DÉBORA MATHIAS DE SIQUEIRA

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE
A EXPRESSÃO DE GENES REGULADORES DO
ESTADO DE HIPÓXIA E A INTENSIDADE DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA**

**Dissertação apresentada ao Programa
de pós-Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas.**

**São Paulo
2009**

DÉBORA MATHIAS DE SIQUEIRA

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE
A EXPRESSÃO DE GENES REGULADORES DO
ESTADO DE HIPÓXIA E A INTENSIDADE DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA**

**Dissertação apresentada ao Programa
de pós-Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas.**

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho

**São Paulo
2009**

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

reprodução não autorizada pelo autor

Siqueira, Débora Mathias de.

Estudo correlação entre a expressão de genes reguladores do estado de hipóxia e a intensidade da resposta inflamatória aguda / Débora Mathias de Siqueira. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Orlando Garcia Ribeiro Filho.

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

Versão do título para o inglês: Study the function of genes regulating the hypoxia state in determining the intensity of acute inflammatory response.

Descritores: 1. Hipóxia 2. Inflamação 3. Fator induzível por hipóxia 1 α (*Hif-1 α*) 4. Genes reguladores 5. Receptor aryl de hidrocarbonetos (*Ahr*) 6. Camundongos I. Ribeiro Filho, Orlando Garcia II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB004/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Débora Mathias de Siqueira.

Título da Dissertação: Estudo da função dos genes reguladores do estado de hipóxia na determinação da intensidade da resposta inflamatória aguda.

Orientador(a): Orlando Garcia Ribeiro Filho.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan com apoio financeiro da FAPESP sob o processo nº 06/53013-9.

Ao meu Deus

Porque sem ELE eu sequer seria...

Aos meus pais, Jelson e Rita, pelos ensinamentos

***Em cada palavra, pela compreensão irrestrita e apoio
incondicional. Sempre, a cada momento, seus exemplos estão
presentes na minha vida, fazendo de mim uma pessoa íntegra e
melhor. Amo vocês!!!***

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho, houve a participação de diversas pessoas que me acolheram e me guiaram. Talvez este seja o momento de falar o quanto esta torcida e apoio foram importantes. Acho que tenho a sorte de conhecer as pessoas certas e de bom coração. Que Deus os abençoe!!!!

Ao meu orientador Dr. Orlando Garcia Ribeiro, pelo voto de confiança, pelo incentivo e inestimável orientação que possibilitou o meu crescimento científico. Muito obrigada pela paciência profissional e pessoal.

Ao Dr. Marcelo De Franco por toda a atenção, apoio, ensinamento e bom humor contagiante!!!

A Dra. Wafa Cabrera pela contribuição intelectual e “braçal” neste trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunogenética: Dra. Olga Ibañez, Dra. Nancy Starobinas, Dra. Solange Massa, Dra. Milene De Franco e Dra. Solange Carbonare pelo incentivo.

Aos meus amigos adorados e adoráveis do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan: Layra (florzinha), Iana, Alessandra, Tatiane, Simone, Cristiano, Andrea Arruda, Fran, Luciana, Andrea Borrego, Vinícius, Patrícia, Ludmila, Thalita e Jussara. MUITÍSSIMO obrigado a todos vocês pela ajuda, pelos conselhos, pela companhia diária, pelas risadas e pela amizade. Vocês tornaram meus dias mais leves e felizes!!!

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética: Sandra Regina Ottoboni, Neusa Maria Coração Miranda, Marinalva de Jesus Lima, Tânia Maria Braga Vieira, Ronaldo Antônio Mateus e Rosa Maria da Silva por todo o trabalho e cuidado na preparação dos materiais utilizados.

Aos funcionários do biotério do Laboratório de Imunogenética: Celso dos Santos, Joel Faustino de Camargo, Luiz Carlos Hilário, Marinalva dos Santos Silva, Sergio Branco de Miranda pela ajuda com os animais.

Aos funcionários do departamento de Imunologia do ICB: Amarildo Utama, Jotelma Leite Ribeiro e Maria Eni do Sacramento Santos por toda orientação e paciência em esclarecer as “milhões” de dúvidas ao longo desse período.

A todos os animais, o meu muito obrigado e, acima de tudo, respeito por tornarem possível o desenvolvimento desse trabalho mesmo sem poder escolher.

A minha família amada, Jelson, Rita, Paula e Bruna, que torceu e torce por mim ao longo dessa minha caminhada, que me dá apoio nos meus momentos de fraqueza e que vibra quando eu estou feliz. A todos vocês eu sou imensamente grata pelos instantes convívios, por cada palavra de serenidade e perseverança, e por todo amor presente em nossa casa. Amo vocês!!!!

***“Eu sou é eu mesmo.
Divêrjo de todo o mundo.
Eu quase que nada sei.
Mas desconfio de muita coisa...”***

***Guimarães Rosa
"Grande Sertão: Veredas"***

RESUMO

SIQUEIRA, D. M. de; **Estudo da correlação entre a expressão de genes reguladores do estado de hipóxia e a intensidade da resposta inflamatória aguda.** 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A habilidade do organismo para se adaptar a mudanças ambientais é essencial para sua sobrevivência. Algumas moléculas atuam como sensores ambientais controlando a resposta a uma série de estímulos exógenos ou endógenos. No grupo de proteínas que realiza esta função destacam-se o *Hif-1 α* (fator induzível por hipóxia), o *Vegf* (fator de crescimento do endotélio vascular), e *Vhl* (Von Hippel-Lindau), além de genes alvo de citocinas pró- ou anti-inflamatórias. Camundongos geneticamente selecionados para alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) reatividade inflamatória aguda exibem diferenças significativas no número médio de leucócitos migrantes e no conteúdo protéico do exsudato inflamatório produzido por partículas de poliacrilamida (biogel). A maior capacidade inflamatória da linhagem AIRmax é decorrente de três fatores: maior capacidade da medula óssea em produzir neutrófilos maduros; maior produção de fatores quimiotáticos no sítio inflamatório e maior resistência à apoptose das células do exsudato. A regulação dos genes de hipóxia opera nas funções biológicas das células mielóides envolvidas nos processos inflamatórios agudos, desviando a via metabólica aeróbica de produção de ATP, para a via glicolítica, propiciando assim, condições funcionais celulares adequadas em situações de baixo nível de oxigênio. No presente estudo, realizamos ensaios biológicos no sentido de caracterizar as reações inflamatórias produzidas por diferentes agentes como o Biogel, o TPA, além de carcinógeno do tipo PAH (hidrocarboneto policíclico aromático). Correlacionando a estes fenótipos realizamos ensaios de expressão de RNAm de genes de hipóxia no tecido inflamado e analisamos o polimorfismo de marcadores genéticos do tipo microssatélites que flanqueiam o gene *Hif-1 α* . Verificamos que os camundongos AIRmax apresentaram maior intensidade de reação inflamatória do que os AIRmin para o Biogel e TPA, tendo por população predominante os neutrófilos. Por outro lado, a resposta ao DMBA ocorreu no sentido inverso, fato provavelmente relacionado aos alelos de alta ou baixa afinidade do gene do receptor a este composto, que foram fixados diferentemente nestas linhagens durante o processo seletivo. A expressão dos genes reguladores de hipóxia foi correlacionada com os fenótipos inflamatórios. Os dados conjuntos de fenótipo, expressão gênica e de polimorfismo candidatam a região do cromossomo 12 que contém, entre outros, o gene *Hif-1 α* , como participante da regulação da AIR.

Palavras-chave: Hipóxia. Inflamação. Fator induzível por hipóxia 1 α (*Hif-1 α*). Genes reguladores. Receptor aryl de hidrocarbonetos (*Ahr*). Camundongos.

ABSTRACT

SIQUEIRA, D. M. de; **Correlation between the expression of hypoxia regulatory genes and the intensity of acute inflammatory response.** 2009. 102 f. Master thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The ability of the organisms to adapt themselves to the environmental changes is essential for their survival. Some molecules act as environmental sensors controlling the cellular and molecular responses to a great number of exogenous or endogenous stimuli. The group of proteins that carry out this function includes the product of the *Hif-1 α* gene and its regulatory genes such as *Vegf* and *Vhl*, beyond the target genes that encode the pro-or anti-inflammatory cytokines. Mice genetically selected for high (AIRmax) or low (AIRmin) acute inflammatory reactivity exhibit significant differences in the average number of migrant leukocytes and in protein content of inflammatory exudate produced by polyacrylamide beads (Biogel). The higher inflammatory capacity of the AIRmax mice is due to three factors: increased capacity of bone marrow to produce mature neutrophils, increased production of chemotactic factors in the inflammatory site and resistance to spontaneous apoptosis of cells in the exudate. The hypoxia genes play an important role on myeloid cells determining their functions in inflammatory processes, deviating the aerobic metabolic process of the ATP production to the glycolytic pathway, thereby providing functional cell conditions in low oxygen levels. In this study, we characterized the inflammatory reactions produced by Biogel and by TPA, and we used DMBA as PAH irritant. Comparing these phenotypes, we tested the mRNA expression of the hypoxia genes and investigated the genetic polymorphism of microsatellite markers flanking the *Hif-1 α* gene. We found that AIRmax mice had greater intensity of the inflammatory reaction than AIRmin to Biogel and TPA, with a neutrophil infiltrate. Moreover, the response to DMBA was inversed probably due to the alleles with high or low affinity of the DMBA receptor gene which segregated in AIRmin and AIRmax mice, respectively. Our results of the inflammatory phenotypes, gene expression and genetic polymorphism candidate the region on chromosome 12, which contains, among others, the *Hif-1 α* gene in the regulation of the Acute Inflammatory reaction.

Key words: Hypoxia. Inflammation. Hypoxia-inducible factor 1 α (*Hif-1 α*). Regulatory genes. Aryl Hydrocarbon Receptor (*Ahr*). Mice.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ahr - Aryl Hydrocarbon Receptor

AIR - Resposta Inflamatória Aguda

AIRmax- Resposta Inflamatória Aguda Máxima

AIRmin - Resposta Inflamatória Aguda Mínima

Ap-1 - Activator-protein 1

ARNT – Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator

Asn - Asparagina

bHLH - basic helix-loop-helix

CBP/ p300 - Co-activators Binding Protein/p300

cM - centiMorgan

cT - Cycle Threshold

CTAD - C-terminal transactivation domain

DMBA - 7,12-dimetilbenzantraceno

DO – Densidade óptica

F1 – Híbridos interlinhagens

F2 – Segregantes interlinhagens

FIH-1 - Factor Inhibiting HIF-1

HE - Hematoxilina-Eosina

Hif-1 - Hypoxia-Inducible Factor 1

HPHs - HIF prolyl hidroxilase

HREs - Hypoxia-responsive elements

MGI – Mouse Genomic Informatics

MPO – Mieloperoxidase

NF-κB - Nuclear factor- κB

NTAD - N-terminal transactivation domain

ODD - Oxygen-dependent degradation

PAHs - Polycyclic aromatic hydrocarbons (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos)

PBS – Salina tamponada com fosfatos

PCR - *Polimerase Chain Reaction*

Per-Arnt-Sim - Period Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator single-minded

PHDs – Prolyl Hydroxylases

Pro - Prolina

pO₂ - Pressão parcial do oxigênio

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorfism

SSLPs - Simple Sequence Length Polymorphisms

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

Vegf- α - Vascular Endothelial Growth Factor- α

VEGFR - Vascular endothelial growth factor receptor

Vhl – von Hippel-Lindau

XRE - Elemento responsivo ao xenobiótico

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Regulação pós-transcricional do HIF-1 α	25
Figura 2 -	Esquema representativo do HIF-1 α em condições de normóxia e hipóxia.....	27
Figura 3 -	Gráfico representativo da divergência entre as linhagens AIR quanto ao número médio de leucócitos infiltrantes e extravasamento protéico no sítio de injeção do Biogel.....	30
Figura 4 -	Estrutura molecular do 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA).....	32
Figura 5 -	Estrutura Molecular do 9,10-dimetilbenzoantraceno (DMBA)...	33
Figura 6 -	Gráficos relativos ao cT (A) e a curva de <i>Melting</i> ou de dissociação (B) do gene <i>cyclofilina</i>	46
Figura 7 -	Cinética do número de células infiltradas no exsudato subcutâneo em camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com Biogel P100.....	52
Figura 8 -	Caracterização das populações celulares presentes no exsudato subcutâneo, após tratamento com Biogel P100.....	53
Figura 9 -	Citogramas representativos das células do exsudato subcutâneo após 24 horas do tratamento com Biogel P100.....	55
Figura 10 -	Representação gráfica dos citogramas das células do exsudato subcutâneo após 24 horas do tratamento com Biogel P100.....	55
Figura 11 -	Quantificação da mieloperoxidase presente no exsudato subcutâneo, após tratamento com Biogel P100.....	56
Figura 12 -	Cinética do aumento da espessura da orelha de camundongos machos AIRmax e AIRmin em resposta ao tratamento com TPA.....	58
Figura 13 -	Cinética do número de células presentes na derme da orelha de camundongos machos AIRmax e AIRmin em resposta ao tratamento com TPA.....	58
Figura 14 -	Caracterização das populações celulares presentes na derme da orelha após tratamento com TPA, em camundongos AIRmax e AIRmin.....	60

Figura 15 -	Citogramas representativos da análise das células da derme da orelha de animais AIRmax e AIRmin tratados com TPA.....	62
Figura 16 -	Representação gráfica do citograma das células emigrantes da orelha dos camundongos AIRmax e AIRmin, após 24hs do tratamento com TPA.....	62
Figura 17 -	Quantificação da mieloperoxidase presente na pele da orelha de camundongos AIRmax e AIRmin em resposta ao tratamento com TPA.....	63
Figura 18 -	Fotomicrografias das peles das orelhas de camundongos AIRmax e AIRmin após 24 horas do tratamento com TPA.....	65
Figura 19a -	Expressão relativa dos genes <i>Hif-1α</i> , <i>Vhl</i> , <i>Arnt</i> e <i>Ahr</i> a partir do cDNA obtido da orelha de animais tratados ou não com TPA.....	67
Figura 19b -	Expressão relativa dos genes <i>Hif-1α</i> , <i>Vhl</i> , <i>Arnt</i> e <i>Ahr</i> a partir do cDNA obtido da orelha de animais tratados ou não com TPA.....	68
Figura 20 -	Camundongos AIRmax e AIRmin, 48hs após o tratamento com DMBA por 5 dias consecutivos.....	70
Figura 21 -	Número de células emigradas da pele do dorso de camundongos AIRmax e AIRmin, em resposta ao tratamento com DMBA por 5 dias consecutivos.....	71
Figura 22 -	Caracterização das populações celulares presentes na derme da orelha após tratamento com DMBA por 5 dias consecutivos.....	72
Figura 23 -	Quantificação da mieloperoxidase presente na pele do dorso de camundongos AIRmax e AIRmin em resposta ao tratamento com DMBA por 5 dias consecutivos.....	73
Figura 24 -	Fotomicrografias da pele do dorso de camundongos machos 48 horas após o tratamento com DMBA 5x.....	74
Figura 25 -	Expressão relativa dos genes <i>Hif-1α</i> (A), <i>Vhl</i> (B) e <i>Arnt</i> (C) a partir do cDNA obtido da pele do dorso de animais tratados ou não com DMBA.....	76
Figura 26 -	Análise dos microssatélites D12Mit153 e D12Mit156.....	80
Figura 27 -	Distribuição dos microssatélites estudados ao longo do cromossomo 12.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Seqüências de primers para utilização em q-PCR.....	46
Tabela 2 -	Definições de alelos de microsatélites nas linhagens isogênicas constituintes da F0.....	81
Tabela 3 -	Microsatélites do cromossomo 12 em animais AIRmax e AIRmin.....	82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	Camundongos.....	38
3.2	Tratamento e avaliação da resposta inflamatória.....	38
3.2.1	Preparo do Biogel P100.....	38
3.2.2	Indução e quantificação da AIR produzida por Biogel.....	38
3.2.3	Indução da inflamação por TPA.....	39
3.2.4	Indução da inflamação por DMBA.....	39
3.2.5	Obtenção das células infiltradas na derme.....	39
3.3	Citometria de fluxo.....	41
3.4	Quantificação de MPO.....	41
3.5	Preparação Histológica.....	42
3.6	Extração de RNA.....	42
3.6.1	Extração de RNA da pele.....	42
3.6.2	Extração de RNA da orelha.....	43
3.7	Obtenção do cDNA.....	43
3.8	Reações de PCR em Tempo-Real ou quantitativo (qPCR).....	43
3.8.1	Quantificação do RNA mensageiro por PCR em Tempo-Real	43
3.8.2	Cálculo da expressão relativa.....	44
3.9	Extração de DNA genômico.....	47
3.10	Análise de polimorfismo de microssatélites de DNA.....	48
3.11	Análise estatística	49
4	RESULTADOS.....	50
4.1	Resposta inflamatória dos camundongos AIRmax e AIRmin ao tratamento com Biogel P100.....	51
4.1.1	Citometria de fluxo.....	54
4.1.2	Ensaio da mieloperoxidase (MPO)	56
4.2	Resposta inflamatória dos camundongos AIRmax e AIRmin ao tratamento com 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA).....	57
4.2.1	Citometria de fluxo.....	61
4.2.2	Ensaio da mieloperoxidase (MPO).....	63

4.2.3	Análise histológica.....	64
4.2.4	Expressão gênica	66
4.3	Resposta inflamatória dos camundongos AIRmax e AIRmin ao tratamento com 9, 10 –dimetilbenzoantraceno (DMBA)	69
4.3.1	Ensaio da mieloperoxidase (MPO)	73
4.3.2	Análise histológica.....	74
4.3.3	Expressão gênica	75
4.4	Análise de polimorfismo nos microssatélites D12Mit153 e D12Mit156	77
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

A resposta imune inata é essencial para a proteção do organismo agindo imediatamente após injúrias teciduais e infecções, sendo que o desenvolvimento de uma resposta ineficiente gera intensos danos aos órgãos afetados. Compreender os fatores que regulam o aparecimento, manutenção e resolução da inflamação é, portanto, fundamental para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas eficazes (WALMSLEY *et al.*, 2005).

Um importante órgão envolvido na defesa inicial do organismo é a epiderme que, além de atuar como uma barreira física, também possui outros mecanismos de defesa, tais como: descamação contínua do epitélio e a ação de proteínas e peptídeos microbicidas como a β -defensina (MEYER *et al.*, 2007). Injúrias teciduais promovem o rompimento da integridade da epiderme, favorecendo a instalação de microorganismos e levando a alterações químicas no microambiente atingido. Tais alterações levam a geração de regiões inflamatórias, sendo estas um ambiente inóspito, caracterizado por baixos níveis de glicose e oxigênio, e altas concentrações de lactato e radicais livres de oxigênio. É nesse ambiente que as células do sistema imune inato atuam buscando restaurar a homeostase tecidual. Para tanto, organismos superiores desenvolveram mecanismos de adaptação às mudanças ambientais, função essencial para a sua sobrevivência, que se dá por meio de moléculas que atuam como sensores ambientais, controlando a resposta do organismo a uma variedade de injúrias (SCHOR *et al.*, 2000; SAADI *et al.*, 2002; WALMSLEY *et al.*, 2005).

Em tecidos saudáveis, a tensão de oxigênio (ou pressão parcial do oxigênio, pO_2) é geralmente entre 20 e 70 mmHg, sendo esses valores variáveis de acordo com o órgão analisado. Como exemplo podemos citar: o tecido cutâneo onde temos uma pO_2 compreendida entre 50-60 mmHg, o fígado cuja pO_2 venosa encontra-se em torno de 30-35 mmHg e os tecidos musculares com uma pO_2 de aproximadamente 25 mmHg (LEWIS *et al.*, 1999; ZHOU *et al.*, 2000). Em caso de perfusão inadequada, como em situações de injúria tecidual ou infecções, dentre outros, a tensão de oxigênio nessas áreas pode chegar a menos de 10 mmHg (LEWIS *et al.*, 1999). Diante desta ampla faixa de variação na tensão de oxigênio em tecidos saudáveis, há certa dificuldade em estabelecer um valor padrão correspondente a um estado de hipóxia. Sendo assim, um conceito mais indicado

para definição de hipóxia é de que esta ocorre quando o fornecimento de O_2 é insuficiente para a demanda do tecido (PAPANDREOU *et al.*, 2005; QU *et al.*, 2005).

Inúmeras patologias demonstram períodos prolongados de reduzido fluxo sanguíneo e vasoconstrição, resultando em queda acentuada de pO_2 tecidual. A perfusão inadequada leva a formação de microambientes hipóxicos característicos nas neoplasias, arteriosclerose, em situações de fraturas ósseas, em artrite reumatóide e nas situações onde o componente inflamatório é importante (HUNT, 1984; LEWIS *et al.*, 1999; NINIKOSKI e HUNT, 1972). Esta queda na oxigenação pode afetar profundamente algumas propriedades funcionais das células tais como: fagocitose, expressão de moléculas de superfície, secreção de citocinas, níveis de expressão de receptores de quimiocinas, conseqüentemente, prejudicando a adesão, migração e sobrevivência celular. Em decorrência destas alterações, o organismo deve utilizar de mecanismos alternativos para reagir em situações adversas de O_2 (LEWIS *et al.*, 1999; CRAMER *et al.*, 2003).

Aproximadamente 95% das células mielóides circulantes são recrutadas para os locais de inflamação, movendo-se contra um gradiente de oxigênio a fim de atingir as áreas injuriadas (LEWIS *et al.*, 1999). O papel crítico das células mielóides reside no fato de responderem rapidamente a pequenas alterações no equilíbrio do organismo, dando origem a uma reação inflamatória local que busca conter e resolver a injúria sem a necessidade de ativação da imunidade adaptativa (SAADI *et al.*, 2002; SCHOR *et al.*, 2000). Como representantes fagocíticos desta população mielóide temos monócitos/macrófagos e neutrófilos (ZINKERNAGEL *et al.*, 2007). Estudos têm demonstrado que tais células são altamente dependentes do processo de glicólise para a produção de ATP (CRAMER *et al.*, 2003). O uso de inibidores glicolíticos induz uma grande redução nas concentrações de ATP celular e nas funções celulares de agregação e invasão, enquanto que inibidores da respiração mitocondrial têm pouco ou nenhum efeito sobre a resposta inflamatória, destacando assim, o importante papel da glicólise para essas células (CRAMER *et al.*, 2003; POELLINGER e JOHNSON, 2004). Uma vez que a glicólise representa o principal meio de geração de ATP na ausência de oxigênio, a dependência de neutrófilos e de outras células mielóides desta via metabólica sugere que eles são altamente

adaptados nas situações de hipóxia (LEWIS *et al.*, 1999; POELLINGER e JOHNSON, 2004). Estas observações indicam uma acentuada dependência de neutrófilos e macrófagos das funções do fator induzível por hipóxia, um dos principais mediadores de adaptação a níveis criticamente baixos de oxigênio (SEMENZA, 2001c).

A capacidade de percepção desenvolvida pelas células de mamíferos, respondendo às modificações na tensão do oxigênio ambiental modula a expressão de genes específicos cujas moléculas produzidas são capazes de manter a homeostase (SALCEDA *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 2004). A hipóxia pode influenciar a expressão de aproximadamente 1% dos genes num genoma dentre os quais, vários fatores de transcrição como *Ap-1* (*activator-protein 1*), *NF-κB* (*nuclear factor- κB*) e *Hif-1* (*hypoxia-inducible factor 1*) (PAPANDREOU *et al.*, 2005; SEMENZA e WANG, 1992).

O fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1, do inglês *Hypoxia-Inducible Factor 1*) é um ativador transcricional atuante na angiogênese de tumores e no desenvolvimento de mamíferos (LEE *et al.*, 2004), induzindo a transcrição de mais de sessenta proteínas. Os genes-alvo da ação do fator HIF-1 α são particularmente relevantes na codificação de fatores angiogênicos, fatores de proliferação e de sobrevivência celular, além de transportadores de glicose e de enzimas glicolíticas, aumentando a disponibilidade de oxigênio (SEMENZA, 2003; LEE *et al.*, 2004).

Camundongos *knockout* para o *Hif-1 α* , tratados com 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) na orelha, apresentam uma quase total inibição na formação do edema, assim como uma diminuição no infiltrado de células inflamatórias, ou seja, uma drástica redução na intensidade da reação inflamatória (CRAMER *et al.*, 2003). Outros estudos com os mesmos animais, mostraram uma viabilidade bacteriana 7 vezes maior em macrófagos de animais deficientes em *Hif-1 α* , do que em relação aos animais ditos competentes para o referido gene (CRAMER *et al.*, 2003). Além disso, a ausência da ação do gene *Hif-1 α* em camundongos no estágio embrionário é letal, com os embriões apresentando defeitos no tubo neural, malformações cardiovasculares, apoptose mesenquimal e aumento de áreas hipóxicas (PAPANDREOU *et al.*, 2005; ZINKERNAGEL *et al.*, 2007).

Dentre os genes alvos do complexo HIF-1 temos o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular α (*Vegf- α – Vascular Endothelial Growth Factor- α*), produzido especificamente pelas células endoteliais em condições de hipóxia. Este fator é considerado um potente mitógeno endotélio-específico, além de participar diretamente da angiogênese. Este fator e seu receptor (VEGFR - Vascular endothelial growth factor receptor) são críticos na regulação da permeabilidade vascular e sobrevivência das células endoteliais (MURA *et al.*, 2006).

O HIF-1 é um heterodímero protéico básico que regula a transcrição dos elementos responsivos a hipóxia (HREs – *Hypoxia-responsive elements*) e é composto por duas subunidades, HIF-1 α e HIF-1 β pertencentes ao subgrupo da família de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (bHLH - basic helix-loop-helix), a qual contém o motivo PAS. O termo PAS é derivado dos membros fundadores desta família, PER-ARNT-SIM (Period Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator single-minded) (CREWS e FAN, 1999). Em geral, a família de proteínas PAS pode ser considerada como sensores ambientais em razão de seus papéis no ritmo circadiano como: influência sobre a digestão, estado de vigília, crescimento e renovação de células e regulação da temperatura corporal (SCHMIDT *et al.*, 1993). A proteína SIM é uma proteína pertencente também à família bHLH envolvida na especificação do destino celular durante a diferenciação. PER é conhecido por estar envolvido na manutenção do ritmo circadiano, não possui a região bHLH, e pode atuar de forma inibitória. ARNT é uma proteína translocadora nuclear (SCHMIDT e BRADFIELD, 1996).

A atividade do HIF-1 é regulada por um mecanismo de modificação pós-transcricional do HIF-1 α , aumentando a estabilidade protéica e a capacidade de transativação. A subunidade HIF-1 α possui dois domínios terminais de transativação: o domínio N terminal (NTAD - N-terminal transactivation domain) e o C terminal (CTAD - C-terminal transactivation domain). O domínio N terminal é também chamado de domínio de degradação dependente de O₂ (ODD - oxygen-dependent degradation), o qual confere a regulação do nível protéico de HIF-1 α em função da concentração do oxigênio molecular. A principal função do CATD é recrutar e interagir com proteínas co-ativadoras transcricionais como o CBP/ p300 (Co-activators Binding Protein/p300) (SEMENZA, 2003; POELLINGER e

JOHNSON, 2004). A regulação transcricional do HIF-1 α está diretamente relacionada à modulação da inflamação (CRAMER *et al.*, 2003).

Na presença de oxigênio, HIF-1 α sofre várias modificações como a hidroxilação de dois resíduos de prolina, Pro402 e Pro564 no domínio ODD e a acetilação de um resíduo de lisina. Essas modificações são mediadas por proteínas possuidoras de domínios prolyl hidroxilase (PHDs – *Prolyl Hydroxylases*) ou HIF prolyl hidroxilase (HPHs). HIF prolyl hidroxilases são enzimas muito específicas e extremamente sensíveis a oscilações no nível de oxigênio celular, devido ao fato de suas atividades serem dependentes de condições adequadas de oxigenação tornando-os, portanto, autênticos sensores do nível de oxigênio em sistemas biológicos (BRUICK *et al.*, 2001; MCNEILL *et al.*, 2002; HEWITSON *et al.*, 2003; HÄGG *et al.*, 2005). A hidroxilação destes resíduos promove uma interação de alta afinidade entre HIF-1 α e a proteína do gene supressor de tumor von Hippel-Lindau (pVHL – von Hippel-Lindau protein). A proteína de von Hippel-Lindau ou VHL funciona como um substrato de reconhecimento a um complexo ubiquitina ligase E3 que medeia a ubiquitinação do HIF-1 α , levando à sua rápida degradação via proteassomo (HÄGG *et al.*, 2005). A deleção do gene *Vhlh* (*Vhl*) resulta em uma hiperinflamação devido à ausência de regulação negativa do HIF-1 α (CRAMER *et al.*, 2003) (**Figuras 1 e 2**).

FIGURA 1: Regulação pós-transcricional do HIF-1 α . LEE *et al.*, 2004.

Outro tipo de regulação do HIF-1 α dá-se por meio da hidroxilação de um resíduo de asparagina, Asn803, localizada na região CTAD. Esta modificação que

é mediada pelo fator de inibição do HIF (FIH-1 - Factor Inhibiting HIF-1), bloqueia a interação do CTAD com o co-ativador transcrricional CBP/p300, inibindo assim a transativação mediada pelo HIF-1 α . Além disso, foi recentemente demonstrado que FIH-1 pode diminuir a atividade da subunidade HIF-1 α mesmo em situações de hipóxia severa, sendo, portanto, um mecanismo potencial de regulação do HIF-1 em condições nas quais as PHDs não são capazes de atuar (STOLZE *et al.*, 2004; BA'RDOS e ASHCROFT, 2005). FIH-1 também interage com o VHL facilitando o recrutamento de HIF-1 α para subsequente ubiquitinação e degradação desta subunidade (MAHON *et al.*, 2001).

Quando os níveis de oxigênio celular diminuem, a modificação e degradação do HIF-1 α cessam, havendo um rápido acúmulo do HIF-1 α no citoplasma e sua translocação para o núcleo, onde ocorre sua dimerização com o HIF-1 β (ARNT – Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator, ou, Translocador Nuclear do Receptor Aryl) e, o complexo HIF-1 formado torna-se transcrionalmente ativo (KE e COSTA, 2006). O complexo HIF-1 α /HIF-1 β inicia a transcrição de genes-alvo ligando-se a uma sequência de pentanucleotídeos (RCGTG) no DNA, denominada elementos responsivos à hipóxia (HREs) (POELLINGER e JOHNSON, 2004; HÄGG *et al.*, 2005) (**Figura 2**).

FIGURA 2: Esquema representativo do HIF-1 α em condições de normóxia e hipóxia. CARROL e ASHCROFT, 2005.

Ao contrário da subunidade α , a subunidade HIF-1 β (ARNT) é expressa constitutivamente no núcleo e sua atividade é controlada independentemente dos níveis de oxigênio (STOCKMANN e FANDREY, 2006).

Atualmente dois novos membros da família HIF- α foram descritas: HIF-2 α e HIF-3 α (PAPANDREOU *et al.*, 2005). HIF-2 α , conhecido como proteína endotelial PAS-1 ou EPAS-1, é também hiper-regulado pela hipóxia (MAXWELL *et al.*, 1999). Assim como o HIF-1 α , esta subunidade interage com o ARNT formando um complexo que atua na sequência HRE do núcleo. Além disto, HIF-2 α é submetido à mesma regulação pós-transcricional que o HIF-1 α , ou seja, interage com o VHL sendo degradado via proteassomo em condições de oxigenação normal (WIESENER *et al.*, 1998; CHAN *et al.*, 2002). As proteínas HIF-1 α e HIF-2 α

compartilham 48% de identidade, no entanto, HIF-1 α parece ser predominante em células epiteliais, enquanto HIF-2 α atua principalmente em células endoteliais e fibroblastos (ROSENBERGER *et al.*, 2002; BA'RDOS e ASHCROFT, 2005).

A isoforma HIF-3 α possui alto grau de similaridade com HIF-1 α e HIF-2 α quanto aos domínios bHLH e PAS, mas não apresenta as estruturas de transativação encontradas na região C-terminal das outras subunidades. Sua atividade também é hiper-regulada em baixas condições de oxigênio, formando um complexo com o ARNT e indo agir no núcleo, no entanto, o HIF-3 α atua reprimindo a expressão do gene induzível por hipóxia (HARA *et al.*, 2001; BA'RDOS e ASHCROFT, 2005).

Diferentes formas alélicas do *Hif-1 α* , relacionadas a elevada capacidade de transativação, podem conferir diferentes graus de susceptibilidade ao câncer em humanos, dos quais ressaltamos os tumores de colon, mama, próstata e esôfago. Esta associação entre o polimorfismo do gene *Hif-1 α* e a progressão tumoral foi sugerida em 2003 por Tanimoto e colaboradores (TANIMOTO *et al.*, 2003).

As semelhanças biológicas e genéticas dos processos inflamatórios e do desenvolvimento de câncer são particularmente nítidas entre humanos e camundongos. Assim, o camundongo tem sido explorado como um organismo modelo para o estudo de fenômenos biológicos complexos.

Baseados na participação do gene *Hif-1 α* nos processos inflamatórios agudos ou crônicos e na progressão de tumores, utilizamos, no presente estudo, modelo animal constituído de duas linhagens de camundongos geneticamente selecionadas, por meio de Seleção Genética Bidirecional, para a capacidade inflamatória aguda. Estas linhagens diferem na capacidade em desenvolver resposta inflamatória aguda (AIR) e apresentam diferenças marcantes na susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções e tumores (BIOZZI *et al.*, 1998; IBAÑEZ *et al.*, 1992).

O processo de Seleção Genética para a obtenção das linhagens AIR foi realizado a partir de uma população de camundongos geneticamente heterogênea resultante de cruzamentos entre oito linhagens isogênicas, conforme esquema abaixo:

Como resultado destes cruzamentos, foi constituída uma população de camundongos, denominada F0, com alta heterogeneidade genética, onde cada indivíduo carregava a combinação aleatória de 12,5% do material genético derivado de cada linhagem isogênica parental.

O processo seletivo foi desenvolvido utilizando como agente flogístico o Biogel P100 (partículas de poliacrilamida), substância insolúvel, não biodegradável e não imunogênica, administrado subcutâneamente no dorso do animal. A reação inflamatória foi avaliada após 24 horas da injeção de biogel e caracterizada levando-se em conta o número e a morfologia das células infiltradas, além da concentração de proteínas presentes no exsudato inflamatório. Com estes parâmetros verificamos que a intensidade da resposta inflamatória variou nos animais da população F0, segundo uma curva normal de distribuição (STIFFEL *et al.*, 1990; IBAÑEZ *et al.*, 1992).

Foram escolhidos para o acasalamento os animais da população F0 situados nos extremos da curva de distribuição, ou seja, aqueles que apresentavam valores mais altos de celularidade e concentração protéica para a obtenção da linhagem de máxima resposta (AIRmax) e os que apresentavam valores mais baixos para a linhagem de mínima resposta (AIRmin). Os acasalamentos foram repetidos em gerações consecutivas até ser atingida a máxima separação fenotípica, onde se observou a conservação dos fenótipos extremos, indicando que os genes relacionados ao controle da AIR fixaram-se em homozigose em cada linhagem, mantendo-se, contudo, um fundo genético heterogêneo (STIFFEL *et al.*, 1990; IBAÑEZ *et al.*, 1992; RIBEIRO FILHO, O.G., 1994).

Durante o processo seletivo houve aumento progressivo da diferença fenotípica entre as duas linhagens AIR, indicando que este caráter é quantitativamente regulado pela interação aditiva de vários genes que segregam independentemente e cujos alelos de efeito de máxima ou mínima reatividade inflamatória foram acumulados progressivamente durante o processo de seleção. A partir da 20^a geração de seleção, admitiu-se que as linhagens atingiram o limite de seleção, onde os alelos responsáveis pelo caráter selecionador, naqueles genes que eram polimórficos na F0, estariam fixados em homozigose em cada linhagem, mantendo-se a heterogeneidade do fundo genético (**Figura 3**). Por métodos de genética quantitativa foi estimada a participação de 7 a 11 loci gênicos independentes controladores da AIR (IBAÑEZ *et al.*, 1992; RIBEIRO FILHO, 1994; BIOZZI *et al.*, 1998).

FIGURA 3: Gráfico representativo da divergência entre as linhagens AIR quanto ao número médio de leucócitos infiltrantes e extravasamento protéico no sítio de injeção do Biogel. FONTE: Modificado de BIOZZI *et al.*, 1998, com permissão.

A diferença estabelecida entre AIRmax e AIRmin é, sobretudo, reflexo do número de leucócitos migrantes ao sítio inflamatório em resposta ao Biogel, sendo que os neutrófilos representam as principais células deste infiltrado. Atualmente, na 48^a geração, a diferença entre as duas linhagens no número médio de leucócitos migrantes ao sítio de injeção do Biogel é de aproximadamente 20 vezes a favor da linhagem AIRmax.

Este maior número de neutrófilos encontrado no exsudato dos camundongos AIRmax é decorrente da convergência de três fatores: maior atividade da medula óssea em produzir neutrófilos maduros em consequência de

alta resposta para citocinas granulopoiéticas como IL-3, IL-5 e fator de estimulação de colônia granulocítica e monocítica (GM-CSF); maior produção de fatores quimiotáticos, como C3a e C5a formados pela ativação do sistema complemento e proteína inflamatória do macrófago 2 (MIP-2), pelas células residentes ou infiltrantes para atrair neutrófilos após tratamento com Biogel e maior resistência a apoptose espontânea das células do exsudato (RIBEIRO *et al.*, 2003).

A diferença interlinhagens, no que concerne à AIR, estendeu-se a outros agentes inflamatórios não relacionados entre si ou ao Biogel, como zymozan, carragenina (VASQUEZ-BRAVO, 1996) e veneno de *Bothrops jararaca* (CARNEIRO *et al.*, 2002) ou *Lonomia obliqua* (RAMOS *et al.*, 2004). Estes compostos induziram também afluxo leucocitário e formação de edema pronunciados nos camundongos AIRmax. No que concerne a doenças inflamatórias, estas linhagens diferiram na susceptibilidade ao desenvolvimento de artrite autoimune desencadeada por pristane (VIGAR *et al.*, 2001) e na inflamação alérgica à ovalbumina no tecido subcutâneo e pulmonar sendo maiores as reações nos animais AIRmax (CAMPOS, 2001). Além disso, a resposta imune específica não foi afetada pelo processo seletivo, uma vez que as linhagens AIRmax e AIRmin produzem títulos de anticorpos semelhantes após a imunização com doses ótimas de antígenos complexos (ARAUJO *et al.*, 1998).

As alterações genéticas decorrentes do processo seletivo também interferiram na resistência ou susceptibilidade destas linhagens à tumorigênese e a infecções por patógenos intracelulares. Os camundongos AIRmax que apresentam uma alta reação inflamatória mostraram-se resistentes à carcinogênese química de pele, no protocolo em duas etapas induzida por agentes químicos como 9,10-dimetilbenzoantraceno (DMBA) como iniciador, seguida de promoção por 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), enquanto os AIRmin, que produzem reação inflamatória “fraca”, são sensíveis (BIOZZI *et al.*, 1998).

O 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato ou TPA (**Figura 4**) é encontrado na planta de cróton, um arbusto do sudeste da Ásia, e sua exposição provoca a formação de exantemas (KOLB *et al.*, 2004). É um potente promotor de tumores que mimetiza o segundo mensageiro (diacilglicerol) ativador da proteína quinase

C (PKC) e altera as vias de sinalização celular, induzindo uma forte resposta inflamatória (KOLB *et al.*, 2004; MUELLER, 2006).

FIGURA 4: Estrutura molecular do 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA)

Há poucos promotores de tumor que atuam sem induzir uma resposta inflamatória, no entanto a reação inflamatória observada inicialmente durante o tratamento com o TPA, não é mantida durante o desenvolvimento do tumor, aproximadamente sete semanas após o início do tratamento (MUELLER, 2006).

O TPA atua na fase de promoção da lesão, sendo identificados processos inflamatórios e de hiperplasia como fenômenos essenciais na promoção da lesão tumoral. Atua na pele do camundongo induzindo a produção de ciclooxigenase-2 e aumento da produção de prostaglandina E_2 . As ciclooxigenases convertem o ácido aracdônico em prostanóides, os quais estão profundamente envolvidos em muitas condições patológicas, especialmente doenças relacionadas à inflamação (PARK *et al.*, 2001).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs - Polycyclic aromatic hydrocarbons) como o DMBA (**Figura 5**), aos quais as linhagens AIRmax e AIRmin respondem diferentemente, são potentes carcinógenos, mutagênicos e teratogênicos (ANDERSON *et al.*, 1995; BIOZZI *et al.*, 1998; DE SOUZA *et al.*, 2009). São contaminantes ambientais gerados pela combustão incompleta de combustível fóssil, fazendo parte dos constituintes da exaustão dos automóveis, da emissão industrial e do tabaco (ANDERSON *et al.*, 1995). Além disso, o DMBA é também um eficaz imunossupressor para humanos e para outras espécies de animais após ser oxidado para a sua forma ativa, DMBA-3,4-dihydrodiol (DEAN *et al.*, 1985; LADICS *et al.*, 1991; GALVÀN *et al.*, 2003). Alguns estudos em

linhagens celulares associam o DMBA a distúrbios na formação do fuso durante a divisão celular com a indução de aneuploidias, poliploidias e instabilidade cromossômica (WU *et al.*, 1997; MATSUOKA *et al.*, 1998).

FIGURA 5: Estrutura Molecular do 9,10-dimetilbenzoantraceno (DMBA)

A resposta tóxica a esse composto é dependente de sua metabolização. Assim, o processo de toxicidade inicia-se pela ligação do hidrocarboneto aromático (DMBA) a um receptor de aril hidrocarbonetos (*Ahr* – *Aryl Hydrocarbon Receptor*), um fator de transcrição localizado no citosol como parte de um complexo formado por algumas proteínas estabilizadoras. Quando ocorre a ligação dos PAHs com o receptor, este se dissocia do complexo e dirige-se para o núcleo onde é heterodimerizado com a mesma proteína utilizada pelo HIF-1 α , o ARNT ou HIF-1 β . O complexo heterodimérico liga-se a uma sequência denominada XRE (elemento responsivo ao xenobiótico), que irá codificar as enzimas envolvidas no metabolismo dos PAHs como CYP1A1 no fígado e CYP1B1 na medula óssea, e mediar os efeitos tóxicos destes hidrocarbonetos aromáticos (HANKISON, 1995; SALCEDA *et al.*, 1996; HEIDEL *et al.*, 2000).

O receptor *Ahr* exibe considerável variabilidade estrutural e funcional em linhagens isogênicas de camundongos e este polimorfismo é resultado da existência de vários alelos no locus *Ahr* (aryl hydrocarbon receptor) que o codifica. Estes alelos são definidos por variações no exon 7, estrutural e no exon 9, funcional (SCHMIDT *et al.*, 1993; THOMAS *et al.*, 2002).

No exon 9, responsável por codificar os aminoácidos formadores do domínio de ligação do receptor, existe um polimorfismo que resulta na troca de aminoácidos (alanina por valina na posição 375) na proteína proporcionando diminuição da afinidade do *Ahr* a xenobióticos (POLAND e GLOVER, 1990). O polimorfismo no exon 7 é observado por RFLP, ou seja, encontramos a perda do

sítio de uma enzima de restrição Eco47III por variação no nucleotídeo 752 (AGCGCT→AGCACT) (SCHMIDT *et al.*, 1993). Camundongos C57BL/6 que apresentam receptores AHR de alta afinidade apresentam o alelo *Ahr^{b1}* que é digerível pela enzima de restrição Eco47III, enquanto os camundongos DBA/2 que apresentam receptor de baixa afinidade têm o alelo *Ahr^d*, resistente à digestão (SCHMIDT *et al.*, 1993). A presença destas mutações foi constatada nos animais AIRmax e AIRmin, havendo uma fixação completa do alelo de baixa afinidade *Ahr^d* nos camundongos AIRmax, enquanto os animais AIRmin apresentam o alelo do gene *Ahr^{b1}* que confere alta afinidade do receptor (DE SOUZA *et al.*, 2009).

Tendo em vista a grande diferença fenotípica entre os camundongos AIRmax e AIRmin no que concerne à reatividade inflamatória, nos propomos estudar nestas linhagens a relação dos genes moduladores de hipóxia tais como, *Hif-1α*, *Vegf*, *Vhl* bem como aqueles participantes na metabolização dos xenobióticos, *Ahr* e *Arnt*, com a intensidade da reação inflamatória aguda induzida sub ou epicutaneamente com diferentes flogógenos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar comparativamente nas linhagens AIRmax e AIRmin a participação do complexo gênico operante nas situações de hipóxia promovidas por indução de reação inflamatória cutânea. Este estudo desenvolveu-se por meio das seguintes análises:

- caracterização das reações inflamatórias produzidas por Biogel P100 injetado subcutâneamente no dorso do animal, por TPA aplicado epicutaneamente na orelha e por aplicação epicutânea do DMBA no dorso, no que concerne à quantificação da celularidade e análise histológica;
- expressão gênica, por meio de experimentos de quantificação de RNAm em reação de PCR em tempo real (Real-Time PCR), do fator de transcrição de hipóxia *Hif-1 α* e de alguns de seus genes alvos.
- estudo do polimorfismo genético de marcadores do tipo microssatélites da região cromossômica que contém o gene *Hif-1 α* .

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Foram utilizados animais AIRmax e AIRmin machos ou fêmeas produzidos e mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan em condições padrão, recebendo dieta peletizada de camundongo Nuvital® e água *ad libitum*. Os procedimentos estão de acordo com os princípios da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (protocolo nº.100/2007).

3.2 Tratamentos e avaliação da resposta inflamatória

3.2.1 Preparo do Biogel P100

Para a indução da reação inflamatória foram utilizadas microesferas de poliácridamida Biogel P100 (Bio-Rad, Tougar e Matingnom, França) cuja porosidade tem limite de exclusão protéica para moléculas acima de 100kDa. Duas a quatro gramas do Biogel foram hidratados durante 1 hora em 300 ml de PBS previamente aquecido a 90°C. Após hidratação, o gás retido foi removido por vácuo e a suspensão esterilizada por 20 min a 120 °C. A suspensão foi então lavada três vezes com salina apirogênica estéril e ressuspensa num volume correspondente à metade do volume ocupado com o Biogel hidratado (53mg de peso seco/mL) (STIFFEL *et al.*, 1990).

3.2.2 Indução e quantificação da AIR produzida por Biogel

Fez-se a aplicação subcutânea de 0,75 ml da suspensão de Biogel P-100 (BioRad) no dorso do animal previamente depilado, com agulha 25 x 7 em seringa de 3 ml. Após o tempo determinado, fez-se a lavagem do exsudato com 1 ml de PBS + heparina (20 U/ml). O lavado foi esgotado em tubo de 5 ml onde permaneceu por 3 minutos para sedimentação do Biogel. Após esse tempo, 500µl do sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo 2 ml de PBS estéril, onde foi deixado por mais 2 minutos para a sedimentação de partículas de Biogel restantes. Posteriormente, foram retirados 100µl do sobrenadante e depositados em tubo contendo 400µl do corante azul de metileno 0,1%, em ácido acético

0,1%. Realizou-se por fim a determinação da concentração celular por meio de contagem em câmara hemocitométrica de Malassez. Uma alíquota de 300µl de cada suspensão na concentração de 2×10^4 células/ml foi utilizada para a preparação de lâminas histológicas em citocentrífuga (Shandon Cytospin 4) e coradas pelo método Diff-Quik.

3.2.3 Indução da Inflamação por TPA

Quatro microgramas de TPA (Sigma) em 20µl de acetona foram aplicados com auxílio de pipeta nas faces interna e externa de uma das orelhas dos camundongos em um total de 60 animais, todos machos com idade entre dois a três meses, sendo 30 animais AIRmax e 30 animais AIRmin. Além disso, em 3 animais de cada linhagem foi feita a aplicação de 20µl de acetona como grupo controle (PUIGNERÓ *et al.*, 1997). As orelhas foram medidas após 3, 6, 12 e 24 horas do tratamento e os resultados foram expressos como o aumento real da espessura da orelha tratada (medida feita com o uso de paquímetro) em relação à orelha contra-lateral. O influxo celular da derme foi determinado após cultura em meio RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (ELMETS *et al.*, 1998).

3.2.4 Indução da Inflamação por DMBA

Foram aplicadas, por cinco dias consecutivos, doses epicutâneas de 50 µg de 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA – FLUKA Chemie AG) dissolvidos em 0,1 ml de acetona (LI *et al.*, 2002) no dorso previamente depilado dos animais. Os animais controle receberam apenas 100µl de acetona. A análise da reação foi feita 48 horas após o último dia de tratamento, por meio de sedimentação em meio de cultura completo.

3.2.5 Obtenção das células infiltradas na derme

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, de acordo com as normas éticas de manuseio de animais de experimentação do COBEA. Animais tratados com TPA tiveram suas orelhas excisadas, após limpeza com etanol absoluto, com o auxílio de uma tesoura curva. Daqueles animais que

receberam DMBA epicutaneamente no dorso, foi retirado um pedaço da pele em um padrão de 1cm².

As orelhas e/ou as amostras de pele do dorso foram depositadas em tubos de 15 ml (Falcon), contendo 4 ml de etanol a 70%. Os tubos contendo os tecidos passaram por um processo de vigorosa agitação e posterior secagem e esterilização em placas de Petri de 35mm durante 15 minutos no interior de um fluxo laminar estéril. Após esse tempo, adicionou-se 1ml de PBS estéril à placa e fez-se a separação das faces dorsal e ventral da orelha, com auxílio de duas pinças curvas anatômicas (PUIGNERÓ *et al.*, 1997). As faces separadas foram transferidas para uma placa de 6 poços contendo 4 ml de RPMI 1640 com 10% de soro bovino fetal (SBF – inativado a 58°C por 30 min), 1 ml de L-glutamina (200mM) e 50µl de Gentamicina (40mg/ml). Realizou-se a incubação em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ à 37°C por 20 horas. É importante conferir que as faces fiquem com a derme (face interna) voltada para o meio de cultura. Após esse período, as células que migraram da pele para o meio de cultura foram coletadas e aquelas que eventualmente permaneceram aderidas ao fundo da placa foram tratadas com 3 ml de GNK (0,9g glucose 1M; 48,8 ml NaCl 0,9%; 0,373g de KCL 1M e 50 ml água destilada) e incubadas na estufa de CO₂ a 37°C por mais 20 minutos para o descolamento. Após esta incubação, a suspensão total foi obtida por lavagem em PBS + 10% SFB por centrifugação a 250 x g por 10 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado em 1 ml de PBS+SFB para a determinação da concentração celular por meio de contagem vital com Azul de Tripán 0,2% (1:2) em câmara hemocitométrica de Malassez. Uma alíquota de 300µl de cada suspensão foi utilizada para a preparação em citocentrífuga (Shandon Cytospin 4) e coradas pelo método Diff-Quik.

3.3 Citometria de fluxo

Células obtidas do exsudato inflamatório ou do processo de sedimentação celular *in vitro*, após lise das hemácias com tampão de lise (4,15 de cloreto de amônia, 0,84g bicarbonato de sódio, 1ml de EDTA 0,5M pH 8,0), foram identificadas e numeradas em esfregaço em câmara hemocitométrica. As células obtidas foram lavadas 2 vezes em PBS 1% SFB e tiveram sua concentração

acertada em $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ cels/ml. Alíquotas de 100 μ l foram incubadas com anticorpos monoclonais dirigidos contra: granulócitos-Ly-6G (GR-1, clone: RB6) e receptor cadeia α de Mac-1 CD11b (clone: Mi/70), marcados com ficoeritrina (PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC), dependendo do caso. Como isótipos controles foram utilizados: IgG2b de rato (clone: A95-1) marcado com PE ou FITC. Todos os anticorpos usados foram obtidos da PharMingen. O registro de 10000 células foi realizado e analisado pelo programa Cellquest-pro (Becton-Dickinson). Cem mililitros de suspensão celular foram adicionados aos poços das placas de cultura (96 poços – COSTAR). Incubaram-se as suspensões com bloqueador da porção Fc de imunoglobulinas (FcBlock) a 1 μ g/ 10^6 céls (10 μ l) por 10 minutos a 4°C protegido da luz. Após este período, adicionaram-se às suspensões todos os anticorpos específicos dirigidos às estruturas celulares na proporção de 1 μ g/ 10^6 cels (10 μ l), incubando por 30 minutos a 4°C protegido da luz. Após incubação, 100 μ l de PBS – 1% SFB foram adicionados em cada poço, seguido por centrifugação por 10 minutos a 250 x g. Repetiu-se esta etapa por duas vezes. Ressuspendeu-se então, o precipitado em 300 μ l de PBS 1% SFB para leitura imediata no citômetro de fluxo FacScalibur BD.

3.4 Quantificação de MPO

Para a quantificação da mieloperoxidase (MPO), a orelha ou a pele foram primeiramente seccionadas com o auxílio de uma tesoura e depositadas em tubos contendo 1ml de HTAB 0,5% (250mg brometo de hexadeciltrimetilamônio, 92,5 mg de EDTA e 50ml de tampão fosfato). Os tecidos foram homogeneizados em Polytron (Brinkmann Instruments) e as amostras centrifugadas por 10 minutos a 12500 x g a 4°C. Pipetou-se 10 μ l da amostra em duplicata na placa de 96 poços e em seguida 200 μ l de tampão substrato (2ml de orto-dianisidina, 200 μ l de solução H_2O_2 0,1% e 39ml de tampão fosfato) foram adicionados à preparação. Deixou-se a solução agir por 5 minutos e então foram adicionados 50 μ l de azida diluída (2ml de azida e 6ml de H_2O destilada) para bloquear a reação. Para o branco só foram utilizados 200 μ l de tampão substrato. A leitura foi feita a 450 nm em leitor de ELISA (μ Quant – Bio-Tek Instruments).

3.5 Preparação Histológica

Fez-se a coleta de orelhas de camundongos e/ou da pele do dorso tratadas previamente com TPA ou DMBA respectivamente e, as mesmas foram acondicionadas em frasco com formol tamponado 10% por 24 horas, sendo, em seguida, processadas. Iniciou-se com o processo de inclusão do material em uma série crescente de álcoois para desidratação, xilol para clarificação e finalmente inclusão em parafina. Os cortes feitos apresentavam 5 µm de espessura e foram colocados em estufa a 56°C para completa fixação dos mesmos e início da desparafinização. O processo terminou com a imersão das lâminas em xilol e a série de álcoois decrescente para rehidratação dos cortes. As lâminas foram finalmente coradas por hematoxilina-eosina (HE), para avaliação.

3.6 Extração de RNA

3.6.1 Extração de RNA da pele

Cerca de 100 mg de pele foram retirados e macerados em 1 ml de Trizol (Invitrogen). Após a incubação à temperatura ambiente, ao precipitado foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio (MERCK) para cada 1 ml de Trizol. As amostras foram submetidas à agitação utilizando-se vórtex e então centrifugadas por 15 minutos a 11000 x g. O sobrenadante (fase aquosa RNA) foi transferido para outro tubo eppendorf e o RNA foi precipitado em 0,5 ml de álcool isopropílico (MERCK) para cada 1 ml de Trizol. A mistura da solução foi feita por inversão e após a incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a 11000 x g por 10 minutos a 4°C. O precipitado de RNA foi lavado por 5 minutos a 9000 x g com 1 ml de etanol a 75% gelado para cada 1 ml de Trizol. Após secagem à temperatura ambiente, foram adicionados 50 µl de água livre de RNase para a dissolução do RNA. A concentração de RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro (260/280nm) e a integridade e a qualidade das preparações foram verificadas por eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE seguida por coloração com brometo de etídeo. O material foi estocado a -70°C até o processamento para a obtenção de cDNA.

3.6.2 Extração de RNA da orelha

As orelhas foram retiradas e colocadas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente maceradas. Adicionou-se 1ml de Trizol (Invitrogen). Homogeneizou-se a solução com seringa de 5ml e agulha calibre 1,20 x 0,40 mm. Após tais etapas, a extração continuou segundo o protocolo descrito para a extração da pele.

3.7 Obtenção do cDNA

A síntese de cDNA foi feita por meio de uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Na primeira fase do processo, 10µl contendo 1µg do RNA foram adicionados a 1µl de Oligo(dT) (50µM), 2µl de água livre de RNase e 1µl de oligonucleotídeos dNTP (10 µM); a mistura foi homogeneizada e submetida à temperatura de 65°C por 5 minutos. Após este período foi incubada no gelo por 1 minuto. A segunda fase consistiu em adicionar 4µl de tampão 5X concentrado (250 mM Tris-HCL pH 8,3, 375 mM KCL e 15 mM MgCl₂), 1µl de DTT (0,1M) e 1µl da enzima SuperScript III (200 U/µl) (Invitrogen), procedimento realizado à temperatura ambiente. Uma nova incubação foi realizada à 50°C por 50 minutos e inativadas à 70°C por 15 minutos. As reações foram incubadas em aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200.

3.8 Reações de PCR em Tempo-Real ou quantitativo (qPCR)

3.8.1 Quantificação do RNA mensageiro por PCR em Tempo-Real

Cada amostra de 1µl do cDNA (diluição 1:2) foi adicionada a uma solução contendo as sequências sintéticas específicas ou *primers* (0,5 µl de cada *primer*) (5µM); 6,25 µl do Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen), e água (4,25 µl) para ajustar o volume final de reação em 12,5 µl por tubo.

As reações foram incubadas no aparelho Chromo 4 (MJ Research), e submetidas a uma fase inicial de incubação à 50°C por 2 minutos, seguido da fase de ativação da enzima (*hot start*) 95°C por 5 minutos. As seqüências alvo foram então amplificadas durante 40 ciclos constituídos de etapas sucessivas de

desnaturação (95°C por 20 segundos), de anelamento (60°C por 35 segundos).

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase de dissociação (*Melting*), onde 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.

3.8.2 Cálculo da expressão relativa

A reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) é uma ferramenta importante no estudo da expressão gênica. A metodologia do PCR em tempo real (qPCR) foi adaptada para transformar o RT-PCR em uma reação que possibilite uma quantificação. Ele é baseado no uso de uma sonda fluorescente, um oligonucleotídeo com seqüência específica que hibridizará com a seqüência alvo, detectando o aumento da quantidade de fitas de DNA marcado com a sonda (no caso, SYBR Green). À medida que a reação ocorre, a fluorescência emitida pela amostra excitada por um laser ou por uma lâmpada de halogênio associada a um filtro específico, é detectada a cada ciclo e enviada para uma unidade processadora. A cada amostra, é atribuído um valor de cT (*Cycle Threshold*) referente ao número de ciclos necessários para que a fluorescência incorporada às duplas fitas amplificadas comece a aumentar acima da fluorescência de fundo. Este sistema permite correlacionar a intensidade de sinal coletada com a quantidade de produto amplificado.

A quantidade de expressão dos genes estudados neste trabalho em cada amostra foi estimada através do método comparativo do *Cycle Threshold* (cT). A quantidade de gene alvo foi normalizada pelo gene controle endógeno ciclofilina para as correções de pequenas variações devido à diferença na quantidade do RNA total. Um gene constitutivo ideal deve ser aquele cuja expressão ocorra em níveis constantes em diferentes tecidos do organismo, em todos os estágios do desenvolvimento e não deve ser afetado pelo tratamento experimental (GIULIETTI *et al.*, 2001; LIVAK *et al.*, 2001).

Pelos valores do cT calcula-se o delta cT (ΔcT) para cada amostra de RNAm, que consiste na diferença entre os cT do gene de interesse e cT do gene constitutivo

$$(\Delta cT = cT_{\text{(gene alvo)}} - cT_{\text{(gene endógeno)}})$$

A expressão dos genes entre vários grupos experimentais foi determinada pela comparação entre o ΔcT das amostras em diferentes condições experimentais e o ΔcT do grupo controle (calibrador):

$$\Delta\Delta cT = \Delta cT_{\text{(teste)}} - \Delta cT_{\text{(calibrador)}}$$

A expressão relativa, portanto, é igual a $2^{-\Delta\Delta cT}$. Como calibrador utilizamos o valor da média dos ΔcT do animais AIRmax controles, em todos os estímulos.

O experimento de qPCR determina para cada poço o número de ciclos no qual a fluorescência intercepta a linha do *threshold* (limiar) cujo ponto é o valor cT na fase linear de amplificação. Quanto menor for o valor do cT, maior será a quantidade inicial de RNAm na reação. Plotando os valores de cT contra as várias diluições das amostras (diluição na razão 10) o resultado é uma reta cujo coeficiente de correlação (R^2) deve ser maior do que 0,95. Para utilizar o método $2^{-\Delta\Delta cT}$ no cálculo do nível de expressão gênica é necessário que os *primers* tenham eficiência individual próxima de 100%.

Descrevemos na **Tabela 1** as seqüências sintéticas (*primers*) que foram utilizadas para amplificar a partir dos cDNA específicos, os RNAm codificantes para os genes escolhidos envolvidos no processo de hipóxia como *Hif-1 α* , *Vegf- α* , *Vhl*, *Ahr* e *Arnt* e, seus respectivos valores de eficiência.

Tabela 1. Seqüências de primers para utilização em q-PCR

Gene	Primer	Eficiência (%) *
<i>Ciclofilina</i>	F: AGCGTTTGGGTCCAGGAAT R: AAATGCCCGCAAGTCAAAAG	98,9
<i>Hif-1α</i>	F: TATGGAGGCCAGAAGAGGGTAT R: CCCACATCAGGTGGCTCATAA	97,7
<i>Vegf-α</i>	F: GTCCCATGAAGTGATCAAGTTCA R: ATCCGCATGATCTGCATGG	94,9
<i>Vhl</i>	F: GCAAAGCTTCAGTCCCTCCT R: AACAAGGCCTGAGCTTCAT	96,7
<i>Ahr</i>	F: AGAATCCCACATCCGCATGA R: TGCAAGAAGCCGAAAACTG	94,2
Arnt (Hif-1β)	F: TGGCTCCTACAAGCCATCTT R: CATAACCACCCGTCCAGT	99,9

Ciclofilina (Cyc) (gene constitutivo)

* coeficiente de correlação das curvas individuais para cada primer

Na **figura 6** representamos, como um exemplo, o perfil da análise da expressão do mRNA do gene constitutivo *ciclofilina*. Em **A** estão os valores de cT do gene constitutivo que se manteve inalterado. Em **B** a respectiva curva de dissociação, mostrando que o nível de fluorescência em função da temperatura não variou, o que revela a especificidade do *primer* devido à amplificação de um único produto (referência).

FIGURA 6: Os gráficos mostram os respectivos cT (**A**) e a curva de *Melting* ou de dissociação (**B**) do gene *ciclofilina*. A curva com cor azul clara indica o material branco (sem inclusão de cDNA na reação) Ensaio realizado no Chromo 4 (MJ Research) utilizando Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG

3.9 Extração de DNA genômico

Foram obtidos segmentos de 2 cm da cauda dos camundongos e colocados em tubos eppendorf estéreis e a estes foram adicionados 180µl do tampão TL (Kit E.Z.N.A.[®] Easy Acid Isolation, Omega Bio-tek, Inc.) e 25µl de O.B. Protease. As soluções foram submetidas à ação do vórtex e incubadas em banho-maria sob agitação a 55°C até que a lise estivesse completa (overnight). Então, efetuou-se a centrifugação das amostras por 10 minutos a 15000 x g à temperatura ambiente (para a formação do precipitado de tecidos). Os sobrenadantes foram recolhidos e transferidos para outros tubos estéreis. Para remover o RNA foram adicionados 15µl de RNase A (25 mg/ml) e deixados por 2 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados, em seguida, 200µl de tampão BL com 210µl de etanol absoluto e misturados vigorosamente no vórtex para que a mistura seja completa. Todas as amostras foram transferidas para as colunas de extração de DNA (2 ml) e centrifugadas a 15000 x g por 15 minutos à temperatura ambiente. Os tubos de coleta foram descartados e as colunas foram colocadas em um segundo tubo eppendorf (tubo de coleta do kit) de 2 ml, lavadas com 650µl do tampão *Wash Buffer* (diluído em etanol) por centrifugação a 10000 x g por 1 minuto sendo os eluatos descartados. Este procedimento foi repetido por duas vezes e os materiais foram centrifugados em 15000 x g por 2 minutos para a secagem. As colunas foram colocadas em tubos estéreis e a elas foram adicionados 200µl do *Elution Buffer* pré-aquecido a 70°C. Fez-se uma centrifugação a 10000 x g por 1 minuto para eluir o DNA da coluna, e os primeiros eluatos foram passados novamente na coluna e centrifugados.

As amostras de DNA oriundas de camundongos isogênicos foram adquiridas do Jackson Laboratory e utilizadas como padrões.

A concentração de todas as amostras de DNA foi determinada em espectrofotômetro (260/280 nm), e a integridade e qualidade das preparações foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE. O material foi estocado a 4°C.

3.10 Análise de polimorfismo de microssatélites de DNA

O método para a identificação do polimorfismo dos alelos dos microssatélites (diferenças no número de repetições) é baseado na técnica de PCR que amplifica a sequência genômica onde estão localizados estes marcadores. Para isso, foram utilizados pares de *primers* de microssatélites sintetizados pela Research Genetics, Hunstville (AL). O DNA genômico das linhagens isogênicas (A/J, BALB/cJ, C57Bl/6J, CBA/J, DBA/2J, P/J, SJL/J e SWR/J) foi adquirido do Laboratório Jackson.

Para as reações de amplificação foram usados 100ng de DNA genômico extraídos das linhagens isogênicas ou AIRmax e AIRmin, 2,4µl de tampão específico para PCR 1x concentrado, 0,84 µl de dNTP 250 µM (Invitrogen), 0,84µl de MgCl₂ 1,5µM (Invitrogen), 2µl a 2µM de cada um dos *primers* (Forward e Reverse, Gibco BRL) e 0,126µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 24µl com H₂O deionizada estéril.

As preparações foram submetidas às seguintes temperaturas: 94°C por 10 minutos, seguidos de 31 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 18 segundos e 72°C por 30 segundos cada ciclo e, finalmente, 10 minutos a 72°C, no aparelho termociclador Eppendorf – Mastercycler Gradient. Foram analisados os seguintes microssatélites para o cromossomo 12: D12Mit153 e D12Mit156.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 12,5 % em aparelho Hoefer SE 600 (Amersham Biosciences, refrigerado com água corrente), aplicando uma corrente elétrica de 100 V inicialmente e, após 30 minutos, aumentando esse valor para 230 V. Ao produto da PCR, acrescentou-se 6µl de corante SSCP (composto de 40% de sacarose, 0,25% de Azul de Bromo Fenol (BPB), 0,25% de Xileno Cyanole e 50mM de EDTA), e 10µl da mistura foi aplicado no gel. A coluna de gel foi montada em placas de vidro de 16x18 cm, com espessura de 0,75 mm. Na corrida utilizamos tampão TBE 10µM. Na preparação do gel utilizamos acrilamida/bis-acrilamida (BioRad), Tampão TBE 10µM, sendo polimerizado com Persulfato de Amônio (APS 10%) e o catalizador TEMED. O tempo de corrida variou em função do tamanho dos fragmentos amplificados. A migração foi acompanhada pela visualização da migração dos corantes azul de bromo fenol, correspondente a 70 pares de bases, e o oxileno cyanole, 130 pares de bases.

Para visualização e localização dos fragmentos amplificados de DNA que migraram no gel, utilizamos uma solução de nitrato de prata a 0,1%, conforme esquema a seguir: o gel foi imerso durante 6 minutos na solução de fixação (10% de Etanol e 0,5% de ácido acético); seguiu-se então 10 minutos de imersão na solução de coloração (0,1% Nitrato de Prata e água destilada) e, após um rápido enxágüe com água destilada, imersão durante 10 minutos na solução reveladora (1,5% NaOH e 0,07% de formaldeído).

3.11 Análise estatística

Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. A significância estatística das diferenças entre as médias foi determinada aplicando o ANOVA, bicaudal. Foram considerados significantes níveis inferiores a 0,05.

A significância do desequilíbrio de frequência dos marcadores alélicos nas linhagens foi calculada pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). Os valores de probabilidade (valores de P) foram transformados em $-\log P$ e considerados significativos valores de $-\log P > 3$ ($P < 0,001$).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Resposta inflamatória dos camundongos AIRmax e AIRmin ao tratamento com Biogel P-100

Camundongos machos e fêmeas receberam a injeção subcutânea de 0,75ml de Biogel P100 e, após períodos variados (6 a 48 horas), fez-se a coleta dos exsudatos formados.

As reações foram avaliadas quanto ao número e tipo de células infiltradas por meio de preparações histológicas em citocentrífuga e por citometria de fluxo com anticorpos dirigidos contra moléculas Ly-6G (GR1) e CD11b. O experimento foi repetido por duas vezes sendo os resultados obtidos em cada um deles, similares.

Na **figura 7** estão representados os valores de celularidade normalizado em logaritmo neperiano ($\ln$) no decorrer de 48 horas de reação ao biogel. Observamos um aumento na celularidade presente no exsudato inflamatório a partir de 6 horas, sendo o máximo de resposta atingido às 24 horas nos animais AIRmax. Esse aumento no número de células foi exacerbado nos animais da linhagem AIRmax, machos e fêmeas, em relação aos animais AIRmin com uma diferença significativa entre as duas linhagens a partir do período de 12 horas após o tratamento. Às 48 horas de reação houve uma diminuição significativa no número de células dos animais AIRmax enquanto podemos notar um aumento nos animais AIRmin, entretanto ainda assim prevaleceu uma resposta mais intensa dos animais selecionados para a máxima reatividade inflamatória.

FIGURA 7: Cinética do número de células infiltradas no exsudato subcutâneo em camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—), machos e fêmeas, após tratamento com Biogel P100. Foram utilizados 5 animais por grupo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ - comparação entre camundongos AIRmax e AIRmin dentro do respectivo período. a – comparação entre AIRmax 24hs e 48 hs.

Na análise das subpopulações de células infiltradas verificamos um predomínio de polimorfonucleares nos animais da linhagem AIRmax, e de maneira independente do sexo. No período de 6 horas, animais da linhagem AIRmax já apresentavam um número significativamente maior de neutrófilos do que os AIRmin, sendo essa característica presente em todos os períodos estudados (12, 24 e 48 horas) (**Figura 8**).

Observamos uma população de monócitos em menor proporção, onde os animais AIRmax demonstraram uma diferença significativa em relação aos animais AIRmin nos períodos de 12 e 24 horas, sendo que às 48 horas a proporção de monócitos aumentou nos AIRmin, como observado nos histogramas e nas fotomicrografias da **Figura 8**.

FIGURA 8: Caracterização das populações celulares presentes no exsudato subcutâneo, por meio de preparação histológica em citocentrífuga, após tratamento com Biogel P100, em camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—) machos e fêmeas. Foram utilizados 5 animais por grupo. Os resultados estão expressos como média da porcentagem do número de células $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ - comparação entre camundongos AIRmax e AIRmin dentro do respectivo período. As fotomicrografias representam o conteúdo do exsudato de 48hs de AIRmax (superior) e AIRmin (inferior), aumento 400x.

4.1.1 Citometria de fluxo

As células obtidas do exsudato inflamatório foram também caracterizadas por citometria de fluxo. Para a marcação com anticorpos específicos foram preparadas suspensões de AIRmax e AIRmin com células de três animais de cada grupo, a fim de obter um número suficiente de 1×10^6 /ml para a marcação adequada. As suspensões foram incubadas com anticorpos dirigidos contra as moléculas Ly6G (GR1) e CD11b e analisadas em citômetro de fluxo. Na análise foram consideradas as células viáveis por exclusão com iodeto de propídio (janela R1). A dupla marcação revelou fenótipos celulares distintos: células GR1^{low-high}/CD11b⁺ representam os neutrófilos enquanto aquelas com fenótipo GR1⁻/CD11b⁺ representam os monócitos (LAGASSE e WAISSMAN, 1996). Como observado na **figura 9**, os neutrófilos representaram a população majoritária de aproximadamente 80% das células infiltradas em ambas as linhagens. Apesar disso, quando esta porcentagem foi corrigida pelo número absoluto de células, pudemos confirmar o predomínio de neutrófilos seguido por uma menor população de monócitos, com a linhagem AIRmax respondendo mais intensamente ao estímulo com biogel do que os animais AIRmin (**Figura 10**). Estes dados corroboram com aqueles obtidos por meio da análise histológica (**Figura 8**).

Nos citogramas de morfologia (tamanho e granulosidade) observamos duas populações distintas em R1 as quais apresentam positividade para GR1, sendo a população com células de maior volume (direita) representa os neutrófilos com nível de fluorescência maior (**Figura 9**).

FIGURA 9: Citogramas representativos das células do exsudato subcutâneo após 24 horas do tratamento com Biogel P100, em camundongos machos e fêmeas AIRmax (—) e AIRmin (—) da geração F46. Anticorpo anti-CD11b-PE e anti-GR1-FITC.

FIGURA 10: Representação gráfica dos citogramas das células do exsudato subcutâneo após 24 horas do tratamento com Biogel P100, em camundongos machos e fêmeas AIRmax e AIRmin. Anticorpo anti-CD11b-PE e anti-GR1-FITC. Pool de 3 animais.

4.1.2 Ensaio da mieloperoxidase (MPO)

Outro parâmetro utilizado para a confirmação da predominância neutrofílica observada na análise histológica, foi a quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), a qual é considerada um marcador de neutrófilos ativados. Para tanto, foi realizada a coleta do exsudato formado em resposta ao Biogel P100, e este foi submetido a protocolo descrito em **Material e Métodos**, cuja reação final é derivada da interação da suspensão celular com um substrato de orto-dianisidina combinado à água oxigenada.

Mais uma vez, podemos observar uma divergência na resposta interlinhagem com os animais AIRmax apresentando uma maior atividade da enzima do que os animais AIRmin (**Figura 11**).

FIGURA 11: Quantificação da mieloperoxidase presente no exsudato subcutâneo, após tratamento com Biogel P100, em camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—) machos e fêmeas. Foram utilizados 4 animais por grupo. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ – entre AIRmax e AIRmin.

4.2 Resposta inflamatória dos camundongos AIRmax e AIRmin ao tratamento com 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA)

Uma segunda avaliação de reação inflamatória aguda em AIRmax e AIRmin foi realizada após aplicação epicutânea de TPA dissolvido em acetona. Para tanto, foram tratados 30 camundongos machos AIRmax e AIRmin com TPA nas faces interna e externa da orelha direita, sendo que 3 animais de cada linhagem serviram como grupo controle (C) recebendo 20µl apenas de acetona. Três animais de cada linhagem foram sacrificados por período, de 3 a 48 horas, após o tratamento com 4µg de TPA e analisados quanto ao edema e influxo celular. As orelhas foram excisadas, pesadas, e determinadas suas espessuras (edema) com auxílio de um paquímetro. Para determinação do influxo celular resultante do estímulo inflamatório, as duas faces das orelhas excisadas foram separadas com auxílio de pinças anatômicas e imersas em RPMI 1640 com a derme voltada para o meio de cultura, propiciando a emigração das células inflamatórias para o meio. O tempo de cultura foi estabelecido em 20 horas nas condições de 37°C em atmosfera de 5% CO₂.

Com relação ao aumento da espessura das orelhas após tratamento com TPA observamos a formação de edema em ambas às linhagens, sendo os valores de espessura da orelha significativamente superiores em relação ao controle já às 3 horas de reação. A partir deste tempo houve aumento gradual, atingindo o máximo em 12 horas e 24 horas e com um decréscimo significativo às 48 horas. Os animais AIRmax apresentaram uma maior capacidade de formação do edema do que os AIRmin no máximo de resposta ao TPA (**Figura 12**).

FIGURA 12: Cinética do aumento da espessura da orelha de camundongos machos AIRmax (—) e AIRmin (—) em resposta ao tratamento com TPA. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ – comparação entre camundongos AIRmax e AIRmin dentro do respectivo período. # $p < 0,05$ - comparação em relação ao controle.

Quanto à análise do número de células totais presentes na derme, observamos nas duas linhagens uma resposta divergente já às 3 horas de reação, atingindo valores elevados às 48 horas com superioridade dos camundongos AIRmax (**Figura 13**).

FIGURA 13: Cinética do número de células presentes na derme da orelha de camundongos machos AIRmax (—) e AIRmin (—) em resposta ao tratamento com TPA. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,01$ – comparação entre camundongos AIRmax e AIRmin dentro do respectivo período. # $p < 0,05$ - comparação em relação ao controle. a $p < 0,05$ - diferença entre AIRmin 24 e 48hs.

Na análise histológica do infiltrado da derme, após o processo de sedimentação celular no meio de cultura, constatamos que os polimorfonucleares representaram, mais uma vez, a população predominante de cerca de 70% em ambas as linhagens (**Figura 14**).

Os resultados obtidos de infiltrado celular caracterizam uma reação inflamatória aguda cuja diferença de intensidade interlinhagens era esperada, uma vez que esta reação produzida por TPA reproduziu o fenótipo de seleção genética por Biogel, indicando ser um fenômeno geral independente do tecido alvo ou flogógeno utilizado (**Figuras 12 e 13**).

FIGURA 14: Caracterização das populações celulares presentes na derme da orelha após tratamento com TPA, em camundongos machos AIRmax (—) e AIRmin (—). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da porcentagem de células. * $p < 0,05$ – comparação entre camundongos AIRmax e AIRmin dentro do respectivo período.

4.2.1 Citometria de fluxo

Além da caracterização das subpopulações celulares, realizada com base nas preparações histológicas em citocentrífuga, fez-se também a análise citométrica das células obtidas do infiltrado da derme (sedimentação em RPMI 1640) das orelhas tratadas com TPA às 24 horas. Foi realizada dupla marcação dessas células por meio de anticorpos específicos dirigidos às moléculas de superfície Ly-6G (GR1)-FITC, CD11b-PE, bem como com os isotipos controles. Foi feita a aquisição em citômetro de fluxo, considerando 10000 eventos e os dados foram analisados com o auxílio do programa CellQuest-Pro (**Materiais e Métodos**). Da mesma forma, a associação de anticorpos CD11b/GR1 possibilitou a identificação de duas populações celulares: macrofágicas (CD11b⁺/GR1⁻) e neutrofílicas (CD11b⁺/GR1⁺).

A análise dos resultados confirmou a predominância de células polimorfonucleares tanto em camundongos AIRmax quanto em camundongos AIRmin, conforme observado anteriormente na análise histológica no mesmo período (**Figura 14 e 16**). A população neutrofílica, nas duas linhagens tratadas, representou 64,41% e 61,31% das células infiltradas, respectivamente com fenótipo GR-1^{high}/CD11b⁺. As demais células representaram a população de monócitos com fenótipo GR1⁻/CD11b⁺ (**Figura 15**). O predomínio da população de neutrófilos frente aos monócitos pode ser melhor observado por meio da representação gráfica da porcentagem de células obtidas no citograma, corrigidas pelo número absoluto (**Figura 16**).

FIGURA 15: Citogramas representativos da análise das células da derme da orelha de animais AIRmax (—) e AIRmin (—) tratados com acetona (controles) ou TPA após 24 horas do tratamento., Anticorpo anti-CD11b-PE e anti-GR1-FITC.

FIGURA 16: Representação gráfica do citograma das células emigrantes da orelha dos camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—), após 24hs do tratamento com TPA. Anticorpos anti-GR1-FITC e anti-CD11b-PE. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão . * $p < 0,05$ – entre AIRmax e AIRmin. # $p < 0,05$ – entre camundongo controle e tratado. N= 4.

Além disso, as populações também foram caracterizadas quanto à expressão de moléculas específicas de linfócitos T e B tais como, B220, CD3 e Tγδ. Em nenhuma das análises observamos a presença destes tipos celulares (dados não mostrados).

4.2.2 Ensaio da mieloperoxidase (MPO)

Com o intuito de confirmar a predominância neutrofílica observada na análise histológica e na citometria de fluxo, realizamos a quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO). Para tanto, realizou-se o tratamento com TPA conforme descrito em **Material e Métodos**. As orelhas foram excisadas após 24 horas do tratamento e então depositadas em tubos contendo 1 ml de HTAB 0,5% e homogeneizadas em Polytron (Brinkmann Instruments). Promoveu-se a reação de 10 µl do sobrenadante obtido de cada amostra, com um substrato orto-dianisidina contendo água oxigenada e os resultados obtidos por espectrofotometria a 450 nm foram expressos como densidade óptica.

Uma diferença interlinhagens na medida da MPO pode ser notada a partir do período de 6 horas, sendo a superioridade dos camundongos AIRmax no período de 12 horas mantida às 24 horas, conforme representado na **Figura 17**.

FIGURA 17: Quantificação da mieloperoxidase presente na pele da orelha de camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—), em resposta ao tratamento com TPA. Os valores estão expressos como média ± erro padrão. * p<0,05 – entre AIRmax e AIRmin. # p<0,05 – entre camundongo controle e tratado. a p<0,05 - diferença entre os controles AIRmax e AIRmin.

4.2.3 Análise histológica

Dois animais de cada linhagem foram tratados epicutaneamente com 4µg de TPA em 20µl com o objetivo de fornecer material para a realização de exame histológico. As orelhas foram excisadas após 24 horas da aplicação de TPA e fixadas em formaldeído 10% por 24 horas para posterior inclusão do material em parafina e processamento para a montagem das lâminas. O período de 24 horas foi escolhido, levando-se em conta a significativa diferença na celularidade entre as duas linhagens (**Figura 13**).

A histologia demonstrou uma intensa reação inflamatória em resposta ao TPA na derme dos animais AIRmax (**Figura 18A**), enquanto que os camundongos AIRmin, por sua vez, apresentaram uma reação de menor intensidade, conforme o padrão histológico visualizado na **Figura 18D**. Confirmando os dados observados na citometria e nas populações celulares diferenciais, temos como tipo celular predominante nos infiltrados células polimorfonucleares, demonstrando que estas são os principais componentes constituintes da reação inflamatória aguda ao TPA.

As **Figuras 18C e F** representam células obtidas após o processo de sedimentação das orelhas em RPMI 1640, e as suspensões preparadas em citocentrífuga e coradas pelo método Diff-Quik. Podemos verificar a predominância de neutrófilos em ambas as linhagens.

FIGURA 18: Fotomicrografias das peles das orelhas de camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—) machos após 24 horas do tratamento com TPA. **A e D** representam cortes histológicos de 5µm, de AIRmax e AIRmin, respectivamente, aumento 200X. **B e E** Aumento 1000X da região selecionada na derme. **C e F** representam células obtidas por sedimentação em RPMI, em preparações de citocentrífuga. Aumento 1000X.

4.2.4 Expressão gênica

Com o objetivo de avaliar os níveis de expressão dos genes envolvidos durante condições adversas de concentrações de O₂ provocadas por processos inflamatórios agudos, amostras de RNAm da pele da orelha de camundongos AIRmax e AIRmin tratados com TPA foram obtidas e sintetizados os respectivos cDNAs para os ensaios de RT-PCR em tempo real. Os genes escolhidos para a realização dos ensaios de expressão foram: *Hif-1α*, *Vegf-α*, *Vhl*, *Arnt*, e *Ahr*. Este último relacionado com a ligação a xenobióticos do tipo DMBA.

Na **figura 19a e 19b** estão representados os valores de variação de expressão gênica em $2^{-\Delta\Delta C_t}$. De uma maneira geral, as diferenças interlinhagens encontradas foram resultantes da ativação ou supressão gênica, com relação ao perfil do calibrador, sendo este estabelecido como os animais AIRmax controle.

Comparativamente entre AIRmax e AIRmin observamos uma expressão significativamente aumentada do gene *Hif-1α* nas orelhas dos animais AIRmax, atingindo níveis superiores aos dos camundongos AIRmin nos quais não se observou alteração na expressão deste gene pelo tratamento. No sentido oposto, o gene *Vhl* que é conhecido como regulador negativo do *Hif-1α*, apresentou-se reprimido nas duas linhagens após receberem a aplicação de TPA (**Figura 19A e B**).

Na **Figura 19C** temos o gene *Arnt*, o qual não apresentou alterações em seu nível de expressão nem nos animais submetidos ao tratamento com TPA e nem nos animais controle. O mesmo pode ser observado quanto ao gene *Ahr*, representado na **Figura 19D**.

Outro gene participante da resposta à hipóxia, o *Vegf-α*, também foi analisado, no entanto sua expressão não foi detectada (dados não mostrados), talvez por tratar-se de um gene cuja expressão ocorra em períodos não avaliados.

FIGURA 19a: Expressão relativa dos genes *Hif-1α*, *Vhl*, *Arnt* e *Ahr* a partir do cDNA obtido da orelha de animais tratados ou não (controle) com TPA. Os valores foram normalizados pela expressão do RNAm da ciclofilina e calibrados contra animais AIRmax controle. Valores expressos como média ± erro padrão de grupos de 6 animais. * $p < 0,05$ – entre AIRmax e AIRmin. # $p < 0,05$ – entre camundongo controle e tratado.

FIGURA 19b: Expressão relativa dos genes *Hif-1 α* , *Vhl*, *Arnt* e *Ahr* a partir do cDNA obtido da orelha de animais tratados ou não (controle) com TPA. Os valores foram normalizados pela expressão do RNAm da ciclofilina e calibrados contra animais AIRmax controle. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão de grupos de 6 animais. * $p < 0,05$ – entre AIRmax e AIRmin. # $p < 0,05$ – entre camundongo controle e tratado.

4.3 Resposta inflamatória dos camundongos AIRmax e AIRmin ao tratamento com 9, 10 –dimetilbenzoantraceno (DMBA)

Em vista da relação existente entre os genes envolvidos nas situações de hipóxia e aqueles operantes na ligação e metabolização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos via AHR, nos propomos avaliar a expressão do complexo gênico envolvido nestas situações na vigência de uma reação inflamatória. Como gene central destas duas vias de regulação, temos o *Arnt* cuja proteína atua como translocadora nuclear comum dos fatores de transcrição *Hif-1 α* e *Ahr*: o primeiro em condições de hipóxia e o segundo quando complexado com xenobiótico do tipo hidrocarbonetos aromáticos (SALCEDA *et al.*, 1996). Para tanto, realizamos experimentos utilizando DMBA como indutor de inflamação cutânea.

Camundongos machos foram tratados, epicutâneamente, durante cinco dias consecutivos com uma solução contendo 50 μ g de DMBA em 100 μ l de acetona. Os animais controle receberam apenas 100 μ l de acetona. Quarenta e oito horas após o último dia de tratamento efetuou-se o sacrifício dos animais por deslocamento cervical e a retirada de uma amostra padronizada no tamanho de 1 cm² da pele do dorso na região tratada. O tecido foi depositado sobre 3 ml de meio de cultura com a derme sempre voltada para o meio, e mantido nas condições de 37°C em atmosfera de 5% CO₂, por 20 horas.

Na quantificação da reação produzida foram considerados: conteúdo celular após sedimentação em meio de cultura, a caracterização histológica do tecido lesionado e a medida da MPO tecidual.

Inicialmente observamos macroscopicamente o efeito das aplicações de DMBA no dorso dos animais. Podemos verificar na **Figura 20** a clara diferença de reação desenvolvida nas duas linhagens, com os animais AIRmin apresentando um quadro de lesão com descamação na região após 48 horas da aplicação do xenobiótico.

FIGURA 20: Camundongos **AIRmax** e **AIRmin**, 48hs após o tratamento com DMBA por 5 dias consecutivos.

Amostras de pele de 1cm^2 da região afetada foram utilizadas para quantificação das células infiltradas, utilizando o sistema de sedimentação *in vitro*. Após o período de incubação, obtivemos um maior número de células nos animais AIRmin tratados (**Figura 21**).

As células obtidas nessa suspensão foram caracterizadas como células monocitárias, as quais representaram a maior parte do infiltrado, e neutrófilos em menor proporção. Os camundongos AIRmin tratados apresentaram maior número destas populações (**Figura 22**).

FIGURA 21: Número de células emigradas da pele do dorso de camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—), após tratamento com DMBA por 5 dias consecutivos. Análise realizada 48hs após o último dia de tratamento. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ – entre AIRmax e AIRmin. # $p < 0,05$ – entre animal controle e tratado.

FIGURA 22: Caracterização das populações celulares presentes na derme do dorso após tratamento com DMBA por 5 dias consecutivos, em camundongos machos AIRmax (—) e AIRmin (—). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da porcentagem de células. * $p < 0,05$ – comparação entre camundongos AIRmax e AIRmin dentro do respectivo período. # $p < 0,05$ – entre animal controle e tratado.

4.3.1 Ensaio da mieloperoxidase (MPO)

A dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO) foi uma ferramenta utilizada para caracterizar o infiltrado de neutrófilos em consequência do tratamento com DMBA. A suspensão para esta análise foi obtida a partir da fragmentação de parte do tecido retirado do dorso de camundongos tratados ou não. Uma pequena alíquota (10 μ l) do sobrenadante de cada amostra juntamente com um tampão substrato contendo água oxigenada, promoveu a reação, sendo o resultado obtido expresso como valores de densidade óptica (DO) a 450 nm.

Seguindo o perfil do infiltrado celular, os animais AIRmin que receberam o DMBA apresentaram níveis de MPO significativamente maiores do que os camundongos AIRmax e controles. Os camundongos AIRmax tratados e controles apresentaram níveis equivalentes da enzima (**Figura 23**).

FIGURA 23: Quantificação da mieloperoxidase presente na pele do dorso de camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—), em resposta ao tratamento com DMBA por 5 dias consecutivos. * $p < 0,05$ – entre AIRmax e AIRmin. # $p < 0,05$ – entre camundongo controle e tratado. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão.

4.3.2 Análise histológica

A diferença de reatividade entre AIRmax e AIRmin ao tratamento epicutâneo com DMBA foi caracterizada histologicamente em amostras de pele de animais tratados demonstrando a ocorrência de hiperplasia na epiderme dos camundongos AIRmax e um discreto infiltrado celular, enquanto que nos animais AIRmin pudemos observar uma perda na integridade da região tratada, havendo desestruturação das camadas dérmica e epidérmica. Os animais controle de ambas as linhagens, tratados apenas com acetona apresentaram a pele normal sem características de processo inflamatório (**Figura 24**).

FIGURA 24: Fotomicrografias da pele do dorso de camundongos machos. **A** e **B** representam cortes histológicos de animais AIRmax (—) e AIRmin (—) controle, respectivamente. **C** e **D** representam animais AIRmax (—) e AIRmin (—) 48 horas após o tratamento com DMBA 5x. Aumento 100X.

4.3.3 Expressão gênica

Nestas condições de reação ao DMBA, foram avaliadas as expressões dos genes *Hif-1 α* , *Vhl*, *Arnt*, *Vegf- α* e *Ahr* por meio do RNA total extraído das amostras de pele da região dorsal dos camundongos AIRmax e AIRmin submetidos ao tratamento com DMBA.

O RNAm obtido foi processado para a síntese de cDNA e em seguida submetido à PCR em tempo real com *primers* específicos para os genes acima citados. Após a reação, observamos uma repressão dos genes *Hif-1 α* e *Vhl* nas amostras obtidas dos animais AIRmin em comparação com os AIRmax, determinando uma diferença interlinhagens significativa (**Figura 25A e B**). Com relação ao gene *Arnt*, não constatamos diferença em sua expressão pelos animais tratados ou não com DMBA (**Figura 25C**). Dois outros genes analisados, o *Ahr* e o *Vegf- α* , não apresentaram expressão detectável em nenhum dos grupos (dados não apresentados).

FIGURA 25: Expressão relativa dos genes *Hif-1 α* (A), *Vhl* (B) e *Arnt* (C) a partir do cDNA obtido da pele do dorso de animais tratados ou não (controle) com DMBA. Os valores foram normalizados pela expressão do RNAm da ciclofilina e calibrados pela expressão das células dos animais AIRmax controle. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ – entre AIRmax e AIRmin. # $p < 0,05$ – entre camundongo controle e tratado.

4.4. Análise de polimorfismos nos microssatélites D12Mit153 e D12Mit156

Sendo o trabalho focado em uma possível participação do gene *Hif-1 α* e seus genes-alvos na regulação da resposta inflamatória aguda, buscamos verificar a existência de polimorfismo de microssatélites na região do cromossomo 12 que contém o gene *Hif-1 α* . Esta região pode ser candidata na regulação genética da resposta inflamatória máxima ou mínima nestas linhagens.

Para tanto, iniciamos esta análise, utilizando dois marcadores de microssatélites, D12Mit153 e D12Mit156 situados em posições flanqueantes ao gene *Hif-1 α* . Estes marcadores foram escolhidos por apresentarem, segundo o site Mouse Genoma Informatic (MGI), polimorfismo entre linhagens de camundongos isogênicos, algumas das quais foram utilizadas no processo seletivo para a obtenção das linhagens AIRmax e AIRmin.

Marcadores de microssatélites, ou SSLPs (*Simple Sequence Length Polymorphisms*), ou ainda SSR (*Simple Sequence Repeats*) são seqüências simples de 1 a 4 nucleotídeos, que se repetem e são distribuídas ao longo dos genomas eucarióticos (LITT E LUTY, 1989), sendo desta forma, utilizados como marcadores de regiões cromossômicas e por consequência, dos genes presentes nestas regiões. Os marcadores microssatélites são numerosos, possuindo localização cromossômica e tamanho conhecidos, além de serem altamente polimórficos, ou seja, com número variável de repetições de pares de base entre indivíduos (DIETRICH *et al.*, 1994).

As seqüências de DNA que flanqueiam as regiões contendo estas repetições curtas são conservadas dentro de cada espécie, permitindo a seleção de *primers* que podem ser utilizados para amplificá-las por PCR. O polimorfismo no tamanho dos fragmentos obtidos se deve ao número diferente de repetições destas seqüências simples que é encontrado entre diversas linhagens, entre populações distintas ou mesmo entre indivíduos de uma população heterogênea. Esse polimorfismo define, portanto diferentes alelos de microssatélite (DIETRICH *et al.*, 1994).

Exemplo de polimorfismo em um marcador microsatélite:

Alelo 1: AAACATAGCACACCGGTT

Alelo 2: AAACATAGCACACACACACCGGTT

O mapeamento das regiões cromossômicas é dado pela distância entre o marcador microsatélite e o gene, a qual é expressa em centimorgan (cM), que equivale à região do cromossomo em que ocorre 1 evento de recombinação a cada 100 meioses. Portanto, quanto maior for essa distância entre o marcador e o gene de interesse, menor a probabilidade de ambos serem herdados conjuntamente (LITT E LUTY, 1989).

Assim, o estudo da associação entre as formas alélicas destes marcadores genéticos com o fenótipo desejado é um método indireto de análise, pois se presume que a transmissão dos alelos parentais que contribuem na determinação do caráter é idêntica àquela observada para os marcadores microsatélites próximos a região cromossômica em questão. Neste caso, se o marcador não apresentar associação com o caráter, a herança deste na população segregante apresentará uma frequência que obedece a uma distribuição mendeliana simples, independentemente do fenótipo (TERWILLIGER E GÖRING, 2000).

Desta forma, neste estudo devemos levar em conta o desequilíbrio de frequência (ou desvio de frequência), o qual descreve uma situação em que algumas combinações de alelos ou marcadores genéticos ocorrem mais frequentemente numa população do que o esperado. Assim, quanto maior o desequilíbrio de frequência, maior será a ligação do microsatélite com o gene relacionado ao caráter (TERWILLIGER E GÖRING, 2000).

A **Figura 26** é representativa de alelos de microsatélite definidos pelo padrão de migração do produto obtido pela PCR com DNA genômico de 5 animais AIRmax ou AIRmin, bem como das oito linhagens isogênicas. Os resultados de toda a análise, isto é, 10 animais de cada linhagem AIRmax e AIRmin e 8 isogênicas estão mostrados nas tabelas 2 e 3. Podemos verificar que para o microsatélite D12Mit153, localizado a 15 cM, encontramos 4 alelos, sendo o mais pesado denominado **1** presente na linhagem SJL/J, as linhagens DBA/2J e

SWR/J apresentando o alelo **2**, A/J, Balb/cJ, CBA/J e P/J o alelo **3** e, o C57Bl/6J com o alelo mais leve **4** (**Figura 26A e Tabela 2**). Nos animais selecionados vimos uma fixação alélica preferencial do alelo 2 nos AIRmax e do alelo 4 nos AIRmin.

Já para o marcador D12Mit156, a 34 cM, encontramos apenas 3 alelos sendo, o alelo **1** presente na linhagem SWR/J, o alelo de tamanho intermediário **2**, presente em A/J, Balb/cJ, C57Bl/6J, CBA/J, DBA/2J e SJL/J, e o alelo mais leve **3** pertencente a linhagem P/J (**Tabela 2 e Figura 26B**). Os 10 animais AIRmax e AIRmin analisados revelaram um desequilíbrio de frequência altamente significativo com predominância do alelo 2 nos AIRmax e do 3 nos camundongos AIRmin (**Tabela 3**).

FIGURA 26: Análise dos microssatélites D12Mit153 (**A**) e D12Mit156 (**B**) do padrão de migração dos produtos de amplificação por PCR das preparações de DNA das 8 linhagens isogênicas e de 5 AIRmax e 5 AIRmin. Gel de poliacrilamida 12,5%. Peso molecular: Φ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments (72pb a 1353pb).

Tabela 2. Definições de alelos de microssatélites nas linhagens isogênicas constituintes da F0

Microssatélite	cM*	A/J	Balb/cJ	C57Bl/6J	CBA/J	DBA/2J	P/J	SJL/J	SWR/J
D12Mit153	13	3	3	4	3	2	3	1	2
D12Mit156	34	2	2	2	2	2	3	2	1

Produtos das amplificações dos microssatélites nas 8 linhagens de camundongos que compuseram a F0 na Seleção de Inflamação. As amostras foram amplificadas por PCR e visualizadas em gel de agarose 3% e gel de poliacrilamida 12,5%.

* **centiMorgan (cM)**: distância do centrômero (Mouse Genome Informatics).

Para o cálculo da significância do desequilíbrio de frequência dos alelos nas duas linhagens AIRmax e AIRmin utilizamos o teste de Qui-quadrado (χ^2) considerando o número de cromossomos que carregam cada alelo do marcador. Em um ensaio onde se analisam 10 animais AIRmax e 10 AIRmin, temos 20 cromossomos em cada linhagem, sendo significativos os valores de $P < 0,001$ ($-\log P > 3$).

Observamos na **Tabela 3** que os dois marcadores analisados apresentaram uma alta significância com relação ao desvio de frequência alélica nos animais das linhagens sendo os valores de $-\log P$ de 8,72 e 4,44, respectivamente.

Tabela 3. Microssatélites do cromossomo 12 em animais AIRmax e AIRmin

Microssatélite	Linhagem	Nº cromossomos por alelo				χ^2	- (log p)
		1	2	3	4		
D12Mit153 15 cM*	AIRmax	-	20	-	-	36,1	8,72
	AIRmin	-	-	-	20		
D12Mit156 34 cM	AIRmax	-	16	4	-	17,07	4,44
	AIRmin	-	2	18	-		

* cM (centiMorgan): distância do centrômero .

χ^2 : Teste de Qui-quadrado.

Na representação abaixo (**Figura 27**), observamos uma distribuição esquemática dos microssatélites analisados ao longo do cromossomo 12 e da localização dos genes *Ahr* e *Hif-1 α* procurando manter a distância aproximada em cM de acordo com informações encontradas Mouse Genome Informatics (www.informatics.jax.org).

FIGURA 27: Distribuição dos microssatélites estudados (quadrado lilás) ao longo do cromossomo 12. As elipses roxas indicam o posicionamento dos genes *Ahr* e *Hif-1 α* .

Discussão

5 DISCUSSÃO

Estudos em modelo de camundongos AIRmax e AIRmin têm demonstrado a participação do controle genético na resposta inflamatória aguda. Buscando caracterizar tal controle vários estudos utilizando essas linhagens foram desenvolvidos a fim de evidenciar o papel do polimorfismo dos genes e suas interações na determinação das várias características fenotípicas que distinguem AIRmax e AIRmin, centralizadas no desenvolvimento de maior ou menor reatividade inflamatória frente à diferentes substâncias (IBÁÑEZ *et al.*, 1992).

Sendo a resposta inflamatória regulada poligenicamente, buscamos no presente trabalho, verificar a relação entre os genes envolvidos nas situações de hipóxia na vigência de uma resposta inflamatória aguda. Além disso, objetivamos verificar a interferência do gene *Ahr* envolvido na metabolização de xenobióticos em um ambiente de baixa concentração de oxigênio. Para tanto caracterizamos fenotipicamente estas linhagens com diferentes situações de reações inflamatórias procurando analisar a expressão dos genes operantes nos estados de hipóxia nos tecidos lesionados.

Inicialmente buscamos confirmar a manutenção da divergência da resposta inflamatória aguda entre as duas linhagens de camundongos AIRmax e AIRmin, na atual geração, o que foi realizado por meio do protocolo de indução inflamação estabelecido por STIFFEL *et al.*, 1990, cujo agente promotor e selecionador é o Biogel P-100 (STIFFEL *et al.*, 1990).

O Biogel P100, é uma substância não biodegradável e não imunogênica causadora de irritação no local de sua inoculação desencadeando uma reação inflamatória intensa produzida por fatores endógenos que, dependendo do tempo de avaliação, constitui uma reação aguda ou crônica (STIFFEL *et al.*, 1990; IBÁÑEZ *et al.*, 1992).

Estudos desenvolvidos por RIBEIRO *et al.*, 2003 demonstraram que a divergência entre as linhagens no que concerne à intensidade da reação inflamatória aguda é decorrente da maior reatividade da medula óssea dos camundongos AIRmax, em resposta a fatores hematopoiéticos e diferenciação de granulócitos, produzidos na vigência da inflamação. Além disso, a produção local de fatores quimiotáticos em níveis mais elevados foi também detectada nos camundongos AIRmax. Estes fatores aliados à baixa sensibilidade à apoptose

expontânea das células inflamatórias confere a esta linhagem AIRmax uma resposta inflamatória exacerbada no tocante à celularidade, em resposta ao Biogel, (RIBEIRO *et al.*, 2003). Assim, o maior número celular apresentado pela linhagem AIRmax em resposta ao Biogel P100 corrobora com os dados encontrados por RIBEIRO *et al.*, 2003. Além disso, no presente trabalho também observamos a predominância da população neutrofílica por meio da análise por citometria de fluxo, análise histológica e quantificação da mieloperoxidase.

Assim, iniciamos o nosso estudo tomando por base o uso de dois protocolos diferentes de indução de inflamação: reatividade ao TPA, promotor clássico de inflamação e ao DMBA substância envolvida na ligação ao receptor AHR responsável pela ligação e metabolização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

O TPA é conhecido como um agente promotor de hiperplasia que, ao ser associado ao um carcinógeno, pode produzir lesões com características neoplásicas (BIOZZI *et al.*, 1998). Uma das respostas iniciais após a aplicação do TPA é o desenvolvimento de uma reação inflamatória local, visto que esta substância desencadeia uma série de alterações bioquímicas e funcionais das células. O protocolo de indução de inflamação por TPA na pele é há tempos utilizado por induzir uma reação prolongada e mensurável (NAKADATE, 1989). O TPA promove um aumento significativo de edema, quantificado pela medida do aumento na espessura da orelha e um infiltrado celular detectável (CRAMER *et al.*, 2003).

Este protocolo foi então utilizado nas linhagens AIRmax e AIRmin para induzir uma reação inflamatória na orelha. O aumento do edema e do número de células determinado em AIRmax e AIRmin confirmaram a característica fenotípica destas linhagens, demonstrando que a intensidade da reação inflamatória produzida por Biogel não é restrita ao mesmo, e tampouco ao tecido onde a reação é desencadeada. Da mesma maneira que ocorreu com o tratamento com Biogel durante o processo seletivo das linhagens, os ensaios com TPA apresentaram padrão celular com predominância de neutrófilos, e menor proporção de monócitos/macrófagos com diferença interlinhagem altamente significativa em vários períodos analisados.

Os cortes histológicos provenientes das orelhas tratadas dos animais de ambas as linhagens, confirmam a resposta contrastante entre eles, mostrando a

presença de um grande infiltrado celular nos animais AIRmax e em menor intensidade nos animais AIRmin, indicando também o predomínio de população neutrofílica, confirmado por análise histológica e citometria de fluxo. A medida da MPO, reveladora da presença de neutrófilos, acompanhou o perfil de resposta obtida nos experimentos de sedimentação celular, ou seja, um aumento crescente na quantidade de enzima ao longo dos períodos de tratamento estabelecidos, com os animais AIRmax respondendo de forma mais intensa do que os AIRmin.

Considerando que um processo inflamatório gera uma condição local de baixo teor de oxigênio e que esta reação é divergente entre AIRmax e AIRmin, pesquisamos a expressão dos genes operantes nessas condições por meio de experimentos de PCR em tempo real. Os genes analisados foram: *Hif-1 α* , *Hif-1 β /Arnt*, *Vhl*, *Vegf- α* e *Ahr* (SEMENZA, 2001c; CRAMER *et al.*, 2003).

Em relação ao gene *Hif-1 α* , observamos um aumento de 5 vezes na sua expressão na pele dos animais AIRmax frente aos AIRmin. Tal resposta era esperada se levarmos em consideração a alta potencialidade inflamatória da linhagem AIRmax e a participação do gene em questão na retomada do equilíbrio diante do quadro de hipóxia desenvolvido na resposta inflamatória (LEWIS *et al.*, 1999).

O gene *Arnt* ou *Hif-1 β* resulta em um produto capaz de ser heterodimerizado tanto com HIF-1 α quanto com a proteína AHR. É essencial para a formação do complexo atuante na resposta de metabolização de xenobióticos (AHR-ARNT) ou ainda na resposta a condições de hipóxia (HIF-1 α -ARNT), possuindo maior afinidade ao HIF-1 α (HANKISON, 1995; SALCEDA *et al.*, 1996). O nível de expressão do gene *Arnt* ou *Hif-1 β* foi equivalente em ambas as linhagens, independentemente do tratamento com TPA. Este resultado é condizente com a literatura, a qual descreve o *Hif-1 β /Arnt* como constitutivamente expresso no núcleo e sua atividade sendo controlada de maneira independente às variações no nível de oxigênio celular (STOCKMANN e FANDREY, 2006).

O *Vhl* é um gene supressor de tumor, cuja mutação resulta no desenvolvimento de hemangioblastomas (tumor nos vasos sanguíneos) principalmente no sistema nervoso central e na retina (KONDO *et al.*, 2001). Quanto à sua expressão relativa em AIRmax e AIRmin, observamos uma repressão equivalente nas duas linhagens. De fato, o *Vhl* é um componente de

um complexo ubiquitina ligase, regulador negativo da expressão do *Hif-1 α* (KONDO *et al.*, 2001). Assim, podemos supor que diante da situação de baixo nível de oxigênio celular e conseqüente expressão do *Hif* (*Hif-1 α* e *Hif-1 β* .) para a resolução desse quadro, a supressão do *Vhl* deve ocorrer no sentido de reduzir a interferência negativa do produto deste gene na estabilidade da molécula de *Hif-1 α* .

Quanto ao *Ahr*, observamos um mesmo nível de expressão deste gene em ambas as linhagens, nos animais que receberam o tratamento ou não. Conforme descrito por DE SOUZA *et al.*, 2009, camundongos AIRmin apresentam a molécula íntegra de AHR como receptor de alta afinidade, enquanto os animais AIRmax apresentam o alelo de baixa afinidade, no entanto tal variação alélica, não interfere no nível de expressão do gene (DE SOUZA *et al.*, 2009).

Infelizmente não foi possível avaliar a expressão do *Vegf- α* devido ao fato desse gene possuir uma expressão mais tardia do que o período de 24 horas analisado. Apesar de a angiogênese ser um dos principais mecanismos pra a resolução da situação de hipóxia, primeiramente há um processo de vasodilatação, sendo que a formação de novos vasos sanguíneos leva um tempo relativamente maior para ocorrer (LADEROUTE *et al.*, 2000). O *Vegf- α* é um dos genes-alvo do complexo *Hif-1 α* , considerado um potente mitógeno endotélio-específico, além de participar diretamente da angiogênese (PAPANDREOU *et al.*, 2005; MURA *et al.*, 2006).

O DMBA é um hidrocarboneto poliaromático, ao qual as linhagens AIRmax e AIRmin respondem diferentemente, tanto no desenvolvimento de lesões papilomatosas, em protocolos onde é feita uma associação entre o DMBA e o TPA (BIOZZI *et al.*, 1998; DE SOUZA *et al.*, 2009), como na toxicidade da celularidade da medula óssea (KATZ, 2007). A transformação do DMBA em um produto tóxico depende de sua ligação inicial a um receptor *Ahr*, fator de transcrição ativado pelo ligante e que regula a expressão de várias enzimas metabolizantes da família do citocromo P450 as quais medeiam os efeitos deste composto aromático. Estudos com animais *knockout* do gene *Ahr* foram realizados para demonstrar que o AHR é necessário para a maioria, se não para a totalidade, de respostas aos efeitos produzidos por esta substância (HEIDEL *et*

al., 2000). Camundongos AIRmin mostraram-se mais susceptíveis aos efeitos tóxicos derivados de xenobióticos (BIOZZI *et al.*, 1998; DE SOUZA *et al.*, 2009).

O protocolo desenvolvido no tratamento com DMBA foi proposto por Li e colaboradores, onde utilizamos cinco aplicações epicutâneas consecutivas de DMBA. Escolhemos o momento de 48 horas após a última exposição ao DMBA para a análise da reação, porque foi o período onde todos os animais AIRmin apresentavam características como a vermelhidão e descamação da pele no local de aplicação da substância, provavelmente em decorrência de uma possível dermatite de contato desencadeada devido aos efeitos tóxicos do DMBA ou a uma reação alérgica específica (LI *et al.*, 2002; DE SOUZA *et al.*, 2009).

Conforme descrito anteriormente, o receptor *Ahr* exibe considerável variabilidade estrutural e funcional em linhagens isogênicas de camundongos e este polimorfismo é resultado da existência de vários alelos no *locus Ahr* que o codifica. Este receptor foi recentemente analisado nas linhagens desenvolvidas em nosso laboratório, demonstrando uma completa fixação dos alelos de baixa afinidade (*Ahr^d*) em AIRmax e a presença do alelo de alta afinidade (*Ahr^{b1}*) em AIRmin (DE SOUZA *et al.*, 2009).

Este polimorfismo do *Ahr* (troca do aminoácido alanina por valina nos animais Airmax) nas linhagens pode estar relacionado às características fenotípicas pelas quais elas foram geneticamente selecionadas, reação inflamatória aguda (AIR), uma vez que os alelos foram fixados diferentemente em AIRmax e AIRmin. De fato, estudo de co-segregação em populações de camundongos F2 extremos oriundos das linhagens AIR, F2max e F2min, revelou uma ligação genética entre o genótipo *Ahr* e a intensidade da reação inflamatória ao Biogel, candidatando este gene como participante do controle genético da intensidade da reação inflamatória aguda (¹) (DE SOUZA *et al.*, 2009).

No tratamento com DMBA observamos diferenças significativas entre AIRmax e AIRmin sendo que, os camundongos AIRmin apresentaram uma maior interação com a droga caracterizada pela alta reatividade apresentada. Esta resposta eficaz ao tratamento é resultado da diferente afinidade do receptor entre as duas linhagens. Neste caso, então, a metabolização do DMBA teve um papel preponderante na indução da reatividade, pois somente os animais da linhagem

¹ Souza V R C, São Paulo, 2007 (Comunicação pessoal)

AIRmin tiveram a capacidade de produzir metabólitos tóxicos a partir do DMBA. Isto pode ser observado através do significativo aumento do número de células destes animais e, conseqüentemente na atividade da enzima mieloperoxidase que apresentou o mesmo perfil obtido no número de células (HEIDEL *et al.*, 2000).

Assim como nos tratamentos com o biogel e TPA, as populações celulares que responderam foram neutrófilos e monócitos. No entanto, houve uma inversão no tipo celular predominante, sendo que os monócitos aparecem em maior número. Essa inversão pode ser derivada do início do desenvolvimento de uma resposta mais tardia frente ao protocolo de tratamento de 5 dias consecutivos.

A pele é uma importante barreira física entre o organismo e o ambiente externo, participando ativamente nos mecanismos de defesa, mantendo reações imunológicas e inflamatórias locais. Os queratinócitos (células presentes na epiderme) apresentam função direta na resposta imune inata contra agressões na pele sendo capazes de secretar uma série de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , entre outras (ANSEL *et al.*, 1990). Foi demonstrado em nosso laboratório por meio da análise de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, altos níveis de RNAm destas proteínas nos camundongos AIRmin tratados com DMBA, enquanto os AIRmax apresentaram um quadro inverso. O perfil observado nos cortes histológicos foi coerente com o esperado, isto é, os animais AIRmin possuidores do alelo *Ahr^b*, de alta afinidade, apresentaram reatividade mais exacerbada do que os AIRmax. Este fato foi confirmado com a avaliação da formação de edema, infiltrado celular e atividade de MPO.

Quanto aos experimentos referentes à expressão gênica, obtivemos uma resposta contrária ao esperado com relação ao *Hif-1 α* sendo que, como os animais AIRmin responderam de forma mais intensa, imaginamos que o padrão de expressão do gene seguiria esse perfil. Uma possível explicação para isso é que os animais AIRmax, que apresentam o receptor de baixa afinidade aos xenobióticos, demorem mais tempo para desenvolver uma resposta inflamatória, talvez devido à utilização de outras vias metabólicas independentes da ligação ao AHR. Assim sendo, se levarmos em conta o tratamento prolongado com o DMBA (cinco dias consecutivos), podemos imaginar que a resposta inflamatória aguda dos AIRmin tenha acontecido durante esse período e, no momento escolhido para o estudo (48 horas após o último dia de tratamento), esses animais já poderiam

estar iniciando um processo de resolução da inflamação, não necessitando portanto da regulação deste gene. Por sua vez, pela diminuída eficiência do receptor expresso pelos AIRmax, esses animais podem estar no início de sua resposta ao tratamento, mostrando assim uma participação maior do gene em questão.

Sabendo-se da competição entre o *Hif-1 α* e o *Ahr* pelo mesmo translocador (*Arnt*) (CHAN *et al.*, 1999), e levando-se em conta que o DMBA depende do receptor *Ahr* para ser metabolizado, a expressão constitutiva do gene *Vhl* nos animais AIRmax estaria regulando ou equilibrando a quantidade de produto resultante do gene *Hif-1 α* nestes animais, já que o *Hif-1 α* também se mostra mais intensamente transcrito nesta linhagem. Quanto aos animais AIRmin tratados, como apresentam o *Hif-1 α* reprimido, não necessitam de uma alta expressão de *Vhl*.

Os resultados obtidos de expressão do gene *Arnt* demonstram novamente a expressão constitutiva desse gene, ou seja, seu nível de expressão não sofre interferência da taxa de oxigenação tecidual (STOCKMANN e FANDREY, 2006).

Sabendo-se do grande consumo de oxigênio frente a ambientes injuriados e ao prejuízo causado às células e tecidos frente à ação de alguns componentes do sistema imune (NATHAN, 2006), os resultados obtidos com Biogel P100, TPA ou DMBA nas linhagens AIRmax e AIRmin demonstraram a presença de tipos celulares que são sabidamente capazes de atuar em condições adversas de O₂ através da produção de ATP via glicólise, buscando restabelecer o equilíbrio do organismo (CRAMER *et al.*, 2003).

Desse modo, temos os neutrófilos e macrófagos como células chave no desempenho de funções já descritas na literatura sobre o Hif-1, um dos principais mediadores da adaptação do organismo em casos de baixos níveis de O₂, promovendo, por exemplo, a angiogênese, a proliferação e sobrevivência celular, regulação do pH, eritropoiese e aumento da glicólise (SEMENZA, 2001c; CARROLL e ASHCROFT, 2005).

De modo a relacionar a intensidade das reações inflamatórias produzidas nas linhagens AIRmax e AIRmin com os ensaios de expressão de genes operantes em estados de baixos níveis de oxigênio, buscamos analisar a participação destes últimos na determinação da intensidade dos processos inflamatórios estudados. No entanto, para uma associação genética mais refinada da participação do *Hif-1 α* na AIR, realizamos pesquisa de polimorfismo genético

na região do cromossomo 12 que contém o gene em questão. Para tanto, com base em informações no MGI, selecionamos alguns marcadores polimórficos que discriminaram algumas linhagens isogênicas constituintes da população F0 de seleção e que foram escolhidos para serem analisados nas linhagens parentais AIRmax e AIRmin.

Apresentamos como resultados até o momento os marcadores de microssatélites, D12Mit153 e D12Mit156, os quais flanqueiam o *Hif-1 α* . Estes marcadores apresentaram polimorfismo entre AIRmax e AIRmin cujo o desequilíbrio de frequência foi altamente significativo, sugerindo a participação do intervalo compreendido entre eles na diferenciação fenotípica das duas linhagens.

É interessante ressaltar que no mesmo cromossomo e também compreendido entre o intervalo dos marcadores estudados, encontramos o gene *Ahr* na posição 18 cM. Este gene conforme comentado acima participa da metabolização de PAHs como o DMBA, e compete com o *Hif-1 α* pelo *Arnt*, translocador nuclear utilizado pelos produtos dos dois genes.

O processo de seleção genética nas linhagens AIRmax e AIRmin propiciou um aumento na frequência dos genes relacionados à máxima ou mínima reatividade inflamatória aguda, respectivamente, e esta característica tornou estes animais detentores de uma complexidade genética particular reguladora da AIR. Assim, a capacidade inflamatória dos camundongos AIRmax e AIRmin pode estar relacionada, ao menos em parte, a fatores derivados do estado de hipóxia. Este estudo poderá contribuir para o esclarecimento dos fatores genéticos envolvidos na regulação da AIR.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- Camundongos AIRmax desenvolvem em maior reatividade inflamatória do que os AIRmin tanto para o Biogel no tecido subcutâneo como para o TPA aplicado epicutaneamente, tendo como população predominante os polimorfonucleares neutrófilos, demonstrando que a diferença de AIR entre as duas linhagens é um fenômeno geral não restrito ao agente selecionador;
- Animais AIRmax apresentam reatividade significativamente inferior à dos AIRmin quando tratados com DMBA por envolver, nesta reação, a participação do receptor AHR cuja afinidade de ligação é maior na linhagem AIRmin;
- A expressão gene *Hif-1 α* foi maior nos animais AIRmax nas reações ao biogel e ao TPA, indicando que estas reações promovem baixo teor de O₂, quando intensa, necessitando da participação da molécula HIF-1 α ;
- Foi demonstrado polimorfismo genético da região que contém o gene *Hif-1 α* com desvio de frequência altamente significativo
- Os dados de fenótipo, de expressão gênica e de polimorfismo, candidatam a região entre 15 e 45cM do cromossomo 12 como reguladora da AIR neste modelo.

Referências

REFERÊNCIAS*

ANDERSON, C.; HEHR, R. R.; HASAN, R.; ATHAR, M.; MUKHTAR, H.; ELMETS, C. A. Metabolic requirements for induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons. **J. Immunol.**, v. 155, p. 3530-3537, 1995.

ANSEL, J. C.; PERRY, P.; BROWN, J.; DAMM, D.; PHAN, T.; HART, C.; LUGER, T.; HEFENEIDER, S. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. **J. Invest. Dermatol.**, v. 94, p. 101S-107S, 1990.

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

BA'RDOS, J. I.; ASHCROFT, M. Negative and positive regulation of HIF-1: A complex network. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1755, p. 107-120, 2005.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAUJO, L. M.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H. K.; SANT'ANNA, O. A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 2, p. 337-246, 1998.

BRUICK, R. K.; MCKNIGHT, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. **Science**, v. 294, p. 1337-1340, 2001.

CAMPOS, A. R. Inflamação alérgica no pulmão e no tecido subcutâneo em camundongos selecionados segundo a reatividade inflamatória aguda. 64 f. Tese (Mestrado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

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

CARROLL, V. A.; ASHCROFT, M. Targeting the molecular basis for tumor hypoxia. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 7, p. 1-16, 2005.

* De acordo com:

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

CHAN, W. K.; GUANG, Y.; GU, Y. Z.; BRADFELD, C. Cross-talk between the Aryl Hydrocarbon Receptor and Hypoxia Inducible Factor Signaling Pathways: Demonstration of competition and compensation. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 7, p. 12115–12123, 1999.

CHAN, D. A.; SUTPHIN, P. D.; DENKO, N. C.; GIACCIA, A. J. Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1 α . **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 40112–40117, 2002.

CRAMER, T.; YAMANISHI, Y.; CLAUSEN, B. E.; FÖRSTER, I.; PAWLINSKI, R.; MACKMAN, N.; HAASE, V. H.; JAENISCH, R.; CORR, M.; NIZET, V.; FIRESTEIN, G. S.; GERBER, H. P.; FERRARA, N.; JOHNSON, R. S. HIF-1 α is essential of myeloid cell-mediated inflammation. **Cell**, v. 112, p. 645-657, 2003.

CREWS, S. T.; FAN, C. M. Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 9, p. 580-587, 1999.

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

DE SOUZA, V. R. C.; CABRERA, W. H. K.; GALVAN, A.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; VORRARO, F.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; DRAGANI, T. A.; IBÁÑEZ, O. M. Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. **Int. J. Câncer**, v. 124, p. 1478–1482, 2009.

DIETRICH, W. F.; MILLER, J. C.; STEEN, R. G.; MERCHANT, M.; DAMRON, D.; NAHF, R.; GROSS, A.; JOYCE, D. C.; WESSEL, M.; DREDGE, R. D.; MARQUIS, A.; STEIN, L. D.; GOODMAN, N.; PAGE, D. C.; LANDER, E. S. A genetic map of the mouse with 4006 simple sequence length polymorphisms. **Nat. Genet.**, v. 7, p. 220-245, 1994.

ELMETS, C. A.; ATHAR, M.; TUBESING, K. A.; ROTHaupt, D.; XU, H.; MUKHTAR, H. Susceptibility to the biological effects of polyaromatic hydrocarbons is influenced by genes of the major histocompatibility complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 14915-14919, 1998.

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

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods.**, v. 25, n. 4, p. 386-401, 2001.

HÄGG, M.; STEFAN, W. Activation of hypoxia-induced transcription in normoxia. **Exp. Cell. Res.**, v. 306, p. 180 – 191, 2005.

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

HARA, S.; HAMADA, J.; KOBAYASHI, C.; KONDO, Y.; IMURA, N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 287, p. 808–813, 2001.

HEIDEL, S. M.; MACWILLIAMS, P. S.; BAIRD, W. M.; DASHWOOD, W. M.; BUTERS, J. T. M.; GONÇALEZ, F. J.; LARSEN, M. C.; CZUPRYNUKI, C. J.; JEFEOATE, C. R. Cytochrome P450B1 mediates induction of bone marrow cytotoxicity and preleukemia cells in mice treated with 7, 12 – Dimethylbenz[a]anthracene. **Cancer Res.**, v. 60, p. 3454 – 3460, 2000.

HEWITSON K. S.; MCNEILL, L. A.; ELKINS, J. M.; SCHOFIELD, C. J. The role of iron and 2-oxoglutarate oxygenases in signalling. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, p. 510–515, 2003.

HUNT, T. K.; KNIGHTON, D. R.; THAKRAL, K. K.; GOODSON, W. H.; ANDREWS, W. S. Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated macrophages. **Surgery**, v. 96, p. 48-54, 1984.

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

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

KE, Q.; COSTA, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). **Mol. Pharmacol.**, v. 70, p. 1469–1480, 2006.

KOLB, T. M.; DAVIS, M. A. The Tumor Promoter 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) Provokes a Prolonged Morphologic Response and ERK Activation in Tsc2-Null Renal Tumor Cells. **Toxicol. Sci.**, v. 81, p. 233–242, 2004.

KONDO, K.; KAE LIN, W. G. Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. **Exp. Cell Res.**, v. 264, p. 117-125, 2001.

LADEROUTE, K. R.; ALARCON, R. M.; BRODY, M. D.; CALAOAGAN, J. M.; CHEN, E. Y.; KNAPP, A. M.; YUN, Z.; DENKO, N. C.; GIACCIA, A. J. Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor. **Clin. Cancer Res.**, v. 6, p. 2941 – 2950, 2000.

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

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

LEE, J. W.; BAE, S. H.; JEONG, J. W.; KIM, S. H.; KIM, K. W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. **Exp. Mol. Med.**, v. 36, n. 1, p. 1-12, 2004.

LEWIS, J. S.; LEE, J. A.; UNDERWOOD, J. C.; HARRIS, A. L.; LEWIS, C. E. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66, p. 889-900, 1999.

LI, X.; ECKARD, J.; SHAH, R.; MALLUCK, C.; FRENKEL, K. Interleukin-1- α 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, p. 417-423, 2002.

LITT, M. e LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 44, p. 398-401, 1989.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2[-Delta Delta C(T)] Method. **Methods.**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MAHON, P. C.; HIROTA, K.; SEMENZA, G. L. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. **Genes Dev.** v. 15, p. 2675–2686, 2001.

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

MAXWELL, P. H.; WIESENER, M. S.; CHANG, G. W.; CLIFFORD, S. C.; VAUX, E. C.; COCKMAN, M. E.; WYKOFF, C. C.; PUGH, C. W.; MAHER, E. R.; RATCLIFFE, P. J. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. **Nature**, v. 399, p. 271– 275, 1999.

MCNEILL, L. A.; HEWITSON, K. S.; GLEADLE, J. M.; HORSFALL, L. E.; OLDHAM, N. J.; MAXWELL, P. H.; PUGH, C. W.; RATCLIFFE, P. J.; SCHOFIELD, C. J. The use of dioxygen by HIF prolyl hydroxylase (PHD1). **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 12, p. 1547– 1550, 2002.

MEYER, T.; STOCKFLETH, E.; CHRISTOPHERS E. Immune response profiles in human skin. **Br. J. Dermatol.**, v. 157 (Suppl. 2), p. 1–7, 2007.

MOUSE GENOMIC INFORMATICS. Disponível em: <http://www.informatics.jax.org>. Acesso em 2008.

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

MURA, M; HAN, B; ANDRADE, C. F; SETH, R; HWANG, D; WADDELL, T. K; KESHAVJEE, S.; LIU, M. The early responses of VEGF and its receptors during acute lung injury: implication of VEGF in alveolar epithelial cell survival. **Crit. Care**, v. 10, n. 5, p. 130, 2006.

NAKADATE, T. The Mechanism of Skin Tumor Promotion Caused by Phorbol Esters: Possible Involvement of Arachidonic Acid Cascade/Lipoxygenase, Protein Kinase C and Calcium/Calmodulin Systemst. **Japan. J. Pharmacol.**, v. 49, p. 1-9, 1989.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 173-182, 2006.

NINIKOSKI, J.; HUNT, T.K. Oxygen tensions in healing bone. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 134, p. 746-750, 1972.

PAPANDREOU, I.; POWELL, A.; LIM, A. L.; DENKO N. Cellular reaction to hypoxia: sensing and responding to an adverse environment. **Mutat. Res.**, v. 569, p. 87–100, 2005.

PARK, B. K.; HEO, M. Y.; PARK, H.; KIM, H. P. Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 expression and skin inflammation in mice by wuoning, a plant flavone from *Scutellaria radix*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 425, p. 153-157, 2001.

POELLINGER, L.; JOHNSON, S. R. HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 14, p. 81–85, 2004.

POLAND, A.; GLOVER, E. Characterization and strain distribution pattern of the murine Ah receptor specified by the Ahd and Ahb-3 alleles. **Mol. Pharmacol.**, v. 38, n. 3, p. 306-312, 1990.

PUIGNERÓ, V.; QUERALT, J. Effect of topically applied cyclosporin an on arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) induced dermal inflammation in mouse ear. **Inflammation**, v. 21, n. 3, p. 357-369, 1997.

QU, X.; YANG, M. X.; KONG, B. H.; QI, L.; LAM, Q. L.; YAN, S.; LI, P.; ZHANG, M.; LU, L. Hypoxia inhibits the migratory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 83, n. 6, p. 668-673, 2005.

RAMOS, A. T.; GONÇALVES, L. R. C.; RIBEIRO, O. G.; ROCHA CAMPOS, A. C.; SANT'ANNA, O. A. Effects of *Lonomia obliqua* (lepidóptera, saturniidae) toxin on clotting, inflammatory and antibody responsiveness in genetically selected lines of mice. **Toxicon**, v. 43, p. 761-768, 2004.

RIBEIRO FILHO, O. G. Controle Genético da Inflamação. 85 f. Tese (Mestrado em Microbiologia e Imunologia). Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1994.

RIBEIRO FILHO, O. G.; MARIA, D. A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W. H. K.; MORISSET, J.; IBÁÑEZ, 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.

ROSENBERGER, C.; MANDRIOTA, S.; JURGENSEN, J. S.; WIESENER, M. S.; HORSTRUP, J. H.; FREI, U.; RATCLIFFE, P. J.; MAXWELL, P. H.; BACHMANN, S.; ECKARDT, K. U. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 13, p. 1721–1732, 2002.

SAADI, S.; WRENSHALL, L. E.; PLATT, J. L. Regional manifestations and control of the immune system. **Faseb J.**, v. 16, p. 849-856, 2002.

SALCEDA, S.; BECK, I.; CAROL, J. Absolute Requirement of Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Protein for Gene Activation by Hypoxia. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 334, n. 2, p. 389–394, 1996.

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

SCHMID, T. J. V.; BRADFELD, C. A. Ah receptor signaling pathways. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 12, p. 55–89, 1996.

SCHOR, H.; VADAY, G. G.; LIDER, O. Modulation of leukocyte behavior by an inflamed extracellular matrix. **Dev. Immunol.**, v. 7, p. 227-238, 2000.

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. 187-96, 2001.

SEMENZA, G. L., WANG, G. L. A nuclear factor induced by hipóxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. **Mol. Cell. Biol.**, v. 12, n. 12, p. 5447-5454 1992.

SEMENZA, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. **J. Appl. Physiol.**, v. 88, p. 1474-80, 2000

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor-1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. **Trends. Mol. Med.**, v. 7, p. 345-350, 2001c.

SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nat. Rev. Câncer**, v. 3, p. 721 - 32, 2003.

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 their interline crosses. **Exp. Clin. Immunogenet.**, v. 7, p. 221-233, 1990.

STOCKMANN, C.; FANDREY, J. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 33, n. 10, p. 968-79, 2006.

STOLZE, I. P.; TIAN, Y. M.; APPELHOFF, R. J.; TURLEY, H.; WYKOFF, C. C.; GLEADLE, J. M.; RATCLIFFE, P. J. Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) in regulating HIF transcriptional target genes. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 41, p. 42719-25, 2004.

TANIMOTO, K.; YOSHIGA, K.; EGUCHI, H.; KANEYASU, M.; UKON, K.; KUMAZAKI, T.; OUE, N.; YASUI, W.; IMAI, K.; NAKACHI, K.; POELLINGER, L.; NISHIYAMA, M. Hypoxia-inducible factor-1a polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 11, p. 1779-1783, 2003.

TERWILLIGER, J. D. e GÖRING, H. H. H. Gene mapping in the 20th and 21st centuries: statistical methods, data analysis, and experimental design. **Hum. Biol.**, v. 72, n. 1, p. 63-132, 2000.

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

VASQUEZ-BRAVO DE LOS ANGELES, Y. Aspectos da resposta inflamatória aguda em linhagens de camundongos com reatividade máxima e mínima obtidas por seleção genética bidirecional. 91 f. Tese (Doutorado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

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

WALMSLEY, S. R.; CADWALLADER, K. A.; CHILVERS, E. R. The role of HIF-1a in myeloid cell inflammation. **Trends Immunol.**, v. 26, n. 8, p. 434-439, 2005.

WIESENER, M. S.; TURLEY, H.; ALLEN, W. E.; WILLAM, C.; ECKARDT, K. U.; TALKS, K. L.; WOOD, S. M.; GATTER, K. C.; HARRIS, A. L.; PUGH, C. W.; RATCLIFFE, P. J.; MAXWELL, P. H. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. **Blood**, v. 92, p. 2260–2268, 1998.

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

ZINKERNAGEL, A. S.; RANDALL, S. J.; NIZET, V. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. **J. Mol. Med.**, v. 85, p. 1339–1346, 2007.

ZHOU, L.; DOSANJH, A.; CHEN, H.; KARASEK, M. Divergent effects of extracellular oxygen on the growth, morphology and function of human skin microvascular endothelial cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 182, p. 134-140, 2000.