



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA**

**ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE
IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA EM
PRIMATAS NÃO HUMANOS.**

**CARLA ELVIRA ARAÚJO DA SILVA
MARIA FERNANDA VITA LAMARÃO**

**BELÉM
2009**

CARLA ELVIRA ARAÚJO DA SILVA
MARIA FERNANDA VITA LAMARÃO

**ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE
IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA EM PRIMATAS NÃO
HUMANOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para obtenção do
grau em Medicina pela
Universidade Federal do Pará.
Orientador: Prof. Dr. Paulo
Pimentel de Assumpção.

BELÉM
2009

CARLA ELVIRA ARAÚJO DA SILVA
MARIA FERNANDA VITA LAMARÃO

**ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE
IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA EM PRIMATAS NÃO
HUMANOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do
grau em Medicina pela Universidade Federal do Pará.

Banca Examinadora:

Orientador

Nome / Instituição

Nome / Instituição

Aprovado em: ____/____/____

Conceito: _____

À Sandra Elvira, minha mãe,
pessoa íntegra e verdadeiro exemplo
de caráter, a quem devo minha vida, minha
formação moral e todas as minhas conquistas,
dedico este trabalho de conclusão de curso.

Carla Elvira Araújo da Silva

Aos meus pais, Fernando e Ana Maria, pelo infinito amor que sempre me deram, por compreenderem a necessidade de minha ausência durante a execução deste projeto e por vibrarem junto comigo com cada conquista, cada avanço deste estudo como se fosse uma vitória deles próprios. Vocês são o meu porto seguro!

Aos meus irmãos, Luciana e Luiz Paulo, pelo carinho, amizade e exemplo de superação e sucesso como resultado de perseverança e profunda dedicação a um propósito maior.

Ao Miranda, meu namorado, grande amigo e incentivador, que sempre acreditou no meu potencial e me deu força e incentivo nos momentos mais difíceis ao longo deste trabalho; foi com quem pude compartilhar minhas angústias e frustrações, mas também todo o êxtase e a indescritível satisfação com a conclusão deste estudo.

Ao meu sobrinho e afilhado João Paulo, alegria da minha vida, tão pequenino e ao mesmo tempo tão importante, sempre conseguindo me fazer sorrir não importa quão exausta eu chegue em casa ao final do dia.

Por fim, e não menos importante, às amigas Carla Elvira, Julianne Lima e Amanda Gomes por sonharam e acreditaram neste projeto junto comigo.

Maria Fernanda Vita Lamarão

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Paulo Pimentel de Assumpção pelos valiosos ensinamentos, orientação e inestimável dedicação à pesquisa, permitindo transformar em realidade o sonho antigo que era a execução deste projeto.

Ao Professor Doutor Rommel Mário Rodriguez Burbano. Sua orientação, seu constante apoio e amor pela pesquisa foram imprescindíveis para concretizar este estudo.

Ao Laboratório de Citogenética Humana da UFPA e aos seus estagiários, pelo auxílio nos experimentos e pela disponibilização do espaço e de todo o aparato necessário para realizar os testes e análises laboratoriais.

Ao Centro Nacional de Primatas (CENP) do Ministério da Saúde, em especial ao Doutor José Augusto Carneiro Muniz, médico veterinário, por acreditar e confiar na nossa proposta de trabalho e ceder toda a estrutura disponível para a realização da mesma. Além da equipe de cuidadores dos primatas.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: Modelos experimentais de imunossupressão há anos vêm sendo estabelecidos com intuito de viabilizar o desenvolvimento de técnicas de mensuração da resposta imune, permitir a avaliação de novas substâncias voltadas ao combate à imunossupressão e o estudo de condições patológicas potencializadas pela depressão do sistema imune como o câncer. Constituem-se em subsídio essencial para variados trabalhos científicos, como os que envolvem a carcinogênese experimental. **Objetivo:** Estabelecer modelo experimental de imunodepressão com Ciclofosfamida em primatas não humanos (espécie *Cebus apella*) e avaliar a genotoxicidade induzida pela referida droga naqueles animais. **Metodologia:** Foram duas etapas: Na primeira fase, no dia zero, foram coletadas amostras de sangue de quatro macacos sadios para análises bioquímicas e hematológicas, as quais serviram como controle negativo para este estudo. Em seguida foram administradas doses únicas de 50mg/kg de Ciclofosfamida, via intravenosa, em cada um dos quatro animais. Posteriormente, foram realizados diariamente leucogramas para determinar o período de recuperação da função imune e, assim, injetar uma novamente a mesma dose iniciando a segunda fase. A fim de se avaliar uma possível indução de genotoxicidade pela Ciclofosfamida foi realizado o Teste do Micronúcleo. **Resultados:** A primeira fase teve duração de vinte dias a partir do dia zero. Entre o quarto e o décimo dia após a injeção de Ciclofosfamida, o número de leucócitos teve seu menor valor ($6,66 \pm 1,40$). Não houve morte por intoxicação nesta fase. Na segunda fase do experimento foi administrada Ciclofosfamida vinte dias após a primeira injeção. Passados dois dias dessa segunda aplicação do imunossupressor os primatas apresentaram os menores valores na contagem de leucócitos ($3,80 \pm 1,44$), a qual permaneceu estável por dezenove dias. Nesse período dois primatas morreram por intoxicação. A média de Micronúcleos/1000 células apresentou um aumento significativo nos linfócitos dos *Cebus apella* após o tratamento ($P < 0.05$). Houve um ligeiro aumento da frequência de Micronúcleos da segunda administração de Ciclofosfamida em relação à primeira, porém este não foi significativo. A maioria dos linfócitos apresentou apenas um Micronúcleo por célula binucleada. **Conclusão:** Embora a imunodepressão estabelecida na 2ª fase do experimento tenha iniciado em período inferior e se sustentado por mais tempo quando comparada à imunossupressão estabelecida na 1ª fase do estudo, a recuperação imune em ambas foi completa. Esse fato se deve a provável bioacumulação da Ciclofosfamida. Como consequência do efeito citotóxico dessa droga dois dos quatro primatas que iniciaram o experimento morreram. Após o tratamento

com Ciclofosfamida os linfócitos do sangue periférico dos animais apresentaram um aumento significativo da média de Micronúcleos/1000 células em relação aos linfócitos controle. O sistema de reparo celular dos *Cebus apella* foi capaz de reparar e/ou eliminar grande parte das células com alterações mutagênicas, visto que houve um discreto aumento da frequência de Micronúcleos, porém não significativo, quando comparamos a segunda administração do imunossupressor em relação à primeira. A concentração de Ciclofosfamida de 50mg/kg corresponde à concentração DL50 da droga, visto que 50% desses animais morreram durante o experimento. Até o desenvolvimento desta proposta esse dado era desconhecido na literatura.

PALAVRAS CHAVE: Ciclofosfamida, Imunossupressão e *Cebus apella*.

ABSTRACT

Introduction: Immunosuppressant experimental models have been being established for a few years allowing the development of immune response measurement techniques, the evaluation of new drugs which fights against immune depression and also the study of pathological conditions that are potentialized by immune depression, such as cancer. These are essential tools that allow many future researches, mainly those which involve experimental carcinogenesis. **Objective:** Establishment of an immunosuppressant experimental model with Cyclophosphamide in non human primates (*Cebus apella* specie) and evaluate the genotoxicity induced by that drug. **Methodology:** There were two fases: in the first one, on day zero, blood samples were collected from four healthy monkeys for biochemistry and hematological analysis, which were the negative control of this study. Next, it was injected a single dose of Cyclophosphamide (50mg/kg), e.v., in each animal. There were performed frequent leucograms to determine the period of immune function recovery and then, to inject the second and same dose of Cyclophosphamide, beginning the second fase. To determine the possible genotoxicity induced by Cyclophosphamide in the DNA of those monkeys the Micronuclei Test was performed. **Results:** The first fase lasted 20 days, from day zero. Between the fourth and the tenth day after the Cyclophosphamide injection the leucocytes levels were lower ($6,66 \pm 1,40$). There was no death caused by intoxication. In the second fase it was injected another dose of Cyclophosphamide passed twenty days from the first one. Two days after that, the leucocytes levels were the lowest ones ($3,80 \pm 1,44$) and this condition remained with no alteration during the next nineteen days. Along this time two monkeys died for intoxication. The *Cebus apella*'s lymphocytes presented a significant increase in the relation Micronuclei/1000 cells after treatment ($P < 0.05$), however the Micronuclei frequency in the second injection of Cyclophosphamide wasn't significant. The majority of lymphocytes showed only one Micronucleus per double nucleated cell. **Conclusion:** Even the beginning of the immunosuppressant status established in the second phase has begun earlier than in the first phase and lasted longer, both immune recovery were complete. As a consequence of the cytotoxic effect of Cyclophosphamide two monkeys from those four of the beginning of this study died. After the treatment the primate's peripheral blood lymphocytes presented a significant increase in the relation Micronuclei/1000 cells comparing this relation with the control cells. The *Cebus apella*'s cellular repair system was able to fix and/or eliminate part of the genetic damaged cells,

based on the fact that a discreet enhance of the Micronuclei frequency occurred when comparing the second injection of the drug with the first one. The 50mg/kg Cyclophosphamide dose corresponds to the DL50 concentration, considering that 50% of the animals died during this experiment. Until the development of this proposal, that data was unknown in the literature.

KEY-WORDS: Cyclophosphamide, Immunosupression and *Cebus apella*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVO GERAL	13
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3 MATERIAL E MÉTODO	18
3.1 TIPO DE PESQUISA	18
3.2 LOCAL DE ESTUDO	18
3.3 ANIMAIS	19
3.4 ASPECTOS ÉTICOS	19
3.5 AMOSTRAS DE SANGUE DOS ANIMAIS	19
3.6 DOSE DE CICLOFOSFAMIDA	19
3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	20
3.8 AVALIAÇÃO DAS FUNÇÕES DA IMUNIDADE: MONITORIZAÇÃO ANTES, DURANTE E APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE CICLOFOSFAMIDA	20
3.9 IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA	21
3.10 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS DA CICLOFOSFAMIDA	22
3.10.1 TÉCNICA DE CULTURA TEMPORÁRIA DE LINFÓCITOS	22
3.10.2 TESTE DO MICRONÚCLEO	22
3.10.3 ANÁLISE DO TESTE DO MICRONÚCLEO	23
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4 RESULTADOS	24
4.1 IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA	24
4.2 EFEITOS MUTAGÊNICOS DA CICLOFOSFAMIDA – ANÁLISE DO MICRONÚCLEO	27
5 DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICES	40
ANEXOS	42

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunitário consiste em um inteligente e complexo conjunto de respostas ou defesas do organismo multicelular aos mais variados agentes agressores, sejam eles vírus, bactérias, fungos, parasitas, substâncias tóxicas, neoplasias ou até mesmo medicações cujo objetivo primordial era sua ação terapêutica. É um sistema bastante singular e dividido em dois grupos com mecanismos de ação distintos, porém bastante interativos que são: o mecanismo inato ou natural e o adaptativo ou específico (PRADO, 2007).

O primeiro, inclui mecanismos de defesa inespecíficos, não necessitando exposição prévia e tem como principais componentes as barreiras física e química da pele, proteínas do sistema de complemento, lisozima, lactoferrina, oligossacarídeos e células fagocitárias. O segundo, é estimulado pela exposição aos antígenos, diferenciando-se a cada nova exposição ao agente em questão. Compreende um sistema mediado pelos linfócitos T, representando a imunidade celular, e linfócitos B que respondem pela imunidade humoral (PRADO, 2007).

É importante salientar que este complexo mecanismo também possui falhas as quais repercutem diretamente na qualidade de vida dos indivíduos acometidos. As doenças autoimunes, as leucemias, alergias e imunodeficiências são um exemplo do impacto que essas imperfeições do sistema imunitário podem acarretar à saúde de uma população. Em algumas doenças malignas, como o câncer, a depressão das funções da imunidade ganham especial destaque por seu efeito potencializador. Pacientes portadores de doenças neoplásicas e infiltrativas possuem uma série de defeitos imunológicos, os quais facilitam a progressão daquela entidade (PRADO, 2007).

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

Com base nessas informações, torna-se imprescindível a obtenção de conhecimento detalhado acerca da funcionalidade e nuances do sistema imune. Por essa razão a elaboração

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

Inclusive, este trabalho consistiu em importante ferramenta da primeira etapa de um projeto maior, intitulado “Avaliação dos Efeitos do Bioproduto *Método Canova* em Modelo Experimental de Câncer Gástrico em Primatas Não Humanos”, o qual aborda, entre outros itens, o desenvolvimento experimental do câncer gástrico *in vivo* na espécie *Cebus apella*, que foi viabilizado pela supressão do sistema imunológico desses primatas.

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

Várias drogas têm sido utilizadas com o intuito de estabelecer modelos experimentais de supressão imunológica em diversas espécies de animais, entre essas a Ciclofosfamida (CY). Essa substância consiste em um agente alquilante comumente empregado na quimioterapia de pacientes com câncer (CENCI et al, 1998; CHILLER et al, 2002; MEHRAD et al, 2002; MONGA, 1983; SELVAKUMAR et al, 2006; SMITH, 1994) e provoca diminuição na celularidade e peso de órgãos linfóides (BIN-HAFEEZ et al, 2001), age em células com alto índice mitótico e demonstra propriedades inibitórias sobre as respostas imunes tanto humoral quanto celular (BACH e STROM, 1986).

A CY também é um conhecido agente indutor de danos no DNA e em muitos estudos de mutagênese ela é empregada como controle positivo por induzir grande número de aberrações no material genético (ANDERSON et al, 1995).

Entretanto, os efeitos desse quimioterápico são variáveis em diferentes tipos de organismos e a literatura carece de dados que relacionem a imunossupressão por CY em primatas não humanos da Amazônia Brasileira.

Muitos estudos favorecem estas condições de supressão do sistema imunológico, a maioria destes tem como substrato de análise camundongos e outros roedores. Todavia, devido à maior proximidade filogenética com o homem, os primatas não humanos são os melhores modelos para o desenvolvimento de estudos experimentais.

Nesse contexto o presente trabalho se propôs a descrever, pela primeira vez, um modelo de imunossupressão em primatas não humanos da Amazônia brasileira, das espécies *Cebus apella*, através da ação da CY, fornecendo dados sobre a periodicidade de recuperação imunológica dos mesmos.

Tendo em vista que as mutações são freqüentemente associadas com o desenvolvimento de cânceres, o conhecimento do potencial mutagênico de substâncias químicas como a CY torna-se uma informação essencial no que se refere ao estabelecimento de risco para o homem (RIBEIRO, 2003). Assim, também monitoramos os animais tratados com CY, através da realização do teste do Micronúcleo (MN), a fim de identificar possíveis danos no material genético causados por esta droga.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um modelo experimental de imunossupressão com CY nos primatas *Cebus apella*, da Amazônia brasileira e avaliar a ação mutagênica do agente alquilante CY, sobre estes animais.

1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Estabelecer um modelo experimental de imunossupressão com CY em *Cebus apella* através da administração endovenosa daquela droga, conforme descrito posteriormente, e da freqüente análise do leucograma desses primatas para identificar o momento exato do início da depressão imune, o período de tempo em que ela se sustenta e a partir de que momento esses animais recobram sua resposta imunológica.

Avaliar os efeitos mutagênicos da CY através do teste do Micronúcleo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

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

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

As primeiras investigações científicas utilizaram primatas do velho mundo, os chamados Catarrhinos, dentre as espécies mais usadas, citam-se o *Pan troglodites* (Chimpanzés) e a *Macaca mulata* (Rhesus). Animais de grande porte e de difícil manutenção e manuseio. Nos últimos 70 anos, a comunidade científica descobriu os monos do novo continente, os Platyrrhinos. Sendo os mais utilizados o macaco-da-noite (*Aotus sp.*), o mico estrela (*Callithrix jacchus jacchus*), o macaco-prego (*Cebus apella*) e o macaco-de-cheiro

(*Saimiri sciureus*), que, pelo seu baixo custo de manutenção, alta taxa de proliferação e fácil manuseio, vem sendo largamente utilizados nas pesquisas experimentais (CASTRO, 2007; CERCOPITHECIDAE..., 2007).

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

O Brasil é o país que possui a maior diversidade de primatas do mundo. São aproximadamente 110 espécies e subespécies com potencial de experimentação. Entretanto, a legislação brasileira, corretamente, exige que somente 04 dessas espécies sirvam de modelos experimentais e que sejam utilizados apenas os animais nascidos em cativeiros regulamentados pela Lei.

Uma dessas instituições, o Centro Nacional de Primatas, do Ministério da Saúde-SVS, está abalizado para proporcionar o apoio necessário às investigações biomédicas. Instalado no município de Ananindeua-Pará, a cerca de 15 quilômetros de Belém, numa área de 25 hectares de mata primária, possui um plantel de mais de 600 animais e é detentor de estrutura clínico-cirúrgico-laboratorial de expressão nacional, recursos esses que facilitam e conferem segurança e credibilidade aos resultados alcançados nas investigações científicas desenvolvidas nessa instituição, a maior da América Latina e uma das dez maiores do mundo em criação de primatas do novo mundo (HISTÓRICO... , 2007).

Várias drogas tem sido utilizadas com o intuito de estabelecer modelos experimentais de supressão imunológica em diversas espécies de animais, todavia entre os modelos experimentais de imunossupressão descritos na literatura, o medicamento imunodepressor Ciclofosfamida tem especial destaque, tanto em trabalhos desenvolvidos em roedores quanto em primatas não humanos. Este é um agente alquilante largamente utilizado como

quimioterápico no tratamento de doenças malignas da infância e da vida adulta, como o câncer. Funciona também como uma droga supressora do sistema imune para estudos envolvendo transplante de órgãos; é usada no tratamento do lupus eritematoso sistêmico e da esclerose múltipla, além de ser administrado em outras doenças benignas (SELVAKUMAR, 2006).

É importante ratificar que os efeitos desse imunodepressor são distintos conforme os organismos nos quais ele é administrado; por essa razão é de grande relevância a geração de dados que relacionem a imunodepressão por CY na espécie *Cebus apella*, que são primatas não humanos bastante utilizados em estudos experimentais na atualidade (CASTRO, 2007).

Há trabalhos na literatura utilizando ratos Wistar machos, com aproximadamente 140g, que afirmam que a dose única de 40mg/kg de Ciclofosfamida administradas por via intraperitoneal é suficiente para provocar a supressão imunológica desses animais, observada a partir do dia seguinte da injeção daquela droga. Permitiu-se também uma avaliação precoce, segundo os autores, dos Micronúcleos (descritos mais adiante) presentes no sangue periférico daqueles animais e que foram provocados pela ação da CY (SELVAKUMAR, 2006). Não houve óbitos ao longo deste experimento, o que indica que para os animais analisados a dose pode ser a padrão.

Em um estudo de imunodepressão experimental com Ciclofosfamida em ovinos machos pesando ao redor de 35kg, foram administrados 40mg/kg da referida droga, via intravenosa, constatando-se uma linfopenia em apenas 24 horas após a aplicação do fármaco, a qual atingiu seu patamar mais baixo entre o 4º e 5º dia do experimento. Entretanto, dos 18 ovinos utilizados 40% evoluíram a óbito, sugerindo que aquela dose de CY é relativamente tóxica para a espécie em questão (GARCIA, 2003).

No estudo de Schurman et al. (2005) utilizando *Macaca fascicularis* e babuínos (*Papio sp*) foram avaliadas várias posologias para a aplicação da Ciclofosfamida (de 1 a 40mg/kg) e com diferentes vias de administração, entre elas as vias intravenosa e oral, em alguns grupos inclusive foram adicionadas substâncias mantenedoras da imunodepressão, por via subcutânea. Esperava-se potencializar o efeito da CY, porém alguns primatas dos grupos de estudo evoluíram com reações adversas, tornando imprescindível a interrupção do mesmo.

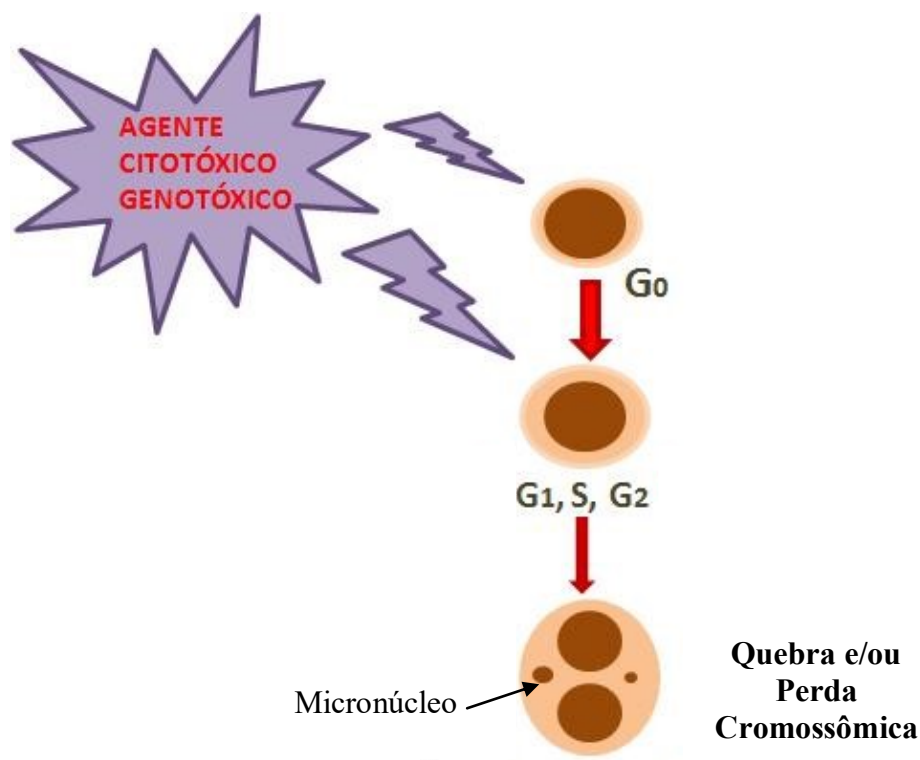
A posologia que obteve melhores resultados no que diz respeito ao início da imunossupressão e manutenção da mesma, sem ocorrência de efeitos adversos, foi a administração de 40mg/kg de Ciclofosfamida, via intravenosa, dose única. O impacto sobre a celularidade teve início entre o 3º e 5º dia após a injeção de CY, cujo nadir se manteve por um período de cinco dias (entre o 5º e 9º dia do experimento), sendo a redução do número de linfócitos o primeiro parâmetro observado, seguido pela queda nos níveis de neutrófilos. Os glóbulos brancos retornaram aos seus valores normais no 15º dia do experimento.

Sabe-se, porém, que a Ciclofosfamida é um potente indutor de alterações no DNA e dados referentes à citotoxicidade provocada por ela não podem ser ignorados. De acordo com Anderson (1995) e Selvakumar (2006), essa citotoxicidade está diretamente relacionada ao seu metabolismo e a 4-Hidroxíciclofosfamida (4-OHCY), fosforamida mustarda e a acroleína são seus maiores metabólitos alquilantes. Os principais alvos daqueles metabólitos são células em rápida divisão, perturbando dessa maneira o crescimento celular, a atividade mitótica, a diferenciação e a funcionalidade dessas células, via alquilação do DNA na posição N7 da guanina (COLVIN, 1999).

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

O teste do Micronúcleo é um dos ensaios *in vivo* mais utilizados para a detecção de agentes mutagênicos (RIBEIRO, 2003) e também para avaliar o efeito citotóxico das mais diversas drogas (HOTCHKISS et al, 2008; MARTINS e GRISOLIA, 2007), além de servir como controle positivo do efeito protetor de algumas substâncias à formação de MN induzidos por ação da Ciclofosfamida (SELVAKUMAR et al, 2006). O procedimento é realizado de acordo com Schmid et al., 1971, com modificações de Heddle, 1973.

Os Micronúcleos são estruturas que apresentam distribuição cromatínica e coloração igual (ou mais clara) a do núcleo, estando no mesmo plano que este e apresentam limites definidos e semelhantes aos nucleares (Figura 1). Seu tamanho não ultrapassa 1/3 do tamanho do núcleo (SARTO et al, 1987; TOLBERT et al, 1991 e 1992).



FONTE: Adaptado de FENECH, 2000.

Figura 1 - Desenho esquemático da formação dos Micronúcleos.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 TIPO DE PESQUISA

O presente estudo é do tipo experimental.

3.2 LOCAL DE ESTUDO

Este trabalho foi realizado nas seguintes instituições: Centro Nacional de Primatas (CENP), onde foram feitos os experimentos com os macacos e a avaliação diária dos índices

hematimétricos dos animais; e no Laboratório de Citogenética Humana da UFPA, onde foi realizado o teste do Micronúcleo.

3.3 ANIMAIS

Foram manipulados 04 macacos (*Cebus apella*) adultos (com 6 a 8 anos de idade), machos, pesando entre 2.8 kg e 3.2 kg, provenientes do Centro Nacional de Primatas (CENP), mantidos sob as condições padrões do CENP. Esses animais receberam dieta balanceada, não enriquecida com cloreto de sódio; a água foi ofertada *ad libitum*.

3.4 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo consiste na primeira fase de um projeto maior intitulado “Avaliação dos Efeitos do Bioproducto *Método Canova* em Modelo Experimental de Câncer Gástrico em Primatas Não Humanos”, o qual recebeu a devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (ANEXO A). Portanto todos os quatro primatas utilizados no presente estudo foram provenientes do referido projeto.

3.5 AMOSTRAS DE SANGUE DOS ANIMAIS

Foram coletadas diariamente amostras de sangue dos primatas *Cebus apella* a partir da veia femural esquerda desses animais.

3.6 DOSE DE CICLOFOSFAMIDA

Foi utilizada neste projeto CY, na forma de Cytosan®, ampolas contendo uma 1gr, (Bristol – Meyers Oncology, Princeton, NJ). Na imunossupressão de *Cebus apella*, 50 mg/kg de CY, diluída em solução salina, foram injetadas em dose única de infusão lenta na veia femural direita daqueles animais (SHARMA et al, 1999). Essas soluções de CY foram preparadas no dia da inoculação.

3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os *Cebus apella* com doença terminal, por intoxicação, envolvendo sofrimento, foram conduzidos à eutanásia através da administração intravenosa da associação medicamentosa de Ketaral® (Cloridrato de cetamina, 50 mg/kg), Dormonid® (Midazolam 50 mg/kg) e Methotrimeprazine ®(Levomepromazine 50 mg/kg). A eutanásia aconteceu pela dose plena desta associação. No CENP, os animais foram submetidos à eutanásia em ambiente apropriado, afastado dos outros animais que participaram deste projeto.

Este método é confiável e produz uma morte humanitária ao primata, a qual foi comprovada pelo Médico Veterinário participante do presente projeto. A metodologia atende à Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Após a eutanásia os cadáveres foram submetidos à necropsia. Amostras de órgãos e fluidos biológicos foram coletados para análises laboratoriais (testes bioquímicos no soro e teste do Micronúcleo, descrito adiante). Após estes procedimentos os cadáveres foram incinerados no CENP.

3.8 AVALIAÇÃO DAS FUNÇÕES DA IMUNIDADE: MONITORIZAÇÃO ANTES, DURANTE E APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE CICLOFOSFAMIDA

A avaliação prévia à administração de CY incluiu determinação dos padrões hematimétricos, leucocitários e de função hepática e renal dos quatro animais em estudo, cujas amostras sangüíneas foram colhidas pelo método anteriormente descrito, constituindo-se no controle negativo desta pesquisa.

Durante as fases de tratamento foi verificado o peso corporal e amostras de sangue periférico dos macacos foram coletadas em intervalos regulares, sendo a primeira coleta realizada antes da administração de CY e as demais diariamente, após a administração das duas doses de CY, para testes de laboratório que incluíram bioquímica do soro, hematologia e exposição à CY.

As análises químicas de rotina incluíram glicose, uréia nitrogenada, creatinina, proteína total, albumina, globulina, bilirrubina total, colesterol, triglicerídeos, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gama GT, lactato desidrogenase, creatinoquinase, amilase, cálcio, fósforo inorgânico, sódio, potássio e cloro. A hematologia clínica incluiu a contagem de células sanguíneas vermelhas, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular media, hemoglobina corpuscular media, contagem de reticulócitos, contagem de plaquetas, contagem total e diferencial de células sanguíneas brancas. A metodologia e os valores de referência foram os descritos por Riviello et al., (2001).

Os animais foram monitorados minuciosamente de forma a evitar qualquer sinal de dor, desconforto, estresse ou infecção antes, durante e depois da injeção do quimioterápico. Foram avaliadas ocorrências de reações alérgicas e de toxicidade quimiorrelacionada, inclusive das possíveis aberrações cromossômicas decorrentes da ação da CY através do Teste do Micronúcleo, descrito mais adiante.

3.9 IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA

A imunossupressão foi realizada em duas fases. Para esta avaliação foram utilizados quatro primatas da espécie *Cebus apella*. Esses animais foram inspecionados diariamente e os sintomas clínicos foram registrados.

No primeiro dia do experimento (D0), foram inicialmente coletadas amostras sanguíneas dos quatro animais através da Veia Femural Esquerda, as quais consistem no controle negativo do presente estudo. Em seguida, foram administrados 50mg/kg de CY, suspensos em solução salina, via Veia Femural Direita dos referidos macacos, concluindo-se a 1ª fase do experimento (APÊNDICE A).

Durante o intervalo de administração do fármaco as funções de imunidade foram avaliadas diariamente e o período de recuperação (intervalo de tempo no qual os animais recobram sua imunidade) que foi observado para a primeira dose foi equivalente ao intervalo temporal para a administração da segunda nos quatro macacos, terminando então a fase 2 do experimento (APÊNDICE B). Foram administradas ao todo duas doses de CY.

A alteração nos parâmetros hematológicos, em particular a contagem diferencial de células sanguíneas brancas representou, no estudo de Schuurman et al (2005), o maior efeito adverso da CY observado nos parâmetros de laboratório analisados em primatas não humanos. Portanto, os dados apresentados nesta pesquisa enfocam somente este parâmetro e a avaliação dos MN, visto que as outras análises não estão relacionadas com o efeito imunossupressor da droga, além de não detectarmos diferenças significativas, nas análises químicas, entre os grupos controle e tratado com CY.

3.10 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS DA CICLOFOSFAMIDA

3.10.1 TÉCNICA DE CULTURA TEMPORÁRIA DE LINFÓCITOS

Foi submetida à cultura temporária de linfócitos parte da amostra de sangue periférico proveniente do controle negativo deste trabalho e uma parte daquela amostra obtida 24 horas após a administração de CY nos animais tratados. Essas células foram cultivadas em meio completo contendo 76,8% de meio de cultura HAM-F10 (Sigma®) suplementado com 1% de estreptomicina (0,01 mg/ml), 1% penicilina (0,005 mg/ml), 19,2% de soro bovino fetal (Cultilab®) e 2% de fitohemaglutinina (PHA), a qual provocou a desdiferenciação de linfócitos, transformando-os em blastos e induzindo-os a sucessivas mitoses.

Colocaram-se os frascos de meio de cultura na estufa de 37° C para o descongelamento e aquecimento. Agitou-se com leveza a seringa que continha o sangue para ressuspenderem-se os glóbulos brancos e em cada frasco contendo 5 ml de meio, depositou-se 20 gotas do plasma agora contendo os linfócitos. Após a homogeneização os frascos foram levados à estufa a 37°C.

3.10.2 TESTE DO MICRONÚCLEO

Passadas quarenta e quatro horas após início da cultura temporária de linfócitos adicionou-se a Citocalasina-B, na concentração de 3 µg/ml de meio, deixando agir por 24

horas antes da coleta, nesse momento transferiu-se as culturas para tubos de centrifuga realizando-se centrifugação a 1000 rpm por 5 min.

Após este procedimento, removeu-se o sobrenadante, deixando um *pellet* de 1 ml e ressuspendeu-se o conteúdo em 5 ml de solução isotônica gelada (4°C), no caso Citrato de Sódio 1%, centrifugando-se novamente a 1000 rpm por 5 minutos. Em seguida, removeu-se novamente o sobrenadante, deixando um *pellet* de 1 ml e ressuspendeu-se em 5 ml de fixador Carnoy (5 metanol : 1 ácido acético), adicionando-se gotas de formaldeído no fixador, com posterior centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos.

Após este procedimento, realizou-se mais duas lavagens com fixador Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético), deixando na ultima lavagem apenas 0,3 ml no volume final do *pellet*. A preparação das lâminas iniciou-se com uma limpeza adequada das mesmas e armazenamento em água destilada gelada. Ao final do procedimento, foram confeccionadas as lâminas e posteriormente coradas com Giemsa, a 3% por 15 minutos.

3.10.3 ANÁLISE DO TESTE DO MICRONÚCLEO

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

Apenas as estruturas com as características descritas anteriormente e que se encontravam distintamente separadas do núcleo principal foram considerados MN. A média de MN foi calculada através da somatória de todas as células dos espécimes analisados e posterior divisão deste resultado pelo número de MN encontrados. Ao total foram analisadas 2.000 células binucleadas (BN) para cada macaco.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Mann-Whitney (teste-U) foi utilizado para determinar diferenças significativas entre valores encontrados para contagem de células sanguíneas brancas e de MN. Nas análises foi estabelecido em 5% o nível de significância.

4. RESULTADOS

4.1 IMUNOSSUPRESSÃO COM CICLOFOSFAMIDA

A primeira fase teve duração de 20 dias a partir do dia zero, quando foi administrada a primeira dose de CY (50 mg/kg). Entre o quarto e o décimo dia após a inoculação de CY, observou-se a menor contagem na taxa de células sanguíneas brancas. A partir de então os animais passaram a recuperar sua imunidade, ocorrendo um aumento da celularidade nos dez últimos dias da 1ª fase (Gráfico 1).

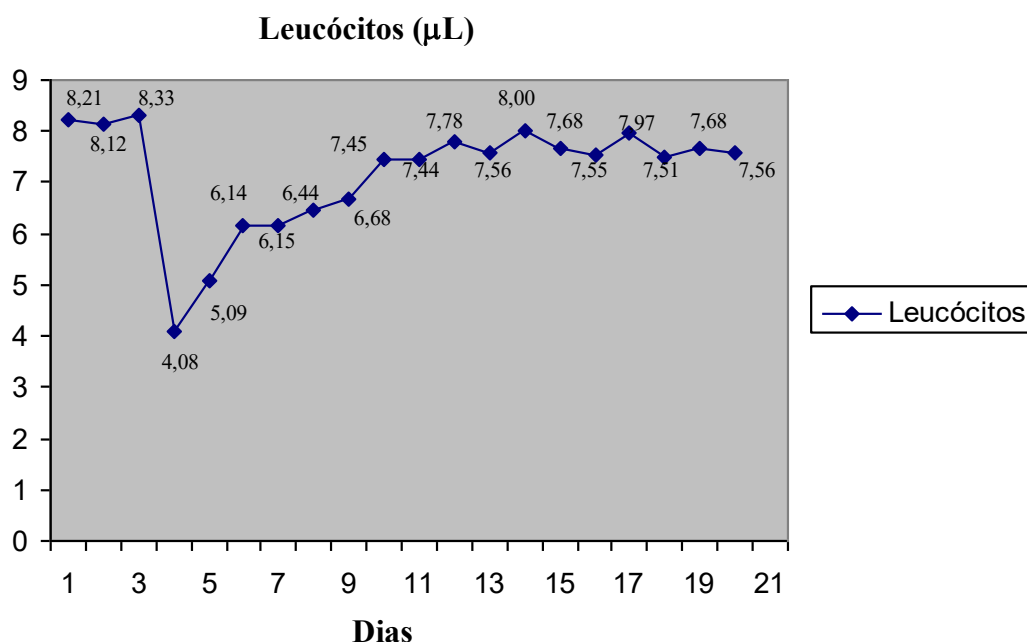


Gráfico 1 – Média de Leucócitos (μL)/dia Durante a Primeira Fase do Experimento

A série vermelha não foi significativamente afetada neste momento, apesar de ter ocorrido um declínio em sua contagem os valores dessa linhagem celular permaneceram

dentro dos padrões de normalidade. Não houve morte após intoxicação neste período, também não foi constatada variação significativa no peso corporal dos primatas.

Na segunda fase do experimento foi administrada novamente CY (50mg/kg) aos 20 dias após a primeira administração do imunossupressor, visto que neste intervalo de tempo o número de células sanguíneas brancas aumentou.

Nessa 2ª fase, no segundo dia (D2) os primatas apresentaram os menores valores na contagem de células sanguíneas brancas. Essa baixa celularidade (Tabela 1) permaneceu estável por 19 dias (Gráfico 2); e a recuperação da imunidade celular foi observada somente após o 21º dia da segunda aplicação de CY. No total, a segunda etapa deste estudo teve 21 dias de duração.

Tabela 1 - Contagem da média de células sanguíneas brancas de *Cebus apella* submetidos a tratamento com ciclofosfamida^a.

Parâmetros Hematológicos	N	Unidade	Antes do tratamento Média±DP	Primeira dose Média±DP	Segunda dose Média±DP	Teste U	LN
Leucócitos	4	10 ³ / µL	8,32±2,05	6,66±1,40	3,80±1,44	P<0.05	3.3–12.15
Linfócitos	4	%	38,70±4,98	22,13±9,33	17,79±7,87*	P<0.05	21-63
Neutrófilos	4	%	63,34±6,21	56,37±9,74	35,6±11,56*	P<0.05	41,5-79
Bas, Eos. e Mon.	4	%	Até 2%	Até 20,5%	Até 27,18%	NS	Até 12%

N= número de amostra, DP= Desvio Padrão, U= Teste Mann – Whitney, NS = Não Significante, LN= Limites de normalidade extraídos de Riviello et al. (2001) e Naves et al. (2006).

Bas= Basófilos, Eos= Eosinófilos, Mon= Monócitos.

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

*Abaixo dos parâmetros de normalidade.

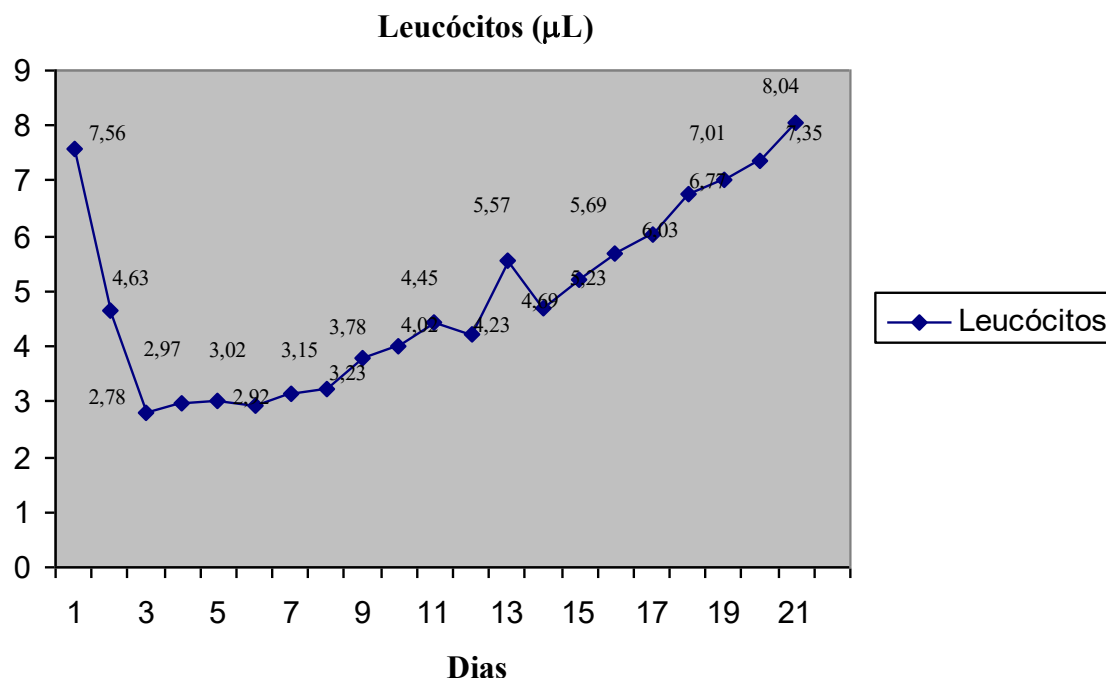


Gráfico 2 – Média de Leucócitos (μL)/dia Durante a Segunda Fase do Experimento.

Durante esse período dois primatas morreram por intoxicação; um deles foi submetido à eutanásia no 2º dia (D2) da segunda fase do experimento apresentando 6.340 leucócitos naquela data, enquanto o outro procedimento de eutanásia foi registrado no quarto dia (D4) daquela mesma etapa, nesta ocasião o primata apresentava 2.350 leucócitos. Esses dois macacos apresentaram os sintomas típicos de intoxicação: sonolência, perda de equilíbrio, tontura, falta de apetite, vômitos, diarreia, erupções cutâneas e lesões orais cáusticas ulcerosas.

Antes de morrerem os animais apresentaram hipocalemia, elevação das aminotransferases, da bilirrubina, da amilase e da creatinoquinase, além de insuficiência respiratória e renal. Os demais primatas evoluíram bem, com linfopenia e sem sintomatologia de intoxicação.

Tanto na primeira como na segunda fase deste experimento a diminuição das células sanguíneas brancas foi resultado da redução no número de linfócitos e posteriormente pela

diminuição de neutrófilos. Não foi constatada mudança significativa no peso corpóreo dos *Cebus apella*.

4.2 EFEITOS MUTAGÊNICOS DA CICLOFOSFAMIDA – ANÁLISE DO MICRONÚCLEO

O estudo consta de dois grupos distintos, um controle negativo composto pelos linfócitos dos quatro animais antes da administração de CY e o outro objeto do estudo, composto pelos linfócitos dos mesmos primatas após dois tratamentos de 50 mg/kg de CY. A média de MN/1000 células apresentou um aumento significativo nos linfócitos dos *Cebus apella* após o tratamento ($P<0.05$).

Houve um ligeiro aumento da frequência de MN da segunda administração de CY em relação à primeira, porém este não foi significativo. A maioria dos linfócitos apresentou apenas um MN por célula binucleada (Tabela 2), essas células são evidenciadas na figura 2. Foram analisadas 2000 células binucleadas para cada *Cebus apella*.

Tabela 2 – Frequência e distribuição de Micronúcleos (MN) em linfócitos binucleados (BN) dos primatas expostos.

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

^a Sangue periférico de *Cebus apella* antes da administração da CY

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

2000 células binucleadas foram analisadas/indivíduo; DP= Desvio Padrão.

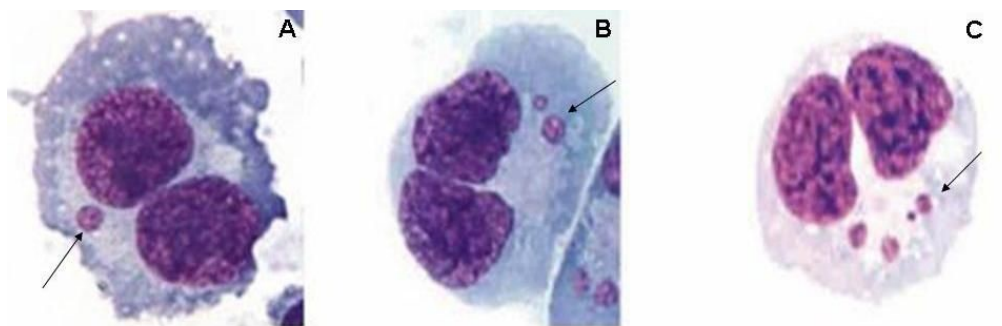


Figura 2 - Foto da formação dos Micronúcleos.

As setas indicam os Micronúcleos (MN). Na imagem **A** observa-se um MN em uma célula binucleada (BN). Em **B** apresentam-se 2 MN em um célula BN. Em **C** encontram-se 3 MN em uma célula BN.

5. DISCUSSÃO

Os experimentos que envolvem imunologia aplicada à clínica dependem primordialmente do desenvolvimento de modelos de boa reprodutibilidade. No nosso conhecimento não existem relatos da literatura utilizando esta espécie de primata não humano, *Cebus apella*, em experimentos de imunossupressão. Estudos similares ao descrito neste projeto foram realizados em babuínos e em *Macaca fascicularis*.

Entre estes estudos destaca-se o de Schuurman et al (2005). No referido experimento de imunodepressão foram inoculados 40mg/kg de CY, e.v., em dose única, ocorrendo uma diminuição significativa das células sanguíneas brancas como consequência da redução no número de linfócitos e posteriormente pela diminuição de neutrófilos. Não foi detectada alteração significativa na série vermelha e nem nos parâmetros plaquetários. Os animais em questão apresentam resultados semelhantes ao do presente trabalho para a primeira administração de CY.

Na segunda dose do imunossupressor administrado nos *Cebus apella*, os valores dos linfócitos e neutrófilos apresentaram diminuição significativa em relação à primeira inoculação da droga e o que é mais importante, somente na segunda aplicação de CY a

contagem de células sanguíneas brancas saiu do padrão de normalidade, se estabelecendo assim a imunossupressão nos animais.

Segundo análise dos dados obtidos por Naves et al (2006) o número de Basófilos, Eosinófilos e Monócitos, juntos, podem representar 13,5% e aproximadamente 12% do total de leucócitos da espécie *Cebus apella* para fêmeas e machos, respectivamente, em condições não patológicas. No presente estudo é provável que, em resposta a diminuição dos níveis de linfócitos e neutrófilos causada por ação da CY, tenha ocorrido um maior recrutamento daquelas células precursoras contrabalanceando a linfopenia e neutropenia estabelecidas em decorrência do uso do imunodepressor.

Os padrões hematológicos e químicos do sangue da espécie *Cebus apella*, em relação a sexo e idade, foram descritos por Riviello e Wirz (2001) em 36 representantes da espécie. Já Naves et al (2006) estudou especificamente as diferenças encontradas nos índices hematológicos entre machos e fêmeas. Entretanto, a pesquisa de Riviello e Wirz (2001) é a única referência da literatura que apresenta o intervalo de normalidade para o número de células sanguíneas brancas e outros parâmetros nesses primatas. Os valores encontrados nas amostras de sangue periférico que foram utilizadas como controle negativo deste trabalho, antes da aplicação da CY, não diferem dos encontrados nessa publicação.

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

Em relação à recuperação da imunidade dos *Cebus apella*, os mesmos adquiriram o padrão de normalidade no número de células brancas do sangue aos 20 dias após a primeira administração do imunossupressor e aos 21 dias após a inoculação da segunda dose de CY.

Novamente comparando nossos resultados com os de Schuurman et al, (2005) em babuínos, observa-se que a recuperação destes antropóides aconteceu mais cedo, com 15 dias. Provavelmente esta diferença ocorreu porque os babuínos receberam uma dose menor de CY (40mg/kg), independentemente de ter um peso corporal superior, de até 35 Kg.

O efeito citotóxico da CY foi observado neste estudo através da grande repercussão dessa droga sobre a celularidade dos primatas, evidenciada em especial na 2ª fase do experimento, momento no qual se identificou o maior impacto sobre a contagem de glóbulos brancos e sobre a duração deste comprometimento imunológico; assim como através de dados laboratoriais, com destaque ao Teste do Micronúcleo discutido a seguir, além da verificação dos sintomas de intoxicação apresentados por dois dos quatro primatas que iniciaram o experimento e, principalmente, pelo óbito daqueles dois animais durante a segunda fase da pesquisa.

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

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

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

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

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

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

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que o agente alquilante Ciclofosfamida pode ser utilizado em modelos experimentais de imunossupressão nos primatas não humanos da espécie *Cebus apella*, da Amazônia Brasileira, tendo em vista sua capacidade de suprimir as funções da imunidade daqueles animais. Com relação à recuperação da imunidade dos *Cebus apella* pode-se concluir que:

- a) Embora a imunodepressão estabelecida na 2ª fase do experimento tenha iniciado em período inferior (D2) e se sustentado por mais tempo (total de 19 dias) quando comparada à imunossupressão estabelecida na 1ª fase do estudo, a recuperação imune em ambas foi completa. Esse fato se deve a provável bioacumulação da CY.
- b) Como consequência do efeito citotóxico da CY, após a segunda administração de CY, dois dos quatro primatas que iniciaram o experimento, morreram por intoxicação.

Com relação às análises de genotoxicidade da CY conclui-se que:

- a) Após o tratamento com CY os linfócitos do sangue periférico dos *Cebus apella*, apresentaram um aumento significativo da media de MN/1000 células em relação aos linfócitos controle.
- b) A frequência de MN controle dos *Cebus apella* foi semelhante à frequência controle encontrada em humanos.
- c) O sistema de reparo celular dos *Cebus apella*, no intervalo entre as aplicações de CY, foi capaz de reparar e/ou eliminar grande parte das células com alterações mutagênicas, visto que um houve discreto aumento da frequência de MN, porém não significativo, quando comparamos a segunda administração do imunossupressor em relação à primeira.

d) A concentração de CY de 50mg/kg, em *Cebus apella*, corresponde à concentração DL50 da droga, visto que 50% desses animais morreram durante o experimento de imunossupressão. Até o desenvolvimento desta proposta, não se conhecia a concentração correspondente ao DL50.

Finalmente deve-se salientar que a extrapolação dos dados obtidos, em experiências com roedores, para os seres humanos é imprudente. Os resultados deste estudo apóiam a conclusão de que os primatas não humanos constituem os melhores modelos experimentais devido a sua grande proximidade evolutiva e filogenética com o ser humano. Por este motivo, são considerados animais nobres para as pesquisas científicas e os resultados provenientes de estudos que os envolvam são mais próximos e seguros quando comparados ao organismo do homem.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO HR et al. Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. **Mutat Res.** 609:43-6. 2006.

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

ANDRADE e ANTENOR (org). **Animais de Laboratório**. 1-2; 19 - 24.2002. Disponível em: <<http://www.uff.br/animaislab/ap1.doc> Acesso em 13 fev 2009.

ANGE-VAN HEUGTEN K; VERSTEGEN M; FERKET PR; STOSKOPF M; VAN HEUGTEN E. Serum chemistry concentrations of captive woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*). **Zoo Biol.** 27(3):188-99. Maio 2008.

ASSUMPCÃO P.P.; BURBANO, R.R. Genética e câncer gástrico. In: Linhares E, Laércio L, Takeshi S (editores). **Atualização em Câncer-Gástrico**. 1º ed. São Paulo: Tecmed Editora, p.95-106. 2005.

BACH; STROM. **The mode of action of immunosuppressive agents**. Elsevier, Amsterdã. 1986.

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

BONFANTI, U; LAMPARELLI, D; COLOMBO, P; BERNARDI, C .Hematology and serum chemistry parameters in juvenile cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) of Mauritius origin: comparison between purpose-bred and captured animals. **J Med Primatol**.18 fev 2009.

BRACK, M. Gastrointestinal tumors observed in nonhuman primates at the German primate center. **J Med Primatol**. v.27, n.6, p.319-24, dez. 1998.

CARNEIRO, MRG; PINTO, LFR; PAUMGARTTEN, FJR. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Cad. Saúde Pública**. 13:27-38. 1997.

CASTRO, P. Primatas como modelo experimental para vigilância em saúde, pesquisa e saúde pública. **Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**. Disponível em:

<http://comciencia.br/comciencia/handler.php?section=8&edicao=31&id=368&tipo=1>
Acesso em 15 jun 2007.

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

CERCOPITHECIDAE. Old World monkeys and baboons, including macaques, rhesus, mangabeys, mandrills, guenons, patas monkeys, langurs, proboscis monkeys, colubus, and many others. Disponível em: <<http://www.ummz.lsa.umich.edu/>>. Acesso em: 12 jun 2007.

CHEN, XT et al. Immunomodulating effects of fractioned polysaccharides isolated from Yu-Ping-Feng-Powder in cyclophosphamide-treated mice. **Am J Chin Med.** 34:631-41. 2006.

CHILLER, T. M. *et al.* Development of a murine model of cerebral aspergillosis. **J. Infect. Dis.** 186:574–577, 2002.

CHUN, Y.H. et al. Characterization of chromosomal aberrations in human gastric carcinoma cell lines using chromosome painting. **Cancer Genet Cytogenet** 119:18-25. 2000.

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

DANG CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. **Mol Cell Biol.** 19:1-11. 1999.

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

DePAOLI, A., McCLURE, HM. Gastrointestinal neoplasms in nonhuman primates: a review and report of eleven new cases. **Vet. Pathol. Suppl.**, 7: 104-125, set.1982.

EHRLICH, et al. Inhalative exposure to vanadium pentoxide causes DNA damage in workers: results of a multiple end point study. **Environ Health Perspect.** 116:1689-93. 2008.

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

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

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

GARCIA, M. et al. Uso da ciclofosfamida em modelos de imunodepressão experimental em ovinos. **Pesq. Vet. Bras.** 24(3)115-119. 2004.

GROSS, S; WALDEN, P. Immunosuppressive mechanisms in human tumors: why we still cannot cure cancer. **Immunol Lett.** v.15;116, p.7-14, fev. 2008.

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

HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutat. Res.** v.18, n.2, p.187-90, 1973.

HÉRODIN, f.; THULLIER, P.; GARIN, D.; DROUET, M. Nonhuman primates are relevant models for research in hematology, immunology and virology. **Eur. Cytokine Netw.** v. 16 n.2, p. 104-16. Jun 2005.

HISTÓRICO do Centro Nacional de Primatas – CENP. Disponível em: <http://www.mentoronline.com.br/cenp/Apres_Criacao.asp>. Acesso em: 20 mai 2007.

HOTCHKISS, CE et al. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes IV: an index of chromosomal damage in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Toxicol Sci.** 102:352-8. 2008.

INCA. **Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA 2008.

ISCN. **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.** Basel: S. Karger, 2005.

KERRICK, G.P., BROWNSTEIN, D.G. Metastatic large intestinal adenocarcinoma in two rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.**, 39:40-42, 2000.

KOGA, T; KANEFUJI, K; NAKAMA, K. Individual Reference Intervals of Hemathological and Serum Biochemical Parameters in Cynomolgus Monkeys. **Int. J. Toxicol.** 24(5):377—85. Set/Out. 2005.

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

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

LAI, M et al. Effects of electroacupuncture on tumor growth and immune function in the Walker-256 model rat. **Zhongguo Zhen Jiu**.28:607-9. 2008.

LIMA, S.R. *et al.* *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. **Phytother Res**, v. 17, n. 9, p.1048-53, nov. 2003.

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

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

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

MIAO, CH. Recent advances in immune modulation. **Curr. Gene. Ther.** v.7, n.5, p.391-402. Out. 2007.

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

MUNGANTIWAR, A.A. et al. Studies on the immunomodulatory effects of *Boerhaavia diffusa* alkaloid fraction. **Journal of Ethnopharmacology** 65, 125–131, 1999.

NAVES, E.A.; FERREIRA, F.A.; MUNDIM, A.V.;GUIMARÃES, E.C. Valores Hematológicos de Macaco Prego (*Cebus apella* – Linnaeu 1758) em Cativeiro. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 125-131, Mai/Ago. 2006

PASSOS, E.C.et al. Resposta imune humoral em macacos-pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, após a revacinação com vacina anti-rábica Fuenzalida & Palácios modificada de uso veterinário. **Braz. J. vet. Res.anim.Sci.** São Paulo, v. 39, n. 4, p. 181-188, 2002.

PRADO, CF.; RAMOS, J.; VALLE R, J.; CARVALHO, T.B. **Atualização Terapêutica** 23^a ed. Artes Médicas Ltda, p.33 – 43, 2007.

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

RAO,V.K. *et al.* The Extent of Chromosomal Aberrations Induced by Chemotherapy in Nonhuman Primates Depends of the Schedule of Administration. **Mutation Research**,583:105-119, 2005.

REDDEL, RR. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. **Carcinogenesis** 21:477-84. 2000.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E.K. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores "in vivo". **Mutagênese Ambiental**. 1ª ed. Canoas-RS, v. prelo, p. 173-198, 2003.

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

SAITO, T; NOMOTO, K; TAMADA, R; INOKUCHI, K. Effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on immune response in rats in stomach carcinogenesis. **Gann**. 67:339-45. 1976.

SANTOS et al. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro. **Biocell**. 32(2):195-200. ago, 2008.

SARTO, F et al. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis** 2:11-7. 1987.

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

SHARMA, N. et al. Protective effect of *Cassia occidentalis* extract on chemical-induced chromosomal aberrations in mice. **Drug and Chemical Toxicology**, 22, 643–653, 1999.

SCHUURMAN, HJ; SMITH, HT. Reference values for clinical chemistry and clinical hematology parameters in cynomolgus monkeys. **Xenotransplantation**.12(1):72-5. Jan 2005.

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

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

TERRELL, T.G., GRIBBLE, D.H., OSBURN, B.I. Malignant lymphoma in macaques: a clinicopathologic study of 45 cases. **J. Natl. Cancer Inst.**, 64:561-568, 1980.

THARAKAN, ST et al. Effect of AC II, an herbal formulation in cyclophosphamide-induced immunosuppression in BALB/c mice--Implication in HIV treatment. **Immunol Invest.** 36:147-57. 2007.

TOLBERT, PE; SHY, CM; ALLEN, JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **Am. J. Epidemiol.** 134:840-50. 1991.

TOLBERT, PE; SHY, CM; ALLEN, JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat. Res.** 271:69-77. 1992.

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

VLACHOYIANNOPOULOS, P.G. et al. Upregulation of antiphospholipid antibodies following cyclophosphamide therapy in patients with systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol.** 35:1768-75. 2008.

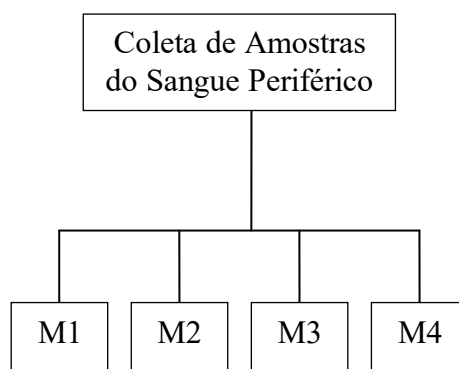
WILLIMSKY G, BLANKENSTEIN T. The adaptive immune response to sporadic cancer. **Immunol. Rev.** v.220, p.102-112, dez. 2007.

YUNIS, J.J. New chromosome techniques in the study of human neoplasia. **Hum Pathol** 12:540-9. 1981.

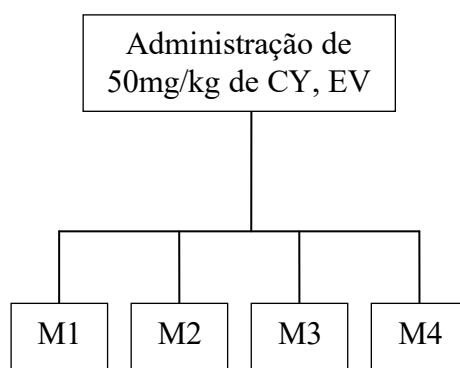
ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, GM et al. Micronucleated erythrocyte frequencies in old and new world primates: measurement of micronucleated erythrocyte frequencies in peripheral blood of *Callithrix jacchus* as a model for evaluating genotoxicity in primates. **Environmental and molecular mutagenesis** 46:253-9. 2005.

APÊNDICE A – Fase 1 do Experimento: Coleta de amostras do sangue periférico e administração de CY.

Inicialmente (D0) foram coletadas amostras do sangue periférico de quatro macacos através da Veia Femural Esquerda, tais amostras serviram como controle negativo deste estudo.



Em seguida, foram administrados 50mg/kg de CY suspensos em solução salina na Veia Femural Direita dos mesmos *Cebus apella*.



Onde;

M1 = Macaco 1

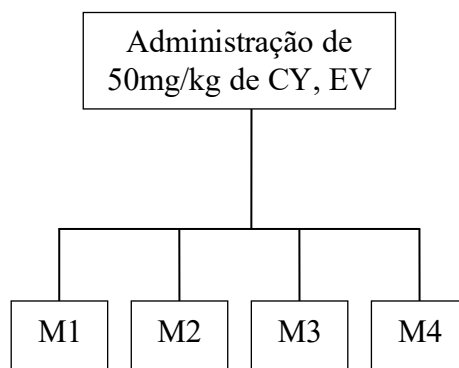
M2 = Macaco 2

M3 = Macaco 3

M4 = Macaco 4

APÊNDICE B – Fase 2 do Experimento: Administração de 2ª dose de CY.

Após a recuperação das funções da imunidade dos quatro macacos deste estudo, foram administrados novamente 50mg/kg de CY, suspensos em solução salina, na Veia Femural Direita dos referido animais, seguindo exatamente a mesma técnica e local utilizados na 1ª fase.



Onde;

M1 = Macaco 1

M2 = Macaco 2

M3 = Macaco 3

M4 = Macaco 4

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação**PARECER MED002/2007**

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

Coordenador: Rommel Mario Rodríguez Burbano

Área Temática: Medicina

Vigência: 01-01-2008 a 31-12-2009

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



Prof. Dr. Antônio Pereira
Presidente do CEPAE/UFPA