

MARIANA PERLATI SANTOS ALEIXO DE PAULA

**INFLUÊNCIA DOS ALELOS *R E S* DO GENE *Slc11a1* NA
SUSCETIBILIDADE À CARCINOGENESE DE PELE INDUZIDA POR 7,12-
DIMETILBENZANTRACENO**

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

São Paulo
2012

MARIANA PERLATI SANTOS ALEIXO DE PAULA

**INFLUÊNCIA DOS ALELOS *R* E *S* DO GENE *Slc11a1* NA
SUSCETIBILIDADE À CARCINOGENESE DE PELE INDUZIDA POR 7,12-
DIMETILBENZANTRACENO**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo De Franco

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 total

Paula, Mariana Perlati Santos Aleixo de.

Influência dos alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* na suscetibilidade à carcinogênese de pele induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno / Mariana Perlati Santos Aleixo de Paula. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo De Franco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia.

Versão do título para o inglês: Influence of *R* and *S* alleles of *Slc11a1* gene in the susceptibility to skin cancer induced by 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene.

1. Pele 2. Câncer 3. Camundongos 4. *Slc11a1* 5. Ahr 6. DMBA
I. De Franco, Prof. Dr. Marcelo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia
III. Título.

ICB/SBIB0140/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariana Perlati Santos Aleixo de Paula.

Título da Dissertação: Influência dos alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* na suscetibilidade à carcinogênese de pele induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo De Franco.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

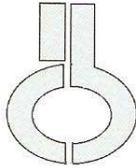
Aprovado(a)

Reprovado(a)

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 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **019** nas fls. **83** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Marcelo De Franco, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Investigação da carcinogênese cutânea em animais selecionados geneticamente para a máxima ou mínima resposta inflamatória aguda homozigotos para os alelos R e S do gene Slc11a1** do qual participou(aram) o(s) **Mariana Perlati dos Santos, Jussara Gonçalves Fernandes, Tatiane Aparecida Canhamero Gasparelo e os pesquisadores Olga Célia Martinez Ibañez, Orlando Garcia Ribeiro Filho, Nancy Starobinas, Wafa Hanna Koury Cabrera, José Ricardo Jensen**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **15.04.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de abril de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Aos amores da minha vida, Cairo e Júlia, por me tornarem a pessoa mais feliz do mundo. Pelo amor, dedicação, incentivo e pelos sorrisos que iluminam minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Marcelo De Franco, por todos os ensinamentos e pelo exemplo de ótimo profissional. Muito obrigada pelo crescimento e amadurecimento acadêmico e intelectual, alimentados pela amizade, bom humor, paciência e direcionamento.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, Dra. Olga Ibañez,, Dr. José Ricardo Jensen, Dra. Nancy Starobinas, Dr. Orlando Garcia Ribeiro, Dra. Milene De Franco, Dra. Solange Carbonare, Dra. Mônica Spadafora, Dra. Solange Massa e, em especial, à Dra. Wafa Cabrera e à amiga Dra. Andrea Borrego pelo ótimo convívio, amizade, disposição em ajudar com tudo que foi necessário e pela contribuição no meu crescimento intelectual.

Aos companheiros e grandes amigos que fiz, Aline Lavezo, Lilian Rego, Iana Katz, Priscila Lara, Jussara Fernandes, Alessandra Suppa, Priscilia Aguilar, Cristiano Rossato, Mara Correa, Camila Moreira e Thaís Narciso. Muito obrigada pelos momentos divertidos, dicas e ajuda em diversos experimentos e adversidades. Agradeço em especial Tatiane Canhamero e Layra Albuquerque, tanto pela ajuda, paciência e por tudo que me ensinaram, quanto pela amizade, conselhos e ombro amigo.

Às funcionárias do Laboratório de Imunogenética, Sandra, Tania, Andressa, Neusa e em especial a Mara, pela amizade e por toda ajuda e pelo preparo dos materiais necessários.

Aos funcionários do biotério por proporcionarem os animais necessários para o trabalho, Mari Lima, Mari Santos, Aline, Celso, Seu Juca e Ronaldo.

Às secretárias Maria Eni e Jotelma do Departamento de Imunologia do ICB IV da USP, pela orientação quanto à parte burocrática do trabalho.

Aos meus pais, Carlos e Margaret, por tornarem toda minha formação possível, pelo apoio em minhas decisões e incentivo nos momentos de insegurança. Obrigada por todo amor, confiança, orgulho e exemplo.

Aos meus irmãos Nando e Du, pela infância feliz e pelo companheirismo de sempre e à minha cunhada Paloma que, junto ao meu irmão Nando, gerou minha amada sobrinha Bella e sempre deu exemplos de como não desistir de nossos sonhos.

Aos meus amores Cairo e Júlia, por representarem meu maior motivo para seguir em frente com tudo na minha vida. Obrigada por nossa família iluminada.

*Ao restante da família, Vó Arlete, Vô Tino, Lilian, Tia Márcia, Tia Elisete, Letícia, Marília,
Vó Nira e Vô Dito por terem contribuído com a formação da pessoa que sou hoje.*

*Às minhas grandes amigas Carol e Elisandra, por contribuírem na minha formação como
pessoa e por sempre estarem por perto, independentemente da distância.*

*Obrigada a todas as demais pessoas que contribuíram de alguma forma, com boas intenções
e com orações.*

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan com apoio financeiro da **FAPESP**, sob o processo **2010/01806-0**.

*“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança
toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”
Johann Wolfgang Von Goethe*

RESUMO

PERLATI-SANTOS, M. **Influência dos alelos R e S do gene *Slc11a1* na suscetibilidade à carcinogênese de pele induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno.** 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Camundongos selecionados para máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) resposta inflamatória aguda diferem na sensibilidade à carcinogênese. Os animais AIRmin são significativamente mais sensíveis à carcinogênese de pele que os animais AIRmax devido ao seu fundo genético e um polimorfismo no gene do receptor aril hidrocarboneto (*Ahr*). Mais que isso, estas linhagens possuem um desequilíbrio de frequência dos alelos do gene *Slc11a1*. Um polimorfismo no gene *Slc11a1* (anteriormente denominado *Nramp1*) modula a atividade de macrófagos, polimorfonucleares e a suscetibilidade a infecções e doenças autoimunes. Para melhor estudar a interação dos alelos de resistência (R) ou suscetibilidade (S) do gene *Slc11a1* com os *loci* de resposta inflamatória aguda dos animais AIRmax e AIRmin, foram produzidas sublinhagens homocigotas para estes alelos. Esses camundongos foram denominados AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}. O objetivo deste estudo foi investigar a diferença de sensibilidade à carcinogênese de pele induzida por DMBA nestas sublinhagens. Para induzir a carcinogênese, 50µg de DMBA foram diluídos em 0.1mL de acetona e aplicados epicutaneamente no dorso previamente depilado dos camundongos por cinco dias consecutivos. A incidência de câncer de pele foi de 7% nos animais AIRmin^{RR} e de 13% nos animais AIRmin^{SS}, e a incidência de câncer em órgãos internos foi semelhante entre as duas sublinhagens (cerca de 57%). As sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} não apresentaram câncer de pele, mas a incidência de câncer em órgãos internos foi 100% apenas na sublinhagem AIRmax^{SS}. A análise de diversas citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas por PCR em tempo real foi realizada na pele e baço de camundongos controle e experimentais após 48 horas do término do tratamento. Todos os camundongos controle mostraram expressão basal de *Il6*, *Tnfa*, *Il1b* e *Cxcl2*. Nos camundongos AIRmin^{RR} tratados com DMBA, a expressão gênica destas citocinas na pele foi, respectivamente, 9, 19, 30 e 215 vezes maior em relação aos seus controles. Nos animais AIRmin^{SS}, a expressão gênica desses mediadores foi, respectivamente, 11, 4, 6 e 75 vezes maior em relação aos controles. Os animais AIRmin^{SS} diferem significativamente das outras sublinhagens em algumas citocinas, mas os animais AIRmin^{RR} apresentaram o maior número de genes diferencialmente expressos (p<0,001) após o tratamento com DMBA. A sublinhagem AIRmax^{SS} apresentou elevada expressão de *Ccl2* e *Cxcl2* no baço. Esses dados mostraram que os camundongos AIRmin^{RR} possuem maior suscetibilidade ao câncer de pele que os animais AIRmin^{SS} e que a sublinhagem AIRmax^{RR} foi resistente ao tratamento. Entretanto, os camundongos AIRmax^{SS} demonstraram maior suscetibilidade à carcinogênese, sugerindo que o alelo S, no fundo genético AIRmax, pode influenciar na suscetibilidade ao câncer.

Palavras-chave: Pele. Câncer. Camundongos. *Slc11a1*. *Ahr*. DMBA.

ABSTRACT

PERLATI-SANTOS, M. **Influence of R and S alleles of *Slc11a1* gene in the susceptibility to skin cancer induced by 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene.** 2012. 107 p. Masters thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Mice selected for maximal (AIRmax) or minimal (AIRmin) acute inflammatory response differ on sensibility to carcinogenesis. AIRmin mice are significantly more sensitive to skin carcinogenesis than AIRmax mice due to the genetic background and the polymorphism of aryl hydrocarbon receptor (Ahr) gene. Furthermore, these mice have an imbalance of frequency of *Slc11a1* gene alleles. The *Slc11a1* gene (formerly *Nramp1*) polymorphism modulates macrophage activity, polymorphonuclear cells and the susceptibility to infections and autoimmune diseases. To study the interaction of resistant (R) or susceptible (S) *Slc11a1* alleles with acute inflammatory reaction loci found in AIRmax and AIRmin mice, homozygous sublines for these alleles were produced. These mice were nominated AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} and AIRmin^{SS}. The objective of this study was to investigate the difference in skin carcinogenesis sensibility induced by DMBA agent in these sublines. To induce carcinogenesis, 50µg DMBA diluted on 0.1mL acetone were applied epicutaneous to the shaved dorsal skin of mice for five consecutive days. The incidence of skin cancer was 7% in AIRmin^{RR} mice and 13% in AIRmin^{SS} mice, and the incidence of internal organs cancer was similar between these sublines (about 57%). AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} mice did not show skin cancer, but the incidence of internal organs cancer was 100% only in AIRmax^{SS} mice. Gene expression analysis of several inflammatory cytokines and chemokines by Real Time PCR was detected in control and experimental mouse skins 48 hours after the last DMBA application. All the control mice had a basal expression of *Il6*, *Tnfa*, *Il1b* and *Cxcl2*. In DMBA treated AIRmin^{RR} mice, mRNA levels of these cytokines were increased 9-, 19-, 30- and 215-fold respectively. In AIRmin^{SS}, these mediators were increased 11-, 4-, 6- and 75-fold in relation to their controls. AIRmin^{SS} differ significantly from the other sublines in some cytokines, but AIRmin^{RR} presented the highest number of differentially expressed genes (P<0.001) after DMBA application. AIRmax^{SS} showed a high expression of *Ccl2* and *Cxcl2* in the spleen. These data showed higher susceptibility to skin carcinogenesis in AIRmin^{RR} than in AIRmin^{SS} mice. The AIRmax^{RR} animals were resistant to treatment. However, AIRmax^{SS} animals showed higher susceptibility, suggesting that the S allele in the AIRmax background could influence susceptible to cancer.

Keywords: Skin. Cancer. Mice. *Slc11a1*. *Ahr*. DMBA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AHR** – Receptor aril hidrocarboneto
- AhRE** – *Aryl hydrocarbon receptor response elements*
- AHRR** – Aryl hydrocarbon receptor repressor
- AIDS** – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- AIR** – Resposta inflamatória aguda
- ARA9** – *Aryl hydrocarbon receptor associated 9*
- ARNT** – *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*
- bHLH** – *Basic Helix-Loop-Helix*
- CAR-R** – *Resistant to carcinogenesis*
- CAR-S** – *Susceptible to carcinogenesis*
- cM** - CentiMorgan
- Ct** – *Cycle Threshold*
- CYP** – Citocromo da família P450
- DMBA** – 7,12-Dimetilbenzantraceno
- DMBA-DE** - 7,12-Dimetilbenzantraceno- 3,4-dihidrodiol-1,2-epóxido
- EAE** – Encefalomielite
- EMT** – *Epithelial-mesenchymal transition*
- FICZ** – *6-formylindolo[3,2-b]carbazole*
- GM-CSF** – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- GST** – Glutathione S-transferase
- HPA** – Hidrocarboneto policíclico aromático
- HPV** – Vírus do papiloma humano
- Hsp90** – *Heat shock protein 90*
- IDO** – Indoleamina 2,3-dioxigenase
- IFN** - *Interferon*
- IL** – Interleucina
- MDSC** - *Myeloid-derived suppressor cells*
- mEH** – Epóxido hidrolase microsomal
- MHC** – *Major Histocompatibility Complex*
- MIP** – *Macrophage inflammatory protein*
- MMP** – Metaloproteinase de matriz
- MPO** – Mieloperoxidase

NF- κ B – *Nuclear factor-kappa B*

Nramp – *Natural resistance associated macrophage protein*

NO – Óxido nítrico

QTL – *Quantitative Trait Loci*

PCR – *Polymerase chain reaction*

SAA – *Serum Amyloid A*

SLC11a1 – *Solute Carrier family 11a member 1*

TAM – Macrófago associado a tumor

TCDD – 2,3,7,8-tetraclorodibenzodioxina

TGF- β – *Transforming growth factor beta*

TNF – Fator de necrose tumoral

TPA – 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

XRE – *Xenobiotic response element*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	17
1.2 Receptor aril hidrocarboneto e o metabolismo do DMBA	18
1.3 Genotoxicidade	21
1.4 Carcinogênese.....	22
1.5 Imunidade tumoral	25
1.6 Modelos animais na carcinogênese	26
1.7 Linhagens selecionadas geneticamente quanto a resposta inflamatória aguda (AIR).....	27
1.8 O gene <i>Slc11a1</i>	30
1.9 Animais selecionados geneticamente quando ao alelo portado do gene <i>Slc11a1</i>	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivos específicos.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Animais	37
3.2 Indução da tumorigênese	37
3.3 Análise histológica.....	38
3.4 Contagem de papilomas e tumores	38
3.5 Quantificação de citocinas	38
3.6 Extração de mRNA de pele e baço	39
3.7 Obtenção de cDNA	40
3.8 Expressão gênica por PCR em temporeal (qPCR)	42
3.9 Extração de DNA genômico	44
3.10 Análise de polimorfismo no gene <i>Ahr</i>	45
3.11 Análise estatística	47
4 RESULTADOS	49
4.1 Incidência e multiplicidade de papilomas e tumores de pele.....	49
4.2 Incidência de tumores em órgãos internos	55
4.3 Análise histológica da pele e órgãos internos	59
4.4 Análise de polimorfismo no gene <i>Ahr</i>	68
4.5 Análise da expressão gênica através de reações de qPCR	69
4.5.1 Expressão gênica para <i>Tnfa</i>	70

4.5.2 Expressão gênica para Il6	71
4.5.3 Expressão gênica para Il1b	72
4.5.4 Expressão gênica para Cxcl2	72
4.5.5 Expressão gênica para Ccl2	75
4.5.6 Expressão gênica para Cxcr2	77
4.5.7 Expressão gênica para Cyp1a1	78
4.5.8 Expressão gênica para os demais genes avaliados	79
4.6 Quantificação de citocinas séricas	79
5 DISCUSSÃO	82
6 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	96

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de morte, representando 13,3% do total de mortes no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Fatores como obesidade, estresse, consumo de álcool, tabagismo e infecções predisõem a esta patologia, mas seu desenvolvimento depende também dos fatores genéticos de cada indivíduo (KRABBE; PEDERSEN; BRUUNSGAARD, 2004; LICASTRO et al., 2005). O processo de carcinogênese pode ser espontâneo ou desencadeado por agentes físicos, como as diferentes radiações, ou químicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os HPAs são compostos lipofílicos caracterizados pela presença de dois a seis anéis aromáticos fundidos, e são conhecidos também como xenobióticos. Estes compostos são formados em diversos processos industriais, combustão de combustíveis orgânicos, incineração de lixo e calefação domiciliar. Estão presentes também na fumaça do cigarro e alimentos grelhados sendo, portanto, encontrados em abundância no ambiente em que vivemos. São potencialmente tóxicos e o contato com tais compostos aumenta o risco do desenvolvimento de câncer em humanos (BOSTROM et al., 2002; GAO et al., 2005).

O 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é um dos HPAs mais estudados, juntamente com o benzopireno e a dioxina (tetraclorodibenzodioxina ou 2,3,7,8-TCDD). Diferentemente destes, amplamente encontrados no ambiente, o DMBA é um protótipo sintético e é comumente utilizado na indução de câncer em roedores. Camundongos tratados com diferentes doses de DMBA mostram diminuição no número de células na medula óssea e no baço. Dessa forma, sua relação com a indução experimental de tumores e aumento de incidência de câncer existe devido a sua ação genotóxica, citotóxica e imunossupressora (BUTERS et al., 2003; GALVAN et al., 2003; GAO et al., 2005; XUE; WARSHAWSKY, 2005).

Assim como os outros HPAs, o DMBA necessita de ativação metabólica pelo citocromo P450 em conjunto com a enzima microsomal epóxido hidrolase (mEH) para exercer seu papel como carcinógeno. Além disso, a enzima glutathione S-

transferase (GST) pode conjugar os derivados eletrofílicos provenientes do metabolismo do DMBA com outras pequenas moléculas inativando-os, sendo responsável pela desintoxicação do metabólito ativo. Portanto, polimorfismos que afetam as atividade enzimáticas do citocromo P450, da mEH e da GST podem influenciar na suscetibilidade à carcinogênese do indivíduo (HANKINSON, 1995; KEMP, 2005).

1.2 Receptor aril hidrocarboneto e o metabolismo do DMBA

O metabolismo do DMBA tem início em sua ligação com o *Aryl hydrocarbon receptor* (AHR). O AHR é uma proteína citosólica que possui um domínio N-terminal do tipo hélice-alça-hélice (bHLH), um domínio C-terminal variável e um domínio central PAS (Per-Arnt-Sim). É fundamental o processo de metabolismo de xenobióticos aromáticos em intermediários polares, que reagem com macromoléculas causando citotoxicidade e câncer (KAFABI et al., 1993). Participa também da regulação de genes envolvidos com a apoptose, produção de citocinas e quimiocinas (MARLOWE; PUGA, 2005). O AHR possui diversos ligantes endógenos que aos poucos vem sendo conhecidos e estudos sugerem como ligantes do AHR as prostaglandinas, lipoxina A4, e também aminoácidos derivados do triptofano (BOSTROM et al., 2002; RANNUG et al., 1987; SCHALDACH; RIBY; BJELDANES, 1999; SEIDEL et al., 2001). O AHR vem sendo conhecido também pelo seu papel na regulação da diferenciação de células Treg e células Th17 e, interessante, regula ambas de maneira específica a cada ligante. Estudos mostraram que, a ativação do AHR por TCDD induziu a diferenciação de células Treg, e isso suprimiu a encefalomielite autoimune experimental (EAE) por um mecanismo dependente de TGF- β 1. Já quando a ativação do AHR foi feita por FICZ (*6-formylindolo[3,2-b]carbazole*), houve interferência na diferenciação de células Treg, a diferenciação de células Th17 foi impulsionada e, conseqüentemente, houve piora na EAE (QUINTANA et al., 2008).

O AHR é expresso em praticamente todos os tecidos de camundongos e na maioria das células do sistema imune, incluindo linfócitos T e B e células mielóides como macrófagos, células dendríticas e células NK (KERLVLIET, 2009). Na ausência de ligante, o AHR integra um complexo protéico citosólico que contém duas moléculas chaperonas *heat-shock protein* (Hsp90) e as proteínas p23 e ARA9.

A chaperona p23 estabiliza a interação AHR-Hsp90. A proteína ARA9 aumenta a sinalização via AHR, pois aumenta a quantidade de AHR com dobramento correto no citoplasma (PUGA; MA; MARLOWE, 2009; STEVENS; MEZRICH; BRADFIELD, 2009).

A ativação por um ligante provoca, em primeiro lugar, a translocação do complexo para o núcleo. Em segundo lugar, ocorre dissociação da molécula desse dímero de Hsp90 e proteínas conjugadas e, em terceiro lugar, há uma ligação do AHR com a proteína nuclear ARNT (do inglês: *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), translocadora do AHR. Finalmente, o heterodímero AHR-ARNT se liga a regiões específicas do DNA, chamadas AhREs (do inglês: *aryl hydrocarbon response elements*), também conhecidas como XREs (do inglês: *xenobiotic response elements*). Estes elementos estão localizados na região promotora de genes alvos e por mecanismos ainda pouco conhecidos, recrutam RNA polimerase II para iniciar a transcrição. O AHR ativado é rapidamente regulado negativamente quando é exportado para o citosol e então degradado pelo proteassomo 26S, ou por uma via de *feed-back* envolvendo o AHRR (do inglês: *aryl hydrocarbon receptor repressor*) (MARLOWE; PUGA, 2005; PUGA; MA; MARLOWE, 2009; STEVENS; MEZRICH; BRADFIELD, 2009).

Os genes alvos ativados por essa cadeia de eventos são genes que codificam as enzimas de fase I, ou seja, responsáveis pela biotransformação, e enzimas de fase II, responsáveis pela inativação dos HPAs. As enzimas de fase I em questão são as do citocromo P450, conhecidas como CYP1A1 e CYP1B1 e a enzima mEH. Já as de fase II são as enzimas UDP-glucuronosiltransferase e GST. Dessa forma, o AHR está envolvido na regulação dos dois processos e o balanço entre ativação e inativação determina a suscetibilidade de cada tecido à ação dos HPAs (HANKINSON, 1995). Estudos com modelo murino de tumorigênese de pele mostram que camundongos deficientes em mEH são menos responsivos ao efeito carcinogênico do DMBA (MIYATA et al., 1999).

O metabólito do DMBA denominado DMBA-3,4-dihidrodiol é pró-carcinogênico e, quando metabolizado, torna-se o carcinógeno efetor, o DMBA-3,4-dihidrodiol-1,2-epóxido (DMBA-DE). Este último liga-se covalentemente ao DNA com consequente formação de adutos, fazendo com que ocorra o desenvolvimento de câncer baseado nas mutações geradas (BUTERS et al., 2003; GAO et al., 2007, 2008; VINEIS; SCHATZKIN; POTTER, 2010).

Em 1969, Nebert e Gerboin observaram que linhagens isogênicas de camundongos possuíam uma resposta polimórfica a administração de HPAs e isso tinha relação com uma variabilidade na atividade de monooxigenase, reação química base dos processos de metabolismo que ocorrem no citocromo P450. Alterações no gene que codifica o AHR levam a diferenças na afinidade do agonista ao receptor em camundongos e, conseqüentemente, na sensibilidade destes animais aos efeitos de HPAs (NEBERT; GERBOIN, 1969).

Baseando-se na resposta da monooxigenase entre outras características bioquímicas, o gene *Ahr* foi classificado de acordo com a presença de quatro alelos, denominados *Ahr^d*, *Ahr^{b1}*, *Ahr^{b2}* e *Ahr^{b3}*. Diversos polimorfismos já foram observados, mas a relativa falta de resposta da monooxigenase observada quando o alelo presente é o *Ahr^d* ocorre devido a uma substituição de uma alanina por uma valina na posição 375 no domínio de ligação, resultando em afinidade de ligação diminuída (POLAND et al., 1990; THOMAS et al., 2002). Os alelos *Ahr^{b1}*, *Ahr^{b2}* e *Ahr^{b3}* são os que codificam receptores de alta afinidade ao ligante, diferenciando entre si quanto à estabilidade durante aquecimento e quanto ao peso molecular. Treze linhagens de camundongos já foram analisadas, e dentre estas, quatro são homozigotas para o alelo *Ahr^d*, uma para o alelo *Ahr^{b1}*, quatro para o alelo *Ahr^{b2}* e quatro para o alelo *Ahr^{b3}*. Um exemplo de linhagem que possui o alelo *Ahr^d* em homozigose é a DBA/2, e uma linhagem que porta o alelo *Ahr^{b1}* em homozigose, que codifica o receptor com maior afinidade e maior estabilidade aos HPAs, é a C57BL/6 (THOMAS et al., 2002).

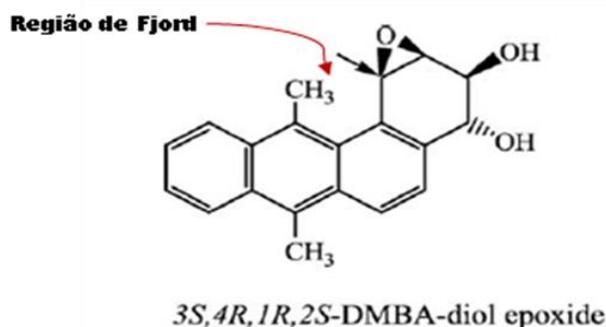
Além destas, linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para máxima e mínima resposta inflamatória aguda (AIRmax e AIRmin, respectivamente), também possuem diferença quanto aos alelos do *Ahr* que possuem. Animais AIRmax são em sua maioria portadores do alelo *Ahr^d*, enquanto os animais AIRmin, em sua maioria, possuem o alelo *Ahr^{b1}*. Estes dados são compatíveis com a sensibilidade a carcinogênese de pele induzida por DMBA, na qual os animais AIRmax, portadores dos alelos que conferem baixa afinidade ao ligante HPA, foram resistentes ao tratamento e os animais AIRmin foram sensíveis (DE SOUZA et al., 2009).

1.3 Genotoxicidade

A carcinogênese química é um processo de múltiplos estágios, no qual a etapa de iniciação consiste geralmente num dano no DNA, denominado lesão genotóxica. Este dano pode também ocorrer em proteínas (histonas), RNA e lipídeos e, independentemente do alvo, altera a conformação molecular e abala a função celular (HUSSAIN; HOFSETH; HARRIS, 2003). O DNA pode ser alterado principalmente pelos seguintes mecanismos: I. Quebra simples ou dupla de suas ligações fosfodiéster mediada por, por exemplo, radicais livres ou radiação iônica, II. Por agentes alquilantes que promovem *crosslinks* intra ou inter-fitas de DNA que modificam bases purinas (formação de adutos) ou III. por inibidores de topoisomerases que aumentam a quebra de fita única ou dupla de DNA (KASTAN; BARTEK, 2004). Porém, pode ocorrer também oxidação, hidrólise ou perda de bases, entre outras alterações.

Como descrito anteriormente, após a metabolização do DMBA ocorre a formação da molécula DMBA-3,4-dihidrodiol-1,2-epóxido (DMBA-DE), que possui uma região de *fjord* altamente mutagênica e carcinogênica (**Figura 1**). O carbono benzílico desta região reage principalmente com as bases purinas do DNA (adenina ou guanina), formando adutos estáveis ou depurinados (XUE; WARSHAWSKY, 2005).

Figura 1 - Região de *fjord* e posição do carbono benzílico (↓) na molécula DMBA-DE.



Fonte: Modificado de Xue e Warshawsky (2005).

Após a formação destes adutos, ocorre a indução de reparo do DNA por excisão de base, no caso de adutos depurinados, ou por excisão de nucleotídeos no caso de adutos estáveis. Porém o sistema de reparo do DNA nem sempre consegue

corrigir tais alterações, e em algumas ocasiões a célula consegue sobreviver mesmo com o dano sofrido. Após sua replicação, a mutação é fixada nas células filhas (CHAKRAVARTI et al., 2008). A irreversibilidade de alterações como estas unida a um estímulo leva a segunda etapa da carcinogênese, denominada promoção. Lesões mal restauradas levam a mutações que podem prejudicar genes importantíssimos, como supressores tumorais, genes de reparo do DNA, de controle de apoptose ou proto-oncogenes. Alterações nestes genes desencadeiam a produção de fatores que incitam a proliferação celular, diminuição do reparo do DNA, recrutamento de células inflamatórias e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, levando facilmente à malignidade na etapa de progressão tumoral (COUSSENS; WERB, 2002). Os principais genes acometidos são os proto-oncogenes *Hras*, *Kras* e *Nras* que, em células normais, regulam a proliferação celular. Em células tumorais, são convertidos em produtos oncogênicos ativos que levam a uma vantagem de crescimento (BUTERIN et al., 2008).

1.4 Carcinogênese

Em 1863, Virchow evidenciou leucócitos em tecidos neoplásicos, podendo inferir que a inflamação e o câncer possuem uma forte relação. De fato, diversos estudos mostraram este infiltrado leucocitário na maioria dos tumores e que, tentando eliminar as células tumorais, lesam o tecido devido a uma grande liberação de espécies reativas de oxigênio, atores fundamentais no desenvolvimento tumoral, invasão e metástase (COUSSENS et al., 2000). O crescimento tumoral ocorre também em paralelo com o acúmulo de macrófagos que, uma vez ativados, compõem uma fonte importante de fatores de crescimento e citocinas, que afetam profundamente células endoteliais, epiteliais e mesenquimais no microambiente local (COUSSENS; WERB, 2002; SICA; BRONTE, 2007). Evidências clínicas também mostram forte associação entre a inflamação crônica e o câncer. Pacientes portadores de vírus sexualmente transmissíveis como hepatite C e HPV, podem desenvolver carcinoma hepatocelular e cervical; indivíduos infectados por *Helicobacter pylori* estão predispostos ao carcinoma gástrico, além de indivíduos com metaplasia de Barret, que possuem vulnerabilidade ao carcinoma de esôfago (HOLD; EL-OMAR, 2008; MACARTHUR; HOLD; EL-OMAR, 2004; VASTO et al., 2009).

Entretanto, alguns eventos patológicos são importantes para que a progressão do câncer ocorra. No ano 2000, Hanahan e Weinberg propuseram seis alterações características do câncer, ou seja, alterações consideradas essenciais para que ocorra o processo de carcinogênese. Estas alterações compreendem a autosuficiência em sinais de crescimento; a insensibilidade a sinais supressores de crescimento; evasão da morte celular; habilidade de invasão e metástase; potencial replicativo ilimitado e angiogênese sustentada (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

No primeiro evento, a célula mutada adquire capacidade para sustentar sinais proliferativos através de alguns mecanismos como I. produção de fatores de crescimento aos quais responderão via receptores cognatos, ou seja, geração de um estímulo proliferativo autócrino (CHENG et al., 2008); II. envio de sinais a células normais que respondem a células tumorais suprindo-as com fatores de crescimento (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004) ou III. hiperexpressão de receptores em sua superfície. Além disso, mutações somáticas podem ativar vias adicionais de sinalização proliferativa excessiva, ou pode ocorrer a quebra de mecanismos de *feedback* negativo que atenuariam a sinalização para proliferação. Como os sinais proliferativos excessivos podem desencadear a senescência da célula, algumas células cancerígenas podem adaptar-se a altos níveis de sinalização oncogênica, desabilitando seu circuito induzido de senescência e apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A insensibilidade a sinais supressores de crescimento é muito dependente da anulação da ação de genes supressores de tumor, que governam a proliferação celular ou ativação de senescência e/ou apoptose. Existem genes que codificam proteínas transdutoras de sinais inibitórios para o crescimento, como a proteína RB (BURKHART; SAGE, 2008). Outros, como o gene que codifica o fator de transcrição p53, permitem a recepção de informações a respeito de estresse e dano no genoma, tendo o poder de parar o ciclo celular até que a homeostasia celular seja recuperada (SHERR; MCCORMICK, 2002). Dessa forma, a perda da atividade de genes como estes permite a replicação inapropriada de células mutadas.

A apoptose e a autofagia são mecanismos alvos de células tumorais, já que são utilizados em situações de estresse fisiológico, estado que obrigatoriamente faz parte da vida de uma célula no processo de tumorigênese. A perda de função do p53 é uma das formas mais comuns de escape da apoptose, porém células tumorais também podem aumentar a expressão de genes antiapoptóticos, como *Bcl-2*, ou

diminuir a expressão de genes de fatores pró-apoptóticos, como *Bax* (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A inativação de componentes da maquinaria da autofagia também admite o escape da morte celular (WHITE; DIPAOLA, 2009). Além disso, em contraste com a apoptose e a autofagia, a morte celular por necrose libera sinais pró-inflamatórios para o microambiente, ou seja, cria um microambiente favorável a progressão tumoral (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

O potencial replicativo ilimitado é outra arma fundamental para a progressão tumoral. Células com lesões pré-malignas não expressam telomerase significativamente, e mostram encurtamento de telômero. Por outro lado, lesões malignas consolidadas mostraram expressão de telomerase unida a longos telômeros e a fixação de cariótipos aberrantes adquiridas antes da atividade da telomerase. Isto gera mutações que promovem o tumor e a subsequente ativação da telomerase estabiliza o genoma mutante e confere a capacidade ilimitada de replicação (CHIN et al., 2004; RAYNAUD et al., 2010).

Outro evento marcante na carcinogênese, a indução de angiogênese, é um processo que, ao contrário do que ocorre nas condições fisiológicas em que aparece, gera continuamente novos vasos que sustentam a expansão neoplásica (HANAHAN; FOLKMAN, 1996). Este fenômeno é coordenado por fatores como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). A hiperexpressão do gene que codifica VEGF pode ocorrer em condições de hipóxia ou por sinalização oncogênica (FERRARA, 2009).

A angiogênese sustentada está muito relacionada com a última marca proposta por Hanahan e Weinberg, que é a capacidade de invasão e metástase. Células tumorais sofrem alterações na interação com outras células e com a matriz extracelular, e tem como alteração conhecida a perda de E-caderina, que forma junções aderentes com as células epiteliais adjacentes. A redução de sua expressão está relacionada com invasão e metástase (BERX; VAN ROY, 2009). O processo em questão se inicia, portanto, com invasão local, seguida da entrada de células cancerígenas em vasos sanguíneos e linfáticos próximos e seu trânsito por eles. Ocorre então o escape destas células dos vasos para o parênquima de tecidos distantes, com subsequente formação de micrometástases. Mais tardiamente, ocorre a colonização, que consiste no crescimento destas micrometástases gerando tumores macroscópicos (CAVALLO et al., 2011).

1.5 Imunidade tumoral

Após mais de dez anos da proposição dos eventos marcantes na evolução do câncer no indivíduo mencionados anteriormente, sabe-se que é necessário também versatilidade ao lidar com o sistema imune para que o processo de carcinogênese se concretize. Desta forma, são propostas três características imunes do câncer: habilidade em evadir do reconhecimento imune; habilidade em suprimir a reatividade imune e capacidade de desenvolvimento num microambiente cronicamente inflamado (CAVALLO et al., 2011).

Os tumores que possuem a menor antigenicidade são os que se consolidarão. A perda ou diminuição da expressão de MHC na membrana celular é um mecanismo utilizado para que o tumor possa crescer sem ser notado, e é resultante da superexpressão de produtos de oncogenes e da alteração na maquinaria de processamento de antígenos. Isto dificulta o reconhecimento de antígenos tumorais por células T, impedindo uma resposta efetora contra o tumor. A evasão da resposta contra tumores como fator determinante em seu crescimento pode ser observada em pacientes com AIDS ou imunossuprimidos após transplante que possuem maior incidência de diversos tumores (GRULICH et al., 2007).

A liberação de TGF- β , IL-10 e IDO (indoleamina 2,3-dioxigenase) pode ocorrer diretamente por células tumorais ou pode ocorrer através da ativação de sua secreção por células supressoras de linhagem mielóide (MDSC), macrófagos associados a tumores ou células dendríticas. Num microambiente contendo tais fatores, células T regulatórias desenvolvem-se a partir das células T naïve, e a presença destas suprime a reatividade do indivíduo ao tumor. As células tumorais em sua expansão também expressam autoantígenos tolerados, levando a ativação de Tregs naturais (CAVALLO et al., 2011).

Por outro lado, a ativação contínua de leucócitos sublevada por infecções persistentes, lesão tecidual ou comportamento anormal de células mutadas contribuem para o desenvolvimento de neoplasias utilizando mecanismos que incluem desde espécies reativas de oxigênio a fatores angiogênicos (CAVALLO et al., 2011). O microambiente tumoral usualmente é caracterizado por alta concentração de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β . Em neoplasias avançadas, é comum encontrar baixos níveis de IL-12 e ativação defectiva da resposta Th1. Além disso, nestas neoplasias macrófagos associados a tumores

(TAM) possuem um fenótipo M2, caracterizados por serem IL-12_{low} e IL-10_{high}, sendo que os TAM também produzem TGF- β , citocina supressora de tumores associada a metástases que pode atuar como promotora tumoral (BIERIE; MOSES, 2006; MANTOVANI et al., 2002).

As quimiocinas tem sido há muito tempo associadas ao recrutamento de leucócitos para os microambientes tumorais. Uma grande variedade de quimiocinas, como CCL2, CXCL12, CXCL8, CXCL1, CXCL13, CCL5, CCL17 E CCL22 tem sido detectadas em tecidos neoplásicos (GARLANDA et al., 2007). Dessa forma, a inflamação possui uma relação interessante com o processo de carcinogênese e, a fim de elucidar a contribuição da inflamação para a carcinogênese, estudos com modelos animais foram amplamente desenvolvidos.

1.6 Modelos animais na carcinogênese

Um dos modelos mais estudados na carcinogênese quimicamente induzida é o de carcinogênese de pele murina. A iniciação é feita através da aplicação de uma baixa dose de um carcinógeno como o DMBA, já que tal tratamento causa, geralmente, uma mutação no resíduo de adenosina do códon 61 do gene *Hras* em células epiteliais, gene responsável por estímulo da produção de fatores de crescimento (BALMAIN; HARRIS, 2000; KEMP, 2005). Esta dose de DMBA raramente levará ao desenvolvimento de tumores visíveis por si só, sendo necessária a aplicação de um agente promotor. A promoção ocorre através da aplicação de múltiplas doses de 12-0-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), agente promotor não carcinogênico capaz de desencadear mudanças celulares e bioquímicas relacionadas ao crescimento e diferenciação. Este evento é conhecido pela presença de perda de heterozigose ou mutação do gene *p53* (DIGIOVANNI, 1992; KEMP, 2005) e ativação de uma série de proteínas quinases que induzem reação inflamatória no tecido (MUELLER, 2006). Assim, células iniciadas são expandidas pelo tratamento com o promotor e ocorre o desenvolvimento de papilomas, lesões neoplásicas benignas que consistem em hiperplasias de queratinócitos e células estromais. Alguns papilomas adquirem a capacidade de invasão através da membrana basal e tornarem-se carcinomas de células escamosas, caracterizados por conter células com perda de diferenciação, atividade

mitótica aumentada e atipia nuclear. Uma fração destas células pode migrar e gerar metástases (ABEL et al., 2009; KEMP, 2005).

Um protocolo alternativo para a geração de carcinomas de pele consiste na aplicação epicutânea repetitiva de DMBA sem TPA. Neste protocolo, o DMBA é tanto iniciador como promotor, e os carcinomas podem formar-se tanto a partir de papilomas como *de novo* (MURPHY et al., 2003). Neste contexto, o que ocorre é que a indução de uma repetida lesão abrasiva pode promover tumores de pele (DIGIOVANNI, 1992), e o DMBA por ser um agente extremamente tóxico e irritante possui essa propriedade. Camundongos selecionados geneticamente para alta ou baixa resposta inflamatória aguda, AIRmax e AIRmin, mostraram diferente comportamento diante deste tratamento. Animais AIRmax mostraram-se mais resistentes ao tratamento tanto em relação à multiplicidade quanto à incidência de tumores de pele (DE SOUZA et al., 2009).

O mesmo ocorreu com estas linhagens em estudos anteriores realizados com aplicação epicutânea de DMBA/TPA (BIOZZI et al., 1998), ou realizados com implantação subcutânea de células B16F10 e S91, de melanoma murino, e células de melanoma humano SKMEL-28 (MARIA et al., 2001). Além disso, o tratamento com uretana para indução de carcinogênese pulmonar também obteve tais resultados (RIBEIRO et al., 2005). Em conjunto, estes trabalhos apresentam os animais geneticamente selecionados, AIRmax e AIRmin, como um modelo interessante e original para estudo da carcinogênese.

Camundongos CAR-S (suscetíveis) e CAR-R (resistentes) obtidos por seleção genética também diferem quanto a vulnerabilidade a tumores de pele quimicamente induzidos por DMBA/TPA (BANGRAZI et al., 1990), assim como camundongos selecionados para alta (H) e baixa (L) produção de anticorpos, sendo os animais L, de baixa produção de anticorpos, mais resistentes ao tratamento (IBAÑEZ et al., 1999).

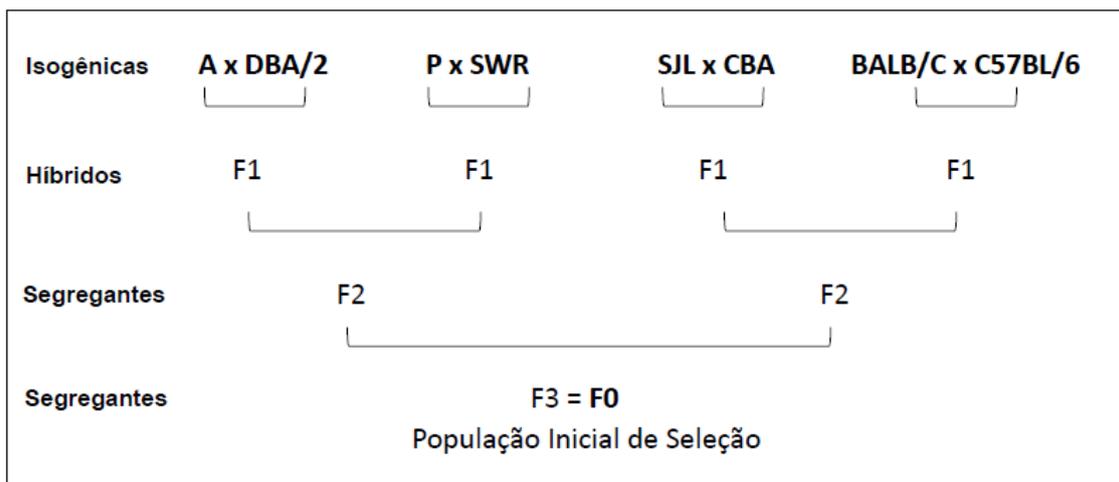
1.7 Linhagens selecionadas geneticamente quanto à resposta inflamatória aguda (AIR)

A inflamação é uma característica quantitativa submetida a controle poligênico sendo, portanto, regulada pela interação de vários *loci* gênicos ou QTL (do inglês: *quantitative trait loci*) que segregam independentemente. Para a melhor

compreensão deste fenômeno, o Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan desenvolveu duas linhagens de camundongos por seleção genética bidirecional de acordo com a intensidade da resposta inflamatória aguda (AIR, do inglês: *acute inflammatory response*) a aplicação de uma suspensão de partículas de poliacrilamida (Biogel P₁₀₀) (IBAÑEZ et al., 1992).

O processo de seleção teve início a partir de uma população de camundongos geneticamente heterogênea que foi resultante de cruzamentos entre oito linhagens isogênicas de origem independente (**Figura 2**). Cada indivíduo da população F₀ é caracterizado por uma recombinação distinta de 12,5% do *pool* gênico de todas as linhagens isogênicas originais (IBAÑEZ et al., 1992).

Figura 2 - Representação esquemática dos cruzamentos das oito linhagens isogênicas para geração da população inicial da seleção.



Fonte: Perlati-Santos (2012).

A resposta inflamatória aguda (AIR) foi desencadeada através da aplicação subcutânea no dorso dos camundongos previamente depilados de 0,75 mL da suspensão de micropartículas de poliacrilamida (Biogel P₁₀₀, Bio-Rad) que possuem porosidade com limite de exclusão para moléculas acima de 100 K_d. É um polímero quimicamente inerte, insolúvel, não biodegradável e não imunogênico. Para avaliação da AIR, 24 horas após a aplicação foi injetado 1 mL de PBS no local e o exsudato foi então drenado para a verificação dos dois parâmetros estabelecidos, que tratam-se da quantidade de células infiltradas e concentração protéica no

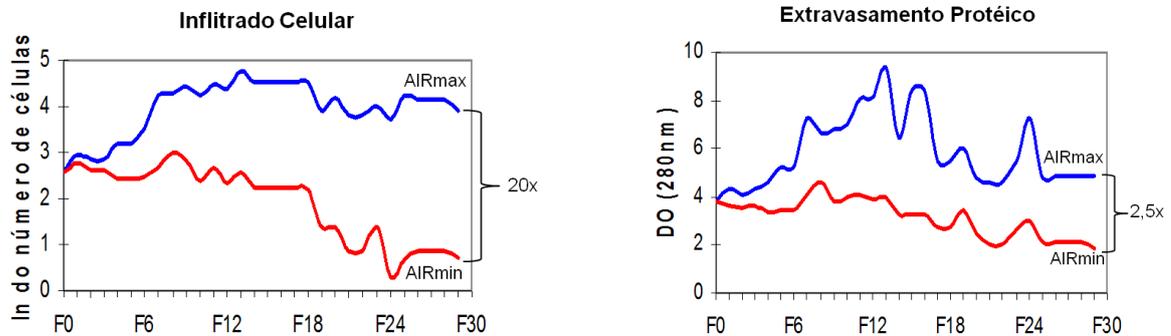
exsudato. O valor fenotípico destas características foi estudado individualmente. (STIFFEL et al., 1990).

Desta forma, os acasalamentos seletivos foram baseados na distribuição fenotípica da população F0, sendo escolhidos os animais com valores situados nas extremidades da curva. Animais com maior concentração de proteínas e maior celularidade no exsudato foram cruzados entre si para a geração da linhagem de alta resposta inflamatória aguda (AIRmax), e os animais com os menores valores nestes parâmetros foram cruzados entre si para a obtenção da linhagem de baixa resposta inflamatória aguda (AIRmin). Para minimizar a consanguinidade, os acasalamentos entre irmãos e primos foram evitados (IBAÑEZ et al., 1992).

Após 20 gerações admitiu-se que as linhagens atingiram o limite de seleção, ou seja, o máximo de diferença fenotípica, sendo neste momento ambas as linhagens consideradas em homozigose para os QTLs relevantes (BIOZZI et al., 1998). Estes animais respondem diferentemente não somente ao Biogel, mas a outros agentes como o veneno de *Bothrops jararaca* (CARNEIRO et al., 2002) e a doenças autoimunes como a artrite (PETERS et al., 2007; VIGAR et al., 2000), tumores de pele e pulmão (BIOZZI et al., 1998; DE SOUZA et al., 2009; MARIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005) e também a infecções (ARAÚJO et al., 1998; BORREGO et al., 2006).

A seleção mostrou divergência de 20 vezes para o infiltrado leucocitário entre as linhagens e 2,5 vezes para a concentração protéica no exsudato (**Figura 3**). Esta diferença fenotípica é regulada quantitativamente por 7 a 11 *loci* gênicos (QTLs) que se segregam independentemente (BIOZZI et al., 1998; IBAÑEZ et al., 1992). Atualmente, o processo de seleção está na 58ª geração.

Figura 3 - Representação da divergência das linhagens AIRmax (●) e AIRmin (●) quanto ao número médio de leucócitos infiltrantes e extravasamento protéico no local de aplicação da suspensão de partículas de poliacrilamida (Biogel P₁₀₀).



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

A diferença entre as duas linhagens no número de leucócitos infiltrados no sítio de injúria pode ser devido à diferença na produção de substâncias quimiotáticas pelas células residentes e infiltrantes para atrair neutrófilos, como C3a, C5a e MIP-2 (do inglês: *macrophage inflammatory protein 2*) após o tratamento com Biogel P₁₀₀). Além disso, os animais AIRmax tem maior produção de neutrófilos maduros, já que animais AIRmax possuem maior frequência do alelo normal do IL-3R α , que em conjunto com o receptor β determina a resposta normal à IL-3, enquanto os animais AIRmin possuem maior frequência do alelo que codifica proteína anormal, de resposta defectiva à IL-3 (RIBEIRO et al., 2003).

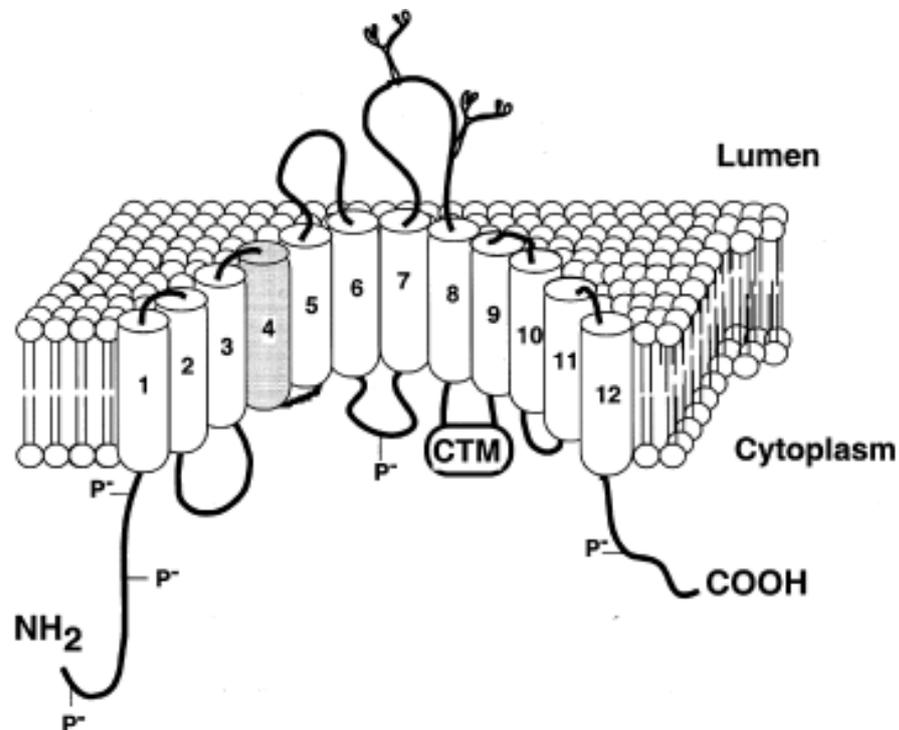
1.8 O gene *Slc11a1*

Como visto anteriormente, as linhagens AIRmax e AIRmin possuem diferenças na suscetibilidade e resistência a doenças, a componentes humorais e celulares e ao alelo do gene *Ahr* que carregam. Entretanto, num estudo realizado para avaliação de seu comportamento na infecção por *Salmonella typhimurium*, foi observado um desequilíbrio na frequência dos alelos *R* (*resistant*) e *S* (*susceptible*) do gene *Nramp1* (*natural resistance associate macrophage protein 1*). A frequência do alelo *S* é de 60% nos animais AIRmin, 9% nos animais AIRmax e na população F0 sua frequência é de 25%. Este desequilíbrio de frequência provavelmente ocorreu devido ao processo seletivo e o gene *Nramp1* ou algum outro próximo a ele

estaria num dos QTLs envolvidos na regulação da resposta inflamatória aguda (ARAÚJO et al., 1998).

Devido a este gene estar intimamente associado ao transporte iônico essencial, foi renomeado *Slc11a1* (*Solute carrier family 11a member 1*) (FORBES; GROS, 2001). Ele está localizado no cromossomo 1 e codifica a proteína expressa na membrana dos compartimentos endossomal e lisossomal de células como monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, sendo que durante o processo de fagocitose, a proteína SLC11A1 é recrutada para a membrana dos fagolisossomos (CELLIER et al., 1997; VIDAL; GROS; SKAMENE, 1995; WYLLIE; SEU; GOSS, 2002). Esta proteína possui 60 kD, doze domínios transmembrânicos e um *loop* extravesicular glicosilado com sítios de fosforilação e uma sequência intravesicular homóloga às proteínas de transporte de bactérias e eucariotos (**Figura 4**). Isto indica um papel desta proteína no transporte iônico de, por exemplo, produtos da oxidação do óxido nítrico, molécula com ação microbicida produzida por macrófagos ativados (CELLIER et al., 1995; GOVONI; GROS, 1998).

Figura 4 - Representação da proteína SLC11A1.



Fonte: Vidal, Gros e Skamene (1995).

A suscetibilidade conferida pelo alelo *S* do gene *Slc11a1* está associada, principalmente, a uma substituição de uma glicina por um ácido aspártico na posição 169, dentro do quarto domínio transmembrânico da proteína (GOVONI; GROS, 1998; ZWILLING et al., 1999), porém o mecanismo de ação pelo qual o gene em questão tem a capacidade de conferir o fenótipo de resistência ou suscetibilidade a infecções em um indivíduo ainda não é totalmente compreendido. Entretanto, existem duas vertentes que tentam explicar o fenômeno.

A primeira delas propõe que a proteína transportadora codificada pelo gene *Slc11a1* possui a função de aumentar o Fe^{2+} endossomal para catalisar a reação de Haber-Weiss/Fenton que, em pH ácido, gera radicais hidroxil altamente tóxicos com ação bactericida (KUHN; LAFUSE; ZWILLING, 1998). Já a outra vertente propõe que a função desta proteína transportadora é privar a bactéria fagocitada da disponibilidade de Fe^{2+} , essencial para o crescimento bacteriano, e de outros cátions divalentes como Zn^{2+} e Mn^{2+} , essenciais para uma efetiva defesa bacteriana antioxidante. Esta privação ocorre pelo transporte de Fe^{2+} do endossomo para o citosol (GOMES; APPELBERG, 1998). Dessa forma, o alelo *S* codifica uma proteína que, na primeira teoria, é incapaz de fazer o transporte de Fe^{2+} do citosol para o endossomo ou que, na segunda teoria, é incapaz de fazer o transporte de Fe^{2+} do endossomo para o citosol, ocorrendo em ambas situações o beneficiamento do crescimento bacteriano, ou seja, o fenótipo de suscetibilidade a infecções.

1.9 Animais selecionados geneticamente quanto ao alelo portado do gene *Slc11a1*

O alelo *S* do gene *Slc11a1* não está envolvido somente com a suscetibilidade a infecções (BORREGO et al., 2006), mas também está associado a doenças como artrite reumatóide (BLACKWELL et al., 2003, PETERS et al., 2007), esclerose múltipla (ATES et al., 2010), câncer (ZAAHL et al., 2005) e até mesmo com a regeneração tecidual (CANHAMERO et al., 2010). Este gene é pleiotrópico e possui papel na ativação macrofágica, *bursts* oxidativos e nitrosaminos, produção de TNF- α e IL-1 β e também na expressão de moléculas de MHC de classe II (BARTON WHITEHEAD; BLACKWELL, 1995; KITA et al., 1992; WOJCIECHOWSKI et al., 1999).

Para a melhor compreensão do comportamento dos animais da seleção (AIRmax e AIRmin) mediante ao desequilíbrio alélico, foram realizados cruzamentos assistidos por genotipagem para a produção de quatro sublinhagens de camundongos homozigotos para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1*. As linhagens foram denominadas AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR}, AIRmin^{SS} (BORREGO et al., 2006; DE FRANCO et al., 2007; PETERS et al., 2007).

Sabendo-se que os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* interagem com os *loci* reguladores de alta e baixa inflamação aguda, modulando vários fenótipos, como influxo de neutrófilos e exsudato protéico após inflamação com Biogel, sensibilidade a artrite induzida por pristane, regeneração tecidual e os níveis de citocinas envolvidos nos diversos processos inflamatórios, nossa hipótese é que a interação dos alelos *R* e *S* com o fundo genético de alta e baixa inflamação devem modular a suscetibilidade à carcinogênese de pele.

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar o papel dos alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* na carcinogênese de pele induzida pelo agente DMBA nas sublinhagens AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR}, AIRmin^{SS}, avaliando alguns mecanismos envolvidos no processo de progressão da doença.

2.1 Objetivos específicos

1. Contagem do número de papilomas, carcinomas de pele e análise de tumores em órgãos internos em diferentes períodos de tempo após a aplicação do agente indutor;
2. avaliação de cortes histológicos de pele e baço na fase inflamatória e, após a progressão da carcinogênese, pele, baço, pulmões, rins e fígado;
3. análise do perfil de citocinas pró- e anti-inflamatórias no início da resposta inflamatória nestes animais.

Materialis e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os camundongos utilizados foram das sublinhagens homozigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1*: AIRmax *Slc11a1*^{RR} (AIRmax^{RR}); AIRmax *Slc11a1*^{SS} (AIRmax^{SS}), AIRmin *Slc11a1*^{RR} (AIRmin^{RR}) e AIRmin *Slc11a1*^{SS} (AIRmin^{SS}), que foram produzidos por cruzamentos assistidos por genotipagem (BORREGO et al., 2006; DE FRANCO et al., 2007; PETERS et al., 2007). Fêmeas e machos de aproximadamente 2 a 4 meses foram utilizados nos experimentos. Estes animais foram gerados e mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. O projeto está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL). Os procedimentos foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB).

3.2 Indução da tumorigênese

Para indução da tumorigênese de pele, doses de 50 µg de DMBA diluído em 0,1 mL de acetona foram aplicadas via epicutânea nos camundongos por 5 dias consecutivos. Os grupos foram de, em média, 15 animais de cada sublinhagem. Nos grupos controles, compostos também por 15 animais, foi aplicada acetona (0,1 mL) durante este mesmo período. Quatro animais de cada sublinhagem (2 machos e 2 fêmeas) foram sacrificados 48 horas após a aplicação para retirada de fragmentos de pele, e mais 4 animais de cada sublinhagem foram sacrificados 30 dias após a aplicação do DMBA. Parte destes fragmentos foram destinados a análise histológica, e o restante foi destinado à quantificação de mRNA de algumas citocinas. O número de papilomas por animal foi contado uma vez por semana, e o restante dos camundongos foi sacrificado 170 dias após o término da inoculação do agente indutor, para análise dos órgãos internos.

3.3 Análise histológica

Os fragmentos de pele, baços e órgãos internos com lesões suspeitas foram fixados em formaldeído a 10% por 24 horas, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes foram feitos na espessura de 5 μm e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). A avaliação foi feita em microscópio óptico (Leitz-Dioplan) e a aquisição e digitalização das imagens através do sistema CCD-IRIS (Sony Company).

3.4 Contagem de papilomas e tumores

A contagem de tumores de pele foi realizada semanalmente através de análise macroscópica no dorso dos animais tratados com DMBA. A busca de tumores nos grupos de animais também foi feita macroscopicamente em órgãos internos num período de 170 dias após o tratamento. Os órgãos de interesse foram pulmões, rins e fígado e em casos de suspeita de lesão maligna, foram retirados e armazenados em formaldeído (10%) para futura confirmação histológica.

3.5 Quantificação de citocinas

Os soros para análise no Bioplex foram armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso. O painel utilizado foi o MILLIPLEX™ Mouse Cytokine / Chemokine, analisando IL-1 β , IL-6, IL-10, MIP-2 α (CXCL-2), TNF- α , GM-CSF, IL-17 e também, para análise de TGF- β , foi utilizado o kit TGF β 1 Single plex (Millipore – Billerica, MA, USA). O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, o filtro da placa de 96 poços foi lavado com *Bioplex Assay Buffer*. Em seguida foram adicionadas as *beads* conjugadas a anticorpos anti-citocinas, lavadas com *Bioplex Wash Buffer*, e depois 25 μL das amostras de soro foram adicionadas. Após uma incubação de 2 horas, a placa foi novamente lavada com *Bioplex Wash Buffer*, e então foi adicionado a cada poço o anticorpo de detecção biotinilado com posterior incubação de 1 hora. Após esse período, novas lavagens com *Bioplex Wash Buffer* foram realizadas, sendo a próxima etapa a de adição da estreptavidina conjugada com PE, que se liga ao anticorpo biotinilado. A incubação nesta etapa foi de 30 minutos. Foram realizadas novas lavagens e posteriormente as

beads foram ressuspensas com *Bioplex Assay Buffer* e analisadas no *Bioplex 200 Suspension Array System/ Luminex* (Bio Rad, Hercules, CA) através do *Software Bio-plex Manager*, versão 4.1 (Bio Rad, Hercules, CA). Os dados apresentados são referentes à, no mínimo, 100 *beads* por citocina.

3.6 Extração de mRNA de pele e baço

Os fragmentos foram acondicionados em tubos contendo RNA *later*TM (*RNA Stabilization Reagent - Qiagen*) a 4 °C por 24 horas imediatamente após sua coleta. Passado esse período, foram armazenados a -20 °C. Os fragmentos de pele ou baço retirados do *freezer* foram colocados em 350 µL de tampão RA1 e 3,5 µL de β-mercaptoetanol para a ocorrência de lise celular. Estas amostras foram submetidas ao vórtex, filtradas em mini filtro RNAspin e centrifugadas durante 1 minuto a uma velocidade de 9.500 r.p.m. O filtro foi então descartado e o filtrado transferido para um novo tubo coletor de 1,5 mL.

Para que as condições de ligação do RNA fossem ajustadas, foram adicionados 350 µL de etanol 70% nas amostras e as mesmas submetidas ao vórtex de 2 a 5 segundos.

Em seguida, para a ocorrência da ligação do RNA, as amostras foram homogeneizadas, colocadas numa coluna de RNAspin e centrifugadas por 30 segundos a 8.000 r.p.m. Após esta centrifugação, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor.

O próximo passo foi o de dessalinização da membrana, já que a presença de sal prejudica a ação da DNase I. Para isso foram adicionados 350 µL de tampão MDB (*membrane dessalting buffer*) as amostras e então estas foram centrifugadas a 9.000 r.p.m por 1 minuto para a secagem da membrana.

Para a digestão do DNA, foram aplicados 95µL da solução de DNase (10 µL de DNase I reconstituída + 90 µL do tampão de DNase) na membrana das colunas, e estas foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Essa solução de DNase foi inativada com 200 µL do tampão RA2 que foram centrifugados por 1 minuto a 9.000 rpm. Após esse procedimento, foram realizadas mais duas lavagens. A primeira utilizou 600 µL de tampão RA3 e centrifugação a 9.000 r.p.m durante 1 minuto. A segunda recebeu 250 µL de tampão RA3 na membrana de sílica, que foi centrifugada a 9.000 r.p.m por 2 minutos, ficando dessa forma completamente seca.

A coluna foi então colocada em um tubo de 1,5 mL nuclease *free*, recebeu 50 µL de água RNase *free* e foi submetida a centrifugação durante 1 minuto a 9.000 r.p.m.

Após esse procedimento, a concentração de RNA total das amostras foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 260nm e expressa em ng/µL. A relação RNA/Proteínas (260 nm/280 nm) também foi observada e seu valor foi ao redor de 2,0. Para análise da integridade, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-base 1 M, ácido bórico 1 M e EDTA 20 mM) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As amostras foram aplicadas no gel na concentração de 0,5 µg/mL num volume final de 10 µL acrescidos de 2 µL de azul de bromofenol. O gel contendo as amostras foi colocado em cuba com tampão TBE 1X e submetido a uma voltagem de 80 V por aproximadamente 30 minutos. A imagem do gel foi obtida no *Pharmacia Biotech – Image Master VDS*, na qual foi possível observar a presença das bandas indicativas da integridade do RNA.

3.7 Obtenção de cDNA

A síntese de cDNA foi feita através de uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Ao volume de 10 µL contendo 0,5 µg de RNA foram adicionados 2 µL de água RNase *free*, 1 µL de oligonucleotídeos dNTP (10 mM) e 1 µL de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (50 mM). A mistura foi homogeneizada e submetida à temperatura de 65 °C por 5 minutos. Após este período, as amostras acrescidas da mistura acima permaneceram no gelo por 1 minuto. Foram adicionados às amostras 4 µL de tampão específico 5X concentrado (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂), 1 µL de DTT (0,1 M) e 1 µL da enzima *SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase – Invitrogen* (200 U/mL). As amostras foram aquecidas a 50 °C por 50 minutos e inativadas a 70 °C por 15 minutos. A reação foi incubada em aparelho termociclador *MJ Research PTC 200*.

Para a amplificação dos cDNA específicos aos mRNA codificantes para *Il1a*, *Il1b*, *Il4*, *Il6*, *Il10*, *Ifng*, *Tgfb*, *Tnfa*, *Ccl2*, *Cxcl2*, *Saa3* e *Foxp3* foram utilizadas seqüências sintéticas (*primers*). Estes *primers* foram desenhados para éxons que flanqueiam íntrons de grande tamanho (1000 pb) evitando assim a amplificação do DNA genômico (**Quadro 1**).

Quadro 1 - Sequência de *primers* utilizados na síntese de mRNA.

Primer	Forward	Reverse
<i>Ciclo</i>	AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT	AAATGCCCGCAAGTCAAAG
<i>Il1a</i>	CAGTTCTGCCATTGACCATC	TCTCACTGAAACTCAGCCGT
<i>Il1b</i>	TTGACGGACCCCAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCCTGA
<i>Il4</i>	TCGGCATTTTGAACGAGGTC	GAAAAGCCCGAAAGAGTCTC
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TGTACTIONCAGGTAGCTATGG
<i>Il10</i>	TCAAACAAAGGACCAGCTGGACAACATACTG	CTGTCTAGGTCCTGGAGTCCAGCAGACTCAA
<i>Ifng</i>	GCTCTGAGACAATGAACGCT	AAAGAGATAATCTGGCTCTGC
<i>Tgfb</i>	ACCGCAACAACGCCATCTAT	GTAACGCCAGGAATTGTTGC
<i>Tnfa</i>	TCTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC
<i>Ccl2</i>	GCCTGCTGTTACAGTTGC	TCATTGGGATCATCTTGCTG
<i>Cxcl2</i>	CCTGGTTCAGAAAATCATCCA	CTTTGGTCTTCCGTTGAGG
<i>Saa3</i>	GAGCTGGCTGACTGGAAGAG	GCGGGTCTGAAGTTGAGATT
<i>Foxp3</i>	CAGTCACTGCAAATGTCCGGT	TGTCGGACACAAAGGAACTGC
<i>Cyp1a1</i>	TGGAGACCTTCCGGCATTTC	GCCATTGACTTGTATCTCTTGTG
<i>Cxcr2</i>	AGCCACTCTGCTCACAACA	CCACCTTGAATTCTCCCATC

Fonte: Perlati-Santos (2012).

3.8 Expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR)

Foi avaliada a expressão de RNA mensageiro para *Il1a*, *Il1b*, *Il4*, *Il6*, *Il10*, *Ifng*, *Tgfb*, *Tnfa*, *Ccl2*, *Cxcl2*, *Saa3*, *Cyp1a1* e *Cxcr2* na pele e *Foxp3*, *Il6*, *Tnfa*, *Ccl2*, *Cxcl2*, *Cyp1a1* e *Cxcr2* no baço de animais submetidos ao tratamento. Os cDNAs destes tecidos foram quantificados através de reações de PCR em Tempo Real (qPCR).

Cada amostra de cDNA (2 μ L) foi adicionada a uma mistura contendo as sequências *forward* e *reverse* de *primers* das citocinas (5 μ M); 12,5 μ l de *Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen)*, e água para ajustar o volume final de reação em 25 μ l por tubo.

As reações foram incubadas no aparelho Chromo 4 (*MJ Research*), e submetidas a uma fase inicial de incubação a 50 °C por 2 minutos, seguida da fase de ativação da enzima (*hot start*) a 95 °C durante 5 minutos. As sequências alvo foram então amplificadas durante 40 ciclos constituídos de etapas sucessivas de desnaturação (95 °C por 20 segundos), e de anelamento (60 °C por 35 segundos). A aquisição da fluorescência foi incorporada ao material dupla fita amplificado a cada ciclo e efetuada na etapa final. 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 começasse a ultrapassar o valor da fluorescência de fundo, ou seja, do início da fase logarítmica (log) de amplificação, da qual depende diretamente de quantas cópias das sequências alvo havia inicialmente em cada amostra.

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase *Melting* na qual a temperatura variou de 55 °C a 90 °C e 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.

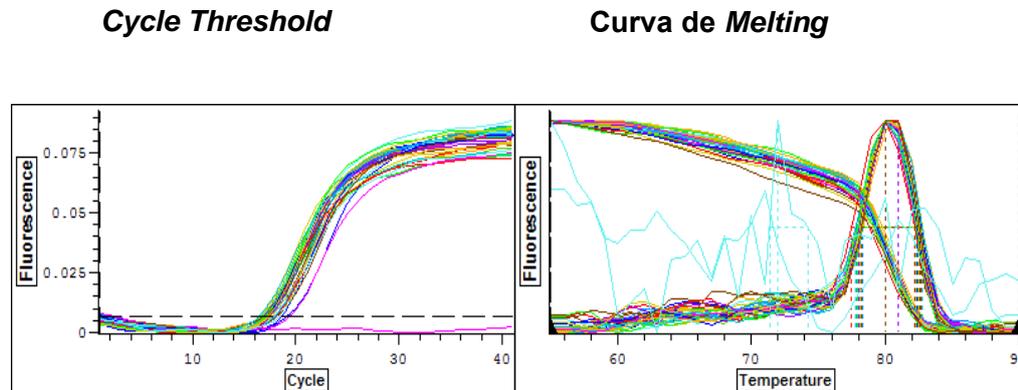
Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa *Opticon Monitor Analysis Software 2.03*, conforme indicado. A quantificação dos resultados obtidos pelo qPCR foi utilizado o Método de *Threshold* Comparativo (GIULIETTI et al., 2001; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), no qual fórmulas aritméticas foram utilizadas para calcular níveis de expressão relativos a um calibrador, que foi uma amostra de menor expressão (controle). Os resultados foram baseados nos valores de Δ Ct, que

representa o valor de Ct do gene alvo, seja de animal experimental ou controle, subtraído do valor de Ct do gene constitutivo, a ciclofilina. O gene da ciclofilina codifica um receptor intracelular para ciclosporina A, que possui um papel fundamental na atividade da PPIase (peptidil-prolil cis-trans isomerase) e chaperonas. A ciclofilina é estruturalmente conservada e encontrada em ambos os organismos procarióticos e eucarióticos (LEE; KIM, 2010).

A quantidade do gene alvo é dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, método descrito por Livak et al. (2001), em que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra) – ΔCt (calibrador). Assim, a equação representa a expressão normalizada do gene alvo, em uma amostra cuja quantidade é desconhecida, relativa à expressão normalizada da amostra calibradora. Isso permite a observação da mudança em vezes na expressão gênica relativa ao calibrador.

O cálculo das médias e desvios padrão foi realizado para cada sublinhagem, tanto para animais controle como para os animais tratados. **A Figura 5** representa a amplificação da ciclofilina nas amostras controle e experimentais e suas curvas de *Melting*. Não houve variação no Ct de animais controle e experimentais, pois as curvas permanecem juntas durante todo o ciclo de amplificação. Isto indica que o tratamento com DMBA não interfere na expressão do gene constitutivo. Da mesma forma, nas curvas de *Melting*, as amostras apresentaram um único pico de dissociação. Isto mostra que todas as duplas fitas separam-se na mesma temperatura, indicando a amplificação de uma banda específica de mesmo tamanho (ciclofilina).

Figura 5 - qPCR representativo de quantificação de ciclofilina na pele dos animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}, controles e experimentais.



Experimento realizado no aparelho Chromo 4 (MJ Research), utilizando Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen).

Fonte: Perlati-Santos (2012).

3.9 Extração de DNA genômico

Foi realizada a extração de DNA da cauda dos animais pelo kit E.Z.N.A Easy Nucleic Acid Isolation[®] (*Omega Bio-Tek, Inc.*), para posterior uso na análise de polimorfismos no gene *Ahr*. Para isso, fragmentos de 0,5 a 1 cm de cauda foram coletados dos camundongos e foram colocados em tubos *ependorf*. Aos tubos foram adicionados 180 μ L de tampão TL (*Buffer TL*), 25 μ L de O.B. protease diluída em Tris-HCl (10 mM pH 8,0). Após passagem dos tubos no vortex, as amostras foram incubadas a 55 °C por 4 horas, com agitação a cada 20 minutos.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.800 rpm e temperatura ambiente para separar o DNA solúvel, presente no sobrenadante, do material não digerido pela enzima, como osso e pêlos. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e transferido para novo tubo *ependorf* estéril. Ao sobrenadante foram adicionados 200 μ L de tampão BL (*Buffer BL*) e 210 μ L de etanol absoluto homogeneizados. O conteúdo final foi homogeneizado no vortex.

A coluna filtrante foi colocada num tubo coletor de 2 mL e para preparar a coluna, foram adicionados 200 μ L de tampão de equilíbrio (*Equilibration Buffer*) e em seguida as colunas com os tubos coletores foram submetidos a centrifugação à 11.200 rpm por um minuto, com posterior descarte do eluato. Depois disso, a amostra de DNA com o tampão BL e etanol foi transferida para a coluna de extração de DNA já preparada e centrifugada por 10 minutos à 9.860 rpm e temperatura

ambiente. O tubo coletor foi descartado juntamente com o material que passou pela coluna. À coluna, foram adicionados 500 µL de tampão HB (*Buffer HB*) e esta foi submetida à centrifugação por 2 minutos a 9.860 rpm e temperatura ambiente, e o eluato foi descartado.

A coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 mL e foi então lavada com 700 µL de tampão de lavagem (*Wash Buffer*) previamente diluído em etanol absoluto conforme instruções do fabricante. A coluna com seu tubo coletor foi centrifugada a 9.860 rpm por 2 minutos, e seu eluato foi descartado. Esta etapa foi repetida, com necessidade de secagem posterior. Assim, para secar a coluna, foi feita uma nova centrifugação por mais 2 minutos na velocidade de 11.200 rpm.

Por fim, a coluna foi transferida para um tubo *ependorf* estéril e 200 µL de tampão de eluição (*Elution Buffer*) pré-aquecidos a 70 °C foram adicionados à coluna. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 3 minutos. Após esse período, a coluna foi centrifugada por 11.200 rpm por 2 minutos, e posteriormente a esta centrifugação, a coluna foi descartada.

A concentração do DNA foi quantificada por densitometria óptica, com diluição de 1:20. A verificação da integridade do DNA extraído foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1% e análise através do aparelho *Pharmacia Biotech – Image Master VDS*.

3.10 Análise de polimorfismo no gene *Ahr*

Para análise de polimorfismo no gene *Ahr*, no cromossomo 12 a 18 cM em DNA genômico, o primeiro passo foi o acerto da concentração de DNA nas amostras, a fim de que todas as amostras ficassem na concentração de 12,5ng/mL. As amostras controles, C57BL/6 (representante do alelo *Ahr^{b1}*) e DBA/J (representante do alelo *Ahr^d*), foram utilizadas na concentração de 25 ng/mL.

Posteriormente foi feita uma mistura de 2 µL de primer *forward*, 2 µL de primer *reverse* (**Quadro 2**), ambos na concentração de 2 pM/µL, e 96 µL de água. Então, para a reação de PCR, cada tubo continha a amostra (3 µL de DNA), 12,8 µL de água, 2,4 µL de tampão de reação, 0,84 µL de Mg, 0,84 µL de dNTP, 0,12 µL de enzima platinum e 4 µL da mistura de primers. A reação ocorreu no aparelho *MJ Research PTC 200*, com uma etapa previa de incubação a 95 °C por 2 minutos e posteriormente, um total de 35 ciclos constituídos por repetidas etapas nas

temperaturas de 95 °C por um minuto, 55 °C por um minuto e 72 °C por um minuto, com incubação final das amostras a 72 °C por 15 minutos. Para subsequente verificação de integridade do produto da reação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 3% em TBE 1X.

A caracterização da existência ou não de polimorfismo no gene *Ahr* é feita da seguinte forma: indivíduos como os animais DBA/J possuem o polimorfismo anteriormente descrito (substituição de uma alanina por valina na posição 375 no domínio de ligação), que caracteriza diminuída afinidade de ligação aos HPAs, após tratamento com enzima de restrição (*Eco* 47III) continuam com sua molécula de DNA íntegra. Entretanto, amostras de DNA de indivíduos sem polimorfismos nesta região (como os animais C57Bl/6), que possuem receptores de maior afinidade aos HPAs, tem região específica reconhecida pela enzima de restrição, tendo então sua molécula de DNA amplificada clivada. Por isso, após a verificação de integridade do produto da reação de PCR, foi realizado tratamento com enzima de restrição. Neste tratamento, 2 µL de amostra de produto da reação de PCR foram acrescidos de 15,6 µL de água, 2 µL de tampão da enzima, 0,2 µL de BSA e 0,2 µL da enzima de restrição *Eco* 47III. A incubação foi feita durante 3 horas a 37 °C.

Ao final da incubação, a análise foi realizada através de eletroforese em gel de agarose Low Melting a 4% em TBE 1X, a 120 V por cerca de 50 minutos. Assim, 2 µL de amostra são misturadas a 8 µL de corante azul de bromofenol, e 1,2 µL das amostras dos controles são misturadas a 4,8 µL de água e 4 µL de corante. Após a corrida no gel, foi possível caracterizar a fragmentação ou não do DNA e fotografar o gel através do aparelho *Pharmacia Biotech – Image Master VDS*.

Quadro 2 - Sequência dos *primers* utilizados para análise do gene *Ahr*.

<i>Primer Ahr</i>	
Forward	GGTTCGAATTTCCAGGATGG
Reverse	CCACCCCAGGTACATGATGGAACC

Fonte: Perlati-Santos (2012).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre as médias das sublinhagens estudadas nos experimentos de qPCR e Bioplex foram determinadas por análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey. Para estabelecer as diferenças de incidência, a análise estatística foi feita através de Tabela de Contingência e Teste Exato de Fisher. Já para a multiplicidade de papilomas e carcinomas, foi realizado o Teste *t Student*. O nível mínimo de significância adotado foi $p < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Incidência e multiplicidade de papilomas e tumores de pele

O tratamento indutor de carcinoma de pele murino tem como característica a formação de múltiplos papilomas que, regredindo ou não, tornam-se lesões malignas características de carcinoma de pele. Dessa forma, a contagem de papilomas e lesões sugestivas de carcinomas é fundamental para a verificação da evolução do processo desencadeado e para a avaliação das possíveis diferenças interlinhagens quanto à sensibilidade a carcinogênese quimicamente induzida. Assim, após o término do tratamento com o DMBA, a observação macroscópica do aparecimento de papilomas e/ou lesões sugestivas de carcinomas e sua contagem foram realizadas semanalmente até o período de 170 dias.

Logo após o início do tratamento com o agente DMBA (48 horas), os animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} demonstraram início de reação inflamatória local, sendo esta intensificada a cada dia de tratamento. Ao término do tratamento, cerca de 94% dos animais AIRmin^{RR} apresentavam a pele intensamente ferida, e 80% dos animais AIRmin^{SS} apresentavam a pele ferida (**Figura 6; Tabela 1**). Entretanto, as feridas melhoraram gradativamente passados 15 a 20 dias. Como representa a Figura 10, os animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} não demonstraram o mesmo comportamento, sendo que os camundongos AIRmax^{RR} não mostraram qualquer alteração visível em suas peles, enquanto que os camundongos AIRmax^{SS} exibiram leve alteração visível em suas peles, muito menos intensa que nos animais AIRmin de ambas as sublinhagens.

Figura 6 - Aspecto da pele dos animais AIRmax^{RR} (A), AIRmax^{SS} (B), AIRmin^{RR} (C) e AIRmin^{SS} (D).



Análise realizada 48 horas após tratamento com DMBA.
Fonte: Perlati-Santos (2012).

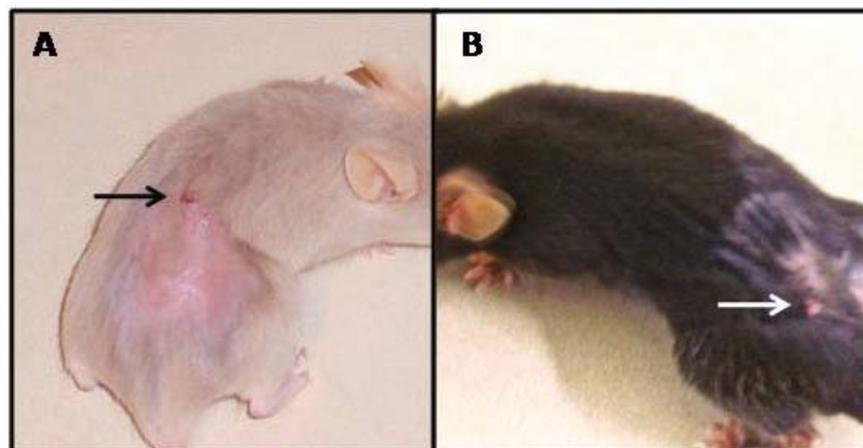
Tabela 1 - Reações inflamatórias na pele nas sublinhagens AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}.

	2 dias			14 dias		
	Positivo/Total	Incidência	<i>p</i>	Positivo/Total	Incidência	<i>p</i>
AIRmin ^{RR}	28/32	87,5 %	0,12	30/32	93,75%	**0,0017
AIRmin ^{SS}	20/29	68,97%		17/29	58,62%	

Análise realizada 2 dias e 14 dias após o término do tratamento com DMBA. A análise estatística foi feita por tabela de contingência e teste exato de Fisher. ***p*<0,01. Dados representativos de dois experimentos.
Fonte: Perlati-Santos (2012).

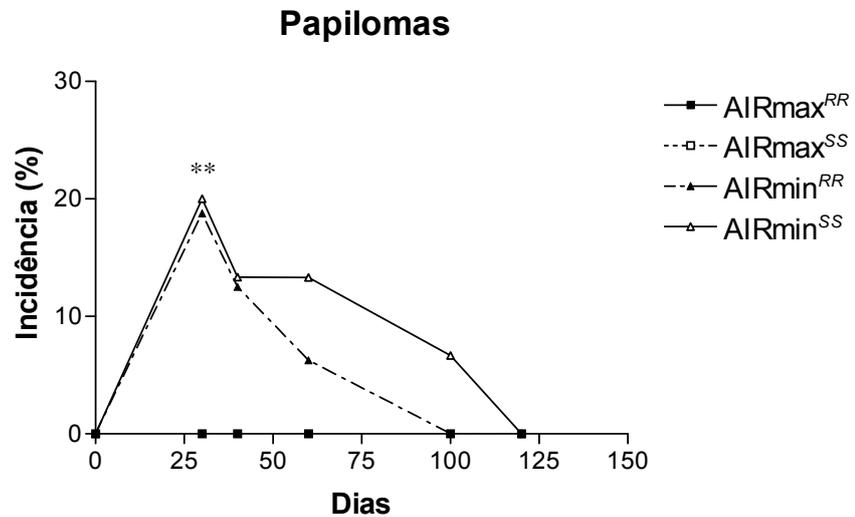
A incidência de papilomas (**Figura 7**) ocorreu de maneira semelhante nos animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}. Os valores foram de 18,8% na sublinhagem AIRmin^{RR} e de 20% entre os animais AIRmin^{SS} no período de 30 dias após o término do tratamento, período no qual os valores de incidência foram os maiores. Após esse período, a incidência diminuiu gradativamente até ser nula (**Figura 8**). Quanto a multiplicidade dos papilomas, as duas sublinhagens também demonstraram comportamento semelhante, atingindo os valores médios de 0,4 nos animais AIRmin^{RR} e 0,46 nos animais AIRmin^{SS}, também no período de 30 dias após o tratamento (**Figura 9**).

Figura 7 - Imagens representativas dos papilomas (setas) na pele dos animais AIRmin^{RR} (**A**) e AIRmin^{SS} (**B**), 40 dias após tratamento com DMBA.



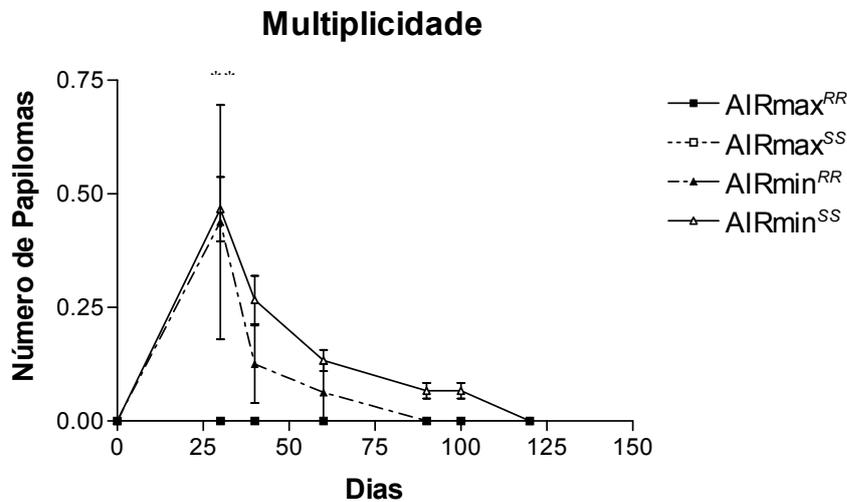
Fonte: Perlati-Santos (2012).

Figura 8 - Incidência de papiloma na pele dos animais AIRmax e AIRmin homocigotos para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* tratados com DMBA.



Foram utilizados animais controles (n=4, para cada sublinhagem) e experimentais (n=17 para AIRmax^{RR}; n=16 para AIRmax^{SS}; n=16 para AIRmin^{RR}; n=15 para AIRmin^{SS}). Resultados expressos em porcentagem de animais positivos para papilomas na observação macroscópica. A análise estatística foi feita por tabela de contingência e teste exato de Fisher. ** $p < 0,01$. Dados representativos de dois experimentos.
Fonte: Perlati-Santos (2012).

Figura 9 - Multiplicidade de papilomas na pele dos animais das quatro sublinhagens tratados com DMBA.

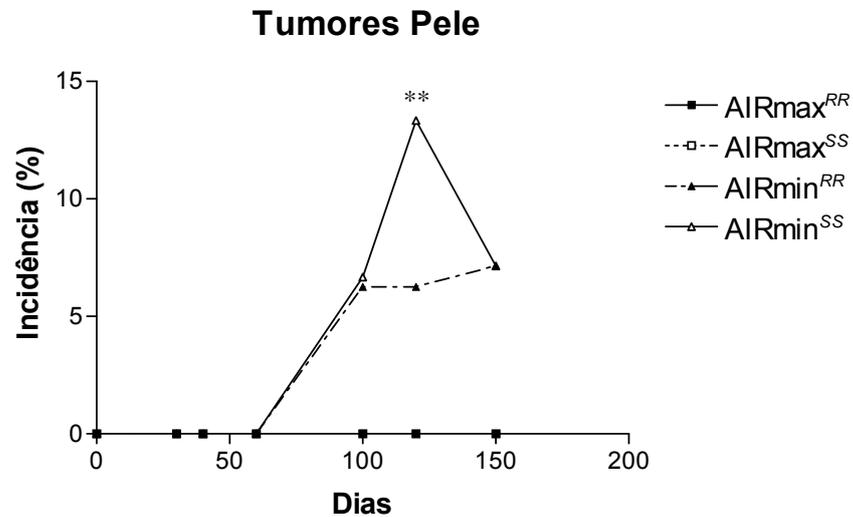


Foram utilizados animais controles (n=4, para cada sublinhagem) e experimentais (n=17 para AIRmax^{RR}; n=16 para AIRmax^{SS}; n=16 para AIRmin^{RR}; n=15 para AIRmin^{SS}). Resultados expressos pela média de papilomas em cada grupo e em cada período de observação. A análise estatística foi feita por Teste T e teste não paramétrico. ** p<0,01. Dados representativos de dois experimentos.
Fonte: Perlati-Santos (2012).

A regressão dos papilomas é compatível com o aparecimento de possíveis carcinomas de pele. O aparecimento das lesões sugestivas de malignidade ocorreu nas mesmas linhagens que apresentaram papilomas a partir do período de 60 dias após o tratamento, período no qual os animais demonstraram regressão importante do número de papilomas (**Figura 10**). A incidência de lesões sugestivas de carcinomas (**Figura 11**) de pele chegou aos valores máximos de 7% nos animais AIRmin^{RR} no período de 150 dias e de 13% nos animais AIRmin^{SS} no período de 120 dias, sendo que este último valor decresceu devido a morte de um animal que apresentava lesão sugestiva de carcinoma.

Os animais das sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} não apresentaram papilomas e lesões sugestivas de carcinomas de pele, chegando até o final do período de observação com a pele macroscopicamente íntegra, conforme mostrado nas Figuras 12 e 15. As lesões foram submetidas posteriormente à confirmação histológica.

Figura 10 - Incidência de lesões sugestivas de carcinomas na pele dos animais das sublinhagens tratados com DMBA.



Foram utilizados animais controles (n=4, para cada sublinhagem) e experimentais (n=17 para AIRmax^{RR}; n=16 para AIRmax^{SS}; n=16 para AIRmin^{RR}; n=15 para AIRmin^{SS}). Resultados expressos em porcentagem de animais positivos para carcinomas na observação macroscópica. A análise estatística foi feita por tabela de contingência e teste exato de Fisher. **p<0,01. Dados representativos de dois experimentos.
Fonte: Perlati-Santos (2012).

Figura 11 - Imagens representativas de tumores (setas) na pele dos animais AIRmin^{RR} (**A**), AIRmin^{SS} (**B**).



Análise realizada 100 dias após a aplicação epicutânea por 5 dias consecutivos do agente DMBA diluído em acetona.
Fonte: Perlati-Santos (2012).

4.2 Incidência de tumores em órgãos internos

A análise da incidência de tumores em órgãos internos foi realizada para evidenciar as diferenças na sensibilidade a carcinogênese entre as sublinhagens AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR}, AIRmin^{SS}. A princípio esta análise visava a análise de metástases dos carcinomas de pele. Entretanto, como o processo desencadeado é sistêmico, foi realizada uma análise quanto à presença ou ausência de tumores em órgãos internos, com posterior caracterização histológica. Para a realização desta análise, os animais foram sacrificados após 170 dias do término da indução da carcinogênese com o agente DMBA, e foi feita a análise macroscópica dos rins, pulmões e fígado.

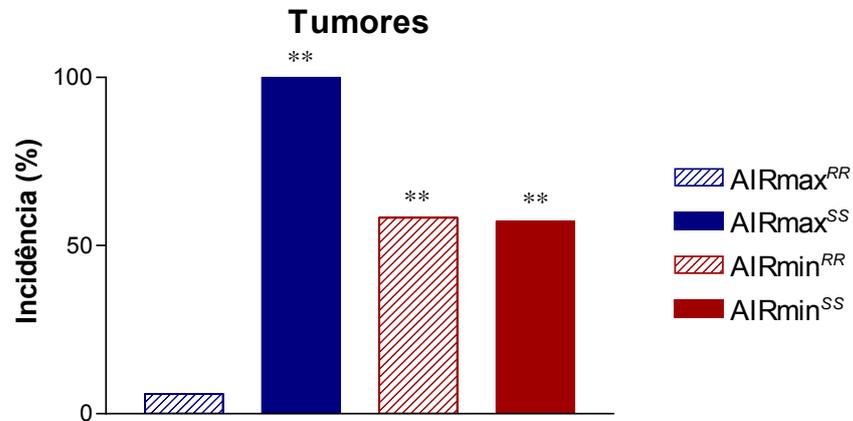
Foi possível observar que 100% dos animais AIRmax^{SS} apresentaram tumores em algum órgão interno (**Figura 12**), sendo os pulmões acometidos em todos os animais desta sublinhagem (**Figura 13**). A diferença na incidência nos pulmões entre os animais AIRmax^{SS} foi altamente significativa quando comparados à todas as outras sublinhagens. O acometimento dos outros dois órgãos ocorreu,

porém em um número pequeno de animais, atingindo por volta de 6% dos animais nos rins (**Figura 14**) e 33% dos animais no fígado (**Figura 15**), sendo que no fígado a diferença entre estes e os animais AIRmax^{RR} foi significativa.

Os animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} mostraram semelhante incidência de tumores em órgãos internos, sendo esta de aproximadamente 58% e 57%, respectivamente (**Figura 12**). Em ambos o acometimento principal foi nos pulmões, sendo presente em 28% dos animais AIRmin^{RR} com lesões e em 38% dos animais AIRmin^{SS} com lesões (**Figura 13**) e ambas as incidências diferiram significativamente dos animais AIRmax^{RR}. Não foi observada alteração hepática nos animais AIRmin^{RR}, porém nos animais AIRmin^{SS} esta atingiu um valor de 25% (**Figura 15**). Nos rins, a incidência de tumores foi observada em cerca de 71% dos animais AIRmin^{RR} e 87% dos animais AIRmin^{SS} (**Figura 14**).

Os animais AIRmax^{RR} não mostraram sensibilidade significativa ao tratamento, já que somente um animal desta sublinhagem apresentou alteração pulmonar (**Figura 12**). Alterações nos outros órgãos não foram observadas nesta sublinhagem (**Figuras 14 e 15**). As lesões sugestivas de malignidade foram submetidas à posterior confirmação histológica.

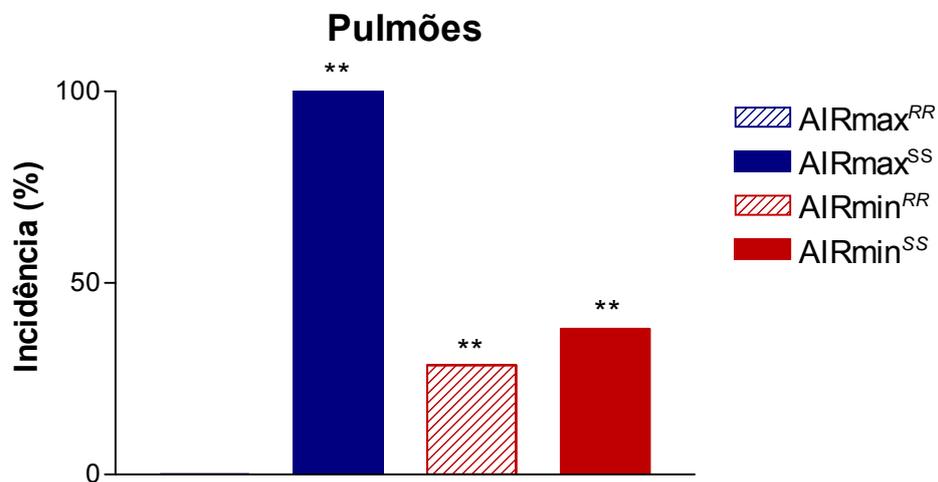
Figura 12 - Incidência de tumores em órgãos internos nos animais AIRmax e AIRmin homocigotos para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* tratados com DMBA.



Foram utilizados animais controles (n=4, para cada sublinhagem) e experimentais (n=17 para AIRmax^{RR}; n=15 para AIRmax^{SS}; n=12 para AIRmin^{RR}; n=14 para AIRmin^{SS}). Resultados expressos em porcentagem de animais positivos para alterações macroscópicas. A análise estatística foi feita por tabela de contingência e teste exato de Fisher. **p<0,01. Dados representativos de dois experimentos.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

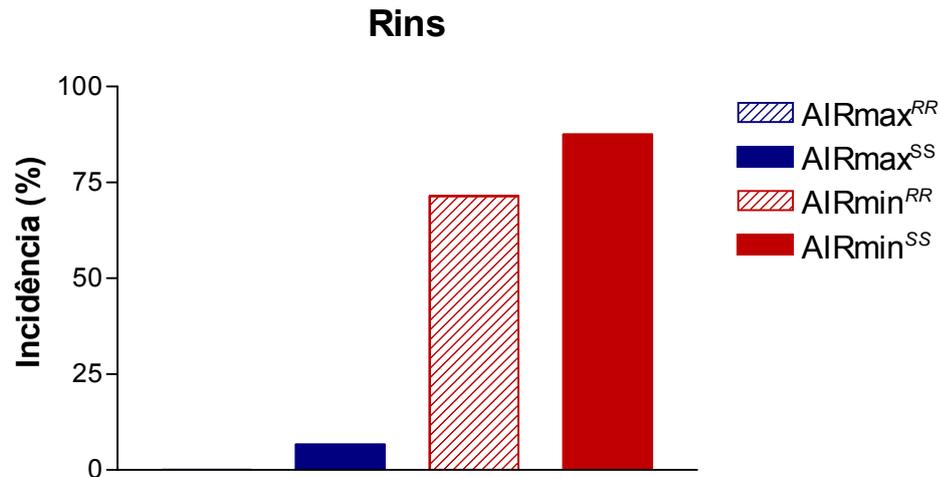
Figura 13 - Incidência de tumores de pulmões em cada sublinhagem tratada com DMBA.



Foram utilizados animais controles (n=4, para cada sublinhagem) e experimentais (n=17 para AIRmax^{RR}; n=15 para AIRmax^{SS}; n=12 para AIRmin^{RR}; n=14 para AIRmin^{SS}). Resultados expressos em porcentagem de animais positivos para alterações macroscópicas nos pulmões dentre os animais com câncer. Análise estatística foi feita por tabela de contingência e teste exato de Fisher. **p<0,01. Dados representativos de dois experimentos.

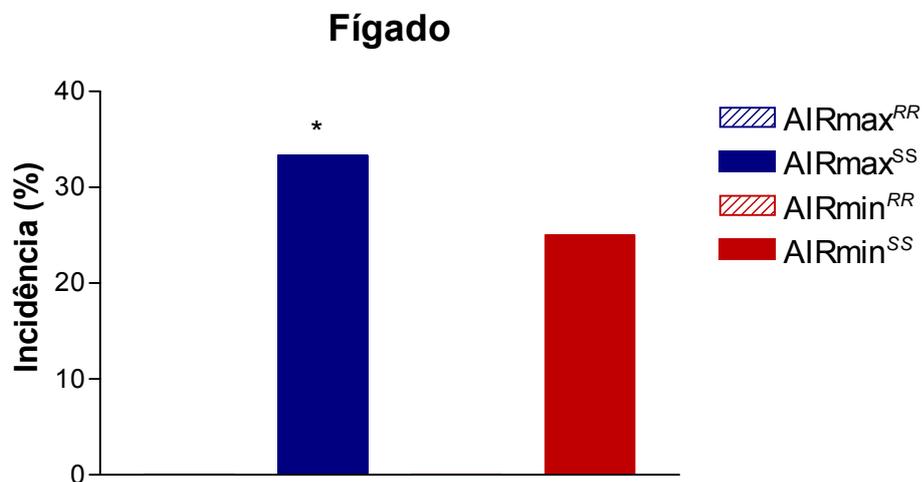
Fonte: Perlati-Santos (2012).

Figura 14 - Incidência de tumores nos rins de cada sublinhagem tratada com DMBA.



Foram utilizados animais controles (n=4, para cada sublinhagem) e experimentais (n=17 para AIRmax^{RR}; n=15 para AIRmax^{SS}; n=12 para AIRmin^{RR}; n=14 para AIRmin^{SS}). Resultados expressos em porcentagem de animais positivos para alterações macroscópicas nos rins dentre os animais com câncer. Análise estatística foi feita por tabela de contingência e teste exato de Fisher. **p<0,01. Dados representativos de dois experimentos. Fonte: Perlati-Santos (2012).

Figura 15 - Incidência de tumores no fígado em cada sublinhagem tratada com DMBA.



Foram utilizados animais controles (n=4, para cada sublinhagem) e experimentais (n=17 para AIRmax^{RR}; n=15 para AIRmax^{SS}; n=12 para AIRmin^{RR}; n=14 para AIRmin^{SS}). Resultados expressos em porcentagem de animais positivos para alterações macroscópicas no fígado dentre os animais com câncer. Análise estatística foi feita por tabela de contingência e teste exato de Fisher. *p<0,05.. Dados representativos de dois experimentos. Fonte: Perlati-Santos (2012).

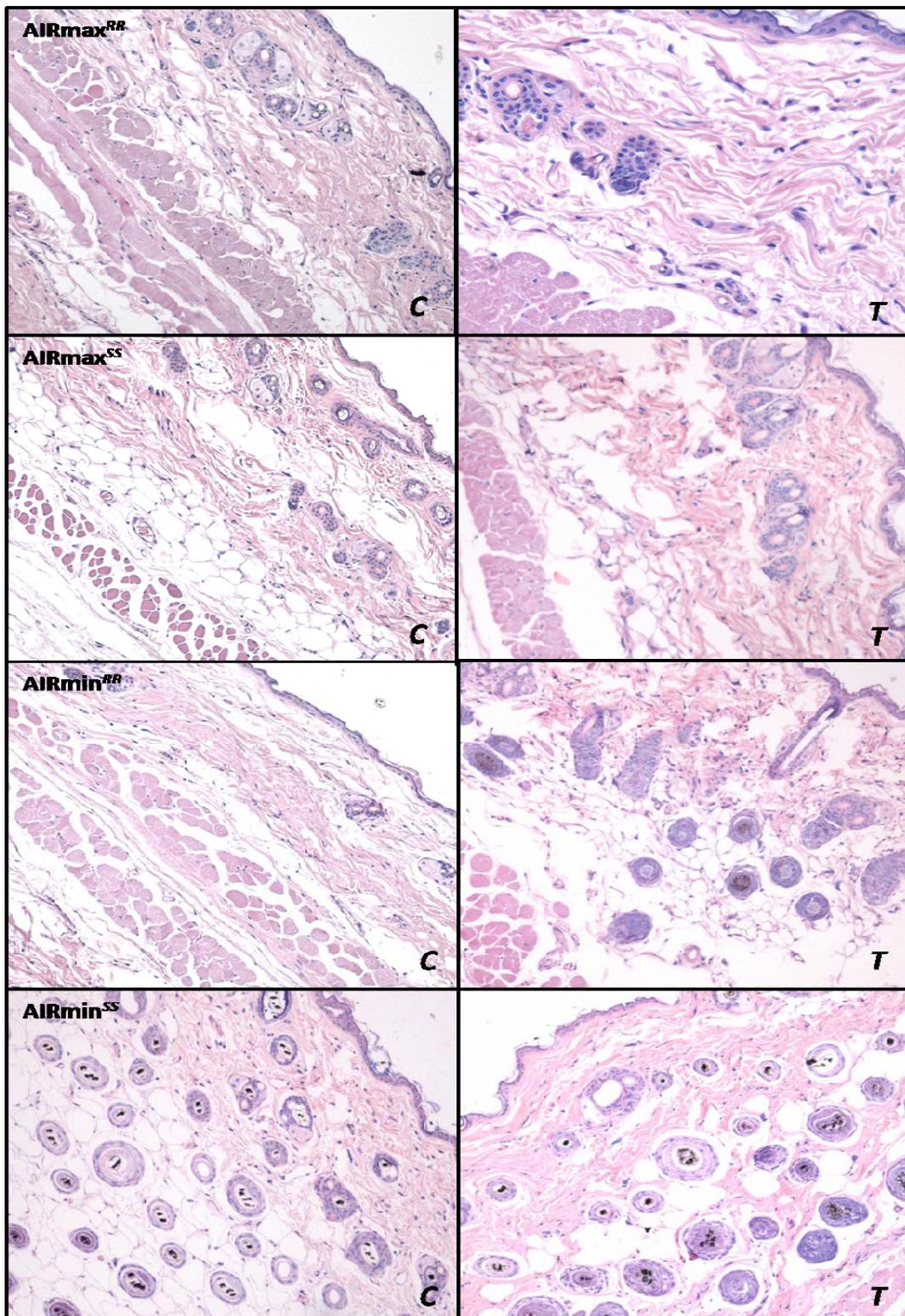
4.3 Análise histológica da pele e órgãos internos

Esta análise teve como objetivo uma caracterização de alterações causadas pelo tratamento com o agente DMBA na pele dos animais das diferentes sublinhagens. A detecção de diferenças na estrutura histológica entre os animais, assim como os tipos celulares envolvidos na reação ao agente em questão é de extrema importância para a compreensão das possíveis diferenças no comportamento dos animais frente ao processo de carcinogênese. Para isso, os animais foram tratados de duas formas diferentes: primeiramente, um grupo recebeu uma dose do DMBA, e 24 horas depois, a pele já foi coletada para análise histológica, na tentativa de caracterizar a inflamação bem no seu início. Outro grupo de animais foi então tratado conforme o protocolo padrão, por 5 dias consecutivos com DMBA e após 48 horas e 30 dias do término deste tratamento, amostras de pele dos animais foram coletadas e processadas. A coloração foi feita por HE.

No grupo que recebeu somente uma dose de DMBA, a pele não demonstrou alterações dignas de nota entre os animais tratados e seus controles. Também não houve diferença significativa quando as quatro sublinhagens foram comparadas entre si (**Figura 16**).

No grupo que recebeu o tratamento padrão, de 5 doses consecutivas de DMBA, os animais da sublinhagem AIRmax^{RR} não apresentaram alterações na pele em nenhum dos períodos analisados. A organização histológica se manteve normal, com camada de queratina de espessura normal (**Figura 17A**).

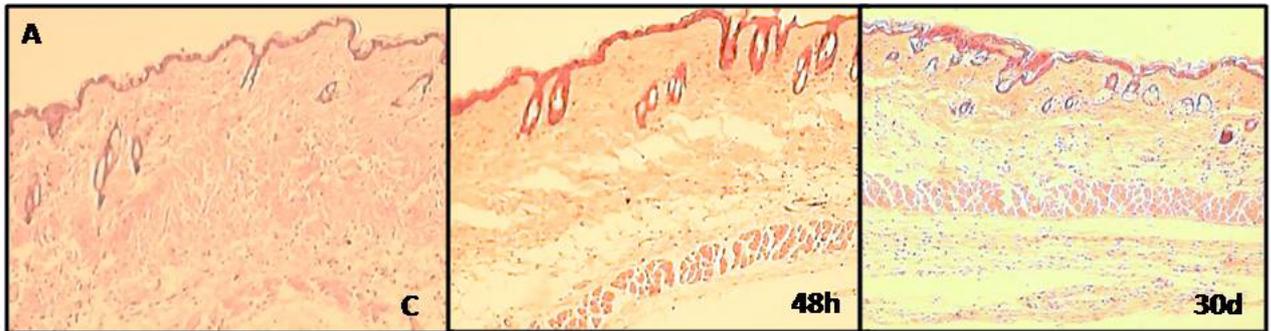
Figura 16 - Cortes histológicos de pele das sublinhagens AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}.



Análise após o tratamento apenas com acetona (**C**) ou com apenas uma dose de DMBA (**T**).Coloração por HE, aumento de 10X.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

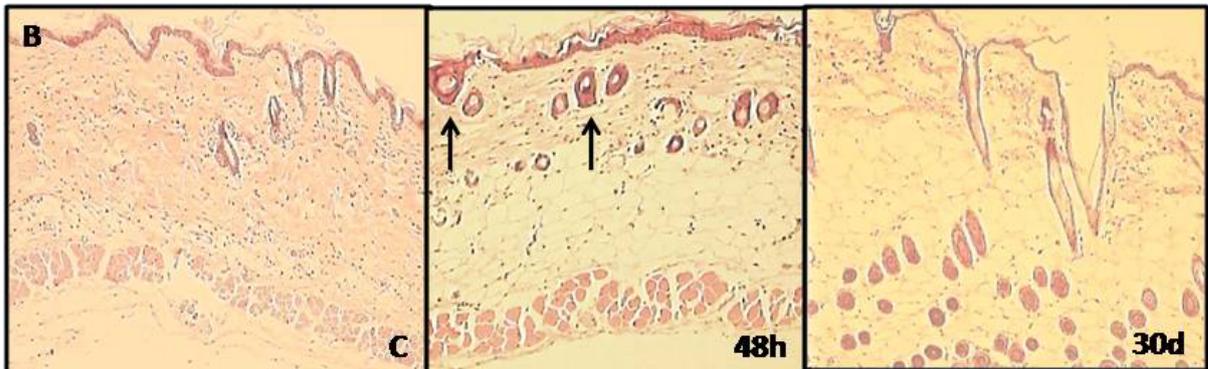
Figura 17A - Cortes histológicos de pele dos grupos Controle (C), 48 horas (48h) e 30 dias (30d).



Análise após o tratamento com DMBA representativos da sublinhagem AIRmax^{RR}. Coloração por HE, aumento de 10X.
 Fonte: Perlati-Santos (2012).

Nos animais AIRmax^{SS} foi possível observar uma pele sem alterações dignas de nota, porém mais delicada já nos animais do grupo controle e a camada de queratina mais espessa. No período de 48 horas após o término do tratamento, estes mesmos animais demonstraram uma quantidade grande de adipócitos e a presença de papilas dérmicas com represamento de queratina que podem ser características de carcinomas, porém não são patognomônicas. As células circundantes destas regiões não demonstraram mitoses, inferindo que estas formações não são neoplásicas. A epiderme demonstrou hiperqueratose. No período de 30 dias após o término do tratamento, as lâminas mostraram que os folículos pilosos começaram a invadir a região de adipócitos, podendo representar proliferação ou desorganização do tecido. Estes se apresentaram com aspecto normal de folículo piloso com glândula anexa. A espessura da derme foi muito reduzida, e as papilas dérmicas não estão mais presentes (**Figura 17B**).

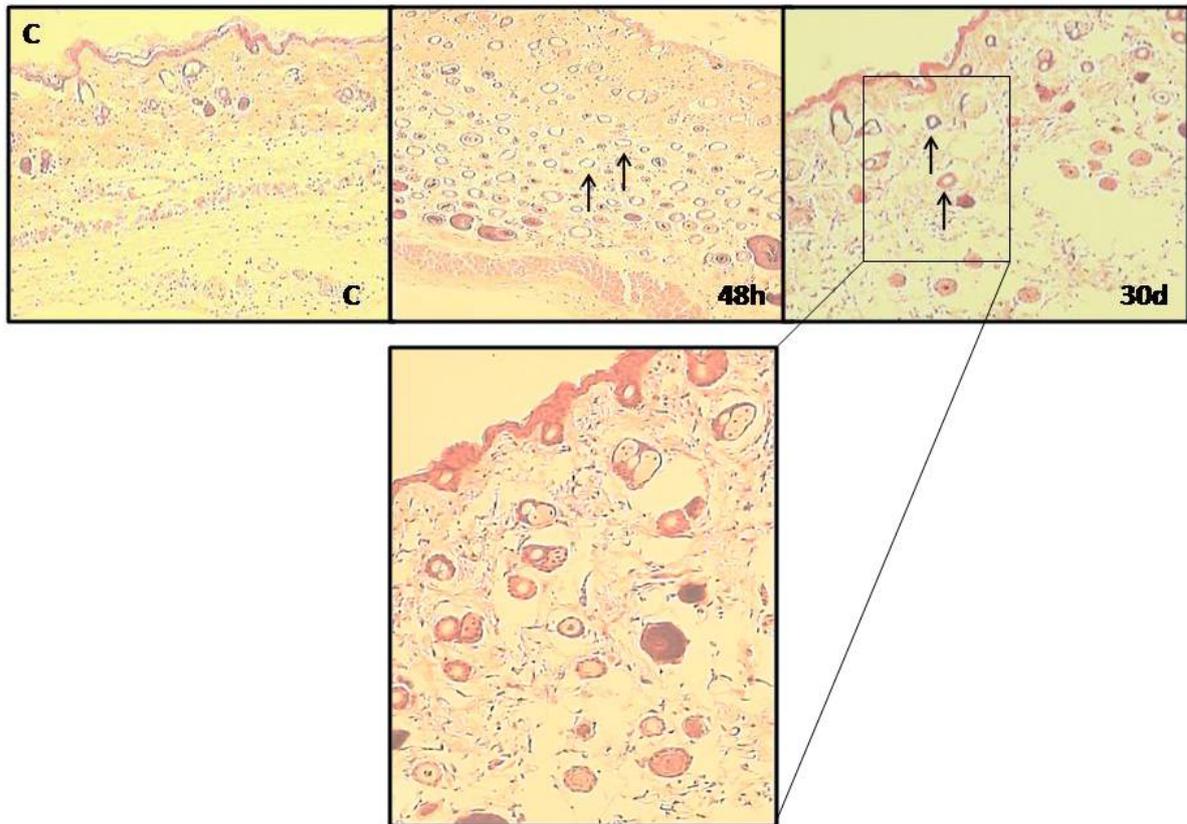
Figura 17B - Cortes histológicos de pele dos grupos Controle (C), 48 horas (48h) e 30 dias (30d).



Análise após o tratamento com DMBA representativos da sublinhagem AIRmax^{SS}. Coloração por HE, aumento de 10X. As setas indicam papilas dérmicas.
Fonte: Perlati-Santos (2012).

A sublinhagem AIRmin^{RR} possui aparentemente celularidade maior na derme nos animais controle, com camada maior de fibroblastos, porém aparentemente normal. Entretanto, as lâminas do período de 48 horas mostraram formações circulares com acúmulo de melanina em seu interior com células glandulares ao redor, podendo representar formação pré-neoplásica na epiderme. Os animais não apresentaram infiltrado celular de fase aguda, mostrando apenas infiltrado de macrófagos e linfócitos, porém não muito abundante e de difícil identificação. Esse infiltrado de característica mais crônica pôde ser caracterizado por um processo de dermatite mononuclear. Além disso, os animais apresentaram uma aparente alteração na arquitetura, com células em diversos estágios de divisão e pêlos e anexos em proliferação. Isto é mais um sinal indicativo de lesão pré-neoplásica. No período de 30 dias após o tratamento, os animais apresentaram edema na derme, com dissociação da matriz devido à presença de líquido. Foi identificado intenso processo inflamatório e região de hiperplasia de células epidermais (resolução). Apresentaram também melhora em relação às formações circulares com acúmulo de melanina, porém estas não se extinguiram (**Figura 17C**).

Figura 17C - Cortes histológicos de pele dos grupos Controle (C), 48 horas (48h) e 30 dias (30d).

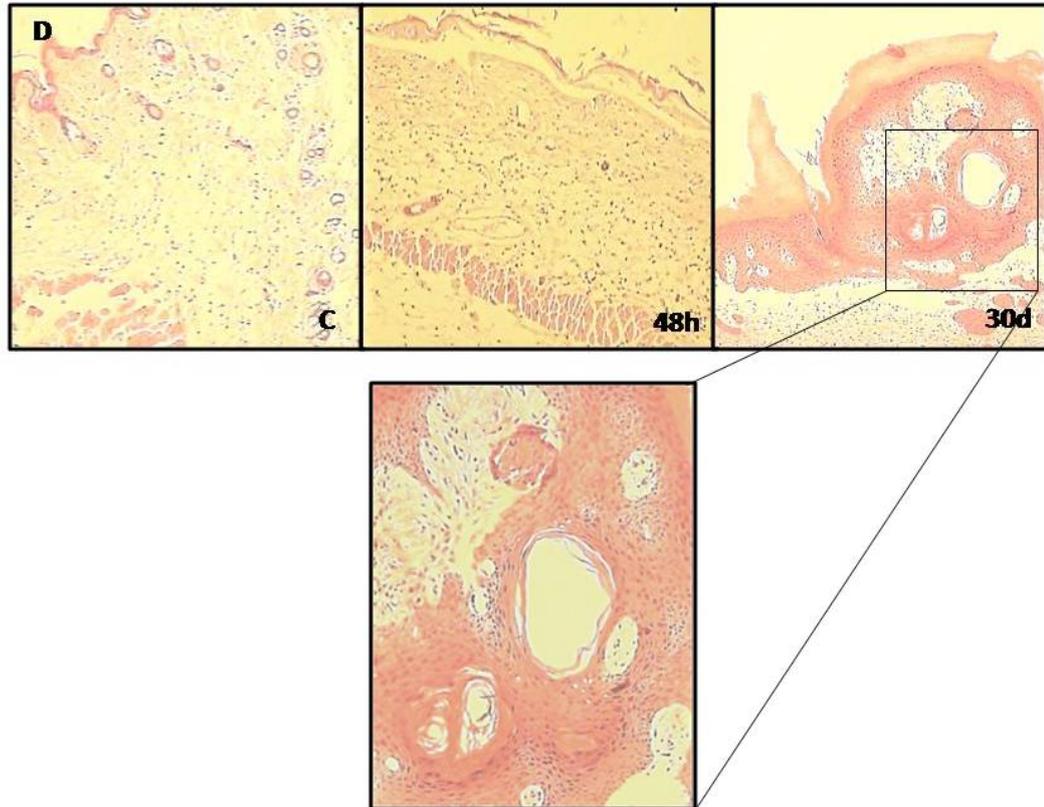


Análise após o tratamento com DMBA representativos da sublinhagem AIRmin^{RR}. Coloração por HE, aumento de 10X. As setas apontam formações circulares com acúmulo de melanina em seu interior com células glandulares ao redor. A região em destaque foi fotografada no aumento de 20X.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

As lâminas histológicas da sublinhagem AIRmin^{SS} mostraram-se sem alterações nos animais controle. No período de 48 horas pós-tratamento, grande inflamação pôde ser observada, inclusive leucócitos aderentes no endotélio vascular. Este infiltrado celular foi constituído principalmente de macrófagos. Linfócitos e neutrófilos não foram identificados. Aos 30 dias após o tratamento, a pele dos animais mostrou células em diversos estágios de divisão, alteração altamente indicativa de lesão neoplásica maligna. Além disso, houve também diminuição de anexos da pele (**Figura 17D**).

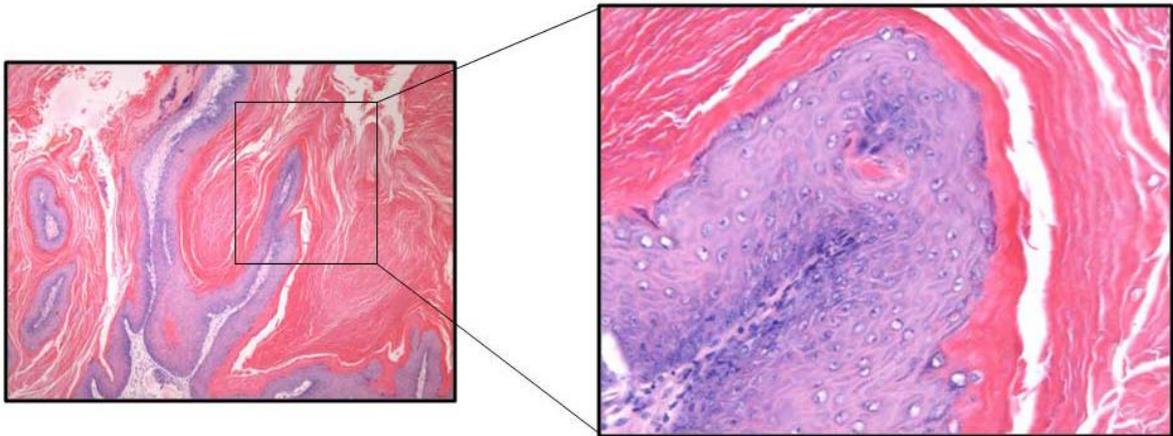
Figura 17D - Cortes histológicos de pele dos grupos Controle (C), 48 horas (48h) e 30 dias (30d).



Análise após o tratamento com DMBA representativos da sublinhagem AIRmin^{SS}. Coloração por HE, aumento de 10X. A região em destaque foi fotografada no aumento de 20X.
Fonte: Perlati-Santos (2012).

As lesões neoplásicas benignas denominadas papilomas mostraram, em análise microscópica, trecho da epiderme com hiperplasia papiliforme com hiperqueratose ortoqueratótica adjacente à epiderme regular. Na derme, foi possível em alguns momentos evidenciar moderado infiltrado inflamatório de mastócitos, ora em derme mais superficial, ora mais profundamente. Também foram encontradas células mononucleadas e alguns melanófagos (**Figura 18**).

Figura 18 - Corte histológico de papiloma de um animal AIRmin^{SS}.

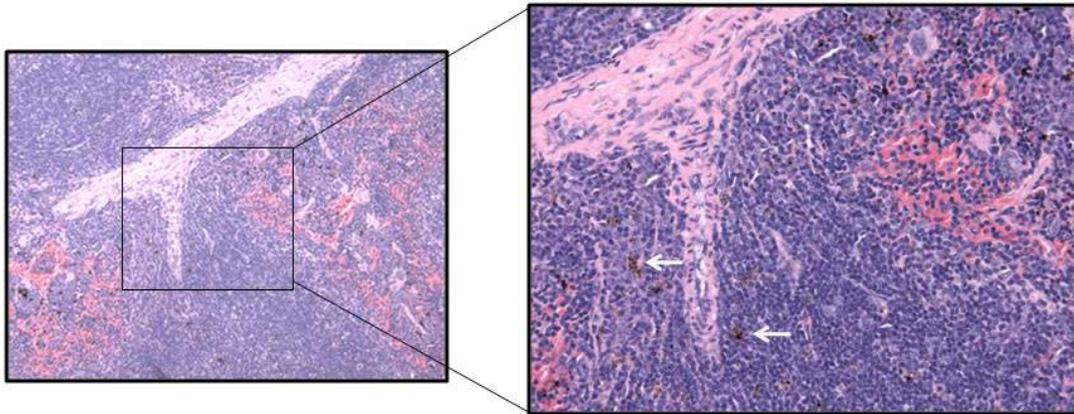


Coloração por HE, aumento de 5X. A região em destaque foi fotografada no aumento de 20X.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

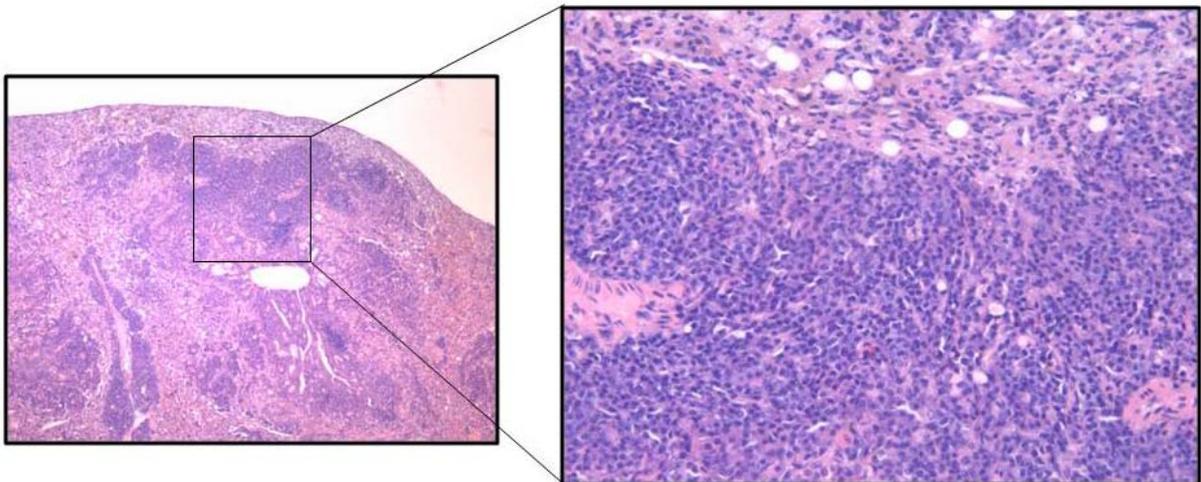
A confirmação histológica das lesões sugestivas de malignidade foi realizada nos pulmões, rins, fígado e baço. Nos baços as lesões analisadas não foram características de malignidade, mostrando apenas hiperplasia em polpa branca, megacariócitos intersticiais e alguns focos de macrófagos com hemossiderina em algumas lâminas (**Figura 19**). Entretanto, nos pulmões foi possível observar áreas nodulares coalescentes de proliferação de célula redonda, evidenciando pleomorfismo celular e nuclear discretos, citoplasma escasso e acidófilo, núcleo redondo e hiper cromático e atividade mitótica atípica discreta. Entre os nódulos, foi possível observar infiltrado inflamatório eosinofílico. Estas células redondas em proliferação são condizentes com neoplasia maligna de célula redonda, ou seja, linfoma. Dessa forma, as lesões pulmonares analisadas histologicamente sugerem metástase de linfoma (**Figura 20**).

Figura 19 - Corte histológico de baço de um animal AIRmin^{SS}.



Coloração por HE, aumento de 10X. A região em destaque foi fotografada no aumento de 20X e enfatiza os macrófagos com hemossiderina (setas).
Fonte: Perlati-Santos (2012).

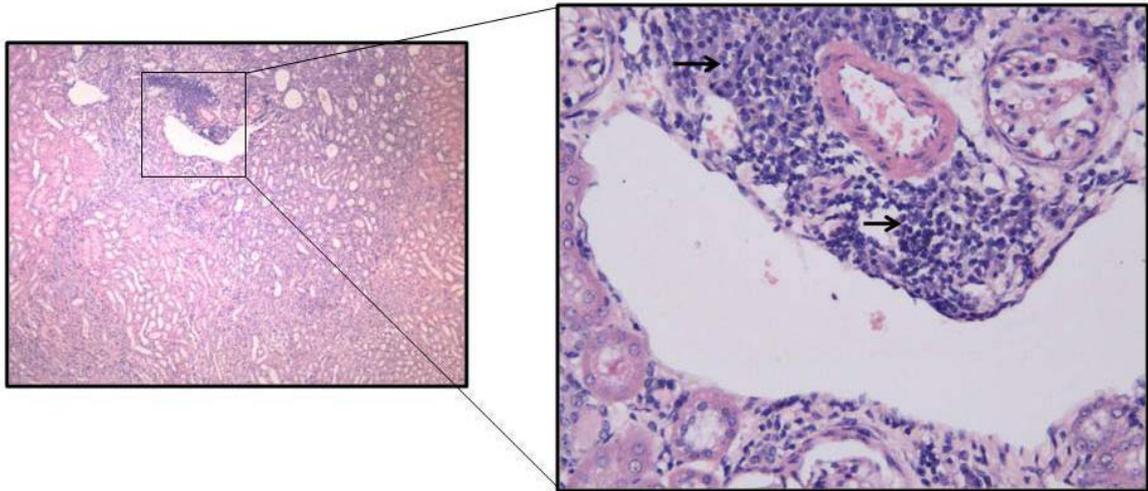
Figura 20 - Corte histológico de pulmão com nódulos tumorais coalescentes de um animal AIRmax^{SS}.



Coloração por HE, aumento de 5X. A região em destaque foi fotografada no aumento de 20X e enfatiza as células redondas.
Fonte: Perlati-Santos (2012).

Nos rins, foi possível observar infiltrado inflamatório, hiperplasia tubular e agrupamentos de células mononucleadas de característica linfóide e hiper Cromáticas, representando possível infiltração de linfoma. (**Figura 21**).

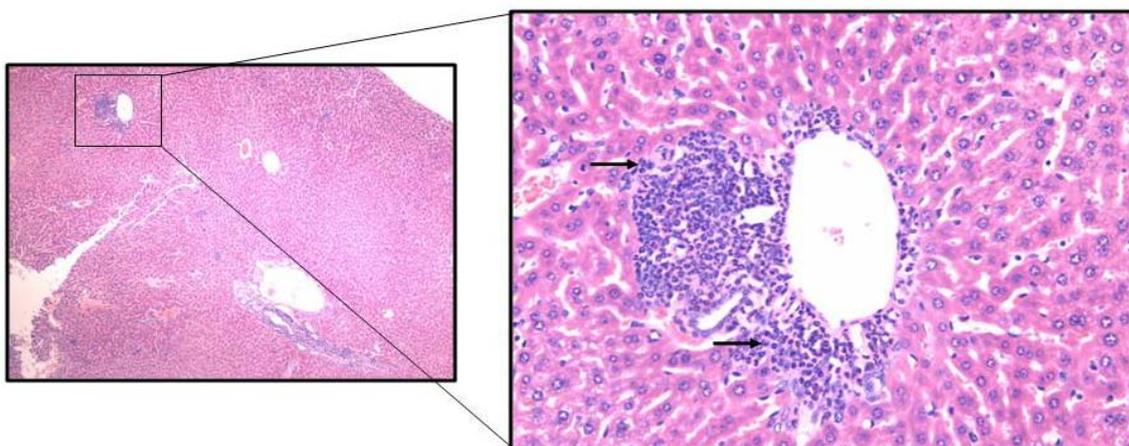
Figura 21 - Corte histológico de rim de um animal AIRmin^{RR}.



Coloração por HE, aumento de 5X. A região em destaque foi fotografada no aumento de 20X e enfatiza o infiltrado inflamatório (setas).
 Fonte: Perlati-Santos (2012).

No fígado dos animais acometidos com lesões, foi possível observar congestão, leucocitose sinusoidal, hepatócitos em atividade mitótica e algumas células mononucleadas de característica linfóide e hiper Cromáticas, que representam também possível infiltração de linfoma (**Figura 22**).

Figura 22 - Corte histológico de fígado de um animal AIRmax^{SS}.



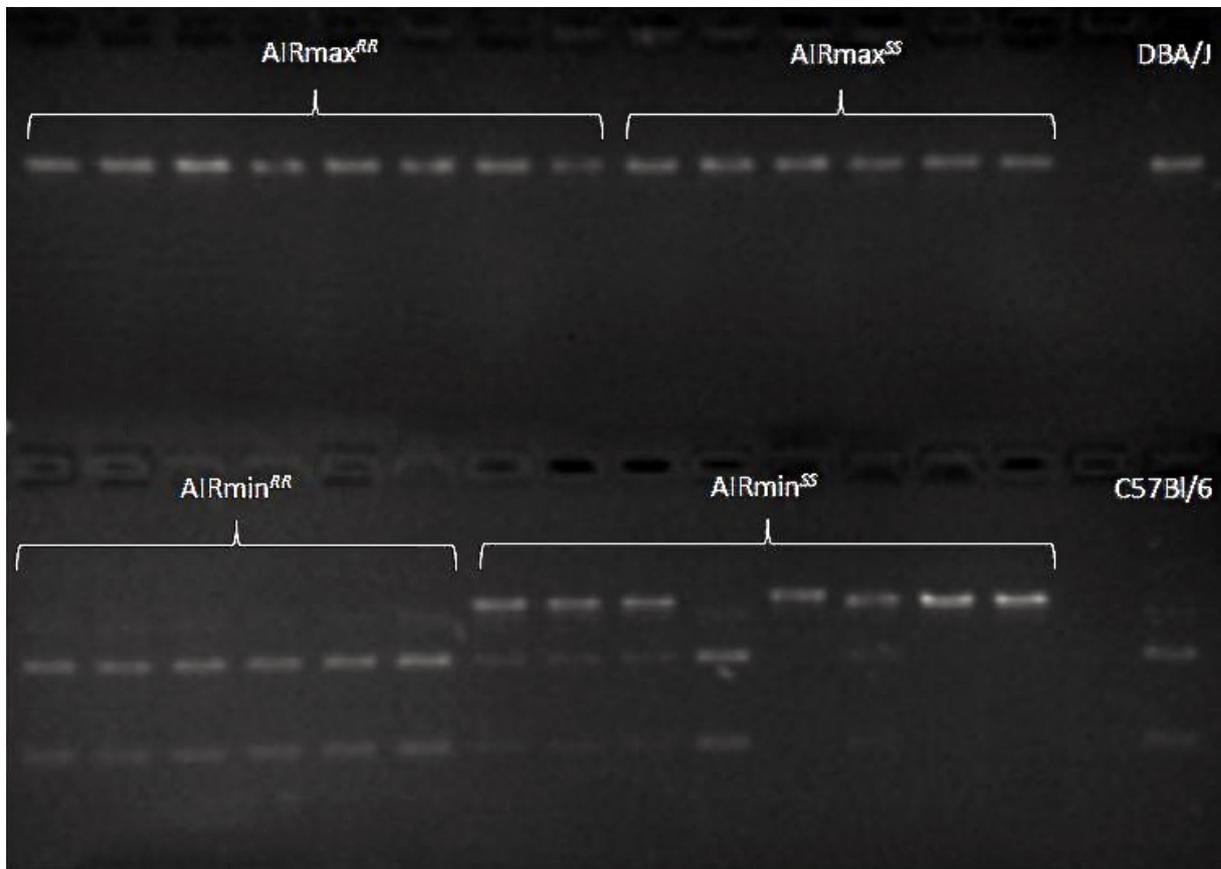
Coloração por HE, aumento de 5X. A região em destaque foi fotografada no aumento de 20X e enfatiza o infiltrado inflamatório (setas).
 Fonte: Perlati-Santos (2012).

4.4 Análise de polimorfismo no gene *Ahr*

Durante o processo de seleção para a obtenção das quatro sublinhagens homocigotas para os alelos *R* ou *S* do gene *Slc11a1*, não era possível afirmar que os animais ficaram em homocigose para os alelos do gene *Ahr*. Era de se esperar que os animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} tivessem, em sua maioria, o alelo *Ahr^d* em homocigose, já que animais AIRmax o possuíam. Dos animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}, esperávamos que tivessem majoritariamente o alelo *Ahr^{b1}* em homocigose, como os animais AIRmin. Dessa forma, para podermos correlacionar os resultados também com as possíveis diferenças quanto aos alelos do *Ahr* portados, realizamos a análise de polimorfismos neste gene. Assim, foi possível evidenciar que todos os animais AIRmax de ambas as sublinhagens, *R* e *S*, estão fixados em homocigose quanto ao alelo *Ahr^d* (**Figura 23**), confirmando que estes animais possuem o receptor de baixa afinidade aos HPAs.

Todos os animais AIRmin^{RR} mostraram que estão em homocigose para o alelo *Ahr^{b1}*, o que confere a estes animais o receptor de alta afinidade aos HPAs (**Figura 23**). Entretanto, a sublinhagem AIRmin^{SS} não está fixada em homocigose. Dos oito animais analisados, três foram homocigotos para o alelo *Ahr^d*, um animal foi homocigoto para o alelo *Ahr^{b1}*, e os outros quatro animais demonstraram heterocigose, portando um alelo *Ahr^{b1}* e um alelo *Ahr^d* (**Figura 23**).

Figura 23 – Imagem representativa do gel de agarose para análise do polimorfismo no gene *Ahr*.



A imagem foi obtida através do aparelho *Pharmacia Biotech – Image Master VDS*.
Fonte: Perlati-Santos (2012).

4.5 Análise da expressão gênica através de reações de qPCR

Para investigação do papel de algumas citocinas importantes no processo inflamatório e carcinogênico, foi realizada a análise da expressão gênica dos genes responsáveis pela produção destas citocinas e a avaliação de diferenças de expressão entre as linhagens. Esta análise foi realizada com amostras de pele e baço coletadas nos períodos de 48 horas e 30 dias após o término do tratamento com DMBA.

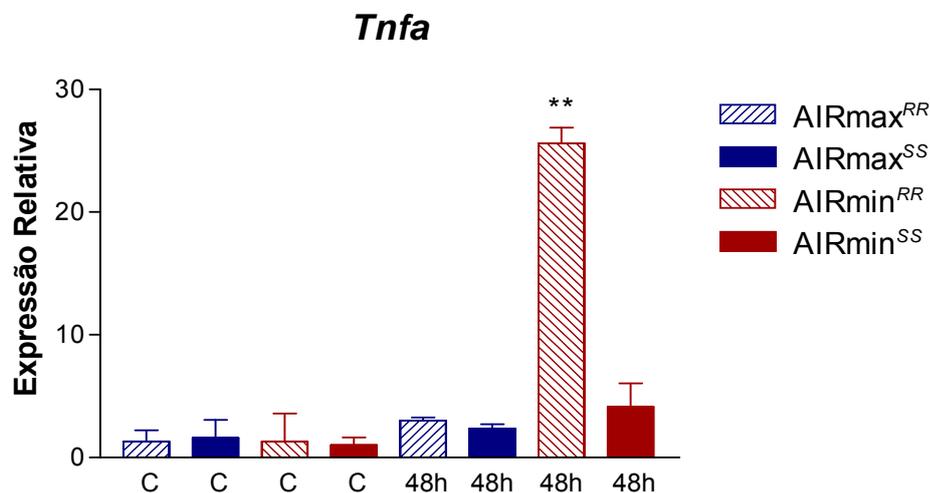
Os genes de escolha foram *Tnfa*, *Il6*, *Tgfb*, *Il1b*, *Cxcl2*, *Ccl2*, *Saa3*, *Il10*, *Il4*, *Il1a* e *Ifng*. Foram testados também os genes *Cd4* e *Cd8* na pele, e *Foxp3*, *Il6*, *Tnfa*, *Ccl2* e *Cxcl2* no baço. As amostras foram normalizadas através da subtração do valor do gene (ΔCt) constitutivo *Ciclofilina* e calibradas através da subtração do ΔCt

dos animais AIRmin^{SS} controle, que respresentaram o calibrador comum, e os resultados finais foram expressos através da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.5.1 Expressão gênica para *Tnfa*

Todos os animais mostraram uma expressão basal de *Tnfa* e em ambos os períodos de 48 horas e 30 dias. Entretanto, nos animais AIRmin^{RR} tratados com DMBA foi possível observar que o nível de mRNA 48 horas após a conclusão do tratamento foi muito maior quando comparado as outras sublinhagens e ao seu controle. Em relação ao seu controle, a expressão de *Tnfa* nestes animais foi 13 vezes maior, mostrando diferença altamente significativa (**Figura 24**). Os animais AIRmin^{SS} mostraram expressão 4 vezes maior deste gene em relação aos seus controles, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Aos 30 dias, os animais de maneira geral tiveram maior expressão deste gene, porém não houve diferença significativa entre eles.

Figura 24 - Expressão relativa do gene *Tnfa*.



Análise realizada a partir do cDNA obtido da pele dos animais 48 horas após o tratamento com o DMBA (48h) e animais não tratados (C). Foram utilizados animais controle (n=4) e tratados (n=4), sendo 2 machos e 2 fêmeas em cada grupo. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e de Tukey. **p<0,001.

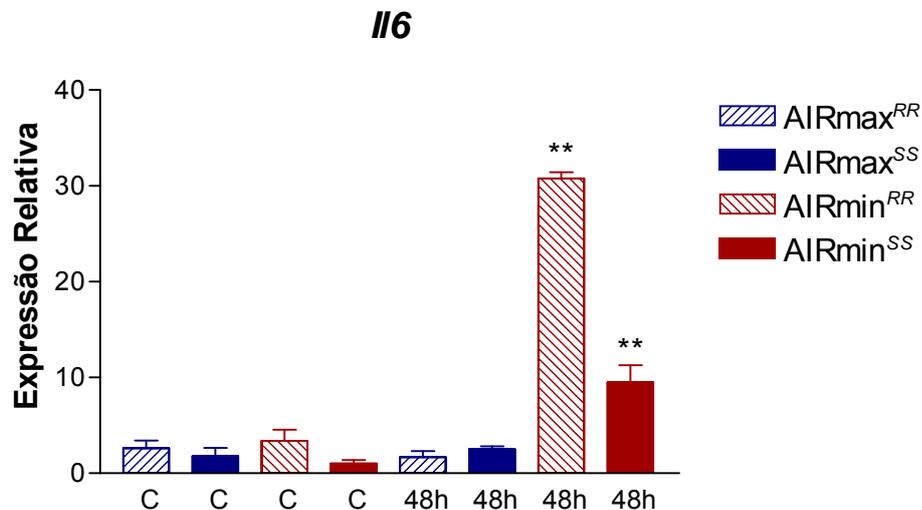
Fonte: Perlati-Santos (2012).

Não foi observada diferença significativa entre os animais no baço em ambos os períodos de 48 horas e 30 dias após o tratamento.

4.5.2 Expressão gênica para *Il6*

Como é possível observar na **Figura 25**, os animais AIRmin^{RR} tratados tiveram expressão do gene *Il6* mais elevada quando comparados aos animais controle da mesma linhagem, sendo esta expressão 9 vezes maior. Os animais AIRmin^{SS} também mostraram uma alta expressão para este gene, também com valor próximo de 9 vezes maior que os animais controle. Os animais AIRmax de ambas as sublinhagens não mostraram diferenças significativas na expressão do gene *Il6*, assim como não foram detectadas diferenças na expressão deste gene no baço dos animais no período de 48 horas.

Figura 25 - Expressão relativa do gene *Il6*.



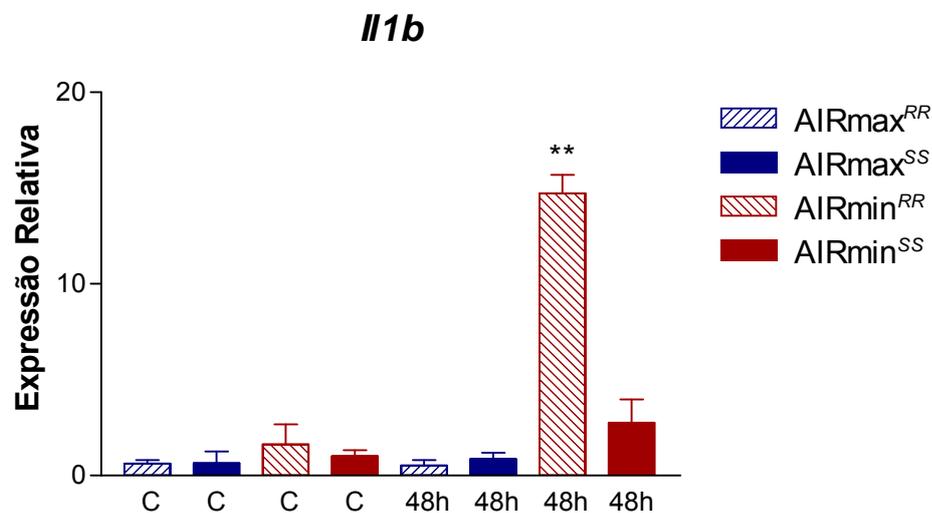
Análise realizada a partir do cDNA obtido da pele dos animais 48 horas após o tratamento com o DMBA (48h) e animais não tratados (C). Foram utilizados animais controle (n=4) e tratados (n=4), sendo 2 machos e 2 fêmeas em cada grupo. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e de Tukey. **p<0,001.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

4.5.3 Expressão gênica para *Il1b*

Quando o gene avaliado foi o *Il1b*, a pele dos animais AIRmin^{RR} 48 horas após o tratamento demonstrou o mesmo padrão descrito anteriormente, já que estes animais tiveram expressão do gene em questão 9 vezes maior que seus controles (**Figura 26**). Quanto às outras sublinhagens, não foram observadas diferenças importantes na expressão do gene *Il1b*.

Figura 26 - Expressão relativa do gene *Il1b*.



Análise realizada a partir do cDNA obtido da pele dos animais 48 horas após o tratamento com o DMBA (48h) e animais não tratados (C). Foram utilizados animais controle (n=4) e tratados (n=4), sendo 2 machos e 2 fêmeas em cada grupo. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e de Tukey. **p<0,001.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

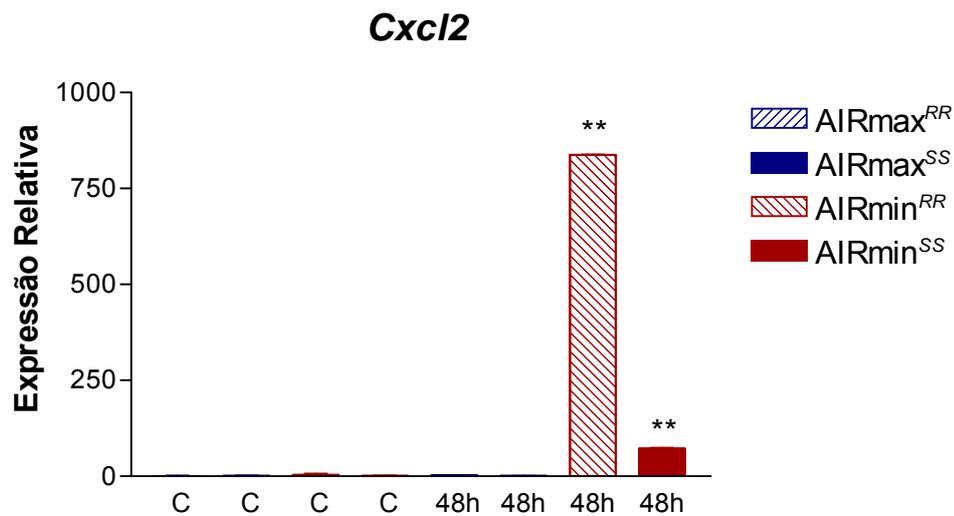
Quando o órgão avaliado foi o baço, nenhuma das sublinhagens demonstrou diferença significativa na expressão no período de 48 horas após o término do tratamento.

4.5.4 Expressão gênica para *Cxcl2*

A expressão para o gene *Cxcl2* foi um dos resultados mais interessantes. A expressão na pele no período de 48 horas após o término do tratamento foi altamente significativa nos animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}, chegando a ser mais de

215 vezes maior que seus controles no primeiro grupo, e 72 vezes maior que seus controles no segundo grupo (**Figura 27**). As outras sublinhagens não demonstraram diferenças significativas. No período de 30 dias após o término do tratamento, tampouco foram observadas diferenças entre as sublinhagens.

Figura 27 - Expressão relativa do gene *Cxcl2*.

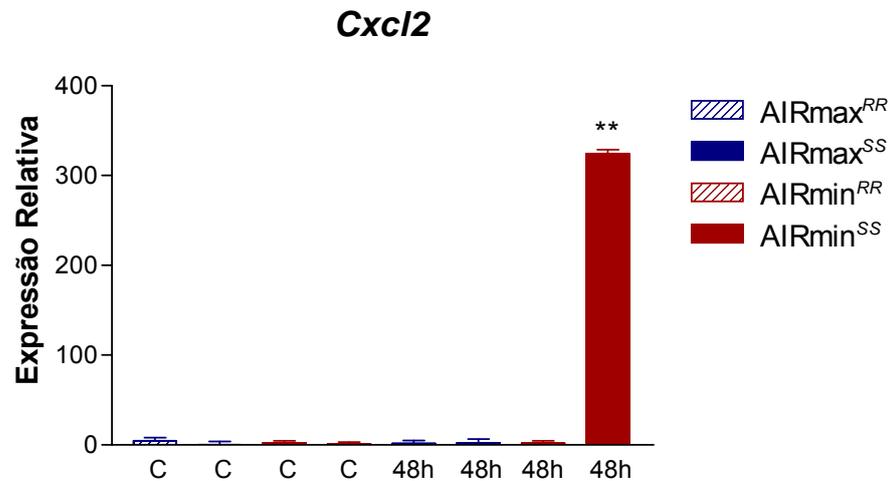


Análise realizada a partir do cDNA obtido da pele dos animais 48 horas após o tratamento com o DMBA (48h) e animais não tratados (C). Foram utilizados animais controle (n=4) e tratados (n=4), sendo 2 machos e 2 fêmeas em cada grupo. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e de Tukey. **p<0,001.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

Entretanto, quando a expressão foi avaliada no baço dos animais, no período de 48 horas após o tratamento, quem mais expressou este gene foram os animais da sublinhagem AIRmin^{SS}, mostrando uma expressão quase 325 vezes maior que seus controles (**Figura 28**). Por sua vez, os animais AIRmin^{RR} apesar de terem expressão 32 vezes maior que seus controles, não mostraram significância quanto a esta observação, nem os animais das outras sublinhagens.

Figura 28 - Expressão relativa do gene *Cxcl2*.

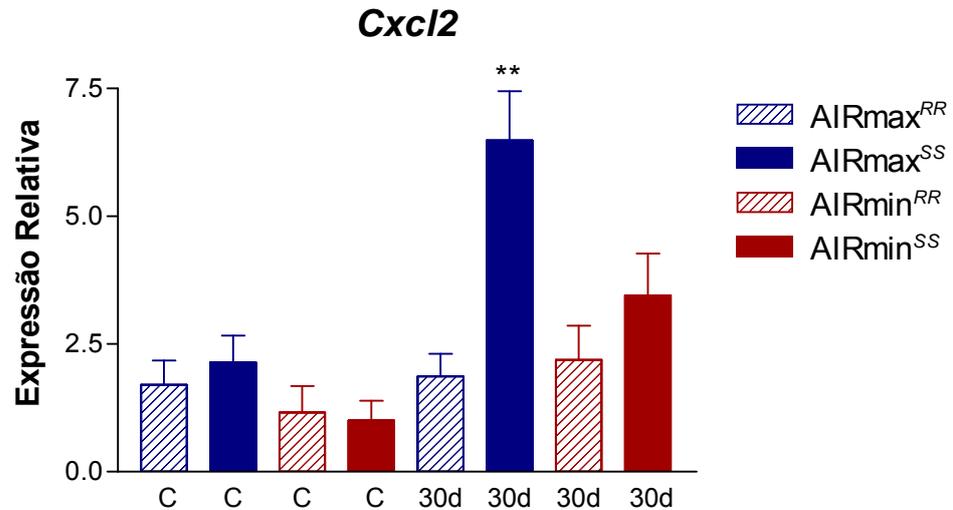


Análise realizada a partir do cDNA obtido do baço dos animais 48 horas após o tratamento com o DMBA (48h) e animais não tratados (C). Foram utilizados animais controle (n=4) e tratados (n=4), sendo 2 machos e 2 fêmeas em cada grupo. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e de Tukey. **p<0,001.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

A observação realizada no baço no período de 30 dias diferiu das análises anteriores. Neste período, quem demonstrou a maior expressão foi o grupo tratado dos animais AIRmax^{SS}, que expressaram 3 vezes mais o gene *Cxcl2* que seus animais controle (**Figura 29**). Os outros animais não tiveram diferenças significativas na expressão de *Cxcl2* no baço neste período.

Figura 29 - Expressão relativa do gene *Cxcl2*.



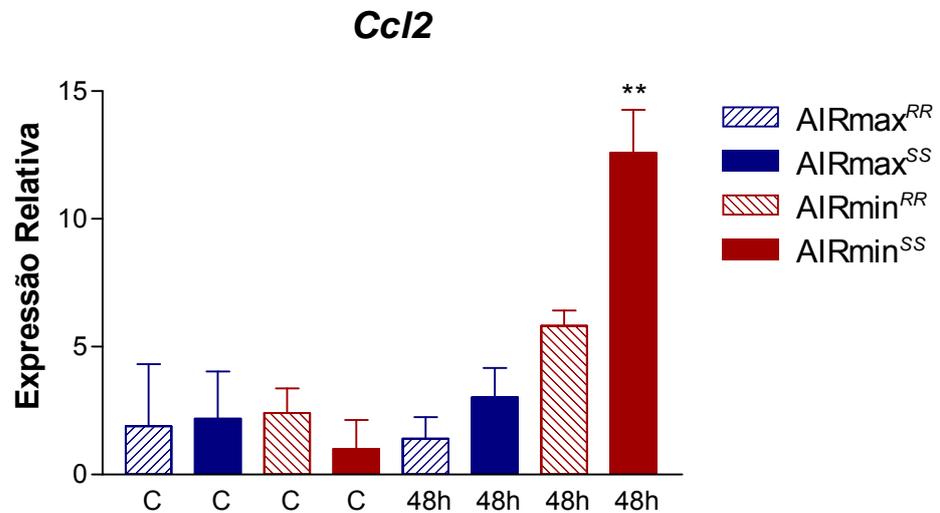
Análise realizada a partir do cDNA obtido do baço dos animais 30 dias após o tratamento com o DMBA (30d) e animais não tratados (C). Foram utilizados animais controle (n=4) e tratados (n=4), sendo 2 machos e 2 fêmeas em cada grupo. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e de Tukey. **p<0,01.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

4.5.5 Expressão gênica para *Ccl2*

Tratando-se da expressão de *Ccl2*, no período de 48 horas, a sublinhagem AIRmin^{SS} foi a de maior expressão na pele, sendo que os animais tratados o expressaram 12 vezes mais que os seus controles (**Figura 30**). Os outros animais não mostraram diferença significativa na expressão nem interlinhagem, nem entre controles e experimentais da mesma linhagem. A análise aos 30 dias após o tratamento também não mostrou diferenças significativas na expressão do gene *Ccl2* na pele entre nenhuma sublinhagem e controles e experimentais.

Figura 30 - Expressão relativa do gene *Ccl2*.

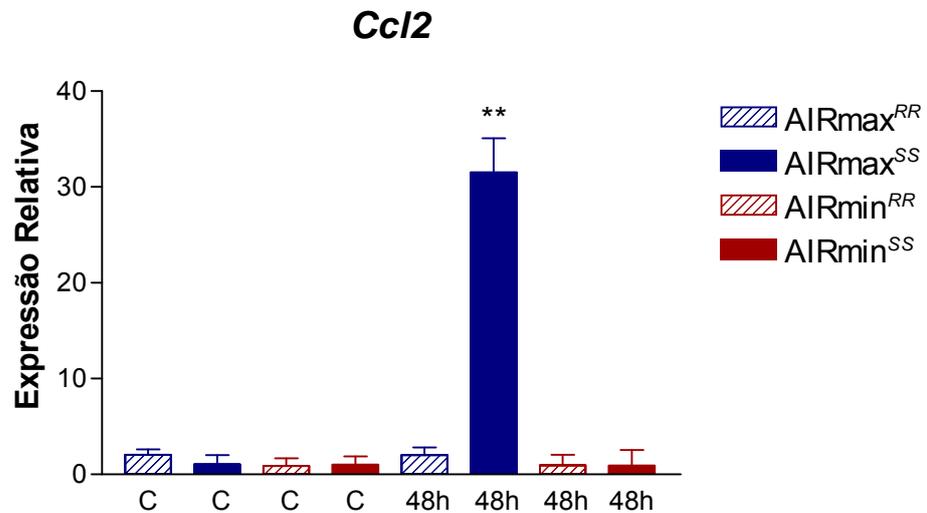


Análise realizada a partir do cDNA obtido da pele dos animais 48 horas após o tratamento com o DMBA (48h) e animais não tratados (C). Foram utilizados animais controle (n=4) e tratados (n=4), sendo 2 machos e 2 fêmeas em cada grupo. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e de Tukey. **p<0,001.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

No baço, a diferença na expressão do gene *Ccl2* no período de 48 horas foi altamente significativa entre animais controles e experimentais da sublinhagem AIRmax^{SS}, diferença esta que foi de aproximadamente 30 vezes (**Figura 31**). Quando o período em análise foi o de 30 dias, os animais não demonstraram diferenças importantes na expressão deste gene no baço.

Figura 31 - Expressão relativa do gene *Ccl2*.



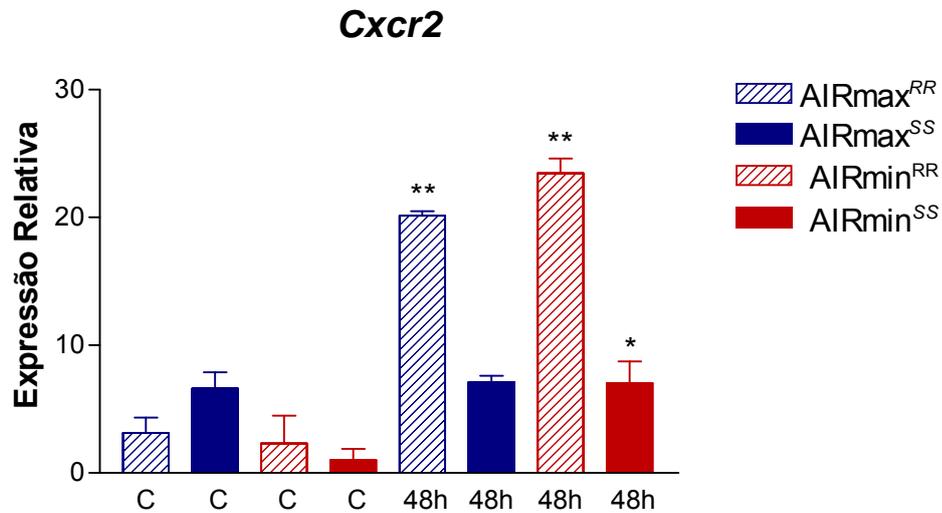
Análise realizada a partir do cDNA obtido do baço dos animais 48 horas após o tratamento com o DMBA (48h) e animais não tratados (C). Foram utilizados animais controle (n=4) e tratados (n=4), sendo 2 machos e 2 fêmeas em cada grupo. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e de Tukey. **p<0,001.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

4.5.6 Expressão gênica para *Cxcr2*

A análise da expressão gênica do *Cxcr2* no baço dos animais não apresentou diferenças significativas em nenhuma sublinhagem. Entretanto, quando comparados aos seus controles, os animais AIRmax^{RR} tiveram expressão 6 vezes maior deste gene na pele, enquanto que a expressão foi 10 vezes maior nos animais AIRmin^{RR} e 7 vezes maior nos camundongos AIRmin^{SS}. Os camundongos AIRmax^{SS} não mostraram diferença significativa na pele quando comparados aos seus controles (**Figura 32**).

Figura 32 - Expressão relativa do gene *Cxcr2*.

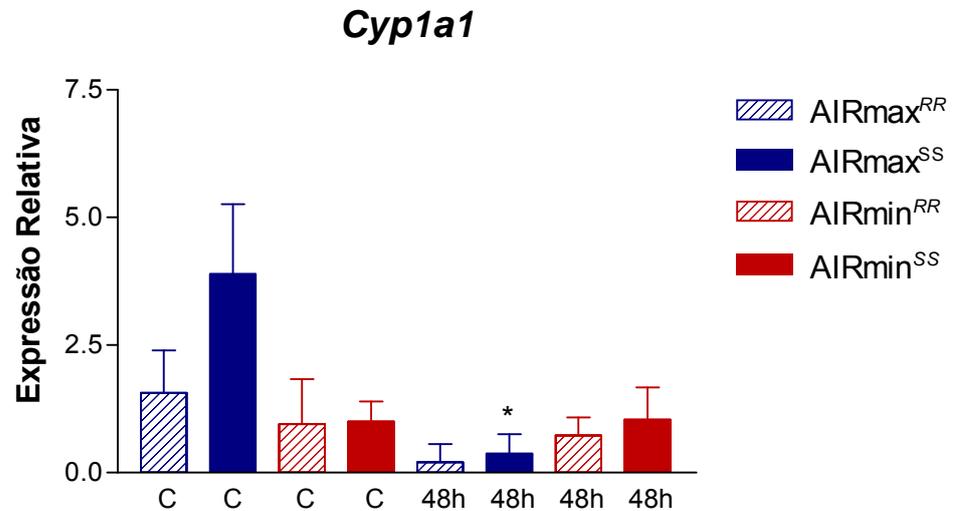


Análise realizada a partir do cDNA obtido da pele dos animais 48 horas após o tratamento com o DMBA (48h) e animais não tratados (C). Foram utilizados animais controle (n=4) e tratados (n=4), sendo 2 machos e 2 fêmeas em cada grupo. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e de Tukey. **p<0,001; *p<0,05.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

4.5.7 Expressão gênica para *Cyp1a1*

Quando o gene em questão foi o *Cyp1a1*, ocorreu uma diferença significativa na expressão deste na pele dos animais AIRmax^{SS}, porém o que ocorreu neste caso foi a menor expressão do *Cyp1a1* nos animais tratados em relação aos animais controle (**Figura 33**). Nas demais sublinhagens, não foi observada diferença significativa, nem na pele e nem no baço destes animais.

Figura 33 - Expressão relativa do gene *Cyp1a1*

Análise realizada a partir do cDNA obtido da pele dos animais 48 horas após o tratamento com o DMBA (48h) e animais não tratados (C). Foram utilizados animais controle (n=4) e tratados (n=4), sendo 2 machos e 2 fêmeas em cada grupo. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e de Tukey. * $p < 0,05$.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

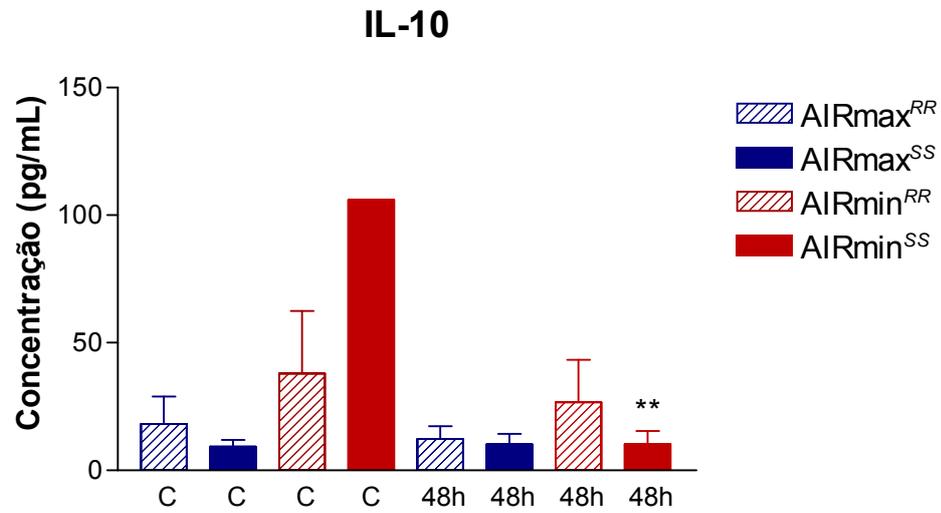
4.5.8 Expressão gênica para os demais genes avaliados

Os genes *Saa3*, *Il10*, *Il4*, *Il1a* e *Ifng*, *Cd4* e *Cd8* na pele e *Foxp3*, *Il6* e *Tnfa* no baço não foram diferentemente expressos entre os animais.

4.6 Quantificação de citocinas séricas

Foram analisadas as citocinas IL-6, IL-10, IL-17, IL-1 β , TNF- α , TGF- β , a quimiocina MIP-2 (CXCL-2) e o fator hematopoiético GM-CSF pelo método Bioplex no soro dos animais controles e tratados com DMBA. Os animais AIRmin^{RR} tratados apresentaram menor concentração de IL-10 no soro em relação aos seus controles (**Figura 27**). Não houve diferenças significativas para qualquer outra citocina analisada no soro por este método.

Figura 34 - Concentração sérica de IL-10 em pg/mL.



Análise realizada 48 horas após o tratamento com o DMBA (48h) e animais não tratados (C). Foram utilizados animais controle (n=3) e tratados (n=4), sendo 2 machos e 1 fêmea no grupo controle e 2 machos e 2 fêmeas nos animais tratados. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e de Tukey. **p<0,001.

Fonte: Perlati-Santos (2012).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Estudos experimentais e epidemiológicos trouxeram grandes evidências de que infecções persistentes e inflamação crônica são condições que predisõem à carcinogênese (ALLAVENA et al., 2011; COUSSENS; WERB, 2002). Mesmo tumores não relacionados à inflamação são caracterizados pela presença de leucócitos reativos e expressão de um grande número de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e enzimas. Embora seja claro que somente a proliferação celular não seja capaz de causar câncer, a proliferação celular sustentada num ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento, estroma ativado e agentes promotores de danos no DNA certamente potencializam o risco neoplásico. A inflamação afeta muitos aspectos de malignidade e em particular sustenta a sobrevivência da célula tumoral, sua proliferação e sua propagação para locais distantes (ALLAVENA et al., 2011; COUSSENS; WERB, 2002).

Os animais das linhagens geneticamente modificadas para alta (AIRmax) e baixa (AIRmin) resposta inflamatória aguda demonstraram o papel do controle genético de tal resposta na suscetibilidade ou resistência não só à tumores, mas também a infecções, autoimunidade e alergia (ARAÚJO et al., 1998; BIOZZI et al., 1998; MARIA et al., 2001, 2003; RIBEIRO et al., 2005). Mais que isso, sabe-se que estes animais possuem desequilíbrio de frequência dos alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1*, os quais interagem com os *loci* reguladores de alta e baixa inflamação aguda, modulando diferentemente a sensibilidade às patologias citadas.

Assim, neste trabalho foi utilizado um protocolo de carcinogênese de pele quimicamente induzida aplicado nas sublinhagens dos animais AIRmax e AIRmin. Tal protocolo utilizou um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA), o DMBA, que necessita de ativação metabólica pelo citocromo P450 em conjunto com a enzima microsomal epóxido hidrolase (mEH) para comportar-se como carcinógeno efetivo (BUTERS, 2003). O carcinógeno foi aplicado epicutaneamente no dorso previamente depilado dos animais por cinco dias consecutivos, seguindo o modelo completo de carcinogênese. Este modelo leva mais rapidamente a uma maior proporção de carcinomas que o modelo com dois estágios para indução (DMBA e TPA) e a um menor número de papilomas, que são neoplasmas benignos, na pele dos animais (LI et al., 2002; SLAGA, 1983). Em nosso estudo, o tratamento com

DMBA desencadeou uma incidência altamente significativa de câncer em órgãos internos nos animais AIRmax^{SS}, atingindo o valor de 100% (**Figura 12**).

A linhagem AIRmax possui melhor controle da resposta inflamatória, característica que contribui para a resistência a carcinogênese, enquanto que animais AIRmin apesar de possuírem resposta inflamatória menos intensa, não são capazes de controlá-la. O interessante é que os animais AIRmax^{SS} também não possuem boa capacidade de controle da resposta inflamatória quando comparados aos AIRmax^{RR} e tendem a cronicar uma forte inflamação. Na **Figura 29**, é possível observar que ainda aos 30 dias, os animais AIRmax^{SS} tem alta expressão do gene da *Cxcl2*, não acompanhada por alta expressão de seu receptor. Já na **Figura 32**, os animais AIRmax^{RR} mostram alta expressão do gene do receptor desta quimiocina, o *Cxcr2* logo às 48 horas, favorecendo uma mais rápida sinalização e posterior controle dos seus efeitos.

Esta menor capacidade de controle da resposta foi evidenciada anteriormente quando os animais foram submetidos à análise da diferença em sua capacidade de reparo tecidual. Animais AIRmax^{SS} foram capazes de reparar a perfuração em suas orelhas completamente, visto que a condição inflamatória crônica é favorável ao reparo tecidual (CANHAMERO et al., 2010; DE FRANCO et al., 2007). Além disso, o perfil dos níveis de MPO, componente de medida indireta da presença de neutrófilos ativados, no local da perfuração também evidenciou essa condição. Os níveis de MPO dos animais AIRmax^{SS}, quando comparados aos AIRmax^{RR}, aumentam mais lentamente e também demoram mais para sofrer regulação negativa (CANHAMERO et al., 2010).

Mais que isso, um estudo sobre a artrite induzida por pristane realizado com os animais das sublinhagens comprovou essa característica dos animais AIRmax^{SS}. A relação de células secretoras de IL-4 com as secretoras de IFN γ (IL-4/IFN γ), foi dobrada nos camundongos AIRmax^{SS} quando comparados aos AIRmax^{RR}, sugerindo uma ativação Th2 preferencial, relacionada à inflamação crônica (PETERS et al., 2007). Estudos com infecção por *Salmonella enterica* sugeriram que a resistência de animais portadores do alelo R do gene *Slc11a1* é devido à produção aumentada de IFN γ e IL-12 pelos macrófagos (LALMANACH et al., 2001), enquanto que em outro trabalho a vacinação contra *Salmonella* mostrou um favorecimento para o produção de IL-4 (SOO et al., 1998). Posteriormente, o alelo S foi relacionado

com a polarização Th2 da resposta durante a infecção por *Salmonella* (CARON et al., 2006).

É interessante observar que ocorre influência pelo alelo portado (*R* ou *S*) somente quando o fundo genético é dos animais AIRmax, visto que não há diferença significativa na suscetibilidade a carcinogênese entre animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}. Isto mostra que a inflamação intensa, porém mais rapidamente controlada, padrão nos animais AIRmax^{RR}, tem papel importante na progressão da doença.

Outro fator que pode ser determinante na suscetibilidade dos animais AIRmax^{SS} pode ser a resposta imune contra células tumorais debilitada devido ao alelo *S* do gene *Slc11a1* que esta sublinhagem carrega. O gene *Slc11a1* possui papel fundamental no *burst* oxidativo e produção de citocinas, podendo fazer com que os macrófagos e polimorfonucleares destes animais desempenhem sua função de maneira deficiente. Isto poderia justificar em parte o desenvolvimento de carcinoma em órgãos internos nestes animais, e não nos animais AIRmax^{RR}. Fritsche e colaboradores mostraram que macrófagos que possuem o alelo *S* do gene *Slc11a1*, denominados RAW-21, apresentaram elevados níveis de RNAm e da própria proteína IL-10. Isto torna estes macrófagos funcionalmente débeis ao reagir à infecção por *S. typhimurium*, já que a alta produção de IL-10 por estas células diminui a atividade de mecanismos microbicidas efetores, como formação de NO ou TNF- α , já conhecidos por serem inibidos pela IL-10 (FRITSCHÉ et al., 2008).

Ainda nesse contexto da resposta imune tumoral, além de o DMBA possuir um efeito carcinogênico, possui também efeito tóxico sobre células da medula e outros órgãos hematopoiéticos. No tratamento dos animais com uma dose de DMBA já é possível observar a redução drástica no número de células mielóides e linfóides na medula óssea de camundongos C57BL/6J (GALVÁN et al., 2006). Animais AIRmax são resistentes a ação tóxica do DMBA na medula óssea (KATZ, 2007). Entretanto, quando a linhagem AIRmax é selecionada para os alelos *R* e *S*, não é possível afirmá-lo, visto que os animais AIRmax^{SS} são suscetíveis ao tratamento e existe grande possibilidade de que essa suscetibilidade também tenha relação com a diminuição de precursores linfóides e mielóides na medula óssea.

O CYP1A1, membro importante da família dos citocromos P450, é um citocromo preferencialmente induzido quando há ativação do AHR. (SHIMADA et al., 2002). Foi observada supressão significativa deste gene na pele dos animais AIRmax^{SS} após 48 horas do término do tratamento com DMBA (**Figura 33**). Isto

pode ter relação com a alta expressão do gene *Ccl2* no baço desses animais (**Figura 31**), que por não ser o órgão alvo da aplicação do DMBA, representa a ação sistêmica do tratamento e, conseqüentemente, o possível aumento desta quimiocina também em outros tecidos. A alta expressão de *Ccl2* pode aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, e estas possuem a capacidade de regular negativamente o gene *Cyp1a1* (MANDREKAR et al., 2011; PATON; RENTON, 1998).

A regulação negativa deste gene deveria diminuir a ação tóxica do DMBA, porém Galván e colaboradores mostraram que a indução ou inibição deste gene em diferentes órgãos não altera a sua atividade imunossupressora na medula óssea (GALVÁN et al., 2005). Dessa forma, sua inibição na pele não altera necessariamente sua ação tóxica imunossupressora na medula óssea, prejudicial no combate a tumores.

Quando submetidos a este protocolo, os animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} apresentaram intensa inflamação na pele (**Figura 6**), o que é amplamente correlacionado com a promoção de carcinomas já que ocorre a indução de proliferação celular, recrutamento de células inflamatórias e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. O comportamento dessas linhagens frente ao nosso protocolo foi diferente do comportamento observado na resposta ao Biogel, já que quando o estímulo utilizado era este último, os animais AIRmax apresentavam maior inflamação. Isto pode ser devido à diferença no alelo do gene *Ahr* que essas linhagens carregam: os animais AIRmax possuem, em sua maioria, os alelos *Ahr^d*, que codificam o receptor de baixa afinidade aos HPAs, conferindo resistência a ação destas substâncias; já os animais AIRmin possuem, em sua maioria, os alelos *Ahr^{b1}*, que codificam o receptor de alta afinidade aos HPAs, tornando-os sujeitos a uma resposta mais intensa ao agente DMBA (DE SOUZA et al., 2009).

Entretanto, quando realizamos a análise do polimorfismo do gene *Ahr* nos camundongos das sublinhagens, este padrão não foi observado nos animais da sublinhagem AIRmin^{SS}, que mostraram indivíduos em homozigose para o alelo *Ahr^d*, em homozigose para o alelo *Ahr^{b1}* e também indivíduos em heterozigose (**Figura 23**). Este resultado é compatível com as diferenças existentes entre animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} quanto à incidência de papilomas, multiplicidade e quanto à incidência de tumores de pele (**Figuras 8-10**). As diferenças não foram significativas, mesmo porque os animais da sublinhagem AIRmin^{SS} não são homogêneos quanto ao gene, mas existem. Entretanto esta diferença fica mais clara quando analisamos

a reação inflamatória na pele após o tratamento. Os camundongos AIRmin^{SS} tiveram significativamente menos animais com reação inflamatória intensa na pele (**Figura 6; Tabela 1**), e a severidade das feridas formadas também foi menor. Sabendo que existe essa heterogeneidade neste grupo quanto aos alelos do *Ahr*, podemos justificar a resistência e a maior sensibilidade em diferentes animais da mesma sublinhagem.

Esta inflamação observada em ambas as sublinhagens AIRmin S e R pôde ser considerada crônica, já que o estímulo inflamatório persiste por dias, não foram encontradas células inflamatórias de fase aguda no exame histológico (**Figuras 17C e 17D**) e estes animais apresentam demora na resolução do processo, levando até 20 dias para o acontecimento deste evento. Num ambiente cronicamente inflamado, problemas nos programas de morte celular e reparo são comuns, resultando na proliferação de células que perderam seu controle de crescimento normal. Além disso, a inflamação crônica carrega a persistência dos fatores iniciais de inflamação, assim como a falha de mecanismos que façam a regulação negativa deste processo (COUSSENS; WERB, 2002). Quimiocinas, citocinas e seus receptores são os atores principais na inflamação relacionada ao câncer, e uma grande variedade destes componentes tem sido detectada no tecido neoplásico como produto não só de células tumorais, mas também de habilidade de invasão celular (BALKWILL; MANTOVANI, 2001).

Os animais AIRmin^{RR} mostraram alta expressão do gene *Tnfa* na pele no período de 48 horas após o tratamento (**Figura 24**), tendo portanto um mal prognóstico diante da indução da carcinogênese. Uma das formas pela qual esta citocina aumenta a capacidade de invasão de células modificadas é através da sua importante característica de acelerar a EMT (*epithelial-mesenchymal transition*). Dessa forma, o fenótipo epitelial que é caracterizado por fortes junções intercelulares e polaridade passa a exibir um fenótipo mesenquimal, com interações intercelulares reduzidas e aumento de motilidade (BATES; MERCURIO, 2003).

Camundongos deficientes em TNF mostraram-se resistentes ao câncer de pele (MOORE et al., 1999), já que a citocina em questão pode estar envolvida nos estágios iniciais da promoção tumoral em camundongos normais, sendo transitoriamente, mas intensamente induzida em queratinócitos após aplicação de um agente promotor. Além disso, com aplicação intraperitoneal de TNF- α , ocorre aumento no desenvolvimento de papilomas e vascularização tumoral (BALKWILL;

MANTOVANI, 2001). A detecção de índices significativos de TNF geralmente está associada com a presença de IL-1 e IL-6 (BURKE et al., 1996; NAYLOR et al., 1993).

Esta associação foi positiva em nosso modelo, pois os animais AIRmin^{RR} demonstraram também alta expressão de *Il1b* na pele no período de 48 horas após o tratamento (**Figura 26**). Esta citocina é rapidamente e localmente produzida por neutrófilos no sítio de injúria, porém sua produção também ocorre por macrófagos em momentos mais tardios no processo inflamatório. É uma potente indutora de quimiocinas (HÜBNER et al., 1996) e baixas concentrações locais de IL-1 β podem induzir resposta inflamatória local levando a ativação de resposta imune protetora. Altas concentrações desta citocina podem resultar em câncer associado à inflamação (APTE; VORONOV, 2002). A presença de IL-1 β aumenta a capacidade invasiva de células tumorais, afirmação sustentada pela observação de que animais deficientes em IL-1 β demonstraram menor número de metástases de melanoma e cânceres de mama e próstata (GIAVAZZI et al., 1990; VIDAL-VANACLOCHA et al., 2000). Ambas as IL-1 α e β possuem papel importante na angiogênese e invasão tumoral *in vivo*, embora a primeira em menor escala (MANTOVANI et al., 2009; PORTA et al., 2009).

A outra citocina relacionada, IL-6, possui um papel semelhante ao da IL-1, participando no início da resposta inflamatória, porém também na manutenção de uma inflamação crônica. Ela é capaz de induzir a ativação de linfócitos T, finaliza a diferenciação de linfócitos B e, portanto, possui papel na produção de anticorpos (GUERNE et al., 1999). A IL-6 tem um papel fundamental na promoção do crescimento e também é uma citocina inflamatória antiapoptótica (NAUGLER; KARIN, 2008), sendo também um dos sinais efetores da ativação do NF- κ B na iniciação e promoção da carcinogênese.

Em nosso modelo, a expressão do gene *Il6* mostrou-se alta em ambas as sublinhagens R e S dos animais AIRmin. Apesar de ser menor nos animais AIRmin^{SS}, a diferença foi altamente significativa entre controles e tratados nessas sublinhagens no período de 48 horas após o tratamento quando o órgão observado foi a pele (**Figura 25**). Ancrile, Lim e Counter (2007) demonstraram que no modelo de carcinogênese de pele induzida por DMBA e TPA, a presença da IL-6 é de extrema importância para o crescimento tumoral (ANCRILE; LIM; COUNTER, 2007).

Além deste, estudos com câncer associado à colite (BOLLRATH et al., 2009), mieloma múltiplo (KLEIN et al., 1989), hepatocarcinoma (MALAGUARNERA et al., 1997; KAKUMU et al., 1991; KHORUTS et al., 1991) e câncer de mama (BERGER, 2004) mostraram as mesmas evidências, trazendo a presença da IL-6 como mal prognóstico para o desenvolvimento da doença nos indivíduos. Camundongos deficientes em IL-6 mostraram-se resistentes a plasmocitoma (LATTANZIO et al., 1997), enquanto um polimorfismo específico na região promotora do gene da IL-6 que aumenta seus níveis é um fator genético que predispõe ao desenvolvimento do câncer de mama (BERGER, 2004).

Na linhagem AIRmin^{SS} pôde ser observada menor concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 no soro dos animais tratados com DMBA (**Figura 34**), consistente com a alta expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Como dito anteriormente, as quimiocinas e também seus receptores são fatores essenciais para o desenvolvimento de carcinomas, já que são promotoras do recrutamento de leucócitos tanto em condições homeostáticas como na resposta inflamatória e câncer (PORTA et al., 2009). Neste último caso são produzidas tanto por células estromais como as tumorais. As células estromais predominantes encontradas no sítio tumoral são macrófagos, linfócitos, células endoteliais e fibroblastos, porém outros leucócitos também podem ser encontrados, sendo que o estroma passa a ser composto principalmente por infiltrado leucocitário (COUSSENS; WERB, 2002). O número e tipo celular do infiltrado determinam a produção de quimiocinas (BALKWILL, 2004). Uma grande variedade de quimiocinas tem sido detectada em tecidos neoplásicos, incluindo CCL2, CXCL1 e moléculas relacionadas, como CXCL2 (GERMANO; ALLAVENA; MANTOVANI, 2008). Dentre estas, analisamos a expressão dos genes das quimiocinas CCL2 e CXCL2, e ambas as análises mostraram resultados interessantes. No caso do gene *Ccl2*, os animais AIRmin^{SS} mostraram expressão muito maior na pele em relação aos animais do seu grupo controle no período de 48 horas após o término do tratamento (**Figura 30**). Os animais AIRmax^{SS} demonstraram expressão ainda maior no mesmo período de análise, mas somente quando o órgão em questão foi o baço (**Figura 31**). Este fato pode indicar resposta sistêmica desta sublinhagem ao tratamento, enquanto que os animais AIRmin^{SS} demonstram expressão da quimiocina no sítio de indução de carcinogênese, assim como para as citocinas já citadas.

Em carcinomas epiteliais, geralmente as células infiltrantes predominantes são macrófagos e linfócitos T CD8⁺, e o nível de expressão de CCL2 está correlacionado com o número de linfócitos e macrófagos que se localizam na mesma área (NEGUS et al., 1997). As quimiocinas CC, incluindo CCL2, induzem a produção de MMP9 por macrófagos e a presença de MMPs em altos níveis, produzidas em conjunto por células estromais e tumorais facilitam o remodelamento da matriz extracelular e conseqüentemente invasão e migração celular. Além disso, Daniel e colaboradores mostraram que a presença de células T CD4⁺ aumenta a invasão e progressão da doença em modelos de carcinogênese de pele induzida pelo vírus HPV através do recrutamento de neutrófilos e macrófagos nas lesões pré-malignas, tornando-as um ambiente cronicamente inflamado com produção de MMP9 e estimulação de angiogênese (DANIEL et al., 2003).

Leucócitos não são os únicos a responderem ao gradiente de quimiocinas, visto que células tumorais também expressam receptores de quimiocinas e respondem a elas. Assim, metástases podem ocorrer, em parte, sob governo das interações entre os receptores de quimiocinas das células tumorais com potencial metastático e gradiente de quimiocinas nos órgãos (MURPHY, 2001). Nibbs et al. (2007) mostraram que animais deficientes no receptor de quimiocina D6, receptor de diversas quimiocinas incluindo CCL2, mostraram maior suscetibilidade à carcinogênese de pele e câncer associado à colite. A deleção do gene deste receptor em animais com dois diferentes *backgrounds* (B6/129 e FVB/N) permite o desenvolvimento de papilomas e evolução para carcinoma de células escamosas (NIBBS et al., 2007). Em melanomas, o receptor CCR10 mostrou relação com metástases de pele (MURAKAMI; CARDONES; HWANG, 2004).

Já no caso do gene *Cxcl2*, os animais AIRmin^{RR} o expressaram na pele em níveis muito elevados quando o período em questão foi o de 48 horas. Os animais AIRmin^{SS} também tiveram esse comportamento, mas não tão intenso quanto os anteriormente citados (**Figura 27**). Os camundongos AIRmin^{SS} além de ter uma expressão elevada na pele no período de 48 horas também mostraram alta expressão deste gene neste período no baço (**Figura 28**). Também no baço, os camundongos AIRmax^{SS} mostraram alta expressão do gene *Cxcl2*, entretanto este comportamento foi observado somente no período de 30 dias (**Figura 29**). Desta forma, os animais AIRmin^{RR} parecem ter uma expressão local e mais precoce ao estímulo, considerando não só o gene *Cxcl2*, mas também das outras citocinas e

quimiocinas discutidas anteriormente. Já nos animais AIRmin^{SS} a ação do carcinógeno também foi sistêmica, gerando efeitos no baço além da pele. Os camundongos da sublinhagem AIRmax^{SS} mais uma vez mostraram uma reação sistêmica ao tratamento, porém desta vez esta reação foi mais tardia.

Células de melanoma possuem altos níveis de CXCR2, receptor também da CXCL2, e a estimulação autócrina por quimiocinas aumenta a sobrevivência, proliferação e migração de células tumorais (BALKWILL, 2004). Este receptor pertence à superfamília de receptores acoplados a proteína G. É expresso em células T, monócitos e em neutrófilos, e é capaz de acoplar-se a diversas quimiocinas CXC (ACOSTA et al., 2008; MURPHY, 1997). Quimiocinas como CXCL1, CXCL2 e CXCL8 (IL-8) possuem um papel de extrema importância na progressão de melanoma por estimulação de crescimento neoplásico, promoção de inflamação e indução de angiogênese (NIBBS, 2007). No caso da CXCL2, a promoção da inflamação deve-se ao recrutamento de monócitos/macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, produtores de diversos fatores incluindo os pró-angiogênicos (BALKWILL, 2004). Os monócitos recrutados podem diferenciar-se em macrófagos associados a tumores (TAM) no microambiente tumoral, sendo que estes são componentes chaves do estroma tumoral. Tais células possuem diversas características de macrófagos M2, desempenhando funções pró-tumorais como promoção da célula tumoral e de vasos sanguíneos, remodelamento de matriz e supressão imune. Além disso, quimiocinas das famílias CC e CXC estão envolvidas na atração de células supressoras mielóides (MDSC) para o sítio tumoral, facilitando a progressão do câncer (ALLAVENA et al., 2011; SOLINAS et al., 2009).

O gene *Cxcr2* (*Il8rb*) localiza-se no cromossomo 1 em camundongos a 40cM. O gene *Slc11a1* está no mesmo cromossomo muito próximo, a 39,2cM. A proximidade entre os dois genes torna esse receptor um candidato a contribuinte na suscetibilidade destes animais.

Sabendo dos efeitos pró-tumorais das quimiocinas, o aumento de expressão do gene *Cxcr2* nos animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} (**Figura 32**) pode ser um dos fatores que contribuem para a suscetibilidade destas linhagens a carcinogênese de pele induzida por DMBA, assim como a tumores em órgãos internos. Isto porque estas sublinhagens sofrem maior influência das quimiocinas que se ligam a esse receptor, como a CXCL2, que teve expressão aumentada nestes animais como mostrado anteriormente (**Figuras 27 e 28**). Entretanto, o mesmo não pode ser

sugerido em relação à suscetibilidade dos animais AIRmax^{SS}, visto que a expressão deste gene no período de 48 horas após o tratamento não mostrou diferença significativa em relação aos controles.

Analisando os resultados obtidos em relação às quimiocinas e citocinas, é possível observar correlação com os resultados histológicos, principalmente nos animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}, já que a expressão elevada destas quimiocinas justifica a presença de infiltrado de macrófagos e linfócitos no período de 48 horas após o tratamento na pele, o que não foi observado nos animais AIRmax^{RR} ou AIRmax^{SS} (**Figuras 17A - D**). Além disso, o fato de os camundongos AIRmax^{SS} possuírem expressão elevada de quimiocinas no baço, indicando uma ação sistêmica do agente DMBA aplicado epicutaneamente, pode justificar a incidência de 100% de tumores em órgãos internos, enquanto que na pele, órgão que não demonstrou expressão significativa de nenhuma quimiocina ou citocina, esses animais não demonstraram o mesmo comportamento (**Figuras 10 - 12**). Já os animais AIRmin de ambas sublinhagens demonstraram comportamento semelhante em relação a papilomas, tumores de pele e de órgãos internos, visto que o perfil de expressão de genes de citocinas foi também semelhante (**Figuras 6 - 15**).

Os resultados em geral deste trabalho sugerem que a interação do fundo genético e do polimorfismo no gene *Slc11a1* nestes animais modulam a expressão de genes e, dessa forma, confere uma maior suscetibilidade a carcinogênese em camundongos AIRmax^{SS}. Mais estudos devem ser realizados no intuito de elucidar os mecanismos genéticos e celulares que permitem essa diferença na sensibilidade a patologia em questão, tendo o nosso modelo animal como peça fundamental para a realização deste trabalho já que podem contribuir para a identificação de genes envolvidos com a resistência e suscetibilidade ao câncer induzido pelo agente DMBA.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- Animais AIRmin de ambas as sublinhagens tiveram cerca de 57% de incidência de carcinomas em órgãos internos. Camundongos AIRmax^{RR} não demonstraram qualquer reação ao tratamento, constituindo um modelo de resistência a carcinogênese de pele quimicamente induzida. Entretanto, apesar de os animais AIRmax^{SS} não apresentarem papilomas e carcinomas de pele, mostraram-se extremamente sensíveis ao tratamento já que a incidência foi de 100% quando o parâmetro avaliado foi tumores em órgãos internos;
- após o término da indução da carcinogênese com o agente DMBA, os camundongos AIRmax^{RR} não demonstraram qualquer sinal na pele de irritação. Os animais AIRmax^{SS} exibiram macroscopicamente leve irritação na pele, mas sem alterações microscópicas significativas. Já os animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} demonstraram intensa irritação na pele, e após o período de 30 dias passaram a apresentar papilomas de forma semelhante tanto em incidência quanto em multiplicidade;
- animais AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} apresentaram alta expressão de diversos genes de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que promovem um microambiente favorável ao crescimento tumoral;
- camundongos AIRmax^{SS} apresentaram supressão no gene *Cyp1a1* na pele no período de 48 horas após o tratamento, porém isso não parece interferir numa possível ação imunossupressora mediada pelo DMBA na medula óssea desses animais, o que diminuiria a efetividade da resposta imune contra tumores;
- a sensibilidade dos animais AIRmax^{SS} evidencia possível modulação de resposta a carcinogênese exercida pelo gene *Slc11a1* quando o fundo genético é AIRmax, com importante probabilidade de o alelo *S* interferir na atividade principalmente de macrófagos devido a sua maior produção de IL-

10, citocina inibidora de NO e TNF- α , mediadores fundamentais na ação de macrófagos.

Referências

REFERÊNCIAS*

- ABEL, E. L.; ANGEL, J. M.; KIGUCHI, K.; DIGIOVANNI, J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. **Nat. Protoc.**, v. 4, n. 9, p. 1350-1362, 2009.
- ACOSTA, J. C.; O'LOGHLEN, A.; BANITO, A.; GUIJARRO, M. V.; AUGERT, A.; RAGUZ, S.; FUMAGALLI, M.; DA COSTA, M.; BROWN, C.; POPOV, N.; TAKATSU, Y.; MELAMED, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F.; BERNARD, D.; HERNANDO, E.; GIL, J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 1006-1018, 2008.
- ALLAVENA, P.; GERMANO, G.; MARCHESI, F.; MANTOVANI, A. Chemokines in cancer related inflammation. **Exp. Cell Res.**, v. 317, n. 5, p. 664-673, 2011.
- ANCRILE, B.; LIM, K. H.; COUNTER, C.M. Oncogenic Ras- induced secretion of IL-6 is required for tumorigenesis. **Genes Dev.**, v. 21, p. 1714–1719, 2007.
- APTE, R. N.; VORONOV, E. Interleukin-1 – a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. **Semin. Cancer Biol.**, v. 12, p. 277–290, 2002.
- ARAUJO, L. 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, n. 9, p. 2913-2920, 1998.
- ATES, O.; KURT, S.; BOZKURT, N.; KARAER, H. NRAMP1 (SLC11A1) variants: genetic susceptibility to multiple Sclerosis. **J. Clin. Immunol.**, v. 30, n. 4, p. 583-586, 2010.
- BALKWILL, F. Cancer and the Chemokine Network. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 4, n. 7, p. 540-550, 2004.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet.**, v. 357, n. 9255, p. 539-545, 2001.
- BALMAIN, A.; HARRIS, C. C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 371-377, 2000.
- 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, n. 10, p. 1711-1179, 1990.

*De acordo com:

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

BARTON, C. H.; WHITEHEAD, S. H.; BLACKWELL, J. M. Nramp transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. **Mol. Med.**, v. 1, n. 3, p. 267-279, 1995.

BATES, R. C.; MERCURIO, A. M. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. **Mol. Biol. Cell.**, v. 14, n. 5, p. 1790-1800, 2003.

BERGER, F. G. The interleukin-6 gene: a susceptibility factor that may contribute to racial and ethnic disparities in breast cancer mortality. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 88, p. 281-5, 2004.

BERX, G.; VAN ROY, F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 1, n. 6, p. 312-319, 2009.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, p. 332-337, 2004.

BIERIE B.; MOSES H. L. TGF-beta and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 17, p. 29-40, 2006.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAUJO, M. L.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; Cabrera, W. K.; SANT'ANNA, O. A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBANEZ, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 2, p. 337-346, 1998.

BLACKWELL, J. M.; SEARLE, S.; MOHAMED, H.; WHITE, J. K. Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story. **Immunol. Lett.**, v. 85, n. 2, p. 197-203, 2003.

BORREGO, A.; PETERS, L. C.; JENSEN, J. R.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; 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.

BOSTRÖM, C. E.; GERDE, P.; HANBERG, A.; JERNSTRÖM, B.; JOHANSSON, C.; KYRKLUND, T.; RANNUG, A.; TÖRNQVIST, M.; VICTORIN, K.; WESTERHOLM, R. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. **Environ. Health Perspect.**, v. 110, n. 3, p. 451-88, 2002.

BURKE, F.; RELF, M.; NEGUS, R.; BALKWILL, F. A cytokine profile of normal and malignant ovary. **Cytokine**, v. 8, p. 578-585, 1996.

BURKHART, D. L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, p. 671-682, 2008.

BUTERIN, T.; HESS, M. T.; LUNEVA, N.; GEACINTOV, N. E.; AMIN, S.; KROTH, H.; SEIDEL, A.; NAEGELI, H. Unrepaired fjord region polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in ras codon 61 mutational hot spots. **Cancer Res.**, v. 60, n. 7, p. 1849-1856, 2000.

BUTERS, J.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; SCHOBER, W.; SOBALLA, V. J.; HINTERMAIR, J.; WOLFF, T.; GONZALEZ, F. J.; GREIM, H. CYP1B1 determines susceptibility to low doses of 7,12 dimethylbenz[a]anthracene induced ovarian cancers in mice: correlation of CYP1B1-mediated DNA adducts with carcinogenicity. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 2, p. 327-334, 2003.

CANHAMERO, T.; REINES, B.; PETERS, L. C.; BORREGO, A.; CARNEIRO, P. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; CABRERA, W. H.; RIBEIRO, O. G., JENSEN, J. R.; STAROBINAS, N., IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Distinct Early Inflammatory Events during Ear Tissue Regeneration in Mice Selected for High Inflammation Bearing *Slc11a1* R and S Alleles. **Inflammation**, v. 34, n. 5, p. 303-313, 2011.

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; 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. **Toxicol.**, v. 40, n. 11, p. 1571-1579, 2002.

CARON, J.; LARIVIÈRE, L.; NACACHE, M.; TAM, M.; STEVENSON, M. M.; MCKERLY, C.; GROS, P.; MALO, D. Influence of *Slc11a1* on the outcome of Salmonella enterica serovar Enteritidis infection in mice is associated with Th polarization. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 5, p. 2787-2802, 2006.

CAVALLO, F.; DE GIOVANNI, C.; NANNI, P.; FORNI, G.; LOLLINI, P. L. 2011: the immune hallmarks of cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 60, n. 3, p. 319-326, 2011.

CELLIER, M.; PRIVÉ, G.; BELOUCHI, A.; KWAN, T.; RODRIGUES, V.; CHIA, W.; GROS, P. *Nramp* defines a family of membrane proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, n. 22, p.10089-10093, 1995.

CELLIER, M.; SHUSTIK, C.; DALTON, W.; RICH, E.; HU, J.; MALO, D. Expression of the human NRAMP1 gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia. **J. Leukoc. Biol.**, v. 61, n. 1, p. 96-105, 1997.

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, 2007.

CHENG, N.; CHYTIL, A.; SHYR, Y.; JOLY, A.; MOSES, H. L. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol. Cancer Res.**, v. 6, p. 1521-1533, 2008.

CHIN, K.; DE SOLORZANO, C. O.; KNOWLES, D.; JONES, A.; CHOU, W.; RODRIGUEZ, E. G.; KUO, W. L.; LJUNG, B. M.; CHEW, K.; MYAMBO, K.; MIRANDA, M.; KRIG, S.; GARBE, J.; STAMPFER, M.; YASWEN, P.; GRAY, J. W.; LOCKETT, S. J. In situ analyses of genome instability in breast cancer. **Nat. Genet.**, v. 36, p. 984–988, 2004.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 2002.

COUSSENS, L. M.; TINKLE, C. L.; HANAHAN, D.; WERB, Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. **Cell**, v. 103, p. 481–490, 2000.

DANIEL, D.; MEYER-MORSE, N.; BERGSLAND, E. K.; DEHNE, K.; COUSSENS, L. M.; HANAHAN, D. Immune enhancement of skin carcinogenesis by CD4⁺ T cells. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 8, p. 1017–1028, 2003.

DE FRANCO, M.; CARNEIRO, P. 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, 2009.

DIGIOVANNI, J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. **Pharmac. Ther.**, v. 54, p. 63–128, 1992.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 29, p. 789–791, 2009.

FORBES, J. R.; GROS, P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 397–403, 2001.

FRITSCHKE, G.; NAIRZ, M.; WERNER, E. R.; BARTON, H. C.; WEISS, G. Nramp1-functionality increases iNOS expression via repression of IL-10 formation. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, n. 11, p. 3060–3067, 2008.

GALVÁN, N.; JASKULA-SZTUL, R.; MACWILLIAMS, P. S.; CZUPRYNSKI, C. J.; JEFCOATE, 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, n. 1, p. 84–96, 2003.

GALVÁN, 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.

GALVÁN, N.; TESKE, D. E.; ZHOU, G.; MOORTHY, B.; MACWILLIAMS, P. S.; CZUPRYNSKI, C. J.; JEFSCOATE, C. R. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in liver and lung by benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene do not affect distribution of polycyclic hydrocarbons to target tissue: role of AhR and CYP1B1 in bone marrow cytotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 202, n. 3, p. 244-257, 2005.

GARLANDA, C.; RIVA, F.; VELIZ, T.; POLENTARUTTI, N.; PASQUALINI, F.; RADAELLI, E.; SIRONI, M.; NEBULONI, M.; ZORINI, E. O.; SCANZIANI, E.; MANTOVANI, A. Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family. **Cancer Res.**, v. 67, p. 6017–6021, 2007.

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.; LAUER, F. T.; MITCHELL, L. A.; BURCHIEL, S. W. Microsomal epoxide hydrolase is required for 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced immunotoxicity in mice. **Toxicol. Sci.**, v. 98, n. 1, p. 137-144, 2007.

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.

GERMANO, G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 374-379, 2008.

GIAVAZZI, R.; GAROFALO, A.; BANI, M. R.; ABBATE, M.; GHEZZI, P.; BORASCHI, D.; MANTOVANI, A.; DEJANA, E. Interleukin 1-induced augmentation of experimental metastases from a human melanoma in nude mice. **Cancer Res.**, v. 50, p. 4771–4775, 1990.

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, p. 386-401, 2001.

GOMES, M. S.; APPELBERG, R. Evidence for a link between iron metabolism and *Nramp1* gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. **Immunology**, v. 95, p. 165-168, 1998.

GOVONI, G.; GROS, P. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. **Inflamm. Res.**, v. 47, n. 7, p. 277-284, 1998.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, p. 883–899, 2010.

GRULICH, A. E.; VAN LEEUWEN, M. T.; FALSTER, M. O.; VAJDIC, C. M. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. **Lancet.**, v. 370, p. 59–67, 2007.

GUERNE, P. A.; DESGEORGES, A.; JASPAR, J. M.; RELIC, B.; PETER, R.; HOFFMEYER, P.; DAYER, J. M. Effects of IL-6 and its soluble receptor on proteoglycan synthesis and NO release by human articular chondrocytes: comparison with IL-1. Modulation by dexamethasone. **Matrix Biol.**, v. 18, n. 3, p. 253-260, 1999.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p. 353–364, 1996.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANKINSON, O. The aryl hydrocarbon receptor complex. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 307-340, 1995.

HOLD, G. L.; EL-OMAR, M. E. Genetic aspects of inflammation and cancer. **Biochem. J.**, v. 41, n. 2, p. 225-235, 2008.

HÜBNER, G.; BRAUCHLE, M.; SMOLA, H.; MADLENER, M.; FÄSSLER, R.; WERNER, S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. **Citokine**, v. 8, n. 7, p. 548-556, 1996.

HUSSAIN, S. P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C. C. Radical causes of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 4, p. 276-285, 2003.

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, p. 153-158, 1999.

IBAÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. 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.

KAFAFI, S. A.; AFEEFY, H. Y.; SAID, H. K.; KAFAFI, A. G. Relationship between aryl hydrocarbon receptor binding, induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and 7 ethoxyresorufin O-deethylase enzymes, and toxic activities of aromatic xenobiotics in animals. A new model. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 6, n. 3, p. 328-334, 1993.

KAKUMU, S.; SHINAGAWA, T.; ISHIKAWA, T.; YOSHIOKA, K.; WAKITA, T.; ITO, Y.; TAKAYANAGI, M.; IDA, N. Serum interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis B. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 86, p. 1804–1808, 1991.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–323, 2004.

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

KEMP, C. J. Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. **Semin. Cancer Biol.**, v. 15, n. 6, p. 460–473, 2005.

KERKVLIT, N. I. AHR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription. **Biochem. Pharmacol.**, v. 77, n. 4, p. 746–760, 2009.

KHORUTS, A.; STAHNKE, L.; MCCLAIN, C. J.; LOGAN, G.; ALLEN, J. I. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. **Hepatology**, v. 13, p. 267–276, 1991.

KITA, E.; EMOTO, M.; OKU, D.; NISHIKAWA, F.; HAMURO, A.; KAMIKAIDOU, N.; KASHIBA, S. Contribution of interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of ltyr mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 51, n. 3, p. 244–250, 1992.

KLEIN, B.; ZHANG, X. G.; JOURDAN, M.; CONTENT, J.; HOUSSIAU, F.; AARDEN, L.; PIECHACZYK, M.; BATAILLE, R. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. **Blood**, v. 73, p. 517–526, 1989.

KRABBE, K. S.; PEDERSEN, M.; BRUUNSGAARD, H. Inflammatory mediators in the elderly. **Exp. Gerontol.**, v. 39, n. 5; p. 687–699, 2004.

KUHN, D. E.; LAFUSE, W. P.; ZWILLING, B. S. Iron transport by isolated phagolysosomes (PL) obtained from the RAW264.7 macrophage (M ϕ) cell line transfected with resistant or susceptible *Nramp1*. **FASEB, Meeting on Experimental Biology**, 1998.

LALMANACH, A. C.; MONTAGNE, A.; MENANTEAU, P.; LANTIER, F. Effect of the mouse *Nramp1* genotype on the expression of IFN-gamma gene in early response to Salmonella infection. **Microbes Infect.**, v. 3, n. 8, p. 639–644, 2001.

LATTANZIO, G.; LIBERT, C.; AQUILINA, M.; CAPPELLETTI, M.; CILIBERTO, G.; MUSIANI, P.; POLI, V. Defective development of pristane-oil-induced plasmacytomas in interleukin-6-deficient BALB/c mice. **Am. J. Pathol.**, v. 151, p. 689–696, 1997.

LEE, J.; KIM, S. S. Current implications of cyclophilins in human cancers. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 29, p. 97, 2010.

LI, X.; ECKARD, J.; SHAH, R.; MALLUCK, C.; FRENKEL, K. Interleukin-1alpha up-regulation in vivo by a potent carcinogen 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and control of DMBA-induced inflammatory responses. **Cancer Res.**, v. 62, n. 2, p. 417-423, 2002.

LICASTRO, F.; CANDORE, G.; LIO, D.; PORCELLINI, E.; COLONNA-ROMANO, G.; FRANCESCHI, C.; CARUSO, C. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. **Immun. Ageing.**, v. 2, p. 8, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MACARTHUR, M.; HOLD, G. L.; EL-OMAR, E. M. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 286, n. 4, p. 515-520, 2004.

MALAGUARNERA, M.; DI FAZIO, I.; LAURINO, A.; FERLITO, L.; ROMANO, M.; TROVATO, B. A. Serum interleukin 6 concentrations in chronic hepatitis C patients before and after interferon-alpha treatment. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 35, p. 385-388, 1997.

MANDREKAR, P.; AMBADE, A.; LIM, A.; SZABO, G.; CATALANO, D. An essential role for monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholic liver injury: regulation of proinflammatory cytokines and hepatic steatosis in mice. **Hepatology**, v. 54, n. 6, p. 2185-2197, 2011.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; LOCATI, M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. **Hum. Immunol.**, v. 70, n. 5, p. 325-330, 2009.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol.**, v. 23, p. 549-555, 2002.

MARIA, D. A.; MANENTI, G.; GALBIATI, F.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; BARRERA, R. G.; PETTINICCHIO, A.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA, M.; DRAGANI, T. A.; IBAÑEZ, O. M. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. **Oncogene**, v. 22, n. 3, p. 426-432, 2003.

MARIA, D. A.; RIBEIRO, O. G.; PIZZOCARO, K. F.; 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, n. 2, 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.

MIYATA, M.; KUDO, G.; LEE, Y. H.; YANG, T. J.; GELBOIN, H. V.; FERNANDEZ-SALGUERO, P.; KIMURA, S.; GONZALEZ, F. J. Targeted disruption of the microsomal epoxide hydrolase gene. Microsomal epoxide hydrolase is required for the carcinogenic activity of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 34, p. 23963-23968, 1999.

MOORE, R. J.; OWENS, D. M.; STAMP, G.; ARNOTT, C.; BURKE, F.; EAST, N. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. **Nat. Med.**, v. 5, n. 7, p. 828-831, 1999.

MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. **Eur. J. Cancer**, v. 42, n. 6, p. 735-744, 2006.

MURAKAMI, T.; CARDONES, A. R.; HWANG, S. T. Chemokine receptors and melanoma metastasis. **J. Dermatol. Sci.**, v. 36, p. 71-78, 2004.

MURPHY, J. E.; MORALES, R. E.; SCOTT, J.; KUPPER, T. S. IL-1 alpha, innate immunity, and skin carcinogenesis: the effect of constitutive expression of IL-1 alpha in epidermis on chemical carcinogenesis. **J. Immunol.**, v. 170, n. 11, p. 5697-5703, 2003.

MURPHY, P. M. Chemokines and molecular basis of cancer metastasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, p. 833-835, 2001.

MURPHY, P. M. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. **Semin. Hematol.**, v. 34, n. 4, p. 311-318, 1997.

NAUGLER, W. E.; KARIN, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. **Trends Mol. Med.**, v. 14, p. 109-119, 2008.

NAYLOR, M. S.; STAMP, G. W. H.; FOULKES, W. D.; ECCLES, D.; BALKWILL, F. R. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 2194-2206, 1993.

NEBERT, D. W.; GELBOIN, H. V. The in vivo and in vitro induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains, and development and hormonal states. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 134, p. 76-89, 1969.

NEGUS, R. P. M.; STAMP, G. W. H.; HADLEY, J.; BALKWILL, F. R. A quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. **Am. J. Pathol.**, v. 150, p. 1723-1734, 1997.

NIBBS, R. J.; GILCHRIST, D. S.; KING, V.; FERRA, A.; FORROW, S.; HUNTER, K. D.; GRAHAN, G. J. The atypical chemokine receptor D6 suppresses the development of chemically induced skin tumors. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 7, p. 1884-1892, 2007.

PATON, T. E.; RENTON, K. W. Cytokine-mediated down-regulation of CYP1A1 in Hepa1 cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, n. 11, p. 1791-1796, 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.

POLAND, A.; GLOVER, E. Characterization and strain distribution pattern of the murine Ah receptor specified by Ah^d and Ah^{b-3} alleles. **Mol. Pharmacol.**, v. 38, p. 306-312, 1990.

PORTA, C.; LARGHI, P.; RIMOLDI, M.; TOTARO, M. G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. **Immunobiology**, v. 214, n. 9-10, p. 761-777, 2009.

PUGA, A.; MA, C.; MARLOWE, J. L. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. **Biochem. Pharmacol.**, v. 77, n. 4, p. 713-722, 2009.

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.

RANNUG, A.; RANNUG, U.; ROSENKRANZ, H. S.; WINQVIST, L.; WESTERHOLM, R.; AGURELL, E.; GRAFSTRÖM, A. K. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 32, p. 15422-15427, 1987.

RAYNAUD, C. M.; HERNANDEZ, J.; LLORCA, F. P.; NUCIFORO, P.; MATHIEU, M. C.; COMMO, F.; DELALOGUE, S.; SABATIER, L.; ANDRÉ, F.; SORIA, J. C. DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 33, p. 341-345, 2010.

RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; MASSA, S.; DI PACE, R. F.; DE SOUZA, V. R.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M. Genetic selection for high acute inflammatory response confers resistance to lung carcinogenesis in the mouse. **Exp. Lung Res.**, v. 31, n. 1, p. 105-116, 2005.

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.

SCHALDACH, C. M.; RIBY, J.; BJELDANES, L. F. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. **Biochemistry**, v. 38, n. 23, p. 7594-7600, 1999.

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

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

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v. 2, p. 103–112, 2002.

SICA, A.; BRONTE, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 1155–1166, 2007.

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

SOLINAS, G.; RIVENNIKOV, G.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 86, p. 1065-1073, 2009.

SOO, S. S.; VILLARREAL-RAMOS, B.; ANJAM KHAN, C. M.; HORMAECHE, C. E.; BLACKWELL, J. M. Genetic control of immune response to recombinant antigens carried by an attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain: Nramp1 influences T-helper subset responses and protection against leishmanial challenge. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 5, p. 1910-1917, 1998.

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.; IBAÑEZ, O. M.; RIBEIRO, O. G.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. **Exp. Clin. Immunogenet.**, v. 7, n. 4, p. 221-233, 1990.

THOMAS, R. S.; PENN, S. G.; HOLDEN, K.; BRADFIELD, C. A.; RANK, D. R. Sequence variation and phylogenetic history of the mouse *Ahr* gene. **Pharmacogenetics**, v. 12, n. 2, p. 151-163, 2002.

VASTO, S.; CARRUBA, G.; LIO, D.; COLONNA-ROMANO, G.; DI BONA, D.; CANDORE, G.; CARUSO, C. Inflammation, ageing and cancer. **Mech. Ageing Dev.**, v. 130, n. 1-2, p. 40-45, 2009.

VIDAL, S.; GROS, P.; SKAMENE, E. Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies Nramp1 as the Bcg/Ity/Lsh locus. **J. Leukoc. Biol.**, v. 58, n. 4, p. 382-390, 1995.

VIDAL-VANACLOCHA, F.; FANTUZZI, G.; MENDOZA, L.; FUENTES, A. M.; ANASAGASTI, M. J.; MARTÍN, J.; CARRASCAL, T.; WALSH, P.; REZNIKOV, L. L.; KIM, S. H.; NOVICK, D.; RUBINSTEIN, M.; DINARELLO, C. A. IL-18 regulates IL-1b-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. **PNAS**, v. 97, p. 734-739, 2000.

VIGAR, N. D.; CABRERA, W. H.; ARAUJO, L. M.; RIBEIRO, O. G.; OGATA, T. R.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, n. 2, p. 431-437, 2000.

VINEIS, P.; SCHATZKIN, A.; POTTER, J. D. Models of carcinogenesis: an overview. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 10, p. 1703-1709, 2010.

WHITE, E.; DIPAOLA, R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, p. 5308-5316, 2009.

WOJCIECHOWSKI, W.; DESANCTIS, J.; SKAMENE, E.; RADZIOCH, D. Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin involves class II transactivator and depends on the *Nramp1* gene. **J. Immunol.**, v. 163, n. 5, p. 2688-2696, 1999.

WYLLIE, S.; SEU, P.; GOSS, J. A. The natural resistance-associated macrophage protein 1 *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and iron metabolism in macrophages. **Microbes Infect.**, v. 4, n. 3, p. 351-359, 2002.

XUE, W.; WARSHAWSKY, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 206, n. 1, p. 73-93, 2005.

ZAAHL, M. G.; WARNICH, L.; VICTOR, T. C.; KOTZE, M. J. Association of functional polymorphisms of *SLC11A1* with risk of esophageal cancer in the South African Colored population. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 159, n. 1, p. 48-52, 2005.

ZWILLING, B. S.; KUHN, D. E.; WIKOFF, L.; BROWN, D.; LAFUSE, W. Role of iron in *Nramp1*-mediated inhibition of mycobacterial growth. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 3, p. 1386-1392, 1999.