1 \times 10^7$  células/mL foi marcada com anticorpos monoclonais dirigidos contra: granulócitos-Ly-6G e Ly-6C (GR-1, clone: RB6), c-Kit (CD117, clone 2B8), Ly-6A/E (Sca-1, clone D7), cadeia  $\alpha$  da MAC-1 (CD11b, clone: Mi/70) e L-selectina (CD62L, clone: MEL 14). As células Lin foram marcadas com o Kit Mouse Lineage Panel. Como isótipos controles foram utilizados: IgG2b, de rato (clone: A95-1) marcado com Ficoeritrina (PE) ou Isotiocianato de fluoresceína (FITC). Todos os anticorpos foram obtidos da BD Biosciences Pharmigen (BD Biosciences Pharmigen, Franklin Lakes, NJ, USA). O registro de 50000 células foi considerado, utilizando FACSCantoII e analisado pelo programa FlowJo (Tree Star).

### **3.5 HEMOGRAMA**

As amostras sanguíneas foram obtidas por meio de punção do plexo axilar, coletadas com o anticoagulante EDTA 10% para realização do hemograma. A dosagem de hemoglobina foi realizada pelo método da cianometahemoglobulina e a determinação do hematócrito pelo método de Strumia. A contagem de eritrócitos e leucócitos foi realizada em hemocitômetro de Neubauer, utilizando como diluentes os líquidos de Gower e Turk, respectivamente. A contagem diferencial dos leucócitos foi feita em extensões sanguíneas preparadas imediatamente após a coleta e coradas com May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947). As lâminas foram analisadas em microscópio ótico, contando-se no mínimo 200 células.

### **3.6 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO E PROGENITORAS HEMATOPOÉTIICAS (CÉLULAS LIN NEGATIVA) POR MÉTODO IMUNOMAGNÉTICO**

Após a obtenção das células da medula óssea com PBS acrescido de 10% de SFB, as hemácias foram lisadas com tampão de lise. Células viáveis foram numeradas em câmara hemocitométrica de Malassez. Foi adicionado 10µL do coquetel de anticorpos (anticorpos monoclonais biotina-conjugado, anti-CD45R, anti-Gr-1, anti CD11b, anti CD3ε e anti Ter-119) a 40µL de uma suspensão celular a  $1 \times 10^6$  células/mL e a suspensão incubação por 20 minutos a 4 °C. Após esse período foram adicionados 20µL de microbeads anti-biotina, sendo a suspensão incubada novamente por 20 minutos, a 4 °C. As células marcadas foram separadas magnéticamente no aparelho MACS Cell Separation Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec, Cambridge, MA, Estados Unidos)

A caracterização imunofenotípica das células Lin negativas foi feita por marcação com o Kit Mouse Lineage Panel. Como controle isótipo foi utilizado IgG2b de rato conjugado com FITC. O registro de 50000 células foi considerado, utilizando FACSCantoII e analisado pelo programa FlowJo (Tree Star).

### **3.7 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE OU NECROSE ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE FOSFATIDIL SERINA (MARCAÇÃO POR ANEXINA V) E IODETO DE PROPÍDEO (PI)**

Células da medula óssea foram lavadas duas vezes em PBS a 4 °C e ressuspendidas na concentração de  $10^6$  células/mL. Essas células foram distribuídas em placas de 24 poços por 4 horas a 37 °C. Para a detecção de células em apoptose ou necrose foi utilizado o Kit Annexin V-fluorescein isothiocyanate Apoptosis Detection da BD Biosciences conforme as instruções do fabricante. O registro de 10000 células foi considerado, utilizando FACSCantoII e analisado pelo programa FlowJo (Tree Star).

Anexina V liga-se aos fosfolípides fosfatidilserinas, que são externalizados em células que estejam no início do processo de apoptose. Por outro lado, células em processo avançado de morte celular, seja por apoptose ou por necrose, são permeáveis à PI, ao contrário de células viáveis. Logo, células viáveis foram marcadas negativamente tanto para Anexina V quanto para PI, células em apoptose precoce foram marcadas positivamente para Anexina V, células em fase final de apoptose e necrose foram marcadas positivamente com AnexinaV e iodeto de propídio.

### **3.8 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR UTILIZANDO IODETO DE PROPÍDIO (PI)**

Células totais da medula óssea na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL foram fixadas com 1% de paraformaldeído em PBS e incubadas 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Após esse período foi adicionado etanol a 70% gelado por 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ . As células foram lavadas 2 vezes e então incubadas por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$  com um tampão de coloração contendo PI e RNase da BD Biosciences. O registro de 10000 células foi considerado, utilizando FACSCantoII e analisado pelo programa FlowJo (Tree Star).

### **3.9 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE POR ENSAIO COMETA**

A genotoxicidade foi avaliada por ensaio cometa realizado em condições alcalinas, com  $\text{pH} > 14$ . O protocolo utilizado baseia-se em Singh e colaboradores (2007), com as adaptações sugeridas por Garcia e colaboradores (SINGH et al., 1988; GARCIA et al., 2007).

A concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL foram incluídas em 140  $\mu\text{l}$  de agarose a 1%. As células são então transferidas para lâminas de microscopia, revestidas com agarose a 1% e cobertas com lamínulas de 18 x 18mm por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida foi retirada a lamínula e as células foram lisadas com tampão de lise (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO e 1% N-Larosylsarcosina, pH 10) por 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ . Após esse tempo, as lâminas foram lavadas duas vezes com água miliQ. Para o desenrolamento do DNA as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese, cobertas com tampão de eletroforese alcalino (0,3 M NaOH, 1mM EDTA, pH 14). e submetidas à eletroforese por 20 minutos a 300 mA/30V, 1 V / cm da cuba de eletroforese. A neutralização foi feita com tampão de neutralização (Tris 0,4 M pH 7,5) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a neutralização, as lâminas foram submersas em solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, 5% sulfato de zinco, glicerol 5%) por 10 min à temperatura ambiente. A coloração foi feita com 2/3 da solução contendo 0,02% de nitrato de amônio, nitrato de prata 0,02%, 0,1% de ácido tungstosilícico e 0,07% de formaldeído adicionado a 1/3 da solução composta por 5% carbonato de sódio, durante 20 minutos. Após esse processo as lâminas foram mergulhadas por 5min em solução de bloqueio (ácido acético 1%). Após estarem secas, as lâminas foram analisadas em microscópio ótico com aumento de 200x. Nessa análise foram consideradas cem células, cinquenta de cada duplicata. As células foram digitalizadas e analisadas automaticamente usando o software de imagem CASP ([www.casp.of.pl](http://www.casp.of.pl)). Os dados são expressos como a média do OTM (Olive Tail Moment).

**OTM** = % de DNA na cauda X distância entre o centro da cauda e o centro da gravidade da cabeça

### **3.10 PROLIFERAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA EM MEIO LÍQUIDO**

Após 24 horas do tratamento com DMBA, foram obtidas as células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin utilizando o mesmo protocolo descrito no item 4.3. As suspensões celulares foram tratadas com tampão de lise de eritrócitos e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 2mM de glutamina, 1mM de piruvato de Sódio, 20µg/mL de gentamicina, 50µM de mercaptoetanol e 10% de soro fetal bovino inativado. As células foram cultivadas em placas de 24 poços, na concentração de  $5 \times 10^5$ /mL, e estimuladas com 50 ng/mL de GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor) Prepotech (Prepotech, Rocky Hill, NJ, USA) associado ao Ácido retinóico a  $10^{-7}$ M (ATRA - All-trans Retinoic Acid,, Sigma) ou 1µg/mL de G-SCF (Granulocyte colony-stimulating factor) (Prepotech) associado a 1µg/mL de IL-3 (Interleukin-3) (Prepotech) ou 1µg/mL de SCF (Stem Cell Factor) (Prepotech) associado a 1µg/mL de IL-3. Após 5 dias de cultura a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>, as células foram cuidadosamente descoladas com o uso de Tripsina 0,05% e EDTA 0,02%, recolhidas e diluídas em Azul de Trypan a 0,2% para contagem em câmara hemocitométrica de Malassez.

### **3.11 CULTURA CLONOGÊNICA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA**

Após 24 horas do tratamento com DMBA foram obtidas as células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin utilizando o mesmo protocolo descrito do item 4.3. Suspensões de  $5 \times 10^5$  células/mL em RPMI 1640 foram cultivadas em meio semi-sólido contendo 50% de metilcelulose a 2% da StemCell (Metho-Cult da StemCell Technologies, Tukwila, WA, USA), 20% de SFB, 1% de L-glutamina 2 mM, 20µg/mL de gentamicina e 50 ng/mL de GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor) (Prepotech) ou IL-3 (Interleukin-3) (Prepotech) associado a 1µg/mL de SCF (Stem Cell Factor) (Prepotech) em placas de cultura de 35 x 10 mm. Essas placas foram incubadas por 7 dias a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras foram analisadas em duplicata para cada camundongo.

Durante 7 dias o número total e diferencial de Unidades Formadoras de Colônias (CFU) foi determinado utilizando microscópio invertido Diaplan (Leitz). Somente



colônias contendo mais do que 50 células foram consideradas. A diferenciação das colônias foi determinada em amostras colhidas em lâminas de cultura através de citocentrífuga e coradas pelos reativos de Diff-Quick. As colônias foram identificadas como granulocíticas (G-CFU), macrofágicas (M-CFU) e mistas (GM-CFU) e seu número expresso como número médio de CFU por  $5 \times 10^4$  células cultivadas.

### **3.12 INDUÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA PRODUZIDA POR BIOGEL**

Suspensão de partículas de Biogel P100 (Microesferas de poliacrilamida - P100 Biogel da BioRad) (Biorad, Touzard & Matignon, Paris, França) foi injetada no dorso do animal por via subcutânea (s.c). O exsudato local foi coletado pela injeção de 1 mL de PBS, contendo 20 U/mL de calciparina, o fluido foi obtido juntamente com as microsferas de biogel e deixado sedimentar por 3 minutos à temperatura ambiente para eliminar o biogel da suspensão. As células nucleadas foram contadas em alíquotas diluídas em azul de Metileno contendo 1% de ácido acético. A determinação protéica do exsudato foi feita, por medida da densidade ótica a 280nm, em espectrofotômetro U3000 (Hitachi) e expressa como unidades de densidade ótica (UDO).

#### **3.12.1 *Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)***

A quantificação do óxido nítrico (NO) presente no exsudato inflamatório foi baseada na Reação Colorimétrica de Griess. Alíquotas de 50  $\mu$ L, da fase líquida do exsudato, ou do nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), para curva padrão, foram distribuídas em placa de 96 poços (NUNC). Adicionamos a esses poços 50  $\mu$ L do Reagente de Griess (sulfonilamida 1% em ácido fosfórico 5% e N-(1-naftil) etilenediamine 0,1% - Sigma Chemical Co.). A absorbância foi determinada em leitor de ELISA automático Labsystems Multiscan EIA (Labsystems and Life Sciences Internacional, UK) utilizando-se filtro de 540nm. Os resultados obtidos em densidade ótica (D.O.) foram transformados em  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-/2 \times 10^5$  células, mediante equação de regressão linear com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de  $\text{NaNO}_2$  (5, 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$ ).

#### **3.12.2 *Quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )***

Alíquotas de 100  $\mu$ l, de células do exsudato inflamatório na concentração de  $2 \times 10^6/\text{mL}$  em solução de vermelho fenol foram distribuídas em placa de 96 poços (NUNC), sendo que à metade dos poços foram adicionados 10 $\mu$ l de PMA (20ng/poço)

fabricado pela Sigma. A curva padrão foi feita com concentrações molares previamente conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/100 µl da Solução de Fenol Vermelho – SFV). A placa foi então incubada por uma hora na estufa, a 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Após este período, 10µl de NaOH 1N foram adicionados a cada poço para interromper a reação. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA automático Labsystems Multiscan EIA, utilizando-se filtro de 620nm.

### ***3.12.3 Determinação da produção de citocinas no exsudato inflamatório***

Os ensaios de ELISA para as citocinas IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α foram realizados com o Kits da BD Biosciences Pharmingen Mouse ELISA Set de acordo com as especificações do fabricante. Utilizamos placas de poliestireno (NUNC - Maxisorp) de 96 poços. As concentrações das amostras foram determinadas baseando-se na curva padrão dos respectivos recombinantes.

## **3.13 DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL APÓS IMUNIZAÇÃO COM GAMAGLOBULINA HUMANA**

A Gamaglobulina Humana (HGG) (0,05 mg/mL) foi diluída em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4, e adicionado lentamente a 1,25 mg/mL de sílica SBA-15 (v / v) e mantida durante 24 horas a 2-8 °C até completa homogeneização. Os camundongos AIR foram imunizados com HGG em SBA-15 por via subcutânea em um volume final de 0,2 mL. Esses animais receberam uma segunda imunização sc da HGG em SBA-15 após 21 dias da primeira imunização.

Os títulos de anticorpo anti-HGG foram determinados nos soros obtidos em tempos variados por ELISA em placas de 96 poços. As placas foram sensibilizadas com 100 µL/poço da solução de antígeno 1µL g/mL ou 0,2 µg/poço do antígeno em solução carbonato/bicarbonato pH 9,6 (0,05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 0,05M NaHCO<sub>3</sub>) e incubadas a 4 °C overnight. Após esse período a placa foi lavada com PBS-Tween 0,05% e bloqueada por 2 horas à 37 °C com 200µL de PBS/gelatina 0,5%. Em seguida as placas foram lavadas e 100µL das amostras foram diluídas de forma seriada (fator 2) com PBS-T/Gelatina 0,5% e incubadas por 1 hora à 37 °C. Adicionamos 100 µL do anticorpo marcado com peroxidase Southern Biotechnology (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama, USA) diluído em PBS-T/Gelatina 0,5% (anti- IgG [1:2500]) e incubamos por 1 hora à 37 °C. Após a lavagem, 100 µL de substrato fresco (5 mg contendo o-fenilenodiamina, Sigma, e 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão citrato/fosfato em pH

4,9) foram adicionados a cada poço, e as placas foram então incubadas a 37 °C. Após 10 minutos, a reação foi interrompida com 50 µL de ácido cítrico 0,2 M. A absorbância foi mensurada num comprimento de onda de 405nm e o título de anticorpos expresso em log<sub>2</sub>, calculado como a recíproca da diluição do soro dando uma absorbância de 20% do valor de platô.

### **3.14 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS**

Células totais da medula óssea ou células Lin negativas de camundongos AIRmax e AIRmin foram recolhidas após diferentes períodos do tratamento com DMBA ou óleo de oliva. As proteínas das células foram extraídas com tampão RIPA fabricado pela Pierce (Pierce, Meridian Rd, Rockford, IL, USA) contendo inibidores de proteases e fosfatases (NaF 50mM, Leupeptina 10 µg/mL, PMSF 1mM e Aprotinina 10µg/mL). As células foram homogeneizadas sob agitação moderada, durante 1 hora em banho de gelo. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e centrifugado a 14000xg durante 15 minutos para sedimentação dos debris celulares. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -40 °C até a realização da análise.

Foi determinada a concentração protéica pela técnica de BCA (Acido Bincicônico), utilizando placa de 96 poços. Alíquotas de 25µL de concentrações decrescente de BSA (Albumina Sérica Bovina) foram adicionadas na placa para determinar a curva padrão. As amostras foram então diluídas seriadamente na razão dois. Após adição dos reagentes do kit BCA, da Pierce, a placa foi transferida para a estufa a 37 °C e incubada por 30 minutos. Decorrido este tempo as densidades óticas das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 520nm (Labsystem). Baseado na curva padrão, determinamos as concentrações protéica das amostras.

### **3.15 WESTERN BLOT PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS REGULATÓRIAS DO CICLO CELULAR**

Após a obtenção das proteínas das células totais da medula óssea ou células Lin negativas, as amostras foram diluídas no Tampão Laemmli 5X concentrado (Tris HCl 1M pH6,8, 0,01% de azul de bromofenol, 10% de SDS, 50% de glicerol e 10% de mercaptoetanol) na proporção de 1 parte de tampão para 4 partes de amostras, deixando-se em ebulição durante 5 minutos para a desnaturação.

Após a quantificação das proteínas totais foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), utilizando gel de empilhamento de 4% e de 10% para o gel de separação de acordo com o sistema de Laemmli (LAEMMLI, 1970).

As amostras foram aplicadas no gel como também o padrão de peso molecular. A eletroforese foi executada a 150 Volts em tampão de corrida pH 8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 0,1% de SDS e água bidestilada) até que as amostras percorram todo o gel. Imediatamente após a separação foi feita a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF da Millipore (Millipore, Billerica, MA, USA). A transferência foi realizada no sistema semi-seco da GE Amersham Biosciences (GE Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) com tampão de transferência pH 8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 20% de metanol e 0,02% de SDS) a 70mA por 90 minutos. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos e depois lavada com água destilada, para monitorarmos a qualidade da transferência. A seguir a membrana foi tratada com tampão de bloqueio, solução de leite a 5% (TBS com 0,01% de Tween 20 e leite em pó desnatado Molico® a 5%), por 90 minutos à temperatura ambiente e sob constante agitação. A membrana foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem TBS-Tween (solução de TBS com 0,01% de Tween 20) 3 vezes de 10 minutos cada lavagem sob agitação à temperatura ambiente para depois ser incubada com o anticorpo primário de anti-p53 (clone PAb 122, diluição 1:400, BD Biosciences Pharmigen), anti-p21 (clone SXM30, na diluição 1:2000, BD Biosciences Pharmigen), anti-p27 (Kip1) (clone 57/kip1/p27, diluição 1:2000, BD Biosciences Pharmigen), anti-ciclina D1 (clone Human Full-length Cyclin D1 Recombinant Protein, diluição 1:2000, BD Biosciences Pharmigen) ou anti-cdk4 (clone 97/Cdk4, diluição 1:2000, BD Biosciences Pharmigen) nas devidas diluições em solução de leite a 3% (PBS com 0,05% de Tween 20 e leite em pó desnatado Molico® a 3%). Essa solução foi mantida *overnight*, a 4 °C e depois a membrana foi novamente lavada da mesma forma descrita anteriormente. A seguir, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-mouse IgG conjugado com peroxidase, BD Biosciences Pharmigen, na diluição de 1:2000) por 1 hora, à temperatura ambiente e sob agitação. Novamente a membrana foi submetida ao processo de lavagem e prosseguiu-se com a detecção por quimioluminescência utilizando o kit de revelação ECL (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) no equipamento ImageQuant 400 (GE, Healthcare). A aquisição da imagem e a análise foi realizada utilizando o programa ImageQuant TL.

Para a quantificação das proteínas foi utilizada a marcação de  $\beta$ -actina com o anticorpo anti-  $\beta$ -actina conjugado com peroxidase (clone AC-15, diluição 1:40000, Sigma-Aldrich), para normalização.

### 3.16 EXTRAÇÃO DE RNA

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

### 3.17 OBTENÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (CDNA)

A síntese de cDNA foi feita por meio de reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para tanto, 10µL contendo 1µg do RNA foram adicionados a 1µL de Oligo(dT) (50µM), 2µL de água livre de RNase e 1µL de oligonucleotídeos dNTP (10 µM). A mistura foi homogeneizada e submetida à temperatura de 65 °C por 5 minutos. Após este período, a mistura permaneceu no gelo por 1 minuto. Em seguida foram adicionados 4 µL de tampão específico 5X concentrado (250 mM Tris-HCL pH 8,3, 375 mM KCL e 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1µL de DTT (0,1M) e 1µL da enzima SuperScript III RNase H- Reverse Transcriptase-Invitrogen (200 U/mL). As amostras foram aquecidas à 50 °C por 50 minutos e inativadas à 70 °C por 15 minutos. As reações foram incubadas amplificadas em termocicladores MJ Research PTC 200 (MJ Research Waltham, USA).

### 3.18 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO-REAL

Os genes estudados foram: *PARP-1*, *p53*, *p21* e *caspase-3* a partir de amostras de RNA obtidas das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin, 12 e 24 horas após o tratamento com DMBA ou óleo de oliva. A cada amostra de 2 µL de cDNA, foi adicionada seqüências de primers específicas na concentração de 5µM, 12,5 µL do Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen) e água, para ajustar o

volume final de reação em 25µL por tubo. As reações foram incubadas no aparelho Chromo 4 (MJ Research) e submetidas a uma fase inicial à 50°C por 2 minutos, seguido da fase de ativação da enzima (“hot start”) a 95°C por 2 minutos. As seqüências alvo foram então amplificadas durante 39 ciclos constituídos de etapas sucessivas de desnaturação (95 °C por 15 segundos) e de anelamento (60 °C durante 1 minuto). A aquisição da fluorescência incorporada ao material dupla-fita amplificado a cada ciclo foi efetuada na etapa de extensão a 72 °C durante 1 minuto.

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

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

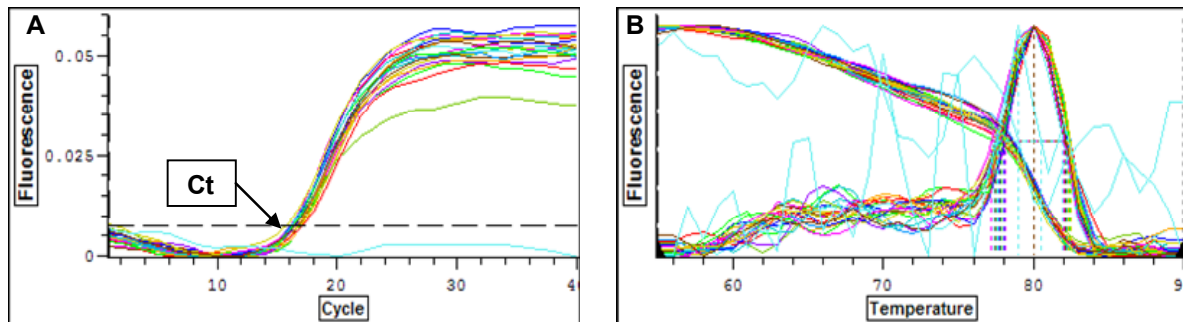
Esse sistema detecta o aumento da quantidade de fitas de DNA marcado com SYBR Green, molécula fluorescente. À medida que a reação ocorre, a fluorescência emitida pela amostra excitada por um laser ou por uma lâmpada de halogênio associada a um filtro específico, é detectada a cada ciclo e enviada para uma unidade processadora. O PCR é feito com número variável de ciclos de modo a determinar o menor número necessário para a amplificação (Ct), isto é, o número do ciclo no qual a fluorescência excede o limiar (ponto fixo previamente determinado). A amplificação de ambos os genes deve estar na fase exponencial (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A cada amostra foi atribuído um valor de Ct (“Cycle Threshold”) referente ao número de ciclos necessários para que a fluorescência incorporada às duplas fitas amplificadas comece a aumentar acima da fluorescência de fundo.

Os resultados são, então, expressos pela normalização dos valores de cT do gene em estudo (alvo), *Parp-1*, *p53*, *p21* e *caspase-3*, com um gene constitutivo, método comumente utilizado para as correções de pequenas variações devido à diferença na quantidade do RNA total. Um gene constitutivo ideal deve ser aquele cuja expressão ocorra em níveis constantes em diferentes tecidos do organismo, em todos os estágios do desenvolvimento e não deve ser afetado pelo tratamento experimental (GIULIETTI *et al.*; 2001).

No presente estudo, utilizamos como gene constitutivo, a *Cyclofilina* que já foi empregada com sucesso em outros estudos como o de Galvan e colaboradores em 2006 (GALVAN *et al.*, 2006). Na **figura 6** estão representadas as análises da expressão do

mRNA do gene constitutivo *Cyclofilina* (A), após 24hs de tratamento com DMBA ou com óleo de oliva e sua respectiva curva de Dissociação (B), ou seja, o nível de fluorescência em função da temperatura, o que revela a especificidade dos *primers* devido à amplificação de um único produto.

**Figura 6** - Experimento de PCR em Tempo Real para quantificação da expressão da *Cyclofilina* nas células da medula óssea obtidas dos animais AIRmax e AIRmin após 24hs do tratamento com DMBA ou óleo de oliva. Os gráficos mostram os respectivos “Cycle Threshold” (Ct), (A) e as curva de Melt (B). A curva com cor azul clara indica o material branco (sem inclusão de cDNA na reação). Ensaio realizado no Chromo 4 (MJ Research) utilizando Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG.



FONTE: Katz (2012).

Para a expressão do gene constitutivo, *Cyclofilina*, independente do tratamento e da linhagem estudada, os valores de cT mantiveram-se constantes. Observamos também que a expressão do mRNA da *Cyclofilina* é mais alta do que a expressão dos outros genes. Isto ocorre porque a *Cyclofilina* é um gene constitutivo expresso em grande quantidade nas células da medula óssea (HASEL; SUTCLIFFE, 1990).

As seqüências sintéticas (*primers*) que foram usadas para amplificar a partir dos cDNA específicos estão listados na Tabela 1, Estes primers foram desenhados entre exons que flanqueiam íntrons de grande tamanho ( $\geq 1000$  pb), evitando assim a amplificação do DNA genômico.

**Tabela 1**- Seqüências sintéticas (primers) dos genes na orientação 5' - 3'.

Primer	Sense (3')	Antisense (5')
<i>Cyclofilina</i>	AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT	AAATGCCCGCAAGTCAAAAG
<i>Parp-1</i>	GGACGAAGAGGCAGTAAAGAAG	ACGTCATGACGCTCAGCCA
<i>p53</i>	TGAAACGCCGACCTATCCTTA	GGCACAAACACGAACCTCAA
<i>p21</i>	ATGTCCAATCCTGGTGATGT	TGCAGCAGGGCAGAGGAAGT
<i>Caspase-3</i>	GGCCTGAATACCAAGTCA	ACAAAGCTGCTCCTTTTGCT

FONTE: Katz (2012).

### **3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A diferença entre as médias foi calculada pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Turkey para a comparação entre os grupos. Consideramos significativos aqueles valores de P inferiores a 0,05 bicaudal.





## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL A GAMAGLOBULINA HUMANA (HGG) EM AIRMAX E AIRMIN APÓS O TRATAMENTO COM DMBA

Além de causar depleção nas células da medula óssea, com redução de neutrófilos e de células B indiferenciadas, o tratamento com DMBA também afeta outros órgãos hematopoiéticos como o baço, diminuindo a celularidade e a capacidade proliferativa de linfócitos B em resposta ao mitógeno LPS na linhagem de camundongos AIRmin (KATZ, 2007).

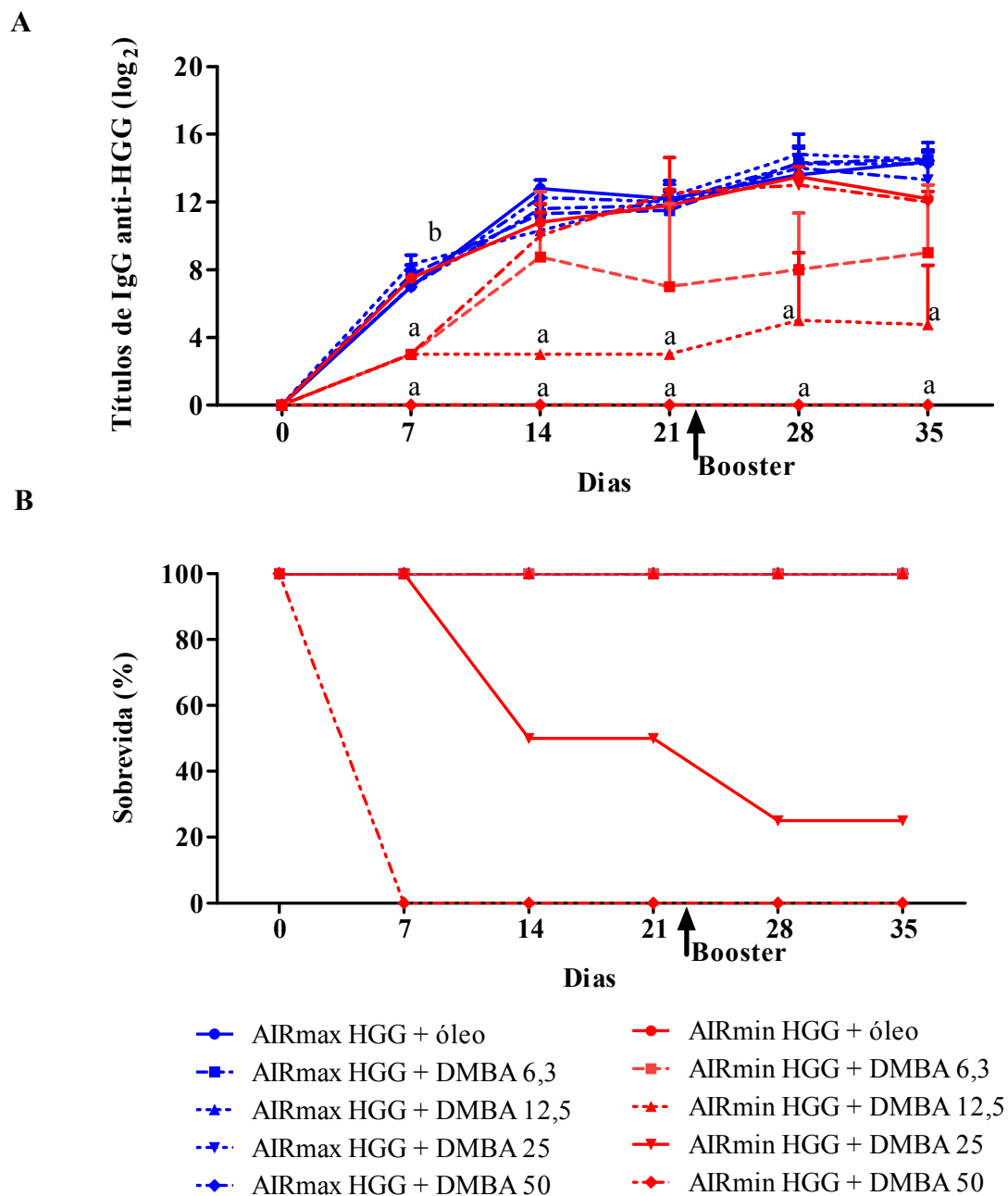
Esse efeito supressor pode afetar o desenvolvimento das células B produtoras de anticorpos e de memória, resultando na ineficácia da resposta imune humoral (DEAN et al., 1986; THURMOND et al., 1987; YAMAGUCHI et al., 1997; HEIDEL et al., 1999; ALLAN et al., 2006).

Para avaliar a influência do DMBA na resposta imune humoral dos camundongos AIRmax e AIRmin grupos de cinco animais de cada linhagem tratados com diferentes doses de DMBA ou óleo de oliva foram inoculados com 50µg/mL de gamaglobulina humana (HGG) adsorvida em sílica mesoporosa SBA-15, como adjuvante (CARVALHO et al., 2010). Avaliamos os títulos de anticorpos anti-HGG durante a resposta primária e secundária.

Após 7 dias da imunização todos os camundongos AIRmin tratados com as diferentes doses de DMBA apresentaram títulos de anticorpos anti-HGG inferiores àqueles apresentados pelos controles e pelos camundongos AIRmax. A inibição pelo DMBA manteve-se até o final da cinética com a dose de 12,5 mg/kg. Apesar de não ser estatisticamente significativa, o perfil cinético da produção de anticorpos obtido com a dose de 6,3 mg/Kg foi também inferior ao grupo controle (**Figura 7A**). Em consequência da morte de 100% dos camundongos AIRmin tratados com 50 mg/kg até 7 dias, não foi possível avaliar a resposta humoral destes animais (**Figura 7B**).

Constatamos também que o tratamento com DMBA não alterou a produção de anticorpos anti-HGG e nem a sobrevivência de camundongos AIRmax (**Figura 7**).

**Figura 7** - Produção de anticorpos IgG anti-HGG por camundongos AIR tratados com diferentes doses de DMBA ou óleo de oliva. **(A)** Títulos de anticorpos da resposta primária e secundária após a imunização. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. **(B)** Porcentagem da sobrevivência a=diferença significativa,  $p<0,05$ , entre os animais tratados com DMBA e com óleo de oliva; b= diferença significativa,  $p<0,05$ , entre a sangria prévia e após a imunização com HGG.



FONTE: Katz (2012).

## 4.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA PRODUZIDA POR BIOGEL, APÓS O TRATAMENTO COM DMBA

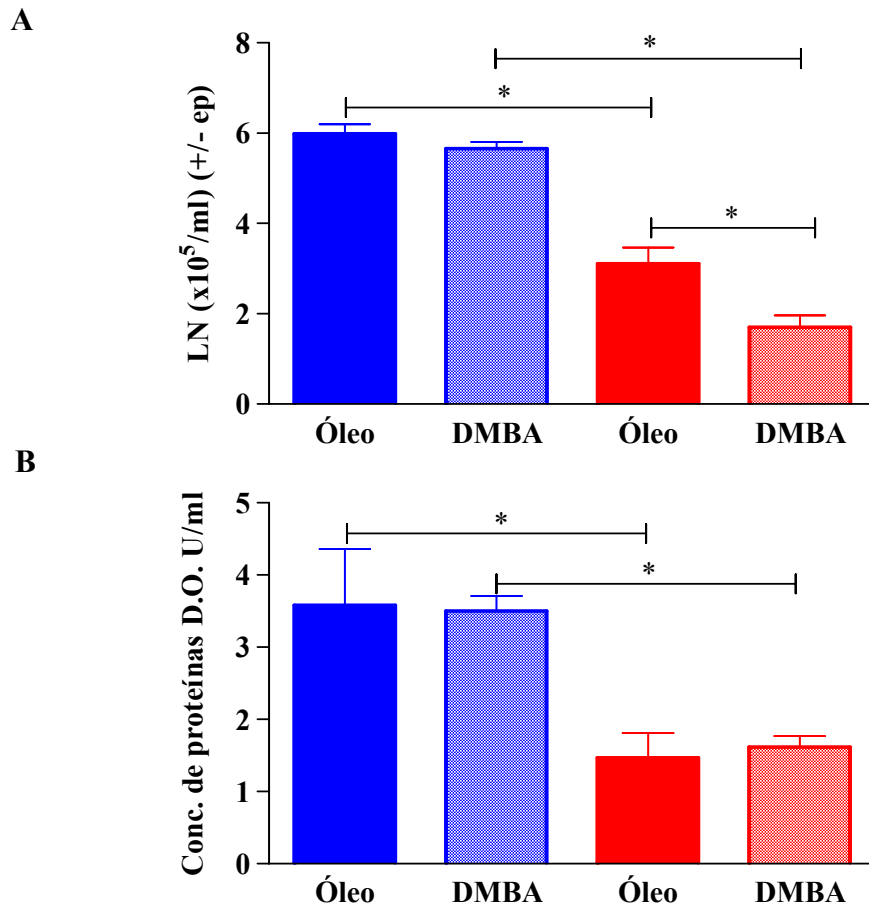
Sabe-se que os neutrófilos polimorfonucleares são o tipo celular mais abundante nas fases iniciais dos processos inflamatórios e formam a primeira linha de defesa do organismo contra microorganismos patogênicos.

Com o intuito de verificar se o DMBA também afeta o aporte de células da imunidade inata, principalmente neutrófilos, em resposta a um estímulo inflamatório agudo local, camundongos AIRmax e AIRmin foram tratados com DMBA ou óleo de oliva e após 24 horas foram inoculados com 0,75 mL de biogel P100, por via subcutânea no dorso, para indução da reação inflamatória aguda local.

### 4.2.1 *Infiltrado Celular e proteína extravazada*

O número de células presente no exsudato inflamatório formado no tecido subcutâneo após 24 horas da administração de biogel foi reduzido em 45% nos camundongos AIRmin tratados com DMBA, enquanto que os animais AIRmax não apresentaram alteração após o tratamento. Existe uma significativa diferença entre as linhagens AIRmax e AIRmin controles,  $p < 0,0001$ , decorrente do processo seletivo (**Figura 8A**). A análise diferencial de leucócitos presentes no exsudato inflamatório de ambas as linhagens mostrou que mais de 90% dessas células são neutrófilos. Por outro lado, o teor de proteínas no exsudato inflamatório das duas linhagens não foi alterado pelo tratamento com DMBA, demonstrando, assim, que o DMBA afeta somente a celularidade do infiltrado inflamatório dos animais AIRmin (**Figura 8B**).

**Figura 8** - Número total de células (A) e concentração protéica (B) do exsudato inflamatório em resposta ao biogel em camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) após 24 horas do tratamento com 50mg/Kg de DMBA ou óleo de oliva. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=10/grupo). Diferença entre os animais AIRmax e AIRmin e entre os animais tratados com oleo e com DMBA,\*  $p \leq 0,05$ .



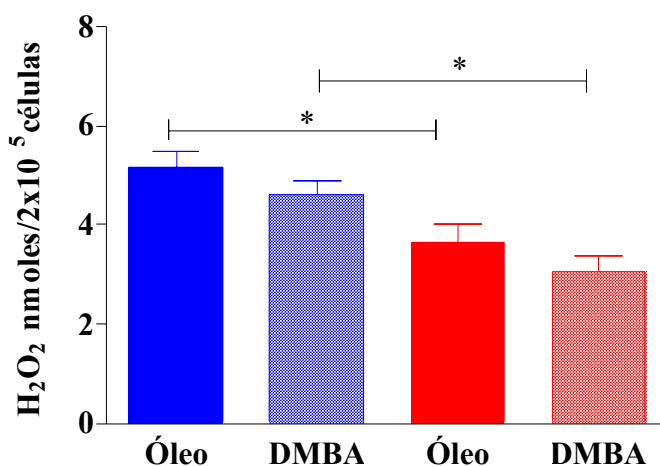
FONTE: Katz (2012).

#### 4.2.2. Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas por fagócitos, como os neutrófilos, durante o burst oxidativo em defesa do hospedeiro, mas também podem ser nocivas ao organismo em uma variedade de desordens inflamatórias. Dentre as EROs podemos citar o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua sobre microorganismos fagocitados destruindo-os, mas também atuam sobre as células íntegras. A ação do peróxido de hidrogênio se deve ao ataque à membrana lipídica, ao DNA ou a outros componentes das células, pelos radicais livres tóxicos que o peróxido produz (BERGSTRAND, 1990). Assim, avaliamos a função celular, isto é, se o DMBA afetou a capacidade de síntese de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas células que migraram em direção ao estímulo inflamatório por biogel.

Observamos que o tratamento com DMBA não foi capaz de induzir a liberação espontânea desta substância pelas células inflamatórias em cultura (dados não apresentados). Após estimulação das células infiltradas com PMA (do inglês: phorbol 12-myristate 13-acetate), um potente ativador de proteína quinase C, foi possível detectar níveis significativos de  $H_2O_2$  em ambas as linhagens com valores 30% superiores a favor dos camundongos AIRmax independente do tratamento prévio com DMBA. Este tratamento, portanto, não interferiu na ativação pelo PMA das células do exsudato dos camundongos AIRmin tampouco dos AIRmax (**Figura 9**).

**Figura 9** – Produção de  $H_2O_2$ , induzida in vitro com PMA, pelas células do exsudato inflamatório após 24hs do estímulo com biogel em camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) tratados 24 horas antes com 50mg/Kg de DMBA ou óleo de oliva. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=6/grupo). Diferença entre os animais AIRmax e AIRmin, \*  $p \leq 0,05$ .



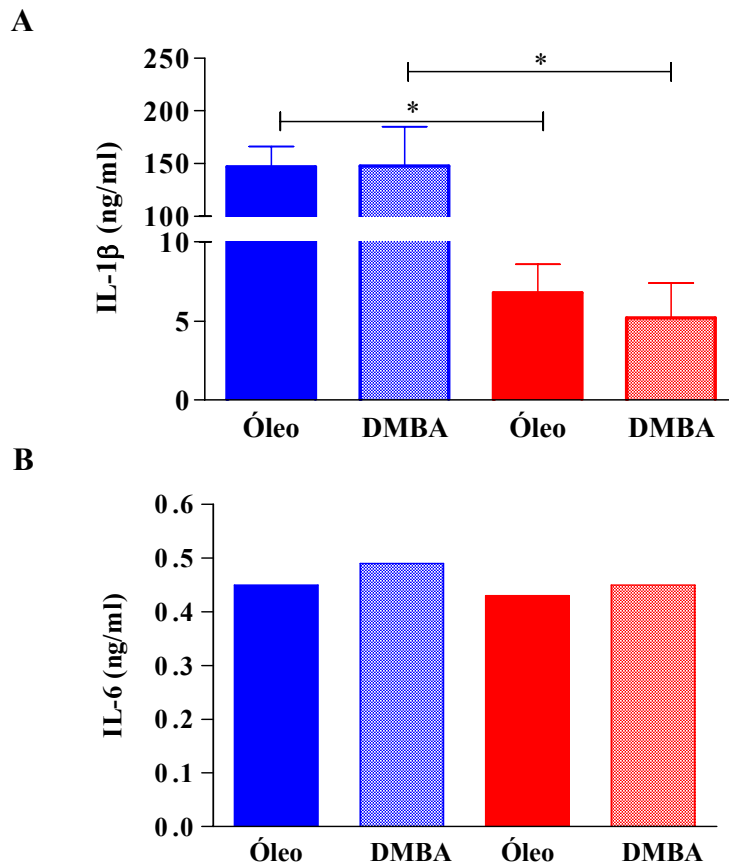
FONTE: Katz (2012).

#### 4.2.3 Produção de Citocinas inflamatórias

Avaliamos a presença das citocinas de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 no exsudato inflamatório em resposta ao biogel nos animais previamente tratados com DMBA.

Os resultados obtidos de produção de IL-1 $\beta$ , mostraram que não houve diferença significativa entre os animais tratados ou não com DMBA. Observamos também que os camundongos AIRmax apresentaram níveis significativamente superiores dessa citocina em relação aos AIRmin,  $p \leq 0,001$  (**Figura 10A**). Quanto à produção de IL-6, não observamos diferença entre camundongos tratados ou não com DMBA e nem qualquer diferença interlinhagens (**Figura 10B**).

**Figura 10-** Produção de IL-1- $\beta$  (A) e IL-6 (B) pelas células do exsudato inflamatório em resposta ao biogel em camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) tratados previamente com 50mg/Kg de DMBA ou óleo de oliva. Para produção de IL-1  $\beta$  os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de quatro animais por grupo e para os resultados da produção de IL-6 como média do pool de quatro animais por grupo. Diferença entre os animais AIRmax e AIRmin, \*  $p \leq 0,05$ .



FONTE: Katz (2012).

A produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  não foram detectadas nos exudatos dos animais experimentais em resposta ao biogel.

#### 4.2.4 Expressão de Moléculas de Adesão

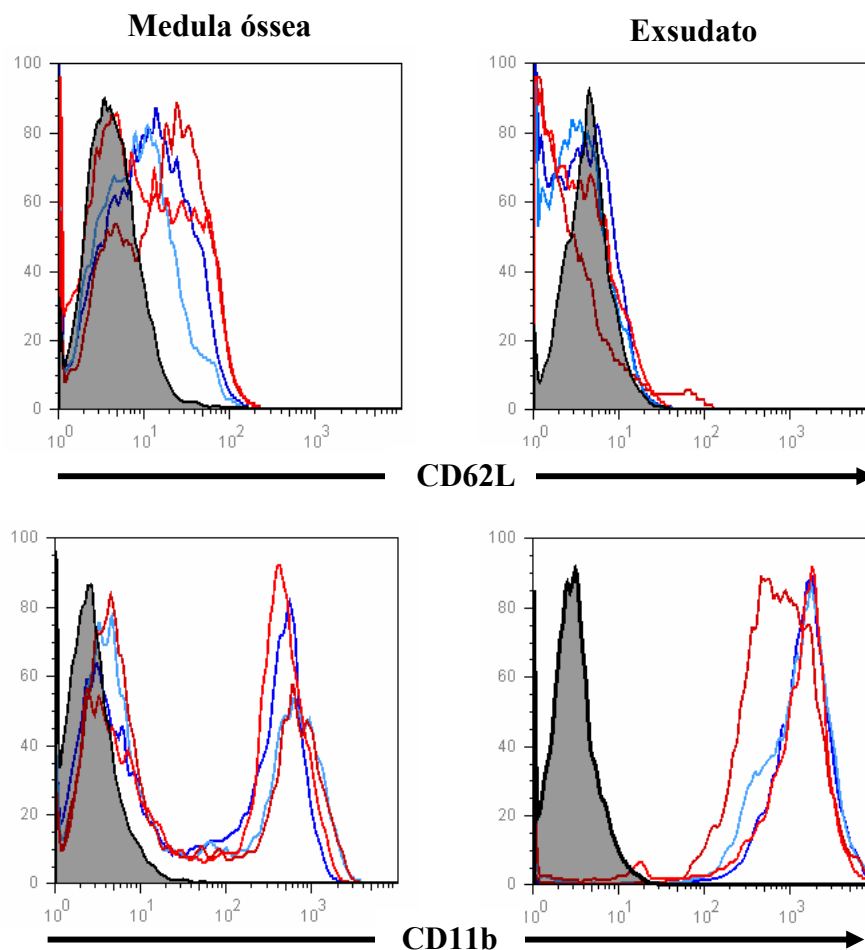
As moléculas L Selectina (CD62L) e  $\beta 2$  integrina (CD11b), presentes nos leucócitos circulantes participam diretamente da migração celular por meio da interação com seus respectivos ligantes na superfície das células endoteliais, promovendo os fenômenos de rolamento e firme adesão, respectivamente.

Verificamos em nossa avaliação que, apesar da diferença no número de células entre os camundongos AIRmax e AIRmin e entre os animais AIRmin tratados com DMBA e seus

controles, o nível de expressão de CD62L e de CD11b foram equivalentes na medula óssea ou no exsudato inflamatório dos animais tratados ou não com DMBA (**Figura 11**).

A presença da CD62L foi mais elevada em células da medula óssea de ambas as linhagens, diminuindo sua expressão a zero no exsudato inflamatório. O mesmo não ocorreu com a expressão de CD11b. Esse fato pode ser explicado pela clivagem da CD62L em células ativadas quando a expressão de CD11b aumenta. Esta última constitui o receptor tipo 3 do complemento (CR3) e está relacionada com vários processos biológicos: fagocitose, desgranulação celular, *burst* respiratório, polimerização de actina, além da produção de citocinas pró-inflamatórias (WALZOG et al, 1999). Estas moléculas também são importantes na capacidade da medula óssea de armazenar e disponibilizar os neutrófilos para a circulação (SURATT et al, 2001).

**Figura 11** - Expressão de CD62L e CD11b nas células da medula óssea e do exsudato inflamatório em resposta ao biogel em camundongos AIRmax (óleo/DMBA) AIRmin (óleo/DMBA) tratados previamente com 50mg/Kg de DMBA ou óleo de oliva.



FONTE: Katz (2012).



### 4.3 EFEITO DO DMBA SOBRE A CELULARIDADE DA MEDULA ÓSSEA NOS CAMUNDONGOS AIRMAX E AIRMIN

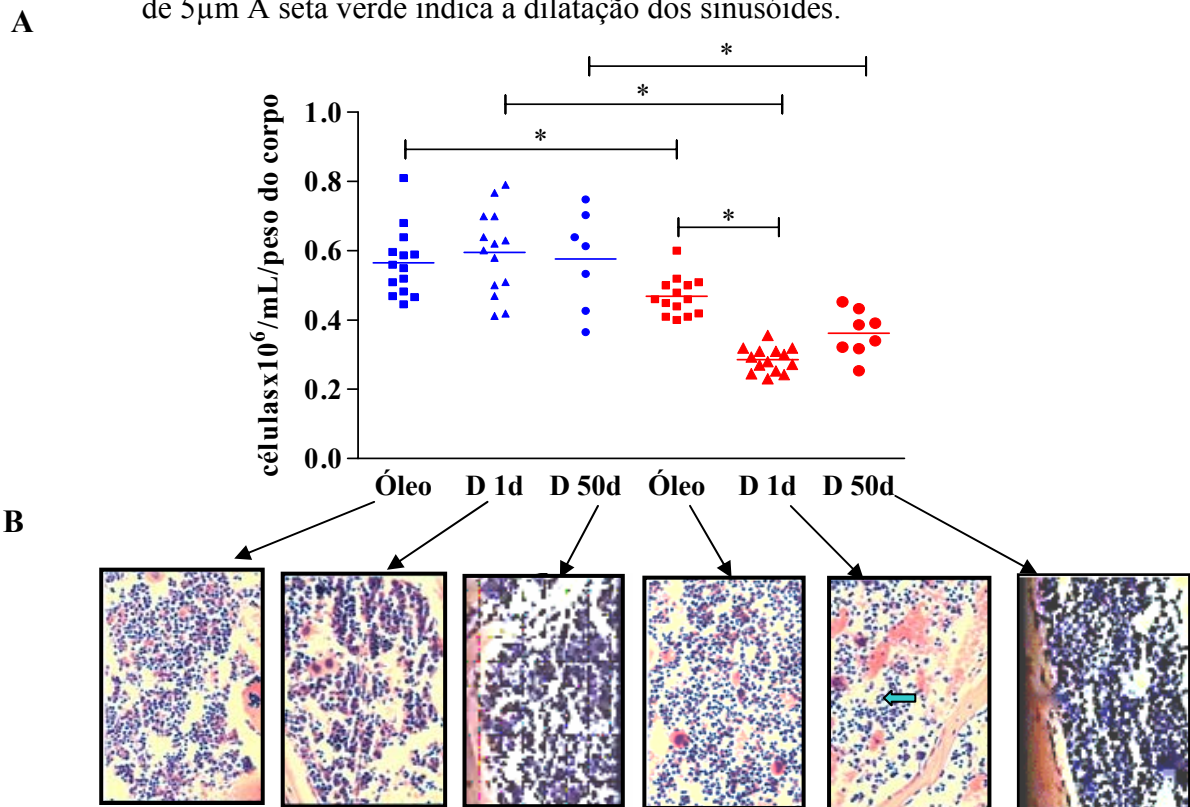
Conforme os dados apresentados na figura 8, após o tratamento com DMBA verificamos uma diminuição no aporte de células para o exsudato inflamatório dos camundongos AIRmin. Esse efeito pode ser devido a uma supressão de células em estágio de diferenciação terminal na medula óssea o que alteraria a fisiologia normal para migração celular.

Após o estabelecimento das condições ideais para a indução de supressão da medula óssea com DMBA (KATZ, 2007), tratamos grupos de animais machos, uma vez que não se constatou diferença entre os sexos, com DMBA a 50mg/kg de peso corpóreo e comparamos com os respectivos grupos controles que receberam apenas óleo de oliva. Determinamos o número total de células da medula óssea, obtidas pela perfusão de dois fêmures após 24 horas ou 50 dias do tratamento com DMBA. O número de células foi normalizado pelo peso corpóreo, para corrigirmos a variação do crescimento do fêmur entre as duas linhagens.

O efeito citotóxico foi observado somente nos animais AIRmin tratados com DMBA após 24 horas, com redução de quase 40% na celularidade, quando comparados com seus controles, enquanto que o mesmo efeito não foi observado nos animais AIRmax. Decorridos 50 dias da inoculação do xenobiótico não observamos modificação significativa no número total de células da medula óssea em nenhum dos grupos, demonstrando que após esse período os animais AIRmin tratados com DMBA recuperaram a celularidade da medula óssea. Verificamos, nos grupos controles, que os animais AIRmax apresentaram maior número de células na medula óssea do que os AIRmin, fato já constatado em estudos anteriores (IBAÑEZ et al, 1992; RIBEIRO et al. 2003). (**Figura 12A**).

Análise histológica do esterno revelou ruptura da arquitetura normal do estroma da medula óssea com redução acentuada na densidade celular e aparecimento de sinusóides dilatados, com grande quantidade de hemácias apenas nos animais AIRmin 24hs após o tratamento com DMBA. Este padrão histológico é típico de comprometimento da medula óssea. O mesmo não aconteceu nas preparações dos animais AIRmin tratados apenas com óleo ou após 50 dias do tratamento, ou nos camundongos AIRmax tratados ou não com DMBA (**Figura 12B**).

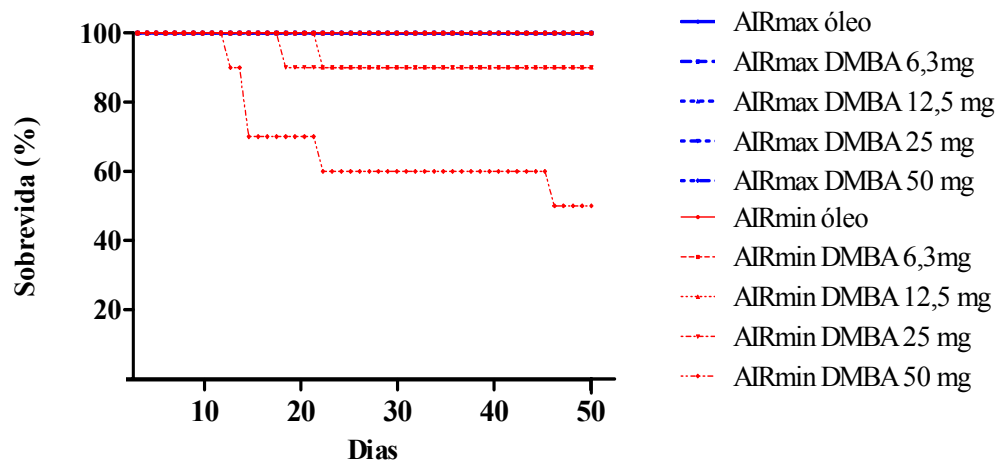
**Figura 12** - Efeito do DMBA sobre a medula óssea após 1 (D 1d) e 50 dias (D 50d) do tratamento. (A) Número total de células da medula óssea de camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■). Diferença entre os animais AIRmax e AIRmin e entre os animais tratados com óleo e com DMBA,\*  $p \leq 0,05$ . (B) Análise histopatológica do esterno corado com Giemsa com aumento de 40x espessura de 5 $\mu$ m A seta verde indica a dilatação dos sinusóides.



FONTE: Katz (2012).

Simultaneamente avaliamos a sobrevivência desses camundongos utilizando doses variadas de DMBA (6,3; 12,5; 25 ou 50 mg/kg) em grupos de dez animais, cinco machos e cinco fêmeas de cada linhagem. Verificamos que a dose de 50 mg/kg de DMBA causou a morte de 50% dos camundongos AIRmin após 50 dias. No período analisado constatamos que 90 a 100% dos camundongos AIRmin tratados com óleo de oliva ou com 6,3, 12,5 ou 25 mg/kg de DMBA sobreviveram. O mesmo aconteceu com todos os grupos da linhagem AIRmax. No presente caso não observamos diferença na sobrevivência entre os sexos. Este perfil de sobrevivência mostrou que, além da importância de se utilizar doses menores de DMBA para estudos crônicos, a mortalidade observada nos animais tratados com DMBA e imunizados com HGG foi, sobretudo, devido aos efeitos tóxicos do DMBA (**Figura 13**).

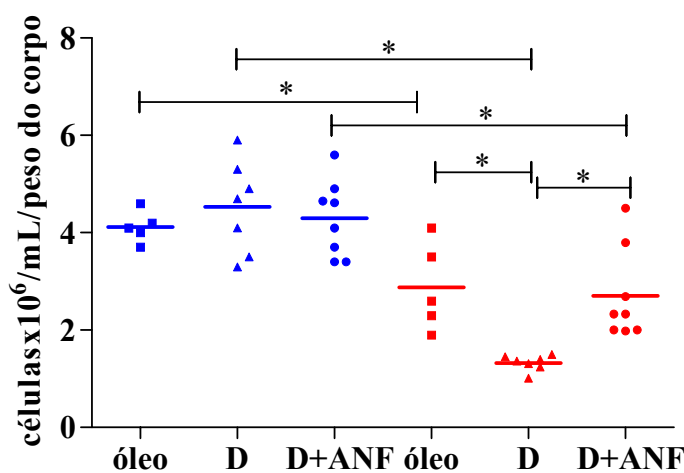
**Figura 13** – Sobrevivência de camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com DMBA em diferentes doses ou óleo de oliva.



FONTE: Katz (2012).

A importância do AHR e da metabolização do DMBA na toxicidade da medula óssea é evidente e pode ser modulada por antagonistas do receptor. Então, para verificar se a supressão celular induzida por DMBA poderia ser revertida, administramos um antagonista de AHR, o  $\alpha$ -Naftoflavona, concomitantemente com o DMBA. Constatamos que os efeitos tóxicos do DMBA na medula óssea dos camundongos AIRmin foi suprimida totalmente após a administração deste antagonista (**Figura 14**).

**Figura 14** - Número total de células da medula óssea de camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) após 24hs do tratamento com óleo de oliva ou DMBA (D) associado ou não com  $\alpha$ -NF. \* Diferença significativa,  $p < 0,05$ , entre os grupos.



FONTE: Katz (2012).

A avaliação dos efeitos do DMBA nos diferentes tipos celulares presentes na medula óssea foi realizada, caracterizando os fenótipos celulares por citologia e por meio de marcação com anticorpos dirigidos contra moléculas de superfície específicas.

Por análise morfológica, observamos o efeito supressor do DMBA na população mielóide diferenciada dos camundongos AIRmin, onde foi observado uma diminuição de mais de duas vezes no número total de neutrófilos segmentados ou com núcleo em anel e um aumento de mais de 2,5 vezes de células blásticas (blastos e mieloblastos) e neutrófilos imaturos (promielócito, mielócito e metamielócito) na medula óssea após 24 horas do tratamento com DMBA (**Figura 15**).

Em seguida verificamos se a diferenciação de neutrófilos observados nos camundongos AIRmin permaneceu comprometida após 50 dias do tratamento com DMBA. Para isso caracterizamos as diversas fases de maturação deste tipo celular, bem como células blásticas da medula óssea. Aos 50 dias constatamos que apesar do tratamento com DMBA não afetar as células em processo de diferenciação terminal, este hidrocarboneto afetou a população de células blásticas na medula óssea de animais AIRmin aumentando em 2 vezes o número de blastos e mieloblastos, quando comparado com seus controles (**Figura 15A**).

Constatamos que a porcentagem desses tipos celulares acompanhou os resultados observados em número absoluto de células (**Tabela 2 e Figura 15A**). Essas células blásticas apresentaram nucléolo morfolologicamente displásico (**Figura 15B**). Não observamos efeito sobre a série linfóide.

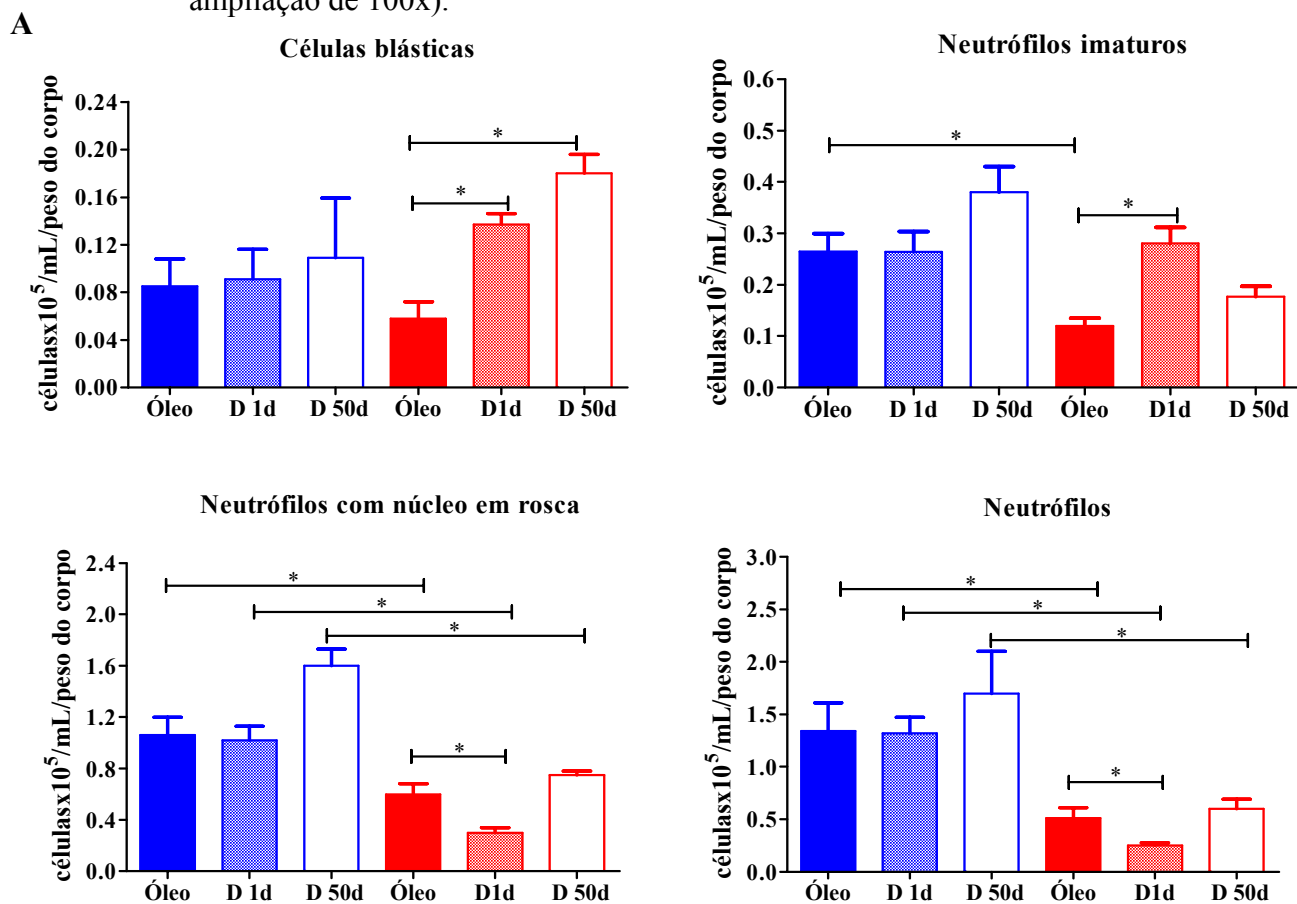
**Tabela 2** – Avaliação da medula óssea quanto às subpopulações de células blásticas e das diversas fases de maturação neutrofilica após 1 e 50 dias do tratamento com DMBA.

	AIRmax óleo (%)*	AIRmax DMBA 1d (%)	AIRmax DMBA 50d (%)	AIRmin óleo (%)	AIRmin DMBA 1d (%)	AIRmin DMBA 50d (%)
<b>Blastos</b>	1,67 ± 1,33	1,08 ± 0,86	2,87 ± 0,83	1,9 ± 1,02	5,5 ± 1,12	4,25 ± 0,25
<b>Neutrof. Imaturos</b>	5,0 ± 2,07	4,33 ± 1,83	4,0 ± 0,82	4,2 ± 1,04	11,2 ± 4,10	1,5 ± 0,5
<b>Neutróf. Núcleo em anel</b>	19,5 ± 6,06	16,5 ± 3,15	23,87 ± 5,62	20,20 ± 6,5	12,2 ± 4,71	17,66 ± 2,51
<b>Neutróf. segmenta do</b>	24,42 ± 11,49	21,5 ± 4,51	25,25 ± 3,59	12,5 ± 1,91	10,0 ± 2,0	14,3 ± 5,5

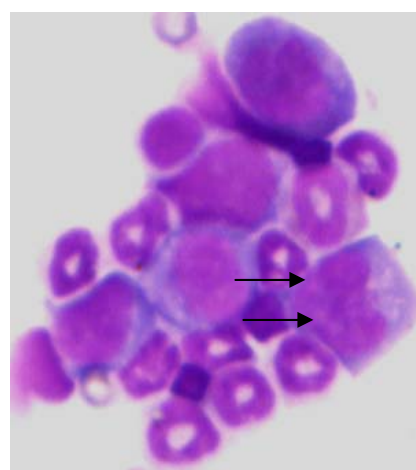
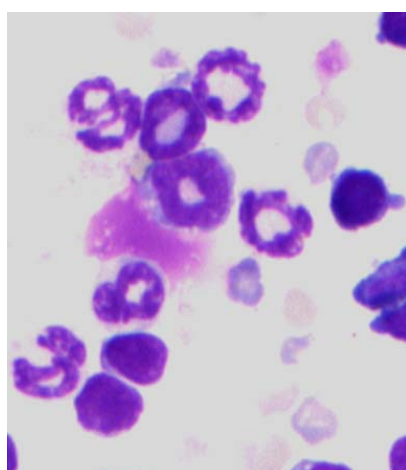
FONTE: Katz (2012).

NOTA: Valores médios ± desvio padrão de 6 animais por grupo.

**Figura 15** – Análise das subpopulações de células da medula óssea após tratamento com DMBA. **(A)** Número total de células blásticas e das diversas fases de maturação neutrofílica de camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) após 1 e 50 dias do tratamento com 50mg/Kg de DMBA ou óleo de oliva. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=7/grupo). Diferença entre os animais AIRmax e AIRmin e entre os animais tratados com óleo e com DMBA,\*  $p \leq 0,05$ . **(B)** Fotomicrografia de células da medula óssea de camundongos AIRmin tratados com óleo (à esquerda) ou DMBA (à direita). As setas mostram células com os nucléolos displásicos (coloração com Giemsa, ampliação de 100x).



**B**



FONTE: Katz (2012).

Para confirmarmos os dados obtidos na citologia, as populações de neutrófilos foram caracterizadas pela associação de anticorpos específicos dirigidos às moléculas de superfície Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) e Mac-1 (CD11b). De acordo com a classificação de Ueda e colaboradores, as células marcadas com GR-1<sup>hi</sup> CD11b<sup>+</sup> são neutrófilos segmentados e neutrófilos num estágio intermediário de maturação (metamielócitos e núcleo em forma de anel) e as células marcadas com GR-1<sup>lo</sup> CD11b<sup>+</sup> são células com a morfologia de promielócitos e mielócitos (UEDA et al., 2005).

Para caracterizar o possível efeito do DMBA em linhagens celulares mais primitivas na ontogenia da medula óssea, utilizamos outros anticorpos que são dirigidos às moléculas de linhagem (Lin), c-Kit e Sca-1. A população de células marcadas negativamente com Lin, isto é, células que não têm expressão de proteínas de superfície que caracterizam linhagens comprometidas, tais como: Gr-1, CD11-b, CD45R, CD3ε e Ter-119, positivamente com c-kit, receptor de tirosina quinase e Sca-1, fator de célula tronco, podem ser células tronco hematopoiéticas ou um progenitor multipotente (MPP) (PASSEGUÉ et al., 2003). Essas células têm capacidade de proliferar e diferenciar na linhagem mielóide quando estimuladas *in vitro* com IL-3, SCF, G-CSF, GM-CSF e EPO ou na linhagem linfóide quando submetidas, em cultura a estímulo com fatores de crescimento como IL-7, IL-3 e SCF (ITO, 1996).

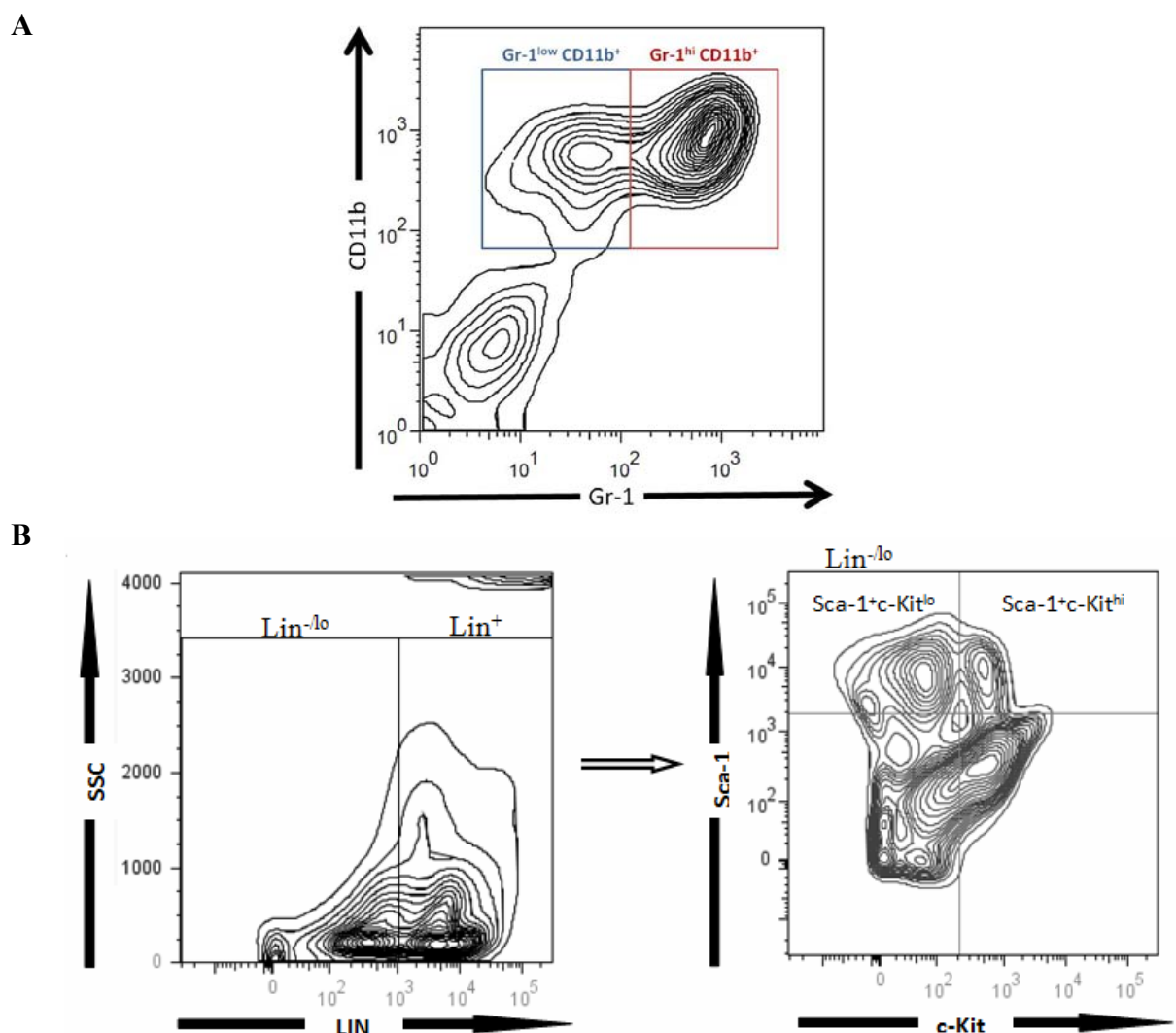
Portanto, células da medula óssea de camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin foram marcadas com esses anticorpos específicos, bem como com os respectivos isótipos controles. Foi feita a aquisição em citômetro de fluxo, considerando 50000 eventos. Para a análise foram consideradas as células viáveis por exclusão em marcação com Iodeto de Propídio.

Na **Figura 16** estão representados dois subtipos celulares GR1<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup> e Gr-1<sup>lo</sup>CD11b<sup>+</sup> (**Figura 16A**). Para a análise da população Lin<sup>-/lo</sup>, Sca-1<sup>+</sup> e c-kit<sup>+</sup>, primeiramente selecionamos a população Lin<sup>-/lo</sup> e nesta população analisamos as células Sca-1<sup>+</sup> c-kit<sup>hi</sup> e Sca-1<sup>+</sup> c-kit<sup>lo</sup> (**Figura 16B**).

Após 24 horas do tratamento com DMBA os animais AIRmin apresentaram uma diminuição no número absoluto de células GR1<sup>hi-lo</sup> CD11b<sup>+</sup>. Constatamos uma diferença interlinhagens de quase duas vezes no número absoluto destes tipos celulares. Já a avaliação imunofenotípica após 50 dias do tratamento com DMBA mostrou que camundongos AIRmin tratados não apresentaram mudanças significantes destas populações. Verificamos também um aumento de quase duas vezes na porcentagem e no número total de células blásticas com o fenótipo Lin<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup> e c-kit em camundongos AIRmin tratados com DMBA após 1 e 50 dias do tratamento, quando comparados com seus controles (**Tabela 3 e Figura 17**).

Esses resultados mostraram que o tratamento com DMBA afetou desde células blásticas até células em estágios mais avançados de diferenciação, sugerindo um bloqueio na maturação de células mielóides após 50 dias do tratamento com DMBA. Os animais AIRmax não apresentaram alteração significativa em seus valores (**Tabela 3 e Figura 17**).

**Figura 16.** Análise da população de células marcadas com Gr-1, CD11b, c-kit, Lin e Sca-1 após 24 horas do tratamento com DMBA em camundongos AIRmax e AIRmin. **(A)** Citograma representativo das populações  $Gr-1^{hi}CD11b^{+}$  e  $Gr-1^{lo}CD11b^{+}$  **(B)** Citograma representativo das populações  $Lin^{-/lo}$  e  $Lin^{+}$  (esquerda) e  $Lin^{-/lo} Sca-1^{+}$  c-Kit<sup>+</sup> (direita).



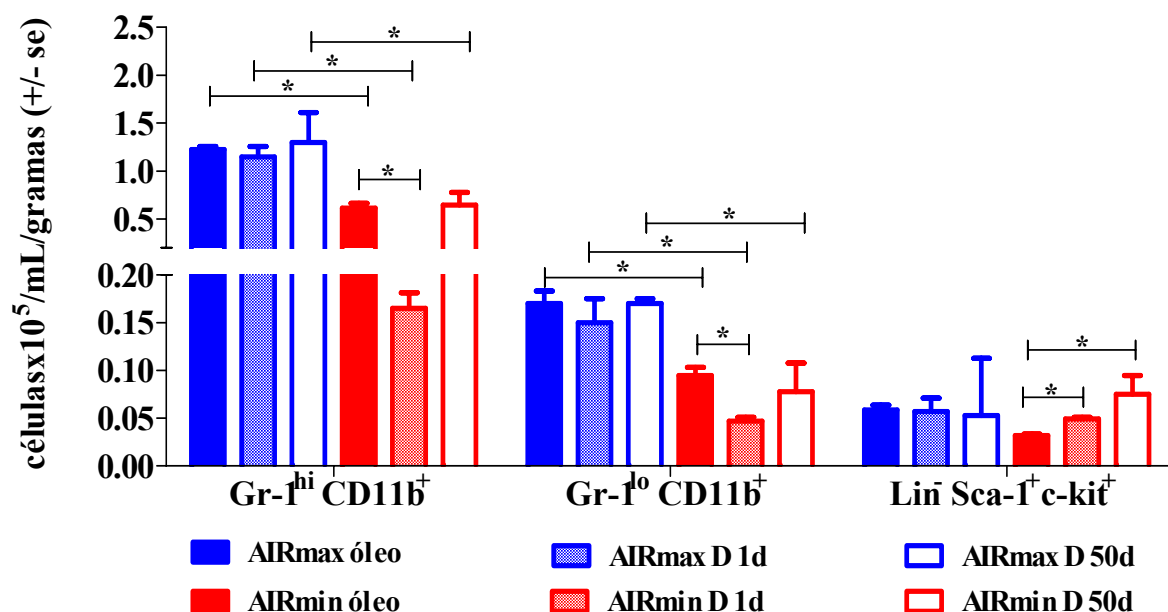
FONTE: Katz (2012).

**Tabela 3-** Avaliação das populações de células da medula óssea marcadas com Gr-1, CD11b, c-kit, Lin e Sca-1 após 1 e 50 dias do tratamento com DMBA.

	AIRmax óleo (%)*	AIRmax DMBA 1d (%)	AIRmax DMBA 50d (%)	AIRmin óleo (%)	AIRmin DMBA 1d (%)	AIRmin DMBA 50d (%)
<b>Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup></b>	0,89± 0,16	0,95± 0,44	5,36 ± 2,65	0,4 ±0,03	1,29 ±0,51	5,44 ± 1,09
<b>Gr-1<sup>lo</sup> CD11b<sup>+</sup></b>	6,84 ± 1,19	6,42 ± 1,51	4,77 ± 1,41	5,09 ± 0,32	7,09 ± 0,28	2,48 ± 1,39
<b>Gr-1<sup>hi</sup> CD11b<sup>+</sup></b>	49,61 ± 0,83	45,91 ± 1,84	46,28 ± 4,22	37,65± 1,08	25,1 ± 3,01	27,8 ± 2,3

FONTE: Katz (2012).

NOTA: Valores médios ± desvio padrão de 5 animais por grupo.

**Figura 17 -** Análise das populações de células da medula óssea marcadas com Gr-1, CD11b, c-kit, Lin e Sca-1 após 1 e 50 dias do tratamento com DMBA. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (n=5/grupo). Diferença entre os animais AIRmax e AIRmin e entre os animais tratados com óleo e com DMBA,\* p≤0,05.

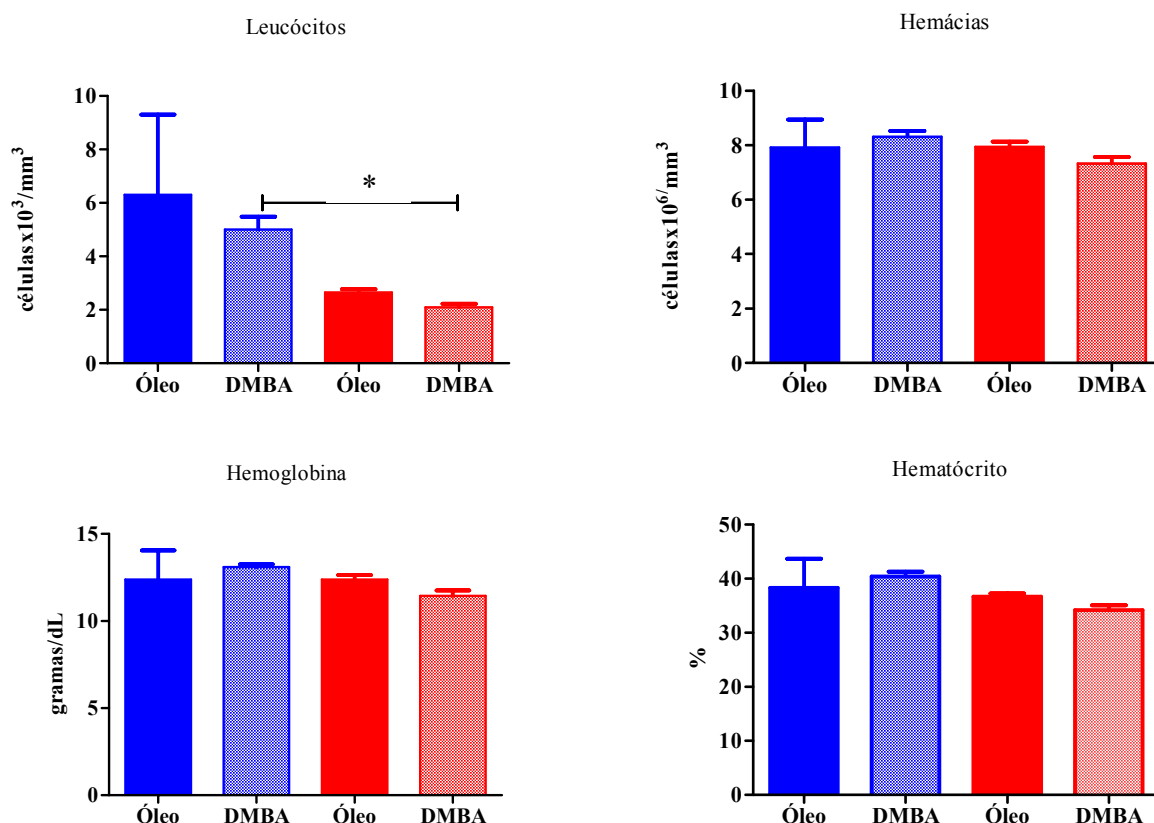
FONTE: Katz (2012).

Foi observado em estudo anterior que os animais AIRmin tratados com DMBA apresentaram uma diminuição de 67% no número de leucócitos circulantes já nos primeiros 3 dias após o tratamento, tendo uma recuperação ao longo da cinética (KATZ, 2007). Quando avaliamos o hemograma após 50 dias do tratamento não observamos nenhum efeito do DMBA (Figura 18). Porém há uma diferença interlinhagens constitutiva no número total de leucócitos na circulação sanguínea. Os valores de número de hemácias, taxa de hemoglobina



ou hematócrito, também não revelaram quaisquer diferenças nesse período (dados não mostrados).

**Figura 18** - Análise da circulação sanguínea de camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) após 50 dias do tratamento com 50mg/Kg de DMBA ou óleo de oliva. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=6/grupo).



FONTE: Katz (2012).

#### 4.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM DMBA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE AIRMAX E AIRMIN

A medula óssea é constituída pelo estroma ((fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, adipócitos) e por células hematopoiéticas de várias linhagens que se originam das células primitivas pluripotentes, isto é, células tronco. Estas quando estimuladas por fatores hematopoiéticos proliferam e diferenciam-se dando origem às várias populações de células mielóides e linfóides circulantes (ZANICHELLI *et al.*, 1995; JAMRA; LORENZI, 1997).

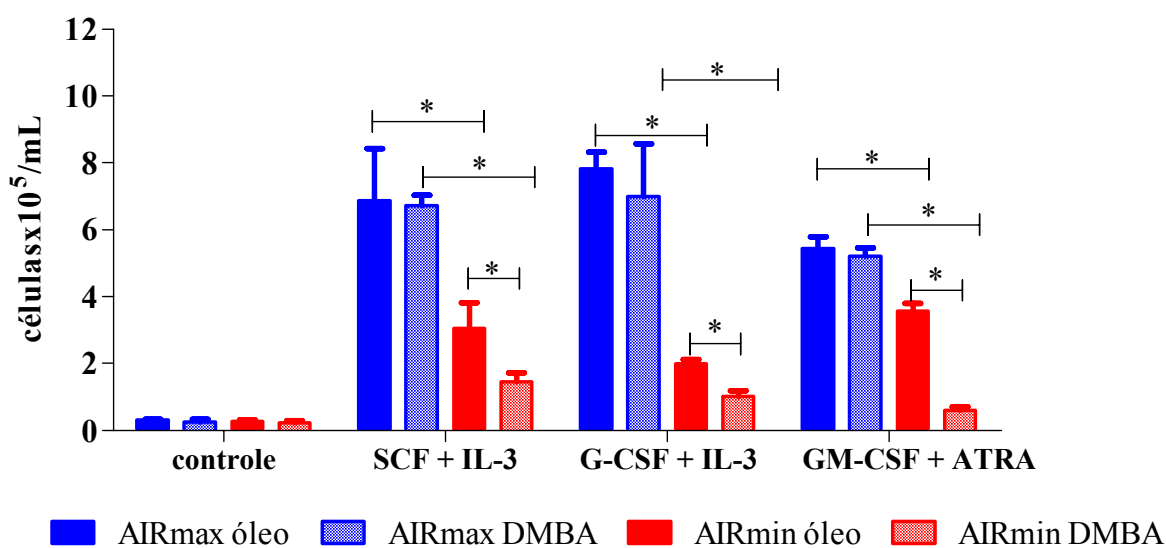
Quando cultivamos células da medula óssea com GM-CSF, por exemplo, as células progenitoras mielóides são estimuladas a se diferenciarem em granulócitos ou macrófagos. (ZANICHELLI *et al.*, 1995; ZHU *et al.*, 2001). No entanto, quando sofrem a ação dos xenobióticos podem apresentar alterações bioquímicas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

proliferativa e de diferenciação, podendo evoluir para apoptose (THURMOND *et al.*, 1987; PETERSON *et al.*, 1992; PAGE *et al.*, 2004).

Para verificar se o DMBA afeta a proliferação das células da medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin, após 24 horas do tratamento *in vivo*, essas células foram cultivadas com G-CSF associado à IL-3, com GM-CSF associado ao ATRA ou com SCF associado a IL-3, já que estudos feitos no laboratório de Imunogenética demonstraram que estas associações propiciam um alto nível de proliferação das células da medula óssea dos camundongos AIRmax, preferencialmente de neutrófilos e granulócitos/macrófagos, segundo Albuquerque, 2010 (comunicação pessoal) \*.

Após o período de 5 dias de cultura com os diferentes estímulos, observamos que a proliferação de células da medula óssea dos camundongos AIRmin tratados com DMBA foi 50% menor quando comparadas aos seus respectivos controles tratados com o veículo, óleo de oliva. Por outro lado, constatou-se que a capacidade proliferativa dos animais AIRmax não foi afetada pelo DMBA ou pelo óleo de oliva e apresentaram níveis superiores aos dos AIRmin em todos os grupos, fato que confirma a capacidade proliferativa maior da medula óssea dos camundongos AIRmax em resposta a fatores hematopoiéticos, conforme já demonstrado anteriormente por nosso grupo (RIBEIRO *et al.*, 2003) (Figura 19).

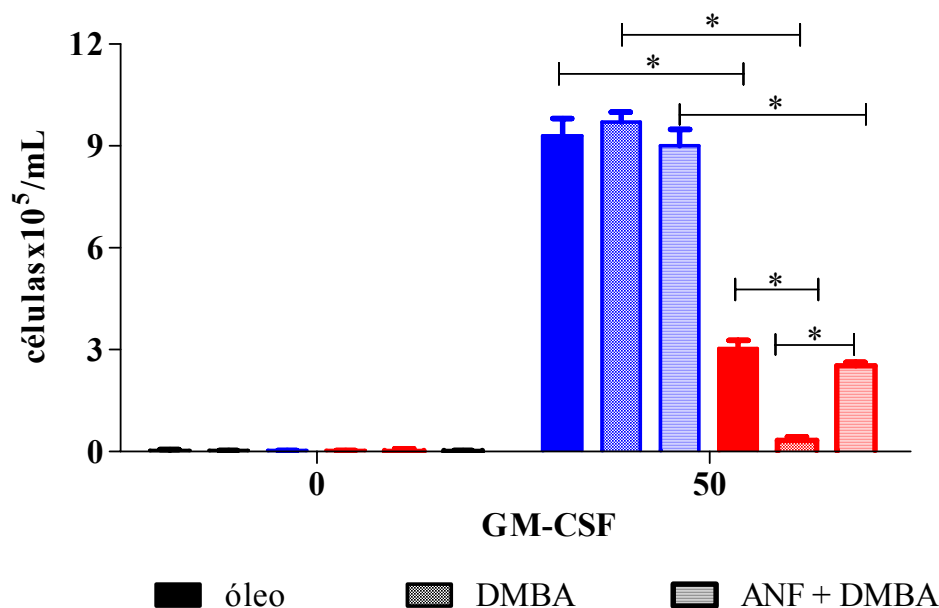
**Figura 19** – Análise proliferativa de células totais da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin tratados *in vivo* com óleo ou DMBA e após 24 horas cultivadas na presença de fatores hematopoéticos por 5 dias. Diferença entre os animais AIRmax e AIRmin e entre os animais tratados com óleo e com DMBA, \*  $p \leq 0,05$ . Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=6/grupo).



FONTE: Katz (2012).

Além de bloquear a mielotoxicidade causada pelo tratamento com DMBA, o  $\alpha$ -NF restaurou em quase 90% da capacidade proliferativa das células da medula óssea nos animais AIRmin (**Figura 20**).

**Figura 20** - Análise proliferativa de células totais da medula óssea de camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) tratadas *in vivo* por 24 horas com óleo, DMBA associado ou não com  $\alpha$ -NF e cultivadas na presença de GM-CSF (ng/mL) por 5 dias. Diferença entre os animais AIRmax e AIRmin e entre os animais tratados com óleo e com DMBA,\*  $p \leq 0,05$ . Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=3/grupo).



FONTE: Katz (2012).

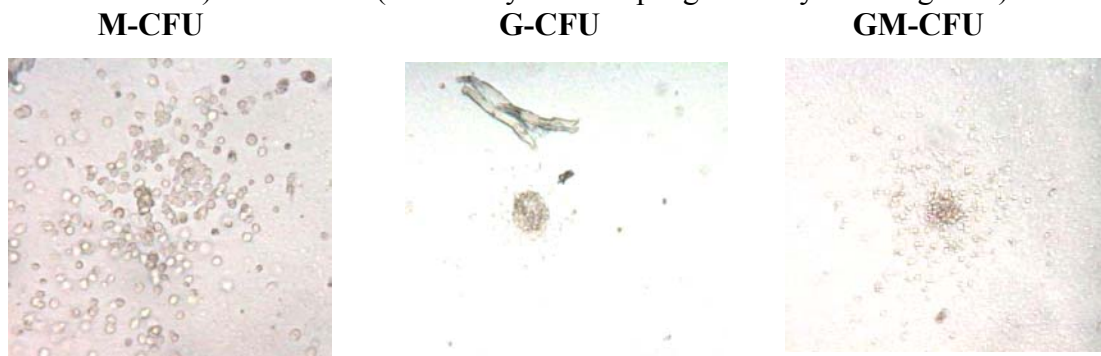
A baixa proliferação das células oriundas dos camundongos AIRmin tratados com DMBA pode ter sido devido a alterações ocorridas nas células precursoras da medula óssea, onde essas células podem ter perdido a capacidade de se expandirem e diferenciarem nos seus progenitores. Para testar esta hipótese, utilizamos a técnica de cultura clonal *in vitro* em ensaios clonogênicos para a determinação do número e tipo de precursores hematopoiéticos (METCALF, 1984).

Os ensaios clonogênicos de progenitores incluem unidades formadoras de colônia comprometida com a linhagem de granulócitos e/ou macrófagos (Granulocyte Macrophage-Colony Forming Unit, GM-CFU), com a linhagem granulocítica (Granulocyte-Colony Forming Unit, G-CFU) ou com a linhagem de macrófagos (Macrophage-Colony Forming Unit, M-CFU) (METCALF, 1984) (**Figura 21**).

O tipo de hematotoxicidade mais freqüente e amplamente estudado in vitro são os efeitos agudos de drogas, como os HPAs, sobre os progenitores da medula óssea da série granulocítica/macrofágica. A quantificação da mielotoxicidade é feita a partir do número de células progenitoras sobreviventes em função do nível de exposição ao xenobiótico na presença de concentrações máximas do fator estimulador de colônias (METCALF 1984).

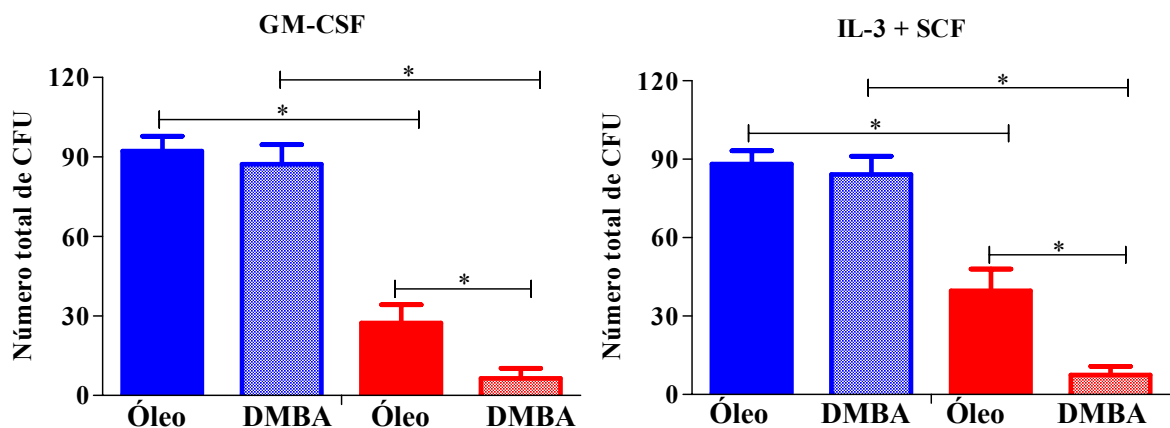
Deste modo, as células da medula óssea de AIRmax e AIRmín foram cultivadas em meio de cultura semi-sólido na presença de GM-CSF ou IL-3 associado ao SCF. Após 7 dias de cultura, verificamos uma diferença interlinhagens significativa no número total de colônias entre os grupos controles, sendo que os animais AIRmax formam pelo menos duas vezes mais colônias do que os AIRmin. Observamos também que o tipo de colônia predominante na linhagem AIRmax é a GM-CFU, enquanto nos AIRmin a M-CFU. O número total de colônias determinado nos animais AIRmin tratados com DMBA foi 80% menor quando comparado aos seus respectivos controles tratados apenas com óleo de oliva, mostrando, assim, que o DMBA afeta a maturação de progenitores mielóides apenas na linhagem AIRmin (**Figura 22 e Tabelas 4 e 5**).

**Figura 21** - Figura representativa dos tipos de colônias encontrados em cultura clonal de células da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin: M-CFU (Macrophage Colony Forming Unit), G-CFU (Granulocyte Colony Forming Unit) e GM-CFU (Granulocyte/Macrophage Colony Forming Unit).



FONTE: Katz (2012).

**Figura 22** - Ensaio clonogênico a partir de células totais da medula óssea de camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) tratadas *in vivo* com óleo ou DMBA e após 24 horas cultivadas na presença de fatores hematopoéticos por 7 dias. Diferença entre os animais AIRmax e AIRmin e entre os animais tratados com óleo e com DMBA, \*  $p \leq 0,05$ . Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5/grupo).



FONTE: Katz (2012).

**Tabela 4** - Tipos de unidades formadoras de colônias (CFU) de células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin estimuladas com GM-CSF por 7 dias.

Tipos de colônias/ grupos de animais	AIRmax óleo	AIRmax DMBA	AIRmin óleo	AIRmin DMBA
M-CSF	16,5 $\pm$ 4,9	18,5 $\pm$ 0,7	16,5 $\pm$ 11,3	0,5 $\pm$ 0,7
GM-CSF	122,5 $\pm$ 32,5	110,75 $\pm$ 38,5	11,5 $\pm$ 6,36	0 $\pm$ 0
G-CSF	24,25 $\pm$ 3,88	22,0 $\pm$ 1,4	3,0 $\pm$ 1,41	0 $\pm$ 0

FONTE: Proprio autor.

NOTA: Valores médios  $\pm$  desvio padrão de 2 animais por grupo.

**Tabela 5** - Tipos de unidades formadoras de colônias (CFU) de células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin estimuladas com IL-3 + SCF por 7 dias.

Tipos de colônias/ grupos de animais	AIRmax óleo	AIRmax DMBA	AIRmin óleo	AIRmin DMBA
M-CSF	29,2 $\pm$ 0,35	24,0 $\pm$ 4,95	11,5 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 1,41
GM-CSF	76,5 $\pm$ 7,07	87,75 $\pm$ 1,06	10,5 $\pm$ 0,7	0,75 $\pm$ 0,35
G-CSF	8,25 $\pm$ 0,35	8,0 $\pm$ 0,7	3,5 $\pm$ 1,41	0 $\pm$ 0

FONTE: Katz (2012).

NOTA: Valores médios  $\pm$  desvio padrão de 2 animais por grupo

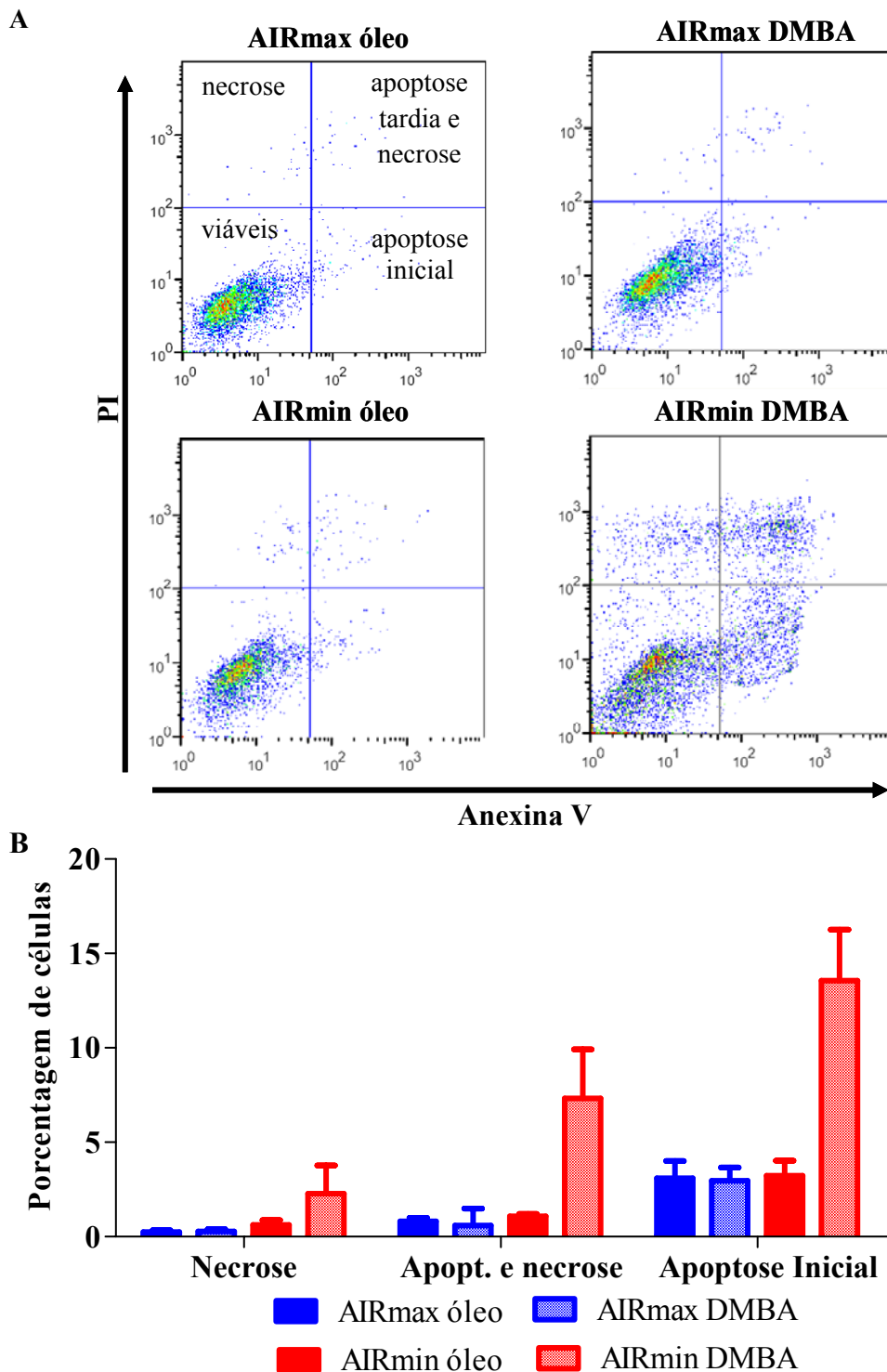
#### 4.5 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR POR APOPTOSE E/OU NECROSE EM ANIMAIS AIRMAX E AIRMIN TRATADOS COM DMBA

Devido à diminuição da celularidade na linhagem AIRmin após tratamento com DMBA, verificamos se esse efeito é causado pelo processo de apoptose ou necrose. Para tanto, células da medula óssea foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e Anexina V-FITC e avaliadas por citometria de fluxo após diferentes tempos do tratamento com DMBA: 6, 12 e 24 horas.

A **figura 23A** é uma representação dos citogramas obtidos. Essa figura mostra os fenótipos de início do processo de apoptose (anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), células em estágio de apoptose tardia (anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) e necrose (anexina V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>) em camundongos AIRmax e AIRmin tratados com óleo ou com DMBA.

Após 6 e 12 horas do tratamento com DMBA não foi observado efeito significativo na porcentagem de células apoptóticas ou necróticas em ambas as linhagens, quando comparadas com seus respectivos controles (dados não mostrados). Porém, após 24 horas do tratamento com DMBA, observamos apenas nos camundongos AIRmin um aumento de 4,2 vezes, 6,7 vezes e 3,7 vezes na porcentagem de células em apoptose no estágio inicial, em estágio tardio e em necrose, respectivamente (**Figura 23B**).

**Figura 23** - Análise da redistribuição de Fosfatidil-Serina por ensaio de Anexina-V/Iodeto de Propídio (PI) em células da medula óssea de camundongos AIR após 24 horas do tratamento com DMBA ou óleo de oliva (controle). **(A)** Citograma representativo de experimentos com resultados similares para 5 animais controles ou tratados com DMBA por 24 horas. **(B)** Proporção de células em necrose (Anexina-V<sup>-</sup>/ PI<sup>-</sup>), apoptose em estágio tardio (Anexina-V<sup>+</sup>/ PI<sup>+</sup>) e apoptose em estágio inicial (Anexina-V<sup>+</sup>/ PI<sup>-</sup>). Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (n=5/grupo).



FONTE: Katz (2012).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA TAXA DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO COM DMBA POR ENSAIO COMETA

DMBA é um composto genotóxico que reage diretamente com o DNA causando lesões. Essas lesões quando não reparadas podem induzir morte celular ou bloqueio do ciclo celular (AGRAWAL; PANDEY, 2009).

Para detectar a genotoxicidade causada pelo tratamento com DMBA usamos como ferramenta o ensaio cometa. O ensaio cometa, ou eletroforese em gel de célula única, é um método de estudo genotoxicológico sensível, que avalia danos no DNA de células individualizadas e possibilita quantificar quebras de fitas em vários tecidos de mamíferos (DAS et al., 2005; PARK et al., 2010).

Por este método as células são incluídas em gel de agarose e dispostas em fina camada sobre lâminas histológicas. Essas células são lisadas e o material genético é submetido à eletroforese. A partir do núcleo, fragmentos de DNA migram no sentido do anodo. Quanto mais intensa for a indução de quebras, menores serão os fragmentos e maior a extensão de migração. Após coloração observamos em microscópio ótico o DNA danificado com forma similar a de um cometa, com a cauda correspondendo aos fragmentos que migraram e a cabeça ao DNA que não migrou, portanto, o DNA integro.

A análise quantitativa do dano no DNA pode ser feita por meio do programa de análise Casp que gera alguns parâmetros como: área, tamanho e porcentagem de DNA da cabeça e da cauda. A partir desses parâmetros é calculado o momento da cauda de Olive ou Olive Tail Moment (OTM) (TICE et al., 2000; COLLINS et al., 2008).

Essa técnica pode gerar falsos positivos, pois alguns compostos químicos, como os HPAs, podem induzir fragmentação do DNA por ação citotóxica. Portanto, a avaliação simultânea da citotoxicidade é de extrema importância para interpretação e validação dos resultados. O nível aceitável de citotoxicidade causada pelo tratamento com diferentes drogas é de no máximo 30% com relação aos animais controles. Níveis de toxicidade acima deste valor podem ser considerados excessivos (TICE et al., 2000). Por isso a avaliação da morte celular, por perda da integridade da membrana, com azul de tripan, foi feita durante o período do tratamento com DMBA. Além disso, na análise foram excluídas células com morfologia que sugerem apoptose ou necrose, isto é, células com núcleo pequeno e cauda muito longa.

Baseando-se nesses critérios, avaliamos os efeitos genotóxicos e citotóxicos produzidos pelo DMBA no período de 24 horas após tratamento *in vivo* e *in vitro*. Na análise *ex vivo* verificamos que após 2 horas do tratamento com DMBA houve um efeito genotóxico em ambas as linhagens AIRmax e AIRmin, quando comparados com os animais controles que

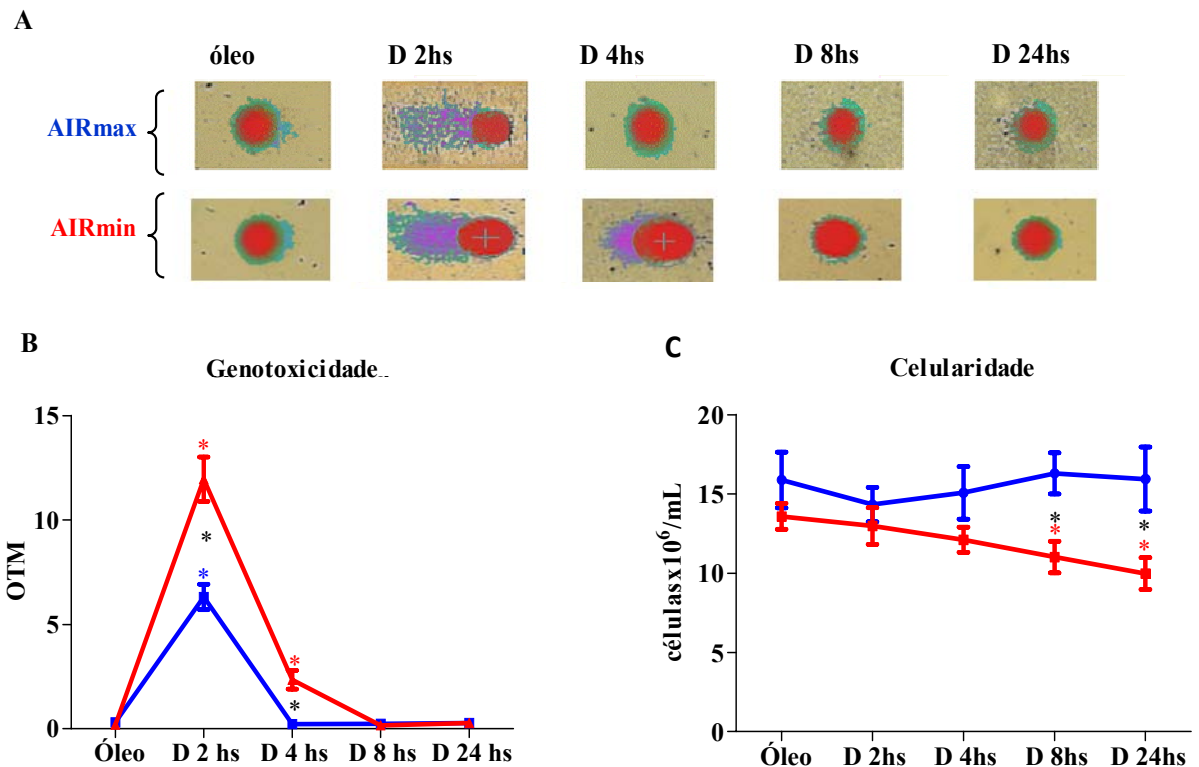


receberam apenas óleo de oliva. Contudo o efeito de dano no DNA prolongou-se até 8 horas após o tratamento com DMBA nos animais AIRmin e desapareceu mais precocemente, às 4 horas, nos AIRmax. Quando avaliamos a viabilidade celular durante esse período, constatamos que após 8 horas do tratamento com DMBA houve uma diminuição de 19% na celularidade nos camundongos AIRmin, passando para 26% às 24 horas após tratamento, quando comparado com seus controles. Nestas condições, não observamos o mesmo efeito nos animais AIRmax (**Figura 24**).

Foi identificada também uma diferença interlinhagens extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) nos valores OTM, após 2 horas do tratamento com DMBA, onde os animais AIRmax apresentaram menos lesões genotóxicas nas células da medula óssea do que os AIRmin (**Figura 24**).

Esses resultados indicaram um efeito genotóxico nas duas linhagens de camundongos, porém esse efeito perdurou por mais tempo nos camundongos AIRmin. Além de sofrerem um efeito menor, a celularidade não foi alterada significativamente nos animais AIRmax. É possível que o tratamento com DMBA tenha afetado a medula óssea dos animais AIRmax, mas esse efeito pode ter sido mascarado provavelmente devido à capacidade desta linhagem em repor células rapidamente.

**Figura 24** - Comparação entre a genotoxicidade, mensurada por ensaio cometa, e a celularidade *ex vivo* de células totais da medula óssea de camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) após tratamento com DMBA. (A) Figura representativa do ensaio cometa, mostrando o dano no DNA após diferentes tempos de tratamento com DMBA. (B) Cinética do efeito genotóxico. (C) Cinética da celularidade da medula óssea com exclusão de células mortas por azul de tripan. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5/grupo). Diferença entre os grupos tratados com DMBA e óleo de oliva, \*,  $p \leq 0,05$ .



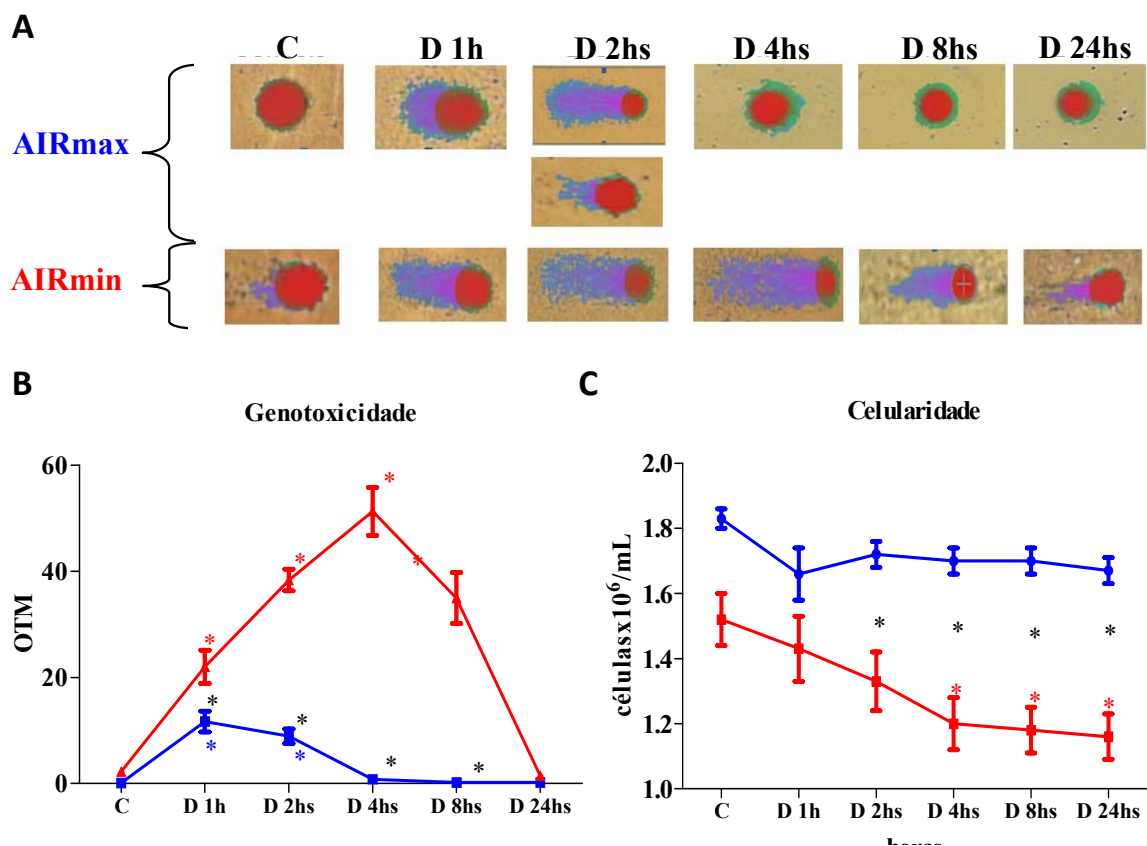
FONTE: Katz (2012).

No intuito de verificar se a maior atividade da medula óssea dos camundongos AIRmax estava ocultando o efeito do DMBA, avaliamos o seu efeito genotóxico e citotóxico diretamente sobre as células da medula óssea em um ambiente controlado de cultura e em tempos variados até 24 horas. Neste ensaio *in vitro* acrescentamos dois controles experimentais, células que são tratadas apenas com o diluente, no caso DMSO e o segundo controle de células apenas com meio de cultura.

As células da medula óssea cultivadas apenas com meio de cultura ou com meio de cultura contendo DMSO não apresentaram qualquer efeito genotóxico. Contudo as células tratadas *in vitro* com DMBA tiveram aumento significativo do OTM após 1 hora do tratamento, sendo que os camundongos AIRmax apresentaram um completo reparo de dano no DNA às 4 horas, enquanto que os AIRmin, apenas após 24 horas do tratamento com

DMBA. Também podemos observar que após 2 horas do tratamento com DMBA os AIRmax apresentaram parte das células com o DNA danificado e outra parte com o DNA quase que completamente reparado. A lesão observada nos animais AIRmin após 4 horas do tratamento com DMBA é elevada, porém não é devida à citotoxicidade da droga, pois a celularidade diminuiu apenas em 20% em relação aos animais controles. Constatamos também que o tratamento *in vitro* com DMBA não afetou a celularidade nos camundongos AIRmax. Assim podemos constatar que este xenobiótico afeta a integridade celular apenas de camundongos AIRmin (**Figura 25**).

**Figura 25** - Comparação entre a genotoxicidade, mensurada por ensaio cometa, e a celularidade *in vitro* após tratamento com DMBA (D) ou com DMSO (controle). **(A)** Figura representativa do ensaio cometa, mostrando o dano no DNA após diferentes tempos de tratamento com DMBA. **(B)** Cinética do efeito genotóxico. **(C)** Cinética da celularidade com exclusão de células mortas por azul de tripan. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=4/grupo). Diferença entre os grupos tratados com DMBA e óleo de oliva, \*,  $p \leq 0,05$ , entre os animais AIRmax, \*,  $p \leq 0,05$  e AIRmin, \*,  $p \leq 0,05$ .



FONTE: Katz (2012).

## 4.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES OPERANTES NA SINALIZAÇÃO DE APOPTOSE E DE REPARO DE DNA

Em camundongos isogênicos e geneticamente selecionados o tratamento epicutâneo com DMBA induziu, na medula óssea, um aumento da expressão de alguns genes relacionados com a sinalização para apoptose e para reparo de DNA por qPCR (EMBER et al, 1998; CARNEIRO, P. et al., 2009).

Assim, em nosso modelo, verificamos a expressão dos genes *caspase 3* e *parp-1* nas células da medula óssea envolvidos nos processos acima descritos e relacionados com a toxicidade pelo DMBA. Para tanto, obtivemos o RNA total das células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin após 12 e 24 horas do tratamento com DMBA ou óleo de oliva. A partir desse RNA total purificado, sintetizamos o cDNA por meio de reação da transcrição reversa e adicionamos os primers específicos para a amplificação da região de interesse do cDNA.

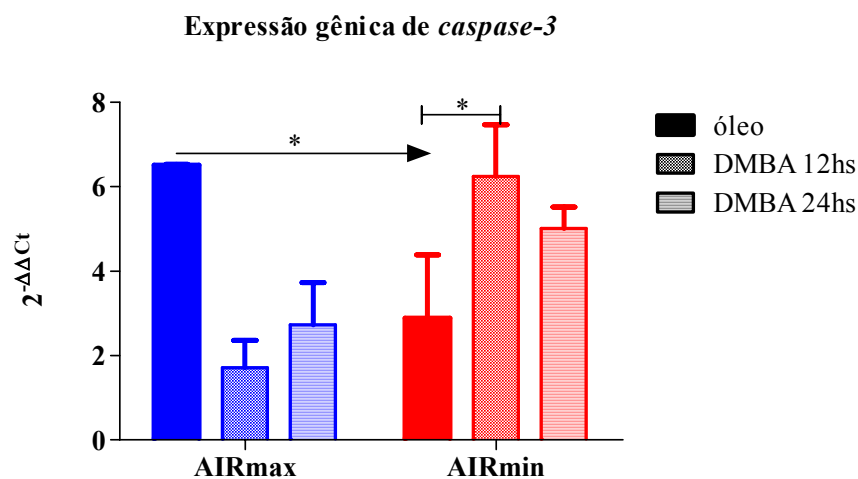
Os valores de expressão dos genes alvos foram calculados a partir da fórmula,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{gene}} (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{constitutivo}}) - \Delta Ct_{\text{calibrador}} (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{constitutivo}})$  e expressos como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que representam a variação da expressão gênica em relação a um único calibrador (LIVAK; SCHIMTTIGEN, 2001). Como calibrador utilizamos o valor do  $\Delta Ct$  dos animais AIRmin tratados com óleo de oliva, já que esse grupo apresentou o valor do  $Ct$  maior, portanto a expressão mais baixa de mRNA em relação aos outros grupos estudados.

### 4.7.1 *Caspase-3e Parp 1*

As proteases cisteínicas, são atualmente conhecidas como caspases e têm um importante papel durante o processo de apoptose, bem como na desativação de enzimas de reparo. As caspases iniciadoras principais nesses processos são caspase-8 e caspase-9. Essas caspases iniciadoras clivam e ativam a caspase efetora, a caspase-3 (WYLLIE, 2010).

Na figura 26 observamos uma diferença significativa na expressão de *caspase-3* entre os animais AIRmax e AIRmin tratados com óleo, onde os animais AIRmax apresentaram uma expressão de 2,5 vezes maior que os AIRmin. Observamos também uma significativa supressão da expressão da caspase-3 nos animais AIRmax tratados por 12 e 24 horas com DMBA, quando comparado com seu controle tratado com óleo de oliva. Já os AIRmin apresentaram um aumento significativo da expressão desse gene após 12 horas do tratamento com DMBA (**Figura 26**).

**Figura 26** - Efeito do DMBA na expressão do gene *caspase-3* nas células medula óssea de camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■) após 12 e 24 horas do tratamento. Os valores foram normalizados pela expressão do mRNA da *Cyclofilina* e calibrados pela expressão dos animais AIRmin normais. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=4/grupo). A seta indica a diferença estatística entre os camundongos AIRmax tratado com óleo e os outros grupos. Diferença entre os animais tratados com oleo e com DMBA, \*  $p \leq 0,05$ .



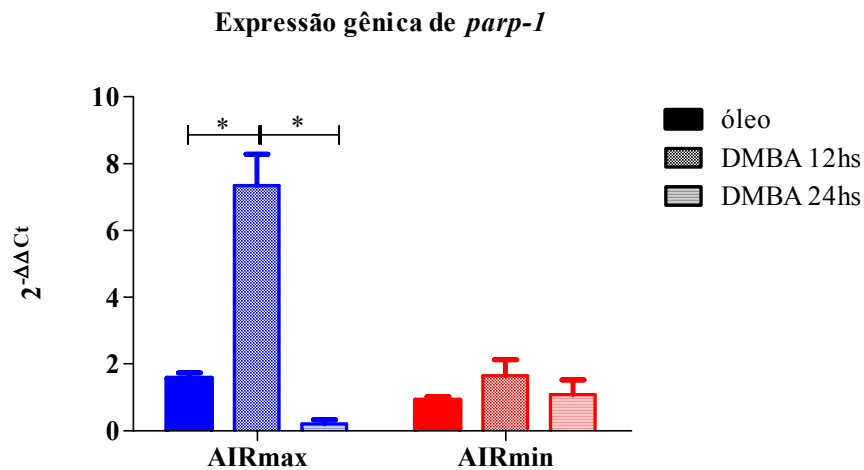
FONTE: Katz (2012).

A Polimerase poli-ADP-ribose 1 (PARP-1) é uma enzima altamente conservada encontrada em grande quantidade na maioria dos núcleos eucarióticos. Esta enzima está envolvida no reparo do DNA e em resposta aos danos no mesmo, pois tem a função de se unir especificamente à região de quebra do DNA. Esta ligação induz uma mudança de conformação dessa proteína, ativando-a e iniciando a síntese de um polímero, cuja função é modificar uma série de proteínas implicadas na reparação do dano (SHALL; MURCIA, 2000).

Devido à importância da PARP-1 na regulação dos eventos moleculares envolvidos no reparo do DNA de células que sofreram ação genotóxica e também pela diferença interlinhagens quanto à expressão deste gene na medula óssea dos camundongos AIR após injeção de biogel (CARNEIRO, P. et al., 2009), analisamos a expressão de *Parp-1* após diferentes tempos de tratamento.

No estudo de expressão do gene *Parp-1* verificamos que, após 12 horas do tratamento com DMBA, houve um aumento de 4,7 vezes nos níveis de expressão gênica apenas nos animais AIRmax em relação aos seus controles tratados com óleo de oliva (**Figura 27**).

**Figura 27** - Efeito do DMBA na expressão do gene *parp-1* na medula óssea de camundongos AIRmax (■) e AIRmin (■), após 12 e 24 horas do tratamento. Os valores foram normalizados pela expressão do mRNA da *Cyclofilina* e calibrados pela expressão dos animais AIRmin normais. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=6/grupo). Diferença entre os animais tratados com óleo e com DMBA,\*  $p \leq 0,05$ .



FONTE: Katz (2012).

#### 4.8 CICLO CELULAR

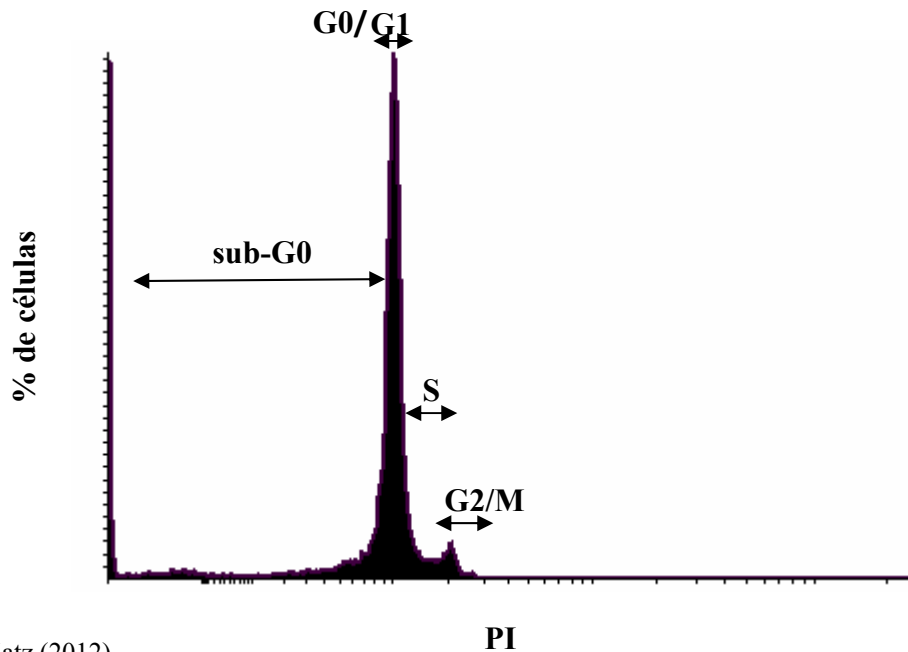
As células eucarióticas desenvolveram mecanismos de controle de qualidade, chamados de *checkpoints*, que asseguram a correta execução dos eventos do ciclo celular, garantindo a estabilidade genética. Quando as células que sofrem danos no DNA por agentes genotóxicos mecanismos de checagem são ativados nas fases G1 e G2/M, prevenindo o início da mitose quando existe algum dano no DNA não reparado (KASTAN; BARTEK, 2004).

É possível determinar o perfil do ciclo celular por meio de diferentes técnicas de citometria de fluxo, identificando os vários estágios do ciclo celular. Uma dessas técnicas usa o Iodeto de Propídio (PI) que se liga ao DNA, após permeabilização e fixação das células, revelando a quantidade de DNA presente em cada célula nas várias fases do ciclo celular. Dessa forma, é possível determinar a fase do ciclo celular pela detecção da fluorescência emitida por PI. Em condições de apoptose, o PI revela uma subpopulação de células hipodiploides com níveis de DNA abaixo do encontrado na fase G0/G1 do ciclo celular. O sinal de fluorescência obtido das células apoptóticas é, portanto, decorrente da ligação do PI ao DNA fragmentado e associado à matriz nuclear.

Tendo em vista as alterações encontradas pelo tratamento com DMBA por 24 horas nos camundongos AIRmin, avaliamos os efeitos dessa droga sobre o ciclo celular primeiramente em células totais da medula óssea.

Na **figura 28** temos um gráfico representativo de como selecionamos as fases sub-G0, G0/G1, S e G2/M do ciclo celular.

**Figura 28.** Representação gráfica das fases do ciclo celular.



FONTE: Katz (2012).

Verificamos que o tratamento com DMBA, no tempo analisado não alterou o ciclo celular das células totais da medula óssea em ambas as linhagens AIRmax e AIRmin (**Tabela 6**).

**Tabela 6** - Análise das células totais da medula óssea marcadas com Iodeto de Propídio nas várias fases do ciclo celular da medula óssea de camundongos AIR tratados por 24 horas com DMBA ou óleo de oliva.

	AIRmax óleo	AIRmax DMBA	AIRmin óleo	AIRmin DMBA
	% células	% células	% células	% células
<b>Sub-G0</b>	2,04 ± 0,6	3,01 ± 1,2	1,68 ± 0,6	2,78 ± 0,6
<b>G0/G1</b>	64,9 ± 3,5	69,35 ± 4,01	62,14 ± 1,2	61,74 ± 2,03
<b>S</b>	17,8 ± 2,3	14,86 ± 2,0	19,22 ± 2,5	20,75 ± 1,09
<b>G2/M</b>	14,01 ± 2,0	12,81 ± 0,6	16,55 ± 2,5	15,97 ± 2,3

FONTE: Katz (2012).

NOTA: Valores médios ± desvio padrão de 6 animais por grupo.

Nos resultados anteriores observamos que o DMBA aumenta a população de células blásticas e progenitoras de neutrófilos (**Figura 15**). Isso se deve provavelmente ao bloqueio de maturação causada pelos metabólitos do DMBA que impedem que essas células entrem no ciclo celular normal e proliferem. Para investigarmos essa hipótese, marcamos células totais da medula óssea com anticorpos específicos para marcadores de linhagem de células maduras ( $\text{Lin}^+$ ) e analisamos o ciclo celular nas células  $\text{Lin}^{-/\text{lo}}$  que não expressam ou expressam pouco na sua superfície proteínas presentes em células maduras.

As células  $\text{Lin}^{-/\text{lo}}$  apresentaram uma diminuição de 45,5% e 27,5% na porcentagem de células na fase S e G2/M, respectivamente e um aumento de 1,4 vezes na proporção em células em sub-G0/G1 em camundongos AIRmin tratados com DMBA. Este resultado é um forte indicativo de bloqueio na transição das fases G0/G1-S e morte celular. (**Tabela 7**).



**Tabela 7** - Análise das células Lin<sup>-lo</sup> da medula óssea marcadas com Iodeto de Propídio nas várias fases do ciclo celular da medula óssea de camundongos AIR tratados por 24 horas com DMBA ou óleo de oliva

	AIRmax óleo % células	AIRmax DMBA % células	AIRmin óleo % células	AIRmin DMBA % células
<b>Sub-G0</b>	10,33 ± 0,6	10,09 ± 0,9	7,77 ± 0,5	11,33 ± 0,32
<b>G0/G1</b>	79,9 ± 0,25	78,21 ± 0,35	77,37 ± 0,4	78,03 ± 1,13
<b>S</b>	5,52 ± 0,4	6,37 ± 0,9	6,75 ± 1,0	3,68 ± 0,3
<b>G2/M</b>	4,15 ± 0,5	5,31 ± 0,3	8,2 ± 0,8	5,94 ± 0,6

FONTE: Katz (2012).

NOTA: Resultados em valores médios ± desvio padrão de 6 animais por grupo

## 4.9 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS REGULADORAS DO CICLO CELULAR

### 4.9.1 Células Totais da medula óssea

As células que carregam dano no DNA, induzidos por agentes genotóxicos, podem determinar aumento de expressão de p53, pois esta proteína é responsável pela regulação da resposta ao dano no DNA, pois induz apoptose ou bloqueia a progressão do ciclo celular na fase G1 nas células que não foram totalmente reparadas. Este efeito é decorrente também da participação das proteínas p21/Waf1 e p27 induzidas por p53. (EL-DEIRY et al., 1993).

Com o intuito de avaliar a expressão desses genes e a presença das respectivas proteínas envolvidas no bloqueio do ciclo celular, camundongos AIRmax e AIRmin foram tratados com DMBA por 24 horas e após esse período foi realizado o ensaio de expressão gênica por qPCR e a expressão protéica pela técnica de western blotting.

A concentração protéica utilizada foi a mesma em todos os grupos, assim pudemos correlacionar a expressão das proteínas entre os grupos de animais AIRmax e AIRmin tratados com DMBA ou com óleo de oliva. Para verificar se a quantidade total de proteína carregada no gel estava correta, a proteína  $\beta$ -actina foi utilizada como controle das reações.

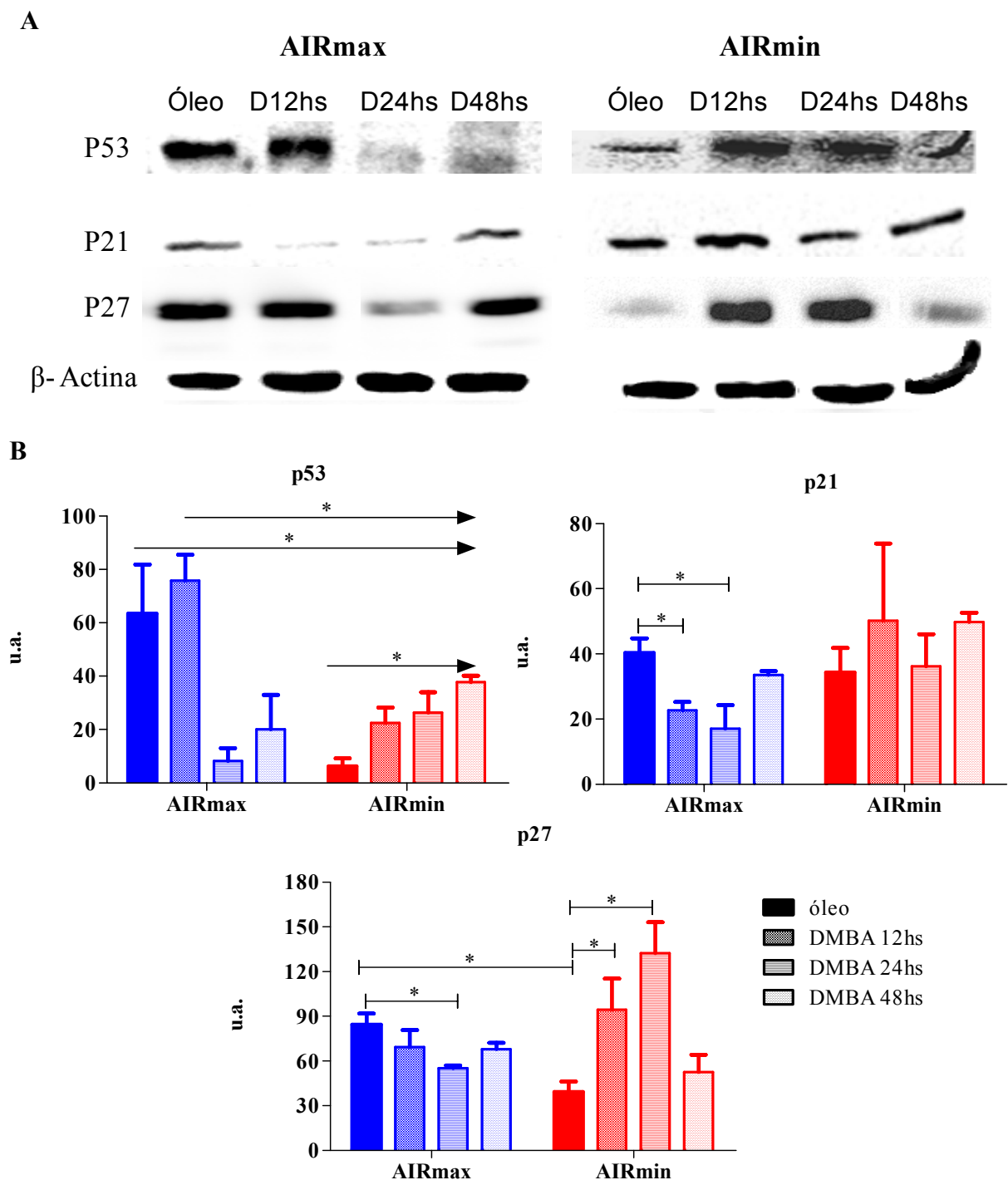
Verificamos um aumento significativo na expressão da proteína p53 nos animais AIRmin que receberam DMBA a partir das 12 horas do tratamento. Este aumento foi acompanhado pela sua expressão gênica (*Trp53*, do inglês: transformation related protein 53) (dados não mostrados). Por outro lado, os animais AIRmax tratados com DMBA apresentaram níveis de p53 extremamente baixos, com relação ao grupo controle, nos

períodos de 24 e 48 horas. Uma maior expressão constitutiva foi observada nos camundongos AIRmax em relação aos AIRmin (**Figura 29**).

A expressão da proteína p21 bem como de seu gene *Cdkn1a* (do inglês: cyclin-dependent kinase inibitor 1A) (dados não mostrados) apresentou diminuição significativa nos camundongos AIRmax tratados com DMBA após 12 e 24 horas em relação aos AIRmax tratados apenas com óleo de oliva. O mesmo efeito não foi observado entre os animais AIRmin que manteve sua expressão inalterada (**Figura 29B**).

A proteína p27 (Kip1) apresentou alta expressão após 12 e 24 horas de tratamento com DMBA nos camundongos AIRmin, quando comparado com seus controles tratados apenas com o veículo óleo de oliva. O inverso ocorreu com os animais AIRmax, onde o tratamento com DMBA diminuiu o nível de expressão após 24 horas. Assim como o nível de expressão de p53, a proteína p27 mostrou-se mais alta nos camundongos AIRmax em relação aos AIRmin tratados apenas com óleo de oliva (**Figura 29B**).

**Figura 29** - Análise de proteínas em células totais da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin tratados com DMBA às 12, 24 e 48 horas e controles tratados com óleo de oliva. **(A)** Western Blot representativo de 3 experimentos independentes das proteínas p53, p21, p27 e  $\beta$ -actina. **(B)** Dados quantitativos das proteínas p53, p21, p27 relativos à  $\beta$ -actina. \*Diferenças significativas,  $p < 0,05$ .



FONTE: Katz (2012).

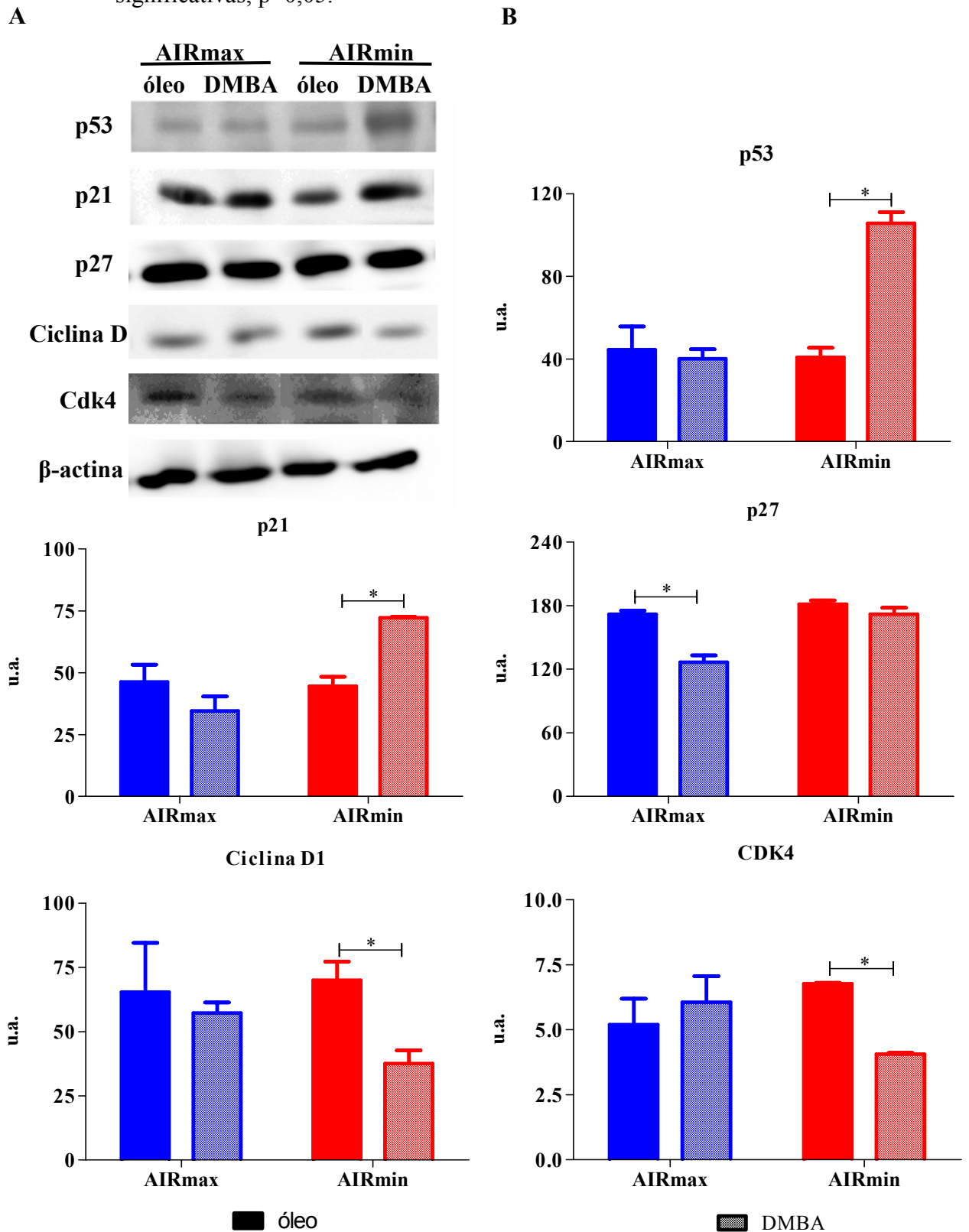
#### 4.9.2 Células *Lin* negativas

As análises citológicas e por citometria de fluxo de células da medula óssea de camundongos AIRmin tratados por 24 horas com DMBA, revelou um aumento de células blásticas e neutrófilos imaturos (**Figura 15**). Além disso, observamos diminuição na progressão do ciclo celular de células *Lin* negativas (**Tabela 7**). Esses resultados indicaram bloqueio na maturação de células progenitoras.

Para confirmarmos essa hipótese, células *Lin* negativas, constituídas por células tronco e progenitoras, foram separadas por depleção negativa e processadas para extração protéica. Pela técnica de Western Blotting avaliamos as proteínas envolvidas no bloqueio (p53, p21, p27) e na progressão (Ciclina D1 e Cdk4) do ciclo celular após 24 horas de tratamento com DMBA. Esse tempo foi escolhido baseado na diferença observada na expressão dessas proteínas extraídas de células totais da medula óssea.

Após 24 horas do tratamento com DMBA constatamos um aumento na expressão protéica de p53 e p21 e uma diminuição da Ciclina D1 e Cdk4 nos camundongos AIRmin tratados com DMBA, indicando um bloqueio na fase G1 do ciclo celular. Já a linhagem AIRmax tratada com esse hidrocarboneto apresentou uma diminuição na expressão de p27, quando comparada aos seus controles (**Figura 30**).

**Figura 30** - Análise de proteínas de células Lin negativas da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin 24 horas após o tratamento com 50mg de DMBA ou com óleo de oliva. **(A)** Western Blot representativo da expressão das proteínas p53, p21, p27, Ciclina D1, Cdk4 e  $\beta$ -actina. **(B)** Dados quantitativos das proteínas p53, p21, p27, Ciclina D1 e Cdk4 relativos à  $\beta$ -actina. \*Diferenças significativas,  $p < 0,05$ .



FONTE: Katz (2012).



## 5 DISCUSSÃO

Linhagens de camundongos selecionados para a reatividade inflamatória aguda (AIR) apresentam diferenças quanto à sensibilidade em desenvolver tumores quimicamente induzidos pelo DMBA. Protocolo de tumorigênese de pele em dois estágios, DMBA/TPA, foi aplicado nestas linhagens e os resultados revelaram uma grande diferença na incidência e multiplicidade de lesões papilomatosas, sendo maior em animais selecionados para a baixa capacidade inflamatória aguda, AIRmin, do que em camundongos AIRmax (BIOZZI et al., 1998). Além desta propriedade, este xenobiótico tem ação tóxica sobre as células da medula óssea e de outros órgãos hematopoiéticos. Estudos recentes demonstraram, por exemplo, que o tratamento com DMBA numa única dose reduz drasticamente o número de células mielóides e linfóides na medula óssea de linhagem isogênica de camundongo, C57BL/6J (HEIDEL et al., 2000; GALVAN et al., 2006).

Devido à ampla ação tóxica descrita dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus metabólitos sobre diversos tecidos e a grande diferença de sensibilidade dos camundongos AIRmax e AIRmin a estes compostos, estudamos os efeitos do DMBA sobre as células da medula óssea destes camundongos. Verificamos, que apenas a linhagem AIRmin foi sensível ao DMBA, apresentando depleção acentuada da celularidade da medula óssea que perdurou por 14 dias. Este efeito refletiu no potencial proliferativo das células da medula óssea estimuladas *in vitro* com GM-CSF, indicando que a supressão provocada pelo DMBA afetou funcionalmente as células estimuladas desse compartimento. Além de causar depleção nas células da medula óssea, o tratamento com DMBA afetou o baço diminuindo a celularidade e a capacidade proliferativa de linfócitos B em resposta ao mitógeno LPS, somente nos camundongos AIRmin (KATZ, 2007).

Como base nestes resultados obtidos em 2007, neste trabalho estudamos de maneira mais ampla a mielotoxicidade induzida pelo DMBA e sua repercussão na resposta imunológica comparativamente nos camundongos AIRmax e AIRmin.

Inicialmente avaliamos o efeito desse hidrocarboneto na resposta imune humoral frente à imunização por HGG. Todos os grupos de camundongos AIRmax responderam de maneira equivalente, apresentando títulos altos de anticorpos específicos. Constatamos que os animais controles AIRmax e AIRmin apresentaram títulos de anticorpos anti-HGG equivalentes, mostrando que a intensidade da resposta humoral não foi afetada pelos genes que determinam os fenótipos extremos da AIR. Araújo e

colaboradores (1998) observaram esse mesmo fenótipo após a infecção com *Salmonella typhimurium* (ARAÚJO et al., 1998). Esta resposta semelhante entre as linhagens AIR reforça a hipótese de que os controles genéticos da imunidade inata e adquirida são independentes (STIFFEL et al., 1990, IBANEZ et al., 1992).

Contudo o tratamento com DMBA interferiu na produção de IgG anti-HGG nos camundongos AIRmin. Observamos que concentrações baixas do DMBA (12,5 mg/kg) causaram supressão na produção de anticorpos específicos durante toda cinética, porém sem mortes. Entretanto, 50% dos animais tratados com 25 mg/kg de DMBA morreram antes de completar 14 dias da imunização, e esses mesmos camundongos apresentaram títulos mais baixos de anticorpos, decorrentes a provável imunossupressão causada pelo DMBA. A baixa sobrevivência desses animais pode ser consequência da ação sinérgica da toxicidade do DMBA associado ao antígeno HGG. Estes dados revelam a diferente sensibilidade dos animais AIRmax e AIRmin aos efeitos tóxicos e imunossupressores do DMBA (**Figuras 7B e 13**).

O tratamento com DMBA afetou também substancialmente o aporte de células em resposta a um estímulo inflamatório local induzida pelo Biogel, nos animais AIRmin (**Figura 8**). Contudo, até onde verificamos essas células que migraram para o exsudato inflamatório não estão funcionalmente comprometidas, pois foram capazes de produzir peróxido de hidrogênio, bem como citocinas inflamatórias em concentrações equivalentes aos seus controles (**Figuras 9 e 10**).

A imunossupressão causada pelo DMBA pode induzir a diminuição de resistência a agentes infecciosos e a tumores transplantados (WARD et al., 1984; DEAN et al., 1986). Neste contexto, a linhagem AIRmin pode ser mais sensível à carcinogênese de pele e pulmão induzidas pelo DMBA devido a um efeito imunossupressor deste xenobiótico, além da sua ação carcinogênica direta.

O efeito do DMBA sobre a resposta imune e inflamatória foi analisada também por meio da dinâmica das populações de células encontradas na medula óssea, principal órgão hematopoiético, após um período precoce, 24 horas, e longo, 50 dias, do tratamento com DMBA. Nessa análise observamos uma diminuição de neutrófilos segmentados e com núcleo em anel, células Gr-1<sup>hi-lo</sup>CD11b<sup>+</sup>, na medula óssea de camundongos AIRmin após 1 dia do tratamento com DMBA (**Figuras 15 e 17**). Essa perda de neutrófilos em processo final de diferenciação na medula óssea pode ser devido ao efeito seletivo dos metabólitos do DMBA em células diferenciadas. Os mecanismos pelos quais as células da medula óssea morrem pelo efeito tóxico do DMBA não são totalmente compreendidos. Sabe-se que os metabólitos do DMBA agem



diretamente nas células estromais, alterando a produção de fatores reguladores de proliferação e da sobrevivência das células da medula óssea, tais como TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , levando estas células à apoptose via caspase 8 (LOTEM et al., 1996, PAGE et al., 2004).

No nosso modelo avaliamos a apoptose por meio da marcação com PI e anexina V e verificamos uma maior porcentagem de células em apoptose e em necrose nos animais AIRmin tratados com DMBA, porém nenhuma diferença foi encontrada nos animais AIRmax (**Figura 23**).

A caspase 8 cliva as pro-formas inativas de caspases 3, sendo esta executora do processo de morte celular por apoptose (WYLLIE, 2010). Nesse sentido, averiguamos um maior nível de expressão do RNA mensageiro da *casp-3* (caspase-3) após 12 horas do tratamento com DMBA nos animais AIRmin (**Figura 26**). Esses resultados de expressão gênica associados aos fenótipos de morte celular nas células da medula óssea podem indicar um possível mecanismo de morte celular por processo de apoptose.

Concomitantemente, danos no DNA induzem um programa global de transcrição que leva à expressão de genes cujos produtos podem retardar ou parar o ciclo celular para facilitar a reparação do DNA, ou acionar o programa de morte celular (HARPER; ELLEDGE, 2007; JACKSON; BARTEK, 2009).

Desta forma, observamos efeitos genotóxicos do DMBA sobre células da medula óssea de ambas as linhagens, entretanto foi evidente um retardamento no processo de reparo da lesão no DNA nas células dos camundongos AIRmin quando comparados com os AIRmax que receberam o mesmo tratamento (**Figura 24 e 25**). Observamos também que o efeito genotóxico foi menor na linhagem AIRmax em relação aos AIRmin tratados com o xenobiótico. Essa resistência poderia ser devida a uma maior capacidade de reparo no DNA, que seria mais rápido e/ou mais eficiente nos animais AIRmax. Além disso, os animais AIRmax possuem o receptor AHR de baixa afinidade para o DMBA, o que poderia interferir na eficácia da metabolização do xenobiótico e consequente redução dos efeitos tóxicos nesta linhagem. O oposto seria válido para explicar a maior sensibilidade dos animais AIRmin.

O PARP-1 é importante no processo de reparo do DNA. Camundongos Knockout do gene *parp-1* apresentaram problemas na capacidade de reparo de danos no DNA e alta instabilidade genômica frente a estímulos genotóxicos (SIMBULAN-ROSENTHAL et al., 1999; TRUCCO et al., 1998; CONDE et al., 2001). Neste contexto, os animais AIRmax tratados com DMBA apresentaram, após 12 horas, maior nível de expressão do RNA mensageiro de *parp-1*, o que sugere maior ativação do

mecanismo de reparo nesta linhagem (**Figura 27**). Contudo observamos também uma diminuição expressiva no nível dessa proteína após 24 horas do tratamento com DMBA nesses camundongos, refletindo a ocorrência de um processo de regulação. Está descrito que o aumento excessivo dessa proteína pode ocasionar depleção energética de ATP na célula causando necrose da mesma (JAVIER et al., 1999). Excessiva ativação de PARP-1 também está envolvida no aumento de radicais livres e mediadores pró-inflamatórios do estresse oxidativo causando uma resposta inflamatória não controlada, favorecendo assim promoção tumoral (MARTIN-OLIVA et al., 2006). Por esses motivos o controle da expressão de PARP-1 é essencial para manter a homeostase celular.

Ao contrário das células maduras a análise citológica e imunofenotípica da medula óssea de camundongos AIRmin tratados com DMBA revelou um aumento de células blásticas e neutrófilos imaturos (promielócito, mielócito, metamielócito) (**Figura 15 e 17**). Esse aumento de células blásticas perdurou por 50 dias, indicando bloqueio persistente na maturação destes precursores (**Figura 15 e 17**). Nesse sentido, alguns trabalhos demonstram aumento desta população em animais isogênicos tratados com DMBA ou dioxina (MURANTE; GASIEWICZ, 2000; GALVÁN et al., 2006), demonstrando que os HPAs tem também efeito sobre células progenitoras da medula óssea.

Tendo em vista as alterações encontradas pelo tratamento com DMBA, indicando bloqueio de maturação nas células primitivas, avaliamos os efeitos dessa droga sobre o ciclo celular. Não constatamos diferenças entre os animais controles e tratados e nem diferenças interlinhagens quando analisamos células totais da medula óssea (**Tabela 6**). Porém, quando analisamos o ciclo celular nas células progenitoras hematopoiéticas, Lin negativas, observamos um bloqueio na progressão da fase G1 para S apenas nos AIRmin (**Tabela 7**). Alguns trabalhos mostram também que a dioxina bloqueia células hepáticas na fase G1 do ciclo celular e esse mecanismo é dependente do AHR (KOLLURI et al., 1999; ELFERINK et al., 2001; HUANG; ELFERINK, 2005).

Para impedir a propagação do DNA danificado, a célula bloqueia o ciclo celular nas fases G1 ou G2. Essa resposta envolve um complexo de proteínas que regulam negativamente (p53, p21 e p27) e positivamente (ciclina D1 e Cdk4) o ciclo celular. Essas proteínas, por meio do equilíbrio entre si, mantêm o balanço entre morte e proliferação celular (AGAMI; BERNARDS, 2002).

O tratamento com dioxina, por exemplo, induz em diferentes linhagens de células a parada do ciclo celular na fase G1 devido o aumento de p27 (KOLLURI et al.,

1999; JIN et al., 2004; ANDRYSÍK et al., 2006). Um outro estudo com benzeno demonstrou que o tratamento diminui a expressão de genes importantes na progressão do ciclo celular como ciclina D e aumenta a expressão de p53 e p21, que estão envolvidos no bloqueio do ciclo. Ao passo que genes relacionados ao reparo de DNA (Rad 50 e Rad 51) têm níveis de expressão baixa em camundongos deficientes de p53 (YOON et al., 2003).

É descrito que os efeitos do DMBA na celularidade da medula óssea são dependentes de p53 e, nesse sentido, essa proteína poderia estar induzindo parada do ciclo celular ou mesmo de apoptose em células que sofreram dano no DNA, por não serem reparadas (PAGE et al., 2003). No entanto, se o dano ao DNA for muito extenso, os mecanismos de reparo não serão tão eficientes e conseqüentemente haverá um aumento de p53, e a célula poderá rapidamente morrer por apoptose (GESKE et al., 2001). Nos camundongos AIRmin o bloqueio da maturação de células da medula óssea poderia ocorrer por parada no ciclo celular de células progenitoras em resposta a ação genotóxica induzida pelo tratamento com DMBA. E de fato houve um aumento no nível de expressão das proteínas p53 e p27 nas células totais da medula óssea de animais AIRmin tratados com DMBA. O aumento da expressão gênica de *p53* após 12 horas do tratamento com DMBA condiz com o aumento da proteína às 24 horas (**Figura 29**).

Embora os camundongos AIRmax tenham uma diminuição da expressão da proteína p53, não observamos alteração no nível da expressão do RNA mensageiro. Verificamos também que os animais AIRmax tem um nível constitutivo maior da proteína p53 que os AIRmin (**Figura 29**). Isto pode estar correlacionado com o fato desta proteína também estar envolvida na manutenção da estabilidade genômica. Muitas evidências sugerem que a função fisiológica da p53 é regular a transcrição e/ou ser um facilitador do reparo de excisão de base (BER), pois a atividade de BER em células murinas está relacionada aos níveis de p53, e quando a p53 é suprimida a atividade BER é muito reduzida (ZHOU et al., 2003). O papel da p53 no reparo do DNA poderia também contribuir para a sua função como um supressor do tumor. Também está descrito que quando a lesão no DNA é reparada eficientemente a p53 é suprimida e a célula não entra em apoptose (GESKE et al., 2001). Neste caso, quando tratamos os camundongos AIRmax com DMBA a p53 poderia estar sendo suprimida pela mdm-2 (do inglês: Murine Double Minute-2) inibindo assim o processo de apoptose ou o bloqueio do ciclo celular (JACK; SCOTT, 2009).

Em vista dos resultados obtidos com a p53, avaliamos a expressão da proteína p21 cuja expressão está relacionada a ela. Não constatamos aumento de p21 nas células

da medula óssea em AIRmin tratados com DMBA, apenas uma diminuição no nível de expressão gênica e protéica em animais AIRmax após tratamento (**Figura 30**). Porém quando avaliamos a expressão de p21 numa suspensão enriquecida com células Lin negativas, observamos um aumento da expressão de p21 que acompanha o aumento de p53 nos camundongos AIRmin tratados com DMBA. Além disso, observamos que os camundongos AIRmin tratados com DMBA tiveram uma diminuição nas proteínas que regulam positivamente o ciclo celular (Ciclina D1 e Cdk4) (**Figura 33**).

As proteínas p21 e p27 originaram-se de um gene ancestral comum, e compartilham um amino terminal altamente homólogo. Porém, elas divergiram durante a evolução e adotaram funções distintas e altamente especializadas. A p27, por exemplo, regula o ciclo celular em resposta a depleção de fatores de crescimento, já a p21 é necessária para iniciação e manutenção do bloqueio na fase G1 e aumenta quando há dano no DNA (AGAMI; BERNARDS, 2002). Portanto o aumento de p27 observado em células totais pode estar relacionado com o bloqueio do ciclo celular no final da fase G1 de células maduras, que constituem mais de 70% das células totais da medula óssea. No entanto, o aumento da proteína p21, em células progenitoras, poderia estar correlacionado com o bloqueio de maturação das células imaturas.

Considerando os resultados de bloqueio do ciclo celular nos animais AIRmin tratados com DMBA, observamos se as células da medula óssea eram capazes de proliferar e diferenciar quando estimuladas *in vitro* com diferentes fatores hematopoiéticos. Verificamos que o tratamento afetou a expansão de precursores e a sua diferenciação em células mielóides nestes animais (**Figura 19 e 22 e Tabela 4 e 5**).

O conjunto dos nossos resultados demonstraram que camundongos AIRmax apresentaram resistência ao efeito citotóxico do DMBA, maior capacidade na remoção da lesão do DNA, maior expressão de p53 constitutiva e aumento da expressão do gene *parp-1* quando tratados com DMBA, o que sugere que essa linhagem pode ter um eficiente mecanismo de reparo do DNA. Neste sentido os animais AIRmax, provavelmente adquiriram durante o processo seletivo um eficiente mecanismo de reparo no DNA numa tentativa de controlar os efeitos indesejáveis da amplificação da reação inflamatória, como a oxidação do DNA, o que poderia acarretar manifestações patológicas indesejáveis como transformações neoplásicas espontâneas.

Por outro lado, os camundongos AIRmin são sensíveis ao DMBA devido ao efeito citotóxico e genotóxico deste hidrocarboneto nas células da medula óssea, podendo afetar substancialmente a diferenciação e proliferação das células mielóides na medula óssea e conseqüentemente o aporte celular em resposta a um estímulo

inflamatório. Este efeito pode estar relacionado com a morte de neutrófilos em estágios finais de maturação e/ou aumento de blastos e neutrófilos imaturos por bloqueio da maturação de células progenitoras. Assim o DMBA pode afetar a diferenciação de células progenitoras desregulando o processo de hematopoiese nos camundongos AIRmin, podendo ocasionar doenças hematológicas.

Neste contexto alguns trabalhos demonstram que o tratamento com uma única ou com múltiplas injeções de DMBA pode induzir a síndrome mielodisplásica ou mesmo leucemia mielóide aguda (LMA) em camundongos isogênicos (PETERSON et al., 1992; HEIDEL et al., 2000). Em nosso trabalho o aumento na quantidade de células blásticas associado à presença de nucléolo displásico e ao bloqueio de maturação e diferenciação da medula óssea são fortes indicativos da ocorrência de uma síndrome mielodisplásica nesta linhagem.

A ocorrência de bloqueio do processo de maturação na linhagem AIRmin, pode também estar correlacionada com o fato desses animais possuírem o alelo mutado do gene da cadeia alfa do receptor de IL-3 ( $IL-3R\alpha$ ) que resulta em receptor de baixa afinidade ao agonista. Uma vez que a IL-3 desempenha um papel importante na regulação da diferenciação das células mielóides, esta mutação pode tornar esses camundongos mais sensíveis à desregulação da hematopoiese causada pelo tratamento com DMBA. Neste sentido alguns trabalhos demonstram que algumas citocinas como SCF e IL-3 podem servir como terapia para LMA atuando como fatores de diferenciação de células leucêmicas (BRUSERUD et al., 2000). Já a linhagem AIRmax possui o alelo que codifica a forma protéica normal do  $IL-3R\alpha$ .

A segregação diferencial de alelos deste receptor, bem como de alelos do receptor AHR resultante do processo de seleção genética das linhagens AIRmax e AIRmin deve contribuir para os fenótipos de resistência e sensibilidade, respectivamente, aos efeitos tóxicos, imunossupressores e carcinogênicos de xenobióticos como o DMBA (DE SOUZA et al., 2008).

Em nosso trabalho mostramos a ação protetora do  $\alpha$ -NF, aos efeitos mielotóxicos provocados pelo tratamento com DMBA. O uso concomitante desse antagonista do AHR, reverteu a diminuição da celularidade e da capacidade proliferativa das células da medula óssea nos camundongos AIRmin tratados com DMBA (**Figura 14 e 20**). Esta é uma prova indireta do envolvimento do AHR na desregulação do processo de ativação e diferenciação celular induzida pelo xenobiótico.

Nesse sentido o AHR é importante na relação do equilíbrio entre a quiescência e a proliferação das células tronco hematopoiéticas (HSCs) (SINGH et al., 2009a).

Quando há uma desregulação da função do AHR, pode ocorrer progressão de doenças hematológicas por meio da ativação inapropriada desse receptor, pelos xenobióticos, alterando a expressão de genes críticos para a diferenciação das células tronco, podendo promover bloqueio da diferenciação e promoção do acúmulo de progenitores.

Uma das maneiras pelas quais o AHR modula a diferenciação e a proliferação das células hematopoiéticas é a regulação direta de genes que controlam esse processo, como *Hes1* e *c-myc* (KIM et al., 2000; THOMSEN et al., 2004). Do mesmo modo, regula a expressão de genes importantes no homing de HSCs na medula óssea, como a *Cxcl12* (SDF-1) e do seu receptor *Cxcr4* (CHUTE, 2006). Neste contexto, o defeito no homing das HSCs, de animais previamente tratados com TCDD, é um dos principais contribuintes para a diminuição da capacidade de reconstituição da medula óssea de animais irradiados (SINGH et al., 2009b). Este receptor também está envolvido no bloqueio do ciclo celular nas fases G0/G1 e G2/M diminuindo a capacidade de replicação do DNA pelo declínio da expressão de ciclina D1, CDKs e Rb fosforilada, inibindo a proliferação na presença de xenobióticos (MARLOWE; PUGA, 2005). Do mesmo modo a interação do AHR com a proteína Rb reprime a transcrição de E2F regulando negativamente o ciclo celular na transição da fase G1 para S (PUGA et al., 2000). Algumas evidências indicam que camundongos knockout para o *Ahr* (*Ahr* KO) têm baixa taxa de proliferação celular e aumento de apoptose pelo aumento dos níveis de TGF- $\beta$ , com acúmulo de células na fase G2/M (ELIZONDO et al., 2000). Em contraste, na ausência de ligantes exógenos o AHR promove a progressão do ciclo celular (MARLOWE; PUGA, 2005).

Existem muitas evidências que certas células leucemias mielóides agudas são células tronco hematopoiética que acumularam mutações, pois estas têm a longevidade maior do que células normais, podendo acumular proporcionalmente mais danos no DNA (PASSEGUÉ et al., 2003). Assim, alguns trabalhos com camundongos isogênicos tentam correlacionar o envolvimento do polimorfismo do AHR com a longevidade de HSCs (HAAN et al., 1997). Os animais C57BL/6, por exemplo, são caracterizados por baixas taxas de proliferação e vida útil longa das HSCs, e possuem o alelo *Ahr*<sup>bl</sup> de alta afinidade, já os camundongos DBA/2, têm altas taxas de proliferação e curta duração das HSC e possuem o alelo *Ahr*<sup>d</sup> de baixa afinidade (NEBERT et al., 1984). Deste modo podemos sugerir que a via de sinalização do AHR pode ser importante na regulação da quiescência e proliferação destas células. Neste contexto podemos também relacionar, ao menos em parte, a capacidade inflamatória dos camundongos AIRmax e AIRmin com os alelos de baixa ou de alta afinidade do *Ahr*, respectivamente.

Além do locus *Ahr* outras regiões que contém marcadores polimórficos vêm sendo localizadas nas linhagens AIR. Para o rastreamento do genoma foram utilizados marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês: Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ou microssatélites. Neste estudo o mapeamento dos QTLs (do inglês: Quantitative Trait Loci, QTL) auxiliou na identificação de genes que interferem nos processos celulares e moleculares da intensidade da AIR, bem como à predisposição ou resistência à carcinogênese, infecções, autoimunidade e inflamação alérgica (MARIA et al., 2001; RIBEIRO et al., 2003, 2005; BORREGO et al., 2006; PETERS et al., 2007). A contribuição de loci na regulação da resposta inflamatória foi avaliada pelo ensaio de co-segregação do genótipo com o fenótipo selecionado em camundongos que apresentam níveis variados de resposta inflamatória aguda, ou seja, animais segregantes F2 (AIRmax X AIRmin). Neste estudo foi identificado um locus no cromossomo 7 envolvido na regulação da resposta inflamatória o *Irm1* (do inglês: inflammatory response modulator 1) (VORRARO et al., 2010).

Esta análise de ligação genética pode ser complementada pela análise da expressão gênica e assim identificar genes diferencialmente expressos e correlacioná-los com QTL já mapeados. Na Tabela abaixo correlacionamos os QTLs onde já identificamos um desequilíbrio de frequência alélica significativa entre os camundongos AIRmax e AIRmin com os genes ou proteínas diferentemente expressos neste trabalho.

**Tabela 8** – Correlação dos QTLs com desequilíbrio de ligação de marcadores alélicos e a expressão de *parp-1*, p21 p53, ciclina D1 e p27.

<b>Cromossomo</b>	<b>Região com LD* (cM)</b>	<b>Gene / localização (cM)</b>	<b>Fenótipos correlacionado com o Polimorfismo</b>	<b>Outros genes nesses QTLs</b>
<b>1</b>	Entre 30 a 40	<i>Parp-1</i> / 84	Maior susceptibilidade a câncer de próstata, fígado, esôfago e sensibilidade a irradiação; doenças autoimunes**	<i>cd28, Cxcr2</i> e <i>Slc11a1</i>
<b>6</b>	72	<i>Cdkn1</i> / 66	maior susceptibilidade a diferentes tipos de tumores ***	<i>Pas1</i>
<b>7</b>	Entre 60 a 69	<i>Ccnd1</i> / 89	resistentes ao câncer de pulmão****	<i>Itga1, Itgam, Itgax, Sec12, Sluc19, Skts2</i>
<b>11</b>	Entre 28 a 40	<i>Trp53</i> / 39	mudanças no ciclo celular, apoptose e sensibilidade ao câncer de pulmão *****	<i>IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, G-CSF e RAR<math>\alpha</math></i>
<b>17</b>	18	<i>Cdkn1a</i> / 15	maior susceptibilidade a diferentes tipos de tumores*****	<i>TNF-<math>\alpha</math></i>

FONTE: Produção própria

NOTA: Os genes *Cdkn1*, *Ccnd1*, *Trp53* e *Cdkn1a* são codificadores das proteínas p21 p53, ciclina D1 e p27, respectivamente

\*Desequilíbrio de ligação; \*\* MASUTANI; NAKAGAMA; SUGIMURA, 2005; \*\*\*MARTÍN-CABALLERO et al., 2001; GARCÍA-FERNÁNDEZ et al, 2011; \*\*\*\*SUTHERLAND; MUSGROVE, 2004; \*\*\*\*\*WHIBLEY et al., 2009;\*\*\*\*\* MARTÍN-CABALLERO et al., 2001; GARCÍA-FERNÁNDEZ et al, 2011.

Deste modo o *parp-1*, o *Cdkn1*, o *Ccnd1*, o *Trp53* e o *Cdkn1a* também são candidatos na regulação dos fenótipos de sensibilidade aos hidrocarbonetos, bem como a resposta inflamatória aguda.

Desta forma, este estudo poderá contribuir para o esclarecimento dos mecanismos celulares e genéticos envolvidos na determinação da resistência ou susceptibilidade à mielotoxicidade induzida por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como também poderá auxiliar na identificação dos fatores genéticos relacionados com a intensidade da AIR que foram fixados durante o processo de seleção genética bidirecional e que podem regular a sensibilidade dos camundongos AIRmax e AIRmin ao DMBA.



***Conclusões***

---

## 6 CONCLUSÕES

- ❖ Os camundongos AIRmin são mais sensíveis aos efeitos supressores do DMBA do que os animais AIRmax no que concerne à diminuição da celularidade da medula óssea. Essa diminuição na celularidade da medula óssea ocorre por morte de células em apoptose tardia ou necróticas.
- ❖ A supressão da celularidade em AIRmin tratados com DMBA ocorre principalmente na população de neutrófilos segmentados.
- ❖ As células mielóides dos animais AIRmin tratados com DMBA, quando estimuladas *in vitro*, apresentam proliferação e diferenciação diminuídas.
- ❖ Após 1 e 50 dias do tratamento com DMBA aumenta a porcentagem das HSCs da medula óssea e causa displasia em grande parte dessas células apenas nos AIRmin.
- ❖ O tratamento com DMBA nos AIRmin diminui a porcentagem de células Lin negativas nas fases S e G2/M do ciclo celular.
- ❖ Os camundongos AIRmin tem aumento de expressão de p53 e p27 nas células totais da medula óssea e aumento da expressão de p53 e p21 nas células Lin negativas após 24 horas do tratamento com DMBA, enquanto os AIRmax tem uma diminuição na expressão dessas proteínas.
- ❖ O comprometimento da medula óssea nos animais AIRmin tratados com DMBA afetou substancialmente o aporte de células em resposta ao Biogel e a produção de anticorpo anti-HGG.
- ❖ Ambas as linhagens AIRmax e AIRmin sofrem efeitos genotóxicos do DMBA, porém os camundongos AIRmax têm capacidade de reparar o dano no DNA mais precocemente que os AIRmin.
- ❖ O tratamento com DMBA causa aumento da expressão de *parp-1* apenas nos AIRmax.



## REFERÊNCIAS

ABBOTT, B. D.; PERDEW, G. H.; BUCKALEW, A. R.; BIRNBAUM, L. S. Interactive regulation of Ah and glucocorticoid receptors in the synergistic induction of cleft palate by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and hydrocortisone. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 128, n. 1, p. 138-150, 1994.

ABDELRAHIM, M.; SMITH, R.; SAFE, S. Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 63, n. 6, p. 1373-1381, 2003.

AGAMI, R.; BERNARDS R. Convergence of mitogenic and DNA damage signaling in the G1 phase of the cell cycle. **Cancer Lett.**, v. 177, n. 2, p. 111-118, 2002.

AGRAWAL, R. C; PANDEY S. Evaluation of anticarcinogenic and antimutagenic potential of Bauhinia variegata extract in Swiss albino mice. **Asian. Pac. J. Cancer Prev.**, v. 10, n. 5, p. 913-916, 2009.

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

AMÉ, J. C.; SPENLEHAUER, C.; DE MURCIA, G. The PARP superfamily. **Bioessays**, v. 26, n. 8, p. 882-893, 2004.

ANDRYSÍK Z.; VONDRÁČEK J.; MACHALA M.; KRČMÁR P.; SVIHÁLKOVÁ-SINDLEROVÁ L.; KRANZ A.; WEISS C.; FAUST D.; KOZUBÍK A.; DIETRICH C. The aryl hydrocarbon receptor-dependent deregulation of cell cycle control induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells. **Mutat. Res.**, v. 615, n. 1-2, p. 87-97, 2006.

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

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

BARHOOVER, M. A; HALL, J. M; GREENLEE, W. F; THOMAS, R. S. Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4. **Mol. Pharmacol.**, v. 77, n. 2, p. 195-201, 2010.

BARTEK, J; LUKAS, J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 19, n. 2, p. 238-245, 2007.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAUER, P. I.; CHEN, H. J.; KENESI, E.; KENESSEY, I.; BUKI, K. G.; KIRSTEN, E.; HAKAM, A.; HWANG, J. I.; KUN, E. Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) and topoisomerase I (Topo I): identification of topology of binding. **FEBS Lett.**, v. 506, n. 3, p. 239-242, 2001.

BERGSTRAND H. The generation of reactive oxygen-derived species by phagocytes. **Agents Actions Suppl.**, v. 30, p. 199-211, 1990.

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

BORREGO A; PETERS L. C; JENSEN J. R.; RIBEIRO O. G.; CABRERA W. H. K.; STAROBINAS N.; SEMAN M.; IBAÑEZ O. M.; DE FRANCO M. Genetic determinants of acute inflammation regulate Salmonella infection and modulate Slc11a1 gene (formerly Nramp1) effects in selected mouse lines. **Microbes Infect.** v. 8, n. 12-13, p. 2766-2771, 2006.

BOSTROM, C. E.; GERDE, P.; HANBERG, A.; JERNSTROM, B.; JOHANSSON, C.; KYRKLUND, T.; RANNUG, A.; TORNQVIST, M.; VICTORIN, K.; WESTERHOLM, R. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. **Environ. Health. Perspect.** v. 110, p. 451-488, 2002.

BUTERS, J. T.; SAKAI, S.; RICHTER, T.; PINEAU, T.; ALEXANDER, D. L.; SAVAS, V.; DOEHMER, J.; WARD, J. M.; JEFCOATE, C. R.; GONZALEZ, F. T. Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lymphomas. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 96, n. 5, p. 1977-1982, 1999.

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H. K.; VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M.; STAROBINAS, N. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon.**, v 40, p. 1571-1579, 2002.

CARNEIRO, P. DOS S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; JENSEN, J. R.; CABRERA, W. H.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Gene expression profiles of bone marrow cells from mice phenotype-selected for maximal or minimal acute inflammations: searching for genes in acute inflammation modifier loci. **Immunology.** v. 128, p. 562-571, 2009.

CARVALHO L. V.; RUIZ R. C.; SCARAMUZZI K.; MARENGO E. B.; MATOS J. R.; TAMBOURGI D. V.; FANTINI M. C.; SANT'ANNA O. A. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. **Vaccine**, v. 28, n. 50, p. 7829-7836, 2010.

CHAKRAVARTI, D.; VENUGOPAL, D.; MAILANDER, P. C.; MEZA, J. L.; HIGGINBOTHAM, S.; CAVALIERI, E. L.; ROGAN, E. G. The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. **Mutat. Res.**, v. 649, n. 1-2, p. 161-178, 2008.

- CHO, Y. S.; PARK, S. Y.; SHIN, H. S.; CHAN, F. K. Physiological consequences of programmed necrosis, an alternative form of cell demise. **Mol. Cells**, v. 29, n. 4, p. 327-332, 2010.
- CHUTE, J. P. Stem cell homing. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 13, p. 399-406, 2006.
- COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.
- CONDE, C. Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. **Embo J.**, v. 20, p. 3535-3543, 2001.
- CURRIER, N.; SOLOMON, S. E.; DEMICCO, E. G.; CHANG, D. L.; FARAGO, M.; YING, H.; DOMINGUEZ, I.; SONENSHEIN, G. E.; CARDIFF, R. D.; XIAO, Z. X.; SHERR, D. H. e SELDIN, D. C. Oncogenic signaling pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors. **Toxicol. Pathol.**, v. 33, n. 6, p. 726-737, 2005.
- D'AMOURS, D.; DESNOYERS, S.; D'SILVA, I.; POIRIER, G. G. Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions. **Biochem J.**, v. 342, p. 249-268, 1999.
- DANTZER, F.; NASHEUER, H. P.; VONESCH, J. L.; DE MURCIA, G.; MÉNISSIER-DE MURCIA, J. Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 26, n. 8, p. 891-898, 1998.
- DAS, M.; ANSARI, K. M.; DHAWAN, A.; SHUKLA, Y.; KHANNA, S. K. Correlation of DNA damage in epidemic dropsy patients to carcinogenic potential of argemone oil and isolated sanguinarine alkaloid in mice. **Int. J. Cancer**, v. 117, n. 5, p. 709-717, 2005.
- DE FRANCO, M.; CARNEIRO, P. DOS. S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; CABRERA, W. K.; IBAÑEZ, O. M. Slc11a1 (Nramp1) alleles interact with acute inflammation loci to modulate wound-healing traits in mice. **Mamm. Genome**, v. 18, n. 4, p. 263-269, 2007.
- DE SOUZA, V. R.; CABRERA, W. K.; GALVAN, A.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; VORRARO, F.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; DRAGANI, T. A.; IBAÑEZ, O. M. Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. **Int. J. Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1478-1482, 2008.
- DEAN, J. H.; WARD, E. C.; MURRAY, M. J.; LAUER, L. D.; HOUSE, R. V. Mechanisms of dimethylbenzanthracene-induced immunotoxicity. **Clin. Physiol. Biochem.**, v. 3, n. 2-3, p. 98-110, 1985.
- DEAN, J. H.; WARD, E. C.; MURRAY, M. J.; LAUER, L. D.; HOUSE, R. V.; STILLMAN, W.; HAMILTON, T. A.; ADAMS, D. O. Immunosuppression following 7,12-dimethylbenz[a]anthracene exposure in B6C3F1 mice--II. Altered cell-mediated immunity and tumor resistance. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 8, n. 2, p. 189-198, 1986.

DE MURCIA J. M.; NIEDERGANG C.; TRUCCO C.; RICOUL M.; DUTRILLAUX B.; MARK M.; OLIVER F. J.; MASSON M.; DIERICH A.; LEMEUR M.; WALZTINGER C.; CHAMBON P.; DE MURCIA G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v 94, n. 14, p. 7303-7307, 1997.

DENISON M. S.; NAGY S. R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**; v. 43, p. 309-334, 2002.

EL-DEIRY, W. S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V. E.; LEVY, D. B.; PARSONS, R.; TRENT, J. M.; LIN, D.; MERCER, W. E.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 817-825, 1993.

ELFERINK C. J.; GE N. L.; LEVINE A. Maximal aryl hydrocarbon receptor activity depends on an interaction with the retinoblastoma protein. **Mol. Pharmacol.** v. 59, p. 664-673, 2001.

ELIZONDO G.; FERNANDEZ-SALGUERO P.; SHEIKH M. S.; KIM G. Y.; FORNACE A. J.; LEE K. S.; GONZALEZ F. J.; Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. **Mol. Pharmacol.**, v. 57, n. 5, p. 1056-1063, 2000.

EMBER, I.; KISS, I.; PUSZTAI, Z. Effect of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on onco/suppressor gene action in vivo: a short-term experiment. **Anticancer Res.**, v. 18, n. 1A, p. 445-447, 1998.

FULDA, S.; GORMAN, A. M.; HORI, O.; SAMALI, A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. **Int. J. Cell. Biol.**, v. 74, p. 2010-2140, 2010.

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

GALVAN N.; PAGE T. J.; CZUPRYNSKI C. J.; JEFSCOATE C. R. Benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene differentially affect bone marrow cells of the lymphoid and myeloid lineages. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 213, n. 2, p. 105-116, 2006.

GAO J.; LAUER F. T.; DUNAWAY S.; BURCHIEL S. W. Cytochrome P450 1B1 is required for 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA) induced spleen cell immunotoxicity. **Toxicol. Sci.**, v. 86, n. 1, p. 68-74, 2005.

GAO, J.; MITCHELL, L. A.; LAUER, F. T.; BURCHIEL, S. W. p53 and ATM/ATR regulate 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced immunosuppression. **Mol. Pharmacol.** v. 73, n. 1, p. 137-146, 2008.

GARCIA, O.; ROMERO, I.; GONZÁLEZ, J.E.; MANDINA, T. Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. **Mutat. Res.**, v. 627, n. 2, p. 186-190, 2007.

- GARNER, E.; RAJ, K. Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. **Cell Cycle**, v. 7, n. 3, p. 277-282, 2008.
- GASIEWICZ T. A.; RUCCI G.; Alpha-naphthoflavone acts as an antagonist of 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by forming an inactive complex with the Ah receptor. **Mol. Pharmacol.**, v. 40, n. 5, p. 607-612, 1991.
- GESKE F. J.; LIEBERMAN R.; STRANGE R.; GERSCHENSON L. E. Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. **Cell Death Differ.**, v. 8, n. 2, p. 182-191, 2001.
- GIULIETTI A.; OVERBERGH L.; VALCKX D.; DECALLONNE B.; BOUILLON R.; MATHIEU C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 386-401, 2001.
- GOLDSTEIN, B. D. Benzene as a cause of lymphoproliferative disorders. **Chem. Biol. Interact.**, v. 184, n. 1-2, p. 147-150, 2010.
- GUICCIARDI, M.E.; GORES, G.J. Life and death by death receptors. **FASEB J.** v.23, n.6, p.1625-37, 2009.
- HAAN, G.; NIJHOF, W.; VAN, G. Z. Mouse Strain-Dependent Changes in Frequency and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells During Aging: Correlation Between Lifespan and Cycling Activity. **Blood**, v. 89, p. 1543–1550, 1997.
- HAHN, M. E.; KARCHNER, S. I.; SHAPIRO, M. A.; PERERA, S. A. Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, n. 25, p. 3743-3781, 1997.
- HANAHAHAN D.; WEINBERG R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
- HANKINSON, O. The aryl hydrocarbon receptor complex. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 307-340, 1995.
- HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: ten years after. **Mol. Cell.**, v. 28, n. 5, p. 739-745, 2007.
- HASEL, K. W.; SUTCLIFFE, J. G. Nucleotide sequence of a cDNA coding for mouse cyclophilin. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 13, 1990.
- HASSA, P. O.; HAENNI, S. S.; BUERKI, C.; MEIER, N. I.; LANE, W. S.; OWEN, H.; GERSBACH, M.; IMHOF, R.; HOTTIGER, M. O. Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 49, p. 40450-40464, 2005.
- HAYASHIBARA T.; YAMADA Y.; MORI N.; HARASAWA H.; SUGAHARA K.; MIYANISHI T.; KAMIHIRA S.; TOMONAGA M. Possible involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: constitutive activation of AhR in ATL. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 300, n. 1, p. 128-134, 2003.



HEIDEL, S. M.; HOLSTON, K.; BUTERS, J. T.; GONZALEZ, F.J.; JEFCOATE, C. R.; CZUPRYNSKI, C. J. Bone marrow stromal cell cytochrome P4501B1 is required for pre-B cell apoptosis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. **Mol. Pharmacol.**, v. 56, n. 6, p. 1317-1323, 1999.

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

HELPERICH, W. G.; DENISON, M. S. Ultraviolet photoproducts of tryptophan can act as dioxin agonists. **Mol. Pharmacol.**, v. 40, n. 5, p. 674-678, 1991.

HIRSCH, T.; SUSIN, S.A.; MARZO, I.; MARCHETTI, P.; ZAMZAMI N.; KROEMER, G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 14, n. 2, p. 141-145, 1998.

HORTON, T. M; JENKINS, G.; PATI, D.; ZHANG, L.; DOLAN, M.E.; RIBES-ZAMORA A.; BERTUCH, A. A.; BLANEY, S. M.; DELANEY, S. L.; HEGDE, M.; BERG, S. L. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 potentiates the cytotoxic activity of temozolomide in leukemia cells: influence of mismatch repair status and O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity. **Mol. Cancer Ther.**, v. 8, n. 8, p. 2232-2242, 2009.

HOUTGRAAF, J. H.; VERSMISSEN, J.; VAN DER GIESSEN, W. J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovasc. Revasc. Med.**, v. 7, n. 3, p. 165-172, 2006.

HSUE S. S.; WANG W. C.; CHEN Y.; LIN L. M. Expression of inhibitors of apoptosis family protein in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal-pouch squamous-cell carcinogenesis is associated with mutant p53 accumulation and epigenetic changes. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 89, n. 5, p. 309-320, 2008.

HUANG G.; ELFERINK C. Multiple Mechanisms Are Involved in Ah Receptor-Mediated Cell Cycle Arrest. **Mol. Pharmacol.**, v. 67: p. 88-96, 2005

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

IBAÑEZ O. M.; MOUTON D.; RIBEIRO O. G.; BOUTHILLIER Y.; DE FRANCO M.; CABRERA W. H.; SIQUEIRA M.; BIOZZI G. Low antibody responsiveness is found to be associated with resistance to chemical skin tumorigenesis in several lines of Biozzi mice. **Cancer Lett.**, v. 136, n. 2, p153-158, 1999.

ITO, M.; ANAN, K.; MISAWA, M.; KAI, S; HARA, H. In vitro differentiation of murine Sca-1+Lin- cells into myeloid, B cell and T cell lineages. **Stem Cells**. v. 14, n. 4, p. 412-418, 1996.

JACK, T.; Z.; SCOTT W. L. Tumor suppressive functions of p53. **Cold Spring Harb. Perspect Biol.**, p 1-12, 2009.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 726, p. 1071-1078, 2009.

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

JANG J. Y.; SHIN S.; CHOI B. I.; PARK D.; JEON J. H.; HWANG S. Y.; KIM J. C.; KIM Y. B.; NAHM S. Antiteratogenic effects of alpha-naphthoflavone on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposed mice in utero. **Reprod. Toxicol.**, v. 24, n. 3-4, p. 303-309, 2007.

JEGGO, P. A.; LÖBRICH, M. Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. **DNA Repair.**, v. 5, n. 9-10, p. 1192-1198, 2006.

JIN D. Q.; JUNG J. W.; LEE Y. S.; KIM J. A. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits cell proliferation through arylhydrocarbon receptor-mediated G1 arrest in SK-N-SH human neuronal cells. **Neurosci. Lett.**, v. 363, n. 1, p. 69-72, 2004.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, p. 316-323, 2004.

KATZ, I.S.S. **Hematotoxicidade por xenobióticos do tipo hidrocarbonetos aromáticos em camundongos AIRmax e AIRmin.** 2007. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

KAUFMANN, S. H.; DESNOYERS, S.; OTTAVIANO, Y.; DAVIDSON, N.E.; POIRIER, G. G. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. **Cancer Res.**, v. 53, n. 17, p. 3976-3985, 1993.

KAWABATA, T. T.; WHITE, K. L. JR. Suppression of the vitro humoral immune response of mouse splenocytes by benzo(a)pyrene metabolites and inhibition of benzo(a)pyrene-induced immunosuppression by alpha-naphthoflavone. **Cancer Res.**, v. 47, n. 9, p. 2317-2322, 1987.

KAWASAKI, Y.; HIRABAYASHI, Y.; KANEKO, T.; KANNO, J.; KODAMA, Y.; MATSUSHIMA, Y.; OGAWA, Y.; SAITOH, M.; SEKITA, K.; UCHIDA, O.; UMEMURA, T.; YOON, B. I.; INOUE, T. Benzene-induced hematopoietic neoplasms including myeloid leukemia in Trp53-deficient C57BL/6 and C3H/He mice. **Toxicol. Sci.**, v. 110, n. 2, p. 293-306, 2009.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KHALADE, A.; JAAKKOLA, M. S.; PUKKALA, E.; JAAKKOLA, J. J. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Environ. Health.**, v. 28; p. 9-31, 2010.

KIM, D. W.; GAZOURIAN, L.; QUADRI, S.A.; ROMIEU-MOUREZ, R.; SHERR, D. H.; SONENSHEIN, G. E. The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. **Oncogene**, v. 19, p. 5498–5506, 2000.

KNAAPEN, A. M.; CURFS, D. M.; PACHEN, D. M.; GOTTSCHALK, R. W.; DE WINTHER, M. P.; DAEMEN, M. J.; VAN SCHOOTEN, F. J. The environmental carcinogen benzo[a]pyrene induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in vascular tissue: a possible role in atherogenesis. **Mutat. Res.**, v. 621, n. 1-2, p. 31-41 2007.

KOLLURI S. K.; WEISS C.; KOFF A.; GOTTLICHER M. P27 (Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. **Genes Dev.**, v. 13, n. 13, p. 1742-1753, 1999.

KUSHNAREVA, Y.; NEWMAYER, D. D. Bioenergetics and cell death. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1201, p. 50-57, 2010.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t 4. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970

LAI, Z. W.; PINEAU, T.; ESSES, C. Identificatin of dioxin-responsive elements (DREs) in the 5`regions of putative dioxin-inducible genes. **Chem. Biol. Interact.**, v. 200, n. 2, p. 97-112, 1996.

LEE J. A.; HWANG J. A.; SUNGA H. N.; JEON C. H.; GILL B. C.; YOUN H. J.; PARK J. H. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates functional differentiation of mouse bone marrow-derived dendritic cells Downregulation of RelB by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Toxicol. Lett.**, v. 173, p. 31–40, 2007.

LEPPARD, J. B.; DONG, Z.; MACKEY, Z. B.; TOMKINSON, A. E. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. **Mol. Cell Biol.**, v. 23, n. 16, p. 5919-5927, 2003.

LÉVESQUE, J. P.; HENDY, J.; WINKLER, I. G.; TAKAMATSU, Y.; SIMMONS, P. J. Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells. **Exp. Hematol.**, v. 31, n. 2, p. 109-117, 2003.

LIVAK, K. L.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-2DDCT</sup>. **Method**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOTEM, J.; SACHS, L.. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. **Leukemia**. v. 10, n. 6, p. 925-931, 1996.

LUSTER, M. I.; ROSENTHAL, G. J. Chemical agents and the immune response. **Environ. Health Perspect.**, v. 100, p. 219-226, 1993.

MARCUS, R. S.; HOLSAPPLE, M. P.; KAMINSKI, N. E. Lipopolysaccharide activation of murine splenocytes and splenic B cells increased the expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 287, n. 3, p. 1113-1118, 1998.

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

MARIA, D.A.; RIBEIRO, O. G., PIZZOCARO, K.; DE FRANCO, M., CABRERA, W. K., STAROBINAS, N.; GALLOIS, V.; SIQUEIRA, M.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M. Resistance to melanoma metastases in mice selected for high acute inflammatory response. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 337- 342, 2001.

MARLOWE, J. L.; PUGA, A. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. **J. Cell Biochem.**, v. 96, n. 6, p. 1174-1184, 2005.

MARNETT, L. J; PLASTARAS, J. P. Endogenous DNA damage and mutation. **Trends Genet.**, v. 17, n. 4, p. 214-221, 2001.

MARTÍN-CABALLERO, J.; FLORES, J. M.; GARCÍA-PALENCIA, P.; SERRANO, M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. **Cancer Res.**, v. 61, n. 16, p. 6234-6238, 2001.

MARTIN-OLIVA, D.; AGUILAR-QUESADA, R.; O'VALLE, F.; MUÑOZ-GÁMEZ, J. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, R.; GARCÍA DEL MORAL, R.; RUIZ DE ALMODÓVAR, J. M.; VILLUENDAS, R.; PIRIS, M. A.; OLIVER, F. J. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 66, n.11, 5744-5756, 2006.

MASUTANI, M.; NAKAGAMA, H.; SUGIMURA T. Poly(ADP-ribosyl)ation in relation to cancer and autoimmune disease. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 62, n. 7-8, p. 769-783, 2005.

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

MERCHANT M.; ARELLANO L.; SAFE S. The mechanism of action of a-naphthoflavone as an inhibitor of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced CYP1A1 gene expression. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 281, :84-89, 1990.

METCALF D.; JOHNSON G. R. Production by spleen and lymph node cells of conditioned medium with erythroid and other hemopoietic colony-stimulating activity. **J. Cell Physiol.**, v. 96, n. 1, p. 31-42, 1978.

MEYER-FICCA, M. L; MEYER, R. G; JACOBSON, E. L; JACOBSON, M. K. Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 37, n. 5, p. 920-926, 2005.

MORGAN D. L.; MAHLER J. F.; WILSON R. E.; MOORMAN M. P.; PRICE H. C. JR.; PATRICK K. R.; RICHARDS J. H.; O'CONNOR R. W. Effects of various pretreatments on the hepatotoxicity of inhaled styrene in the B6C3F1 mouse. **Xenobiotica.**, v. 27, n. 4, p. 401-411, 1997.

MÜSCHEN, M.; RAJEWSKY, K.; KRÖNKE, M.; KÜPPERS, R. The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma. **Trends Immunol.**, v. 23, n. 2, p. 75-80, 2002.

MURANTE, F. G; GASIEWICZ, T. A. Hemopoietic progenitor cells are sensitive targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J mice. **Toxicol. Sci.**, v. 54, n. 2, p. 374-383, 2000.

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

NEBERT, D. W; BROWN, D. D; TOWNE, D. W; EISEN, H. J. Association of fertility, fitness and longevity with the murine Ah locus among (C57BL/6N) (C3H/HeN) recombinant inbred strains. **Biol. Reprod.**, v. 30, p. 363-373, 1984.

NIMER, S. D. MDS: a stem cell disorder--but what exactly is wrong with the primitive hematopoietic cells in this disease? **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, p. 43-51, 2008.

OLIVER F. J.; DE LA RUBIA G.; ROLLI V.; RUIZ-RUIZ M. C.; DE MURCIA G.; MURCIA J. M. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 50, p. :33533-33539, 1998.

PAGE, T. J.; MACWILLIAMS, P. S.; SURESH, M.; JEFCOATE, C. R.; CZUPRYNSKI, C. J. 7-12 Dimethylbenz[a]anthracene-induced bone marrow hypocellularity is dependent on signaling through both the TNFR and PKR. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 198, n. 1, p. 21-28, 2004.

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

PAGE, T. J.; O'BRIEN, S.; JEFCOATE, C. R.; CZUPRYNSKI, C. J. 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene induces apoptosis in murine pre-B cells through a caspase-8-dependent pathway. **Mol. Pharmacol.**, v. 62, n. 2, p. 313-319, 2002.

PAGES, V.; FUCHS, R. P. How DNA lesions are turned into mutations within cells? **Oncogene**, v. 21, p. .8957-8966, 2002.

PARENT-MASSIN D. Relevance of clonogenic assays in hematotoxicology. **Cell. Biol. Toxicol.**, v. 17, n. 2, p. :87-94, 2001.

PARK S. Y.; PHARK S.; LEE M.; LIM J. Y.; SUL D. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of placental extracts in benzo[a]pyrene-exposed rats. **Placenta**, 2010. In press.

PASSEGUE, E.; JAMIESON, C. H. M.; AILLES, L. E.; WEISSMAN, I. L. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 11842-11849, 2003.

PERDEW, G. H.; BABBS, C. F. Production of Ah receptor ligands in rat fecal suspensions containing tryptophan or indole-3-carbinol. **Nutr. Cancer.**, v. 16, n. 3-4, p. 209-218, 1991.

PETERS, J. M.; WILEY, L. M. Evidence that murine preimplantation embryos express aryl hydrocarbon receptor. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 134, n. 2, p. 214-221, 1995.

PETERS L. C.; JENSEN J. R.; BORREGO A.; CABRERA W. H.; BAKER N.; STAROBINAS N.; RIBEIRO O. G.; IBAÑEZ O. M.; DE FRANCO M. Slc11a1 (formerly NRAMP1) gene modulates both acute inflammatory reactions and pristane-induced arthritis in mice. **Genes Immun.**, v. 8, n. 1, p. 51-56, 2007.

PETERSON, H. P.; FELDGES, A.; VON WANGENHEIM, K. H.; FEINENDEGEN, L. E. Preleukemic proliferative changes in murine bone marrow after single and multiple 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-applications. **Leuk. Res.**, v. 17, n. 1, p. 43-49, 2003.

PIEPER, A. A.; VERMA, A.; ZHANG, J.; SNYDER, S. H. Poly(ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, p 171-181, 1999.

PUGA A.; BARNES S. J.; DALTON T. P.; CHANG C.; KNUDSEN E. S.; MAIER M. A.. Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. **J. Biol. Chem.** v. 275, n. 4, p. 2943-2950, 2000.

QUINTANA, F. J; BASSO, A. S.; IGLESIAS, A. H.; KORN, T; FAREZ, M. F; BETTELLI, E.; CACCAMO, M.; OUKKA, M.; WEINER, H. L. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 453, n.7191, p. 65-71, 2008.

RIBEIRO FILHO, O. G. **Controle genético da inflamação**, 1994. 101 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1994.

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

RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; MASSA, S.; DI PACE, R. F.; DE SOUZA, V. R. C.; STAROBINAS, N.; SEMEN, M.; IBAÑEZ, O. M. Genetic selection for high acute inflammatory response confers resistance to lung carcinogenesis in the mouse. **Exp. Lung Res.**, v. 31, p. 105-116, 2005.

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol. Med.** v. 12, n. 9, p. 440-450, 2006.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços do sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. **Mem. Isnt. Butantan**, v. 20, p. 315-28, 1947.

RUNDLE, A.; TANG, D.; HIBSHOOSH, H.; ESTABROOK, A.; SCHNABEL, F.; CAO, W.; GRUMET, S.; PERERA, F. P. The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1281-1289, 2000.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L.A.; UNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 39-85, 2004.

SCHALDACH, C .M.; RIBY, J.; BJELDANES, L. F. Lipoxin A(4): A new class of ligand for the Ah receptor. **Biochemistry**, v. 38, n. 23, p. 7594-7600, 1999.

SCHMIDT, J. V.; CARVER, L. A.; BRADFIELD, C. A. Molecular characterization of the murine Ahr gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 22203-22209, 1993.

SEIDEL, S. D.; WINTERS, G. M.; ROGERS, W. J.; ZICCARDI, M. H.; LI, V.; KESER, B.; DENISON MS. Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 15, n. 4, p.187-196, 2001.

SHALL, S.; DE MURCIA, G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? **Mutat. Res.**, v. 460, n. 1, p. 1-15, 2000.

SHIROMIZU K.; MATTISON D. R. Murine oocyte destruction following intraovarian treatment with 3-methylcholanthrene or 7,12-dimethylbenz(a)anthracene: protection by alpha-naphthoflavone. **Teratog. Carcinog. Mutagen.**, v. 5, n. 6, p. 463-472, 1985.

SIMBULAN-ROSENTHAL, C. M.; ROSENTHAL, D. S.; LYER, S.; BOULARES, H.; SMULSON, M. E. Involvement of PARP and poly(ADP-ribosyl) ation in the early stages of apoptosis and DNA replication. **Mol. Cell Biochem.**, v. 193, p. 137-148, 1999.

SINGH, K.; CASADO, F. L.; OPANASHUK, L. A.; GASIEWICZ, T. A. The aryl hydrocarbon receptor has a normal function in the regulation of hematopoietic and other stem/progenitor cell populations. **Biochem. Pharmacol.**, v. 77, n. 4, p. 577-587, 2009a.

SINGH, K. P.; WYMAN, A.; CASADO, F. L.; GARRETT, R. W.; GASIEWICZ, T. A. Treatment of mice with the Ah receptor agonist and human carcinogen dioxin results in altered numbers and function of hematopoietic stem cells. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 1, p. 11-9, 2009b.

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

STEVENS, E. A.; MEZRICH, J. D.; BRADFIELD, C. A. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. **Immunology**, v. 127, n. 3, p. :299-311, 2009.

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

SURATT, B. T.; YOUNG, S. K.; LIEBER, J.; NICK, J. A.; HENSON, P. M.; WORTHEN G. S. Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 281, p. 913-921, 2001.

SZABÓ, C.; VIRÁG, L.; CUZZOCREA, S.; SCOTT, G.S.; HAKE, P.; O'CONNOR, M. P.; ZINGARELLI, B.; SALZMAN, A.; KUN, E. Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose) synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 95, n. 7, p. 3867-3872, 1998.

TAKAMURA, T.; HARAMA, D.; MATSUOKA, S.; SHIMOKAWA, N.; NAKAMURA, Y.; OKUMURA, K, OGAWA, H.; KITAMURA, M.; NAKAO, A. Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway may ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. **Immunol. Cell Biol.**, v. 88, n. 6, p. 685-689, 2010.

TENTORI, L.; PORTARENA, I.; VERNOLE, P. Effects of single or split exposure of leukemic cells to temozolomide, combined with poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on cell growth, chromosomal aberrations and base excision repair components. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 47, p. 361–369, 2001.

THATCHER, T. H.; MAGGIRWAR, S. B.; BAGLOLE, C. J.; LAKATOS, H. F.; GASIEWICZ, T. A.; PHIPPS, R. P.; SIME, P. J. Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice develop heightened inflammatory responses to cigarette smoke and endotoxin associated with rapid loss of the nuclear factor-kappaB component RelB. **Am. J. Pathol.**, v. 170, n. 3, p. 855-864, 2007.

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

THOMSEN J. S.; KEITZ S.; STROM A.; GUSTAFSSON J. A.; HES-1.a novel target gene for the aryl hydrocarbon receptor. **Mol. Pharmacol.**, v. 65, p. 165–171, 2004.

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



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

TICE R. R.; AGURELL E.; ANDERSON D.; BURLINSON B.; HARTMANN A.; KOBAYASHI H.; MIYAMAE Y.; ROJAS E.; RYU J. C.; SASAKI Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TROMBINO, A. F.; NEAR, R. I.; MATULKA, R. A.; YANG, S.; HAFER, L. J.; TOSELLI, P. A.; KIM, D. W.; ROGERS, A. E.; SONENSHEIN, G. E.; SHERR, D. H. Expression of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor (AhR) and AhR-regulated CYP1 gene transcripts in a rat model of mammary tumorigenesis. **Breast Cancer Res. Treat.** v. 63, n. 2, p.117-131, 2000.

TRUCCO, C.; OLIVER, F. J.; DE MURCIA, G.; MENISSIER DE MURCIA, J. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. **Nucleic Acids Res.**, v. 26, p. 2644-2649, 1998.

UEDA, Y.; KONDO, M.; KELSOE, G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. **J. Exp. Med.**, v. 201, n. 11, p. 1771-1780, 2005.

VAN DEN HEUVEL S. Cell-cycle regulation. **WormBook.**, v. 21, p. 1-16, 2005.

VASQUEZ-BRAVO, YANIRA DE LOS ANGELES . **Aspectos da resposta inflamatória aguda em linhagens de camundongos com reatividade máxima e mínima obtidas por seleção genética bidirecional.** 1996. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

VAZIRI, C.; SCHNEIDER, A.; SHERR, D. H.; FALLER, D. V. Expression of the aryl hydrocarbon receptor is regulated by serum and mitogenic growth factors in murine 3T3 fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 42, p. 25921-25927, 1996.

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

WALZOG, B.; WEINMANN, P.; JEBLONSKI, F.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K.; BOMMERT, K.; GAEHTGENS, P. A. role for beta(2) integrins (CD11/CD18) in the regulation of cytokine gene expression of polymorphonuclear neutrophils during the inflammatory response. **FASEB J.**, v. 13, p. 1855-1865, 1999.

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

- WHILHELMSSON A.; WHITELAW M. L.; GUSTAFSSON J. A.; POELLINGER L. Agonistic and antagonistic effects of  $\beta$ -naphthoflavone of dioxin receptor function. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 19028–19033, 1994.
- WU, Y.; BARNABAS, N.; RUSSO, I. H.; YANG, X.; RUSSO, J. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in chromosomes 9 and 16 in human breast epithelial cells transformed by chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 5, p. 1069-1074, 1997.
- WYLLIE A. H. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. **Mol. Neurobiol.**, v. 42, n. 1, p. 4-9, 2010.
- YAMAGUCHI, K.; MATULKA, R. A.; SHNEIDER, A. M.; TOSELLI, P.; TROMBINO, A. F.; YANG, S.; HAFFER, L. J.; MANN, K. K.; TAO, X. J.; TILLY, J. L.; NEAR, R. I.; SHERR, D. H. Induction of PreB cell apoptosis by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in long-term primary murine bone marrow cultures. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 147, n. 2, p. 190-203, 1997.
- YOON, B.; HIRABAYASHI, Y.; KAWASAKI, Y.; KODAMA, Y.; KANNEKO, T.; KANNO, J.; KIM, D.Y.; FUJII-KURIYAMA, Y.; INOUE, T. Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity. **Toxicol. Sci.**, v. 70, p. 150-156, 2002.
- YOON, B. I.; LI, G. X.; KITADA, K.; KAWASAKI, Y.; IGARASHI, K.; KODAMA, Y.; INOUE, T.; KOBAYASHI, K.; KANNO, J.; KIM, D. Y.; INOUE, T.; HIRABAYASHI, Y. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. **Environ. Health. Perspect.**, v. 111, n. 11, p. 1411-1420, 2003.
- YOUNG, N. S. Acquired aplastic anemia. **Ann. Intern. Med.**, v. 136, n. 7, p. 534-46, 2002.
- ZANICHELLI, F.; CAPASSO, S.; CIPOLLARO, M.; PAGNOTTA, E.; CARTENI, M.; CASALE, F.; IORI, R.; GALDERISI, U.; Hematopoiese, fatores de crescimento e aplicação clínica da eritropoetina na anemia da prematuridade. **Pediatria**, v. 17, n. 3, p. 124-142, 1995.
- ZHOU, J.; AHN, J.; WILSON, S. H.; PRIVES, C. A role for p53 in base excision repair. **EMBO J.**, v. 20, n. 4, p. 914-923, 2001.
- ZHU, J.; HEYWORTH, C. M.; GLASOW, A.; HUANG, Q. H.; PETRIE, K.; LANOTTE, M.; BENOIT, G.; GALLAGHER, R.; WAXMAN, S.; ENVER, T.; ZELEN, A. Lineage restriction of the *RAR $\alpha$*  gene expression in myeloid differentiation. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2563-2567, 2001.