Vinicius Ricardo Cuña de Souza

**CARCINOGENESE DE PELE E PULMÃO EM
LINHAGENS DE CAMUNDONGOS SELECIONADAS
SEGUNDO A REATIVIDADE INFLAMATÓRIA
AGUDA**

São Paulo

2007

Vinicius Ricardo Cuña de Souza

**CARCINOGENESE DE PELE E PULMÃO EM
LINHAGENS DE CAMUNDONGOS SELECIONADAS
SEGUNDO A REATIVIDADE INFLAMATÓRIA
AGUDA**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.**

São Paulo

2007

Vinicius Ricardo Cuña de Souza

**CARCINOGENESE DE PELE E PULMÃO EM
LINHAGENS DE CAMUNDONGOS SELECIONADAS
SEGUNDO A REATIVIDADE INFLAMATÓRIA
AGUDA**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.**

Área de concentração: Imunologia

**Orientadora: Dra Olga Célia
Martinez Ibañez**

São Paulo

2007

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

© reprodução total

Souza, Vinicius Ricardo Cuña de.

Carcinogênese de pele e pulmão em linhagens de camundongos selecionados segundo a reatividade inflamatória aguda / Vinicius Ricardo Cuña de Souza. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Olga Célia Martinez Ibañez.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: imunogenética.

Versão do título para o inglês: Skin and lung carcinogenesis in mice selected for acute inflammatory response (AIR).

Descritores: 1. Imunogenética 2. Carcinógenos Químicos 3. Inflamação 4. Neoplasias cutâneas e de pulmão 5. Camundongos 6. Hidrocarbonetos aromáticos I. Ibañez, Olga Célia Martinez II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB149/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Vinicius Ricardo Cuña de Souza.

Título da Tese: Carcinogênese de pele e pulmão em linhagens de camundongos selecionados segundo a reatividade inflamatória aguda.

Orientadora: Olga Célia Martinez Ibañez.

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

() Aprovado

() Reprovado

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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 02/10265-7.

DEDICATÓRIA

As pessoas mais importantes da minha vida...

meus pais Ricardo e Hortência,

meus irmãos e sobrinhos,

minha esposa Clarisse,

minha filha Kailani.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Dra. Olga Célia Martinez Ibañez pela paciência, incentivo e orientação durante a condução deste trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan Orlando Garcia Ribeiro Filho, Maria Siqueira, Wafa H. K. Cabrera, Marcelo De Franco, Milene T. De Franco, Nancy Starobinas, Luiza Maria Araújo, José R. Jensen e Solange Massa pela amizade e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. José Alexandre Marzagão Barbuto e a Profa. Eva Burger pela oportunidade de ter participado do programa PAE.

Mais uma vez agradeço ao Prof. J. A. Barbuto bem como aos professores Ises de Almeida Abrahamsohn, Anna Carla Goldberg e João Gustavo Pessini Amarante Mendes pela grande ajuda e sugestões durante o exame de qualificação.

Ao pesquisador Durvanei A. Maria pela ajuda nos momentos iniciais desta tese.

Ao Prof. Dr. Jose Luiz Guerra e a Luciana Torres pelo imprescindível suporte na avaliação histopatológica desta tese.

Aos companheiros pós-graduandos Francisca Vorraro, Andréa Borrego, Adriana e Patrícia Carneiro, Luciana Peters, Robertinho, Yana, Layra, Ludmila, Alessandra, Andréa Arruda, Cristiano, Tati, Amaral, Simone e Amanda que me aturaram durante estes anos.

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética Sandra Regina Ottoboni, Neusa Maria Coração Miranda, Ronaldo Antônio Mateus, Marinalva de Jesus Lima e Tânia Maria Braga Vieira.

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 e ao nosso saudoso Pedrinho pela ajuda com os animais.

A Sras. Eva Aparecida S. Oliveira e Maria José Jesus Carvalho, funcionárias da Biblioteca do ICB, eu agradeço pela pronta ajuda, principalmente quanto à revisão e correção bibliográfica.

Aos funcionários do departamento de Imunologia do ICB: Jotelma Leite Ribeiro, Maria Eni do Sacramento Santos e Valéria Santos.

Agradeço sinceramente a todos que contribuíram para minha estadia na Universidade de Vigo: aos professores Dr. Armando Caballero Rúa, Dr. Emilio Rolán-Alvarez e Dr. Humberto Quesada e aos meus amigos de *poyata* Mônica Martínez Fernandez, Nieves, Jorge Guerra e Paula Conde Padín por suas preciosas ajudas e idéias.

À minha família da Espanha Elsa, Angélica, Lucy, Teresa e José, aos tios Tito, Paco, “Carmens” e filhos e a Antônio, Isabel e filhas pelos seis maravilhosos meses de convívio familiar diário.

A minha irmã Maria e sua filha Flora eu agradeço pela presença constante e carinho com nossos pais.

Ao meu irmão Alexandre, minha cunhada Lilian e meus sobrinhos Gabriel e Amanda pela constante presença e amor.

Aos meus pais, sogros, Fabiano e a Conceição pelo apoio dado a distância. A vocês serei eternamente grato.

Durante os anos que trabalhei nesta tese, Clarisse, minha esposa, me proporcionou mais ajuda e apoio que ninguém poderia esperar. Além do que, sua ilimitada paciência foi importantíssima para que pudesse realizar esta tese. A ela e minha filha dedico esta tese.

“Masakatsu agatsu, true victory is victory over oneself”

Morihei Ueshiba

RESUMO

SOUZA, V. R. C. de **Carcinogênese de Pele e Pulmão em Linhagens de Camundongos Seleccionados Segundo a Reatividade Inflamatória Aguda** 2007. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência) - Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

As linhagens de camundongos selecionadas segundo máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) resposta inflamatória aguda local (AIR) a partículas de poliacrilamida (Biogel P₁₀₀), divergem fenotipicamente na habilidade de produzir e recrutar granulócitos para o sítio inflamatório. Além disso, diferem na susceptibilidade à carcinogênese química de pele em 2 estágios pela administração epicutânea 7,12-dimetilbenzo[*a*]antraceno (DMBA) seguido de repetidas doses de 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e ao desenvolvimento de cânceres de pulmão por uretana (etil carbamato) ip. AIRmax são resistentes e AIRmin susceptíveis, demonstrando o impacto do controle genético da AIR na predisposição à carcinogênese. Neste trabalho, utilizamos dois carcinógenos do tipo Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAH): 3 metilcolantreno (3-MC) e DMBA. Aplicamos 3-MCA por via im e entre a 19^a e 23^a semanas após o tratamento, respectivamente, 50% dos AIRmin e AIRmax apresentaram tumor local ($\geq 0,5$ cm). Ao final de 45 semanas, cerca de 90% dos animais desenvolveram fibrossarcomas, entretanto, somente nos AIRmin encontramos múltiplos adenomas e grandes adenocarcinomas pulmonares. No segundo protocolo aplicamos doses epicutâneas de DMBA por 5 dias consecutivos. Os AIRmin apresentaram uma reação de dermatite de contacto inicial, seguida de tumores na pele, enquanto que os AIRmax foram resistentes. Às 48 horas após o tratamento, verificamos a expressão de genes de citocinas e enzimas do complexo P450 por qPCR. Os AIRmin tratados com DMBA tinham níveis significativamente elevados de mRNA para IL-1 β (46x), TNF- α (6x), IL-6 (7x) e TGF- β 1 (5x) e de CYP1B1 (7x), já os AIRmax, apresentaram resultados semelhantes aos do controle. Aos 260 dias, apenas os AIRmin desenvolveram múltiplos tumores de pulmão. O receptor de aril hidrocarbonetos (AHR) tem um papel importante no metabolismo dos PAHs. Existe polimorfismo no gene *Ahr* entre linhagens isogênicas de camundongos que determina a afinidade de ligação do AHR ao agonista e susceptibilidade ao câncer. Os AIRmax são homozigotos para o alelo

Ahr^d de baixa afinidade (resistência) e os AIRmin portam o alelo *Ahr^{b1}* de alta afinidade (susceptibilidade). A segregação alélica nestas 2 linhagens sugere que o *Ahr* é um marcador genético envolvido no controle da AIR, hipótese que foi confirmada pelo teste positivo de co-segregação (*linkage*) do genótipo parental de *Ahr* com o grau da resposta inflamatória ao Biogel em uma população de segregantes F2 (AIRmax x AIRmin). Conclusões: Camundongos AIRmax são resistentes e AIRmin são susceptíveis à indução de tumores de pele pela aplicação repetida de DMBA. Os AIRmin são também significativamente mais susceptíveis do que os AIRmax em desenvolver tumores de pulmão induzidos por DMBA ou 3-MCA. Os animais AIRmin apresentaram uma reação cutânea ao DMBA, a qual está relacionada à susceptibilidade ao desenvolvimento tumoral. O perfil de citocinas induzidas é coerente com o aparecimento da reação de hipersensibilidade de contacto pelo DMBA e o aumento da enzima CYP1B1 está relacionado com a bioativação do DMBA que depende da afinidade de ligação do agonista ao AHR. Os resultados indicam mecanismos e fatores genéticos que contribuem para a diferente susceptibilidade de AIRmax e AIRmin a substâncias cancerígenas do tipo PAH.

Palavras Chave: Inflamação, Imunogenética, Camundongos selecionados, DMBA, 3-MC, Carcinogênese química.

ABSTRACT

SOUZA, V. R. C. de. **Skin and Lung Carcinogenesis in Mice Selected for Acute Inflammatory Response (AIR)** 2007. 102 f. Doctor thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Two lines of mice were genetically selected for the maximal (AIRmax) or minimal (AIRmin) local acute inflammatory reactions (AIR) to non immunogenic polyacrilamide beads (Biogel). These lines greatly differed in susceptibility to two stage skin carcinogenesis induced by the epicutaneous administration of dimethylbenzo[*a*]anthracene and repeated doses of phorbol miristate acetate (DMBA/TPA) and for lung cancer induced by the ip injection of urethane. AIRmax were resistant and AIRmin susceptible, demonstrating an association between the predisposition to chemical carcinogenesis and the genetic control of inflammatory reactivity. In this work, we used two polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) carcinogenic compounds in these mouse lines: 3-methylcholanthrene (3-MCA) and DMBA. 3-MCA was injected im and 50% of AIRmin and AIRmax mice developed local tumor ($\geq 0,5$ cm) between 19th and 23rd weeks after treatment, respectively. However, after 45 weeks, about 90% of all animals developed fibrosarcomas but at this time, AIRmin mice only, showed multiple lung adenomas and large adenocarcinomas. DMBA was applied in 5 repeated 50 μ g epicutaneous doses. AIRmax mice were resistant but AIRmin mice developed skin reaction, followed by the appearance of skin and lung tumors. Total RNA was extracted from skin fractions at 48 h after the last dose and expression levels of cytokines and P450 enzymes mRNA were scored by real-time PCR. In AIRmin mice DMBA induced significantly up regulated levels of IL-1 β (46x), TNF- α (6x), IL-6 (7x), TGF- β 1 (5x) and CYP1B1 (7x) mRNA. In AIRmax, the results were similar to controls. The aryl hydrocarbon receptor (Ahr) plays an important role in polyaromatic hydrocarbon (PAH) metabolism. Upon binding to agonist this transcription factor increases the expression of CYP 450 enzymes. An allelic polymorphism was found in *Ahr* gene between inbred mouse lines which correlated to a decrease in binding affinity of the receptor to DMBA and a decrease in carcinogenesis susceptibility. All AIRmax are homozygous for the *Ahr* allele encoding the low affinity receptor whereas all AIRmin bear

the high affinity related allele. The allelic segregation in these two lines indicates *Ahr* as a genetic marker or a gene target involved in inflammatory response control. This was confirmed by a linkage analysis or the co-inheritance of *Ahr* parental genotypes with the degree of acute inflammation to Biogel in a heterogeneous F2 (AIRmax X AIRmin) intercross population. Conclusions: AIRmax mice are resistant and AIRmin mice are susceptible to the induction of skin tumors by continuous application of DMBA. Late after treatment with DMBA and 3-MCA, AIRmin were also significantly more susceptible than AIRmax to develop lung tumors. AIRmin mice presented a precocious skin reaction to DMBA which was correlated to tumor development susceptibility. This reaction was contemporary to the upregulation of the expression in the skin of cytokine genes such as IL-1 β , IL-6, TNF- α and TGF- β and of cytochrome P450 Cyp1b enzyme. The profile of cytokines induced in AIRmin mice is coherent with the elicitation of contact hypersensitivity reaction by DMBA. The increase in Cyp1b1 enzyme correlates with the cutaneous bioactivation of DMBA which in turn depends on high affinity binding to AHR. The results point to mechanisms and genetic factors underlying the differential susceptibility of AIRmax and AIRmin mice to carcinogenesis induced by PAHs.

Keywords: Inflammation, Immunogenetics, Selected mice, DMBA, 3-MC, Chemical carcinogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Seleção fenotípica bidirecional de linhagens AIRmax e AIRmin.....	5
Figura 2.	Herança poligênica de alta e baixa resposta inflamatória aguda e sua relação com a carcinogênese pulmonar.....	7
Figura 3.	Fotomicrografia do corte histológico do sarcoma no músculo de camundongo AIRmin.....	26
Figura 4.	Incidência de sarcomas induzidos pelo 3-MC.....	27
Figura 5.	Fotomicrografia do corte histológico de um adenocarcinoma pulmonar induzido por 3-MC em camundongo AIRmin.....	27
Figura 6.	Aspectos da pele de animais AIRmax e AIRmin, 8 dias após a aplicação por cinco dias consecutivos de doses epicutâneas dorsais de 50 µg de DMBA dissolvidos em 0,1ml de acetona.....	30
Figura 7.	Multiplicidade de lesões papilomatosas de pele induzidas pelo DMBA.....	30
Figura 8.	Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de áreas com tumores pulmonares de camundongos AIRmax e AIRmin induzidos por DMBA.....	32
Figura 9 A.	Fotomicrografia de cortes histológicos da pele de animal AIRmax (1) e AIRmin (2) controle.....	33
Figura 9 B.	Fotomicrografia de cortes histológicos da pele de animal AIRmax (1) e AIRmin (2) após tratamento com DMBA.....	33
Figura 9 C.	Fotomicrografia de cortes histológicos da pele de animal AIRmax (1) e AIRmin (2) após tratamento com TPA.....	34
Figura 10.	Fotomicrografia de cortes histológicos da pele de reações induzidas pelo DMBA e pelo DNFB na orelha em animais AIRmax e AIRmin.....	37
Figura 11.	Expressão por RT-PCR em Tempo Real do HMBS na pele animais AIRmax e AIRmin controle e estimulados com DMBA.....	38
Figura 12.	Quantificação da expressão de IL-6 por RT-PCR em Tempo Real na pele dos animais AIRmax e AIRmin estimulados com DMBA.....	39
Figura 13.	Análise da expressão de RNAm para citocinas em amostras de pele de animais AIRmax e AIRmin 48 horas após o tratamento com DMBA.....	41
Figura 14.	Análise da expressão de RNAm para CD8 e CD4 em amostras de pele de animais AIRmax e AIRmin 48 horas após o tratamento com DMBA.....	43
Figura 15.	Análise da expressão de RNAm para enzimas do citocromo P450 em amostras de pele de animais AIRmax e AIRmin 48 horas após o tratamento com DMBA.....	44
Figura 16.	Imagem do gel de eletroforese da análise do polimorfismo do gene <i>Ahr</i>	46
Figura 17.	Análise da reação inflamatória aguda nos segregantes F2 (AIRmax x AIRmin).....	48
Figura 18.	Distribuição do genótipo <i>Ahr</i> em segregantes F2 (AIRmax X AIRmin) de acordo com reatividade inflamatória.....	49
Figura 19.	Análise do microssatélite D9Mit248 onde mostramos o padrão de migração do produto de amplificação por PCR das preparações de DNA das linhagens isogênicas e de 5 AIRmax e 5 AIRmin.....	52
Figura 20.	Análise do microssatélite CYP1A1 onde mostramos o padrão de migração do produto de amplificação por PCR das preparações de DNA das linhagens isogênicas e de 7 AIRmax e 8 AIRmin.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Relação de seqüências sintéticas (<i>primers</i>) empregados nas reações de PCR em tempo real.....	21
Tabela 2.	Marcador tipo microsatélite de CYP1A1 e D9Mit248.....	23
Tabela 3.	Análise do aparecimento de adenomas e adenocarcinomas pulmonares em camundongos AIRmax e AIRmin tratados com 3-MC.....	28
Tabela 4.	Análise do aparecimento de adenomas e adenocarcinomas pulmonares em camundongos AIRmax e AIRmin tratados com DMBA.....	31
Tabela 5.	Reações de dermatite de contato ao DNFB e ao DMBA nas linhagens AIRmax e AIRmin.....	36
Tabela 6.	Avaliação das variações dos níveis de expressão de RNAm de citocinas e enzimas do citocromo P450 e por técnica de qPCR na pele de animais AIRmax e AIRmin após tratamento com DMBA ou TPA.....	40
Tabela 7.	Alelos do gene <i>Ahr</i> em linhagens de camundongos isogênicas e de AIRmax e AIRmin.....	47
Tabela 8.	Genótipo <i>Ahr</i> de camundongos F2 entre AIRmax e AIRmin.....	49
Tabela 9.	Resposta inflamatória aguda (AIR) ao Biogel de camundongos F2 (AIRmax x AIRmin) de acordo com o genótipo <i>Ahr</i>	50
Tabela 10.	Definição de alelos de microsatélites em linhagens isogênicas constituintes da F0.....	52
Tabela 11..	Análise de microsatélites no cromossomo 9 em camundongos AIRmax e AIRmin.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

χ^2	Qui-quadrado.
3-MC	3-metilcolantreno
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism.</i>
AhR	<i>Receptor aril hidrocarboneto.</i>
AHRNT	<i>arylhydrocarbon receptor nuclear translocator.</i>
AHRR	<i>aryl hydrocarbon receptor repressor.</i>
APC	Célula apresentadora de antígeno, <i>antigen-presenting cells.</i>
B[a] P	Benzo[a]pireno.
BPB	Azul de bromo Fenol.
CHS	Hipersensibilidade de contato, <i>Contact hypersensitivity.</i>
cM	CentiMorgan.
CSF	<i>Colony Stimulating Factor.</i>
Ct	<i>Cycle threshold.</i>
CYP450	Citocromo P450.
DMBA	7,12-dimetil benzoantraceno.
DMH	Dimetil hidrazina.
DMSO	Dimetil Sulfóxido.
DNFB	2, 4-dinitrofluorobenzeno.
DO	Densidade óptica.
EPHX1	Hidrolase epóxida microssômica, <i>Microsomal epoxide hydrolase.</i>
F1	Primeira geração filial de um cruzamento.
F2	Segunda geração filial de um cruzamento.
F3	Terceira geração filial de um cruzamento.
GST	<i>Glutathione S-transferase.</i>
HE	Hematoxilina-Eosina.
HMBS	Hidroximetil-bilane sintase.
i.m.	Intramuscular.

i.p.	Intraperitoneal.
IFN	<i>Interferon.</i>
Ig	Imunoglobulina.
IL	Interleucina.
iNOS	NO sintetase induzível.
LRS	<i>Likelihood ratio statistic.</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex.</i>
MMP	<i>Membrane-type Matrix Metalloproteinase.</i>
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa-beta</i> .
NK	<i>Natural Killer.</i>
NO	Óxido nítrico.
NQO	NAD(P)H: quinone oxidoreductase.
PAH	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.
PBS	Salina tamponada com fosfatos.
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction.</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor.</i>
PMN	Polimorfonuclear.
QTL	<i>Quantitative Trait Loci.</i>
RAPD	<i>Randon Amplified Polymorphic DNA.</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism.</i>
s.c.	Subcutâneo.
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region.</i>
STS	<i>Sequence-Tagged Site.</i>
T.A.	Temperatura ambiente.
TAM	Macrófagos associados a tumores.
TCDD	2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina.
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta.
Th	Linfócito T <i>helper</i> .
TNF	Fator de necrose tumoral.
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoil-forbol-13-acetato.
VNTR	<i>Variable number tandem repeat.</i>
XRE	Elementos respondedores a xenobióticos.
H-2	<i>Locus</i> murino de histocompatibilidade 2.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Carcinogênese.....	01
1.2 Inflamação e Câncer.....	02
1.3 Seleção Genética Bidirecional de linhagens de camundongos segundo a intensidade da Resposta Inflamatória Aguda (AIR).....	03
1.3.1 Carcinogênese nas linhagens AIRmax e AIRmin.....	06
1.4 Xenobióticos.....	08
1.5 Ahr.....	10
1.5.1 Ahr e Inflamação.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Animais experimentais.....	16
3.2 Histológico.....	16
3.3 Tratamentos.....	16
3.3.1 3-MC.....	16
3.3.2 DMBA.....	16
3.3.3 TPA.....	17
3.4 Parâmetros de avaliação do crescimento tumoral.....	17
3.5 Indução da reação inflamatória pelo Biogel.....	17
3.6 Extração de DNA genômico (Kit E.Z.N.A.® <i>Easy Acid Isolation, Omega Bio-tek, Inc.</i>).....	17
3.7 Protocolo de extração de RNA da pele utilizando Trizol.....	18
3.8 Obtenção do cDNA.....	19
3.9 Reações de PCR em Tempo-Real ou quantitativo (qPCR).....	19

3.10 Indução das reações de Dermatite de Contato.....	21
3.10.1 DNFB.....	21
3.10.2 DMBA.....	21
3.11 Tipagem do genótipo <i>Ahr</i> (<i>aryl hydrocarbon receptor</i>).....	22
3.12 Análise de polimorfismo de regiões microssatélites de DNA.....	22
3.13 Análise estatística.....	24
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Carcinogênese induzida por PAHs.....	25
4.1.1 Carcinogênese pelo metilcolantreno (MCA).....	25
4.1.2 Carcinogênese pelo DMBA.....	28
4.2 Dermatite de Contato ao DNFB e ao DMBA.....	35
4.3 Estudo da reação ao DMBA na pele.....	37
4.3.1 Avaliação da Expressão de Citocinas por RT-PCR em Tempo Real.....	39
4.3.2 Análise da Expressão de CD4 e CD8 por RT-PCR em Tempo Real.....	42
4.3.3 Detecção da Expressão de CYP1A1 e CYP1B1 por RT-PCR em Tempo Real.....	43
4.4 Pesquisa de polimorfismo em gene candidato.....	44
4.4.1 Ensaio de <i>linkage</i>.....	47
4.4.2 Análise de Polimorfismo do gene <i>CYP1A1</i> e do Microssatélite D9Mit 248...	50
5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinogênese

A carcinogênese é um processo de múltiplos estágios que envolve eventos genotóxicos (mutações), bem como expressões genéticas alteradas no momento da transcrição, tradução e pós-tradução (eventos epigenéticos) e alterações na sobrevivência celular (proliferação e apoptose) (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000; HERCEG, 2007). Funcionalmente, o processo de carcinogênese é dividido em três etapas: iniciação, promoção e progressão. O primeiro estágio, iniciação, é onde ocorre uma ou mais mutações no DNA promovida pelo agente cancerígeno levando à transformação celular e tornando-a potencialmente capaz de se multiplicar de modo autônomo. O estágio seguinte, a promoção, ocorre depois de um período prolongado de tempo de exposição. A promoção é um processo complexo, que em momentos iniciais é reversível. A progressão tumoral é considerada irreversível e é caracterizada pelo aumento da instabilidade genômica e posterior progresso em direção à malignidade e ao crescimento celular autônomo. Carcinógenos completos possuem atividade iniciadora e promotora e podem atuar em diferentes estágios no processo carcinogênico, mas a forma de ação varia de acordo com o produto químico. O conhecimento dos mecanismos de carcinogênese induzida por produtos químicos tem oferecido base para novas pesquisas na prevenção ao câncer (MILLER e MILLER, 1981).

O risco de câncer no homem é determinado pela combinação de vários fatores genéticos e ambientais. Muitos dos genes descobertos ao longo da última década nos fornecem um elo entre os cânceres que são predeterminados no momento da concepção – as síndromes cancerosas familiares - e os esporádicos. Nestes, múltiplos genes de baixa penetrância segregam na população humana e podem ser fatores essenciais que contribuem à susceptibilidade individual à carcinogênese. A combinação apropriada de alelos que

conferem resistência ou susceptibilidade, modulando os efeitos de exposição a carcinógenos exógenos ou controlando etapas intrínsecas limitantes do crescimento da célula neoplásica, determinaria assim o risco individual de desenvolver câncer (BALMAIN e NAGASE, 1998).

Camundongos expostos a carcinógenos desenvolvem tumores por um processo em múltiplos estágios, muito semelhante ao que ocorre no homem, sendo um modelo experimental adequado para a pesquisa de genes de susceptibilidade ou resistência. Diferentemente das populações humanas, grande número de famílias de camundongos pode ser analisado em estudos de *linkage*, o que aumenta a probabilidade estatística de identificar os vários *loci* envolvidos nas diferentes etapas do processo de carcinogênese. Teoricamente, *loci* que controlam cada um destes subfenótipos podem ser mapeados em modelos de câncer murinos, desde que existam polimorfismos funcionais nas linhagens parentais escolhidas para a análise.

Descobertas sobre os fatores genéticos de predisposição ao câncer vêm contribuindo para o conhecimento mais profundo dos mecanismos da doença e desta maneira colaborando para o desenvolvimento de novos tratamentos.

1.2 Inflamação e Câncer

Tem sido muito discutida a relação funcional entre inflamação e câncer. Está bastante claro que um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento, estroma ativado e agentes promotores de dano ao DNA potenciam e/ou promovem o risco e transformação neoplásica de células em proliferação. Num quadro normal, em resposta à injúria tissular, uma rede multifatorial de sinais químicos inicia e mantém uma resposta do hospedeiro destinada a curar o tecido lesado. Isto envolve ativação e migração dirigida de leucócitos (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) do sistema venoso aos sítios de dano, associada a um aumento da proliferação celular, enquanto o tecido regenera. A proliferação e inflamação cedem, quando o agente agressor é removido ou o reparo está completo. Em contraste, células em proliferação que carregam o dano ao DNA ou a mutação (células iniciadas) continuam a proliferar em microambientes ricos em células inflamatórias e fatores de crescimento que suportam seu desenvolvimento.

Embora a relação causal entre inflamação, imunidade inata e desenvolvimento de tumores seja bem aceita, muitos dos mecanismos celulares e moleculares que medeiam esta relação permanecem não esclarecidos. O conceito fundamental é que inflamação associada ao reparo de lesão é usualmente autolimitante, porque a produção de citocinas antiinflamatórias acompanha a das citocinas pró-inflamatórias; por outro lado, a persistência de fatores iniciadores, a desregulação ou falha dos mecanismos requeridos para resolver a resposta inflamatória, podem conduzir a anormalidades como inflamação crônica, resultando em patogênese. Esta parece ser a situação durante a progressão neoplásica. De certa forma, tumores podem ser interpretados como lesões que não se reparam (DVORAK, 1986; COUSSENS e WERB, 2002).

O componente inflamatório de um tumor em desenvolvimento pode incluir uma população diversificada de células, por exemplo, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos e mastócitos bem como linfócitos, todos capazes de produzir uma variedade de citocinas, mediadores citotóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio e serina ou cisteína proteases, MMPs e agentes perfurantes de membrana, além de mediadores de morte celular como $\text{TNF}\alpha$, interleucinas e interferons (BALKWILL e MANTOVANI, 2001). Células neoplásicas, por sua vez, produzem fatores solúveis como IL-6 e CSF-1 que dirigem a maturação de precursores mielóides a macrófagos. Macrófagos associados a tumores (TAM) exercem um papel ambíguo em neoplasias: embora eles possam matar as células neoplásicas após ativação com IL-2, IFN e IL-12, a infiltração de macrófagos está intimamente relacionada à angiogênese associada ao tumor, bem como à disseminação de metástases (SCHOPPMANN *et al.*, 2002).

Neutrófilos PMNs, por sua vez, representam a primeira linha de defesa contra agressões e são potentes efetores da inflamação. Embora em diferenciação terminal, com pouca maquinaria biossintética, neutrófilos são capazes de produzir considerável quantidade de citocinas/quimiocinas necessárias para o recrutamento, ativação e resposta de células efectoras. Estas células fagocíticas iniciam o reparo da lesão, servindo como uma fonte de citocinas de resposta precoce pro-inflamatórias, como $\text{TNF}\alpha$, IL-1 α e IL-1 β . PMNs são envolvidos no inter-relacionamento entre as células imunes e endoteliais que une a imunidade inata e adaptativa. Recentemente, o potencial anti-tumoral de PMNs e de outros componentes da resposta inflamatória tem recebido maior atenção como arma

efetiva no combate ao câncer (Di CARLO *et al.*, 2001; ISHIHARA, IJIMA e MATSUNAGA, 1998).

1.3 Seleção Genética Bidirecional de linhagens de camundongos segundo a intensidade da Resposta Inflamatória Aguda (AIR)

A caracterização de mecanismos genéticos que regulam a resposta inflamatória e, por conseguinte, as reações biológicas que este processo desencadeia é tema de estudos de grande interesse que têm sido desenvolvidos em modelos murinos (STIFFEL *et al.*, 1990; IBANEZ *et al.*, 1992).

A resposta inflamatória aguda é uma reação complexa cuja intensidade varia de forma contínua e com distribuição normal numa população heterogênea. A inflamação, portanto, é uma característica quantitativa e assim submetida a controle poligênico, ou seja, à regulação pela interação aditiva de vários *loci* gênicos (QTL para *quantitative trait loci*) que segregam independentemente (STIFFEL *et al.*, 1990; SUDBERY, 2004).

Para o estudo genético deste caráter multifatorial, o Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan produziu duas linhagens de camundongos que foram geneticamente selecionadas segundo a resposta inflamatória local de máxima (AIRmax) e de mínima (AIRmin) intensidade a partículas de poliacrilamida (Biogel P100), que é uma substância não imunogênica e não biodegradável. Foi utilizado o processo de seleção Genética Bidirecional que é um método poderoso, pois permite concentrar nas linhagens obtidas muitas variantes alélicas nos diversos *loci* que estão implicados na variação fenotípica de interesse.

O processo de seleção iniciou-se a partir de uma população de camundongos geneticamente heterogênea resultante de cruzamentos entre oito linhagens isogênicas, conforme esquema a abaixo:

A população resultante destes cruzamentos foi denominada de F0, apresentando alta heterogeneidade genética, onde cada representante continha uma combinação aleatória de 12,5% do conjunto gênico de cada uma das oito linhagens isogênicas originais.

No processo seletivo, o agente flogístico (Biogel P100) foi administrado por via subcutânea no dorso dos animais e a reação inflamatória produzida foi avaliada 24 horas após a injeção, considerando o número e a morfologia das células infiltradas, além da determinação do conteúdo protéico no exsudato inflamatório (FONTAN e FAUVE, 1983; FAUVE, JUSFORGUES e HEVIN, 1983). A população inicial (F0) analisada apresentou grande variação fenotípica, obedecendo a uma Distribuição Normal quanto ao caráter intensidade de resposta inflamatória aguda (STIFFEL, *et al.*, 1990).

A seleção genética foi iniciada pela escolha para acasalamento dos indivíduos que expressavam os fenótipos extremos e opostos desta curva com características de resposta máxima e mínima. Evitando cruzamentos consangüíneos, o processo se repetiu por gerações consecutivas, buscando-se atingir o máximo de separação fenotípica entre as duas linhagens, denominando-as AIRmax e AIRmin.

Este processo de seleção promoveu uma progressiva divergência entre as linhagens, com concomitante redução da variância dentro de cada uma quanto à expressão dos caracteres de interesse. A separação gradativa das linhagens no sentido de alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) resposta é explicada pelo acúmulo progressivo, em cada uma, de múltiplos genes exercendo efeitos aditivos sobre o fenótipo selecionado.

Admitiu-se que, a partir da 20ª geração de seleção, 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 nas respectivas linhagens, mantendo-se a heterogeneidade do fundo genético. Nesta etapa foi possível estimar o número de *loci* envolvidos na AIR, indicando a complexidade da regulação gênica. Para ambos, os parâmetros considerados chegou-se à estimativa de 7 a 12 *loci* ou QTL controladores da AIR (IBAÑEZ *et al.*, 1992; RIBEIRO-FILHO, 2003; BIOZZI *et al.*, 1998).

A diferença fenotípica estabelecida entre AIRmax e AIRmin é, sobretudo, reflexo do número de leucócitos migrantes ao sítio inflamatório em resposta ao Biogel. Às 24 horas após a inoculação do Biogel os neutrófilos são as principais células deste infiltrado, correspondendo a 85%, enquanto que os outros 15% são essencialmente fagócitos

mononucleares (RIBEIRO *et al.*, 2003). Esta diferença foi progressivamente aumentando ao longo do processo seletivo, atingindo valores de 20 a 30 vezes no número de células infiltradas e 2,5 vezes na concentração protéica do exsudato, conforme a **figura 1**:

Figura 1: Seleção fenotípica bidirecional de linhagens AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho).

1.3.1 Carcinogênese nas linhagens AIRmax e AIRmin

Embora não tenha sido considerado como caráter de seleção, estes animais selecionados diferiram significativamente na resistência/ susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores induzidos em diferentes órgãos e por agentes diversos. Os AIRmax se mostraram resistentes e os AIRmin susceptíveis a protocolos de carcinogênese de pele em dois estágios induzida pela administração epicutânea de 7,12-dimetil benzo(a)antraceno, seguida por doses repetidas de 12-*O*-tetradecanoil-forbol-13-acetato (DMBA/TPA) (BIOZZI *et al.*, 1998) e também à carcinogênese de pulmão induzida pela injeção peritoneal de uretana (etil carbamato) (MARIA *et al.*, 2003), ou pela administração de dimetil hidrazina (DMH) (DiPACE *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2005). Os resultados evidenciam o impacto do controle genético da reatividade inflamatória aguda na predisposição à carcinogênese química.

Foi ainda demonstrada a associação entre os fenótipos de alta resposta inflamatória aguda e resistência e de baixa resposta e susceptibilidade à carcinogênese de pele (BIOZZI *et al.*, 1998) e de pulmão (RIBEIRO *et al.*, 2005), em populações de segregantes F2 entre AIRmax e AIRmin. A co-segregação ou *linkage* das características de grau de inflamação e carcinogênese sugere que alguns dos *loci* que regulam a intensidade da resposta inflamatória aguda, interferem na susceptibilidade à carcinogênese. (Ensaio de co-segregação ilustrado na **figura 2**).

Estes camundongos representam, assim, um modelo original para identificar os *loci* genéticos relacionados com a resposta inflamatória e sua possível associação com os de predisposição ao desenvolvimento tumoral.

Figura 2: Herança poligênica de alta e baixa resposta inflamatória aguda e sua relação com a carcinogênese pulmonar. Cruzamento de linhagens de camundongos de alta resposta inflamatória aguda (AIRmax) e baixa (AIRmin) resulta em uma progênie inter cruzada de

camundongos (F2) que apresentam níveis variados de resposta dependendo do agrupamento alélico. Neste exemplo, a herança dos alelos “A” e “B” em dois *loci* reguladores da resposta inflamatória aguda confere alta resposta e resistência a tumor de pulmão e a herança dos alelos “a” e “b” confere baixa resposta inflamatória aguda e susceptibilidade a tumor de pulmão. A resposta inflamatória e susceptibilidade à carcinogênese intermediárias são resultantes da composição variada dos heterozigotos.

1.4 Xenobióticos

Os Xenobióticos são substâncias químicas naturais ou artificiais estranhas ao organismo. Os produtos industriais, como pesticidas, poluentes, alcalóides, metabólitos secundários de plantas, toxinas produzidas por fungos, plantas e animais são exemplos de agentes que necessitam de uma destruição endócrina (PARKINSON, 1996). Em seu estado natural ou biotransformados, os xenobióticos podem afetar a integridade do DNA, levando ao câncer quando esta exposição persistir. Estudos epidemiológicos demonstram que 80 a 90% dos cânceres estão relacionados a fatores ambientais como o fumo, a exposição ocupacional e a dieta (DOLL e PETO, 1981).

O metabolismo de fármacos e de substâncias de origem exógena (xenobióticos) é catalisado por um conjunto de enzimas que também estão envolvidas na metabolização de substratos endógenos como ácidos biliares, hormônios esteróides e ácidos graxos. Essas enzimas são amplamente distribuídas pelo organismo, mas são predominantemente encontradas em tecidos altamente expostos a xenobióticos, como fígado, pulmões, intestinos e rins. Estudos mostram que a detoxificação celular feita por enzimas está relacionada com a proteção celular. A inativação de xenobióticos e de toxinas endógenas possibilita a preservação da integridade celular, além da inibição dos eventos de citotoxicidade provocados por estas substâncias e que podem ser a causa de algumas doenças (WILKINSON e CLAPPER, 1997).

A maioria dos agentes carcinogênicos requer ativação metabólica antes de se ligarem a biomoléculas (DNA, RNA e proteínas), logo, as variações nos processos de ativação e detoxificação destes compostos desempenham um papel crucial na carcinogênese química. As enzimas que participam destes processos são classificadas em 2 grupos, baseados em suas propriedades funcionais. As enzimas de Fase I (metabolismo oxidativo) ativam o xenobiótico, tornando-o mais eletrofílico e desta forma mais reativo.

Em um segundo estágio as de Fase II (enzimas conjugadas) competem com a ativação feita pelas enzimas de Fase I, inibindo a formação de produtos eletrofílicos, além de catalisarem a conversão destes em conjugados inativos, tornando-os mais hidrossolúveis e facilitando sua excreção. Este segundo estágio (metabolismo de Fase II) inclui a conjugação com grupos acetato, sulfato inorgânico, açúcares ou aminoácidos (WILKINSON e CLAPPER, 1997; HUTZ e FIEGENBAUM, 2004).

As principais enzimas envolvidas no metabolismo de fase I fazem parte da superfamília das monooxigenases citocromo P450 (CYP450). Em humanos, aproximadamente 10 isoenzimas CYP450 são responsáveis pela metabolização de grande parte dos agentes farmacológicos conhecidos. A variação genética nestas enzimas de biotransformação de Fase I bem como de Fase II vem sendo muito estudada (NEBERT; INGLEMAN-SUNDERG e DALY, 1999; XIE *et al.*, 2001).

Responsáveis por casos de contaminação ambiental, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH, *polycyclic aromatic hydrocarbons*) pertencem a uma classe de produtos químicos de origem petrolífera ou formada durante a combustão incompleta ou pirólise de materiais contendo carbono e hidrogênio. Ela abrange uma variedade grande de produtos que vão desde a gasolina a alimentos (COLBORN, DUMANOSKI e MEYERS, 1997).

Os PAHs podem exercer ações mutagênicas (genotóxicas) e epigenéticas (não genotóxicas). Estes compostos exibem um efeito cancerígeno em várias espécies de animais e são suspeitos de causar câncer também em seres humanos (VASCONSELLOS *et al.*, 1998). Uma importante característica dos PAH é a de quando convertidos metabolicamente em intermediários eletrofílicos reativos formam ligação covalente a alvos nucleofílicos no DNA (principalmente as bases purínicas e pirimidínicas), RNA e proteínas (SIMS e GROVER, 1974; WILKINSON e CLAPPER, 1997). Desta forma, com a formação de aductos com o DNA e a indução de mutações e eventual tumores, metabólitos reativos podem reagir com outros alvos celulares e interferir na transcrição, replicação do DNA e síntese de proteína. Além disso, certos PAHs podem, após metabolização, induzir um processo inflamatório (CASALE *et al.*, 1998).

A constante prevalência de doenças alérgicas vem aumentando nos últimos anos (RYDZYNSKI e PALCZYNSKI, 2004). A exposição a xenobióticos ambientais é descrita como um dos fatores de risco ao desenvolvimento de atopia e asma (ARRUDA *et al.*,

2005). A pele, o trato respiratório e digestivo são os primeiros tecidos que entram em contacto com estes produtos químicos exógenos presentes em escapamentos de automóveis, fumaça de cigarros, em diversos alimentos e em dejetos industriais. Recentes estudos sugerem que a inalação de PAHs das partículas oriundas de escapamentos de motores a diesel e fumaça de cigarros iniciam respostas inflamatórias no trato respiratório, resultando, em rinite e asma (HEO, SAXON e HANKINSON, 2001; MASTRANGELO *et al.*, 2003; SAXON *et al.*, 2000; TAKENAKA *et al.*, 1995). A exposição ocupacional aos PAHs ou a aplicação tópica destes agentes químicos ou drogas que os contêm iniciam doenças inflamatórias na pele, conhecidas como hipersensibilidade de contacto ou dermatites (WU *et al.*, 2003; YAMAMOTO e TOKURA, 2003). Apesar de um aumento do número de informações mostrando a relação entre PAHs e desordens inflamatórias, os precisos mecanismos moleculares que atuam no desenvolvimento dos estágios patológicos continuam sendo pesquisados (TAUCHI *et al.*, 2005).

1.5 AHR

O Receptor Aril Hidrocarboneto (AHR) é um fator transcricional ativado por ligante que regula a diferenciação celular e indução de enzimas de biotransformação com papel na resposta a tóxicos como a muitos poluentes ambientais do tipo dioxina (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina – TCDD) ou compostos policíclicos aromáticos (PAH). O AHR é uma proteína básica do tipo hélice-alça-hélice (bHLH) e membro da superfamília PAS (SCHMIDT e BRADFIELD 1996). O termo PAS é derivado dos membros fundadores desta família: Per-Arnt-Sim e em geral a família PAS de proteínas pode ser considerada como de sensores ambientais, em razão de seus papéis no ritmo circadiano, sinalização por hipóxia e resposta a contaminantes ambientais.

Após a ligação ao agonista, o AHR é transformado, dissocia-se de um dímero de proteína de choque térmico (*heat shock*, HSP90) com o qual ele está ligado no citosol, e entra no núcleo onde se junta com uma proteína nuclear, o ARNT (AHR translocador). O complexo agonista-AHR-ARNT interage com seqüências específicas do DNA onde existe o elemento de resposta a xenobióticos (XRE), localizado nas regiões promotoras ou na seqüência de genes alvos. O domínio de ligação ao DNA determina a especificidade da interação do AHR ao DNA. Para regular a função do AHR existe o AHRR (Repressor do

Receptor Aril Hidrocarboneto). O AHRR compete com o AHR e assim regula a expressão de genes influenciados por AHR (FUJISAWA-SEHARA *et al.*, 1987; LAI, PINEAU e ESSER, 1996).

Os efeitos carcinogênicos e mutagênicos dos PAHs são bem documentados (SJÖGREN, EHRENBERG e RANNUG, 1996) e estudos genéticos e bioquímicos indicam que a maioria destas respostas obtidas pelos PAHs são realizadas através da ligação ao AHR (MIMURA *et al.*, 1997), visto que os PAHs são importantes indutores da atividade de AHR (HANKINSON, 1995).

Esta via do AHR promove a expressão de enzimas metabolizantes, incluindo P450-1A1, P450-1A2, P450-1B1, glutatona-S-transferase GSTM1 e GSTT1, NAD(P)H: quinona oxidoreductase (NQO), e UDP-glucuronosiltransferase (UDPGT) (RUSHMORE e KONG, 2002). As substâncias lipofílicas planares, como o B[a]P e o 3-metilcolantreno, o composto alogenado 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) e o DMBA são sabidamente ativadores de AHR (RUSHMORE e KONG, 2002).

Em animais de laboratório, variações genéticas no *Ahr* levam a diferenças substanciais na afinidade do agonista ao receptor, com conseqüências na sensibilidade aos efeitos bioquímicos e tóxicos produzidos pela exposição aos PAHs. As primeiras análises genéticas do *Ahr* revelaram que as linhagens de camundongos isogênicos têm uma resposta idiossincrática após a administração de PAHs baseada na variabilidade de sua indução da atividade monooxigenase (NEBERT e GELBOIN, 1969). Este gene que codifica o AHR no camundongo, situa-se no cromossomo 12, a 18 cM, é composto por 11 exons e, no exon 9, onde há o 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 a xenobióticos. Fundamentado na resposta monooxigenase e outras características bioquímicas, o gene *Ahr* foi classificado fenotipicamente em 4 alelos: *Ahr^d*, *Ahr^{b1}*, *Ahr^{b2}* e *Ahr^{b3}* (POLAND e GLOVER, 1990; THOMAS *et al.*, 2002). Desta maneira, as linhagens de camundongos que expressam o alelo *Ahr^d*, tendo como protótipo a linhagem DBA/2, apresentam um receptor com baixa afinidade, e os animais que têm o alelo *Ahr^{b1}*, presente na linhagem C57BL/6, codificam um receptor com alta afinidade para o agonista.

Ao contrário do que ocorre em modelos animais onde a variação genética do *Ahr* apresenta um grande efeito sobre o fenótipo de resposta a PAHs, ainda pouco se sabe sobre

o papel do *Ahr* humano (cromossomo 7) na susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento de doenças. Um extenso estudo funcional utilizando-se SNP (*single nucleotide polymorphism*) ao longo do gene *Ahr* humano demonstrou que existe uma substituição de G por A na posição 1721 no exon 10, o qual causa uma mudança de arginina para lisina (R554K) na região que codifica a principal porção do domínio de transativação do receptor, que é o responsável pela expressão de outros genes (HARPER *et al.*, 2002). Esta substituição foi associada a um aumento significativo de atividade CYP1A1, embora outros estudos não mostrem esta associação (ANTTILA *et al.*, 2001; SMART *et al.*, 2000; WONG, OKEY e HARPER, 2001).

A partir do estudo anterior, muitos outros ensaios foram realizados à procura de uma associação significativa entre polimorfismo do *Ahr* humano e a incidência de diversas enfermidades (KOYANO *et al.*, 2005; SASAKI *et al.*, 2006; SMART e DALY, 2000). Estes estudos epidemiológicos propuseram que outras variantes do *Ahr*, como por exemplo, K401R, N487D, I514T, e K17T/R554K na região de codificação (KOYANO *et al.*, 2005; SASAKI *et al.*, 2006; SMART; DALY, 2000) ou até mesmo a combinação de polimorfismos (GAMBIER *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007), poderiam contribuir como um fator de risco para câncer de mama, pulmão, hipertensão e peso da prole ao nascer de mães fumantes. Entretanto, estes resultados dependem ainda de uma análise mais apurada, pois até agora, o impacto desta variação genética no *Ahr* humano sobre respostas bioquímicas ou que resulte em alterações na função normal parece ser moderado.

O papel do AHR na regulação de enzimas responsáveis pela biotransformação de substâncias endógenas já foi descrito. Alguns ligantes endógenos já foram testados em diferentes modelos e apresentaram-se com fraco poder de ligação ao AHR, tais como, triptamina, ácido indol acético (AIA), bilirrubina e biliverdina (MILLER, 1997; PHELAN, *et al.*, 1998).

Estudos mostram que em cultura de células de queratinócitos humanos, de Hepa 1c1c7 e células HeLa há expressão de genes *Ahr*-dependentes mesmo quando não há adição de um ligante exógeno (SADEK e ALLEN-HOFFMANN, 1994; SINGH, HORD e PERDEW, 1996), e, de maneira indireta, existem trabalhos que mostram que as linhagens de camundongos *knockout* do *Ahr* apresentam uma grande variedade de alterações fenotípicas, tais como, diminuição do tamanho do fígado, hepatite súbita, fibrose portal

bem como comprometimento de sistemas e órgãos importantes, por exemplo, coração, vasos sanguíneos, estômago, pele e outros. Estes dados sugerem que o AHR pode estar envolvido em processos fisiológicos como proliferação celular, desenvolvimento, e na manutenção da homeostasia (FERNANDEZ-SALGUERO *et al.*, 1995; LAHVIS e BRADFIELD, 1998).

1.5.1 AHR e Inflamação

Apesar de muitas décadas de estudo a respeito das funções e da maneira de agir do AHR, ainda é muito discutida a sua relação com a resposta inflamatória.

Prostaglandinas têm importante função na resposta inflamatória, tais como, aumento de permeabilidade capilar e quimiotaxia para macrófagos. Pesquisadores relatam que a via de transdução do sinal em experimento *in vitro* do AHR pode ocorrer com a participação de prostaglandinas, a saber, PGB₃, PGD₃, PGF₃ α , PGG₂, PGH₁ e PGH₂ (SEIDEL *et al.*, 2001). No trabalho, os autores conseguiram estabelecer a capacidade destas prostaglandinas de produzir uma ligação competitiva com TCDD pelo AHR, o que as credita como ligantes agonistas a este receptor (SEIDEL *et al.*, 2001).

A lipoxina (LX) é um eicosanóide endógeno gerado a partir dos fosfolípídeos constituintes de membrana celular com propriedade antiinflamatória e associada à fase regenerativa do processo inflamatório (SERHAN *et al.*, 1984). Em um estudo realizado em culturas de células Hepa-1c1c7 (Hepa-1), que contêm o alelo de alta afinidade *Ahr^{bl}*, ficou demonstrado que um dos possíveis ligantes endógenos do AHR poderia ser a Lipoxina A₄ (LXA₄) (SCHALDACH *et al.*, 1999). Estes mediadores lipídicos bioativados, designados LXA₄ e ATL (*aspirin triggered lipoxins*) são amplamente estudados porque possuem importantes ações antiinflamatórias, como interromper a infiltração de PMNs (SERHAN *et al.*, 2005; SERHAN, 2005) e de auxiliar na resolução do processo inflamatório ativando monócitos e estimulando fagocitose dos macrófagos contra PMNs apoptóticos (SERHAN, 2005).

O envolvimento do AHR como modulador de processos alérgicos e inflamatórios é controverso: existem relatos que a dioxina, um típico ligante do AHR, suprime as respostas imunes alérgeno-específicas (FUJIMAKI *et al.*, 2002; WALKER *et al.*, 2002; ANDERSON *et al.*, 1995; DAVILA *et al.*, 1995; YAMAMOTO e TOKURA, 2003). Uma

outra linha de evidência sugere que espécies de oxigênio reativo gerados por PAHs oxigenados parecem aumentar a resposta alérgica (BONVALLOT *et al.*, 2001; KEPLEY *et al.*, 2003). Os PAHs também podem estimular um aumento da atividade do NF- κ B, o qual induz a expressão de uma série de genes, provocando a resposta alérgica (PEI *et al.*, 2002).

Estudo com camundongos transgênicos que expressam a forma ativa constitutiva do AHR em queratinócitos, demonstrou pela primeira vez uma contribuição primária da ativação transcricional mediada por AHR no desenvolvimento de doença inflamatória. Mesmo sem o estímulo exógeno estes animais na fase adulta desenvolveram lesões de pele com inflamação, semelhantes à dermatite atópica. A indução de genes de mediadores inflamatórios dependentes do AHR seria assim um mecanismo central de doenças inflamatórias mediadas pelos PAHs, e os autores sugerem a possibilidade de que com o bloqueio do sinal do AHR se poderia aliviar os sintomas alérgicos, após uma exposição exacerbada aos xenobióticos nas doenças alérgicas por meio da via deste receptor (TAUCHI *et al.*, 2005).

Além disso, o desenvolvimento de reações de dermatite de contato a carcinógenos dependentes da ligação ao AHR tem sido associado à susceptibilidade ou à resistência ao desenvolvimento de tumores, em modelos experimentais murinos com diferente constituição genética (ANDERSON *et al.*, 1995). O polimorfismo neste gene em camundongos e possivelmente em humanos, bem como nos genes que codificam as enzimas responsáveis pela cadeia de eventos que se sucedem após sua ação, pode ser mais um fator determinante de sensibilidade individual diferenciada ao desenvolvimento do câncer induzida por estas substâncias tóxicas.

No modelo de camundongos AIRmax e AIRmin tem-se demonstrado a participação exercida pelos genes modificadores da resposta inflamatória aguda na resistência/susceptibilidade à carcinogênese química (MARIA *et al.*, 2001; MARIA *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2005; Di PACE *et al.*, 2006). Por este motivo, estes animais representam um modelo adicional para o mapeamento e identificação de genes de predisposição à carcinogênese.

2 OBJETIVOS

Neste trabalho, aprofundamos o estudo das inter-relações genéticas da inflamação e carcinogênese, analisando comparativamente as linhagens AIRmax e AIRmin quanto à susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores de pulmão e de pele induzidos por carcinógenos do tipo PAH. Avaliamos ainda alguns dos mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela diferença encontrada entre as linhagens que estariam relacionadas à resposta inflamatória e/ou à imunidade específica e ao polimorfismo de genes candidatos.

Objetivos específicos:

- 1- Analisar os fenótipos de resistência e de susceptibilidade dos animais AIRmax e AIRmin a protocolos variados de indução de tumores por compostos do tipo PAH;
- 2- Estudar o desenvolvimento de reações alérgicas do tipo dermatite de contato ao carcinógeno e comparar com a reação produzida por substância alergênica;
- 3- Estudar o polimorfismo genético entre as linhagens AIRmax e AIRmin, em regiões cromossômicas que codificam genes responsáveis pela resposta a xenobióticos, como o *Ahr* e *CYP1A1* ;
- 4- Realizar ensaio de co-segregação ou *linkage* do genótipo *Ahr* com o fenótipo de resposta inflamatória aguda em população heterogênea de camundongos F2 resultante do inter cruzamento (AIRmax x AIRmin).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin, a partir da 38^a geração de cruzamentos seletivos e segregantes F₂, provenientes de cruzamentos entre híbridos F₁ (AIRmax X AIRmin) produzidos e mantidos no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, São Paulo. Usamos em todos os experimentos, machos e fêmeas de 4 a 6 semanas de idade. A utilização dos animais foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) em 16/12/04, protocolo nº 115.

3.2. Histológico

Os fragmentos de órgãos dos animais foram retirados e fixados em formol tamponado 10 % PBS por 24 horas, seguido de desidratação em uma série crescente de álcoois (70 %, 90 %, 100%), diafanização em xilol e impregnação e inclusão em parafina. Os cortes foram feitos na espessura de 5µm e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). A avaliação foi feita em microscópio óptico (Leitz-Diaplan) e a aquisição e digitalização das imagens através do sistema CCD-IRIS (Sony Company).

3.3 Tratamentos:

3.3.1 3-MC: Grupos de 30 camundongos de cada linhagem receberam injeção intramuscular no membro posterior esquerdo de 0,3 mg de metilcolantreno (3-MC) (Sigma-Aldrich) suspensos em 0,1 ml de óleo sésamo. O desenvolvimento do tumor foi avaliado 2 a 3 vezes por semana durante 11 meses. Os camundongos com tumores com 5 mm de diâmetro contam como positivos. Os camundongos que apresentavam uma massa superior a 20 mm ou que estavam debilitados eram sacrificados. O diagnóstico dos tumores foi feito

pela análise macroscópica e foram retiradas amostras de diferentes órgãos e tecidos para a análise histológica.

3.3.2 DMBA: Aplicamos por cinco dias consecutivos, doses epicutâneas dorsais de 50 µg de 7,12-dimetil benzoantraceno (DMBA) (Sigma-Aldrich) dissolvidos em 0,1 ml de acetona (LI *et al*, 2002). Os animais foram observados até 250 dias após o tratamento.

3.3.3 TPA: Aplicamos o agente promotor por cinco dias consecutivos, doses epicutâneas dorsais de 5 µg de 12-*O*-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) (Sigma-Aldrich) dissolvidos em 0,1 ml de acetona (LI *et al*, 2002). Os animais foram observados até 250 dias após o tratamento.

3.4 Parâmetros de avaliação do crescimento tumoral

Foram considerados: Incidência = (%) de animais positivos; a multiplicidade de tumores = N (soma do número de tumores no total dos animais) e o volume total de tumores = N V (soma do volume de tumores onde $V = \frac{4}{3}\pi R^3$ em mm³; R= raio médio do tumor).

3.5 Indução da reação inflamatória pelo Biogel

O Biogel P₁₀₀ (BIORAD, Tougar e Matingnom, França) é formado por microesferas de poliacrilamida, cuja porosidade tem limite de exclusão protéica para moléculas acima de 100 kDa. Duas a quatro gramas de Biogel são hidratadas durante uma hora em 300 ml de PBS previamente aquecido a 90 °C, e deixadas por uma hora à temperatura ambiente. Após a hidratação, o gás retido é removido por vácuo e a suspensão é esterilizada por 20 minutos a 120 °C. A suspensão é então lavada 3 vezes com salina apirogênica estéril e ressuspendida na proporção de 1 ml de partículas em 0,5 ml de salina. Essa suspensão final contém aproximadamente 53 mg/ml de Biogel P100. O diâmetro médio das microesferas hidratadas é de 131×10^{-3} mm (STIFFEL *et al*, 1990). Os camundongos da população F2 foram previamente depilados na região dorsal onde receberam uma injeção subcutânea de 0,75 ml da suspensão de Biogel P₁₀₀ em PBS. O exsudato foi recuperado após 24 horas pela administração de 1ml de PBS. Após sedimentação das partículas, o número de leucócitos

infiltrados foi determinado por contagem em câmara de Malassez de uma alíquota do sobrenadante.

3.6 Extração de DNA genômico (Kit E.Z.N.A.[®] *Easy Acid Isolation*, Omega Bio-tek, Inc.)

Dois pedaços da cauda de 1 a 2 cm foram cortados e colocados em tubos *ependorf* estéreis (*nuclease-free*) e adicionados de 180 µl do *Buffer* TL e 25 µl de O.B. Protease (+ Tris-HCl), misturados (em vortex) e incubados em banho-maria com agitação a 55 °C até que a lise esteja completa. (*overnight*), e foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 r.p.m. à temperatura ambiente (T.A.) (para a formação do *pellet* de tecidos). O sobrenadante foi recolhido e transferido para um tubo estéril. Para remover o RNA foram adicionados 15 µl de RNase A (25 mg/ml) por 2 min à temperatura ambiente.

Foram adicionados em seguida 200µl de Buffer BL com 210µl de etanol absoluto e misturados vigorosamente (vortex) para que a mistura seja completa.

Toda a amostra foi transferida para a coluna de extração de DNA (2 ml) e centrifugada a 13.000 r.p.m. por 15 minutos à T.A. O tubo de coleta foi descartado e a coluna colocada em um segundo tubo *ependorf* (tubo de coleta do Kit) de 2 ml, lavada com 650 µl do *Wash Buffer* (diluído em etanol) por centrifugação a 10.000 r.p.m. por 1 minuto e o eluato foi descartado. Este procedimento foi repetido uma vez e o material foi centrifugado em velocidade máxima por 2 minutos para secar a coluna. A coluna foi colocada em um tubo estéril, adicionados 200µl do *Elution Buffer* pré-aquecido a 70 °C por 3 minutos a 70 °C.

Após centrifugação a 10.000 r.p.m. por 1 minuto para eluir o DNA da coluna, o primeiro eluato foi passado novamente na coluna e centrifugado.

O DNA de linhagens isogênicas foi adquirido da *Jackson Laboratory*.

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

3.7 Protocolo de extração de RNA da pele utilizando Trizol

Cerca de 100 mg de fragmentos de pele foram retirados e macerados em 1 ml de

Trizol (Invitrogen). Após a incubação no gelo foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio (MERCK) para cada 1 ml de Trizol. Após o período de agitação e centrifugação, o sobrenadante (incolor, que contém o RNA) foi transferido para outro tubo *ependorf* 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 no gelo, a solução foi centrifugada a 11000 rpm por 10 minutos à 4 °C. O *pellet* de RNA foi lavado com 1 ml de etanol 75% gelado para cada 1 ml de Trizol. Após a secagem, para dissolver o *pellet* foi adicionado 50 µl de água livre de RNase. A concentração de RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro (260/280 nm), a integridade e qualidade das preparações foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1,5 % em TBE e o material foi estocado a -70 °C.

3.8 Obtenção do cDNA

A síntese de cDNA foi feita através de uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para isso, 10 µl contendo 1 µg do RNA foram adicionados a 1 µl de Oligo(dT)₁₂₋₁₈, (50 µM) 2 µl de água livre de RNase, 1 µl de oligonucleotídeos dNTP (10 µM); a mistura foi homogenizada e submetida à temperatura de 65 °C por 5 minutos. Após este período permaneceu no gelo por 1 minuto. Em seguida adicionamos 4 µl de tampão específico 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 RNase H-Reverse Transcriptase (200 U/µl) (Invitrogen) e a mistura permaneceu a temperatura ambiente por 5 minutos, seguida de nova incubação à 50° C por 50 minutos e inativação a 70 °C por 15 minutos. As reações foram incubadas em aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200.

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

Cada amostra de 1 µl do cDNA (diluição a 1:2) foi adicionada a uma reação contendo as seqüências sintéticas específicos ou *primers* (0,5 µl de cada *primer*) (5 µM); 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 2 minutos. As seqüências alvo foram então amplificadas durante 40 ciclos constituídos de etapas sucessivas de desnaturação (94°C por 20 segundos), de anelamento (58 °C por 20 segundos).

A cada amostra foi atribuído um valor de *Ct* (*Cycle Threshold*) referente ao número de ciclos necessários para que a fluorescência incorporada às duplas fitas amplificadas comece a aumentar acima da fluorescência de fundo, ou seja, no início da fase logarítima (log) de amplificação, a qual depende diretamente de quantas cópias das seqüências alvos havia inicialmente em cada amostra.

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

Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa “Opticon Monitor Analysis Software 2.03”, conforme indicado. A quantidade de expressão dos genes estudados neste trabalho em cada amostra foi estimada através do *Cycle Threshold* (*Ct*). Para quantificar os resultados obtidos pelo qPCR alguns métodos são comumente utilizados , entre eles o Método de *Threshold* Comparativo (GIULIETTI *et al.*, 2001 e LIVAK *et al.*, 2001). Neste método fórmulas aritméticas são usadas para calcular níveis de expressão relativos com um controle, que normalmente é amostra não tratada. Pelos valores do *Cycle Threshold* (*Ct*) calcula-se o Delta *Ct* (ΔCt) que consiste na diferença entre os *Ct* do gene de interesse e do constitutivo. Do valor do ΔCt do grupo tratado desconta-se o valor do ΔCt do grupo controle que é o Delta Delta *Ct* [$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra) - ΔCt (controle)]. A diferença de expressão é dada pela formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e os valores são expressos em $\log_2$ ($\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$), uma vez que a cada ciclo as cópias do cDNA obedecem a uma curva exponencial com base 2. Esta transformação é necessária para o tratamento estatístico dos resultados.

Devemos lembrar que os valores do *Cycle Threshold* (*Ct*) são inversamente proporcionais às quantidades iniciais de mRNA, ou seja, quanto menor for o valor do *Ct*, maior será a quantidade inicial da reação.

Descrevemos na **tabela 1** as seqüências sintéticas (*primers*) que foram utilizadas para amplificar a partir dos cDNA específicos, os RNAm codificantes para algumas citocinas envolvidas no processo inflamatório como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TGF- β 1, IFN- γ , IL-18, IL-10 e TNF- α , para os enzimas do citocromo P450: CYP1A1 e CYP1B1 e para os receptores CD4 e CD8 de linfócitos T. Estes *primers* foram desenhados para *éxons* que flanqueiam *íntrons* de grande tamanho (1000 pb) evitando assim a amplificação do DNA genômico.

Tabela 1: Relação de seqüências sintéticas (*primers*) empregados nas reações de PCR em tempo real.

PRIMER	SENSE (3')	ANTISENSE (5')	Tamanho do produto
HMBS	AAAGTGCCGTGGGGAAACCAG	GAGGCGGGTGAGGTTTC	102 pb
TNF- α	TTGACCTCAGCGCTGAGTTG	CCTGTAGCCCACGTCGTAGC	213 pb
IL-1 α	CAGTTCTGCCATTGACCATC	TCTCACTGAAACTCAGCCGT	219 pb
IL-1 β	GAGATTGAGCTGTCTGCTCA	AAGGAGAACCAAGCAACGAC	205 pb
IL-6	GTACTCCAGAAGACCAGAGG	TGCTGGTGACAACCACGGCC	209 pb
TGF- β 1	ACCGCAACAACGCCATCTAT	GTAACGCCAGGAATTGTTGC	201 pb
IL-10	TCAAACAAAGGACCAGCTGGACAACATACTG	CTGTCTAGGTCCTGGAGTCCAGCAGACTCAA	254 pb
INF- γ	GCTCTGAGACAATGAACGCT	AAAGAGATAATCTGGCTCTGC	227 pb
IL-18	GACCCAGAGGATATTGGATC	GGAGGAAGTGTGATGTGAC	214 pb
CYP1A1	TGGAGACCTTCCGGCATTTC	GCCATTCACTTGTATCTCTTGTG	77 pb
CYP1B1	TGGCTGCTCATCCTCTTTAC	AGGTTGGGCTGGTCACTCAT	113 pb
CD4	AGCAACTCTAAGGTCTCTAACC	AGAGTCAGAGTCAGGTTGCC	467 pb
CD8	AGGATGCTCTTGGCTCTTCC	TCACAGGCGAAGTCCAATCC	399 pb
AHR	AGAATCCCACATCCGCATGA	TGCAAGAAGCCGGAATACTG	64 pb
EPHX	GGGTCAAAGCCATCAGCCA	CCTCCAGAAGGACACCACTTT	186 pb

OBS: HMBS: Hidroximetil-bilane sintase (gene constitutivo)

3. 10 Indução das reações de Dermatite de Contato

3.10.1 DNFB: Vinte e cinco microlitros de uma solução a 0,5% de 2, 4-dinitrofluorobenzeno (DNFB) em acetona/ óleo de oliva foram aplicados no abdômen, previamente raspado e 5 dias após a reação foi desencadeada pela aplicação de 10 μ l de uma solução de DNFB a 0,2% nos dois lados da orelha (GRABBE *et al.*, 1996). Na orelha contra lateral foi aplicado o mesmo volume do veículo. Os animais foram sacrificados após 24 horas e as orelhas foram cortadas com um bisturi circular (*punch*) com 5 mm de diâmetro. Duas amostras de cada orelha foram retiradas e pesadas. O valor de reação foi dado pela porcentagem de aumento entre o peso das amostras de orelha reação e a normal.

Para cada ensaio utilizamos 5 a 10 animais de cada linhagem por experimento e animais controle, os quais receberam apenas o veículo na fase de sensibilização.

3.10.2 DMBA: os animais receberam 150 µl de uma solução de 7,12-dimetil benzoantraceno (DMBA) a 100µg/ml dissolvido em solvente acetona mais DMSO (na proporção de 2:1) no abdômen previamente raspado. O local da aplicação foi protegido por uma membrana permeável ao oxigênio e ao vapor (BioOcclusive[®], Johnson & Johnson Medical Inc., Arlington, TX). Após 5 dias, a orelha esquerda de cada animal recebeu 30 µl de uma solução a 200µg do DMBA no mesmo solvente. Os animais foram sacrificados após 72 horas e a análise da reação foi realizada conforme o procedimento anterior.

3.11 Tipagem do genótipo *Ahr* (*aryl hydrocarbon receptor*)

Para identificação do polimorfismo do gene *Ahr* nas linhagens dos camundongos AIRmax e AIRmin utilizamos a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Um fragmento de 218 pb contendo o local da mutação no exon 7 do gene foi amplificado a partir de 100 ng de DNA genômico com os *primers*: OL72 (GGT TCG AAT TTC CAG GAT GG) e OL 111 (CCA CCC CAG GTA CAT GAT GGA ACC), descritos por Schmidt, 1996. Os produtos do PCR (24 µl) foram submetidos à digestão com a enzima *Eco*-47III (5 U/µl) a 37° C por 3 horas. Ao produto da digestão acrescentou-se 8µl do corante Azul de Bromo Fenol (BPB) preparado com 50% de glicerol, 100mM de EDTA, 1% de SDS e 0,1 g de BPB. Desta mistura 12 µl foram submetidos à eletroforese horizontal de agarose a 4%, aplicando uma corrente constante de 120 v durante 2 horas. As amostras foram reveladas pelo brometo de Etídio incorporado ao gel (1,5µg/ml) pela incidência de luz U.V.

3.12 Análise de polimorfismo de regiões microssatélites de DNA

O método para identificação do polimorfismo nos 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 vários pares de *primers* de microssatélites sintetizados pela Gibco BRL.

Para as reações de amplificação foram usados 100 ng de DNA genômico, em uma mistura de tampão específico para PCR 1x concentrado; dNTP, 250 µM (Gibco BRL); MgCl₂ 1,5 mM (Gibco BRL); 2 mM de cada um dos *primers* (Forward e Reverse, Gibco BRL); 1U de Taq DNA polimerase (Gibco BRL) em um volume final de 25 µl com H₂O deionizada estéril.

As preparações foram submetidas às seguintes temperaturas: 94 °C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 57 °C por 35 segundos e 72 °C por 45 segundos cada ciclo e finalmente 2 minutos a 72 °C, nos aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200. Foram analisados os seguintes microssatélites para o cromossomo 9: CYP1A1 (microssatélite dentro do gene) e D9Mit248 (**Tabela 2**).

Tabela 2: Marcador tipo microssatélite de CYP1A1 e D9Mit248.

Microssatélite	Seqüência de <i>Primers</i>	Temperatura de anelamento
CYP1A1	5' AGCTACTGAATGGAGGAGCC 3'	60 °C
	5' TCTGTAATAGGCATTTGATGCC 3'	
D9Mit248	5' TCAGAGTTCAGGAGGGCTGT 3'	55 °C
	5 TCTGAGAGGCCACATGTCTG 3'	

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese vertical em gel de poli(acrilamida em aparelho Hoefer SE 600 (Amersham Biociences, refrigerado com água corrente), aplicando uma corrente elétrica de 40mA. Ao produto da PCR (24 µl), acrescentou-se 12 µl de corante SLP composto de 40% sacarose; 0,25 % de Azul de Bromo Fenol (BPB) 0,25 % de Xileno Cyanole; 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 10mM. Na preparação do gel utilizamos acrilamida / bis-acrilamida 37,5: 1 da BioRad, (8 ou 12,5 %) e Tampão TBE 10mM, sendo polimerizado com o catalizador Persulfato de Amônia (APS a 20 %), 1,8 µl/ml da solução de acrilamida, e o polimerizador TEMED, 0,75µl/ml da solução de acrilamida. O tempo da corrida variou em função do tamanho dos fragmentos amplificados (tempo médio de 4 horas). A migração foi acompanhada pela visualização da migração dos

corantes Azul de Bromo Fenol, correspondendo a 70 pares de base, 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 + 0,5% de Acido acético); seguiu-se então 10 minutos de imersão na solução de coloração (0,1% Nitrato de Prata), e após um rápido enxágüe com água destilada, Imersão, durante 10 minutos, na solução reveladora (1,5% de NaOH + 0,07% de formaldeído).

3.13 Análise estatística

O teste exato de Fisher foi aplicado para as análises comparativas entre incidência dos tumores e de reações de dermatite de contato nos diferentes grupos experimentais.

Teste não paramétrico de Mann-Whitney para as diferenças entre os grupos nos parâmetros de desenvolvimento tumoral (N e NV) e na intensidade das reações de dermatite de contato alérgica.

A significância do desequilíbrio de frequência dos marcadores alélicos nas linhagens AIRmax e AIRmin é calculada pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

Os níveis de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Carcinogênese induzida por PAHs

Os animais AIRmax e AIRmin foram tratados com 2 carcinógenos do tipo PAH, por diferentes vias e esquemas de administração.

O aparecimento de tumores no local da inoculação foi acompanhado em períodos regulares e em tempos tardios foi analisado o desenvolvimento de tumores em órgãos internos, em especial nos pulmões.

O objetivo destes experimentos foi o de confirmar a diferente susceptibilidade de animais selecionados em desenvolver tumores de pele e de pulmão, quando submetidos a outros protocolos de tratamentos ou de carcinógenos de diferentes composições.

4.1.1 Carcinogênese pelo metilcolantreno (3-MC)

A indução de sarcomas por 3-MC se dá por injeção intramuscular. 31 animais AIRmax e 30 AIRmin foram tratados com 0,3 mg de 3-MC suspenso em 0,1 ml de óleo de sésamo no músculo da perna posterior.

A incidência de 50% de animais com tumor local, com diâmetro igual ou superior a 0,5 cm ocorreu na 19^a e na 23^a semanas após o tratamento, nos AIRmin e AIRmax, respectivamente. Não obstante, durante o período de observação de 45 semanas, cerca de 90% de todos os camundongos desenvolveram fibrossarcomas, caracterizados histologicamente (**Figuras 3 e 4**).

Um grupo controle (3 machos e 3 fêmeas) de cada linhagem recebeu apenas uma injeção intramuscular no membro posterior esquerdo de 0,1 ml de óleo de sésamo (Sigma-Aldrich) que é o diluente utilizado na aplicação do 3-MC. Não houve o aparecimento de lesões locais por este tratamento.

Figura 3: Fotomicrografia do corte histológico do sarcoma no músculo de camundongo AIRmin. Tumor no local da aplicação de 0,3 mg de 3-MC diluído em óleo sésamo (aumento de 100 X).

Figura 4: Incidência de sarcomas induzidos pelo 3-MC.

Animais AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho) receberam uma injeção intramuscular no membro posterior esquerdo de 0,3 mg de 3-MC suspensos em 0,1 ml de óleo sésamo e foram observados durante 45 semanas após a aplicação do carcinógeno.

No momento do sacrifício foram encontrados múltiplos adenomas pulmonares e grandes adenocarcinomas somente nos camundongos AIRmin tratados com 3-MC (**Figura 5**). Este resultado confirma a maior susceptibilidade dos AIRmin em desenvolver câncer pulmonar quando comparados aos animais AIRmax (RIBEIRO *et al*, 2005) (**Tabela 3 e Figura 5**).

Figura 5: Fotomicrografia do corte histológico de um adenocarcinoma pulmonar induzido por 3-MC em camundongo AIRmin. Os animais receberam injeção intramuscular no membro posterior esquerdo de 0,3 mg de 3-MC suspensos em 0,1 ml de óleo sésamo e necropsiados após 11 meses do início do tratamento. Aumento de 100 X.

Tabela 3: Análise do aparecimento de adenomas e adenocarcinomas pulmonares em camundongos AIRmax e AIRmin tratados com 3-MC.

Camundongos	Adenomas				Adenocarcinomas		
	Tratamento	Incidência (%)	N	NV (mm ³)	Incidência (%)	N	NV (mm ³)
AIRmax	3-MC + Óleo	17,2 % (5/29)*	14	14,6	3,5 % (1/29)	1	14
	Óleo	0 % (0/6)	0	0	0 % (0/6)	0	0
AIRmin	3-MC + Óleo	61,5 % (16/26) *	107	122	19,2 % (5/26)	5	90
	Óleo	50 % (3/6)	4	2,1	0 % (0/6)	0	0

Os animais receberam uma injeção intramuscular no membro posterior esquerdo de 0,3 mg de 3-MC suspensos em 0,1 ml de óleo sésamo ou apenas 0,1 ml do veículo. Foram analisados incidência = (%) de animais positivos; a multiplicidade de tumores = N (soma do número de tumores no total dos animais positivos) e o volume total de tumores = N V (soma do volume de tumores onde $V = 4/3\pi R^3$ em mm³) às 45 semanas após o tratamento.

2 animais AIRmax e 4 AIRmin morreram no decorrer do tratamento e não foram necropsiados.

* Diferença AIRmax x AIRmin: teste exato de Fisher $p < 0,001$.

4.1.2 Carcinogênese pelo DMBA

O DMBA é um protótipo de PAH que em várias espécies animais tem efeitos carcinogênicos e imunossupressores (BURCHIEL *et al.*, 1988, 1990; BUTERS *et al.*, 1999, 2003; SHIMADA e FUJII-KURIYAMA, 2004; THURMOND *et al.*, 1987). Devido a propriedades de fotólise e foto-oxidação este PAH não existe naturalmente no meio

ambiente. Entretanto, estudos prévios com objetivo de entender os mecanismos de toxicidade imunológica causados pelo DMBA vêm fornecendo importantes pistas sobre as ações de PAHs dominantes no meio ambiente (GAO *et al.*, 2005).

Em ensaios anteriores, os animais AIRmax foram resistentes e os AIRmin, sensíveis quando submetidos ao protocolo clássico de carcinogênese de pele em dois estágios que se dá pela administração epicutânea do carcinógeno DMBA seguida por doses repetidas de TPA como agente promotor (BIOZZI *et al.*, 1998).

Com o objetivo de se investigar a ação iniciadora e promotora da progressão tumoral do DMBA em camundongos, empregamos o protocolo descrito por LI *et al.* (2002), no qual se aplicam 5 doses epicutâneas consecutivas deste agente. De acordo com os autores, este esquema de tratamento induz o desenvolvimento de carcinomas espinocelulares, em maior número e em um tempo mais curto, do que quando se aplica o TPA como promotor, que por sua vez induz o aparecimento de um maior número de lesões benignas. Foi, portanto, interessante verificar o comportamento das linhagens frente a este protocolo mais agressivo e assim melhor avaliar a contribuição da resposta inflamatória aguda no controle da evolução de tumores malignos (CASALE *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2002).

Os camundongos (15 de cada linhagem) receberam por cinco dias consecutivos, aplicações epicutâneas dorsais de 50 µg de 7,12-dimetil benzoantraceno (DMBA) dissolvidos em 0,1 ml de acetona.

Observamos inicialmente que todos os camundongos AIRmin desenvolveram uma acentuada reação na pele, parecida com uma dermatite de contato alérgica, a partir do 7º dia após a última exposição ao DMBA, enquanto que não houve alteração na pele dos animais AIRmax (**Figura 6**). Esta reação poderia ser devida aos efeitos tóxicos diretos da droga ou a uma reação alérgica específica. Ocorreu regressão gradual da lesão até a completa cicatrização aos 20 dias após o tratamento. Os animais foram observados semanalmente por mais 250 dias para o acompanhamento do aparecimento de lesões cutâneas papilomatosas e carcinomas (**Figura 7**).

Figura 6: Aspectos da pele de animais AIRmax (A) e AIRmin (B), 8 dias após a aplicação por cinco dias consecutivos de doses epicutâneas dorsais de 50 μ g de DMBA dissolvidos em 0,1 ml de acetona.

Figura 7: Multiplicidade de lesões papilomatosas de pele induzidas pelo DMBA. Animais AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho) foram tratados por 5 dias consecutivos com 50 µg de DMBA dissolvidos em 0,1 ml de acetona no dorso. O número de tumores foi observado até 250 dias após o final do tratamento.

Os camundongos AIRmin mostraram-se mais susceptíveis que os AIRmax à indução de tumores de pele por repetidas aplicações epicutâneas de DMBA, mesmo na ausência do promotor. Múltiplos papilomas benignos apareceram nos tempos iniciais e carcinomas espinocelulares se desenvolveram nos animais AIRmin já a partir de 70 dias, enquanto os AIRmax mostraram-se resistentes. A partir de 200 dias apareceram algumas lesões papilomatosas nos AIRmax, enquanto neste tempo, as lesões já haviam progredido para carcinomas nos AIRmin.

Após 250 dias de tratamento os animais foram sacrificados e submetidos a necropsia. Constatamos o aparecimento de múltiplos tumores pulmonares (adenomas e adenocarcinomas) em 93% dos camundongos AIRmin. Por outro lado, também sob este protocolo, os AIRmax foram mais resistentes, e apenas 1 camundongo em 13 apresentou 2 lesões, sendo um pequeno adenoma e um adenocarcinoma no pulmão (**Tabela 4**).

Tabela 4: Análise do aparecimento de adenomas e adenocarcinomas pulmonares em camundongos AIRmax e AIRmin tratados com DMBA.

Camundongos	Adenomas			Adenocarcinomas		
	Incidência (%)	N	NV (mm ³)	Incidência (%)	N	NV (mm ³)

AIRmax	7,7 (1/13) *	1	4	7,7 (1/13)	1	14
AIRmin	92,9 (13/14) *	32	112	42,9 (6/14)	12	690

Os camundongos AIRmax e AIRmin receberam doses epicutâneas dorsais de 50 ug de 7,12-dimetil benzoantraceno (DMBA) dissolvidos em 0,1 ml de acetona por 5 dias consecutivos e 260 dias após o tratamento foram analisados incidência = (%) de animais positivos; a multiplicidade de tumores = N (somatória do número de tumores no total dos animais positivos) e o volume total de tumores = N V (somatória do volume de tumores onde $V = 4/3\pi R^3$ em mm^3).

* diferença AIRmax x AIRmin: teste exato de Fisher $p < 0,0001$.

Na **Figura 8 (A e B)** mostramos um adenoma pulmonar de camundongo AIRmax onde as células inflamatórias estão infiltradas no adenoma. Nas **figuras 8 C e D** apresentamos um adenocarcinoma pulmonar de animal AIRmin com infiltrado inflamatório envolvendo as células tumorais.

Figura 8: Fotomicrografia de cortes histológicos de pulmão de áreas com tumores pulmonares de camundongos AIRmax e AIRmin induzidos por DMBA. Os animais foram tratados por 5 dias consecutivos com aplicações epicutâneas dorsais de 50 µg de DMBA dissolvidos em 0,1 ml de acetona e foram sacrificados aos 260 dias do tratamento.

- A: adenoma em pulmão de AIRmax (aumento de 100 x);
- B: focos inflamatórios intralesionais (indicado pela seta) em animal AIRmax (aumento de 400 x);
- C: adenocarcinoma em pulmão de AIRmin (aumento de 100X);
- D: infiltrado inflamatório na periferia das células tumorais, mas não na lesão (indicado pela seta) em camundongo AIRmin (aumento de 400 x).

Como já referido, durante a fase inicial do tratamento com as 5 doses consecutivas de DMBA, observamos o aparecimento de lesões na pele, semelhantes a uma dermatite de contato que foi muito mais intensa e duradoura nos animais AIRmin em comparação com os AIRmax (**Figura 6**). Um grupo de animais (2 de cada linhagem) foi então tratado com DMBA e sacrificado 48 horas após a última das 5 aplicações do carcinógeno para a análise histológica da pele; nos animais controle, aplicamos acetona durante 5 dias e em outro grupo aplicamos doses consecutivas de TPA para comparação do efeito de um promotor que é usualmente empregado em protocolos de carcinogênese cutânea.

Os resultados estão apresentados na **figuras 9 A, B e C**. Observamos um infiltrado moderado predominante de leucócitos polimorfonucleares na pele de animais AIRmax tratados com 5 doses de DMBA (**Figura 9 B1**), enquanto nos AIRmin, ocorre um intenso infiltrado com células mononucleares e polimorfonucleares (**Figura 9 B2**). O tratamento com TPA induziu um quadro inflamatório mais intenso na pele dos animais AIRmax.

Figura 9A: Fotomicrografia de cortes histológicos da pele de animal AIRmax (1) e AIRmin (2) controle.

Os animais receberam o tratamento de 5 cinco dias consecutivos de doses epicutâneas dorsais de 0,1 ml de acetona e foram sacrificados 48 horas depois.

1: AIRmax : Pele normal, ausência de processo inflamatório, preservação de anexos, epiderme hipoderme normais, sem espessamento (Aumento de 100 X);

2: AIRmin: Tecido normal, ausência de processo inflamatório e com todos os componentes da pele normais (aumento de 40X).

Figura 9B: Fotomicrografia de cortes histológicos da pele de animal AIRmax (1) e AIRmin (2) após tratamento com DMBA.

Os camundongos receberam por 5 dias consecutivos doses epicutâneas dorsais de 50 µg de DMBA dissolvidos em 0,1 ml de acetona e 48 horas após o tratamento foram sacrificados.

1: AIRmax: Área com discreta hiperplasia da epiderme, discreto infiltrado de endoderme para epiderme, resposta mais perivascular, predomínio de leucócitos polimorfonucleares (Aumento de 100 X).

2: AIRmin: Área com hiperplasia da derme e com intenso infiltrado misto com predominância de polimorfonucleares (Aumento de 100 X).

Figura 9C: Fotomicrografia de cortes histológicos da pele de animal AIRmax (1) e AIRmin (2) após tratamento com TPA.

Os camundongos receberam por 5 dias consecutivos doses epicutâneas dorsais de 5 µg de TPA dissolvidos em 0,1 ml de acetona e 48 horas após o tratamento foram sacrificados.

1: AIRmax: pele com hiperplasia mais acentuada, espongiose acentuada, hipergranulose e ortoqueratose (seta) (Aumento de 100 X).

2: AIRmin: Evidente hiperplasia difusa da epiderme, acantose e ortoqueratose (seta), espongiose multifocal, discreta fibrose, fibrose superficial, infiltrado discreto mais evidente alteração de epiderme, padrão mononuclear (Aumento de 100 X).

As alterações histopatológicas cutâneas observadas nos AIRmin após o tratamento com DMBA estariam relacionadas com as particularidades desta linhagem em desenvolver a reação cutânea inicial.

Está descrito na literatura que a ocorrência de reação específica de dermatite de contato ao DMBA estaria associada ao grau de susceptibilidade à carcinogênese. Casale e colaboradores (2000) avaliaram camundongos susceptíveis que receberam DMBA na pele, e estes apresentaram um aumento na produção de IFN gama e IL-2 nos gânglios drenantes, e também maior expressão de IL-1 beta, IL-10, TNF alfa e IL-4 na pele após o tratamento. Este perfil de citocinas é semelhante ao perfil das reações convencionais que ocorrem na dermatite de contato, como as induzidas pelo 2, 4-dinitrofluorobenzeno (DNFB).

Assim, decidimos analisar a capacidade dos animais AIRmax e AIRmin de produzir reação de dermatite de contato ao DMBA, comparativamente ao protocolo clássico de indução de reação ao DNFB.

4.2 Dermatite de Contato ao DNFB e ao DMBA

A dermatite de contato é uma inflamação na pele causada pelo contato e exposição repetida a algum fator ambiental, usualmente uma substância química, que pode ter uma base imunológica (KRASTEVA *et al.*, 1999a, b).

As mesmas vias enzimáticas que são necessárias para as atividades mutagênicas e carcinogênicas dos PAHs, como o DMBA, também devem estar completamente funcionais para que ocorra a sensibilização por contato. Por exemplo, a inibição farmacológica do

metabolismo enzima-dependente do citocromo P450 bloqueia a resposta de dermatite de contato ao DMBA. Por outro lado, o sensibilizante de contato DNFB é um hapteno que não requer conversão dependente da enzima P450 (ANDERSON *et al.*, 1995).

Vários experimentos foram realizados com diferentes doses de sensibilização e diferentes tempos após o desafio, para determinarmos as melhores condições de reação ao DNFB ou ao DMBA, seguindo o protocolo descrito por Anderson e seus colaboradores, 1995.

Resumindo, os animais receberam as doses epicutâneas sensibilizantes de DNFB ou de DMBA dissolvidas em veículos apropriados no abdômen e as reações foram desencadeadas 5 dias após pela aplicação dos mesmos antígenos na orelha (detalhe na **Tabela 5**). As reações foram avaliadas pela variação no peso de fragmentos de orelha tratada em relação ao controle.

Os camundongos AIRmax de ambos os sexos produziram uma reação intensa específica ao DNFB. Por outro lado, os machos AIRmin não reagiram ou produziram reações fracas, sendo significantes as diferenças com as fêmeas da mesma linhagem ou com os AIRmax. Nos animais controle, apenas desafiados, não houve variação de peso das orelhas ou sinais de irrigação (**Tabela 5**).

Por outro lado, observamos que 85% (11/13) dos animais AIRmin produziram reações positivas ao DMBA com aumento significativo (>10%) do peso da orelha e sinais evidentes de aumento de irrigação sangüínea, enquanto que apenas 25% (3 em 12) dos animais AIRmax produziram reações. Não houve diferença significativa na reação ao DMBA entre machos e fêmeas AIRmin (**Tabela 5 e Figura 10**).

A baixa resposta dos AIRmax ao DMBA neste protocolo está em concordância com a ausência de reação de dermatite observada anteriormente após as 5 aplicações de DMBA. Por outro lado, estes animais são capazes de produzir reações intensas específicas ao DNFB, situação em que não é necessária a metabolização do agente irritante.

Tabela 5: Reações de dermatite de contato ao DNFB e ao DMBA nas linhagens AIRmax e AIRmin.

	DNFB ¹			DMBA ²		
	Positivo/total	Média	P	Positivo/total	Média	P
		%aumento±dp [@]			%aumento±dp [@]	
AIRmax						

♂	6/6	88,5±26,1 (ep=10,7)*	*<0,001	2/6	16,2±25,83 (ep=10,5)	
♀	6/6	77,9±15,9 (ep=6,5)		1/6	8,6±20,98 (ep=8,6)	
♂+♀	12/12#	83,15±21,82 (ep = 6,3)	#0,04	3/12#	12,4±22,8* (ep=6,6)	*0,01 #0,0048
AIRmin						
♂	2/6	17,6±5,5 (ep=2,2)*		6/6	45,0± 26,22 (ep=10,7)	
♀	5/6	79,0±42,7 (ep=17,4)		5/7	21,2± 13,02 (ep=4,9)	
♂+♀	7/12#	48,3±45,03 (ep=13,0)		11/13#	32,2±22,9 (ep=6,4)	

¹Foram aplicados no abdômen dos animais 25µl de DNFB 0,5% diluído em acetona/ óleo de oliva e 5 dias após a reação foi desencadeada pela aplicação de 10 µl de uma solução de DNFB a 0,2% na orelha.

²Foram aplicados no abdômen dos animais 150 µl de uma solução DMBA a 100µg dissolvido em acetona mais DMSO. Após 5 dias, a orelha esquerda de cada animal recebeu 30 µl de uma solução a 200µg do DMBA no mesmo solvente. Os animais foram sacrificados após 72 horas e a análise da reação foi realizada conforme o procedimento anterior.

@ % de aumento de peso da orelha reação em comparação com a orelha controle. Diferenças entre AIRmax e AIRmin # (Teste exato de Fisher) * (Teste não paramétrico de MannWhitney).

Figura 10: Fotomicrografia de cortes histológicos da pele de reações induzidas pelo DMBA e pelo DNFB na orelha em animais AIRmax e AIRmin.

Os animais foram sensibilizados com DMBA ou DNFB no abdômen e 5 dias depois foram desafiados. 48 horas após o desafio os animais foram sacrificados e as orelhas foram analisadas. Os animais sensíveis ao DNFB (AIRmax) e ao DMBA (AIRmin) apresentaram hiperplasia da epiderme, edema da derme e um infiltrado inflamatório perivascular (aumentos de 10 X).

4.3 Estudo da reação ao DMBA na pele

Retornando ao protocolo inicial, avaliamos por técnica de RT-PCR em tempo real a quantidade de RNA mensageiro de algumas citocinas, de 2 enzimas do citocromo P450 que metabolizam o DMBA na dependência da ligação com o AHR e de receptores CD4 e CD8 de linfócitos T, na pele de animais AIRmax e AIRmin 48 horas após o último dia de tratamento repetido com DMBA. Os resultados foram comparados aos de animais tratados com o agente promotor (TPA), com o veículo (acetona) ou não tratados (LI *et al.*, 2002).

A normalização para um gene constitutivo é comumente o método mais aceitável para a correção de pequenas variações, devido à diferença na quantidade do RNA total. Um gene constitutivo ideal deve ser expresso 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).

Utilizamos como gene constitutivo o HMBS (*hydroxymethylbilane synthase*), e obtivemos bons resultados em nossos experimentos. Na **figura 11** mostramos os gráficos de amplificação do HMBS das amostras experimentais e controle bem como as respectivas curvas de *Melting*. Podemos observar que nas varias preparações que inclui animais controle e tratados não houve variação importante no C_t indicando a boa qualidade dos RNA. As curvas de *Melting*, em que as amostras apresentaram um único pico de dissociação, evidenciam que todas as duplas fitas do material analisado separam-se na mesma temperatura, indicando a amplificação de uma banda específica, de mesmo tamanho.

Para comparação e ilustração, apresentamos na **figura 12** a análise da expressão da IL-6 nas mesmas amostras, onde observamos variação importante nos C_t e a mesma temperatura de *Melting* para todas as amostras.

Nestes experimentos foram analisados 2 ♂ e 2 ♀ de cada linhagem sem tratamento ou recebendo 5 aplicações de acetona, representando os grupos controles. Nos grupos experimentais que receberam as 5 doses de DMBA ou de TPA foram utilizados 3 ♂ e 5 ♀ de cada linhagem.

Figura 11: Expressão por RT-PCR em Tempo Real do HMBS na pele animais AIRmax e AIRmin controle e estimulados com DMBA. Os gráficos mostram *Cycle Threshold* (C_t) (A) e as curvas de *Melting* (B) onde o pico de dissociação do branco da reação (sem inclusão de cDNA) é diferente das demais amostras. Os animais foram tratados com 5 doses de 50 μ g de DMBA dissolvidos em 0,1 ml de acetona (LI *et al.*, 2002). A análise foi feita 48 horas após o final do tratamento. Ensaio realizado no Chromo 4 (MJ Research) utilizando Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen).

Figura 12: Quantificação da expressão de IL-6 por RT-PCR em Tempo Real na pele dos animais AIRmax e AIRmin estimulados com DMBA. Os gráficos mostram *Cycle Threshold* (C_T) (A) e as curvas de *Melting* (B) onde o pico de dissociação do branco da reação (sem inclusão de cDNA) é diferente das demais amostras. Os animais receberam 5 doses de 50 µg de DMBA dissolvidos em 0,1 ml de acetona (LI *et al.*, 2002). A análise destes foi feita 48 horas após o final do tratamento. Ensaio realizado no Chromo 4 (MJ Research) utilizando Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen).
→AIRmax; →AIRmin.

Todos os resultados referem-se a reações realizadas em duplicata e os valores apresentados são a média das duas determinações. Foi feita a média e desvio padrão das amostras individuais em cada grupo para análise das significâncias das diferenças de expressão dos genes entre as linhagens de camundongos quanto ao tratamento (**Tabela 7**).

4.3.1 Avaliação da Expressão de Citocinas por RT-PCR em Tempo Real

Os níveis de expressão de diferentes citocinas foram determinados pela comparação entre os grupos tratados com DMBA ou com TPA e os controles, às 48h após o final do tratamento. A aplicação repetida de acetona não provocou alterações significativas na expressão das citocinas analisadas em comparação com a pele normal. O grupo de animais tratados com acetona foi usado como controle para os grupos tratados com DMBA ou TPA. Os resultados estão apresentados na **tabela 6** e **figura 13**.

Tabela 6: Avaliação das variações dos níveis de expressão de RNAm de citocinas e enzimas do citocromo P450 e por técnica de qPCR na pele de animais AIRmax e AIRmin após tratamento com DMBA ou TPA.

Primers	Linhagem	Acetona* $\log_2 2^{-\Delta\Delta C_T}$	DMBA** $\log_2 2^{-\Delta\Delta C_T}$	<i>p</i>	TPA** $\log_2 2^{-\Delta\Delta C_T}$	<i>p</i>
IL-6	AIRmax	-0,71 ± 1,31	1,05 ± 1,77	<0,0001	1,27 ± 1,82	n.s.
	AIRmin	-0,44 ± 1,27	5,05 ± 1,00		1,43 ± 2,77	
TNF-α	AIRmax	-0,07 ± 0,46	-0,02 ± 1,22	0,0009	1,14 ± 1,50	n.s.
	AIRmin	0,36 ± 0,98	2,07 ± 0,70		1,96 ± 2,47	
IL-10	AIRmax	-0,12 ± 2,37	1,50 ± 3,55	n.s.	0,49 ± 1,97	n.s.
	AIRmin	0,56 ± 1,58	3,32 ± 0,94		0,58 ± 2,08	
IFN-γ	AIRmax	0,83 ± 2,63	1,04 ± 2,53	n.s.	1,12 ± 2,82	n.s.
	AIRmin	0,03 ± 0,76	2,27 ± 0,80		0,28 ± 3,89	
IL-1 α	AIRmax	0,69 ± 1,08	-1,15 ± 3,57	n.s.	1,13 ± 0,88	n.s.
	AIRmin	-0,77 ± 0,53	-1,05 ± 2,54		1,88 ± 2,64	
IL-1-β	AIRmax	-1,43 ± 2,29	0,84 ± 2,29	0,0002	4,01 ± 2,66	n.s.
	AIRmin	0,80 ± 0,92	5,16 ± 0,69		5,36 ± 3,91	
TGF-β 1	AIRmax	0,13 ± 0,77	-0,84 ± 1,38	<0,0001	0,60 ± 1,09	n.s.
	AIRmin	0,53 ± 0,57	2,08 ± 0,49		0,27 ± 1,09	
IL-18	AIRmax	-0,78 ± 2,48	0,62 ± 1,59	n.s.	0,46 ± 0,68	n.s.
	AIRmin	0,92 ± 0,38	0,37 ± 0,64		-0,10 ± 1,01	
CYP1A1	AIRmax	-0,29 ± 2,68	-1,13 ± 1,85	n.s.	0,48 ± 1,91	n.s.
	AIRmin	-0,01 ± 0,74	-0,85 ± 0,54		0,21 ± 1,74	
CYP1B1	AIRmax	0,11 ± 0,69	-0,49 ± 1,41	0,0012	-0,18 ± 0,82	n.s.
	AIRmin	0,97 ± 1,45	1,78 ± 0,72		0,12 ± 1,03	

*: Variação em relação à pele normal.

** : Variação em relação ao grupo tratado com acetona.

n.s.: Diferença AIRmax e AIRmin não significativa.

Resultados: média ± dp (dp é o desvio padrão).

Figura 13 Análise da expressão de RNAm para citocinas em amostras de pele de animais AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho) 48 horas após o tratamento por 5 dias consecutivos com 50 µg de DMBA dissolvido em 0,1 ml de acetona no dorso em comparação com animais tratados com 5 aplicações de 0,1 ml de acetona.

* $\log_2 2^{-\Delta\Delta C_T}$: diferença AIRmax X AIRmin significativa quando $p < 0,05$.

Resultados: média $\pm$ erro padrão (e.p.) da média = $dp/\sqrt{N}$, onde N é o número de camundongos testados e dp é o desvio padrão.

Os resultados mostram que 48 horas após a exposição ao carcinógeno os animais AIRmin expressaram quantidades significativamente maiores de RNAm para as citocinas IL-1 β, IL-6, TNF-α e TGF-β-1 que os AIRmax, resultados que são coerentes com a maior susceptibilidade dos AIRmin em desenvolver as reações alérgicas ao DMBA e posteriormente os tumores de pele. No mesmo material, não encontramos diferenças na expressão de IL-10, IFN-γ entre as linhagens e não foi verificada a estimulação da expressão dos genes da IL-1α e da IL-18 (**Tabela 6 e Figura 13**).

Na pele tratada com o agente promotor TPA, sabidamente inflamatório para ambas as linhagens e que não requer a metabolização para exercer seu efeito, com exceção da IL-

1 β , não houve modulação significativa da expressão de nenhum dos genes estudados, não sendo observadas diferenças interlinhagens (**Tabela 6**).

4.3.2 Análise da Expressão de CD4 e CD8 por RT-PCR em Tempo Real

Estudos clínicos e em animais experimentais já demonstraram o papel das células T CD4⁺ e CD8⁺ na resposta de hipersensibilidade de contacto (KRASTEVA *et al.*, 1999; CAVANI *et al.*, 2001; GRABBE *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2001), os estudos vem indicando que: 1) as células Tc1 CD8⁺ são células efetoras na resposta de hipersensibilidade de contacto em camundongos (XU *et al.*, 1997; BOUR *et al.*, 1995; CAVANI *et al.*, 2001; KEHREN *et al.*, 1999; MARTIN *et al.*, 2000); e em humanos (CAVANI *et al.*, 2001; CAVANI *et al.*, 1998) e que 2) as células Th2/Treg CD4⁺ regulam a magnitude da resposta de hipersensibilidade de contacto (XU *et al.*, 1997; BOUR *et al.*, 1995; CAVANI *et al.*, 2001; DESVIGNES *et al.*, 1998; LOPEZ *et al.*, 1998; GORBACHEV *et al.*, 2001; CAVANI *et al.*, 2000; AKIBA *et al.*, 2002).

Analizamos a expressão dos receptores CD4 e CD8 em 4 animais de cada linhagem (2 ♂ e 2 ♀) e observamos maior expressão do receptor CD4 e também de CD8 na pele de animais da linhagem AIRmin tratados com DMBA do que nos AIRmax (**Figura 14**), o que deve refletir a magnitude do influxo destas células ao local. Esta diferença em CD4 e CD8, que ocorreu 48 após o fim do tratamento, é uma resposta carcinógeno-específica uma vez que aconteceu apenas na presença do carcinógeno e não do veículo e nem do agente promotor (não mostrado).

Figura 14: Análise da expressão de RNAm para CD8 e CD4 em amostras de pele de animais AIRmax e AIRmin 48 horas após o tratamento por 5 dias consecutivos com 50 µg de DMBA dissolvido em 0,1 ml de acetona no dorso em comparação com 0,1 ml de acetona no dorso.

4.3.3 Detecção da Expressão de CYP1A1 e CYP1B1 por RT-PCR em Tempo Real.

Muitos dos carcinógenos químicos que estão no ambiente são quimicamente inertes e requerem uma ativação metabólica preliminar pelas enzimas do Citocromo P450 para torná-los metabólicos mais reativos e assim se tornarem capazes de atividade carcinogênica em animais experimentais e em humanos (CONNEY *et al.*, 1991; GUENGERICH e SHIMADA, 1991). O Citocromo P450 é um conjunto altamente diversificado (1.500 seqüências conhecidas) de peptídeos e são freqüentemente chamados de hidroxilases que podem executar amplo espectro de reações.

Discute-se o papel executado por CYP1A1 e CYP1B1 como os responsáveis pela ativação de PAHs para intermediários epóxidos, que são posteriormente convertidos em diol-epóxidos mais reativos com o auxílio da epóxido hidrolase EPHX1 (*microsomal epoxide hydrolase*, hidrolase epóxida microssômica) (CONNEY *et al.*, 1982; SHIMADA *et al.*, 1996). (GONZALEZ, 2001). O metabólito DMBA-3,4-diol-1,2-epóxido (DMBA-DE) é considerado o carcinógeno definitivo que se liga ao DNA e produz toxicidade (GONZALEZ, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 1992) (GAO *et al.*, 2005).

Na epiderme de camundongos, a P4501A1 tem uma expressão constitutiva baixa, entretanto, pode ser induzida de maneira significativa por meio de agonistas de AHR neste tecido (SHIMIZU *et al.*, 2000; MARSTON *et al.*, 2001).

Analisamos por este motivo a expressão de RNAm destas duas enzimas na pele de animais AIRmax e AIRmin normais ou tratados com DMBA ou TPA. Como o observado para algumas citocinas, ocorreu aumento da expressão de CYP1B1 apenas na pele de animais AIRmin tratados com DMBA(Figura 15). Não houve alteração na expressão da enzima pelo tratamento com TPA (que não é metabolizado por esta via) ou acetona (Tabela 6).

Figura 15: Análise da expressão de RNAm para enzimas do citocromo P450 em amostras de pele de animais AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho) 48 horas após o tratamento por 5 dias consecutivos com 0,1 ml de DMBA em acetona no dorso em comparação com amostras de pele normal.

* $\log_2 2^{-\Delta\Delta C_T}$: diferença AIRmax X AIRmin significativa quando $p < 0,05$.

Resultados: média ± erro padrão (e.p.) da média = $dp/\sqrt{N}$, onde N é o número de camundongos testados e dp é o desvio padrão.

4.4 Pesquisa de polimorfismo em gene candidato

Como já referido, o processo de metabolização do DMBA e de outros PAHs se inicia pela sua ligação ao receptor de aril hidrocarbonetos (AHR) que é um fator de transcrição ativado por ligante e que regula a expressão de várias enzimas metabolizantes,

que os transformam em produtos tóxicos. 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 hidrocarbon receptor*) que o codifica. Estes alelos são definidos por variações nos exons 7 e 9. Todas as linhagens de camundongos que expressam o alelo *Ahr^d* (o alelo que está associado a um receptor de baixa afinidade e com uma deficiência na capacidade de metabolizar PAHs) falham em desenvolver a dermatite por contato ao DMBA e são mais resistentes à carcinogênese por este composto (ELMETS *et al.*, 1998).

A análise molecular do gene *Ahr* é, portanto uma etapa essencial em nosso estudo para entender a diferenciação das linhagens nos processos de carcinogênese e os mecanismos que estão envolvidos na toxicidade dos compostos empregados.

O polimorfismo do exon 9 resulta numa troca de aminoácidos alanina por valina na posição 375 do sítio de ligação do receptor, com a conseqüente diminuição de afinidade. O polimorfismo no exon 7 é evidenciado por RFLP, ou seja, a perda do sítio de uma enzima de restrição Eco47III no nucleotídeo 752 (AGCGCT→AGCACT). Camundongos C57BL/6 apresentam o alelo que é digerível pela enzima neste sítio, enquanto os camundongos DBA/2 têm o outro alelo.

O método foi inicialmente padronizado com DNA de camundongos C57BL6/J e DBA2/J provenientes da *Jackson Laboratories* e em seguida analisamos individualmente os DNA genômicos extraídos de fragmentos da cauda de 10 camundongos de cada linhagem (AIRmax e AIRmin).

Conforme mostra a **figura 16** da eletroforese no gel, é evidente a fixação do alelo equivalente ao C57BL6/J, relacionado à alta afinidade do receptor, nos animais AIRmin e do alelo correspondente aos DBA/2 nos AIRmax.

Figura 16: Imagem do gel de eletroforese da análise do polimorfismo do gene *Ahr*.
 Todos os AIRmax apresentam o mesmo alelo dos DBA/2 (resistente à ação da enzima), enquanto todos os AIRmin apresentam o alelo dos camundongos C57BL/6, com o aparecimento de dois fragmentos resultantes da digestão pela enzima de restrição.
 OBS: P= peso molecular Ø X174 RF DNA/*Hae* III Fragments.
 ND= não digerido (sem adição da enzima *Eco47III*)
 D= com a adição da enzima

Na **tabela 7** estão apresentados os genótipos *Ahr* das linhagens isogênicas que constituíram a população inicial F0 do processo de seleção das linhagens AIRmax e AIRmin. Os dados do exon 9 foram obtidos por sequenciamento e fornecidos pelo Dr. Tommaso Dragani do Laboratório de Oncologia Experimental do Istituto Nazionale dei Tumori em Milão, Itália, que é colaborador de nosso laboratório.

Tabela 7: Alelos do gene *Ahr* em linhagens de camundongos isogênicas e de AIRmax e AIRmin.

Linhagem	Polimorfismo no exon 9 A375V	Polimorfismo de nucleotídeo no exon 7 G752A	Alelo <i>Ahr</i>	Fenótipo
C57BL/6J	(Alanina)	Guanina	<i>Ahr^{b1}</i>	Alta afinidade
A/J	(Alanina)	Adenina	<i>Ahr^{b2}</i>	Alta afinidade
BALB/cJ	(Alanina)	Adenina	<i>Ahr^{b2}</i>	Alta afinidade
CBA/J	(Alanina)	Adenina	<i>Ahr^{b2}</i>	Alta afinidade
DBA/2J	(Valina)	Adenina	<i>Ahr^d</i>	Baixa afinidade
SJL/J	(Valina)	Adenina	<i>Ahr^d</i>	Baixa afinidade
SWR/J	(Valina)	Adenina	<i>Ahr^d</i>	Baixa afinidade
P/J		Adenina		
AIRmax	(Valina)	Adenina	<i>Ahr^d</i>	Baixa afinidade
AIRmin	(Alanina)	Guanina	<i>Ahr^{b1}</i>	Alta afinidade

Estas linhagens de camundongos constituíram a população inicial F0 da seleção AIRmax e AIRmin.

Linhagem isogênica P foi genotipada apenas pelo Laboratório de Imunogenética por RFLP para o exon 7.

Estes genótipos indicam que o *Ahr* é um fator genético que contribui para a diferente susceptibilidade das linhagens selecionadas ao câncer induzido pelos PAHs. A fixação alélica diferencial em AIRmax e AIRmin sugere adicionalmente o *Ahr* como um alvo genético possivelmente envolvido no controle da resposta inflamatória. Esta hipótese se baseia no princípio de que, em decorrência do processo de seleção bidirecional das linhagens, os alelos dos genes que condicionam fenótipo de resposta inflamatória máxima ou mínima, segregaram especificamente das 8 linhagens parentais, para as linhagens AIRmax e AIRmin, respectivamente, conduzindo a uma homozigose em *loci* modificadores da AIR, mas mantendo heterogeneidade genética em *loci* não ligados.

4.4.1 Ensaio de *linkage*

A contribuição deste *locus* na regulação da reatividade inflamatória foi então avaliada pelo ensaio de co-segregação ou *linkage* dos genótipos *Ahr*, correspondentes aos parentais AIRmax e AIRmin, com o fenótipo de intensidade da resposta inflamatória aguda ao Biogel, em população heterogênea de segregantes F2 entre as duas linhagens. A população F2 foi produzida a partir de cruzamentos entre F1(AIRmax x AIRmin) X F1(AIRmax x AIRmin) sendo analisado o perfil de resposta inflamatória ao Biogel destes animais (número de leucócitos infiltrados) (**Figura 17**) bem como o genótipo do *locus Ahr*.

Figura 17: Análise da reação inflamatória aguda nos segregantes F2 (AIRmax x AIRmin).

Foram analisados 117 fêmeas e 64 machos F2. A distribuição dos genótipos de *Ahr* na população total aproximou-se de distribuição Mendeliana, com 35 (19,3%) animais homozigotos *Ahr* 752A (aa), 96 (53%) heterozigotos *Ahr* A/G (ab) e 50 (27,6%) homozigotos *Ahr* 752G (bb) (**Tabela 8**).

Observamos que, enquanto os heterozigotos se distribuíram ao longo da curva de resposta inflamatória, existe uma maior frequência de camundongos com genótipo *Ahr* 752A (aa) (dos parentais AIRmax) entre os grupos F2 com resposta inflamatória mais alta e de camundongos *Ahr* 752G (bb) (dos parentais AIRmin) entre os animais com resposta baixa (**Figura 18**).

Figura 18: Distribuição do genótipo *Ahr* em segregantes F2 (AIRmax X AIRmin) de acordo com reatividade inflamatória (aa = homozigoto para baixa afinidade; bb = homozigoto para alta afinidade).

Para comparação, apresentamos na tabela a distribuição dos genótipos na população total, e nos extremos de alta e baixa resposta inflamatória (AIR). Como limites estabelecemos valores de $\log_n$ do número de leucócitos infiltrados maiores ou iguais à média adicionada de 1 desvio padrão ($\geq X+1dp$) para os F2 de alta AIR e valores $\leq X - 1dp$ para os F2 de baixa AIR (**Tabela 8**).

Tabela 8: Genótipo *Ahr* de camundongos F2 entre AIRmax e AIRmin.

População F2	Genótipo <i>Ahr</i>		
	Aa	ab	bb
F2 total	35 (19,3%)	96 (53%)	50 (27,6%)
F2 alta AIR	10 (41,7%)	12 (50%)	2 (8,3%)
F2 baixa AIR	2 (7,7%)	14 (54%)	10 (38,5%)

Entre F2 alta AIR e F2 baixa AIR: $\chi^2 = 10,758$; $p = 0,0046$.

bb = homozigoto para alta afinidade; aa = homozigoto para baixa afinidade e ab = heterozigoto.

Numa outra análise, considerando a população F2 total, observamos que a resposta inflamatória dos camundongos com genótipo *Ahr* 752A foi significativamente maior (>2

vezes) do que a resposta dos camundongos com genótipo *Ahr* 752G (**Tabela 9**). Deve-se ressaltar que a divergência fenotípica total entre as linhagens AIRmax e AIRmin é de ao redor de 20 vezes no número de células infiltradas e resulta do efeito aditivo de cerca de 11 QTL.

Tabela 9. Resposta inflamatória aguda (AIR) ao Biogel de camundongos F2 (AIRmax x AIRmin) de acordo com o genótipo *Ahr*.

População F2	Genótipo <i>Ahr</i> /AIR		
	aa	ab	bb
♂	5,93±0,49 (376) *	5,32±0,90 (204)	4,96±0,89 (143) *
♀	4,67±1,38 (107)	3,96±1,74 (53)	3,91±1,58 (50)
♂ + ♀	5,03±1,32 (153) **	4,64±1,32 (104)	4,41±1,39 (82) **

AIR: log_n (número de células infiltradas x 10⁵/ml) ± d.p.

Diferença entre os grupos *Ahr* aa e *Ahr* bb *p<0,001 e **0,05>p>0,02.

bb = homozigoto para alta afinidade; aa = homozigoto para baixa afinidade e ab = heterozigoto.

A completa segregação dos alelos de baixa e de alta afinidade do receptor no *locus Ahr* em camundongos AIRmax e AIRmin, respectivamente, é coerente ao fenótipo de resistência e susceptibilidade à carcinogênese cutânea e de pulmão induzida por PAHs apresentada pelas linhagens, e indica que o *locus Ahr* é um provável fator genético que contribui para esta diferenciação. Além disso, a demonstração do *linkage* ou co-herança dos genótipos parentais de *Ahr* e do nível de inflamação induzido pelo Biogel na população de segregantes F2 indica que o *locus Ahr*, ou algum gene próximo pode representar um dos QTL selecionados (*loci* reguladores de características quantitativas) que participam da regulação da reatividade inflamatória aguda.

4.4.2 Análise de Polimorfismo do gene *CYP1A1* e do Microssatélite D9Mit 248

Os polimorfismos dos genes de detoxificação que estão relacionados com enzimas de metabolização/ativação de substâncias genotóxicas, parecem estar envolvidos com o desenvolvimento do câncer.

Tem sido descrito em camundongos bem como em humanos a existência de polimorfismo no gene do CYP1A1 que pode estar relacionado à susceptibilidade a cânceres de pulmão provocados por carcinógenos químicos. Além disso, a região cromossômica que contém alguns dos genes da família de enzimas do citocromo P450, no cromossomo 9 foi

envolvida, por ensaios de *linkage* de marcadores polimórficos do tipo microssatélites, na regulação da sensibilidade a efeitos tóxicos de algumas drogas.

Os microssatélites, ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), ou SSLPs (*Simple Sequence Length Polymorphisms*) são seqüências simples de 1- 4 bases repetidas, de localização cromossômica conhecida, amplamente dispersas no genoma, numerosos e altamente polimórficos, ou seja, com número variável de repetições de pares de base entre indivíduos (DIETRICH *et al.*, 1994), permitindo a criação de mapas genéticos bastante detalhados. 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 os alelos do microssatélite.

Analizamos assim um microssatélite situado em uma região intrônica do gene *CYP1A1* e o microssatélite D9Mit248 a 31,0 centiMorgan (cM) no cromossomo 9, região em que se encontra um painel de genes da superfamília do citocromo P-450 (CYPs), dentre os quais o *CYP1A1* e *CYP1A2* (DIETRICH *et al.*, 1994). Como ocorreu no locus *Ahr*, uma diferença altamente significativa no padrão de distribuição alélica de marcadores desta região cromossômica poderia indicar a sua participação na regulação do caráter selecionado, ou seja, da resposta inflamatória (CASLEY *et al.*, 1999; FERNANDEZ-SALGUERO, 1995).

Para caracterização dos alelos de microssatélites, sempre partimos da análise do padrão de migração dos produtos de PCR em DNA genômico das 8 linhagens isogênicas que constituíram a F0 da seleção das linhagens AIRmax e AIRmin. O tamanho dos fragmentos é definido por dados da literatura (Database, Research Genetics) ou por comparação com o padrão de peso molecular no aparelho Image Master (Amersham Pharmacia Biotech) (**Tabela 10**).

Para o microssatélite no gene *CYP1A1* na **tabela 11** encontramos 3 alelos, sendo o mais pesado denominado 1 presente na linhagem CBA/J, as linhagens A/J, P/J, SJL/J, e

SWR/J apresentam o alelo 2 e BALB/cJ, DBA/J e C57BL/6 tem o alelo mais leve denominado 3.

Para o D9Mit248 também encontramos 3 alelos, o mais pesado denominado 1 presente nas linhagens A/J, BALB/c, C57BL/6, P/J e SJL, a linhagem CBA apresentou o alelo 2 e as linhagens DBA/2 e SWR tem o alelo 3, o mais leve (**Tabela 11**).

Tabela 10: Definição de alelos de microssatélites em linhagens isogênicas constituintes da F0

Marcador	cM*	BALB/cJ	SJL/J	SWR/J	A/J	C57BL6/J	CBA/J	DBA/J	P/J
CYP1A1	31.0	3	2	2	2	3	1	3	2
D9 Mit 248	31,0	1	1	3	1	1	2	3	1

Produtos das amplificações dos microssatélites nas 8 linhagens isogênicas de camundongos que compuseram a F0 da Seleção de Inflamação.

As amostras foram amplificadas por PCR e visualizadas em gel de agarose 4% e Gel de poliacrilamida 12,5%.

* **centiMorgan (cM)**: distância do centrômero (Mouse Genome Database, 1998).

Nas **figuras 19 e 20** mostramos o padrão de migração dos microssatélites da região do cromossomo 9 a 31 cM comparativamente nas linhagens AIRmax, AIRmin e nas o linhagens isogênicas parentais.

Figura 19: Análise do microssatélite D9Mit248 onde mostramos o padrão de migração do produto de amplificação por PCR das preparações de DNA das linhagens isogênicas e de 5 AIRmax e 5 AIRmin (Seta).
Gel de poliacrilamida 12,5 %.
Peso molecular: Ladder ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments (72pb a 1353pb).

Figura 20: Análise do microssatélite CYP1A1 onde mostramos o padrão de migração do produto de amplificação por PCR das preparações de DNA das linhagens isogênicas e de 7 AIRmax e 8 AIRmin (seta).
Gel de poliacrilamida 12,5 %.
Peso molecular: Ladder ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments (72pb a 1353pb).

Observamos na **tabelas 11** que os dois microssatélites analisados apresentaram desvios de frequência alélica altamente significantes entre os animais das linhagens AIRmax e AIRmin ($p < 0,0001$).

Tabela 11: Análise de microssatélite no cromossomo 9 em camundongos AIRmax e AIRmin.

Linhagem	cM*	Marcadores	N	Genótipos/nº de animais						Alelos/ nº de cromossomos			p**
				11	12	13	22	23	33	1	2	3	
AIRmax	31.0	D9 Mit 248	10	0	0	0	10	0	0	0	20	0	$p < 0,0001$
AIRmin			10	10	0	0	0	0	0	20	0	0	
AIRmax	31.0	CYP1A1	15	6	0	2	3	2	2	14	8	8	$p < 0,0001$
AIRmin			17	0	0	0	0	5	12	0	5	29	

*centiMorgans (cM): distância do centrômero (Mouse Genome Database, 1998).

p**: calculado pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

n: número de animais.

5 DISCUSSÃO

O sistema imune adaptativo é capaz de reconhecer e atacar células cancerosas, mas estas têm a capacidade de evadir de diversas maneiras desta vigilância imunológica. A resposta inflamatória é, assim, um outro importante componente de controle de neoplasias. Embora células da imunidade inata reajam contra células cancerosas e provavelmente tenham a capacidade de retardar a progressão tumoral, a inflamação crônica é também associada com a promoção de diversos tipos de tumores em vários tecidos como a pele, próstata, ovário, mucosa gástrica, intestino, fígado e bexiga urinária. Em modelos animais, mastócitos, neutrófilos e macrófagos são agentes que contribuem para a progressão tumoral, entretanto, outros estudos demonstram o efeito protetor destas mesmas células. (COUSSENS e [WERB](#) 2001).

O modelo de camundongos AIRmax e AIRmin vem demonstrando a participação do controle genético da resposta inflamatória aguda como fatores de predisposição ou resistência à carcinogênese. Em conjunto, todos os resultados nos últimos anos evidenciaram o papel dos fenômenos exercidos pelo polimorfismo dos genes envolvidos na resposta inflamatória aguda e suas interações, nas características fenotípicas que distinguem AIRmax e AIRmin quanto à resistência a processos neoplásicos, bem como a infecções, autoimunidade e inflamação alérgica (BIOZZI *et al.*, 1998; ARAÚJO *et al.* 1998, MARIA *et al.*, 2001; MARIA *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2005; RIBEIRO FILHO, 2003).

Com base nos resultados anteriores, nós empregamos neste trabalho diferentes protocolos de carcinogênese química no modelo de linhagens selecionadas segundo a resposta inflamatória aguda (AIR). Para tal, utilizamos carcinógenos do tipo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), que são poluentes ambientais decorrentes da combustão incompleta de compostos aromáticos que exibem um efeito cancerígeno em vários animais e são suspeitos de causar câncer também em seres humanos (VASCONCELLOS *et al.*, 1998; BURCHIEL *et al.*, 2005). Estes PAHs são substâncias inertes que necessitam de ativação metabólica via sistema enzimático citocromo P450 para produzir muitas (CONNEY, 1982; DiGIOVANNI, 1992) mas não todas (RUBY; HALLIDAY e MULLER, 1989; THURMOND *et al.*, 1987) das suas atividades biológicas.

Recentes estudos sugerem que a inalação de PAHs inicia uma resposta inflamatória no trato respiratório, resultando em rinite e asma (HEO; SAXON e HANKINSON, 2001; MASTRANGELO *et al.*, 2003; SAXON e DIAZ-SANCHEZ, 2000; TAKENAKA *et al.*, 1995). A exposição ocupacional aos PAHs ou quando há aplicação tópica de produtos químicos ou de drogas que contém PAHs são capazes de desencadear doenças inflamatórias na pele, como hipersensibilidade de contato ou dermatites (WU *et al.*, 2003; YAMAMOTO e TOKURA, 2003).

Utilizamos dois protótipos de PAHs, o 3-MC e DMBA, os quais foram aplicados por diferentes vias, objetivando a caracterização dos fenótipos de susceptibilidade e/ou resistência dos animais AIRmax e AIRmin ao desenvolvimento de tumores. O estudo baseou-se nas diferenças marcantes encontradas nas linhagens selecionadas quando submetidos aos protocolos propostos.

Os dois são carcinógenos químicos completos, que executam a função de iniciador e promotor. A iniciação da carcinogênese envolve uma indução inicial de mudanças genéticas em células alvo, enquanto que durante a promoção tumoral, as células afetadas são resgatadas da apoptose e estimuladas à proliferação com acúmulo de mais mutações, as quais levam ao desenvolvimento de células malignas que formarão o tumor.

O primeiro protocolo proposto foi o de indução de fibrosarcomas em camundongos AIRmax e AIRmin com 3-MC. O 3-MC é um carcinógeno químico tipo PAH que tem sido amplamente usado de forma experimental em modelos animais, principalmente em roedores para o estudo comparativo nestes animais e em seres humanos. A transformação maligna pelo 3-MC resulta no acúmulo de mutações, por exemplo, em protooncogenes como o *ras* ou genes supressores de tumor como o *p53* (HALEVY *et al.*, 1991; WATANABE *et al.*, 1999). O 3-MC produz, ainda, mutações aleatórias e muitas delas podem interferir na integridade celular e desta forma, o 3-MC leva ao dano tecidual e à transformação maligna em paralelo. A resposta inflamatória para reparar o tecido lesado é caracterizada pelo influxo precoce de neutrófilos seguida pelo acúmulo de macrófagos. Nas fases mais tardias, os fibroblastos são o tipo celular predominante que produzem e depositam a matriz extracelular, levando à fibrose e cicatrização.

De acordo com a literatura, durante esta resposta de reparo tissular aos danos induzidos pelo 3-MC, o carcinógeno é encapsulado e persiste por longo tempo em animais resistentes ao desenvolvimento de tumores. Deste modo, a reação inflamatória ao corpo estranho seria um mecanismo protetor para o controle da carcinogênese química (QIN *et al.*, 2002) e por este motivo, achamos interessante testar este protocolo nas linhagens AIRmax e AIRmin.

No protocolo utilizado, a injeção intramuscular de 3-MC provocou o aparecimento de tumores locais, sarcomas, nas duas linhagens sendo, entretanto mais precocemente nos AIRmin (**Figuras 3 e 4**). Porém, durante o período de observação de 45 semanas, cerca de 90% dos camundongos das duas linhagens desenvolveram tumores no local de aplicação (**Figura 4**). Em tempos tardios, entretanto, observamos maior incidência de tumores de pulmão nos AIRmin (**Figura 5 e Tabela 3**).

Estes resultados poderiam refletir a capacidade da linhagem AIRmax de manter restrito o 3-MC no sítio de inoculação. O microambiente inflamatório gerado pelos animais AIRmax na presença de um agente estranho pode ter contribuído para a maior resistência ao desenvolvimento da malignidade pulmonar, mantendo o fenótipo anteriormente observado frente a outros protocolos já estudados (BIOZZI *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2001). Os mecanismos envolvidos nesta imunomodulação necessitam ainda de outras abordagens para a melhor compreensão.

O segundo protocolo de carcinogênese química foi o proposto por Li e colaboradores, 2002, onde utilizamos cinco aplicações epicutâneas consecutivas do DMBA. Neste tratamento, o desenvolvimento de carcinomas espinocelulares ocorre em maior número e em um tempo mais curto, do que com o protocolo clássico de iniciação com DMBA seguido de várias administrações de TPA na pele como agente promotor, que por sua vez induz o aparecimento de maior número de lesões benignas.

Quando as linhagens foram submetidas a este protocolo, apenas os animais AIRmin apresentaram uma reação precoce específica semelhante à dermatite de contato (**Figura 6**) que é sabidamente correlacionada ao desenvolvimento de tumores em linhagens de camundongos susceptíveis (CASALE *et al.*, 2000).

O epitélio da pele é principalmente composto por queratinócitos espalhados entre células dendríticas, melanócitos, poucos linfócitos T e monócitos e está altamente comprometido em defender o organismo. Insultos físicos, químicos ou imune-específicos rapidamente levam a uma resposta epidermal caracterizada por aumento da expressão de um sistema de mediadores pró-inflamatórios, incluindo fatores quimiotáticos, os quais iniciam a migração ordenada de distintas subpopulações leucocitárias (PASTORE *et al.*, 2005). Monócitos ativados, células dendríticas e linfócitos T liberam citocinas em resposta a microrganismos e outros antígenos e desta forma medeiam e regulam reações imunes e inflamatórias. Estas atuam sobre as células no local do ambiente que sofreu a injúria dando início a uma resposta inflamatória, mas também podem, quando produzidas em grandes quantidades, entrar na circulação e atuar à distância do local de produção (ação endócrina) (PASPARAKIS *et al.*, 2002; PASTORE *et al.*, 2005).

A indução da imunidade epidermal depende da ativação local de células dendríticas, para que estas migrem da pele para os nódulos linfáticos locais e assim serem maturadas como potentes células imunoestimulatórias. As células dendríticas são as mais potentes células apresentadoras de antígeno derivadas da medula óssea e estão presentes em diversos tecidos. Na camada da epiderme da pele elas são denominadas de células de Langerhans (LC) (HALLIDAY e LE, 2001). Esta importante característica deste tipo celular já levou aos estudos abordando seu possível efeito imunoterapêutico como vacinas contra o câncer (BARBUTO *et al.*, 2004; NEVES *et al.*, 2005).

Escolhemos o momento de 48 horas após a última exposição ao DMBA para o estudo da reação observada, porque era a ocasião onde todos os animais AIRmin iniciavam as manifestações clínicas típicas de resposta de dermatite de contacto, com inquietação e vermelhidão no local de aplicação do carcinógeno. Em tempos mais tardios, todos os AIRmin apresentavam já lesões decorrentes da intensa coceira com e escarificação da pele.

Esta reação cutânea foi caracterizada histologicamente e pela análise da expressão local de genes de citocinas, de receptores CD4 e CD8 de linfócitos T e de enzimas do citocromo P450. O tratamento induziu aumento significativo da expressão de IL-1 β , IL-6, TNF α e TGF β , bem como de CD4 e CD8 e da enzima CYP1B1 apenas na pele dos AIRmin, enquanto nos AIRmax os níveis de expressão destes genes não foram alterados significativamente (**Figuras 13, 14 e 15 e Tabela 6**).

A hipersensibilidade de contacto (CHS, *Contact hypersensitivity*) é uma resposta imune dependente de célula T. No modelo clássico em camundongos para a dermatite de contacto alérgica em humanos, ela envolve duas fases denominadas de fase de sensibilização e de desafio (GRABBE e SCHWARZ, 1998). Na fase de sensibilização, o alérgeno (hapteno) é associado a proteínas da pele e capturado pelas células de Langerhans da pele (LCs), células dendríticas dermais e macrófagos teciduais. Subseqüentemente, estas células, sob a ação de citocinas como TNF- α e IL- β , migram para os nódulos linfáticos adjacentes e maturam em potentes células apresentadoras de antígeno (APCs, *antigen presenting cells*) (WANG *et al.*, 2003). Células T *naïve* são ativadas e diferenciam-se em células Th1 antígeno específicas e citotóxicas sob a influência de sinais polarizadores, tais como IL-12 (WANG *et al.*, 2000). Estas células T são então designadas como “sensibilizadas”. Em paralelo, células B-1 na cavidade peritoneal são estimuladas por células NKT secretoras de IL-4 a produzir IgM antígeno específica. Além disso, células NK parecem desempenhar um papel na sensibilização (CAMPOS *et al.*, 2003; O’LEARY *et al.*, 2006).

Na fase de desafio, iniciada pela re-exposição ao mesmo hapteno, ligação cruzada de moléculas IgM causa liberação do fator de complemento C5a (TSUJI *et al.*, 2002). Este atua sobre as plaquetas, mastócitos residentes na pele e macrófagos (TSUJI *et al.*, 2000) resultando na ativação da microvasculatura (McHALE *et al.*, 1999) permitindo a penetração da primeira onda de leucócitos (HWANG *et al.*, 2004). Em resposta a quimiocinas, tais como proteína 10 induzível por IFN- γ (IP-10, ou também nomeada de CXCL10), células T sensibilizadas entram na derme no sítio de exposição ao hapteno e são re-estimuladas pelas APCs residentes (DUFOUR *et al.*, 2002). Estas células T então liberam mediadores pró-inflamatórios, os quais ativam células mielóides residentes a secretar citocinas como proteína 2 inflamatória de macrófagos (MIP-2, *macrophage inflammatory protein-2*, também chamada de CXCL2) e proteína 1 quimo atraente de monócitos (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1* ou CCL2), conduzindo a uma forte segunda onda de infiltração leucocitária (WANG *et al.*, 2003).

Em camundongos, as principais citocinas apontadas como responsáveis pela mobilização e migração de células de Langerhans em resposta à sensibilidade a alérgenos químicos são a interleucina 1 β (IL-1 β), IL-18 e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α)

(CUMBERBATCH e KIMBER, 1995; CUMBERBATCH e DEARMAN, 2001). Todos são produtos das células epidermais, e em cada caso a expressão é aumentada durante a sensibilização da pele.

Em modelos animais, a administração de anticorpos que neutralizam a ação de TNF- α leva a uma redução significativa da magnitude da reação, sugerindo que TNF- α é importante para iniciar a dermatite de contacto alérgica (PIGUET *et al.*, 1991). Da mesma forma, o bloqueio da atividade IL-1 β durante a sensibilização reduz a magnitude da resposta inflamatória (ENK *et al.*, 1993).

TNF- α induz a expressão de numerosas citocinas, com atividade de atrair células T cutâneas e indutoras de resposta em queratinócitos. Algumas destas citocinas estão envolvidas nas respostas prematuras quando há injúria ou irritação e desordens na pele mediada por célula T (GILLITZER e GOEBELER, 2001; GIUSTIZIERI *et al.*, 2001) com controle do recrutamento de monócitos/macrófagos, células dendríticas e células T (NAKAMURA; WILLIAMS e KUPPER, 1995; CARR *et al.*, 1994; GOEBELER *et al.*, 2001; GIUSTIZIERI *et al.*, 2001).

Outros autores demonstraram que aplicações tópicas de DMBA, B(a)P e 3-MC resultam em indução de respostas de hipersensibilidade de contacto, a qual é uma resposta imune mediada por células T contra os compostos (KLEMME, MUKHTAR e ELMETS, 1987; ANDERSON *et al.*, 1995). A resposta cumpre todos os requerimentos de uma resposta imune adquirida incluindo a especificidade antigênica e a habilidade para ser uma resposta imune transferida por meio de suspensão de células oriundas de nódulos linfóides drenantes (KLEMME, MUKHTAR e ELMETS, 1987). Estas respostas após a exposição a xenobióticos revelam a contribuição de cada população de células T CD4 e CD8. De maneira geral, as células T CD8⁺ são células efectoras, enquanto que as células T CD4⁺ exercem um papel regulatório na resposta (ANDERSON *et al.*, 1995; ELMETS *et al.*, 2005).

Pelos resultados em nosso modelo pudemos comprovar a ocorrência de reação de dermatite de contato específica ao DMBA apenas na linhagem AIRmin. Os resultados sugerem ainda que a baixa reatividade ao DMBA apresentada pelos AIRmax pode ser decorrente da inabilidade destes animais em metabolizar o DMBA (que será discutido adiante) e não da deficiência de produzir reações específicas, já que eles responderam

normalmente à imunização com DNFB (**Tabela 5 e Figura 10**). Esta reação inicial ao DMBA era resolvida ao redor do 20º dia após o tratamento e em seguida apareceram múltiplas lesões cutâneas que evoluíram para carcinomas apenas nos animais AIRmin. Além disso, em tempos tardios foi maior a susceptibilidade dos animais AIRmin em desenvolver tumores de pulmão.

Com capacidade de provocar mutações e carcinogênese, o DMBA vem sendo extensamente investigado com o intuito de elucidar os mecanismos pelos quais os PAHs causam cânceres em tecidos epiteliais (DiGIOVANNI, 1992). Uma observação feita nestes estudos é que o DMBA produz uma específica transversão A-T no segundo nucleotídeo do códon 61 do oncogene *H-ras* (BIZUB, WOOD e SKALKA, 1986; PELLING *et al.*, 1987; QUINTANILLA *et al.*, 1986). Esta mutação é um importante evento inicial na carcinogênese epitelial na pele e em outros órgãos (DiGIOVANNI, 1992; PELLING; SHENG e BETZ, 1995).

Dados da literatura indicam que a exposição ao DMBA é capaz de suprimir as imunidades humoral e celular e esta imunossupressão persistente promove mecanismos epigenéticos para crescimento tumoral ou metástases (WARD *et al.*, 1984; WARD *et al.*, 1986). Suganuma e seus colaboradores (2002) acharam distintos papéis desempenhados por alguns mediadores pró-inflamatórios (citocinas), em particular, TNF- α , IL-1 (alfa e beta) e IL-6 produzidos pelo sistema imune na promoção tumoral e transformação celular. Moore *et al.* (1999) reportaram que citocinas pró-inflamatórias eram importantes nos primeiros estágios de promoção tumoral uma vez que camundongos deficientes em TNF- α se mostraram mais resistentes que os selvagens a protocolos de carcinogênese química de pele. Por outro lado, a expressão constitutiva de IL-1 α na epiderme de camundongos FVB conferiu a eles resistência a carcinogênese de pele (MURPHY *et al.*, 2003).

A Interleucina 1 compreende uma família de genes intimamente relacionados e duas proteínas agonísticas principais, a IL-1 α e IL-1 β , são pleiotrópicas e afetam primordialmente a inflamação, imunidade e hematopoiese. IL-1 α e IL-1 β recombinantes se ligam aos mesmos receptores e induzem mesmas funções biológicas. A IL1 é abundante em sítios tumorais, onde ela pode afetar o processo de carcinogênese, crescimento e capacidade de invasão tumoral e também as formas de interação tumor-hospedeiro. Foi, entretanto descrito que a IL-1 β expressa em células malignas, ativa a inflamação promovendo a

invasão e também a supressão imune mediada pelo tumor (APTE *et al.*, 2006). Enquanto é descrita a ação protetora da IL-1 α no processo de carcinogênese química induzida com PAHs, o papel executado pela IL-1 β seria de potencializar a atividade carcinogênica pela indução de uma resposta inflamatória local com atividade promotora, que possivelmente contribuiria para o aumento da incidência do desenvolvimento de tumores e aparecimento de metástases (APTE *et al.*, 2006).

A superfamília do fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) desempenha um papel complexo no processo de carcinogênese cutânea. Numerosos estudos vêm demonstrando a importância da sinalização exercida pelo TGF- β na progressão de metástases cancerosas. Em momentos iniciais da formação tumoral, o TGF- β atua como um supressor de tumor emergente (WIESER, 2001) de fato, a perda da atividade de TGF- β neste momento promove a formação tumoral. Paradoxalmente, em um momento posterior do processo de carcinogênese de pele, células tumorais podem produzir e secretar altas quantidades de TGF- β e este pode atuar de maneira autócrina e parácrina para promover o crescimento tumoral e a conversão maligna (WIESER, 2001). Assim, diversos trabalhos investigaram os efeitos do TGF- β no processo de carcinogênese epitelial, mas os resultados são por diversas vezes contraditórios. Embora alguns estudos enfatizem seus efeitos supressores tumorais, outros indicam o papel de promoção tumoral do TGF- β . Estudos utilizando camundongos geneticamente alterados que expressam TGF- β na epiderme, atestam o papel dicotômico do TGF- β na carcinogênese de pele. Comparados com os animais controle, os alterados geneticamente são mais resistentes ao aparecimento de papilomas induzidos por carcinógenos de pele. Entretanto, os papilomas que estes desenvolveram apresentaram uma evolução para a progressão maligna em direção a carcinoma de células espinhosas (SCCs). Desta forma, o TGF- β parece ter efeitos de duas fases no processo de carcinogênese química de pele dependendo do estágio do desenvolvimento tumoral (CUI *et al.*, 1996).

Os queratinócitos são as principais origens de algumas citocinas produzidas na pele sendo capazes de secretar IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β , e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (SCHWARZ e LUGER, 1989; ANSEL *et al.*, 1990). A produção de citocinas pode ser aumentada em resposta a um estímulo ambiental. Por exemplo, a radiação UVB estimula a produção de IL-6 (KIRNBAUER *et al.*, 1991) e IL-8 (KONDO *et al.*, 1993) por queratinócitos. E também as citocinas pró-inflamatórias, tais

como, IL-1 α , IL-1 β , e TNF α , aumentam a síntese e liberação de IL-6 nos queratinócitos (KIRNBAUER *et al.*, 1989; ANSEL, LUGER e GREEN, 1983; PARTRIDGE *et al.*, 1991).

A Interleucina 6 é uma citocina pleiotrópica com numerosas atividades biológicas. Ela é produzida por constituintes normais da pele, incluindo células epidermais, fibroblastos e células endoteliais dermais. Ela também é sintetizada por células inflamatórias que infiltram na pele em variadas condições patológicas. A IL-6 participa da regulação do crescimento celular, diferenciação e sobrevivência celular (Van SNICK, 1990; AKIRA; TAGA e KISHIMOTO, 1992; SUI *et al.*, 1999; TOSATO e PIKE, 1988; IGLESIAS *et al.*, 1995; KAWANO *et al.*, 1989).

A ativação do gene da IL-6 pode ser um passo essencial na carcinogênese de múltiplos estádios das células epiteliais da pele. A radiação ionizante já foi descrita como indutora da expressão de IL-6 via a ativação NF- κ B (BEETZ *et al.*, 2000). Nishimura e colaboradores, 1999 e 2000, no entanto, reportaram que a irradiação com raios ultravioleta B provocam uma lesão na pele mais extensa em animais *knockout* de IL-6 do que em animais tipo selvagens. Murata *et al.*, 2002, também demonstrou o papel protetor exercido pela IL-6 em animais *knockout* de IL-6 que apresentava um processo inflamatório causado por baixas ou altas doses de DMBA. Estes resultados sugerem também que camundongos *knockout* de IL-6 têm prejuízo de funções imunes normais e de sua capacidade de defesa do que os animais tipo selvagem (KOPF *et al.*, 1994).

Desta forma, o estímulo dos genes destas citocinas citadas, evidenciado na pele dos animais AIRmin tratados com o DMBA, está coerente com o desenvolvimento de resposta específica de dermatite de contato ao composto e com o posterior aparecimento de lesões malignas nesta linhagem. Além disso, foi detectada maior expressão do gene da enzima CYP1B1 na pele dos animais AIRmin, provavelmente relacionada à sua maior capacidade de promover a biotransformação do DMBA. Nos tempos tardios após este tratamento, bem como quando utilizamos o 3-MC, os AIRmin mostraram-se significativamente mais susceptíveis do que os AIRmax em desenvolver tumores de pulmão.

A transformação de 3-MC e de DMBA em subprodutos cancerígenos quando administrado em animais experimentais depende da sua ligação inicial ao receptor de hidrocarbonetos aromáticos AHR com a participação de outros fatores. Estudos com camundongos *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 estas substâncias tóxicas. Além disso, as reações podem ser moduladas por variantes alélicas do gene *Ahr* que codifica a proteína gerando receptores de baixa afinidade.

Muitos experimentos realizados em diferentes linhagens de camundongos demonstraram variações na capacidade destas linhagens em desenvolver reações de hipersensibilidade de contacto ao DMBA. Camundongos com o alelo *Ahr^d* (linhagens que são deficientes em metabolizar PAHs) falham em desenvolver a reação de hipersensibilidade de contacto ao DMBA e as linhagens que possuem o alelo *Ahr^{b1}* produzem esta resposta (ANDERSON *et al.*, 1995).

Em conformidade aos fenótipos de resistência e susceptibilidade ao desenvolvimento de reação alérgica e de posterior desenvolvimento tumoral, foi constatada a presença desta mutação em todos os animais AIRmax analisados, enquanto todos os AIRmin apresentam o alelo do gene que confere alta afinidade do receptor.

Há evidências na literatura de que, conjuntamente com o *locus* do receptor do AHR, proteínas codificadas por genes do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) interagem na indução de resposta imune ao DMBA. Assim, a combinação do polimorfismo no *Ahr* e de *loci* do CPH determinariam a magnitude da resposta cutânea imune celular aos PAHs (ELMETS *et al.*, 1998). Foi demonstrado que os animais com haplótipos H-2^k e H-2^a desenvolvem hipersensibilidade de contacto ao DMBA, enquanto que os camundongos com H-2^b, H-2^d e H-2^s não desenvolvem a reação.

Em estudos anteriores do laboratório foi evidenciado que os AIRmax são predominantemente H-2^b enquanto os AIRmin são H-2^d ou H-2^k (VIGAR *et al.*, 2000). Este fator genético poderia assim contribuir para a resposta diferencial ao DMBA dependente do AHR observada nestas linhagens.

O papel do AHR na indução da expressão de enzimas do citocromo P450 depois da exposição a xenobióticos, tem sido estudado (HANKINSON, 1995). A oxidação dos compostos especialmente por CYP1A1 e CYP1B1 produz tanto os metabólicos inativos, como leva a ativação metabólica para carcinógenos finais que são capazes de se ligarem ao DNA causando mutações e iniciando o câncer. Em alguns experimentos que utilizam DMBA na carcinogênese em camundongos *knockout* de *CYP1A1* e *CYP1B1* foi observada uma diferença quanto à capacidade de resposta em determinados órgãos. Setenta por cento

dos camundongos selvagens (129/Sv), que receberam altos níveis de DMBA oralmente por meio de gavagem desenvolveram linfomas enquanto apenas 7,5 % dos animais *knockout* de *CYP1B1* desenvolveram a doença. Os animais *knockout* também não apresentaram carcinoma na pele em contraste com o tipo selvagem. Entretanto, 10% dos camundongos *knockout* de *CYP1B1* desenvolveram adenomas de pulmão em comparação com os animais tipo selvagem (nenhum desenvolveu) (BUTERS *et al.*, 1999). O risco para desenvolver papilomas era também aumentado em animais *knockout* de glutathione *S*-transferase P1 e P2 tratados com DMBA e TPA (HENDERSON *et al.*, 1998). Alguns estudos indicam que a oxidação do DMBA para diol epóxido é realizada preferencialmente por CYP1B1 em comparação com o CYP1A1 (SHIMADA *et al.*, 1996).

É extremamente atraente especular que o polimorfismo dos genes *CYP* poderia influenciar a capacidade individual em converter diferentes compostos pré-carcinogênicos em seus carcinógenos finais e assim ser um fator importante na susceptibilidade individual para o desenvolvimento do câncer quimicamente induzido. De fato, em populações humanas tem sido demonstrada associação entre a susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores, principalmente de pulmão, e o polimorfismo genético de várias enzimas envolvidas na detoxificação e metabolismo de xenobióticos (GRESNER, GROMADZINSKA e WASCOWICZ, 2007). Estas associações, entretanto, não são ainda definitivas porque o *background* genético das populações humanas estudadas é muito heterogêneo e fatores ambientais diferentes são de grande relevância para as doenças em questão, tornando muito mais difícil a afirmação de uma correspondência. Isto faz com que se torne muito mais intrincado o estudo da influência de genes polimórficos específicos que estão relacionados com o câncer e outras doenças (INGELMAN-SUNDBERG, 2001).

Por outro lado, estes fatores são bem controlados em estudos com camundongos. O polimorfismo no *Ahr* bem como nos genes que codificam as enzimas responsáveis pela cadeia de eventos que se sucedem após sua ação, podem ser fatores que interferem na predisposição individual diferenciada ao desenvolvimento do câncer induzida por estas substâncias tóxicas do tipo PAHs.

Conforme referido anteriormente, ocorreu a fixação do alelo *Ahr^{bl}* que confere resistência nos AIRmax e do alelo *Ahr^d* relacionado ao receptor AHR de alta afinidade nos AIRmin. Este genótipo certamente contribui para a diferente susceptibilidade apresentada

pelas linhagens ao desenvolvimento tumoral e, além disso, sugere a participação deste locus ou de algum gene próximo, no controle da resposta inflamatória. Esta hipótese foi confirmada pelo ensaio positivo de co-segregação ou *linkage* destes alelos com a reatividade inflamatória em população intercruzada F2 (AIRmax x AIRmin).

Neste mesmo sentido, foi também detectado desequilíbrio altamente significativo entre as duas linhagens, de alelos do gene do *CYP1A1* e de microssatélite próximo no cromossomo 9 onde se encontra um grupo de genes de enzimas do citocromo P450, sugerindo a participação desta região na diferenciação fenotípica das duas linhagens.

Este polimorfismo pode, portanto estar relacionado à diferença de sensibilidade das linhagens aos carcinógenos e também à sua reatividade inflamatória. Apesar de termos observado desvios de frequência alélica altamente significantes para estes dois marcadores, não realizamos o teste funcional, ou seja, de co-segregação em população F2 (AIRmax x AIRmin) porque não ocorreu fixação total dos alelos do microssatélite CYP1A1 (dentro do gene *CYP1A1*) em cada linhagem e as diferenças no padrão de migração do D9Mit248 são muito pequenas para visualização nos F2.

Como consequência do processo seletivo bidirecional, os alelos dos genes relacionados aos fenótipos de alta e baixa resposta inflamatória aguda segregam especificamente nas linhagens AIRmax e AIRmin. A análise da herdabilidade do caráter durante o processo revelou o envolvimento de 7 a 11 *loci* distintos com efeito aditivo na determinação da divergência fenotípica entre as duas linhagens (IBAÑEZ *et al.*, 1992).

Os vários QTL selecionados em AIRmax e AIRmin formam um grupo funcionalmente heterogêneo de genes que devem afetar um amplo espectro de processos celulares e moleculares para a regulação da intensidade da AIR. São também funcionalmente heterogêneos os grupos de genes que regulam a susceptibilidade ao câncer. A carcinogênese é um fenômeno complexo que envolve múltiplos fatores que interferem em etapas definidas do processo. Estudos indicam que dependendo do tecido alvo, existe uma expressão diferenciada do tipo de enzima quando aplicado o mesmo carcinógeno. Achados recentes indicam que existem ainda mecanismos pós-transcricionais envolvidos na regulação de enzimas metabolizantes do carcinógeno. Desta forma, a combinação de fatores transcricionais, pós-transcricionais e específicos do metabolismo do tecido pode ser

requerida para regular a expressão diferencial de enzimas em distintos tipos celulares (McFADYEN *et al.*, 2003).

Assim, uma rede complexa de sinais autônomos da célula transformada e de sinais não autônomos da célula, mas provenientes do microambiente que a alberga, regula o desenvolvimento de tumores (DEMANT, 2003).

Estas linhagens geneticamente selecionadas que diferem enormemente quanto ao grau de resposta inflamatória aguda e à susceptibilidade à carcinogênese química, representam, assim, uma nova ferramenta para o estudo de fatores genéticos que influenciam o microambiente inflamatório na predisposição ao câncer.

6 CONCLUSÕES

Os nossos resultados demonstraram que os camundongos AIRmax são resistentes e os AIRmin são sensíveis a indução de tumores de pele pela aplicação repetida de DMBA. Após este tratamento, os AIRmin foram também significativamente mais susceptíveis ao desenvolvimento de cânceres de pulmão, bem como quando receberam o 3-MC.

Os animais AIRmin desenvolveram uma reação de dermatite de contacto ao carcinógeno DMBA, a qual está relacionada à susceptibilidade ao desenvolvimento tumoral. Nesta reação inicial foi constatado que ocorreram aumentos da expressão na pele de genes das citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e TGF- β) e de enzima do citocromo P450 (Cyp1b1).

O perfil das citocinas induzidas nos AIRmin é coerente com o que determina o aparecimento da reação de hipersensibilidade de contacto pelo DMBA. O aumento da enzima CYP1B1 está relacionado com a bioativação cutânea do DMBA que depende da afinidade de ligação do agonista ao receptor AHR.

A completa segregação dos alelos de alta afinidade (*b1*) e baixa afinidade (*d*) no *locus Ahr* encontrada em AIRmin e AIRmax, respectivamente, é coerente com o fenótipo de susceptibilidade e resistência à carcinogênese de pele e pulmão apresentados nas linhagens, indicando o *locus Ahr* como um fator genético que pode estar contribuindo com esta diferenciação.

O *linkage* genético significativo do genótipo do *Ahr* com grau de inflamação induzida pelo Biogel foi demonstrado em uma população de segregantes F2, confirmando que o próprio *Ahr* ou outro gene ligado representa um QTL controlador da reatividade inflamatória aguda.

Fatores genéticos ligados ao *Ahr* e reações imunes específicas contribuem para a diferente susceptibilidade das linhagens selecionadas à carcinogênese por compostos policíclicos aromáticos.

REFERÊNCIAS

AKIBA, H.; KEHREN, J.; DUCLUZEAU M. T.; KRASTEVA, M.; HORAND, F.; KAISERLIAN, D.; KANEKO, F.; NICOLAS, J. F. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8⁺ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. **J. Immunol.**, v. 168, n. 6, p. 3079-3087, 2002.

AKIRA, S.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6 in biology and medicine. **Adv. Immunol.**, v. 54, p. 1-78, 1993.

ANDERSON, C.; HEHR, A.; ROBBINS, 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.

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

ANSEL, J.; 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–7S, 1990.

ANSEL, J. C.; LUGER, T. A.; GREEN, I. The effect of in vitro and in vivo UV irradiation on the production of ETAF activity by human and murine keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 81, p. 619–24, 1983.

ANTTILA, S.; TUOMINEN, P.; HIRVONEN, A.; NURMINEN, M.; KARJALAINEN, A.; HANKINSON, O.; ELOVAARA, E. CYP1A1 levels in lung tissue of tobacco smokers and polymorphisms of CYP1A1 and aromatic hydrocarbon receptor. **Pharmacogenetics**, v. 11, p. 501-509, 2001.

APTE, R. N.; DOTAN, S.; ELKABETS, M.; WHITE, M. R.; REICH, E.; CARMI, Y.; SONG, X.; DVOZKIN, T.; KRELIN, Y.; VORONOV, E. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 25, n. 3, p. 387-408, 2006.

ARAUJO, L. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W. H.; MOUTON, D.; SEMAN, M.; IBANEZ, O. M. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 9, p. 2913-2920, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023:**

Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

National Library of Medicine. List of journals indexed in Index

Medicus. 2006. Available from:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/;](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/)

<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>.

ARRUDA, L. K.; SOLE, D.; BAENA-CAGNANI, C. E.; NASPITZ, C. K. Risk factors for asthma and atopy. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v. 5, p. 153–159, 2005.

BALKWIL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, p. 539–345, 2001.

BALMAIN, A.; NAGASE, H. Cancer resistance genes in mice: models for study of tumor modifiers. **Trends Genetic.**, v. 14, p. 139-144, 1998.

BARBUTO, J. A.; ENSINA, L. F.; NEVES, A. R.; BERGAMI-SANTOS, P.; LEITE, K. R.; MARQUES, R.; COSTA, F.; MARTINS, S. C.; CAMARA-LOPES, L. H.; BUZAID, A. C. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, n. 12, p. 1111-1118, 2004.

BEETZ, A.; PETER, R. U.; OPPEL, T.; KAFFENBERGER, W.; RUPEC, R. A.; MEYER, M.; VAN BEUNINGEN, D.; KIND, P.; MESSER, G. NF-kappaB and AP-1 are responsible for inducibility of the IL-6 promoter by ionizing radiation in HeLa cells. **Int. J. Radiat. Biol.**, v.76, n. 11, p. 1443-1453, 2000.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAUJO, L. M. M.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H. K.; SANT'ANNA, O. A.; MASSA, S.; PIOLI, C.; DORIA, G.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; IBÁÑEZ, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v.19, p. 337-346, 1998.

BIZUB, D.; WOOD, A. W.; SKALKKA, A. M. Mutagenesis of the Ha-ras oncogene in mouse skin tumors induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Proc. Natl. Acad., Sci. U. S. A.** v. 83, p: 6048–6052, 1986.

BONVALLOT, V.; BAEZA-SQUIBAN, A.; BAULIG, A.; BRULANT, S.; BOLAND, S.; MUZEAU, F.; BAROUKI, R.; MARANO, F. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 25, n. 4, p. 515-521, 2001.

BOUR, H., E. PEYRON, E. M. GAUCHERAND, J. L. GARRIGUE, C. DESVIGNES, D. KAISERLIAN, J. P. REVILLARD, J. F. NICOLAS. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺ T cells and class II-restricted CD4⁺ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 3006-3010, 1995.

BURCHIEL, S. W.; DAVIS, D. A.; GOMEZ, M. P.; MONTANO, R. M.; BARTON, S. L.; SEAMER, L. C. Inhibition of lymphocyte activation in splenic and gut-associated lymphoid tissues following oral exposure of mice to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 105, n 3, p. 434-442, 1990.

BURCHIEL, S. W.; HADLEY, W. M.; BARTON, S. L.; FINCHER, R. H.; LAUER, L. D.; DEAN, J. H. Persistent suppression of humoral immunity produced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in B6C3F1 mice: Correlation with changes in spleen cell surface markers detected by flow cytometry. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 10, p. 369–376, 1988.

BURCHIEL; S. W.; LAUER, F. T.; DUNAWAY, S. L.; ZAWADZKI, J.; MCDONALD, J. D.; REED, M. D. Hardwood smoke alters murine splenic T cell responses to mitogens following a 6-month whole body inhalation exposure. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 202, n. 3, p. 229-236. 2005

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

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

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

CAMPOS, R. A.; SZCZEPANIK, M.; ITAKURA, A.; AKAHIRA-AZUMA, M.; SIDOBRE, S.; KRONENBERG, M.; ASKENASE, P. W. Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Valpha14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 1785–1796, 2003.

CAMPOS, R. A.; SZCZEPANIK, M.; ITAKURA, A.; LISBONNE, M.; DEY, N.; LEITE-DE-MORAES, M. C; ASKENASE, P. W. Interleukin-4-dependent innate collaboration between iNKT cells and B-1 B cells controls adaptative contact sensitivity. **Immunology**, v. 117, p. 536–547, 2006.

CARR, M. W.; ROTH, S. J.; LUTHER, E.; ROSE, S. S.; SPRINGER, T. A. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 91, p. 3652-3656, 1994.

CASALE, G. P.; HIGGINBOTHAM, S.; JOHANSSON, S. L.; ROGAN, E. G.; CAVALIERI, E. L. Inflammatory response of mouse skin exposed to the very potent carcinogen dibenzo[a,l]pyrene: a model for tumor promotion. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 36, n. 1, p. 71-78. 1997.

CASALE, G. P.; CHENG, Z.; LIU, J.; CAVALIERI, E. L.; SINGHAL, M. Profiles of cytokine mRNAs in the skin and lymph nodes of SENCAR mice treated epicutaneously with dibenzo[a,l]pyrene or dimethylbenz[a]anthracene reveal a direct correlation between carcinogen-induced contact hypersensitivity and epidermal hyperplasia. **Mol. Carcinog.**, v. 27, p. 125-140, 2000.

CASLEY, W. L.; MENZIES, J. A.; WHITEHOUSE, L. W.; MOON, T. W. Detection of quantitative trait loci affecting caffeine metabolism by interval mapping in a genome-wide scan of C3H/HeJ x APN F (2) mice. **Drug Metab. Dispos.**, v. 27, n. 12, p. 1375-1380, 1999.

CAVANI, A.; ALBANESI, C.; TRAJDL, S.; SEBASTIANI, G.; GIROLOMONI, G. Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis. **Trends Immunol.**, v. 22, p. 118- 120, 2001.

CAVANI, A.; MEI, D.; GUERRA, E.; CORINTI, S.; GIANI, M.; PIRROTTA, L.; PUDDU, P.; GIROLOMONI, G. Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell responses: evidence for the presence of effector CD8⁺ and regulatory CD4⁺ T cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 111, p. 621- 628, 1998.

CAVANI, A.; NASORRI, F.; PREZZI, C.; SEBASTIANI, S.; ALBANESI, C.; GIROLOMONI, G. Human CD4⁺ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. **J. Invest. Dermatol.**, v. 114, p. 295- 302, 2000.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MEYERS, J. P. **Our Stolen Future: How We Are Threatening Our Fertility, Intelligence and Survival — A Scientific detective story.** New York: Editora Plume Book, p.316 1997.

CONNEY, A. H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. Clowes memorial lecture. **Cancer Res.**, v. 42, p. 4875–4917, 1982.

CONNEY, A. H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Res.**, v. 42, p. 4875– 4917, 1982.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 19-26, 2002.

CUI, W.; FOWLIS, D. J.; BRYSON, S.; DUFFIE, E.; IRELAND, H.; BALMAIN, A.; AKHURST, R. J. TGFβ1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. **Cell**, v. 86, p. 531-542, 1996.

CUMBERBATCH, M.; DEARMAN, R. J.; ANTONOPOULOS, C.; GROVES, R. W.; KIMBER, I. Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor-α and IL-1β-dependent mechanism. **Immunology**, v. 102, p. 323–330, 2001.

CUMBERBATCH, M.; KIMBER, I. Tumour necrosis factor- α is required for accumulation of Dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. **Immunology**, v. 84, p. 31–35, 1995.

DAVILA, D. P.; DAVIS, D. R.; CAMPBELL, K.; CAMBIER, J. C.; ZIGMOND, L. A.; BURCHIEL, S. W. Role of alterations in Ca (2+)-associated signaling pathways in the immunotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. **J. Toxicol. Environ. Health** v. 45, p. 101–126, 1995.

DEMANT, P. Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. **Nat. Rev. Genet.**, v. 4, p. 721–735, 2003.

DiCARLO, E., IEZZI, M., PANNELLINI, T., ZACCARDI, F., MODESTI, A., FORNI, G.; MUSIANI, P. Neutrophils in anti-cancer immunological strategies: old players in new games. **J. Hematother. Stem Cell Res.**, v. 10, p. 739–748, 2001.

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 4,006 simple sequence length polymorphisms **Nature Genetics**, v. 7, 220–245, 1994.

DiGIOVANNI, J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. **Pharmacol. Ther.**, v. 54, p: 63–128, 1992.

DiGIOVANNI, J. Genetic factors controlling responsiveness to skin tumor promotion in mice. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 391, p. 195–212, 1995.

DiPACE, R. F.; MASSA, S.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBANEZ, O. C. Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory responsiveness. **Carcinogenesis**. v. 27, n. 8, p 1517–1525, 2006.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 66, n. 6, p. 1191–1308, 1981.

DUFOUR, J. H.; DZIEJMAN, M.; LIU, M. T.; LEUNG, J. H.; LANE, T. E.; LUSTER, A. D. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. **J. Immunol.**, v. 168, p. 3195–3204, 2002.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma, generation and wound healing. **N. Engl. J. Med.**, v.315, p. 1650–1659, 1986.

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.

ELMETS, C. A.; YUSUF, N.; KATIYAR, S. K.; XU, H. Antagonistic roles of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in DMBA cutaneous carcinogenesis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 124, A: 22, 2005.

ENK, A. H.; ANGELONI, V. L.; UDEY, M. C.; KATZ, S. I. An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin. **J. Immunol.**, v. 150, p. 3698-3704, 1993.

FAUVE, R. M.; JUSFORGUES, H.; HEVIN, B. Maintenance of granuloma macrophages in serum-free medium. **J. Immunol. Methods**, v. 64, n. 3, p. 345-351, 1983.

FERNANDEZ-SALGUERO, P.; PINEAU, T.; HILBERT, D. M.; MCPHAIL, T.; LEE, S. S. T.; KIMURA, S.; RUDIKOFF, D. W. N. S.; WARD, J. M.; GONZALEZ, F. J. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. **Science**, v. 268, p. 722–726. 1995.

FONTAN, E.; FAUVE, R. M. [Inflammation and antibacterial resistance. III. Influence of an inflammatory reaction induced by the injection of polyacrylamide gels on the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection]. **Ann. Immunol.**, v. 134 c, n. 2, p. 255-264, 1983.

FUJIMAKI, H.; NOHARA, K.; KOBAYASHI, T.; SUZUKI, K.; EGUCHI-KASAI, K.; TSUKUMO, S.; KIJIMA, M.; TOHYAMA, C. Effect of a single oral dose of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on immune function in male NC/Nga mice. **Toxicol. Sci.**, v. 66, p. 117–124, 2002.

FUJISAWA-SEHARA, A.; SOGAWA, K.; YAMANE, M.; FUJII-KURIYAMA, Y. Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug-metabolizing cytochrome P-450c gene: a similarity to glucocorticoid regulatory elements. **Nucleic Acids Res.**, v. 15, n. 10, p. 4179-4191, 1987.

GAMBIER, N.; MARTEAU, J. B.; BATT, A. M.; MARIE, B.; THOMPSON, A.; SIEST, G.; FOERNZLER, D.; VISVIKIS-SIEST, S. Interaction between CYP1A1 T3801C and AHR G1661A polymorphisms according to smoking status on blood pressure in the Stanislas cohort. **J. Hypertens.**, v. 24, n. 11, p. 2199-205, 2006.

GAO, J.; LAUER, F. T.; DUNAWAY, S.; BURCHIEL, S. W. Cytochrome P450 1B1 Is Required for 7, 12-Dimethylbenz (a)-anthracene (DMBA) Induced Spleen Cell Immunotoxicity. **Toxicol. Sci.**, v. 86, n. 1, p. 68–74, 2005.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **J. Leukocyte Biol.**, v. 69, p. 513-521, 2001.

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

GIUSTIZIERI, M. L.; MASCIA, F.; FREZZOLINI, A.; DE PITA', O.; CHINNI, L. M.; GIANNETTI, A.; GIROLOMONI, G.; PASTORE, S. Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 107, n. 5, p. 871-877, 2001.

GOEBELER, M.; TRAUTMANN, A.; VOSS, A.; BRÖCKER, E. V.; TOKSOY, A.; GILLITZER, R. Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. **Am. J. Pathol.**, v. 158, n. 2, p. 431-40, 2001.

GONZALEZ, F. J. The use of gene knockout mice to unravel the mechanisms of toxicity and chemical carcinogenesis. **Toxicol. Lett.**, v. 120, p. 199-208, 2001.

GONZALEZ, F. J.; KIMURA, S. Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice. **Mutat Res.**, v. 477, p. 79-87, 2001.

GRABBE, S.; SCHWARZ, T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. **Immunol. Today**, v. 19, p. 37-44, 1998.

GRABBE, S., BHARDWAJ, R. S., MAHNKE, K., SIMON, M. M., SCHWARZ, T., LUGER, T. α -Melanocyte-stimulating hormone induces hapten-specific tolerance in mice. **J. Immunol.**, v. 156, p. 473-478, 1996.

GRESNER, P.; GROMADZINSKA, J.; WASOWICZ, W. Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer. **Lung Cancer**, v. 57, n. 1, p. 1-25, 2007.

GUENGERICH, F. P.; SHIMADA, T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. **Chem Res Toxicol.** v. 4, p. 391-407, 1991.

HALEVY O.; RODEL, J.; PELED A.; OREN, M. Frequent p53 mutations in chemically induced murine fibrosarcoma. **Oncogene**, v. 6, n. 9, p. 1593-1600, 1991.

HALLIDAY, G. M.; LE, S. Transforming growth factor-beta produced by progressor tumors inhibits, while IL-10 produced by regressor tumors enhances, Langerhans cell migration from skin. **Int Immunol.**, v. 13, n. 9, p. 1147-1154, 2001.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

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

HARPER, P. A.; WONG, J. M. Y.; LAM, M. S. M.; OKEY, A. B. Polymorphism in the human AH receptor. **Chem. Biol. Interact.**, v. 141, p. 161-187, 2002.

HENDERSON, C. J.; SMITH, A.G.; URE, J.; BROWN, K.; BACON, E. J.; WOLF, C. R.. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 5275–5280, 1998.

HEO, Y.; SAXON, A.; HANKINSON, O. Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. **Toxicology**, v. 159, p. 143–158, 2001.

HERCEG, Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors **Mutagenesis**, v. 22, n. 2, p. 91–103, 2007.

HUTZ, M. H.; FIEGENBAUM, M. Farmacogenômica. **Genômica**, Autor Mir, L., Ed. Atheneu Cap. 32, p.665-666, 2004.

HWANG, J. M.; YAMANOUCHI, J.; SANTAMARIA, P.; KUBES, P. A critical temporal window for selectin-dependent CD4⁺ lymphocyte homing and initiation of late-phase inflammation in contact sensitivity. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 1223–1234, 2004.

IBANEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; SANT'ANNA, O. A.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZI, 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, n. 10, p. 2555-263, 1992.

INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants **Toxicol. Lett.**, v. 120, n. 1-3, p. 259-268, 2001

ISHIHARA, Y.; IIJIMA, H.; MATSUNAGA, K. Contribution of cytokines on the suppression of lung metastasis. **Biotherapy**, v. 11, p. 267-75, 1998.

KAWANO, M.; KURAMOTO, A.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. Cytokines as autocrine growth factors in malignancies. **Cancer Surv.**, v. 8, n. 4, p. 905-19, 1989.

KEHREN, J.; DESVIGNES, C.; KRASTEVA, M.; DUCLUZEAU, M. T; ASSOSSOU, O.; HORAND, F.; HAHNE, M.; KAGI, D.; KAISERLIAN, D.; NICOLAS, J. F. Cytotoxicity is mandatory for CD8⁺ T cell-mediated contact hypersensitivity. **J. Exp. Med.**, v. 189, n. 5, p. 779- 786, 1999.

KEPLEY, C. L.; LAUER, F. T.; OLIVER, J. M.; BURCHIEL, S. W. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo(a) pyrene (BaP) and BaP-quinones, enhance IgE-mediated histamine release and IL-4 production in human basophils. **Clin. Immunol.**, v. 107, n.1, p. 10-19, 2003

KIM, J. H.; KIM, H.; LEE, K. Y.; KANG, J. W.; LEE, K. H.; PARK, S. Y.; YOON, H. I.; JHEON, S. H.; SUNG, S. W.; HONG, Y. C. Aryl hydrocarbon receptor gene polymorphisms affect lung cancer risk. **Lung Cancer**, v. 56, n. 1, p. 9-15, 2007.

KIRNBAUER, R.; KOCK, A.; NEUNER, P.; FORSTER, E.; KRUTMANN, J.; URBANSKI, A.; SCHAUER, E.; ANSEL, J. C.; SCHWARZ, T.; LUGER, T. A Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. **J. Invest. Dermatol.**, v. 96, p. 484–489, 1991.

KIRNBAUER, R.; KOCK, A.; SCHWARZ, T.; URBANSKI, A.; KRUTMANN, J.; BORTH, W.; DAMM, D.; SHIPLEY, G.; ANSEL, J. C.; LUGER, T. A. IFN-beta 2, B cell differentiation factor 2, or hybridoma growth factor (IL-6) is expressed and released by human epidermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. **J. Immunol.**, v. 142, p. 1922–1928, 1989.

KLEMME, J.; MUKHTAR, H.; ELMETS, C. Induction of contact hypersensitivity to dimethylbenz[a]anthracene and benzo[a]pyrene in C3H/HeN mice. **Cancer Res.**, v. 47, p. 6074–6078, 1987.

KOPF, M.; BAUMANN, H.; FREER, G.; FREUDENBERG, M.; LAMERS, M.; KISHIMOTO, T.; ZINKERNAGEL, R.; BLUETHMANN, H.; KÖHLER, G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. **Nature**, v. 368, n. 6469, p. 339–342, 1994

KOYANO, S.; SAITO, Y.; FUKUSHIMA-UESAKA, H.; ISHIDA, S.; OZAWA, S.; KAMATANI, N.; MINAMI, H.; OHTSU, A.; HAMAGUCHI, T.; SHIRAO, K.; YOSHIDA, T.; SAIJO, N.; JINNO, H.; SAWADA, J. Functional analysis of six human aryl hydrocarbon receptor variants in a Japanese population. **Drug. Metab. Dispos.**, v. 33, n. 8, p. 1254–1260, 2005.

KRASTEVA, M.; KEHREN, J.; DUCLUZEAU, M. T.; SAYAG, M.; CACCIAPUOTI, M.; AKIBA, H.; DESCOTES, J.; NICOLAS, J. F. Contact Dermatitis I : Pathophysiology of contact sensitivity. **Eur. J. Dermatol.**, v. 9, p. 65–77, 1999 a.

KRASTEVA, M.; KEHREN, J.; DUCLUZEAU, M. T.; SAYAG, M.; DUPUIS, M.; KANITAKIS, J.; NICOLAS, J. F. Contact Dermatitis II: Clinical aspects and diagnosis. **Eur. J. Dermatol.**, v. 9, p. 144–160, 1999 b.

LAHVIS, G. P.; BRADFIELD, C. A. Ahr null alleles: Distinctive or different? **Biochem. Pharmacol.**, v. 56:, p. 781–787, 1998.

LAI, Z. W.; PINEAU, T.; ESSER, C. Identification of dioxin-responsive elements (DREs) in the 5' regions of putative dioxin-inducible genes. **Chem. Biol. Interact.**, v. 100, n. 2, p. 97–112, 1996.

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 Research**, v.62, p. 417–423, 2002.

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.

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

MARIA, D. A.; RIBEIRO, O. G.; PIZZOCARO, K. F.; DE FRANCO M.; CABRERA W. K.; STAROBINAS, N.; GALLOIS, V.; SIQUEIRA, M.; SEMAN, M.; IBANEZ, O. M. Resistance to melanoma metastases in mice selected for high acute inflammatory response **Carcinogenesis**, v. 22, n. 2, p. 337-342. 2001.

MARSTON, C. P.; PEREIRA, C.; FERGUSON, J.; FISCHER, K.; HEDSTROM, O.; DASHWOOD, W. M.; BAIRD, W. M. Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on the tumor initiation, PAH-DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PAH in mouse epidermis. **Carcinogenesis**, v. 22, p.1077-1086, 2001.

MARTIN, S., LAPPIN, M. B; KOHLER, J.; DELATTRE, V.; LEICHT, C.; PRECKEL, T.; SIMON, J. C.; WELTZIEN, H. U. Peptide immunization indicates that CD8⁺ T cells are the dominant effector cells in trinitrophenyl-specific contact hypersensitivity. **J. Invest. Dermatol.**, v. 115, p. 260-266, 2000.

MASTRANGELO, G.; VELLER FORNASE, C.; PAVANELLO, S.; MERCER, G.; LAZZARO, M.; MILAN, E.; FADDA, G.; FEDELI, U.; CLONFERO, E. Polyaromatic hydrocarbons administered in humans by dermal route increase total IgE. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, v. 16, p. 145–150, 2003.

MASTRANGELO, G., VELLER FORNASE, C.; PAVANELLO, S.; MERCER, G.; LAZZARO, M.; MILAN, E. G.; FADDA, E. G.; FEDELI, U.; CLONFERO, E. Polyaromatic hydrocarbons administered in humans by dermal route increase total IgE. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, v. 16, p. 145–150, 2003.

MCFADYEN, M. C.; ROONEY, P. H.; MELVIN, W. T.; MURRAY, G. I. Quantitative analysis of the Ah receptor/cytochrome P450 CYP1B1/CYP1A1 signalling pathway **Biochem Pharmacol.**, v. 15, p. 1663-74, 2003.

MCHALE, J. F.; HARARI, O. A.; MARSHALL, D.; HASKARD, D. O. Vascular endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 at the onset of eliciting contact hypersensitivity in mice: evidence for a dominant role of TNF-alpha. **J. Immunol.**, v. 162, p. 1648–1655, 1999.

MILLER, C. A. Expression of human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 32824–32829, 1997.

MILLER, E. C.; MILLER, J. A. Mechanisms of chemical carcinogenesis. **Cancer**, v.1, p. 1055-1064, 1981.

MIMURA, J.; YAMASHITA, K.; NAKAMURA, K.; MORITA, M.; TAKAGI, T. N.; NAKAO, K.; EMA, M.; SOGAWA, K.; YASUDA, M.; KATSUKI, M.; FUJII-KURIYAMA, Y. Loss of teratogenic response to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. **Genes Cells**, v. 2, p. 645–654, 1997.

MOORE, R. J.; OWENS, D. M.; STAMP, G.; ARNOTT, C.; BURKE, F.; EAST, N.; HOLDSWORTH, H.; TURNER, L.; ROLLINS, B.; PASPARAKIS, M.; KOLLIAS, G.; BALKWILL, F. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. **Nat. Med.**, 5, 828–831, 1999.

MURATA, M.; NISHIMURA, N.; ZHANG, B.; SATOH, M.; TOHYAMA, C. Interleukin-6 protects skin lesion caused by 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 65, n. 4, p. 511-513. 2003.

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

NAKAMURA, K.; WILLIAMS, I. W.; KUPPER, T. S. Keratinocyte-derived chemoattractant protein-1 (MCP-1): analysis in a transgenic model demonstrates that MCP-1 can recruit dendritic and Langerhans cells to the skin. **J. Invest.Dermatol.**, v. 105, p. 635-643, 1995.

NEBERT, D. W.; GELBOIN, H. V. The in vivo and in vitro induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains, and developmental and hormonal states. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 134, n. 1, p. 76-89, 1969.

NEBERT, D. W.; INGLEMAN-SUNDBERG, M.; DALY, A. K. Genetic epidemiology of environmental toxicity and cancer susceptibility: human allelic polymorphism in drug-metabolizing enzymes genes, their functional importance, and nomenclature issues. **Drugs Metab. Rev.**, v. 31, p. 467-487, 1999.

NEVES, A. R.; ENSINA, L. F.; ANSELMO, L. B.; LEITE, K. R.; BUZAID, A. C.; CÂMARA-LOPES, L. H.; BARBUTO, J. A. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon- γ in mixed lymphocyte reactions. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 54, n. 1, p. 61-66, 2005.

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

O'LEARY, J. G.; GOODARZI, M.; DRAYTON, D. L.; VON ANDRIAN, U. H.. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. **Nat. Immunol.**, v. 7, p. 507-516, 2006.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: Curtis. D. Klaassen (Ed.), Editora McGraw-Hill, **Casarett & Doull's Toxicology**. The Basic Science of Poisons, New York, 1996. 5^a Edição v. 6. Cap. 6, p. 113-186; 1996.

PARTRIDGE, M.; CHANTRY, D.; TURNER, M.; FELDMANN, M. Production of interleukin-1 and interleukin-6 by human keratinocytes and squamous cell carcinoma cell lines. **J. Invest. Dermatol.**, v. 96, p. 771-776, 1991.

PASPARAKIS, M.; COURTOIS, G.; HAFNER, M.; SCHMIDT-SUPPRIAN, M.; NENCI, A.; TOKSOY, A.; KRAMPERT, M.; GOEBELER, M.; GILLITZER, R.; ISRAEL, A.; KRIEG, T.; RAJEWSKY, K.; HAASE, I. TNF mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. **Nature**, v. 417, p. 861-866, 2002.

PASTORE, S.; MASCIA, F.; MARIOTTI, F.; DATTILO, C.; MARIANI, V.; GIROLOMONI, G. ERK1/2 Regulates Epidermal Chemokine Expression and Skin Inflammation **J Immunol.**, v. 174, n. 8, p.5047-5056, 2005.

PEI, X. H.; NAKANISHI, Y.; INOUE, H.; TAKAYAMA, K.; BAI, F.; HARA, N. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce IL-8 expression through nuclear factor κ B activation in A549 cell line. **Cytokine**, v. 19, p. 236-241, 2002.

PELLING, J. C.; FISCHER, S. M.; NEADES, R.; STRAWHECKER, J.; SCHWEICKERT, L. Elevated expression and point mutation of the Ha-ras proto-oncogene in mouse skin tumors promoted by benzoyl peroxide and other promoting agents. **Carcinogenesis**, v. 8, p: 1481-1484, 1987.

PELLING, J.C.; SHENG, X.; BETZ, N. A. Role of Ha-ras oncogene in skin cancer. In: Mukhtar, H. (Ed.), **Skin Cancer: Mechanisms and Human Relevance**. Boca Raton: CRC Press, 1995, FL, p. 283-291, 1995.

PHELAN, D.; WINTERS, G. M.; ROGERS, W. J.; LAM, J. C.; DENISON, M. S. Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 3, n. 57, p. 155-163 1998.

PIGUET, P. F.; GRAU, G. E.; HAUSER, C.; VASSALLI, P. Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten induced irritant and contact hypersensitivity reactions. **J. Exp. Med.**, v. 173, p.673-679, 1991.

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.

QIN, Z.; KIM, H.; HERMME, J. BLANKENSTEIN, T. Inhibition of methylcholanthrene-induced carcinogenesis by an interferon receptor-dependent foreign body reaction **J. Exp. Med.**, v.11, p. 1479-1490, 2002.

QUINTANILLA, M.; BROWN, K.; RAMSDEN, M.; BALMAIN, A. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. **Nature**, v.322, p. 78–80, 1986.

RAMAKRISHNA, N. V.; DEVANESAN, P. D.; ROGAN, E. G.; CAVALIERI, E. L.; JEONG, H.; JANKOWIAK, R.; SMALL, G. J. Mechanism of metabolic activation of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 5, p. 220–226, 1992.

RIBEIRO FILHO, O. G. **Inflamação e Granulopoeia: Aspectos Funcionais e Genéticos**. xiii, 118f. Tese (Doutorado – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia) São Paulo, 2003.

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

RUBY, J.; HALLIDAY, G.; MULLER, H. Differential effects of benzo[a]-pyrene and dimethylbenz[a]-anthracene on Langerhans cell distribution and contact sensitization in murine epidermis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 92, p. 150–160, 1989.

RUSHMORE, T. H.; KONG, A. N. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. **Curr. Drug Metab.**, v. 3, p. 481-490, 2002.

RYDZYNSKI, K.; PALCZYNSKI, C. Occupational allergy as a challenge to developing countries. **Toxicology**, v. 198, p. 75–82, 2004.

SADEK C. M.; ALLEN-HOFFMANN, B. L. Cytochrome P450IA1 is rapidly induced in normal human keratinocytes in the absence of xenobiotics. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 23, p. 16067-16074, 1994.

SASAKI, S.; KONDO, T.; SATA, F.; SAIJO, Y.; KATOH, S.; NAKAJIMA, S.; ISHIZUKA, M.; FUJITA, S.; KISHI, R. Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, CYP1A1 and GSTM1 affect infant birth size in Japanese subjects. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 12, n. 2, p. 77-83, 2006.

SAXON, A.; DIAZ-SANCHEZ, D. Diesel exhaust as a model xenobiotic in allergic inflammation. **Immunopharmacology**, v. 48, p. 325–327, 2000.

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

SCHWARZ, T.; LUGER, T. A. Effect of UV irradiation on epidermal cell cytokine production. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 4, p.1–13, 1989.

SCOPPMANN, S. F.; BIRNER, P.; STÖCKL, J.; KALT, R.; ULLRICH, R.; CAUCIG, C.; KRIEHLER, E.; NAGY, K.; ALITALO, K.; KERJASCHKI, D. Tumor-Associated Macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 161, p. 947 – 956 2002.

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

SERHAN, C. N. The lipoxins and the aspirin triggered lipoxins. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.**, v. 73, p: 3-4, 2005.

SERHAN, C. N.; HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 81, n. 17, p: 5335-5339, 1984.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat. Immunol.** v. 6, p: 1191-1197, 2005.

SHIMADA, T.; FUJII-KURIYAMA, Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1 **Cancer Sci.**, v. 95, n. 1, p. 1-6, 2004.

SHIMADA, T.; HAYES, C. L.; YAMAZAKI, H.; AMIN, S.; HECHT, S. S.; GUENGERICH, F. P.; SUTTER, T. R. Activation of chemically diverse procarcinogens by cytochrome P-450 1B1. **Cancer Res.**, v.56, p. 2979–2984 1996.

SHIMIZU, Y.; NAKATSURU, Y.; ICHINOSE, M.; TAKAHASHI, Y.; KUME, H.; MIMURA, J.; FUJII-KURIYAMA, Y.; ISHIKAWA, T. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, p. 779-782, 2000.

SIMS, P.; GROVER, P. L. Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. **Adv. Cancer Res.**, v. 20, p. 165-274, 1974.

SINGH, S.; HORD, N.; PERDEW, G. H. Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 329, p. 47–55, 1996.

SJÖGREN, M.; EHRENBORG, L.; RANNUG, U. Relevance of different biological assays in assessing initiating and promoting properties of polycyclic aromatic hydrocarbons with respect to carcinogenic potency. **Mutat. Res.**, v. 358, n. 1, p. 97-112, 1996.

SMART, J.; DALY, A. K. Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms. **Pharmacogenetics**, v. 10, n. 1, p. 11-24, 2000.

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

SUDBERY, P. **Genética Molecular Humana**. Madrid: Pearson Educación, 2004. p. 396.

SUGANUMA, M.; OKABE, S.; KURUSU, M.; IIDA, N.; OHSHIMA, S.; SAEKI, Y.; KISHIMOTO, T.; FUJIKI, H. Discrete roles of cytokines, TNF-alpha, IL- 1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation. **Int. J. Oncol.**, v. 20, p. 131-136, 2002.

SUI, X.; TSUJI, K.; EBIHARA, Y.; TANAKA, R.; MURAOKA, K.; YOSHIDA, M.; YAMADA, K.; YASUKAWA, K.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T.; NAKAHATA, T. Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor with IL-6 stimulates megakaryopoiesis from human CD34(+) cells through glycoprotein (gp)130 signaling. **Blood**, v. 93, n. 8, p. 2525-2532, 1999.

TAKENAKA, H.; ZHANG, K.; DIAZ-SANCHEZ, D.; TSIEN, A.; SAXON, A. Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 95, p. 103-115, 1995.

TAKENAKA, H.; ZHANG, K.; DIAZ-SANCHEZ D.; TSIEN, A.; SAXON, A. Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 95, p.103-115, 1995.

TAUCHI, M.; HIDA A.; NEGISHI, T.; KATSUOKA F.; NODA, S.; MIMURA, J.; HOSOYA, T.; YANAKA A.; ABURATANI, H.; FUJII-KURIYAMA, Y.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Constitutive Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Keratinocytes Causes Inflammatory Skin Lesions **Mol. Cell. Biol.**, v. 25, n. 21, p. 9360-9368, 2005.

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

THURMOND, L.; LAUER, L.; HOUSE, R.; COOK, J.; DEAN, J. Immunosuppression following exposure to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in Ah-responsive and Ah-nonresponsive mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 91, p. 450- 460, 1987.

TOSATO, G.; PIKE, S. E. Interferon-beta 2/interleukin 6 is a co-stimulant for human T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 141, n. 5, p. 1556-1562, 1988.

TSUJI, R. F.; KAWIKOVA, I.; RAMABHADHAN, R.; AKAHIRA-AZUMA M.; TAUB, D.; HUGLI, T. E.; GERARD, C.; ASKENASE, P. W. Early local generation of C5a initiates the elicitation of contact sensitivity by leading to early T cell recruitment. **J. Immunol.**, v. 165, p. 1588–1598, 2000.

TSUJI, R. F.; SZCZEPANIK, M.; KAWIKOVA, I.; PALIWAL, V.; CAMPOS, R. A.; ITAKURA, A.; AKAHIRA-AZUMA, M.; BAUMGARTH, N.; HERZENBERG, L. A.; ASKENASE, P. W. B cell-dependent T cell responses: IgM antibodies are required to elicit contact sensitivity. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 1277–1290, 2002.

TUCKERMANN, J. P.; KLEIMAN, A.; MCPHERSON, K. G.; REICHARDT, H. M. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 42, p. 71–104, 2005.

VAN SNICK, J. Interleukin-6: an overview. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 253-78, 1990

VASCONCELLOS, P. C.; ARTAXO, P. E.; CICCIONI, P.; CECINATO, A.; BRANCALEONI, E.; FRATTONI, M. Determinação dos hidrocarbonetos saturados e policíclicos aromáticos presentes no material particulado da atmosfera amazônica. **Química Nova**, v. 21, n 4, p. 385-393, 1998.

WALKER, D. B.; WILLIAMS, W. C.; COPELAND, C. B.; SMIALOWICZ, R. J. Persistent suppression of contact hypersensitivity, and altered T-cell parameters in F344 rats exposed perinatally to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). **Toxicology**, v. 197, p. 57–66, 2004.

WANG, B.; ESCHE, C.; MAMELAK, A.; FREED, I.; WATANABE, H.; SAUDER, D. N. Cytokine knockouts in contact hypersensitivity research. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 14, p. 381–389, 2003.

WANG, B.; FUJISAWA, H.; ZHUANG, L.; FREED, I.; HOWELL, B. G.; SHAHID, S.; SHIVJI, G. M.; MAK, T. W.; SAUDER, D. N. CD4⁺ Th1 and CD8⁺ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **J. Immunol.**, v. 165, p. 6783–6790, 2000.

WANG, B.; FELICIANI, C.; FREED, I.; CAI, Q.; SAUDER, D. N. Insights into molecular mechanisms of contact hypersensitivity gained from gene knockout studies. **J. Leukocyte Biol.**, v. 70, p. 185-191, 2001.

WARD, E.C., MURRAY, M. J.; LAUER, L. D.; HOUSE, R.V.; DEAN, J. H. Persistent suppression of humoral and cell mediated immunity in mice following exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene. **Int. J. Pharmacol.**, v. 8, p. 13–22, 1986.

WARD, E. C.; MURRAY, M. J.; LAUER, L. D.; HOUSE, R. V.; IRONS, R.; DEAN, J. H. Immunosuppression following 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene exposure in B6C3F1mice: 1. Effects on humoral immunity and host resistance. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 75, p. 299–308, 1984.

WATANABE, M.; SUEOKA, K.; SASAGAWA, I.; NAKABAYASHI, A.; YOSHIMURA, Y.; OGATA, T. Association of male infertility with Pro185Ala polymorphism in the aryl hydrocarbon receptor repressor gene: implication for the susceptibility to dioxins. **Fertil. Steril.**, v. 82, n. 13, p. 1067-1071, 2004.

WIESER, R. The transforming growth factor-beta signaling pathway in tumorigenesis. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 13, p. 70-77, 2001

WILKINSON, J.; CLAPPER, M. L. Detoxification enzymes and chemoprevention. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 216, p. 192-200, 1997.

WONG, J. M.; OKEY, A. B.; HARPER, P. A. Human aryl hydrocarbon receptor polymorphisms that result in loss of CYP1A1 induction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 288, p. 990—996, 2001.

WU, M. T.; PAN, C. H.; WU, T. N.; HUANG, Y. L.; CHEN, C. Y.; HUANG, L. H.; HO, C. K. Immunological findings in a group of coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **J. Occup. Environ. Med.**, v. 45, p. 1034–1039, 2003.

WU, M. T.; PAN, C. H.; WU, T. N.; HUANG, Y. L.; CHEN, C. Y.; HUANG, L. H.; HO, C. K. Immunological findings in a group of coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **J. Occup. Environ. Med.**, v. 45, p. 1034–1039, 2003.

XIE, H. G.; KIM, R. B.; WOOD, C. M. STEIN, C. M. molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 41, p. 815-850, 2001.

XU, H.; BANERJEE, A.; DILULIO, N. A.; FAIRCHILD, R. L. Development of effector CD8⁺ T cells in contact hypersensitivity occurs independently of CD4⁺ T cells. **J. Immunol.**, v 158, p. 4721-4728, 1997.

YAMAMOTO, O.; TOKURA, Y. Photocontact dermatitis and chloracne: two major occupational and environmental skin diseases induced by different actions of halogenated chemicals. **J. Dermatol. Sci.**, v. 32, p. 85–94, 2003.

YAMAMOTO, O.; TOKURA, Y. Photocontact dermatitis and chloracne: two major occupational and environmental skin diseases induced by different actions of halogenated chemicals. **J. Dermatol. Sci.**, v. 32, p. 85–94, 2003.