PATRÍCIA DOS SANTOS CARNEIRO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES ENVOLVIDOS
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA E CRÔNICA E SUA
INFLUÊNCIA NA CARCINOGENESE QUÍMICA CUTÂNEA EM
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADOS PARA ALTA OU
BAIXA REATIVIDADE INFLAMATÓRIA AGUDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências (Imunologia).

São Paulo

2009

PATRÍCIA DOS SANTOS CARNEIRO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES
ENVOLVIDOS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA E
CRÔNICA E SUA INFLUÊNCIA NA CARCINOGENESE QUÍMICA
CUTÂNEA EM CAMUNDONGOS GENETICAMENTE
SELECIONADOS PARA ALTA OU BAIXA REATIVIDADE
INFLAMATÓRIA AGUDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências (Imunologia).

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Dr Marcelo De Franco

São Paulo

2009

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

© reprodução total

Carneiro, Patrícia dos Santos.

Análise da expressão diferencial dos genes envolvidos na resposta inflamatória aguda e crônica e sua influência na carcinogênese química cutânea e crônica em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda / Patrícia dos Santos Carneiro. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Marcelo de Franco.

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: Analysis of the differential gene expression in the acute or chronic inflammatory responses and its influence in the cutaneous chemical carcinogenesis in mice genetically selected for maximal or minimal acute inflammatory response.

Descritores: 1. Resposta inflamatória 2. Carcinogênese química cutânea 3. Expressão gênica global 4. Células de medula óssea 5. Camundongos fenotipicamente selecionados I. de Franco, Marcelo II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB39/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Patrícia dos Santos Carneiro.

Título da Tese: Análise da expressão diferencial dos genes envolvidos na
resposta inflamatória aguda e crônica e sua influência na
carcinogênese química cutânea e crônica em
camundongos geneticamente selecionados para alta ou
baixa reatividade inflamatória aguda.

Orientador(a): Marcelo de Franco.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AGRADECIMENTOS

À DEUS, causa primária de todas as coisas...

Ao meu pai...

João Batista,

“A paciência é amarga, mas seus frutos são doces”. A paciência é o diamante da personalidade. Muitos discorrem sobre ela, poucos são seus amantes. Mas os que a conquistam colherão os mais excelentes frutos. A paciência tem mais poder do que a força. Não meça um ser humano pelo seu poder político e financeiro. Meça-o pela grandeza dos seus sonhos e pela paciência em executá-los. Mas a paciência precisa de outro remo para conduzir o barco dos sonhos. Qual? Precisa da coragem para correr riscos. Os maiores riscos para quem sonha são as pedras no caminho. Tropeçamos nas pequenas pedras e não nas grandes montanhas. Quem é controlado pelos riscos e pelos perigos das jornadas não tem resistência emocional. Cedo recua. Você tem essa resistência? Os grandes navegadores devem sua reputação aos temporais e às tempestades. Se você tiver medo das tempestades, nunca navegará pelos mares desconhecidos. Jamais conquistará outros continentes.

À minha mãe...

Ana Maria,

“Certa manhã um escritor caminhava por uma praia. De repente avistou uma pessoa que corria à beira do mar e fazia uns gestos que se assemelhavam a uma dança. O escritor aproximou-se e viu um homem que ia pegando estrelas do mar, uma a uma, e as jogava de volta às águas. Ele perguntou ao homem:

- Que é que você está fazendo?

- Estou jogando estrelas de volta ao mar – respondeu o homem.

E o escritor continuou:

- São milhares de estrelas, e você conseguirá salvar muito poucas, não vai fazer diferença...

Nesse momento o homem olhou para o escritor, abaixou-se, pegou uma estrela e jogou-a de volta ao mar, dizendo:

- Para essa fez a diferença.

O escritor ficou pensando naquilo o resto do dia. No dia seguinte resolveu voltar à praia e ajudar o homem a jogar estrelas de volta ao mar. Agora já eram dois... Talvez dali a algum tempo fossem quatro, depois oito...

*Uma visão sem ação é apenas um sonho.
Uma ação sem visão é apenas um passatempo.
Mas uma visão com ação... pode mudar o mundo!*

À minha irmã...

Adriana,

... É muito difícil para nós entendermos os outros, porque não sabemos o que vai em sua alma. As experiências vivenciadas, as feridas e as ilusões sepultadas e escondidas pelo esquecimento da vida atual. Embora apagadas da lembrança, elas permanecem no mundo interior de cada um e se expressam em atitudes e posicionamentos conflitantes e inabituais. Elas são responsáveis por atitudes intempestivas e apaixonadas nem sempre explicáveis pela nossa lógica... Por mais que deseje, não conseguirá modificá-la. O que poderá fazer é mudar a forma como você a vê. Não adianta querer o impossível. Deixe-a ser o que ela é. Dê tempo ao tempo. Sinta que a ama, que ela é sua irmã e não revide. Expresse seu afeto e não se preocupe... As palavras pouco ajudam nesses casos. Mudá-la, ninguém conseguirá. Só ela mesma tem esse poder. No entanto, você pode ir além de visualizar o bem, mostrando afeto com naturalidade, principalmente com sinceridade. Não lhe será difícil, porque na verdade você a quer muito bem. Lembre-se, você não tem condições de saber o que ela guarda no coração. Não conhece as suas razões. O respeito sempre será um santo remédio.

Na tese da minha irmã ela disse que éramos o “avesso do avesso”... alguns anos depois eu digo que somos dois lados de uma mesma moeda... juntas somos uma só... ***Que Deus ilumine nossos passos e atitudes...*** com muito amor e perseverança, chegaremos lá!

Ao meu primeiro e grande amor...

Fabício,

Amar, verbo intransitivo...

Se os olhares se cruzarem e neste momento, houver o mesmo brilho intenso entre eles, fique alerta: pode ser a pessoa que você está esperando desde o dia em que nasceu.

Se o primeiro e o último pensamento do seu dia for essa pessoa ...

Se a vontade de ficar juntos chegar a apertar o coração, agradeça: Deus te mandou um presente divino - o amor.

Se um dia tiverem que pedir perdão um ao outro por algum motivo e em troca receber um abraço, um sorriso, um afago nos cabelos e os gestos valerem mais que mil palavras, entregue-se: vocês foram feitos um para o outro .

Se você conseguir, em pensamento, sentir o cheiro da pessoa como se ela estivesse ali do seu lado ...

Se por algum motivo você estiver triste, se a vida te deu uma rasteira e a outra pessoa sofrer o seu sofrimento, chorar as suas lágrimas e enxugá-las com ternura, que coisa maravilhosa: você poderá contar com ela em qualquer momento de sua vida.

Se você achar a pessoa maravilhosamente linda, mesmo estando ela de pijamas velhos, chinelos de dedo e cabelos emaranhados ...

Se você não consegue trabalhar direito o dia todo, ansioso pelo encontro que está marcado para a noite ...

Se você não consegue imaginar, de maneira nenhuma, um futuro sem a pessoa ao seu lado... É o amor que chegou na sua vida. É uma dádiva.

Se você tiver a certeza que vai ver a outra envelhecendo e, mesmo assim tiver a convicção que vai continuar sendo louco por ela ...

Se você preferir morrer, antes de ver a outra partindo... É o amor que chegou na sua vida !

Por isso, preste atenção nos sinais - não deixe que as loucuras do dia-a-dia o deixem cego para a melhor coisa da vida: muitas pessoas apaixonam-se muitas vezes na vida, mas poucas amam ou encontram um amor verdadeiro. Ou, às vezes encontram e, por não prestarem atenção nesses sinais, deixam o amor passar, sem deixá-lo acontecer verdadeiramente.

Preste atenção nos sinais e não deixe que as loucuras do dia-a-dia o deixem cego para a melhor coisa da vida: O amor ...

Carlos Drummond de Andrade

À minha grande amiga-irmã e “filha”...

Luciana,

Dizem que um bom trabalho é feito de “sangue, suor e lágrimas”... Digamos que essa tese foi feita de sangue (mas não do meu...), um pouco de suor, mas de muitas lágrimas... Obrigada, minha amiga, por secá-las...

... tudo está disponível quando tua vontade é crescer; crescer não é poder, é querer. A vontade de cada um é a única necessidade para estar presente e aprender com a vida. Dá a ti mesmo a oportunidade de estar em quietude, ouve o murmurar das águas, o vento nas folhas, a chuva no rio... Fecha teus olhos e deixa que o mundo interior te conduza a paz, ao amor. A paz não pode ser difícil para aqueles que a desejam. Tem paciência com teus dias, com teus humores, com teus vazios... Tem compreensão para contigo, para com o outro, para com a vida. Tudo tem seu tempo de desabrochar, de florescer aos olhos de Deus. Se forças, perdes o momento onde descansa o aprendizado. Lembra que tens que estar pronto para cada coisa que te chega, ao contrário poderás não a vê-la tão presente no teu aprendizado... Traz a certeza de que tudo que pedires com o teu coração, chegará, mansamente, para ti.

À minha avó, Lucília, que sempre esteve ao meu lado, no princípio amparando meus passos e agora andando juntas... Todo o meu amor e gratidão!

Ao meu orientador, Marcelo De Franco, todo o meu carinho e consideração... após uma largada conturbada, um caminho às vezes tortuoso, enfim uma chegada gloriosa... obrigada, Marcelo, de coração, por esses anos de convivência e crescimento!

À Dra Olga, minha gratidão e total apreço intelectual e emocional...

Ao Prof Gustavo Amarante-Mendes, minha admiração e meu respeito... pelo carinho, pela atenção e por me ensinar tanto a respeito de mim mesma... obrigada especialmente pela colaboração intelectual na construção dessa tese e por abrir meus horizontes profissionais.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunogenética, Orlando, Nancy, Solange Massa, Wafa, Solange Carbonare e Milene.

Aos “companheiros de infortúnio” (hahaha!), amigos do Laboratório de Imunogenética, de todas as gerações, Vinícius, Francisca, Andréa Ramalho, Carla, Andrea Borrego, José Ricardo, Robertinha, Layra, Iana, Débora, Tatiane, Ludmila, Andréa Arruda, Simone, Cristiano, Alessandra, Talita e Jussara.

À Márcia Marçal, companheira para todas as horas... muitas risadas nos momentos de sufoco e experimentos no final de semana...

Aos amigos do ICB, Érica e Rafinha, Ju Bortolato, Cíntia, Ju Kuribaiashi, Claudinha, Janine, Daniel, Welbert, Mari, Jean, Clara, Lu Carvalho, Moki, Jackie, Aninha e tantos outros...

À Sandra Ottoboni, amiga de coração, companheira de todas as horas...

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética, Neuza, Mari Lima, Ronaldo e Tania, obrigada pelo carinho no preparo dos materiais...

Aos funcionários do Biotério, Mari Santos, Hilário, Joel, Sérgio, Celso, obrigada pelo cuidado com nossos animais...

Aos professores participantes da banca de qualificação, Fabíola e Niels, pela maravilhosa contribuição.

Aos Dr Carlos Alberto Moreira Filho e Dr Oswaldo Keith Okamoto, pela orientação e disponibilização do Instituto de Pesquisas do Hospital Albert Einstein.

À Sally Müller Affonso Prado, minha eterna gratidão pela mão estendida no momento crucial...

À Kazumi, Laerte, Adriano e César... muito obrigado pela acolhida maravilhosa e por me tornarem parte da família...

Aos meus irmãos de fé, amigos protetores daqui e de outros mundos, o meu mais profundo agradecimento. Obrigado em especial pela força e pela sustentação nos momentos de dúvida e hesitação...

“A obediência e a resignação são virtudes companheiras da doçura. A obediência é o consentimento da razão; a resignação é o consentimento do coração”.

Força e proteção a todos os que de alguma forma colaboraram nesse trabalho...

Cartão de visitas

Um senhor de 70 anos viajava de trem tendo ao seu lado um jovem universitário que lia o seu livro de ciências. O senhor, por sua vez, lia um livro de capa preta. Foi quando o jovem percebeu que se tratava da Bíblia e estava aberta no livro de Marcos. Sem muita cerimônia o jovem interrompeu a leitura do velho e perguntou:

- O senhor ainda acredita neste livro cheio de fábulas e crendices?

- Sim, mas não é um livro de crendices. É a Palavra de Deus. Estou errado?

- Mas é claro que está! Creio que o senhor deveria estudar a História Universal. Veria que a Revolução Francesa, ocorrida há mais de 100 anos, mostrou a miopia da religião. Somente pessoas sem cultura ainda crêem que Deus tenha criado o mundo em seis dias. O senhor deveria conhecer um pouco mais sobre o que os nossos cientistas pensam e dizem sobre tudo isso.

- É mesmo? E o que pensam e dizem os nossos cientistas sobre a Bíblia?

- Bem, respondeu o universitário, como vou descer na próxima estação, falta-me tempo agora, mas deixe o seu cartão que eu lhe enviarei o material pelo correio com a máxima urgência.

O velho então, cuidadosamente, abriu o bolso interno do paletó e deu o seu cartão ao universitário. Quando o jovem leu o que estava escrito, saiu cabisbaixo sentindo-se pior que uma ameba. No cartão estava escrito:

Professor Doutor Louis Pasteur,
Diretor Geral do Instituto de Pesquisas Científicas,
Universidade Nacional da França.

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima"

A Lição da Borboleta

Um homem, certo dia, viu surgir uma pequena abertura num casulo. Sentou-se perto do local onde o casulo se apoiava e ficou a observar o que iria acontecer, como é que a lagarta conseguiria sair por um orifício tão miúdo. Mas logo lhe pareceu que ela havia parado de fazer qualquer progresso, como se tivesse feito todo o esforço possível e agora não conseguisse mais prosseguir. Ele resolveu então ajudá-la: pegou uma tesoura e rompeu o restante do casulo. A borboleta pôde sair com toda a facilidade... mas seu corpo estava murcho; além disso, era pequena e tinha as asas amassadas.

O homem continuou a observá-la porque esperava que, a qualquer momento, as asas dela se abrissem e se estendessem para serem capazes de suportar o corpo que iria se firmar a tempo. Nada aconteceu! Na verdade a borboleta passou o restante da sua vida rastejando com um corpo murcho e asas encolhidas. Nunca foi capaz de voar.

O que o homem em sua gentileza e vontade de ajudar não compreendia era que o casulo apertado e o esforço necessário à borboleta para passar através da pequena abertura eram o modo pelo qual Deus fazia com que o fluido do corpo daquele pequenino inseto circulasse até suas asas para que ela ficasse pronta para voar assim que se livrasse daquele invólucro.

Algumas vezes o esforço é justamente aquilo de que precisamos em nossa vida. Se Deus nos permitisse passar através da existência sem quaisquer obstáculos, ele nos condenaria a uma vida atrofiada. Não iríamos ser tão fortes como poderíamos ter sido. Nunca poderíamos alçar vôo.

RESUMO

CARNEIRO, P. S. **Análise da expressão diferencial dos genes envolvidos na resposta inflamatória aguda e crônica e sua influência na carcinogênese química cutânea em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda.** 2009. 150 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Camundongos selecionados para a alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) reatividade inflamatória aguda exibem diferenças significativas no desenvolvimento de tumores de pele quimicamente induzidos. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão gênica em células de medula e de pele dos animais AIRmax e AIRmin submetidos a inflamação aguda e crônica. Os animais AIRmax, resistentes ao tumor de pele, apresentam intensa reação inflamatória aguda com predominante migração de células polimorfonucleares e alta expressão dos genes *Il1b*, *Il6*, *Tnf* e *Ifng* após 6 horas do estímulo com TPA, enquanto que nos animais AIRmin a resposta é mais tardia. Aos trinta dias após estímulo, o infiltrado celular (predominantemente mononuclear) é maior nos animais AIRmin, assim como a expressão dos genes *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Ifng* e *Casp8* quando comparados com os AIRmax. A análise da expressão gênica global na medula destes animais 24 h após o estímulo com Biogel, verificamos que no cromossomo 1 existem duas regiões que agrupam genes diferencialmente expressos entre AIRmax e AIRmin: em 70 Mb (*Slc11a1*, *Il1r2*, *Cd28* e *Il8rb*) e em 130 Mb (*Il10* e *Chi3l1*); no cromossomo 3, em 90 Mb (*Tlr2*, *Adam15*, *Ilf2*, *Mcl1*, *Cd53* e *Vcam1*); no cromossomo 6 se agruparam genes diferencialmente expressos relacionados a proliferação celular e transdução de sinal (*Kras2*, *Atp6v1*, *Tnfrsf1*, *Cd9*, *Ccnd2* e *lapp*); e no cromossomo 11, se agruparam em categorias envolvidas na migração celular e reações inflamatórias (*Ccl8*, *Igfbp4*, *Stat3*, *Epx*, *Itga2b*, *Icam2*). Os genes *Cd28*, *Il8rb*, *Il10*, *Tlr2*, *Adam15* e *Stat3* localizados nestas regiões também se mostram diferencialmente expressos nos animais controles. Após o estímulo crônico com TPA, foi verificada que um grupo significativo de genes envolvidos na transdução de sinal são ativados e que outros relacionados à morfogênese de epitélio são reprimidos na medula dos AIRmax. Por outro lado, genes responsáveis por transdução de sinal Rho-GTPase e angiogênese são ativados na medula dos AIRmin e outros envolvidos na proliferação de linfócitos são reprimidos. Esses resultados tomados em conjunto permitem candidatar genes reguladores da inflamação aguda e crônica que influenciem a carcinogênese química cutânea.

Palavras-chave: Resposta inflamatória; Carcinogênese química cutânea; Expressão gênica global; Células de medula óssea; Camundongos fenotipicamente selecionados.

ABSTRACT

CARNEIRO, P. S. **Analysis of the differential gene expression in the acute or chronic inflammatory responses and its influence in the cutaneous chemical carcinogenesis in mice genetically selected for maximal or minimal acute inflammatory response.** 2009. 150 f. (PhD Thesis - Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Mice selected for high (AIRmax) or low (AIRmin) acute inflammatory reactivity exhibit significant differences in the development of chemically induced tumors of the skin. The objective of this study was to analyze gene expression in cells of bone marrow and skin of animals AIRmax and AIRmin subjected to acute and chronic inflammation. Resistant skin tumor AIRmax mice have an intense acute inflammatory reaction with predominant migration of polymorphonuclear cells and high expression of *Il1b*, *Il6*, *Tnf* and *Ifng* genes after 6 hours of TPA stimulation, while in AIRmin animals these responses take more time. After thirty days, the cellular infiltrate (mostly mononuclear) is higher in AIRmin as well as the *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Ifng* and *Casp8* gene expressions when compared with AIRmax mice. The global gene expression analysis in the bone marrow cells of these animals, 24 h after stimulation with Biogel, showed on chromosome 1 two regions that grouped differentially expressed genes between AIRmax and AIRmin: in 70 Mb (*Slc11a1*, *Il1r2*, *Cd28* and *Il8rb*) and 130 Mb (*Il10* and *Chi3l1*); on chromosome 3, at 90 Mb (*Tlr2*, *Adam15*, *Ilf2*, *Mcl1*, *Cd53* and *Vcam1*); on chromosome 6 are grouped differentially expressed genes related to cell proliferation and signal transduction (*Kras2*, *Atp6v1*, *Tnfrsf1*, *Cd9*, *Ccnd2* and *lapp*); and on chromosome 11 are grouped into categories involved in cell migration and inflammatory reactions (*Ccl8*, *Igfbp4*, *Stat3*, *Epx*, *Itga2b*, *Icam2*). The *Cd28*, *Il8rb*, *Il10*, *Tlr2*, *Adam15* and *Stat3* genes found in these regions were also differentially expressed in control animals. After TPA chronic stimulation, it was observed that a significant group of genes involved in signal transduction are activated and others related to the epithelium morphogenesis are suppressed in the AIRmax bone marrow cells. Moreover, genes involved in Rho-GTPase signal transduction and angiogenesis are activated in the AIRmin bone marrow cells and others implicated in the proliferation of lymphocytes are repressed. Taken together, these results allow candidate genes regulating the acute and chronic inflammation affecting the skin chemical carcinogenesis

Keywords: Inflammatory response; Skin chemical carcinogenesis; Global gene expression; Bone marrow cells; Phenotype selected mice.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – ácido araquidônico

AINEs – Anti-inflamatórios não-esteróides

AIR – resposta inflamatória aguda

AIRmax – Linhagem de camundongos selecionados para alta resposta inflamatória aguda

AIRmin – Linhagem de camundongos selecionados para baixa resposta inflamatória aguda

BALB/c – Linhagem de camundongos isogênica

COX-1 – ciclooxigenase-1

COX-2 – ciclooxigenase-2

DBA – Linhagem de camundongos isogênica

DMBA – 9,10- dimetilbenzoantraceno

DMH – 1,2- dimethylhydrazine

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

IP-10 – Proteína 10 induzida por interferon

LTB₄ – Leucotrieno B₄

LX – Lipoxina

MCP-1 – *Monocyte chemoattractant Protein- 1*

MIP-1 α – *Macrophage Inhibitory protein - 1 α*

NF- κ B – Fator nuclear- κ B

NO – Óxido Nítrico

O₂⁻ - Ânion superóxido

PBS – Solução Salina em tampão fosfato

PG – Prostaglandina

PGE₂ – prostaglandina E₂

PMN – Polimorfonucleares

qPCR – PCR quantitativo

QTL – *Quantitative Trait Loci*

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

TXB₂ – Tromboxana B₂

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Resolução e inflamação crônica	37
Figura 2: Processo de geração das linhagens AIRmax e AIRmin	47
Figura 3: Distribuição dos valores fenotípicos (celularidade e exsudato protéico) nas linhagens isogênicas, na F0 e nas linhagens AIRmax e AIRmin.....	47
Figura 4: Gráficos fornecidos pelo programa “Opticon Monitor Analysis Software 2.03” para o qPCR de um gene constitutivo.....	63
Figura 5: Gráficos fornecidos pelo programa “Opticon Monitor Analysis Software 2.03” para o qPCR de um gene alvo	64
Figura 6: Cinética da incidência de tumorigênese cutânea em animais AIRmax e AIRmin	73
Figura 7: Cinética da multiplicidade de tumorigênese cutânea em animais AIRmax e AIRmin.....	73
Figura 8: Lesões papilomatosas observadas em animais AIRmax e AIRmin submetidos ao tratamento de indução de tumorigênese cutânea em dois estágios (DMBA/TPA) aos 100 dias	74
Figura 9: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de animais AIRmin sacrificados 6 horas após os tratamentos. Coloração hematoxilina-eosina. (A) Animal controle tratado com acetona; (B) e (C) Animais tratados com uma dose de TPA (10µg/0,1 ml de acetona)	77
Figura 10: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de animais AIRmin sacrificados 24 horas após os tratamentos. Coloração hematoxilina-eosina. (A) Animal controle tratado com acetona; (B) e (C) Animais tratados com uma dose de TPA (10µg/0,1 ml de acetona)	77
Figura 11: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de animais AIRmin sacrificados 30 dias após os tratamentos. Coloração hematoxilina-eosina. (A) Animal controle tratado com acetona; (B) e (C) Animais tratados com duas aplicações semanais de TPA (1µg/0,1 ml de acetona)	77

Figura 12: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de animais AIRmax sacrificados 6 horas após os tratamentos. Coloração hematoxilina-eosina. (A) Animal controle tratado com acetona; (B) e (C) Animais tratados com uma dose de TPA (10µg/0,1 ml de acetona) 78

Figura 13: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de animais AIRmax sacrificados 24 horas após os tratamentos. Coloração hematoxilina-eosina. (A) Animal controle tratado com acetona; (B) e (C) Animais tratados com uma dose de TPA (10µg/0,1 ml de acetona) 78

Figura 14: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de animais AIRmax sacrificados 30 dias após os tratamentos. Coloração hematoxilina-eosina. (A) Animal controle tratado com acetona; (B) e (C) Animais tratados com duas aplicações semanais de TPA (1µg/0,1 ml de acetona) 78

Figura 15: Cinética da expressão do gene da IL-1 α na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens 80

Figura 16: Cinética da expressão do gene da IL-1 β na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens 81

Figura 17: Cinética da expressão do gene da IL-6 na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens 82

Figura 18: Cinética da expressão do gene da IL-12 na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens 83

Figura 19: Cinética da expressão do gene da TNF- α na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens 84

Figura 20: Cinética da expressão do gene da IFN- γ na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens 85

Figura 21: Cinética da expressão do gene da IL-4 na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.....	86
Figura 22: Cinética da expressão do gene da IL-10 na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.....	87
Figura 23: Cinética da expressão do gene da TGF- β 1 na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.....	88
Figura 24: Cinética da expressão do gene da Caspase 8 na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens	89
Figura 25: Controles negativos da lâmina de microarray. As seqüências alvo dos mRNAs bacterianos estão distribuídas aleatoriamente pela lâmina.....	90
Figura 26: Controles positivos da lâmina de microarray. As seqüências alvo dos mRNAs bacterianos estão distribuídas aleatoriamente pela lâmina.....	91
Figura 27: Representação gráfica da expressão gênica de células de medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin submetidos ao estímulo com Biogel.....	91
Figura 28: Número de genes ativados e reprimidos na medula óssea de animais das linhagens AIRmax e AIRmin após o estímulo com Biogel 24 horas.	93
Figura 29: Número de genes diferencialmente expressos nos animais controles e estimulados com Biogel 24 horas.....	96
Figura 30: Representação gráfica da expressão gênica de células de medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin controle, submetidos ao estímulo com acetona	99
Figura 31: Número de genes ativados e reprimidos na medula óssea de animais das linhagens AIRmax e AIRmin após o estímulo com TPA 30 dias	100
Figura 32: Número de genes diferencialmente expressos (AIRmax/AIRmin) nos animais controles e estimulados com TPA 30 dias	102

Figura 33: Níveis de IL-1 β secretados no plasma estimulado com diferentes doses de LPS e ATP	105
Figura 34: Níveis de TNF- α secretados no plasma estimulado com diferentes doses de LPS e ATP	105
Figura 35: Correlação entre secreção de IL-1 β e influxo celular local na população F2	107
Figura 36: Expressão de mRNA para Caspase 8 em pele de animais AIRmax e AIRmin tratados com TPA em dose única de 10 μ g para 6 e 24 horas e em duas doses semanais de 1 μ g para 30 dias.....	109
Figura 37: Correlação da expressão de mRNA para <i>Caspase 8</i> em pele de animais AIRmax e AIRmin estimulados com TPA 30 dias com os alelos a e b	109
Figura 38: Modelo proposto de resistência a tumorigênese induzida quimicamente em animais geneticamente selecionados para alta resposta inflamatória aguda (AIRmax)	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comportamento das linhagens AIRmax e AIRmin frente a diferentes patologias experimentais induzidas.....	49
Tabela 2: Seqüência dos primers utilizados para identificação de polimorfismos nos genes <i>Caspase 8</i> e do <i>P2x7r</i>	59
Tabela 3: Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para a realização dos ensaios de qPCR.....	65
Tabela 4: Níveis de infiltrado celular e sua relação com os tempos após a aplicação epicutânea de TPA nos animais AIRmax e AIRmin	76
Tabela 5: Correlações entre as expressões gênicas obtidas no qPCR e microarray de células de medula óssea de camundongos estimulados com Biogel 24 horas	92
Tabela 6: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes ativados nos animais AIRmax após o estímulo com Biogel 24 horas	94
Tabela 7: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes reprimidos nos animais AIRmax após o estímulo com Biogel 24 horas.....	94
Tabela 8: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes ativados nos animais AIRmin após o estímulo com Biogel 24 horas	94
Tabela 9: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes reprimidos nos animais AIRmin após o estímulo com Biogel 24 horas.....	95
Tabela 10: Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão >4 vezes nos animais controles da linhagem AIRmax comparados aos AIRmin	96
Tabela 11: Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão >4 vezes nos animais controles da linhagem AIRmin comparados aos AIRmax	97
Tabela 12: Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão >4 vezes nos animais AIRmax após o estímulo com Biogel 24 horas comparados aos AIRmin	97

Tabela 13: Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão >4 vezes nos animais AIRmin após o estímulo com Biogel 24 horas comparados aos AIRmax	98
Tabela 14: Correlações entre as expressões gênicas obtidas no qPCR e microarray de células de medula óssea de camundongos estimulados com TPA durante 30 dias.....	99
Tabela 15: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes ativados nos animais AIRmax após o estímulo com TPA 30 dias	101
Tabela 16: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes reprimidos nos animais AIRmax após o estímulo com TPA 30 dias	101
Tabela 17: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes ativados nos animais AIRmin após o estímulo com TPA 30 dias	101
Tabela 18: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes reprimidos nos animais AIRmin após o estímulo com TPA 30 dias	102
Tabela 19: Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão >4 vezes nos animais AIRmax após o estímulo com TPA 30 dias comparados aos AIRmin	103
Tabela 20: Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão >4 vezes nos animais AIRmin após o estímulo com TPA 30 dias comparados aos AIRmax	103
Tabela 21: Genotipagem do <i>P2x7r</i> nos animais AIRmax e AIRmin.....	104
Tabela 22: Genotipagem do <i>P2x7r</i> e níveis de IL-1 β secretada após estímulo	106
Tabela 23: Frequência dos alelos da <i>Caspase 8</i> nos animais AIRmax e AIRmin	108

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 A Inflamação	27
1.2 Resolução x Inflamação Crônica	36
1.3 A inflamação e o câncer: uma relação controversa	40
1.4 A utilização de modelos animais	44
1.5 O modelo de seleção genética bidirecional para inflamação aguda	46
1.6 Diferenças de sub-fenótipos nas linhagens AIRmax e AIRmin.....	49
2 OBJETIVOS.....	54
3 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 Animais	55
3.2 Indução de inflamação aguda por Biogel.....	55
3.3 Indução de inflamação aguda por TPA	56
3.4 Indução de inflamação crônica por TPA	56
3.5 Indução da tumorigênese cutânea	56
3.6 ELISA.....	56
3.7 Histológico.....	57
3.8 Extração de DNA genômico	58
3.9 Análise do polimorfismo da <i>Caspase 8</i> e do <i>P2x7r</i>.....	58
3.10 Extração de RNA de pele	60
3.11 Extração de RNA de medula.....	60
3.12 <i>Clean-up</i> do RNA	60
3.13 Síntese do cDNA	61
3.14 PCR em tempo real ou quantitativo (qPCR).....	62
3.14.1 <i>Primers</i>.....	64
3.15 <i>Microarrays</i>.....	65
3.15.1 Preparação dos mRNAs bacterianos.....	65
3.15.2 Preparação do cDNA de fita simples	66
3.15.3 Preparação do cDNA de fita dupla.....	66
3.15.4 Purificação do cDNA de fita dupla	66
3.15.5 Síntese do cRNA por transcrição <i>in vitro</i>.....	67
3.15.6 Purificação do cRNA	67

3.15.7 Fragmentação do cRNA.....	68
3.15.8 Hibridização	68
3.15.9 Detecção com <i>Cy5-Streptavidina</i>	68
3.15.10 Análise dos dados obtidos.....	69
CodeLink Gene Expression System	69
SAM (Significance Analysis of Microarrays).....	69
EASE (Expression Analysis Systematic Explorer).....	70
3.16 Ensaios Biológicos	70
3.16.1 IL-1 β	70
3.16.2 <i>Caspase 8</i>	71
3.17 Análise estatística	71
4 RESULTADOS.....	72
4.1 Incidência de tumores de pele induzidos por DMBA-TPA.....	72
4.2 Multiplicidade de tumores de pele induzidos por DMBA-TPA	72
4.3 Dosagem de citocinas séricas através do método de ELISA.....	74
4.4 Avaliação histológica da pele submetida aos protocolos de inflamação aguda e crônica	74
4.5 Quantificação da expressão gênica de citocinas na pele pelo método do <i>Real – Time PCR</i> (qPCR).....	79
4.6 Avaliação da expressão gênica global de células de medula óssea de camundongos estimulados com Biogel pelo método de <i>Microarray</i>	90
4.7 Avaliação da expressão gênica global de células de medula óssea de camundongos estimulados com TPA pelo método de <i>Microarray</i>	98
4.8 Ensaios biológicos.....	103
4.8.1 IL-1 β	103
4.8.2 <i>Caspase 8</i>	107
5 DISCUSSÃO	111
6 CONCLUSÕES	131
REFERÊNCIAS.....	134
ANEXOS	150
Anexo A – Lista de genes com expressão 4 vezes maior nos animais AIRmax controle em relação aos AIRmin	150

Anexo B – Lista de genes com expressão 4 vezes maior nos animais AIRmin controle em relação aos AIRmax	151
Anexo C – Lista de genes com expressão 4 vezes maior nos animais AIRmax estimulados com Biogel 24 horas em relação aos AIRmin	153
Anexo D – Lista de genes com expressão 4 vezes maior nos animais AIRmin estimulados com Biogel 24 horas em relação aos AIRmax.....	157
Anexo E – Lista de genes com expressão 4 vezes maior nos animais AIRmax estimulados com TPA 30 dias em relação aos AIRmin	158
Anexo F – Lista de genes com expressão 4 vezes maior nos animais AIRmin estimulados com TPA 30 dias em relação aos AIRmax.....	162
Anexo G – Lista de genes em comum modulados nos animais AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho) submetidos a inflamação aguda (Biogel) e crônica (TPA)...	164
Anexo H – Artigo “Slc11a1 (Nramp1) alleles interact with acute inflammation loci to modulate wound-healing traits in mice”, Mamm. Genome, doi: 10.1007/s00335-007-9012-x, 2007	167
Anexo I – Artigo “Gene expression profiles of bone marrow cells from mice phenotype-selected for maximal or minimal acute inflammations: searching for genes in acute inflammation modifier loci”, pré-print, Immunology, doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03032.x, 2009	174

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Inflamação

A inflamação é um processo fisiológico acionado toda vez em que um agente agressor físico, químico ou biológico, ultrapassa uma barreira primária de defesa do corpo humano – a camada epitelial e/ou endotelial e suas estruturas especializadas. A inflamação tem como objetivo principal recompor a homeostase do tecido lesado através da ativação dos componentes específicos e não específicos da imunidade. No primeiro caso, são importantes o processo de reconhecimento e a geração de células efectoras e seus produtos (citocinas e anticorpos). O componente não específico atua através da destruição, diluição ou isolamento do agente agressor (GALLIN et al., 1992; PAUL, 1998), envolvendo a ação de células fagocíticas e de mediadores, bem como sua migração para o sítio de injúria.

Durante o processo inflamatório agudo ocorrem diversos eventos mediados por componentes solúveis, celulares e vasculares que induzem alterações morfológicas e bioquímicas. Entre eles, podemos observar três eventos principais: (a) aumento do calibre das arteríolas, capilares e vênulas, cujo objetivo é causar um aumento de permeabilidade e de fluxo sanguíneo; (b) exsudação de líquido, incluindo proteínas plasmáticas como albumina, fatores do complemento e anticorpos, e (c) migração de leucócitos do espaço intravascular para o foco inflamatório (GALLIN et al., 1992; PAUL, 1998). Juntos, esses eventos caracterizam os sinais clássicos da inflamação: rubor, calor, tumor, dor e perda de função.

O estímulo inflamatório induz a formação e a liberação de substâncias farmacologicamente ativas, capazes de gerar mudanças na morfologia e integridade das células endoteliais. São fatores solúveis, como histamina e cininas, que promovem alterações no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular. Várias células têm sido responsabilizadas por iniciar a cascata de eventos dos processos inflamatórios. Entre elas, destacam-se os mastócitos, que são células que sintetizam e estocam no interior dos seus grânulos mediadores inflamatórios, como a própria histamina, leucotrienos, prostaglandinas e

proteases. Além desses, ocorre produção e liberação de citocinas do tipo IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-14, TNF- α e de quimiocinas como MIP-1 α , MCP-1 e linfotaxinas (BERNOIST e MATHIS, 2002), que irão participar do recrutamento inicial dos leucócitos.

A vasodilatação é uma das primeiras mudanças físicas em resposta ao estímulo inflamatório. Em situações fisiológicas, as células endoteliais funcionam como uma barreira semipermeável, restringindo as proteínas plasmáticas ao espaço intravascular. Como consequência da mudança conformacional do endotélio, ocorrem dois eventos importantes: o aumento do leito dos capilares, promovendo maior aporte sanguíneo e levando à vermelhidão e ao calor locais; e aumento da permeabilidade vascular, que ocorre por contração das células endoteliais pós-capilares (MAJNO e PALADE, 1961) e pela abertura de canais intracelulares nas próprias células endoteliais (LAMPUGNANI e DEJANA, 1997). Este último permite a saída de fluido plasmático rico em proteínas do interior dos vasos para o interstício e a presença de proteínas plasmáticas no tecido, como a albumina, provoca um aumento da pressão oncótica intersticial que leva a um maior extravasamento de plasma. Dependendo do volume de líquido extravasado e da eficiência do sistema de drenagem linfática, pode ocorrer um aumento no volume local: o edema.

Como consequência das mudanças morfo-estruturais sofridas pelas células endoteliais e pelas intersticiais, suas membranas plasmáticas são rapidamente remodeladas gerando mediadores lipídicos biologicamente ativos. Os fosfolípidos da membrana são clivados pela enzima fosfolipase A₂, que é detectável em quase todos os tipos celulares, gerando o ácido araquidônico (AA) (STACK e DuBOIS, 2001; ROCCA e FITZGERALD, 2002). O AA livre pode ser metabolizado por duas vias enzimáticas distintas: a da ciclooxigenase, gerando os prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanas), e a da lipoxigenase, gerando os leucotrienos e as lipoxinas (STACK e DuBOIS, 2001). Estes metabólitos, conhecidos como eicosanóides, podem modular a resposta inflamatória através de seus efeitos sobre o endotélio e sobre os leucócitos.

Os prostanóides podem ser gerados pelas duas isoformas da enzima ciclooxigenase (COX): COX-1 e COX-2, ambas encontradas nas membranas do retículo endoplasmático e na membrana nuclear. A COX-1 está presente na

maioria das células e sua expressão é constitutiva, sendo responsável pela síntese fisiológica de prostanóides. A COX-2 tem sua expressão induzida por estímulos inflamatórios e apresenta cerca de 60% de homologia com a COX-1, sendo expressa constitutivamente apenas no sistema nervoso central e nos glomérulos renais (SMITH e LANGENBACH, 2001; ROCCA e FITZGERALD, 2002)

As prostaglandinas (PGs) têm funções importantes na manutenção da homeostase, estando envolvidas na manutenção da integridade do epitélio das mucosas, e das funções cardiovascular e renal. São essenciais ainda para a implantação da célula-ovo no início da gestação, para a angiogênese necessária ao estabelecimento da placenta, e para a contração uterina durante o trabalho de parto. (VANE et al., 1998; STACK e DuBOIS, 2001)

As PGs contribuem para o estabelecimento do edema devido ao seu efeito vasodilatador (TILLEY et al., 2001). São responsáveis ainda pela febre e pela dor. Como agente pirético, as PGs tem sua expressão induzida por citocinas como a interleucina-1 (JAKOBSSON et al., 1999). A dor inflamatória não é causada diretamente pelas PGs, mas estas contribuem para tal porque abaixam o limiar dos receptores algésicos, nos quais age a bradicinina, por exemplo (TILLEY et al., 2001).

As tromboxanas (TXs) também estão presentes nos exsudatos inflamatórios, porém sua função como mediador ainda é pouco conhecida. Estudos mostram que este prostanóide é responsável pela vasoconstrição e formação de trombos que visam isolar o foco inflamatório, sendo importante também na formação do edema e no influxo de neutrófilos, através da indução de moléculas de adesão (WILES et al., 1991).

Os leucotrienos (LTs), ao contrário dos prostanóides, são produzidos predominantemente em células inflamatórias pela 5-lipoxigenase, enzima que está presente no citosol e no núcleo de células não-ativadas e que se transloca após a ativação celular para a membrana nuclear. Estes metabólitos são responsáveis pelo recrutamento dos leucócitos para o local injuriado, mediando a quimiotaxia e a aderência ao endotélio vascular (RADOMSKI et al., 1987 a-d), além de induzirem a desgranulação, o “burst” oxidativo e a liberação de enzimas dos grânulos (BORGEAT e NACCACHE, 1990).

Outro mecanismo importante no processo inflamatório agudo envolve a ativação do sistema complemento com a produção de fragmentos com atividade quimiotática e de anafilaxina, C3a e C5a. Estes promovem a liberação de substâncias pró-inflamatórias, as aminas vasoativas, a partir de células especializadas residentes ou posteriormente atraídas ao local da injúria. O componente C5 pode ser derivado do plasma ou ser produzido localmente por fibroblastos ou macrófagos. Sua clivagem ocorre sob a ação de serino proteases localizadas nas membranas celulares produzindo o fragmento C5a, um potente agente flogístico, cuja função na produção de citocinas e quimiocinas é descrita (HUBER-LANG et al., 2002).

Uma das principais funções da inflamação é recrutar os leucócitos diretamente ao local da injúria. Os leucócitos participam ativamente do processo inflamatório, ingerindo os agentes agressores, impedindo o crescimento de um eventual microrganismo patogênico, removendo restos celulares da área afetada, degradando o tecido necrótico e iniciando a reparação tecidual (FORD-HUTCHINSON, 1992). O extravasamento dos leucócitos da corrente sanguínea para o tecido perivascular (diapedese) ocorre através de três passos coordenados: rolamento dos leucócitos sobre a parede endotelial, adesão firme às células endoteliais e, finalmente, a transmigração para o acúmulo no sítio de injúria (SPRINGER et al., 1995).

Devido ao aumento da permeabilidade vascular ocorre uma hemoconcentração que diminui a velocidade do fluxo sanguíneo local. Além disso, a agregação das hemácias desloca os leucócitos e estes, que em situações fisiológicas circulam pelo eixo central do vaso (as hemácias circulam na periferia), fluem sobre o endotélio das vênulas pós-capilares, favorecendo interações com a superfície do endotélio (PEARSON e LIPOWSKY, 2000). Essas interações se dão através das moléculas de adesão.

As moléculas de adesão são classificadas de acordo com suas propriedades bioquímicas e bases moleculares. As três principais famílias de moléculas de adesão são as selectinas, a superfamília das imunoglobulinas (IgSF) e as integrinas (HOGG, 1989; BRANDLEY et al., 1990; SPRINGER, 1990; BEVILACQUA et al., 1991; SPRINGER e LASKY, 1991).

O contato inicial entre as células inflamatórias e o endotélio é transiente e é chamado de comportamento “rolling” ou rolamento (fluxo lento dos leucócitos sobre o endotélio dos vasos), e é seguido pela adesão firme e transmigração, sendo as etapas acima descritas coordenadas pela interação dinâmica entre moléculas de adesão expressas na superfície das células endoteliais e dos leucócitos (BUTCHER, 1991), fatores de atração e seus receptores (BUTCHER, 1991; SPRINGER, 1994).

Os eventos iniciais de migração são mediados pelas moléculas chamadas selectinas. Entre as selectinas destacam--se a E-selectina e a P-selectina, presentes no endotélio ativado e em plaquetas, e a L-selectina, também chamada de CD62L, presente constitutivamente nos leucócitos (LEY et al., 1991; GRANGER e KUBES, 1994). O papel desta classe de moléculas de adesão é formar ligações de baixa afinidade entre os leucócitos e a parede endotelial, diminuindo a velocidade dos mesmos dentro das vênulas pós-capilares, promovendo a etapa de captura e o rolamento (SPRINGER, 1995; MULLER, 2002). Enquanto os leucócitos rolam sobre o endotélio, devido à força motriz exercida pelo fluxo sanguíneo (GRANGER e KUBES, 1994), eles são ativados por quimiocinas e outros fatores atraentes, mudando seu padrão de expressão de receptores de superfície tanto para estas substâncias, como para as moléculas de adesão (VIDEM e STRAND, 2004). Como consequência da ativação, ocorre uma redistribuição das integrinas leucocitárias, seguindo-se uma mudança conformacional nas mesmas, facilitando assim a aderência firme às moléculas da superfamília das imunoglobulinas, expressas no endotélio ativado. O aumento da aderência leva a uma diminuição do rolamento dos leucócitos, fazendo com que os mesmos parem, apesar do fluxo sanguíneo contínuo (DIAMOND e SPRINGER, 1993; MULLER, 2002).

As citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-1, IL-4, IL-6 e IFN- γ também participam desse processo, na medida em que modulam a transcrição e a expressão de moléculas de adesão e fatores quimiotáticos na célula endotelial e induzem a migração seletiva dos leucócitos (ISSEKUTZ e ISSEKUTZ, 1993; GRANGER e KUBES, 1994; TILG et al., 1997; JAGELS et al., 1999; MIYATA et al., 1999; SHARP et al., 2001).

Firmemente aderidos ao endotélio, os leucócitos iniciam então o processo de transmigração do espaço intra para o extravascular, através das junções endoteliais (CINES et al., 1998), utilizando as mesmas moléculas de adesão que as células endoteliais usam para ficarem unidas.

O tipo de leucócito que migra para o tecido vai variar de acordo com a natureza e o tempo decorrido a partir do início da lesão/estímulo inflamatório. Na maioria das vezes, na inflamação aguda, os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório durante as primeiras 24 horas, sendo substituídos por monócitos/macrófagos após este período (GALLIN et al., 1992; LLOYD e OPPENHEIM, 1992).

Uma vez tendo atravessado o endotélio e penetrado nos tecidos, os leucócitos devem interagir com proteínas da matriz extracelular. À medida que as células deixam os vasos sanguíneos, elas perdem algumas de suas moléculas de superfície, como a L-selectina, que não são mais necessárias, e seguem para o foco inflamatório através de um processo chamado quimiotaxia, que pode ser definido como uma locomoção orientada de acordo com um gradiente de concentração formado por substâncias endógenas ou exógenas a partir do sítio de injúria (DEVREOTES e ZIGMOND, 1988). Entre as substâncias endógenas, que são fatores quimiotáticos, temos: os componentes do sistema complemento, particularmente C5a, os metabólitos do ácido araquidônico da via da lipoxigenase, principalmente o leucotrieno B₄, e citocinas, particularmente da família das quimiocinas (SNYDERMAN e UHING, 1992; MILLER e KRANGEL, 1992).

Existem 40 ou mais quimiocinas diferentes que podem ser classificadas, de acordo com a localização dos resíduos de cisteína próximos a porção amina terminal (NH₂), em 4 famílias principais: CXC ou alfa, como a IL-8, que age sobre neutrófilos e células de reparação tecidual; CC ou beta, como MCP-1, MIP-1 α ou RANTES, que tendem a atuar sobre monócitos e em alguns casos sobre eosinófilos (SPRINGER, 1995); C ou gama, que agem sobre células B, T, NKT e neutrófilos e CX3C ou delta, que agem somente sobre as células T efectoras (CHRISTOPHERSON II e HROMAS, 2001). Estas moléculas se ligam a receptores acoplados a proteína G, com 7 domínios transmembrânicos, que são classe-específicos: CXCR ligam quimiocinas CXC; CCR ligam quimiocinas CC;

XCR ligam quimiocinas C; e CX3CR ligam quimiocinas CX3C (ROSSI e ZLOTNIK, 2000).

As quimiocinas e seus receptores estão envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos, como no processo de organogênese, no controle do tráfego dos linfócitos, no recrutamento celular, no desenvolvimento de células Th1 e Th2, na angiogênese, na metástase, na inflamação e na cicatrização (ROSSI e ZLOTNIK, 2000).

As quimiocinas possuem papel fundamental no processo de transmigração leucocitária, atraindo grupos diferentes de leucócitos, de acordo com a situação patológica, principalmente em tecidos periféricos, ainda que sejam pertencentes à mesma família (MACKAY, 2001). As primeiras células que são recrutadas e migram para o foco inflamatório são os leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, seguidos pelos monócitos/macrófagos (GALLIN et al., 1992; LLOYD e OPPENHEIM, 1992).

Além de estimular a locomoção, muitos fatores quimiotáticos, principalmente em altas concentrações, induzem a ativação leucocitária, que tem como função principal a fagocitose e morte de microorganismos patogênicos, e a remoção de debris, permitindo a regeneração tecidual e o restabelecimento da homeostase (TIDBALL, 1995; VIDEM e STRAND, 2004).

Neutrófilos e macrófagos ativados sintetizam e secretam vários mediadores pró-inflamatórios como citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α), eicosanóides (LTB₄, PGE₂, TXB₂), fatores hematopoiéticos (GM-CSF; G-CSF; M-CSF), além de moléculas efetoras microbidas (H₂O₂ e NO) (FANTONE e WARD, 1982; KOLB e KOLB-BACHOFEN, 1992; LLOYD e OPPENHEIM, 1992; NAKAMURA et al., 2003).

As citocinas são proteínas produzidas por vários tipos celulares, durante as respostas imunes e inflamatórias, e sua secreção é transiente e estritamente regulada. São pleiotrópicas podendo agir em diferentes tecidos e tipos celulares, e algumas tem efeito redundante, agindo na síntese ou ação de outra. Elas têm sido identificadas como os principais mediadores responsáveis pela modulação da função de outras células envolvidas nas respostas imunes, além de induzir a expressão de moléculas de adesão (POBER, 1987), estando envolvidas numa grande variedade de situações inflamatórias (DINARELLO, 1991).

As moléculas microbicidas são formadas após a ativação dos neutrófilos e macrófagos, pela ingestão do agente agressor. A fagocitose estimula um aumento do consumo de oxigênio e o metabolismo da glicose pela via da hexose monofosfato gerando os reativos intermediários do oxigênio (Reactive Oxygen Intermediate: ROI) (FANTONE e WARD, 1982), fenômeno este conhecido como “burst oxidativo”. Este aumento do consumo de oxigênio tem como resultado a secreção do ânion superóxido (O_2^-) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais são produzidos dentro dos peroxissomos. Estes metabólitos são capazes de se inserir na camada bilipídica da membrana plasmática dos microorganismos, quebrando assim o equilíbrio homeostático do mesmo (FLOHÉ et al., 1979; PICK e KEISARI, 1980).

Da mesma maneira que os ROI, os reativos intermediários do nitrogênio (Reactive Nitrogen Intermediate: RNI) são produzidos após o contato dos fagócitos com os agentes infecciosos ou inflamatórios, a partir de uma reação de oxidação, sendo o óxido nítrico (NO), a molécula mais importante produzida através deste processo. O NO produzido se oxida rapidamente em meio aquoso dando origem a nitratos/nitritos (NO_2^-/NO_3^-), que agem destruindo pontes de ferro-enxofre presentes em algumas enzimas e causando danos letais nas funções mitocondriais e no DNA da célula-alvo, sendo assim um potente inibidor do crescimento de microorganismos (MONCADA et al., 1991).

Além dos reativos do oxigênio e do nitrogênio, os neutrófilos ainda produzem enzimas proteolíticas, como a mieloperoxidase (MPO), que reage com íons cloro e promove a destruição da bactéria por halogenação ou por oxidação de proteínas e lipídeos da membrana (CLIFFORD e REPINE, 1982).

Os neutrófilos são o tipo celular mais importante nas fases iniciais do processo inflamatório e formam a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos patogênicos. Esta capacidade atribuída aos neutrófilos dá-se pela sua habilidade de aderir e posteriormente migrar através do endotélio, fagocitar microrganismos e eliminá-los pela ação das espécies reativas do oxigênio e nitrogênio e das enzimas proteolíticas por eles produzidas. Impossibilitados de recircular entre o sangue e os tecidos e linfonodos como os linfócitos, os granulócitos migram da corrente sanguínea diretamente para a região lesionada,

em resposta a mudanças moleculares da superfície interna dos vasos e do microambiente (SPRINGER et al., 1995).

Essas células são geradas na medula óssea pela expansão e diferenciação de precursores que levam a produção de células maduras e funcionais. São estocadas por cerca de sete dias antes de serem liberadas na circulação e possuem alta taxa de renovação (a vida média na circulação é de aproximadamente 6 horas) controlada por inúmeros fatores, incluindo moléculas de superfície (selectinas e integrinas), citocinas do tipo G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), GM-CSF (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor), IL-3, IL-5 e quimiocinas como IL-8 e MCP-2 (BERLINER, 1998).

O processo inflamatório é regulado por diversos fatores de transcrição e certamente um dos mais importantes é o NF- κ B. Este desempenha um papel crucial na iniciação e amplificação da inflamação (KARIN e GRETEN, 2005; HAYDEN, WEST e GHOSH, 2006; TAK e FIRESTEIN, 2001). Respondendo a estímulos pró-inflamatórios como IL-1 β ou TNF- α , o NF- κ B desencadeia a transcrição dos principais genes de propriedades pró-inflamatórias e anti-apoptóticas e torna-se, pelo menos durante a fase inicial, parte da alça de retroalimentação positiva. A ativação prolongada ou desbalanceada, entretanto, comumente gera inflamação crônica e favorece diversas doenças (KARIN e GRETEN, 2005). Apesar de ainda não ter suas bases moleculares de ativação e o seu papel na regulação da resposta imune conhecidos em detalhes, a importância da sinalização do NF- κ B durante a inflamação deriva de evidências indiretas. Os estudos *in vivo* têm suas limitações, mas *in vitro* a função pró-inflamatória do NF- κ B está clara. A inibição da via do NF- κ B leva a drástica diminuição da produção de mediadores inflamatórios em diferentes tipos celulares, como os macrófagos, linfócitos e células endoteliais. Esse fato pode sugerir que a deficiência do NF- κ B ou sua inibição *in vivo* leva a uma redução da resposta inflamatória (GERONDAKIS et al., 2007). Entretanto, alguns trabalhos sugerem um papel anti-inflamatório do NF- κ B, e ele estaria envolvido na regulação da resolução da inflamação. Lawrence e colaboradores (2001) demonstraram que a ativação do NF- κ B em leucócitos recrutados durante o curso da inflamação está associada com expressão de genes pró-inflamatórios em um modelo de pleurite em ratos, enquanto a ativação tardia, durante a resolução da inflamação está associada

com a expressão de genes anti-inflamatórios e indução de apoptose. A inibição da ativação regular do NF- κ B durante a resolução da inflamação mantém a resposta inflamatória e previne a apoptose das células inflamatórias.

1.2 Resolução x inflamação crônica

Um pensamento comum diz que “a maioria das coisas na vida são como uma faca de dois gumes”. Em determinada ocasião agem em nosso favor, mas sob outras condições podem agir desfavoravelmente. A inflamação desempenha papel central na luta contra patógenos e pode ser considerada, portanto, como um conjunto de reações biológicas cujo objetivo é restaurar a integridade do organismo. Quando a inflamação se manifesta por um curto espaço de tempo, ela tem consequências terapêuticas. Entretanto, quando a inflamação torna-se crônica ou permanece por muito tempo, ela pode tornar-se perigosa. A amplificação descontrolada dos eventos que compõem a reação ou a não contenção dos mesmos pode levar a manifestações patológicas indesejáveis como doenças inflamatórias crônicas ou, ainda, transformações neoplásicas decorrentes da oxidação do DNA. Enquanto a inflamação aguda é parte da resposta de defesa, a inflamação crônica pode levar ao câncer, diabetes e doenças cardiovasculares, pulmonares e neurológicas. Para que isso não ocorra, é necessário limitar o processo inflamatório pela eliminação do infiltrado celular e de seus produtos potencialmente tóxicos. (BALKWILL e COUSSENS, 2004; AGGARWAL et al., 2006).

Como visto anteriormente, a inflamação aguda começa com uma cascata de citocinas e quimiocinas que atraem células imunes e não-imunes, principalmente neutrófilos, que infiltram o tecido danificado. Esse processo é normalmente auto-limitante porque a produção de citocinas pró-inflamatórias é seguida pela produção de anti-inflamatórias no processo de cicatrização. Entretanto, se o processo não for resolvido rapidamente, a manutenção do mesmo por tempo prolongado gera a inflamação crônica. Na inflamação crônica, células mononucleares, macrófagos, linfócitos e plasmócitos são encontrados em

adição aos neutrófilos e existe destruição e reparação do tecido simultaneamente (PHILIP et al., 2004; MUELLER, 2006) (**Figura 1**).

FIGURA 1: Resolução e inflamação crônica (Adaptado de SERHAN et al., 2007).

Hoje sabemos que vias bioquímicas endógenas ativadas durante as reações de defesa podem conter ou regular a inflamação e promover a sua resolução. A resolução é um processo ativo, e não passivo como antes imaginado e a intervenção nessa fase, baseada em agonistas endógenos da resolução, pode ser uma abordagem promissora nas doenças associadas à inflamação (SERHAN et al., 2007).

Em resposta a injúria ou infecções os leucócitos polimorfonucleares migram para os sítios inflamatórios para neutralizar e eliminar estímulos potencialmente deletérios. Este é o fator talvez mais óbvio, mas com certeza o mais crítico para a resolução da inflamação aguda. Com o fim dos estímulos, ocorre a diminuição das vias de sinalização pró-inflamatórias, da síntese dos mediadores pró-inflamatórios (eicosanóides, quimiocinas, citocinas, moléculas de

adesão, etc) e o início do catabolismo dos mesmos. Em adição a esses eventos, ocorre liberação de fatores que previnem a migração dos polimorfonucleares e a formação de edema e esse conjunto constitui “o início do fim”, ou seja, o início do processo de resolução da inflamação aguda e o retorno a homeostase (SERHAN et al., 2007).

O próximo passo na seqüência de eventos é o “clearance” celular. As rotas de saída disponíveis para os leucócitos inflamatórios incluem recirculação sistêmica ou morte local seguida por sua fagocitose através de macrófagos recrutados. Após a fagocitose ser completada, a maioria dos macrófagos abandona o sítio inflamatório através da drenagem linfática e uma pequena população morre no local por apoptose. Caso esses passos sejam seguidos, a inflamação aguda será resolvida sem causar grandes danos ao tecido e com poucas possibilidades de complicações (SERHAN et al., 2007). O último, mas igualmente essencial aspecto a ser considerado para a resolução e homeostase é o retorno das células do parênquima e estroma locais onde ocorreu a inflamação para o fenótipo não-inflamatório. As terapias mais usadas têm como alvo as células imunes e tentam inibir a produção de mediadores químicos pró-inflamatórios, mas um alvo igualmente importante é a ativação de programas “pró-resolução” nas células estromais, como os fibroblastos, nos tecidos inflamados (FILER et al., 2006). As células estromais podem contribuir para a resolução da inflamação através de: (a) inibição dos sinais de sobrevivência; (b) normalização do gradiente de quimiocinas; (c) indução de programas de resolução que permitem a apoptose das células infiltradas ou a sua saída pelos vasos linfáticos. Uma falha nessas vias levaria a uma inflamação persistente (BUCKLEY et al., 2001).

Assim como na fase aguda da inflamação, cada um dos eventos aqui descritos para a resolução são altamente coordenados e estão sob rigoroso controle do que chamamos de fatores “pró-resolução”. Estes fatores desempenham papéis importantes, não apenas na iniciação, mas também na regulação da resposta inflamatória e tem entre eles as lipoxinas (LXs), resolvinas, docosatrienos e neuroprotectinas.

O ácido araquidônico além de ser precursor de mediadores lipídicos pró-inflamatórios também pode ser convertido em mediadores lipídicos anti-

inflamatórios, como as LXs, através da 15-lipoxigenase (NATHAN, 2002; SERHAN, 2004). Durante a interação célula-célula em uma resolução experimental, tanto a PGE quanto a PGD estimularam a regulação transcricional de enzimas envolvidas na formação de LXs (LEVY et al., 2001). Além disso, segundo Nathan (2002), as interações célula-célula favorecem a transição do padrão de produção dos metabólitos do ácido araquidônico de leucotrienos inflamatórios em lipoxinas antiinflamatórias. Ao mesmo tempo, a COX-2 é induzida em macrófagos por produtos microbianos e citocinas e gera PGE₂, que é um potente agente vasodilatador. Entretanto, quando os níveis desse mediador aumentam, ele passa a inibir a COX-2, assim como a 5-lipoxigenase, ao mesmo tempo em que induz a 15-lipoxigenase em neutrófilos. Dessa forma, em algumas horas, a PGE₂ que representava um sinal ativador para a inflamação torna-se um sinal inibidor da mesma.

As LXs geram diferentes sinais: para os PMNs, “stop signals”, limitando sua entrada nos sítios de inflamação através da ligação com receptores celulares que bloqueiam o seu influxo (SERHAN et al., 1993, NATHAN, 2002); para os monócitos, “go signals”, já que de uma maneira não-flogística, ativa-os como fatores atraentes mas sem estimular os eventos subseqüentes como a geração de ânions superóxidos (MADDOX e SERHAN, 1996; MADDOX et al., 1997). Além disso, as LXs e seus análogos estáveis são potentes agonistas para macrófagos, estimulando a fagocitose de PMNs apoptóticos, um passo chave na resolução (McMAHON et al., 2001). Já as resolvinas e os docosatrienos são potentes reguladores do infiltrado de PMNs (HONG et al., 2003).

Além das vias “pró-resolução”, a ativação das vias apoptóticas também é importante na resolução. Uma vez ativadas, elas aumentarão a apoptose das células infiltradas. Entretanto, é importante salientar que este aumento deve ser acompanhado pelo aumento da eficiência do “clearance” dos macrófagos. Caso isso não ocorra, a consequência pode ser uma necrose secundária e dano tecidual (MADERNA et al., 2005).

Os diversos genes necessários para suprimir a inflamação podem ser classificados em grupos funcionais. Embora essa classificação seja subjetiva, podemos destacar pelo menos três elementos chave para a tônica do estado anti-inflamatório. Primeiro, a solubilização e o “clearance” de imuno-complexos e

debris celulares. O segundo elemento é o balanço progressivo de leucócitos através de programas de ativação, proliferação e apoptose. O terceiro é evitar as injúrias oxidativas, através de restrição constitutiva da atividade de “burst” respiratório de macrófagos que estão continuamente expostos a estímulos (WERT et al., 2001).

Assim, a inflamação pode seguir dois caminhos: a resolução e o retorno a homeostase ou a persistência e suas complicações posteriores. Entre as patologias relacionadas com a inflamação crônica, destaca-se o câncer.

1.3 A inflamação e o câncer: uma relação controversa

O câncer é um distúrbio genético provocado por mutações em alguns genes que codificam proteínas capazes de estimular o crescimento e divisões celulares. Os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor podem ser expressos em diferentes tecidos e controlam o ciclo celular normal. As formas mutadas, os oncogenes, podem promover uma ativação excessiva de proteínas estimulatórias ou a diminuição da atividade dos genes supressores, conduzindo a uma proliferação celular descontrolada. O acúmulo de desarranjos genéticos na célula e a perda de regulação de seu crescimento e diferenciação determinam o aparecimento do tumor (BISHOP, 1991; RUOSLAHT, 1996). Alguns fatores genéticos afetam o microambiente celular, incluindo células estromais, endoteliais e derivadas do sistema imune, além dos seus fatores solúveis que estimulam o crescimento tumoral (PERERA, 1996). O conjunto desses fatores pode ser crítico na determinação do desenvolvimento do câncer.

Os mecanismos de resistência do organismo que impedem ou inibem o crescimento ou disseminação das células tumorais constituem um conjunto altamente diversificado de eventos, que vão da resposta primária mediada por células e fatores solúveis até a produção de anticorpos e células citotóxicas dirigidos contra os antígenos tumorais.

As respostas imune adaptativa e inata interagem para prevenir a malignidade. Infiltrados celulares não-específicos induzidos por citocinas pró-

inflamatórias e fatores hematopoéticos são gerados no ambiente para ativação da resposta imune específica contra antígenos tumorais.

A inflamação desempenha papel central na resposta inata, mas se ela não for contida adequadamente transforma-se em crônica e pode contribuir para algumas doenças, como a artrite e Alzheimer. A ligação funcional entre inflamação crônica e câncer há muito tempo tem sido proposta, baseada em duas premissas básicas: tecidos cronicamente inflamados seriam mais suscetíveis ao câncer; e longos tratamentos com anti-inflamatórios não-esteróides reduziram o risco de muitos tipos de cânceres (BALKWILL e COUSSENS, 2004).

Já em 1863 Virchow sugeriu que a origem do câncer em sítios de inflamação crônica em parte era devida ao aumento da proliferação celular. Embora hoje saibamos que apenas a proliferação celular não é capaz de causar o câncer, uma proliferação em um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento, estroma ativado e agentes promotores de dano de DNA certamente potencializa ou promove o risco de desenvolvimento de neoplasias.

Além disso, a maioria dos tumores sólidos contém muitas células não-malignas, incluindo células imunes que são importantes na inflamação. Leucócitos e outras células fagocíticas induzem dano ao DNA das células em proliferação através da geração de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, normalmente produzidas nessas células em resposta a infecções. Essas espécies reagem e formam peroxinitrito, um agente mutagênico. Esses danos ao DNA resultam em alterações genômicas permanentes, como mutações pontuais, deleções ou rearranjos (COUSSENS e WERB, 2002).

Para alguns autores é evidente que as células inflamatórias possuem poderosos efeitos no desenvolvimento de tumores (O'BYRNE e DALGLEISH, 2001; ALBINA e REICHNER, 1998; SHACTER e WEITZMAN, 2002). Nas fases iniciais, essas células agem como promotoras de tumor, produzindo um ambiente atrativo para o crescimento tumoral, facilitando a instabilidade genômica e promovendo a angiogênese. As células inflamatórias, assim como as citocinas e quimiocinas que elas produzem, influenciam na regulação do crescimento, migração e diferenciação de todos os tipos celulares no microambiente tumoral, incluindo células neoplásicas, fibroblastos e endoteliais. Por outro lado, o recrutamento de células inflamatórias pode ser prejudicial ao desenvolvimento do

tumor, podendo representar uma resposta do hospedeiro no intuito de suprimir o crescimento do tumor (COUSSENS e WERB, 2002).

As células inflamatórias no microambiente tumoral podem desempenhar papel na progressão tumoral via secreção de fatores parácrinos que estimulam o crescimento tumoral. Entretanto, a contribuição da inflamação para iniciação ou progressão do tumor permanece controversa. Entre os fatores mais atualmente estudados está o NF- κ B que sabidamente desempenha papel-chave na inflamação, mas seu papel na progressão tumoral tem apresentado resultados conflitantes, agindo como promotor de tumor em alguns tipos celulares e como supressor em outros (DITSWORTH e ZONG, 2004).

No intuito de comprovar qual papel a inflamação e suas células desempenham no câncer, muitos estudos foram e continuam sendo realizados. Nessa linha, Lozupone e colaboradores (2000) demonstraram que a administração *in vivo* de anticorpos específicos para granulócitos em camundongos SCID submetidos a implante de tumores humanos aumenta o crescimento tumoral, indicando a ação direta dessas células inflamatórias na contenção das células tumorais (LOZUPONE et al., 2000).

A eficácia terapêutica de citocinas pró-inflamatórias e hematopoéticas também tem sido demonstrada em animais e pacientes humanos (FIORETTI et al., 1998; HEVIN et al., 1990; SOIFFER et al., 1998). Esses autores sugerem um papel benéfico da inflamação no controle de doenças neoplásicas. Por outro lado, outras evidências sugerem que o processo inflamatório propicia o ambiente para o desenvolvimento da malignidade (O'BYRNE e DALGLEISH, 2001). Exemplos disso são os efeitos de alguns mediadores da inflamação como os metabólitos do oxigênio e do nitrogênio nos danos causados ao DNA e na progressão tumoral maligna (ALBINA e REICHNER, 1998), o aumento da resistência à tumorigênese em camundongos deficientes de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a redução da carcinogênese experimental em pulmão e cólon por inibição da resposta inflamatória com drogas antiinflamatórias (SHACTER e WEITZMAN, 2002).

O processo inflamatório inclui liberação de citocinas, fatores de crescimento, polipeptídios quimiotáticos e prostaglandinas, os quais tornaram-se alvos favoritos para prevenção de cânceres de pele induzidos tanto por agentes

químicos, quanto por radiação UV (MARKS e FURSTENBERGER, 2000; TRIPP et al., 2003; WILGUS et al., 2003; BOWDEN, 2004). Vários mediadores da inflamação apresentam papéis-chave na carcinogênese cutânea, como: as prostaglandinas, cicloxigenase-2, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), AP-1, fator nuclear- κ B (NF- κ B), transdutor de sinal e ativador de transcrição (Stat) 3 e outros (BUCKMAN et al., 1998; MOORE et al., 1999; SUGANUMA et al., 1999; YOUNG et al., 1999; CHAN et al., 2004; LIND et al., 2004). Paralelamente a esses resultados experimentais, muitas condições clínicas associadas com inflamação parecem aumentar os riscos de câncer de pele, incluindo lupus eritematoso e sítios de cicatrização crônicos. Entretanto, existem muitas doenças de pele também associadas com inflamação crônica, mas que não predis põem a malignização das lesões, como a psoríase e a dermatite atópica (NICKOLOFF et al., 2005).

Muitos estudos têm sido feitos no intuito de verificar a eficiência de tratamentos com anti-inflamatórios na inibição do crescimento de tumores. Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) agem como inibidores da atividade das cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2). Os dados indicam que a utilização dessas drogas reduz o risco de câncer de cólon entre 40 e 50% e podem também prevenir o câncer de pulmão, esôfago e estômago (BARON e SANDLER, 2000; GARCIA-RODRIGUES e HUERTA-ALVAREZ, 2001). Estudos baseados em DNA microarray sugerem que alguns AINEs como o rofecoxib podem exercer efeitos primários anti-tumor através da indução de um padrão específico de expressão gênica que favoreça a interrupção do ciclo celular (TSENG et al., 2002). Além disso, a expressão de grande número de genes associados com transcrição, transdução de sinal, regulação do ciclo celular e apoptose são influenciadas pelos AINEs (IIZAKA et al., 2002).

Recentemente muitos grupos têm relatado que os AINEs podem suprimir o crescimento de diversos tipos de cânceres, como o cólon-retal (OSHIMA et al., 1996), o de mama, pulmão, próstata, esôfago, pele e fígado, induzindo as células a pararem nas fases G0-G1 ou G2-M; algumas vezes, os AINEs podem também induzir o processo de apoptose (AKASHI et al., 2000; CASTONGUAY et al., 1998; FUNKHOUSER e SHARP, 1995).

Uma importante etapa da tumorigênese cutânea envolve a perda de sensibilidade das células pré-malignas e malignas a vários sinais apoptóticos, aumentando sua sobrevivência (VAN HOGGERLINDEN et al., 1999; THOMPSON, 1995; ASHKENAZI e DIXIT, 1998). Nesse contexto, torna-se importante entender a regulação da apoptose em queratinócitos. Segundo Qin e colaboradores (2001) o bloqueio da ativação do NF- κ B concomitantemente com a administração de IFN- γ leva a uma indução da apoptose por TNF- α dependente de FADD, TRAIL e ativação de caspase. Ocorre então uma diminuição da expressão das proteínas anti-apoptóticas dependentes de NF- κ B acompanhado de aumento nos níveis de caspase-8.

Assim, a influência da inflamação na carcinogênese e no desenvolvimento de tumores é controversa. A relação entre eles parece depender do tecido afetado e da causa, da natureza do estímulo e/ou intensidade da reação inflamatória. Mais além, essa relação pode depender do estágio do desenvolvimento do tumor. Neste contexto, fatores genéticos influenciando a resposta inflamatória podem afetar a resistência ou suscetibilidade a tumores.

As evidências rapidamente acumuladas provêm novas conexões moleculares entre inflamação e tumorigênese, sugerindo que essa ligação não é simples como inicialmente foi postulado. Muitos tipos de processos inflamatórios da pele (e possivelmente de outros tecidos) podem ter função supressora de tumor. (PIKARSKY et al., 2005). O desafio para o futuro será interferir no processo inflamatório do hospedeiro: diminuir os altos níveis de propriedades promotoras de tumor das células infiltradas, como as citocinas pró-inflamatórias, e aumentar suas propriedades supressoras de tumor, como as citocinas anti-inflamatórias (COUSSENS e WERB, 2002).

1.4 A utilização de modelos animais

Entender as bases moleculares da tumorigênese é essencial para fornecer diagnósticos fidedignos e eventualmente desenvolver novos métodos para a prevenção e o tratamento do câncer. Em particular a identificação e a caracterização funcional de genes celulares que são ativados por estímulos oncogênicos, através da identificação do seu padrão de expressão gênica

representam uma importante abordagem experimental (SCHLINGEMANN et al., 2003).

As dificuldades em determinar precisamente os fatores genéticos de risco do desenvolvimento de tumores diretamente em humanos tornam o uso de modelos experimentais altamente atrativos (GARIBOLDI et al., 2003a). Os modelos murinos isogênicos que apresentam predisposição ou resistência para o desenvolvimento do câncer em diferentes tecidos são indicados para análise genética, já que em humanos a possibilidade do envolvimento desses componentes pode estar mascarada pela heterogeneidade genética e por interações ambientais (GARIBOLDI et al., 2003b).

Os camundongos quando expostos a carcinógenos desenvolvem tumores em um processo de múltiplos estágios, muito semelhante ao que ocorre no homem, sendo um modelo experimental adequado para a pesquisa de genes de suscetibilidade ou resistência. Diferentemente das populações humanas, grande número de famílias de camundongos podem ser analisadas em estudos de *linkage*, o que aumenta a probabilidade estatística de identificar os vários *loci* envolvidos nas diferentes etapas do processo de carcinogênese.

Na investigação da ligação entre inflamação e câncer de pele o modelo freqüentemente utilizado é a indução de carcinogênese química em múltiplos estágios (NICKOLOFF et al., 2005). O primeiro estágio do desenvolvimento de tumores pode ser causado por vírus ou carcinógenos químicos que induzem alterações somáticas. Esse estágio, conhecido como “iniciação”, envolve alterações no DNA, é irreversível e pode persistir em tecidos normais indefinidamente até a ocorrência de um segundo tipo de estimulação, ou seja, a “promoção”. A promoção é o segundo estágio do desenvolvimento de um tumor, e pode resultar da exposição de células iniciadas a irritantes químicos, como os phorbol-esteres, entre eles o mais comumente utilizado, o TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato). Funcionalmente, os promotores induzem proliferação celular, recrutamento de células inflamatórias, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e reduzem os níveis de reparo de DNA (COUSSENS e WERB, 2002).

Na década passada, estudos com camundongos mostraram que muitos genes com efeitos relativamente pequenos controlavam a suscetibilidade ao

câncer. Além disso, análises recentes da estrutura do risco genético ao câncer em populações humanas têm mostrado que a maioria dos cânceres esporádicos (não-hereditários) desenvolve-se em indivíduos geneticamente pré-dispostos e que essa predisposição é resultado, preferencialmente, de muitos genes de baixa penetrância a mutações em genes individuais. Aparentemente a melhor abordagem para definir esses numerosos genes de efeito cumulativo é identificá-los e mapeá-los em camundongos e subseqüentemente estudar o papel dos seus homólogos humanos (DEMANT, 2003).

Uma abordagem válida para avaliar o papel da inflamação no desenvolvimento de tumores é a pesquisa de polimorfismos funcionais em genes que regulam o processo inflamatório (por exemplo, genes que codificam citocinas, quimiocinas ou selectinas) que possam alterar o risco de desenvolvimento de câncer ou representarem indicadores de prognóstico (COUSSENS e WERB, 2002).

1.5 O modelo de seleção genética bidirecional para inflamação aguda

O Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan produziu por processo de seleção genética bidirecional, duas linhagens de camundongos que diferem amplamente na capacidade de produzir resposta inflamatória aguda (AIR) a corpo estranho. O modelo de indução da AIR utilizou como agente flogístico partículas de poliacrilamida (Biogel P100), substância insolúvel, não biodegradável e não imunogênica. A reação foi medida pelo infiltrado de leucócitos e concentração de proteínas presentes no exsudato inflamatório local, colhido 24 horas após a injeção subcutânea do Biogel (IBÁÑEZ et al., 1992). Os dois parâmetros são positivamente correlacionados e possuem uma distribuição normal de freqüências.

A seleção iniciou-se a partir de uma população heterogênea de animais (F0), resultante do acasalamento equilibrado de oito linhagens isogênicas (A/J, DBA2/J, SWR/J, P/J, CBA/J, SJL/J, C57BL/6J, BALB/cJ) (**Figura 2**). Nessa população denominada F0 cada indivíduo possuía 12,5% do genoma de cada linhagem isogênica parental.

FIGURA 2: Processo de geração das linhagens AIRmax e AIRmin.

A intensidade da resposta inflamatória variou nos animais da população F0, segundo uma curva normal de distribuição (STIFFEL et al., 1990). O processo de seleção bidirecional baseou-se, em cada geração, na escolha de animais situados nos extremos da curva para os acasalamentos seletivos, ou seja, que apresentavam valores de proteína e celularidade mais altos para obtenção da linhagem de máxima resposta (AIRmax) e os que apresentavam valores mais baixos para produção da linhagem de mínima resposta (AIRmin) (**Figura 3**).

FIGURA 3: Distribuição dos valores fenotípicos (celularidade e extravasamento protéico) nas linhagens isogênicas, na F0 e nas linhagens AIRmax e AIRmin.

Este procedimento foi repetido em gerações consecutivas até a máxima separação entre as linhagens. A separação gradativa destas linhagens no sentido da alta ou baixa resposta é explicada pelo acúmulo progressivo de múltiplos genes exercendo efeitos aditivos sobre o fenótipo selecionado. A partir da 20ª geração de seleção, admitiu-se que as linhagens atingiram o limite de seleção. Nesse limite de seleção, considera-se que os alelos que apresentam efeitos opostos na resposta inflamatória estejam fixados em homozigose em cada linhagem, mantendo-se a heterogeneidade do fundo genético, uma vez que foram evitados os acasalamentos consanguíneos (IBAÑEZ et al., 1992). Hoje, os animais estão na geração F49 e freqüentemente é realizada a verificação da manutenção dos fenótipos de seleção.

O tipo celular predominante no exsudato inflamatório é o leucócito polimorfonuclear (PMN), sendo os neutrófilos sua grande maioria. As células mononucleares são essencialmente monócitos e o número de linfócitos é insignificante (RIBEIRO et al., 2003).

Segundo Ribeiro e colaboradores (2003), a alta resposta inflamatória observada nos animais AIRmax parece ser resultado do acúmulo de três elementos convergentes durante o processo de seleção genética. Esses animais produzem elevado número de neutrófilos na medula óssea como resposta aos altos níveis de citocinas granulopoiéticas e também produzem grandes quantidades de fatores quimiotáticos no exsudato que atraem neutrófilos. Finalmente, os neutrófilos extravasados dos AIRmax são mais resistentes a apoptose espontânea.

Ainda na medula óssea, além da maior capacidade de produzir e exportar neutrófilos, os AIRmax aparentemente possuem células precursoras com maior e mais rápida capacidade de regular positivamente receptores para citocinas envolvidas na diferenciação de neutrófilos e eosinófilos (GM-CSFR e IL-5R). Além disso, quando estimulados com ácido retinóico (ATRA), a diferenciação de neutrófilos é acelerada. Assim, a combinação gênica responsável pela diferenciação dos fenótipos AIRmax e AIRmin possivelmente afetou principalmente a atividade da medula óssea desses animais (RIBEIRO et al., 2003).

1.6 Diferenças de sub-fenótipos nas linhagens AIRmax e AIRmin

A diferença entre as linhagens não é limitada à resposta do tecido subcutâneo ao Biogel, afetando todos os tecidos vascularizados e a resposta a diversos agentes (**Tabela 1**), tais como carragenina, zimozan (VASQUEZ-BRAVO, 1996) e veneno de *Bothrops jararaca* (CARNEIRO et al., 2002). Estes compostos induziram também afluxo leucocitário e formação de edema pronunciado nos animais AIRmax.

TABELA 1: Comportamento das linhagens AIRmax e AIRmin frente a diferentes patologias experimentais induzidas

Fenótipos	AIRmax	AIRmin

Infecção por <i>Salmonella thyphymurium</i>	resistente	sensível
Choque endotóxico por LPS	sensível	resistente
Artrite Experimental	sensível	resistente
Cicatrização	rápida	lenta
Carcinogênese de Cólon	sensível	resistente
Carcinogênese de Pulmão	resistente	sensível
Carcinogênese de Pele	resistente	sensível

Obs.: Salientamos que os fenótipos não são absolutos, e que as classificações “sensível” e “resistente” representam a maioria da população estudada.

Também foram observadas diferenças quanto a infecção por bactérias vivas (ARAÚJO et al., 1998), choque endotóxico por LPS (ARAÚJO et al., 1998; BORREGO et al., 2006), artrite induzida por pristane (VIGAR et al., 2000; PETERS et al., 2007) e diversos tipos de cânceres induzidos por agente químicos, como o câncer de pulmão induzido por uretana (MARIA et al., 2003), o câncer de cólon induzido por DMH (1,2-dimethylhydrazine) (Di PACE et al., 2006) e o câncer de pele induzido em dois estágios: iniciação por DMBA (9,10-dimetilbenzoantraceno) e promoção por aplicações repetidas de TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato) (BIOZZI et al., 1998).

Os camundongos AIRmax mostraram-se altamente resistentes à infecção experimental por patógenos intracelulares como *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, com DL50 de 1000 e 100 vezes respectivamente maiores quando comparados aos animais AIRmin. Esta maior resistência não está associada à capacidade de controlar a infecção por meio da resposta imune humoral ou celular, uma vez que as duas linhagens produzem títulos de anticorpos e reações de hipersensibilidades tardia equivalentes aos antígenos de salmonela. Inversamente ao observado para infecções, os animais AIRmax são aproximadamente 10 vezes mais sensíveis ao choque endotóxico por LPS quando comparados aos AIRmin (ARAUJO et al., 1998).

Os animais AIRmax são extremamente sensíveis à artrite induzida por pristane, enquanto os AIRmin mostraram-se mais resistentes. A incidência de artrite experimental nos AIRmax foi de aproximadamente 50% aos 120 dias, atingindo 65% dos animais aos 200 dias, enquanto nos AIRmin a incidência foi de 7% aos 180 dias de indução (VIGAR et al., 2000).

Também quanto ao fenótipo de cicatrização existem diferenças significantes entre AIRmax e AIRmin. Os animais AIRmax quando submetidos a orifícios de dois milímetros de diâmetro nas orelhas mostraram reparo tecidual significativo aos 30 dias (2,0 – 0,68 mm; $p < 0,001$) enquanto os animais AIRmin não apresentaram cicatrização. Além disso, o infiltrado neutrofílico induzido por Biogel correlacionou positivamente com o reparo tecidual na orelha em uma população intercruzada F2 (AIRmax x AIRmin), indicando um papel importante desse evento no fenótipo de cicatrização (De FRANCO et al., 2007).

Os animais da linhagem AIRmax são resistentes ao desenvolvimento de tumores pulmonares induzidos por uretana (MARIA et al., 2003) e ao desenvolvimento de metástases após implantes de melanomas (MARIA et al., 2001). Paradoxalmente ao encontrado na literatura, no caso da tumorigênese pulmonar, o tratamento com anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) determinou aumento na incidência de tumores nos animais AIRmax, sugerindo que a inflamação aguda apresenta papel relevante na resistência a tumorigênese (MARIA et al., 2001; 2003; RIBEIRO et al., 2005).

Interessantemente, fato inverso ocorre na tumorigênese de cólon. Neste caso, os animais da linhagem AIRmax são suscetíveis ao desenvolvimento de

tumores induzidos por DMH no cólon (100% aos 475 dias após a aplicação) e também apresentam cerca de 22% de incidência de tumores pulmonares. Em contrapartida, os AIRmin apresentam apenas 8,3% de incidência de tumores de cólon mas até 75% de tumores pulmonares. Devemos levar em consideração que os animais AIRmin possuem uma tendência ao desenvolvimento de tumores espontâneos de pulmão, uma vez que os controles não tratados apresentaram 43% de incidência e que essa tendência pode ser em parte explicada pela presença do alelo de susceptibilidade do *Pas-1* (*Pulmonary adenoma susceptibility locus*). Além disso, o tratamento com anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) causou diminuição na incidência de tumores de cólon em ambas as linhagens. Esses dados em conjunto com os obtidos por Maria e colaboradores indicam que esse tratamento pode apresentar efeitos diferentes dependendo do órgão alvo (Di PACE et al., 2006).

Quando os animais selecionados geneticamente são submetidos ao protocolo de indução de tumores de pele pelo tratamento com DMBA e promoção TPA há uma diferença de aproximadamente 6 vezes na multiplicidade de papilomas ao final do período de promoção. A partir de então, a maioria das lesões benignas regride, mas algumas se vascularizam, crescem e evoluem para tumores malignos do tipo carcinomas espino-celulares. A incidência de carcinomas foi superior nos AIRmin (55% contra 18% nos AIRmax), demonstrando uma modificação das linhagens nas diferentes fases de evolução tumoral (BIOZZI et al., 1998).

A co-segregação entre os fenótipos alta resposta inflamatória e resistência e baixa resposta inflamatória e sensibilidade a carcinogênese de pele foi observada na população F2 entre as linhagens AIRmax e AIRmin nos grupos de animais escolhidos nos extremos de alta (F2max) e baixa (F2min) resposta inflamatória aguda. Estes estudos evidenciaram uma regulação genética parcial comum aos fenótipos “intensidade da resposta inflamatória aguda” e “suscetibilidade à carcinogênese de pele” (BIOZZI et al., 1998).

Através de estudos realizados na população inicial (F0) e em híbridos F1 (AIRmax x AIRmin), segregantes F2 da Seleção de Inflamação (AIR) (IBAÑEZ et al., 1992; BIOZZI et al., 1998) foram estimados a existência de aproximadamente 7 a 11 QTL (*Quantitative Trait Loci*) com efeito aditivo regulando a resposta

inflamatória aguda, sendo que 7 QTL controlam o extravasamento protéico e 11 QTL regulam o infiltrado celular.

Estes camundongos representam, assim, importante modelo para identificação dos *loci* genéticos envolvidos na regulação da resposta inflamatória aguda e de sua provável associação ou *linkage* com os *loci* de predisposição a diversas doenças, inclusive o desenvolvimento de tumores.

Em nosso modelo, até o presente momento, foram observadas regiões polimórficas com desequilíbrio de frequência de alelos de microssatélites altamente significantes nos cromossomos 1, 6, 7, 11 e 13 que sugerem a presença de QTL responsáveis pela regulação da intensidade da resposta inflamatória aguda (BORREGO et al., 2006).

No cromossomo 1, encontramos uma região aparentemente implicada na resposta inflamatória aguda e nela temos como genes candidatos *Cd28*, *Il10*, *Casp8*, *Slc11a1* e *Ctla4* (BORREGO et al., 2006).

Regiões nos cromossomos 5 e 7 sugerem a presença de QTL reguladores da inflamação aguda que coincidem com os *loci* de resistência e suscetibilidade a tumores de pele induzidos quimicamente em linhagens isogênicas descritos por Nagasi e colaboradores em 1998, os *loci* Skts 1- Skts 4. Vários genes candidatos são descritos nessas regiões: no cromossomo 5 os principais genes que podem estar participando dos processos de carcinogênese e de inflamação são o oncogene *Kit* (regulador da proliferação celular), *Tpar1* (TPA repressed gene), *Tlr1* e *Tlr6*; no cromossomo 7 os principais genes possivelmente envolvidos são *ciclina D1*, *Bax* e o oncogene *H-ras* (SOUZA, 2002).

No cromossomo 6 foi descrito o *locus* *Pas1* (*Pulmonary adenoma susceptibility 1*) que está envolvido tanto na resposta inflamatória quanto na carcinogênese pulmonar e nessa região o principal candidato é o *K-ras* (MARIA et al., 2003). O cromossomo 11 contém um grupo de genes que codificam quimiocinas (*Gcsf* e *Gmcsf*) e citocinas (*Il3*, *Il4*, *Il5* e *Il13*) e ainda as enzimas *Nos2* e *Mpo* (RIBEIRO et al., 2003), enquanto no cromossomo 13 temos como candidatos os genes dos receptores de angiotensina, dopamina e histamina, *Il9* e *Fgf* (BORREGO et al., 2006).

Conforme citado anteriormente, o câncer de pele possui três estágios (iniciação, promoção e progressão), e aparentemente, a relação mais forte entre o

câncer e a inflamação está localizada no estágio de promoção. Assim, pensamos em focar a pesquisa em duas frentes: a expressão gênica global nas células de medula óssea como o local de produção das células inflamatórias e sabidamente um diferencial entre as linhagens; e a expressão gênica de alguns fatores na pele como o local de agressão e sítio inflamatório. Para verificar o padrão de expressão das células de medula, utilizamos dois tratamentos: estímulo inflamatório agudo causado pelo agente selecionador utilizado na geração das linhagens AIRmax e AIRmin e estímulo inflamatório crônico causado pelo agente responsável pela promoção tumoral. Na determinação do microambiente tumoral (pele), utilizamos o mesmo agente responsável pela promoção tumoral de forma aguda e crônica. O principal objetivo da tese foi identificar genes comuns implicados tanto na modulação da resposta inflamatória aguda e crônica, quanto na carcinogênese química de pele induzida nos camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa resposta inflamatória aguda.

2 OBJETIVOS

No intuito de caracterizar nosso modelo de pesquisa, os objetivos específicos são:

1. Estudar diferenças na expressão gênica global de células de medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin submetidos aos protocolos de indução de inflamação aguda por Biogel e de inflamação crônica por TPA (agente promotor da tumorigênese cutânea);
2. Verificar diferenças na expressão de genes relevantes para o processo inflamatório agudo e crônico na pele dos animais AIRmax e AIRmin submetidos a aplicações de TPA, no intuito de caracterizar o microambiente tumoral na fase de promoção da tumorigênese;
3. Comparar os resultados obtidos, na tentativa de identificar possíveis modulações gênicas que possam contribuir para as diferenças fenotípicas entre os animais AIRmax e AIRmin;
4. Identificar genes diferencialmente expressos na medula após o tratamento com Biogel localizados em prováveis QTL envolvidos na resposta inflamatória aguda previamente mapeados nas linhagens AIRmax e AIRmin.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos, com idade entre 2 e 4 meses, das linhagens AIRmax e AIRmin da seleção AIR, produzidos e mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Foram utilizados também animais segregantes F2 interlinhagens AIRmax x AIRmin da geração F40. Os procedimentos experimentais realizados neste trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) em 16/12/2004, protocolo n° 133 e revalidado por três anos a partir de 16/12/2007.

3.2 Indução de Inflamação Aguda por Biogel

Para a indução da reação inflamatória aguda foram utilizadas microesferas de poliacrilamida Biogel P100 (Bio-Rad, Tougar e Matingnom, França), cuja porosidade tem o limite de exclusão protéica para moléculas acima de 100 kDa. No preparo da solução, duas a quatro gramas de Biogel são hidratadas durante uma hora em 300 ml de PBS previamente aquecido a 90°C. Após a hidratação, o gás retido dentro das esferas é removido por vácuo e a suspensão é esterilizada por 20 minutos a 120°C. A suspensão é então lavada três vezes com salina apirogênica estéril e ressuspensa em um volume correspondente à metade do volume ocupado pelo Biogel hidratado. 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). No tratamento, cada camundongo dos grupos AIRmax e AIRmin recebeu, por via subcutânea, 750 µl da suspensão de Biogel em PBS aplicados na região dorsal previamente depilada. Após 24 horas os animais foram sacrificados e a medula óssea foi retirada para extração de RNA das células.

3.3 Indução de Inflamação Aguda por TPA

Cada camundongo dos grupos AIRmax e AIRmin recebeu, por via epicutânea, uma única dose TPA (10 µg de TPA diluído em 0,1 ml de acetona) aplicada na região dorsal previamente depilada. Os animais foram sacrificados após 6 e 24 horas do tratamento e fragmentos da pele da região dorsal foram retirados para extração de RNA e para a preparação de cortes histológicos.

3.4 Indução de Inflamação Crônica por TPA

Cada camundongo dos grupos AIRmax e AIRmin recebeu, por via epicutânea, duas aplicações semanais de uma solução de 1 µg de TPA em 0,1 ml de acetona, durante 30 dias, na região dorsal previamente depilada. Após esse período, os animais foram sacrificados e fragmentos da pele da região dorsal foram retirados para extração de RNA e para a preparação de cortes histológicos, além da medula que também foi recolhida para extração de RNA.

3.5 Indução da Tumorigênese Cutânea

Cada camundongo dos grupos AIRmax e AIRmin recebeu uma única aplicação epicutânea dorsal, na pele previamente depilada, de 25 µg de DMBA dissolvidos em 0,1 ml de acetona como agente iniciador. Após sete dias iniciou-se a fase de promoção com a aplicação de 1 µg de TPA em 0,1 ml de acetona duas vezes por semana, durante 100 dias. Os animais foram acompanhados semanalmente, durante 200 dias, e sacrificados ao final do experimento.

3.6 ELISA

A dosagem das citocinas inflamatórias IL1 β , IL-6, TNF α e IFN γ foram realizadas pelo método de ELISA utilizando nas reações o soro de animais submetidos ao protocolo de indução de tumorigênese cutânea em dois estágios sangrados aos 50 e 100 dias após o início do tratamento e ao protocolo de inflamação crônica induzida por TPA sangrados aos 15 e 30 dias após o início do

tratamento. Para a realização dos ensaios foi utilizado o BD OptEIA Mouse ELISA Set de acordo com as especificações do fabricante (BD Biosciences Pharmingen). Brevemente, placas de poliestireno (NUNC - Maxisorp) de 96 poços foram sensibilizadas utilizando anticorpos de captura específicos na diluição de 1:250 diluídos em tampão Carbonato de Sódio (0,1M – pH 9,5) ou tampão Fosfato de Sódio (0,2M – pH 6,5). As placas foram incubadas por 18 horas (“overnight”) a 4°C e os sítios livres foram bloqueados durante 2 horas a 37°C com PBS contendo 10% de Soro Fetal Bovino (PBS-SFB 10%). Após as lavagens com PBS contendo 0,05% de Tween (PBS-T), as amostras foram adicionadas em diluições seriadas de 1:2 até 1:16 e incubadas durante 2 horas à 37°C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS-T e em seguida foram adicionados os anticorpos de detecção anti- IL1 β biotinilados na diluição de 1:250 em PBS-SFB 10% e às placas das demais citocinas foi adicionado o “Working Detector” (anticorpo de detecção biotinilado + avidina-HRP, ambos na diluição de 1:250) As placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente. Após as subseqüentes lavagens, foi adicionada na placa da IL-1 β a avidina-HRP (1:250) e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. Para a revelação da reação foi aplicado o substrato constituído de uma solução de Tetrametilbenzidina (TMB) e Peróxido de hidrogênio. Após aproximadamente 30 minutos a reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico 2N e a absorbância foi determinada em leitor de ELISA automático (Labssystem Multiskan MS) com os filtros de 450 nm e de 570 nm (utilizado como correção). Os resultados obtidos foram transformados em pg/ml, mediante a equação de regressão linear baseada nas curvas padrão feitas com concentrações seriadas dos recombinantes de TNF α , IL1 β , IL6 e IFN γ , partindo de uma concentração inicial de 40.000 pg/ml até a diluição de 1,22 pg/ml para o TNF α e IFN γ , e de 80.000 pg/ml até a diluição de 2,44 pg/ml para a IL1 β e IL6.

3.7 Histológico

A análise histológica da pele dos animais submetidos aos diferentes tratamentos foi realizada utilizando fragmentos de pele desses animais colhidos após o sacrifício. Para tanto, fragmentos da pele da região dorsal foram retirados

e submetidos ao protocolo para inclusão em parafina. O processo consiste em fixação do material 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 para evitar sobreposição de células e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). A avaliação foi feita por microscopia ótica (Leitz-Dioplan) e a aquisição e digitalização das imagens através do sistema CCD-IRIS (Sony Company).

3.8 Extração de DNA genômico

O DNA genômico dos camundongos foi extraído de um pequeno segmento de cauda que foi retirado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido. As amostras foram pulverizadas e incubadas a 65 °C durante 1 hora em 200 µl de tampão de lise contendo Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 10mM pH 8, SDS 0,5%, suplementado com 1,5 mg/ml de Proteinase K. Em seguida, foram acrescentados 200 µl do mesmo tampão de lise sem a Proteinase K e as amostras foram mantidas durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, foi acrescentado ao sobrenadante 0,1 vol. de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2 vol. de etanol 100%. O DNA precipitado foi lavado em etanol 70%, seco e dissolvido em água bi-destilada. Sua concentração foi determinada por espectrofotometria e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (Tris-base 1M, ácido bórico 1M e EDTA 20nM) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BET) (Pharmacia). O gel contendo as amostras foi colocado em uma cuba eletroforética e recoberto com TBE, sendo em seguida submetido a uma corrente elétrica de 80 V por cerca de 30 minutos. O gel foi então analisado no “Pharmacia Biotech – Image Master VDS” para a avaliação da presença das bandas de integridade do DNA.

3.9 Análise de polimorfismo da *Caspase 8* e do *P2x7r*

Para a análise do polimorfismo dos genes *Caspase 8* (localizado no cromossomo 1, a 30,1 cM) e do *P2x7r* (localizado no cromossomo 5, a 56,8 cM) o

DNA genômico foi amplificado pela técnica de PCR. Na reação utilizamos 10 ng de DNA em uma mistura de 2,5 µl de tampão específico para PCR 10x concentrado; 2,5 µl de dNTP 2,5 µM (Invitrogen); 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen); 0,8 µl de cada um dos *primers* a 2 mM; 0,2 de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 25µl com água deionizada estéril. A sequência dos *primers* utilizados está apresentada na tabela a seguir:

TABELA 2: Sequência dos primers utilizados para identificação de polimorfismos nos genes *Caspase 8* e do *P2x7r*

	Sense	anti-sense
<i>P2x7r</i>	CTATCTCTCCACGACTCACCCC CTATCTCTCCACGACTCACCCCT	TATAATCCCGGGAGGGATACTTGAAG
<i>Caspase 8</i>	GGTGATCTGAGTTTGATCTCTGGAAC	CCCGTGACTCACTGTCTTGTCTCTT

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 polimorfismos da *Caspase 8* (cromossomo 1, 30,1 cM) e do *P2x7r* (cromossomo 5, 56,8 cM).

Os produtos de amplificação foram submetidos à análise em gel de agarose 4% *low melt* e *high melt* –Invitrogen (volume a volume), preparado em tampão TBE (Tris-base 1M, ácido bórico 1M e EDTA 20nM) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BET) (Pharmacia). O gel contendo as amostras foi colocado em uma cuba eletroforética e recoberto com TBE, sendo em seguida submetido a uma corrente elétrica de 100 V por 1 hora. As bandas de DNA foram visualizada utilizando o “Pharmacia Biotech – Image Master VDS”. O tamanho das bandas foi definido com base no padrão de peso molecular composto de diferentes fragmentos de DNA o ϕ X174 RF DNA/*Hae* III (Invitrogen - 72pb a 1353pb), aplicado no mesmo gel.

3.10 Extração de RNA de pele

Fragmentos de pele da região dorsal foram retirados (aproximadamente 100g de tecido) e imediatamente acondicionados em 1 ml de TRIzol (Invitrogen). Após a homogeneização, adicionamos 0,2 ml de clorofórmio (Merck) para cada 1 ml de TRIzol. Após o período de agitação e centrifugação (11000 rpm), a fase aquosa (incolor, que contém o RNA) foi transferida para outro tubo eppendorf e o RNA foi precipitado com 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, o pellet foi solubilizado com 50 µl de água livre de RNase. A concentração de RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro (260/280 nm) e a integridade do RNA foi verificada utilizando uma diluição de 0,5 µg de RNA em 10 µl na qual foi adicionado 2 µl de Azul de Bromofenol (100nM EDTA, 1% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 50% glicerol). A alíquota foi aplicada em gel de agarose 1% em TBE (Tris-base 1M, ácido bórico 1M e EDTA 20nM) contendo brometo de etídio (40 pg/ml). O gel contendo as amostras foi colocado em uma cuba eletroforética, recoberto com TBE e submetido a uma corrente elétrica de 100V por 30 minutos. A análise do gel foi realizada no programa “Pharmacia Biotech – Image Master VDS”.

3.11 Extração de RNA de medula

As células de medula óssea foram retiradas dos fêmures dos animais por perfusão com 1,5 ml de PBS e centrifugadas. O precipitado obtido foi ressuspenso em 0,75 ml de TRIzol (Invitrogen). O protocolo seguido para a extração do RNA foi o mesmo descrito para a pele (item 3.10).

3.12 Clean-up do RNA

Para a remoção de resíduos de fenol que possam permanecer nas amostras de RNA e que eventualmente interfiram nas reações fluorescentes e

devido a dificuldade de obtenção de amostras de RNA livres de contaminação de DNA genômico foi realizada a purificação do RNA utilizando o kit *RNeasy* (Qiagen). Para isso, a primeira observação a ser feita é a saturação da membrana da coluna de purificação que é de 100 µg de RNA total em 100 µl de solução aquosa. Para cada reação foram adicionados 350 µl de Tampão RLT, lembrando que esse tampão é reconstituído com β-mercaptoetanol (10 µl de β-mercaptoetanol para cada 1 ml de tampão). Em seguida, foram adicionados 250 µl de etanol 100% e as amostras foram colocadas imediatamente na coluna e centrifugadas por 1 minuto a 10000 rpm. Logo após é colocado 350 µl de tampão RW1 sobre a membrana. Após nova centrifugação por 1 minuto a 10000 rpm, inicia-se o tratamento com a DNase (Qiagen) onde 80 µl de uma solução de DNase em tampão RDD (10 µl de enzima para 70 µl de tampão) foi colocada diretamente sobre a membrana e seguiu-se uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente. A membrana foi lavada novamente com 350 µl de tampão RW1 e em seguida duas vezes com o tampão RPE (reconstituído com etanol 100%), sendo a segunda centrifugação de 3 minutos para secar a membrana. Para a eluição do RNA, a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e foi adicionado 40 µl de água RNase free diretamente sobre a membrana e os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 10000 rpm para completa eluição. Após essa etapa, o RNA foi novamente quantificado através do espectrofotômetro (260/280 nm) e sua integridade novamente verificada em gel de agarose 1%.

3.13 Síntese do cDNA

A síntese de cDNA foi feita através de uma reação de transcrição reversa a partir do RNA purificado. Para isso, 10 µl contendo 1 µg de RNA total, 1 µl de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (50 µM), 1 µl de dNTP (2,5 µM) e 2 µl de água livre de Rnase foram incubados a 65°C durante 5 minutos. Depois de decorrido o tempo, os tubos foram retirados e colocados no gelo por um minuto. A seguir, adicionamos 4 µl de Tampão 5X (250 mM Tris-HCL pH 8,3, 375 mM KCL e 15 mM MgCl₂), 1 µl de DTT (0,1M) e 1 µl de 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 a 50°C durante 50 minutos e uma inativação

a 70°C por 15 minutos. As reações foram incubadas em aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200.

3.14 PCR em Tempo-Real ou quantitativo (qPCR)

A transcrição reversa aliada à reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) é um método poderoso para avaliar a expressão gênica. A tecnologia do Real-Time foi adaptada para transformar o RT-PCR em quantitativo. O método quantitativo em tempo real é baseado no uso de uma sonda fluorescente, um oligonucleotídeo com sequência específica que hibridizará com a sequência alvo. Essa sequência hibridizada irá gerar um sinal fluorescente proporcional à concentração dos produtos amplificados e que será medido durante a amplificação (a cada ciclo). Este sistema permite correlacionar a intensidade do sinal coletado com a quantidade de produto amplificado. Cada amostra de cDNA (1 µl diluído 1:2) foi adicionada a uma reação contendo as seqüências de *primers* das citocinas (0,5 µl do *primer forward* e 0,5 µl do *primer reverse*, na concentração de 5µM); 6,25 µl do Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen), e 4,25 µl de água para ajustar o volume final de reação em 12,5µl 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 à 5 minutos. As seqüências alvo foram então amplificadas durante 40 ciclos constituídos de etapas sucessivas de desnaturação (95 °C por 20 segundos), e de anelamento (60°C por 35 segundos).

A 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 ultrapasse a fluorescência de fundo, ou seja, no início da fase logarítmica (log) de amplificação, a qual depende diretamente de quantas cópias das seqüências alvo 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 55 °C a 90 °C e a fluorescência foi adquirida a cada 1 °C, registrando-se a temperatura de dissociação, ou desnaturação da dupla fita do material amplificado, o que indica o tamanho e, portanto a especificidade do produto amplificado em cada reação.

Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa “Opticon Monitor Analysis Software 2.03”. A quantidade de citocina em cada amostra foi expressa através dos valores 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 calibrador. A quantidade do gene alvo, normalizado para um endógeno (gene constitutivo) e relativa ao calibrador é dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, na qual $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$, e o ΔCt é o Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene constitutivo. Assim, a equação representa a expressão normalizada do gene alvo, em uma amostra cuja quantidade é desconhecida, relativa à expressão normalizada do calibrador. Os resultados serão expressos em $\log_2 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Foram testados alguns genes para serem usados como constitutivos e os melhores resultados foram obtidos com a $\beta 2$ -microglobulina para as amostras de pele e a ciclofilina para as amostras de medula.

FIGURA 4: Gráficos fornecidos pelo programa “Opticon Monitor Analysis Software 2.03” para o qPCR de um gene constitutivo. No exemplo, o gene da *ciclofilina*.

Nestes primeiros gráficos (**Figura 4**) temos a representação do qPCR da ciclofilina. No primeiro quadro, podemos observar que todas as amostras possuem um Ct parecido, exatamente como deve se comportar um gene constitutivo. Em seguida temos a representação da curva de dissociação ou de *Melting* onde podemos observar o pico de dissociação comum a todas as amostras, o que garante a especificidade do produto.

FIGURA 5: Gráficos fornecidos pelo programa “Opticon Monitor Analysis Software 2.03” para o qPCR de um gene alvo. No exemplo, o gene da *caspase 8*.

Nesse outro gráfico (**Figura 5**) observamos a representação de um gene alvo e nesse caso podemos notar a diferença entre os Ct das diferentes amostras, o que reflete a diferença na quantidade inicial de mRNA. Devemos lembrar que o Ct é inversamente proporcional a quantidade inicial de mRNA, ou seja, quanto menor o Ct, maior foi a quantidade inicial da reação. Da mesma forma, a curva de dissociação possui apenas um pico, garantindo a especificidade do produto.

3.14.1 Primers

Os *primers* foram desenhados de forma a flanquear regiões intrônicas grandes com o intuito de não amplificar DNA genômico. As seqüências estão relacionadas na **tabela 3**. Os *primers* utilizados apresentaram uma eficiência próxima a 100%, definida pelo cálculo da regressão linear entre diluições seriadas das amostras de cDNA e o valor individual de Ct.

TABELA 3: Seqüência dos *primers* utilizados para a realização dos ensaios de qPCR.

primer	Sense	anti-sense	pb
β 2-microglobulina	TGACCGGCTTGATGCTATC	CAGTGTGAGCCAGGATATAG	223 pb
Ciclofilina	AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT	AAATGCCCCGAAGTCAAAAG	91 pb
IL-1 α	CAGTTCTGCCATTGACCATC	TCTCACTGAAACTCAGCCGT	219 pb
IL-1 β	TTGACGGACCCCAAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCCTCA	205 pb
IL-4	TCGGCATTTTTGAACGAGGTC	GAAAAGCCCCGAAAGAGTCTC	217 pb
IL-6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TGTACTCCAGGTAGCTATGG	209 pb
IL-10	ATGCAGGACTTTAAGGGTTACTTG	TAGACACCTTGGTCTTGGAGCTTA	254 pb
IL-12p35	GATCATGAAGACATCACACGG	AGAATGATCTGCTGATGGTGG	258 pb
IL-12p40	CAGTACACCTGCCACAAAGGA	GTGTGACCTTCTCTGCAGACA	277 pb
TNF- α	TCTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC	213 pb
IFN- γ	GCTCTGAGACAATGAACGCT	AAAGAGATAATCTGGCTCTGC	227 pb
TGF- β 1	ACCGCAACAACGCCATCTAT	GTAACGCCAGGAATTGTTGC	201 pb
GM-CSF	TGAACCTCCTGGATGACATG	GTGTTTCACAGTCCGTTTCC	219 pb
Caspase-8	GGTGATCTGAGTTTGATCTCTGGAACACAT	CCCGTGACTCACTGTCTTGTCTCTT	146 pb
IL-8rb	GACTGTTACCTAAACGGTG	CATACCAAGATGGAAGGGAGC	189 pb

3.15 Microarrays

Todos os reagentes para a preparação dos microarrays fazem parte do “CodeLink Gene Expression System”, GE Healthcare.

3.15.1 Preparação dos mRNAs bacterianos

Uma solução de mRNAs bacterianos é utilizada como controle interno da lâmina, que possui seqüências que serão hibridizadas com esses controles. Para o preparo da solução estoque 1 de mRNAs (16,7 ng/ μ l) foi combinada uma série de mRNAs bacterianos (*araB*, *entF*, *fixB*, *gnd*, *hisB* e *leuB*) na concentração de 0,1 μ g/ μ l, no volume de 2,5 μ l cada, perfazendo um total de 15 μ l de volume final. Essa solução foi aliquoteada em 5 tubos e armazenada em freezer -70°C. Uma nova solução é montada (estoque 2) na concentração de 50,2 pg/ μ l adicionando 3 μ l da solução estoque 1 a 997 μ l de água nuclease-free. A partir desta solução foi montada a solução de trabalho, onde 2 μ l da solução estoque 2 foi adicionada a 998 μ l de água nuclease-free.

3.15.2 Preparação do cDNA de fita simples

Para cada amostra de RNA (2 µg em 9 µl) adicionamos 2 µl da solução de trabalho de mRNAs bacterianos (1µl para cada 1 µg de RNA total), 1 µl de T7 oligo(dT). Essa solução foi incubada por 10 minutos a 70 °C no termociclador e após esse período foi colocada imediatamente no gelo durante 3 minutos. Em seguida foi adicionado 2 µl de tampão *first-strand* 10X, 4 µl de dNTP (5 mM), 1 µl de inibidor de RNase e 1 µl de transcriptase reversa. Essa solução foi incubada por 2 horas a 42 °C no termociclador, porém sem aquecimento da tampa.

3.15.3 Preparação do cDNA de fita dupla

Adicionamos aos tubos da reação anterior 63 µl de água nuclease-free, 10 µl de tampão *second-strand* 10X, 4 µl de dNTP (5 mM), 2 µl de DNA polimerase e 1 µl de RNase H. A solução foi incubada por 2 horas a 16 °C no termociclador novamente sem aquecimento da tampa.

3.15.4 Purificação do cDNA de dupla fita

A purificação do cDNA foi feita utilizando-se o *QIAquick Purification Kit* (Qiagen). Adicionamos 500 µl de tampão PB ao cDNA da etapa anterior e essa mistura foi colocada na coluna de purificação e centrifugada a 12000 rpm por 1 minuto. Em seguida a coluna foi lavada com a adição de 700 µl de tampão PE e centrifugada a 12000 rpm por 30 segundos. Logo após a coluna foi seca com uma nova centrifugação a 12000 rpm durante 1 minuto. Para eluir o cDNA, adicionamos 30 µl de tampão EB diretamente sobre a membrana, e após o tempo de 1 minuto, a coluna foi novamente centrifugada a 12000 rpm por 1 minuto. Esse passo foi repetido para gerar 60 µl de eluato final. Para concentrar o cDNA, utilizamos uma *SpeedVac* até que o volume final fosse de 9,5 µl por tubo.

3.15.5 Síntese do cRNA por transcrição *in vitro*

Ao tubo que continha a reação anterior foram adicionados 4 µl de tampão de reação T7 10X, 4 µl de solução T7 ATP, 4 µl de solução T7 GTP, 4 µl de solução T7 CTP, 3 µl de solução T7 UTP, 7,5 µl de solução de biotina-11-UTP (10 mM) e 4 µl de enzima T7 10X. A reação foi protegida da luz e incubada por 14 horas em estufa a 37 °C.

3.15.6 Purificação do cRNA

A purificação do cRNA foi feita através da utilização do kit *RNeasy* (Qiagen). Ajustamos o volume do tubo para 100 µl adicionando 60 µl de água nuclease-free. Para cada reação foram adicionados 350 µl de Tampão RLT, lembrando que esse tampão é reconstituído com β-mercaptoetanol (10 µl de β-mercaptoetanol para cada 1 ml de tampão). Em seguida, foram adicionados 250 µl de etanol 100% e as amostras foram colocadas imediatamente na coluna e centrifugadas por 30 segundos a 10000 rpm. Em seguida a coluna é lavada duas vezes com o tampão RPE (reconstituído com etanol 100%), sendo as lavagens seguidas por uma centrifugação de 2 minutos para secar a membrana. Para a eluição do RNA, a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e foi adicionado 50 µl de água RNase free diretamente sobre a membrana e após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 10000 rpm para completa eluição. Esse passo foi repetido com o retorno do eluato para a membrana seguido de nova centrifugação. Após essa etapa, o RNA foi novamente quantificado através do espectrofotômetro (260/280 nm) e as amostras foram aliquotadas na concentração de 10 µg em 20 µl. A integridade foi novamente verificada em gel de agarose 1% e nesse momento o cRNA deve apresentar-se como um “smear” abaixo da banda 18s do RNA íntegro (controle).

3.15.7 Fragmentação do cRNA

À alíquota de 10 µg em 20 µl foi adicionado 5 µl de tampão de fragmentação 5X e a amostra foi incubada em um termociclador a 94 °C, durante 20 minutos, utilizando tampa aquecida. Em seguida os tubos foram colocados a 0 °C por 5 minutos.

3.15.8 Hibridização

Após transferir as amostras para um tubo de 1,5 ml foram adicionados 78 µl de tampão de hibridização A, 130 µl de tampão de hibridização B e 27 µl de água nuclease-free e a solução foi incubada a 90 °C por 5 minutos para desnaturar o cRNA. Logo após os tubos foram colocados no gelo e cada lâmina foi preenchida com 250 µl da solução, sendo em seguida colocadas no “*shaker*” a 300 rpm e a 37 °C, onde permaneceram por 18 horas.

3.15.9 Detecção com Cy5-Streptavidina

A seguir as lâminas foram lavadas com tampão TNT 0,75X (Tris-HCl pH 7,6, NaCl 5M e 0,05% Tween 20) e colocadas em outro recipiente de tampão TNT 0,75X pré-aquecido a 46 °C por exatamente 1 hora. A seguir as lâminas são colocadas em um recipiente com Cy5-streptavidina (1:500) em tampão TNB (Tris-HCl pH 7,6, NaCl 5M e 0,5% de NEN blocking – PerkinElmer) e incubadas protegidas da luz por 30 minutos. Em seguidas as lâminas são lavadas em tampão TNT 1X durante 5 minutos por três vezes. Como última lavagem, as lâminas são colocadas em um recipiente com tampão SSC 0,1X / 0,05% Tween 20 e movimentadas durante 30 segundos, sendo em seguida secas em centrífuga a 664 x g por 3 minutos.

3.15.10 Análise dos dados obtidos

CodeLink Gene Expression System

As lâminas foram analisadas com o “GenePix Array Scanner”. O estudo de expressão gênica foi realizado com a plataforma *CodeLink Gene Expression System* (GE Healthcare), que é composta por lâminas contendo oligonucleotídeos representando cerca de 36.000 genes distintos, com seqüências catalogadas em banco de dados (NCBI). Esta plataforma utiliza um sistema de detecção de cor única, baseado na incorporação indireta de apenas um fluorocromo para a marcação das amostras. Este sistema elimina resultados falsos decorrentes de parâmetros enzimáticos, que afetam a frequência de incorporação de fluorocromos distintos, ou relativos à sobreposição espectral de duas fluorescências. Os dados de expressão extraídos de cada *microarray* foram normalizados de acordo com os valores de fluorescência dos genes de expressão constitutiva, presentes nos chips como controles internos. Genes expressos diferencialmente foram identificados pelas razões dos valores de intensidade fluorescente obtidos a partir de amostras controle e experimentais entre as linhagens, pelo programa *CodeLink Expression v.2.3* (GE Healthcare). Critérios para definição de valores de *cut-off* para identificar genes diferencialmente expressos foram baseados em parâmetros biológicos (ex. razões ≥ 2 ou ≤ 0.5).

SAM (Significance Analysis os Microarrays)

SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) é um programa estatístico para encontrar genes diferencialmente expressos significativamente em réplicas de experimentos de *microarrays*. O SAM compara as expressões gênicas de cada experimento, assim como suas respostas variáveis. O SAM calcula um *score* estatístico d_i (SAM score: valor *t*-estatístico) para cada gene i , medindo a força da relação entre a expressão gênica e suas respostas variáveis. Ele usa permutações repetidas dos dados para determinar se a expressão de alguns genes está significativamente relacionada com a resposta. O valor de *cut-off* para a significância é determinado pelo parâmetro delta (“threshold”), escolhido pelo usuário baseando-se na taxa de falsos-positivos. Quanto maior o delta, menor o

número de falsos-positivos, e conseqüentemente, menor o número de genes diferencialmente significantes. Essa escolha depende do nível de falsos-positivos no qual o usuário sente-se confortável para trabalhar (CHU et al., 2006).

EASE (Expression Analysis Systematic Explorer)

EASE (Expression Analysis Systematic Explorer) é um programa utilizado para determinar agrupamentos funcionais significativos. Esse software permite que os genes diferencialmente expressos possam ser agrupados em “temas biológicos” de acordo com sua categoria funcional, sua localização cromossômica e sua representação em relação ao genoma total. O EASE calcula a sobre-representação dos genes em relação ao total de genes utilizados no ensaio e anotados dentro de cada sistema, tendo o “Gene Ontology” como padrão. Utilizamos a conversão da identificação dos genes para números do “LocusLink” para assegurar que cada gene fosse classificado apenas uma vez em cada categoria, já que em alguns sistemas (por exemplo, o GenBank) um único gene pode ter mais de uma identificação. Para calcular a significância das categorias, o programa utiliza um teste estatístico chamado “EASE score”. Esse teste nada mais é do que um teste exato de Fisher modificado, onde é penalizada a categoria composta por poucos genes (chamadas “instáveis”) em favor de categorias representadas por um maior número de genes, levando em consideração a perspectiva dos temas globais biológicos, minimizando a possibilidade de falsos-positivos. É, portanto, um teste mais restritivo (HOSACK et al., 2003).

3.16 Ensaios Biológicos

3.16.1 *IL-1 β*

A influência do polimorfismo do gene do receptor do P2x7 (*P2x7r*) na secreção de IL-1 β foi avaliada em ensaios *in vitro* pela dosagem dessa citocina secretada por monócitos presentes na circulação sanguínea de animais das linhagens AIRmax, AIRmin e em segregantes F₂ interlinhagens, além das linhagens isogênicas DBA2 e BALB/c. Amostras de 200 μ l sangue total

heparinizado foram tratadas com doses variadas de LPS de *E.coli* LPS (1 a 1000 µg/mL). Após 3 horas de incubação a 37 °C foram ensaiadas diferentes doses de ATP (0.63 a 5mM). Seguiu-se uma nova incubação por um período de 2 horas. As amostras foram então centrifugadas e o plasma coletado e congelado até o momento da dosagem. O nível de IL-1β foi avaliado por ensaio de ELISA, conforme metodologia anteriormente descrita.

3.16.2 Caspase8

A influência do polimorfismo do gene da *Caspase8* na sua expressão na pele após protocolo de inflamação crônica foi avaliada por qPCR e a genotipagem foi realizada por PCR, ambos já descritos anteriormente.

3.17 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Software Prism 3.0. As significâncias entre as médias foram calculadas pelo ANOVA one-way, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey, para $p < 0,05$. O desequilíbrio de frequência dos alelos dos genes estudados foi calculado em tabela de contingência pelo teste de Qui-quadrado corrigido por Yates.

4 RESULTADOS

4.1 Incidência de tumores de pele induzidos por DMBA-TPA

Os animais das linhagens AIRmax e AIRmin foram submetidos ao protocolo de desenvolvimento de tumores de pele em dois estágios no qual a indução é feita por DMBA e a promoção por TPA. Foram realizados dois experimentos nos quais as doses do iniciador e do promotor foram modificadas, porém foram observados resultados muito semelhantes. Os animais controle foram tratados com doses de acetona. Durante os 110 dias do experimento os animais foram avaliados semanalmente e a incidência de papilomas foi determinada em relação ao número total de animais. Como podemos observar na **figura 6**, ambas as linhagens desenvolvem papilomas, porém os animais AIRmin apresentam maior incidência de papilomas quando comparados com os animais AIRmax ($p < 0,05$). Esse resultado sugere que pode haver uma regulação gênica comum, ainda que parcial, tanto para o fenótipo de incidência de tumorigênese quanto para resposta inflamatória. Os animais utilizados como controle não desenvolveram papilomas.

4.2 Multiplicidade de tumores de pele induzidos por DMBA-TPA

Como descrito anteriormente, os animais foram avaliados semanalmente e a multiplicidade foi determinada através do número de papilomas desenvolvidos por cada animal. Novamente, os animais utilizados como controle não desenvolveram papilomas. Enquanto os AIRmax apresentaram valores baixos para multiplicidade, os AIRmin apresentaram valores significativamente maiores ($p < 0,0001$) (**Figura 7**). As características dos papilomas também foram diferentes. Enquanto os AIRmax apresentaram em sua maioria um único papiloma grande e hiperêmico, os papilomas do AIRmin foram múltiplos, pequenos e pálidos (**Figura 8**). Com a evolução da promoção, passamos a notar uma tendência em alguns animais AIRmin, normalmente os que apresentavam grandes quantidades de papilomas, de união entre papilomas menores e formação de grandes massas. Da mesma forma que para o parâmetro anterior, parece haver uma regulação

comum, ainda que parcial, entre a resposta inflamatória aguda e a multiplicidade de tumores.

Interessante observar que aproximadamente aos 30 dias é o tempo em que ocorre a divergência para os dois sub-fenótipos avaliados. Tanto a incidência como a multiplicidade passam a apresentar grandes diferenças nesse ponto.

FIGURA 6: Cinética da incidência de tumorigênese cutânea em animais AIRmax e AIRmin. Os animais receberam uma dose de agente iniciador (DMBA) na dose de 25 μ g/0,1 ml de acetona e subseqüentes aplicações epicutâneas de promotor (TPA) na dose de 1 μ g/0,1 ml de acetona, duas vezes por semana, durante 100 dias.

FIGURA 7: Cinética da multiplicidade de tumorigênese cutânea em animais AIRmax e AIRmin. Os animais receberam DMBA na dose de 25 μ g/0,1 ml de acetona e subseqüentes aplicações epicutâneas de TPA na dose de 1 μ g/0,1 ml de acetona, duas vezes por semana, durante 100 dias.

FIGURA 8: Lesões papilomatosas observadas em animais AIRmax (A) e AIRmin (B) submetidos ao tratamento de indução de tumorigênese cutânea em dois estágios (DMBA/TPA) aos 100 dias.

4.3 Dosagem de citocinas séricas através do método de ELISA

Os animais submetidos ao protocolo longo de indução de tumorigênese cutânea foram sangrados aos 50 e 100 dias e os animais submetidos ao protocolo de inflamação crônica foram sangrados aos 15 e 30 dias do início dos respectivos tratamentos. Em ambos os casos não encontramos níveis séricos de IL-1 β , IL-6, TNF- α ou IFN- γ detectáveis por ELISA, talvez devido a baixa sensibilidade dos testes ou porque realmente o estímulo não foi capaz de gerar alterações sistêmicas nos tempos avaliados.

4.4 Avaliação histológica da pele submetida aos protocolos de inflamação aguda e crônica

A avaliação histológica da pele de camundongos AIRmax e AIRmin submetidos aos diferentes protocolos de inflamação cutânea foi realizada para visualização da formação de infiltrado celular local, uma vez que as diferenças no fenótipo “migração celular” já estão fortemente estabelecidas nas linhagens. Assim sendo, o intuito dessa análise foi verificar se para o estímulo com TPA os animais se comportariam da mesma forma, o que de fato ocorreu. Foram

observados trinta campos em cada corte histológico, dois cortes por animal e 5 animais nos tratamentos agudos e dez no tratamento crônico.

A análise dos cortes histológicos dos animais AIRmin revelou, para os animais controle (acetona), nos tempos de 6 e 24 horas (**Figuras 9 e 10**), a presença de uma pequena quantidade de células inflamatórias, aparentemente residentes, o que não caracterizou um infiltrado. Às 6 horas pudemos observar um discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear nos animais tratados com TPA. No período de 24 horas o influxo celular aumentou bastante em relação ao tempo anterior, caracterizando uma migração de células inflamatórias normal em resposta a um estímulo inflamatório, com predominância de células polimorfonucleares. Aos 30 dias (**Figura 11**) o animal controle AIRmin apresentou espessamento da epiderme e um leve infiltrado predominantemente mononuclear. Os animais AIRmin tratados com TPA mostraram um espessamento e um infiltrado persistente, comparável em quantidade ao infiltrado observado em 24 horas, mas, totalmente diferente em qualidade, uma vez que o mesmo apresentou-se predominantemente composto de células mononucleares.

Nas **figuras 12 e 13** estão apresentados os cortes histológicos dos animais AIRmax sacrificados 6 e 24 horas após o tratamento. Nos animais controles que receberam uma aplicação de acetona não foi verificada alteração histológica. No entanto os cortes de estímulo com TPA mostram um influxo celular na derme que muitas vezes atinge a epiderme. Este infiltrado inicia-se claramente em 6 horas é mais evidente no tempo de 24 horas. Esse infiltrado inflamatório pode ser classificado como predominantemente polimorfonuclear. Comparando com os animais AIRmin, podemos observar diferenças claras entre os cortes, com uma migração maior nos animais AIRmax, o que corrobora os dados já estabelecidos para essas linhagens. Quando analisamos os cortes de 30 dias (**Figura 14**) temos outro panorama, onde o controle (acetona) apresentou um leve infiltrado predominantemente mononuclear, porém em menor quantidade do que os animais AIRmin nessa mesma condição. No tratamento com TPA observamos um espessamento da epiderme (hiperplasia) e um infiltrado maior do que o observado no controle, mas ainda discreto, predominantemente mononuclear e da mesma forma que o observado no controle, menor do que o encontrado nos AIRmin.

Os resultados da avaliação histológica permitiram a confirmação de que o fenótipo “migração celular” quando gerado a partir da aplicação epicutânea de

TPA comporta-se de maneira semelhante ao descrito anteriormente para outros estímulos inflamatórios agudos, como por exemplo o biogel, uma vez que os animais AIRmax apresentaram um infiltrado maior do que o observado nos AIRmin, principalmente em 24 horas. Interessante observar que em 30 dias os animais AIRmax apresentam um infiltrado semelhante aos AIRmin em qualidade (predominantemente mononuclear) mas absolutamente diferente em quantidade já que apresenta muito menos células. A tabela abaixo é um esquema representativo dos níveis de infiltrado celular e sua cinética em relação aos tempos estudados.

TABELA 4: Níveis de infiltrado celular e sua relação com os tempos após a aplicação epicutânea de TPA nos animais AIRmax e AIRmin

	6 horas	24 horas	30 dias
AIRmax	Infiltrado +++	Infiltrado ++++	Infiltrado +
AIRmin	Infiltrado +	Infiltrado ++	Infiltrado +++

FIGURA 9: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de animais AIRmin sacrificados 6 horas após os tratamentos. Coloração hematoxilina-eosina. (A) Animal controle tratado com acetona; (B) e (C) Animais tratados com uma dose de TPA ($10\mu\text{g}/0,1\text{ ml}$ de acetona).

FIGURA 10: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de animais AIRmin sacrificados 24 horas após os tratamentos. Coloração hematoxilina-eosina. (A) Animal controle tratado com acetona; (B) e (C) Animais tratados com uma dose de TPA ($10\mu\text{g}/0,1\text{ ml}$ de acetona).

FIGURA 11: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de animais AIRmin sacrificados 30 dias após os tratamentos. Coloração hematoxilina-eosina. (A) Animal controle tratado com acetona; (B) e (C) Animais tratados com duas aplicações semanais de TPA ($1\mu\text{g}/0,1\text{ ml}$ de acetona).

FIGURA 12: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de animais AIRmax sacrificados 6 horas após os tratamentos. Coloração hematoxilina-eosina. (A) Animal controle tratado com acetona; (B) e (C) Animais tratados com uma dose de TPA ($10\mu\text{g}/0,1$ ml de acetona).

FIGURA 13: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de animais AIRmax sacrificados 24 horas após os tratamentos. Coloração hematoxilina-eosina. (A) Animal controle tratado com acetona; (B) e (C) Animais tratados com uma dose de TPA ($10\mu\text{g}/0,1$ ml de acetona).

FIGURA 14: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele de animais AIRmax sacrificados 30 dias após os tratamentos. Coloração hematoxilina-eosina. (A) Animal controle tratado com acetona; (B) e (C) Animais tratados com duas aplicações semanais de TPA ($1\mu\text{g}/0,1$ ml de acetona).

4.5 Quantificação da expressão gênica de citocinas na pele pelo método do *Real – Time PCR* (qPCR)

Os experimentos de qPCR foram realizados para amostras de pele submetidas ao protocolo de inflamação aguda e crônica com o intuito de caracterizar possíveis diferenças na produção local de citocinas e fatores de crescimento que pudessem ajudar a explicar as diferenças fenotípicas extremas entre AIRmax e AIRmin.

Sabemos que o papel da inflamação na carcinogênese é controverso e depende principalmente do tecido afetado e da natureza e duração do estímulo. Lembrando que os animais utilizados nos experimentos foram selecionados para resposta inflamatória aguda (24 horas), 30 dias de estímulo caracteriza uma inflamação crônica.

Outro ponto relevante a ser considerado nas análises é a escolha do calibrador. No caso das amostras aqui descritas, a expressão dos genes alvo dos animais controle AIRmin foi utilizada como um calibrador para as demais situações. Assim, os gráficos representam a expressão normalizada do gene alvo, em uma amostra cuja quantidade é desconhecida, relativa à expressão normalizada do calibrador.

Nas figuras a seguir estão representadas as cinéticas de expressão das citocinas na pele. Os resultados são referentes a três experimentos independentes. Em cada um deles as reações foram feitas a partir de um *pool* de cDNAs dos animais controle (n=2 para cada linhagem para a inflamação aguda e crônica) e experimentais (n=5 para cada linhagem na inflamação aguda e n=12 para cada linhagem na inflamação crônica). Para as citocinas IL-1 α , IL-1 β , TGF- β 1, além da Caspase 8, no tempo de 30 dias foram feitas análises individuais.

Na **figura 15** temos os níveis de expressão de mRNA para a citocina IL-1 α . O primeiro resultado interessante é a repressão desse gene nos animais controle AIRmax quando comparado aos animais controle AIRmin. Outra diferença é resposta ao estímulo inflamatório agudo. Em 6 horas os AIRmax ainda tem o gene reprimido, enquanto que os AIRmin apresentam níveis de expressão dessa citocina. Já em 24 horas o perfil se inverte e os AIRmax passam a ter expressão enquanto os AIRmin sofrem repressão. A expressão dos AIRmax experimentais é

diferente estatisticamente do seu controle ($p<0.05$). Aos 30 dias, no estímulo crônico, ambos apresentam repressão do gene, apesar da mesma ser mais pronunciada nos AIRmin e diferente estatisticamente da expressão em 6 horas ($p<0.05$).

FIGURA 15: Cinética da expressão do gene da IL-1 α na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.

Observando a **figura 16** verificamos os níveis de expressão de mRNA para a citocina IL-1 β . Da mesma forma que a IL-1 α , esse gene também está reprimido nos animais AIRmax controle quando comparados aos AIRmin controle. A cinética de expressão dessa citocina apresentou os AIRmax com expressões maiores nos estímulos agudos e os animais AIRmin com uma expressão maior em 30 dias. Interessante notar que, excluindo-se os AIRmax controles, não houve repressão desse gene em nenhuma outra situação. Além disso, todas as expressões dos animais AIRmax nos tempos estudados foram significativamente diferentes do controle ($p<0.05$).

FIGURA 16: Cinética da expressão do gene da IL-1 β na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.

Quando analisamos a expressão de IL-6 (**Figura 17**) percebemos que as duas linhagens apresentam um perfil semelhante de expressão. Em resposta aos estímulos agudos, após 6 horas, ambas as linhagens apresentam diferenças estatísticas entre os animais experimentais e controles ($p < 0.001$). Os níveis de expressão são altos já em 6 horas, e significativamente maiores nos AIRmax em relação aos AIRmin ($p < 0.001$). Em 24 horas observamos uma inversão e a expressão nos AIRmin passa a ser significativamente maior ($p < 0.001$). Em ambas as linhagens, as diferenças nas expressões entre os tempos 6 e 24 horas são estatisticamente significantes ($p < 0.001$ nos AIRmax e $p < 0.05$ nos AIRmin). Já com 30 dias, a expressão nos AIRmax continua caindo, chegando a apresentar uma pequena repressão, ao passo que nos AIRmin ela permanece praticamente estável, sendo a mesma diferente estatisticamente do seu controle ($p < 0.05$) e dos AIRmax ($p < 0.05$).

FIGURA 17: Cinética da expressão do gene da IL-6 na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.

Na análise da IL-12 (**Figura 18**), não observamos diferenças nas expressões em 6 horas, com exceção dos AIRmin entre 6 horas e 30 dias ($p < 0.05$). Em 24 horas podemos observar uma maior expressão nos animais AIRmax, sendo a mesma diferente estatisticamente do seu controle ($p < 0.01$); da mesma forma que para 6 horas, nos AIRmin temos diferença na expressão entre 24 horas e 30 dias ($p < 0.05$). Aos 30 dias, observamos uma forte repressão do gene nos AIRmin e a diferença é significativa ($p < 0.05$) em favor do AIRmax.

FIGURA 18: Cinética da expressão do gene da IL-12 na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.

O padrão de expressão para o TNF- α (**Figura 19**) nos estímulos agudos é semelhante nas duas linhagens, apresentando altas expressões em 6 horas e uma pequena repressão em 24 horas. Ainda em 6 horas, os AIRmax apresentam uma diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0.05$) e em relação a 30 dias ($p < 0.05$). Já aos 30 dias, enquanto nos AIRmax a repressão aumenta, os AIRmin voltam a apresentar uma expressão comparável ao tempo de 6 horas.

FIGURA 19: Cinética da expressão do gene do TNF- α na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.

Na **figura 20** podemos observar que a expressão do gene do IFN- γ é totalmente diferente nas linhagens. Enquanto nos animais AIRmax temos uma expressão média em 6 horas e essa expressão aumenta em 24 horas (a maior entre os tempos observados e diferente do seu controle, $p < 0.05$), nos AIRmin temos uma repressão do gene em 6 horas e uma pequena expressão em 24 horas (diferente do tempo de 6 horas, $p < 0.05$), que aumenta em 30 dias (a maior entre os tempos observados e diferente do tempo de 6 horas, $p < 0.01$), ao contrário do que ocorre nos AIRmax, que diminui a expressão em 30 dias.

FIGURA 20: Cinética da expressão do gene do IFN- γ na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.

Para as citocinas inflamatórias analisadas podemos observar um padrão: em resposta aos estímulos agudos (6 e 24 horas), os animais AIRmax apresentam maiores níveis de expressão dessas citocinas; já aos 30 dias, os níveis de expressão são maiores nos animais AIRmin. Esse fato será objeto da discussão, mas em linhas gerais podemos dizer que os animais AIRmax apresentam um processo inflamatório local mais agudo e que é resolvido rapidamente. Já os animais AIRmin apresentam uma dificuldade maior em resolver o processo inflamatório e esse processo se cronifica, explicando os índices ainda elevados dessas citocinas. Outro fato interessante é que todos os controles AIRmax apresentam uma repressão (em maior ou menor grau) em relação ao controle AIRmin.

Na **figura 21** podemos observar o comportamento da expressão da IL-4. Em todos os tempos observados a expressão nos AIRmin foi maior, sendo que

em 6 horas a diferença praticamente não existe. Nos AIRmax a diferença de 6 horas em relação ao seu controle é significativa ($p < 0.05$). Em 24 horas a diferença aumenta até que aos 30 dias a diferença é clara, já que existe uma repressão do gene da IL-4 nos animais AIRmax.

FIGURA 21: Cinética da expressão do gene do IL-4 na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.

Para a IL-10 (**Figura 22**) não existe diferenças no tempo de 6 horas, mas podemos observar uma tendência dos animais AIRmax expressarem quantidades maiores dessa citocina em 24 horas. Aos 30 dias, essa diferença passa a ser significativa ($p < 0.05$) em favor dos animais AIRmax.

FIGURA 22: Cinética da expressão do gene do IL-10 na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.

O comportamento do TGF- β (**Figura 23**) nos animais AIRmax é constante. O gene está constitutivamente reprimido e, 24 horas após um estímulo inflamatório, ele passa a ser expresso em quantidade considerável, retornando ao ponto inicial quando o estímulo é crônico. Já nos animais AIRmin, apenas em 6 horas temos pequena expressão do gene.

FIGURA 23: Cinética da expressão do gene do TGF β -1 na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.

Finalmente, a Caspase 8 (**Figura 24**). Em 6 horas, nos animais AIRmin, existe uma diferença entre a repressão apresentada e a expressão aos 30 dias ($p < 0.05$). No tempo de 24 horas existe uma maior expressão nos AIRmax (que é diferente da repressão aos 30 dias, $p < 0.01$) quando comparada com os AIRmin, mas esse padrão é completamente invertido aos trinta dias, onde existe uma forte repressão do gene da Caspase 8 nos AIRmax (diferente estatisticamente do seu controle, $p < 0.01$) e uma ativação desse mesmo gene nos AIRmin e essa diferença inter-linhagens é estatisticamente significativa ($p < 0.001$).

FIGURA 24: Cinética da expressão do gene da Caspase 8 na pele de animais AIRmax e AIRmin. Os gráficos A (AIRmax) e B (AIRmin) representam as diferenças intra-linhagens e o gráfico C representa as diferenças inter-linhagens.

Para os genes tidos como regulatórios do processo inflamatório agudo, podemos observar novamente uma repressão nos animais AIRmax controle e uma expressão ainda incipiente em 6 horas que torna-se consistente em 24 horas, onde aparentemente o processo inflamatório nesse animais já atingiu seu ápice e começa a ser resolvido, com a transcrição desses genes regulatórios (exceto a IL-4). Já aos 30 dias, com exceção da IL-10, esse genes voltam a ser reprimidos nos animais AIRmax, enquanto permanecem ativados nos AIRmin.

Tomados em conjunto, esses dados reforçam a hipótese da importância do balanço pró e anti-inflamatório local na determinação do fenótipo.

4.6 Avaliação da expressão gênica global de células de medula óssea de camundongos estimulados com Biogel pelo método de *Microarray*

O primeiro passo para a realização do *microarray* é a obtenção de um RNA de ótima qualidade para ser hibridizado. Assim, partimos de um *pool* de células de medula dos animais AIRmax e AIRmin estimulados com Biogel por 24 horas e controles e extraímos o RNA, de onde originaram-se os cDNAs de fita simples e posteriormente de fita dupla que sofreram a transcrição *in vitro* para produção de cRNA. As amostras de cRNA foram então hibridizadas e os primeiros parâmetros avaliados foram os controles internos da lâmina.

Na lâmina estão colocadas, além das seqüências correspondentes aos genes de camundongos, seqüências que hibridizam com os mRNAs bacterianos colocados no início da síntese de cDNA de fita simples. Esses funcionam como controles internos e estão repetidos por toda a lâmina, em distribuição aleatória. Na **figura 25** podemos observar os controles negativos. Nesse gráfico, a expressão de todos os nossos controles estão abaixo da fluorescência de fundo, isto é, abaixo do “background” ou “ruído” da lâmina, atestando a confiabilidade dos nossos resultados. Na **figura 26** observamos os controles positivos. Nesse gráfico, a expressão de todos os controles positivos está acima do valor da fluorescência de fundo, isto é, acima do “background” ou “ruído” da lâmina, confirmando a qualidade do experimento.

FIGURA 25: Controles negativos da lâmina de *microarray*. As seqüências alvo dos mRNAs bacterianos estão distribuídas aleatoriamente pela lâmina. As expressões dos controles internos da lâmina estão abaixo da fluorescência de fundo.

FIGURA 26: Controles positivos da lâmina de *microarray*. As seqüências alvo dos mRNAs bacterianos estão distribuídas aleatoriamente pela lâmina. As expressões dos controles internos da lâmina estão acima da fluorescência de fundo.

Em seguida o software “CodeLink Expression Analysis” gera gráficos que informam sobre genes diferencialmente expressos, comparando diferentes lâminas. Como ilustração, a **figura 27** apresenta a comparação entre os resultados dos animais AIRmax e AIRmin estimulados com Biogel após 24 horas.

FIGURA 27: Representação gráfica da expressão gênica de células de medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin submetidos ao estímulo com Biogel.

Nessa figura estão representados no eixo X os resultados de expressão gênica dos animais AIRmax e no eixo Y estão os animais AIRmin, ambos estimulados. Em marrom estão os genes cuja expressão está próxima do “background” e, portanto devem ser excluídos de uma análise posterior. Em azul estão os genes que possuem expressão acima do ruído. A linha verde é a mediana da fluorescência de todos os “spots” das lâminas e os resultados já estão normalizados por ela. E finalmente, as duas linhas rosa indicam o limite de duas vezes de diferença. Então, a interpretação do gráfico indica que existe uma quantidade maior de genes diferencialmente expressos (duas vezes) no AIRmax em relação ao AIRmin.

Os dados foram então exportados para tabelas do tipo Excel ou em formato texto e analisados posteriormente.

O próximo passo foi a validação do *microarray*. Nessa fase, comparamos a expressão de alguns genes obtidas pelo *microarray* com as expressões obtidas através do qPCR. Alguns genes diferencialmente expressos e envolvidos na resposta inflamatória foram escolhidos. Os resultados estão apresentados na **Tabela 5**.

TABELA 5: Correlações entre as expressões gênicas obtidas no qPCR e *microarray* de células de medula óssea estimuladas com Biogel 24 horas.

Correlação de Pearson (r)	
IL-1 β	0,98
IL-6	0,54
IL-10	0,60
IL-8r	0,77
total	0,66; p=0,0075 (**)

Lembramos que os experimentos foram feitos na forma de réplicas biológicas e todos os procedimentos foram reproduzidos integralmente para os dois experimentos. Após validar as lâminas, os resultados foram submetidos ao programa SAM para compilação e análise da reprodução do experimento. Como anteriormente explicado no material e métodos, o SAM determina

estatisticamente genes diferencialmente expressos segundo um valor estipulado pelo usuário. No caso dos dados obtidos para inflamação aguda, optamos por trabalhar com genes que se apresentaram quatro vezes diferencialmente expressos para tornar a análise mais restritiva e segura.

Os genes ativados e reprimidos foram identificados para as diferentes linhagens, como mostrados na **figura 28**. Nesse gráfico podemos observar que após o estímulo com Biogel por 24 horas os animais AIRmax possuem 136 genes que são ativados e 94 que são reprimidos. Já os animais AIRmin apresentam 198 genes que são ativados e 740 que são reprimidos.

FIGURA 28: Número de genes ativados e reprimidos na medula óssea de animais das linhagens AIRmax e AIRmin após o estímulo com Biogel 24 horas.

Dando prosseguimento à análise dos dados, utilizamos o software EASE para verificar se os genes modulados pelo estímulo estariam sobre-representando alguma categoria funcional. Nas **tabelas 6, 7, 8 e 9** temos as categorias sobre-representadas pelos genes ativados e reprimidos nos AIRmax e nos AIRmin, bem como a lista dos mesmos após o estímulo por Biogel 24 horas.

TABELA 6: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes ativados nos animais AIRmax após o estímulo com Biogel 24 horas.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Comunicação celular / sinalização intracelular	37	1.43e-002	<i>Fyn, Ctnnbip1, Grit, Fgf13, Agtr1b, Olfr983, Trim23, Per3, Chrne, Gpr124, Pde9a, Il1r2, Il17ra, Il11, Il10ra, Il4ra, Adam28, Fgf21, Sipa1, Vcan, V1rg12, V1rh1, V1rh9, Ccr7, Cd3e, Gtpbp1, Smad3, Gpld1, Gira1, Gnas, Ghrh, Gnal, Map3k7, Rbm9, Lck, Gabrb1, Axin1</i>

TABELA 7: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes reprimidos nos animais AIRmax após o estímulo com Biogel 24 horas.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Resposta imune	20	3.87e-006	<i>Ppbp, Irf2, Igll1, Il1b, Igk-V38, Igk-V33, Ighg1, Igj Igk-V, Serpina1e, Pf4, Cxcl2, Ccl6, Tcrb-V13, Vpreb1, H2-Q10, Tyrobp, Cd3d, Ly6f, Tnfsf13b</i>

TABELA 8: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes ativados nos animais AIRmin após o estímulo com Biogel 24 horas.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Modificação de proteínas	10	9.00e-003	<i>Stk40, Lrrk2, Prkaca, Pdgfra, Ppt2, Pias4, Havcr2, Rps6kl1, Cdc25a, Gria1</i>
Comunicação celular	21	1.38e-002	<i>Gira3, Lama4, Olfr170, Clec14a, Olfr507, Hapln2, Prkaca, Trim23, Pdgfra, Olfr493, Olfr1269, Pias4, Drd3, Scg5, V1rc5, Foxa3, Mapk8ip2, Gria1, Pcdhb21, Chrn4, Tac4</i>
Metabolismo de proteínas	16	2.68e-002	<i>Stk40, Lrrk2, Prkaca, Pdgfra, 4930432H15Rik, Erap1, Ppt2, Pias4, Barhl2, BarH, Havcr2, Rps6kl1, Rps3, Cdc25a, Tpp2, Gria1, Nr5a2</i>

TABELA 9: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes reprimidos nos animais AIRmin após o estímulo com Biogel 24 horas.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Proliferação / Ciclo celular	57	3.96e-007	<i>Smchd1, Cetn2, Ccnb1, Fanc1, Gadd45g, Prim1, Mobkl3, Ppp1ca, Kras, Ppm1g, Nuf2, Pttg1, Kit, Jun, Itgb1, Ebna1bp2, Aurka, Aurkb, Mapre1, Psmg2, Cdkl1, Nampt, Sept6, Slfn3, Gtpbp8, Siah1a, Nf2, Nek2, Mxi1, Cul4a, Csf1r, Sfn, Hdgf, Uba1, Rnf2, Dock2, Cul1, Cdkn2c, Cdc42, Smc4, Mcm6, Mcm2, Gspt1, Cct7, Cct2, Ccne2, Ccnd3, Ctnnb1, Casp3, Calm2, Tgfb1, Bub3, Btg2, Rad9, Rad21, Wdr20a, Orc4l</i>
Metabolismo de DNA	38	4.30e-006	<i>Fanc1, Gadd45g, Prim1, Smarcd2, Asf1b, Pttg1, Parp1, Hat1, Supt4h1, Aurkb, Dnmt3a, Ruvbl1, Actl6a, Csnk1d, Hp1bp3, Zc3h11a, Hist1h2bc, Mylc2b, Hdac2, Mll3, Uba1, H2afy, Pplr2g, Recql, Mela, Mcm6, Mcm2, Ccne2, Cbx3, Cbx1, Mbd3, Xab2, Btg2, Smarca5, Rad51ap1, Rad21, Orc4l, Morf4l1</i>
Metabolismo de RNA	32	5.01e-006	<i>Cpsf3l, Pcbp1, Auh, Farsb, Sfrs4, Papola, Cstf2t, Ebna1bp2, Vars2, Pcbp2, Spop, Hnrnpu, Pabpn1, Prmt1, Cugbp1, Hnrnpa1, Ddx24, Dnajb11, Papolg, Hnrnpa2b1, Exosc9, Sfrs1, Trmt1, Cct2, Rbm39, Csd2, Xab2, Skiv2l2, Sip1, Dhx15, Rpgrip1, Rmb6</i>

A partir dos dados de expressão gênica das linhagens, avaliamos quais os genes diferencialmente expressos entre AIRmax e AIRmin e quais as categorias funcionais sobre-representadas por eles. Na **figura 29** temos a representação dos genes diferencialmente expressos mais que quatro vezes. Nos controles, o número de genes com maior expressão nos AIRmax foi de 125 e nos AIRmin, 162 genes. Após o estímulo com Biogel, o número de genes diferencialmente expressos aumenta, chegando aos 495 genes com maior expressão nos AIRmax e 223 nos AIRmin, no primeiro caso devido principalmente aos genes reprimidos nos AIRmin.

FIGURA 29: Número de genes diferencialmente expressos nos animais controles e estimulados com Biogel 24 horas.

Nas **tabelas 10, 11, 12 e 13** estão listadas as categorias funcionais sobre-representadas pelos genes diferencialmente expressos entre os controles e entre os animais experimentais das duas linhagens submetidos ao estímulo com Biogel.

TABELA 10: Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão >4 vezes nos animais controles da linhagem AIRmax comparados aos AIRmin.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Digestão	3	7.48e-003	<i>Npy, Tac4, Csn1s1</i>
Resposta de defesa / inflamatória	4	3.16e-002	<i>Il1b, Cxcl2, Cxcl1, Tlr6</i>
Regulação positiva da síntese de IL-6	2	3.37e-002	<i>Il1b, Tlr6</i>

TABELA 11: Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão >4 vezes nos animais controles da linhagem AIRmin comparados aos AIRmax.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Metabolismo de DNA	19	5.45e-008	<i>Prim1, Prim2, Asf1b, Parp1, Hells, Hat1, 4933411G06Rik, Ruvb1, Actl6a, Ctcf, Mre11a, Ahcy, Mela, Gtf2h1, Ccne2, Rad23a, Gcn5l2, Rad21, Usp8</i>
Tradução	9	6.52e-004	<i>Farsb, Prim2, Gmf1, Eif4g2, Eif4a2, Spnb2, Cct2, Lgtn, Rpgrip1</i>
Processamento de RNA	10	2.00e-003	<i>Farsb, Prim2, Ppp1r8, Spnb2, Hnmpu, Rpgrip1, Nol5, Sfrs1, Cct2, Rbm6</i>

TABELA 12: Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão >4 vezes nos animais AIRmax após o estímulo com Biogel 24 horas comparados aos AIRmin.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Resposta de defesa / inflamatória	18	2.97e-008	<i>Fos, Fcer1g, Itgb2, Cxcl2, Ccl8, Saa3, Myd88, Cybb, Cd14, Tlr1, Itgam, Il10, Ncf1, Csf3r, Ccr2, Ccr1, Dock2, Tnfrsf1a</i>
Biossíntese de macromoléculas	41	1.12e-005	<i>Atp6v1b2, Atp6v1a, Impdh1, Atp5b, Rpl14, Eefig, Atp6v0d1, Gadd45g, Farsb, Ireb2, Paics, Prkag1, Isyna1, Eif4e3, Eif3e, Adsl, Il6, Vars2, Il10, Eef1a1, Ampd2, Mterfd1, Eif4g2, Nmt1, St8sia1, Gadd45b, Acly, Gyg, Eif4h, Cebpb, Edem2, Gys1, Cct2, Cd37, Agpat2, Tlr1, Atic, B3gnt5, Rad21, Chst14, Mapk13</i>
Metabolismo de coenzimas	13	6.22e-005	<i>Atp6v0d1, Atp6v1b2, Atp6v1a, Atp5b, Ubiad1, Idh1, Acly, Rsad2, Gsr, Ncf1, Cpox, Gcat, Cyb5r4</i>
Quimiotaxia de células imunes	5	1.95e-004	<i>Itgb2, Itgam, Csf3r, Ccr1, Dock2</i>

TABELA 13: Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão >4 vezes nos animais AIRmin após o estímulo com Biogel 24 horas comparados aos AIRmax.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Meiose	4	5.18e-003	<i>Sycp1, Rec8, Clgn, Wdr20a</i>
Morfogênese	16	6.30e-003	<i>Plce1, Pitx1, Pdgfra, Elf3, Prelp, Dmd, Myom2, Hoxd3, Myl4, Hoxd13, Tlx3, Dpysl3, Cdkn2a, Lhx8, Ptprz1, Bglap1</i>
Proliferação	14	6.57e-003	<i>Ets1, Pdgfra, Sycp1, Elk1, Rec8, Hoxd13, Clgn, Ccnj, Cdkn2a, Rab8a, Cd28, Nr6a1, Cdk8, Wdr20a</i>

4.7 Avaliação da expressão gênica global de células de medula óssea de camundongos estimulados com TPA pelo método de *Microarray*

Da mesma forma que para o experimento anterior, partimos de um *pool* de células de medula dos animais AIRmax e AIRmin estimulados com TPA durante 30 dias e controles que recebiam aplicações de acetona (veículo) nos mesmos dias e extraímos o RNA pelo método do TRIzol. Em seguida, esse material passou pelo *clean-up* e sua integridade foi avaliada da mesma maneira. O protocolo seguido para a preparação do cRNA foi o mesmo e a qualidade das amostras também estava de acordo para a continuação do experimento. Os controles internos das quatro lâminas que foram utilizadas para a inflamação crônica apresentaram-se da mesma forma anteriormente vista, isto é, de acordo com os parâmetros adequados. A seguir foram gerados os gráficos de diferenciação dos genes e as tabelas a serem exportadas. Como exemplo, a **figura 30** traz a comparação entre os controles.

FIGURA 30: Representação gráfica da expressão gênica de células de medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin controle, submetidos ao estímulo com acetona.

Nessa figura estão representados no eixo X os resultados de expressão gênica dos animais AIRmax e no eixo Y estão os animais AIRmin, ambos controles. O restante da interpretação é semelhante ao gráfico anterior. Assim, os dados no gráfico demonstram que existe uma quantidade maior de genes diferencialmente expressos (duas vezes) no controle AIRmin em relação ao controle AIRmax.

A validação de alguns genes foi feita da mesma maneira para esse segundo experimento. Os resultados estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 14):

TABELA 14: Correlações entre as expressões gênicas obtidas no qPCR e *microarray* de células de medula óssea estimuladas com TPA durante 30 dias.

Correlação de Pearson (r)	
IL-1 β	0,78
IL-6	0,91
IL-12p35	0,46
IL-8r	0,82
total	0,60; p=0,017(*)

Da mesma forma que para a inflamação aguda, para a inflamação crônica os experimentos foram feitos em réplicas biológicas e todos os procedimentos foram reproduzidos integralmente para os dois experimentos. Após validar as lâminas, os resultados foram submetidos ao programa SAM para compilação e análise da reprodução do experimento. No caso dos dados obtidos para inflamação crônica, novamente optamos por trabalhar com genes que se apresentaram quatro vezes diferencialmente expressos para tornar a análise mais restritiva. Seguimos o mesmo raciocínio e os genes ativados e reprimidos foram identificados para as diferentes linhagens, como mostrados na **figura 31**. Nesse gráfico podemos observar que após o estímulo com TPA por 30 dias os animais AIRmax apresentam 406 genes que são ativados e 122 que são reprimidos. Já os animais AIRmin apresentam 227 genes que são ativados e 52 que são reprimidos.

FIGURA 31: Número de genes ativados e reprimidos na medula óssea de animais das linhagens AIRmax e AIRmin após o estímulo com TPA 30 dias.

A análise de sobre-representação dos genes modulados está representada nas tabelas a seguir.

TABELA 15: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes ativados nos animais AIRmax após o estímulo com TPA 30 dias.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Transporte de íons	11	4.36e-002	<i>Atp6v1a, Kcnj9, Slc26a5, Slc23a2, Slc13a2, Ryr1, Hcn1, Kcnh8, Glra1, Slc39a4, Slco2a1</i>
Transdução de sinal ligado a receptor de superfície	24	6.61e-002	<i>Olfr78, Gnas, Glra1, Axin1, Olfr539, Olfr799, Olfr275, Olfr983, Olfr482, Olfr1095, Olfr710, Mrgprh, Il1r2, Il15ra, Olfr480, Ccl28, Olfr976, Olfr1232, Olfr729, Htr2a, Gkap1, Chrm3, Hcrtr1, AI987712</i>

TABELA 16: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes reprimidos nos animais AIRmax após o estímulo com TPA 30 dias.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Morfogênese do epitélio	2	6.98e-002	<i>Lce1a1, Lama1</i>

TABELA 17: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes ativados nos animais AIRmin após o estímulo com TPA 30 dias.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Transdução de sinal Rho-GTPase	3	3.49e-003	<i>Cdc42ep4, Ptplad1, Gna13</i>
Metabolismo de ácido nucléico	15	9.97e-003	<i>Paqr7, Rpp40, Gabpb2, Zdhhc20, Lars, Jarid1a, Ahctf1, Nlcn1, Ikzf1, Myt1, Hdac7, Mga, Xrcc5, Atrx, Zfp445</i>
Angiogênese	3	1.94e-002	<i>Rapgef1, Angpt1, Gna13</i>

TABELA 18: Categorias funcionais sobre-representadas entre os genes reprimidos nos animais AIRmin após o estímulo com TPA 30 dias.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Desenvolvimento	8	1.81e-002	<i>Lce1a1, Alx3, Chst2, Ibsp, Myh4, Vegfc, Spock2, Foxc1</i>
Crescimento celular	12	2.02e-002	<i>Slc17a3, Src, Scnn1b, Myh4, RP23-157O10.7, Rprd2, Vegfc, Cd28, Tmem114, Cd40lg, Gpr12, Cacnb3</i>
Proliferação de linfócitos	2	3.51e-002	<i>Cd28, Cd40lg</i>

A próxima figura (**Figura 32**) se refere aos genes diferencialmente expressos após o tratamento com TPA durante 30 dias. Para os controles, continuamos com 77 genes quatro vezes diferencialmente expressos nos AIRmax e 98 genes nos AIRmin. Após o estímulo com TPA, o número de genes mais de quatro vezes diferencialmente expressos aumenta para 460 nos AIRmax e 383 nos AIRmin.

FIGURA 32: Número de genes diferencialmente expressos (AIRmax / AIRmin) nos animais controles e estimulados com TPA 30 dias.

Nas **tabelas 19 e 20** estão listadas as categorias funcionais sobre-representadas pelos genes diferencialmente expressos entre os animais experimentais das duas linhagens submetidos ao estímulo com TPA.

TABELA 19: Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão >4 vezes nos animais AIRmax após o estímulo com TPA 30 dias comparados aos AIRmin.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Modificação de proteínas	22	2.40e-002	<i>Grk6, Lats1, Ppp2cb, Flt3, Kdr, C430014N20Rik, Pcsk6, Ube4b, Nmt1, Rps6ka5, 5730469M10Rik, B3gnt2, Snf1lk, Vrk3, Uba1, Rock2, Chuk, Spc24, Cd37, Mtmr4, Lox, Galnt1</i>

TABELA 20: Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão >4 vezes nos animais AIRmin após o estímulo com TPA 30 dias comparados aos AIRmax.

Categoria funcional	n° de genes	EASE score	Genes
Adesão celular	12	4.96e-003	<i>Cntn2, Itgb2l, Pecam1, Fcgbp, Emr1, Cldn11, Wisp2, Cdh5, Cdh16, Al987712, Stab2, Lgals7</i>
Desenvolvimento / Morfogênese	24	6.88e-003	<i>Fzd5, Cramp1l, 1700018B08Rik, Itgb2l, Angpt1, LOC380905, Fcgbp, En1, Cldn11, Ntn3, Cox7b2, Rnf17, Nfe2l1, Sema4d, Hdac7, Mtap2, Hoxa11, Foxg1, Hes1, Tlx3, Bai2, Al987712, Matn4, Socs2, Uts2</i>

4.8 Ensaios Biológicos

4.8.1 IL-1 β

A IL-1 β é sabidamente uma citocina extremamente importante nos processos inflamatórios e tumorais. Como já apresentado anteriormente, ela tem sua expressão na pele diferenciada entre AIRmax e AIRmin após 24 horas de

estímulo por TPA, além de ter sua expressão constitutiva diferente na medula (os animais AIRmax controle apresentam maiores níveis de expressão para essa citocina). Além disso, entre as linhagens AIRmax e AIRmin ela apresenta-se, em situações diversas, como séria candidata a regular alguns eventos essenciais nos processos citados acima. No intuito de verificar se a secreção de IL-1 β também seria diferente entre as linhagens, foram feitos alguns ensaios como descritos a seguir.

Quando estimulados com LPS, monócitos geram pro-IL1 β , mas liberam pouca quantidade de citocina ativa. O processo pós-traducional é desencadeado pelo ATP, que ativa a caspase-1 e que, por sua vez, cliva a pró-IL1 β em sua forma madura. O *P2x7r* é um receptor purinérgico que tem como ligante o ATP e a sua ativação pode levar desde a formação de canais de cátions até poros que podem determinar a morte celular. Além disso, também foram atribuídas ao *P2x7r* funções na regulação da inflamação, baseadas na sua capacidade de induzir apoptose e secreção de citocinas. Uma mutação alélica (P451L) determina sensibilidade reduzida à formação de poros induzida por ATP em células de camundongos C57BL6 e DBA2, mas seus efeitos na secreção de citocinas eram desconhecidos. Uma vez que essas linhagens fazem parte das populações fundadoras dos animais AIRmax e AIRmin, passamos à verificação do polimorfismo alélico do *P2x7r* em um “background” inflamatório e sua influência na produção de citocinas. Primeiramente fizemos a genotipagem desse gene nas linhagens AIRmax e AIRmin. O resultado dessa genotipagem revelou um grande desequilíbrio de frequência entre os alelos do *P2x7r* (**tabela 21**).

TABELA 21: Genotipagem do *P2x7r* nos animais AIRmax e AIRmin, onde a substituição C/T leva a mutação P451L.

Genótipo <i>P2x7r</i>	CC (BALBc)	CT	TT (DBA2)
AIRmax	6	12	2
AIRmin	0	6	17

A partir desse resultado, dosamos a IL-1 β e o TNF- α nos animais selecionados. Inicialmente a dosagem foi feita em *pools* (figuras 33 e 34) e foram variadas as doses de LPS e de ATP em cada ensaio. Como resultado obtivemos que a secreção de IL-1 β é dependente da dose de ATP utilizada e a dose de LPS pouco interfere no resultado para animais AIRmax, resultado completamente diferente do encontrado para o TNF- α , cuja secreção depende da dose de LPS e independe da dose de ATP e da linhagem do camundongo.

FIGURA 33: Níveis de IL-1 β secretados no plasma estimulado com diferentes doses de LPS e ATP. Os níveis de IL-1 β são ATP-dependentes e LPS-independentes.

FIGURA 34: Níveis de TNF- α secretados no plasma estimulado com diferentes doses de LPS e ATP. Os níveis de TNF- α são LPS-dependentes e ATP-independentes.

Aparentemente, a secreção de IL-1 β estava condicionada à presença do alelo que caracterizava o receptor suficiente e presente nos animais AIRmax. Para confirmar essa hipótese, em um experimento posterior, os animais da seleção AIR foram genotipados e a IL-1 β dos mesmos foi dosada após o protocolo de estímulo *in vitro* (**tabela 22**). Todos os animais AIRmax produziram IL-1 β , independente do genótipo e, ao contrário do esperado, os animais que apresentavam genótipo TT produziram maior quantidade de IL-1 β ($p < 0.01$) quando comparados com os animais CT e CC. Entre os animais AIRmin não foi encontrado nenhum animal CC, apenas 1 animal CT, e esse era capaz de produzir nível mensurável de IL-1 β , apesar de ser significativamente menor do que os animais AIRmax CT ($p < 0.05$). Entre os animais AIRmin TT, apenas 3 em 16 produziram IL-1 β e seus níveis foram extremamente menores do que nos animais AIRmax TT ($p < 0.001$).

TABELA 22: Genotipagem do *P2x7r* e níveis de IL-1 β secretada após estímulo. A genotipagem foi feita através de PCR alelo-específico e a IL-1 β foi mensurada através da técnica de ELISA.

Genótipo <i>P2x7r</i>	CC (BALBc)	IL-1 β (pg/ml)	CT (B/D)	IL-1 β (pg/ml)	TT (DBA)	IL-1 β (pg/ml)
		7/7		6/6		2/2
AIRmax	7	3289 $\pm$ 1655	6	3694 $\pm$ 1199	2	7183 $\pm$ 81
				1/1		3/16
AIRmin	0	-	1	573	16	1063 $\pm$ 805

Assim, encontramos uma dependência parcial da secreção de IL-1 β com a presença do receptor suficiente, mas aparentemente os níveis de secreção de IL-1 β estariam mais associados ao “background” inflamatório desses animais.

Para verificar se o fenótipo “secreção de IL-1 β ” estava associado ao fenótipo “resposta inflamatória aguda” foi feita a dosagem da citocina e a quantificação do influxo celular em uma população F2 de 300 animais (**Figura 35**). Analisando os dados, foram encontradas correlações positivas entre esses dois fenótipos para machos ($r=0,96$) e para fêmeas ($r=0,85$), $p < 0,001$.

FIGURA 35: Correlação entre secreção de IL-1 β e influxo celular local na população F2, onde o mesmo foi distribuído em classes de 0,4 log_n células infiltradas x 10⁶.

Como conclusão principal observamos que existe uma forte correlação entre o “background” inflamatório dos animais da Seleção AIR e a secreção de IL-1 β , já que os animais AIRmax, que apresentam maior infiltrado celular local em resposta ao Biogel, também possuem monócitos circulantes com maior capacidade para secretar IL-1 β . Além disso, apesar de haver grande desequilíbrio de frequência do alelo mutado que codifica o receptor *P2x7r* deficiente (AIRmin), não há fixação completa e essa mutação no *P2x7r* aparentemente exerce menor efeito sobre a secreção de IL-1 β do que o “background” genético desses animais. Então, além de apresentarem maiores níveis de expressão gênica para a IL-1 β na pele, os animais AIRmax também possuem monócitos com capacidade de secretar maiores níveis de IL-1 β quando submetidos a estímulos agudos.

4.8.2 Caspase 8

A *Caspase 8* também é um gene candidato a contribuir na diferenciação dos fenótipos de resposta inflamatória, uma vez que ele está localizado no cromossomo 1, em uma região fortemente associada ao fenótipo e que apresenta um desequilíbrio de frequência dos seus alelos. Além disso, a *Caspase 8* é uma caspase iniciadora, e participa tanto da apoptose induzida pela via extrínseca, quando é recrutada a partir da ativação de receptores de morte (TNFR e Fas), como da via intrínseca, através da sua ação sobre o BID, que amplifica a ativação de Bak e Bax e a liberação de citocromo c. Sabemos também que a apoptose tem papel fundamental na resposta imune e principalmente está intimamente envolvida com a relação entre inflamação e câncer.

Para investigar se o polimorfismo alélico da *Caspase 8* seria funcional, ou seja, codificaria expressões diferentes, o primeiro passo foi a determinação do polimorfismo alélico e o desequilíbrio de frequência entre esses alelos nas linhagens AIRmax e AIRmin (**Tabela 23**) e sua influência na expressão de *Caspase 8* (**Figura 36**). Existe um grande desequilíbrio de frequência entre os alelos da *Caspase 8*, sendo uma maior frequência dos alelos **a** nos animais AIRmax e do alelo **b** nos animais AIRmin, apesar da fixação não ter sido completa. Através de uma tabela de contingência achamos um valor alto de qui-quadrado para esse desequilíbrio ($\chi^2 = 30,08$) que foi corrigido por Yates e teve alto grau de significância ($p < 0,0001$).

TABELA 23: Frequência dos alelos da *Caspase 8* nos animais AIRmax e AIRmin. A genotipagem foi feita por PCR alelo-específico.

Alelos	a	b
AIRmax	22	2
AIRmin	2	22

Os animais foram estimulados segundo o protocolo de inflamação aguda ou crônica com TPA e a expressão de *Caspase 8* foi avaliada na pele. No tempo de 24 horas existe uma maior expressão nos AIRmax quando comparada com os AIRmin, mas esse padrão é completamente invertido aos trinta dias, onde existe uma forte repressão do gene da *Caspase 8* nos AIRmax e uma ativação desse mesmo gene nos AIRmin e essa diferença foi significativa ($p < 0,001$).

FIGURA 36: Expressão de mRNA para Caspase 8 em pele de animais AIRmax e AIRmin tratados com TPA em dose única de 10 µg para 6 e 24 horas e em duas doses semanais de 1 µg para 30 dias.

Em seguida foi feita uma correlação entre os alelos e a expressão de Caspase 8 na pele aos trinta dias (**Figura 37**). O alelo **a** apresenta correlação com repressão do gene da Caspase 8, enquanto o alelo **b** apresenta correlação com ativação do gene.

FIGURA 37: Correlação da expressão de mRNA para Caspase 8 em pele de animais AIRmax e AIRmin estimulados com TPA 30 dias com os alelos **a** e **b**.

Como conclusões, observamos um grande desequilíbrio de frequência entre os alelos da *Caspase 8* (alelo **a** nos AIRmax e alelo **b** nos AIRmin), porém não há fixação completa; esse desequilíbrio pode ter sido gerado devido à pressão seletiva para produzir as duas linhagens; a presença de um alelo específico pode modular a expressão de *Caspase 8* na pele dos animais AIRmax e AIRmin em um modelo de inflamação crônica. Assim, o alelo **a** que está presente com maior frequência nos AIRmax pode estar colaborando para uma maior expressão da *Caspase 8* sob estímulos agudos e uma repressão desse mesmo gene em uma situação de estímulo crônico, quando comparados aos AIRmin.

5 DISCUSSÃO

Em 1971, Weiss propôs um paradigma: as células pré-malignas não são uma ilha isolada, mas sim um foco de intensas interações teciduais. Nesse contexto, os muitos efeitos inflamatórios do microambiente tumoral são importantes para entender o desenvolvimento do tumor, assim como sua supressão.

As linhagens geneticamente selecionadas para alta e baixa resposta inflamatória aguda possuem também diferenças significativas na resistência e suscetibilidade a tumores de pele induzidos quimicamente. Esse fato nos leva a uma conclusão lógica: os genes que controlam a inflamação aguda podem responder, em parte, pela tumorigênese cutânea. Assim, procurar diferenças para um fenótipo significa achar evidências para o outro também. Então, nada mais razoável do que pensarmos no processo inflamatório como responsável por pelo menos parte da determinação do fenótipo, priorizando em nosso estudo a ação do promotor, que é um agente inflamatório.

Tendo em vista as diferenças nas relações entre inflamação aguda/crônica e progressão tumoral, escolhemos o tratamento com TPA por ele ser o promotor da tumorigênese e agente inflamatório, aplicado de forma aguda e crônica; o tratamento agudo com Biogel por ele ter sido o agente selecionador na geração das linhagens; e três tempos para serem objeto de estudo: 6 e 24 horas e 30 dias. Como explicado anteriormente, aos trinta dias obtivemos o início da divergência entre as linhagens para o fenótipo “tumorigênese cutânea”. Desse modo, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar as alterações locais e sistêmicas que o promotor da tumorigênese poderia causar, assim como suas conseqüências. O intuito de verificar a expressão de diversos genes que pudessem contribuir para os dois fenótipos foi alcançado com a utilização de amostras de pele e de medula desses animais. Essa abordagem tem sido utilizada em outros modelos de estudo das relações entre inflamação e câncer (GASSE et al., 2007).

Como visto no primeiro resultado apresentado nesta tese, os animais AIRmax possuem menor incidência e multiplicidade de tumores de pele induzidos quimicamente. Além disso, após o período de promoção esses tumores tendem a regredir, enquanto que aproximadamente 50% dos tumores dos AIRmin progridem para carcinomas espino-celulares (BIOZZI et al., 1998). Esse resultado

está de acordo com Murphy e colaboradores (2003) que descrevem que a promoção com aplicações repetidas de TPA induz a proliferação celular e tem como resultado em curto prazo a formação de lesões papilomatosas benignas. Nas fases finais da promoção, a proliferação induzida pelo TPA resulta em acúmulo de mutações adicionais, deleções cromossômicas e amplificações que favorecem fortemente a progressão de papilomas benignos para carcinomas de células escamosas e até carcinomas espino-celulares.

Em relação a essa maior resistência dos animais AIRmax a desenvolver múltiplos tumores podemos sugerir duas teorias que em última instância se completam. A primeira tem relação com o balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias e seus tempos de expressão. Tendo os AIRmax uma maior capacidade inflamatória aguda, nesse caso seria certo dizer que provavelmente esses animais conseguem eliminar, através da resposta inata, as células ditas mutantes. Além disso, e talvez mais importante, o AIRmax possui capacidade anti-inflamatória também aguda. Nossos resultados sugerem que os animais da linhagem AIRmax com 24 horas estão com a inflamação induzida pelo TPA sob controle e a mesma é resolvida logo em seguida. A resposta anti-inflamatória além de inibir a migração celular, limita a resposta vascular e inibe o crescimento tumoral (COUSSENS e WERB, 2002).

Segundo Philip et al. (2004) podemos simplificar a relação entre inflamação e câncer da seguinte forma: a inflamação aguda combate, enquanto que a inflamação crônica promove o desenvolvimento do câncer. A inflamação crônica pode agir fazendo com que as células acumulem maior número de mutações (causadas por carcinógenos ou reativos do oxigênio) possivelmente prevenindo a apoptose, direcionando-as à proliferação e dando a essas células pré-neoplásicas e neoplásicas vantagens no crescimento. Assim, a inflamação aguda pode levar ao desaparecimento de lesões pré-neoplásicas e o estímulo inflamatório persistente está comumente associado com o aumento no desenvolvimento do câncer (PHILIP et al., 2004).

Então, temos o seguinte panorama: os animais AIRmax possuem uma alta capacidade inflamatória porém também possuem uma alta capacidade de resolução do processo inflamatório, ao contrário do AIRmin, que não resolve seu processo inflamatório e, como consequência, desenvolve um processo crônico, o que favorece o microambiente tumoral.

Dois resultados fornecem dados que aparentemente comprovam, com grande propriedade, essa proposição acima descrita. O primeiro é a avaliação histológica dos cortes de pele dos animais AIRmax e AIRmin estimulados epicutâneamente com TPA de forma aguda e crônica. Além da grande diferença de migração celular, observamos também diferenças na qualidade desse infiltrado e, talvez o mais interessante, na cinética e persistência dessas células. Ao acompanharmos o que foi dito no parágrafo anterior e visualizando a **tabela 4**, conseguimos estabelecer uma correlação clara com o observado nesses resultados.

A inflamação nos AIRmax é extremamente aguda, aumenta em intensidade às 24 horas e está praticamente resolvida aos 30 dias, ou seja, grande capacidade inflamatória e alta capacidade de resolução. Em contrapartida, os animais AIRmin apresentam um aumento gradativo das células infiltradas e a manutenção e cronificação do processo. Lembramos que a persistência dessas células no local e seus produtos liberados facilitam a formação de um microambiente altamente favorável ao desenvolvimento tumoral.

O segundo resultado que colabora para a confirmação de parte da hipótese é a expressão de citocinas avaliada através do qPCR. Vimos que existe diferença na migração e na persistência das células no processo inflamatório local entre AIRmax e AIRmin e os dados obtidos por qPCR demonstram que essa diferença estende-se à expressão gênica. Os animais AIRmax apresentam uma reação inflamatória aguda, com grande migração de células e com altos níveis transcricionais de genes de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ em 6 horas. Os animais AIRmin também apresentam respostas semelhantes, mas em intensidade bem menor. Em 24 horas, o AIRmax aumenta o infiltrado celular e também alguns níveis de expressão de citocinas inflamatórias, como o da IL-1 α , IL-12 e IFN- γ , mantém o nível de expressão de IL-1 β , diminui a expressão de IL-6 e TNF- α e, mais importante, aumenta os níveis de IL-10 e TGF- β 1, além da Caspase-8, eventos que ocorrem com menor intensidade nos AIRmin. Dessa forma, podemos sugerir que o maior número de células infiltradas nos AIRmax geram maior variedade e quantidade de produtos que de alguma forma interferem na resposta inflamatória, sejam eles ativadores, reguladores ou restauradores da homeostase. Aos trinta dias, temos uma

situação diferente e o infiltrado celular é maior nos animais AIRmin. Não por acaso, nessa fase temos uma maior expressão de IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α e Caspase-8. Esses dados reforçam a hipótese de que os AIRmax inflamam rapidamente e intensamente, e desinflamam com a mesma rapidez e eficiência, enquanto que os animais AIRmin apresentam um curso normal para seu processo inflamatório.

A IL-1 é uma citocina pleiotrópica que desempenha papel importante na defesa do organismo, funcionando como ligação entre as respostas imune inata e adaptativa (MURPHY et al., 2000). Enquanto a IL-1 β aparentemente é forma dominante de IL-1 produzida pelas células de origem hematopoiéticas, a IL-1 α predomina nas células epiteliais, incluindo queratinócitos (KUPPER et al., 1988). A IL-1 α é uma citocina que pode ser induzida por aplicações de TPA na pele e que pode desempenhar importante papel anti-tumoral, inibindo a formação de papilomas e o crescimento de células mutadas através do sistema imune inato (MURPHY et al., 2003). Ela age induzindo a migração de neutrófilos e a infiltração dos mesmos nas fases iniciais do tumor pode ser benéfica (HAQQANI et al., 2001). Esses dados condizem com o nosso modelo, que apresenta níveis de mRNA para IL-1 α maiores nos animais AIRmax em 24 horas.

A IL-1 β age principalmente na ativação de NF- κ B. O NF- κ B desempenha papel duplo na tumorigênese, dependendo da fase em que ele é estimulado. Como supressor, ativa o sistema imune, a hematopoiese e, em alguns tipos de modelos tumorais, como por exemplo, o câncer de pele, sua inativação predispõe o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas. Como promotor, induz proteínas oncogênicas, transformação celular, medeia a proliferação e invasão celular, a angiogênese e o processo de migração da célula tumoral (metástase) (SHISHODIA e AGGARWAL, 2004; KARIN e GRETEN, 2005). Ainda não sabemos qual o papel do NF- κ B no nosso modelo, mas podemos sugerir que o alto nível de citocinas inflamatórias nos animais AIRmax, principalmente a IL-1 β , nas fases iniciais do processo inflamatório (6 e 24 horas) e o nos animais AIRmin nas fases tardias (30 dias) pressupõe uma ativação acentuada desse fator de transcrição, porém com papéis distintos: supressor de tumores de pele quando estimulado em fases precoces e promotor quando estimulado em uma fase mais avançada. Essa colocação ratifica a posição de diversos autores anteriormente

citados que apresenta a inflamação aguda como anti-tumoral e a inflamação crônica como pró-tumoral.

O TNF- α é certamente a citocina mais estudada na carcinogênese. E talvez por esse motivo seja a que tem um papel mais contraditório, como a própria inflamação. Muitos são os estudos que apontam o TNF- α como o grande vilão no desenvolvimento tumoral, uma vez que o mesmo pode ativar NF- κ B que é apontado, atualmente, como a grande chave reguladora da oncogênese. Altas doses de TNF- α , quando administradas localmente, podem resultar em regressão aguda e marcante de tumores em humanos e camundongos (OLD, 1988). Entretanto, dois estudos independentes demonstraram que a via de sinalização intacta do TNF- α é requerida para a indução de tumores de pele (SUGANUMA et al., 1999; MOORE et al., 1999). Como, então, avaliar o papel do TNF- α ? Aparentemente, o papel do TNF- α na tumorigênese depende do complexo formado entre ele e seu receptor. O complexo intacto leva a ativação de NF- κ B e sobrevivência celular (efeito pró-oncogênico), enquanto o complexo modificado (alterações bioquímicas) recruta caspase 8 e 10 e causa apoptose (efeito anti-oncogênico). Como essa decisão é tomada ainda não é completamente compreendido, mas parece depender da força e da duração da estimulação através do TNF- α ou Fas-L (PHILIP et al., 2004). No nosso modelo, inicialmente o TNF- α é expresso em maiores níveis nos AIRmax (24 horas), e nos AIRmin aos 30 dias.

Em estudos comparativos realizados anteriormente, a IL-12 mostrou-se a citocina mais efetiva em modelos tumorais animais (LEROY et al., 1998). A IL-12 é um heterodímero, constituído pelas unidades p35 e p40, produzida por células apresentadoras de antígeno, fagócitos e granulócitos (TRINCHIERI, 1995). A expressão de ambas as proteínas é necessária para a ativação da IL-12. Essa citocina é capaz de prevenir o desenvolvimento de metástases, além de desencadear uma resposta anti-tumoral a longo prazo (RAKHMILEVICH et al., 1997; CAVALLO et al., 1997). Dependendo do modelo tumoral, a IL-12 pode exercer seu efeito anti-tumoral através das células T (FERNANDEZ et al., 1999), células NK (YAO et al., 1999; KODAMA et al., 1999) ou células NKT (CUI et al., 1997). A IL-12 induz a produção de outras citocinas, como o IFN- γ (NASTALA et al., 1994; BRUNDA et al., 1995; TANNENBAUM et al., 1996) além de exercer

efeitos anti-angiogênicos, que inibem o crescimento local do tumor e a formação de metástases. A atividade anti-tumoral da IL-12 é mediada pela liberação de IFN- γ no sítio tumoral através da estimulação de macrófagos que liberam outras citocinas como o TNF- α , aumentam a síntese de óxido nítrico, aumentam a expressão de MHC nas células tumorais, de IP-10 (proteína 10 induzida por interferon) e induzem a infiltração de células T com conseqüente inibição da angiogênese (ANGIOLILLO et al., 1995; LASTER, GREENBERG e LEDER, 1995). Esses efeitos condizem perfeitamente com o encontrado nos resultados obtidos. Nos nossos resultados, os animais AIRmax apresentam maiores níveis de IL-12 para todos os tempos analisados, o que estaria contribuindo para a inibição do crescimento tumoral. Talvez ainda mais interessante seja o fato de que em 30 dias essa citocina apresenta repressão nos animais AIRmin ($p < 0,05$), o que pode estar favorecendo o desenvolvimento tumoral, fornecendo condições para a angiogênese.

Entre as citocinas inflamatórias que podem combater o desenvolvimento de tumores estão os interferons. O IFN- γ age ativando Stat-1, que aumenta o reparo de DNA (NOZAWA et al., 1999). Além disso, ele ativa p53 que não somente inibe a progressão do ciclo celular e a replicação de DNA como leva à apoptose. Assim, existem evidências de que a via do interferon é essencial na diminuição da frequência das mutações e no aumento dos reparos das mesmas (PHILIP et al., 2004). Os animais AIRmax apresentam altos níveis de IFN- γ quando comparados com os AIRmin já em seis horas e a diferença aumenta em 24 horas. Em compensação, aos 30 dias temos níveis maiores nos AIRmin. Levando em consideração esses efeitos do IFN- γ , podemos sugerir que os altos níveis precoces nos AIRmax induzem reparo de DNA ou a apoptose das células mutadas e que esse processo começará a acontecer nos AIRmin de 30 dias para frente. Interessante lembrar que os níveis de Caspase-8 acompanham os níveis de IFN- γ e TNF- α , reforçando o fato de que em 24 horas o sistema do AIRmax está voltando à homeostase celular, enquanto que o AIRmin está ainda tentando solucionar a inflamação.

Aparentemente, uma das funções ainda pouco explicadas da IL-6 é a transição do recrutamento de neutrófilos para monócitos durante a transformação

da inflamação de aguda para crônica. Possivelmente, o complexo formado entre a IL-6 e seu receptor solúvel (sIL-6) é decisivo nessa transição (GABAY, 2006).

As citocinas que são produzidas durante o processo inflamatório são estimuladores da produção de proteínas de fase aguda. Essas citocinas incluem IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e TGF β (KUSHNER, 1996), além da IL-6. A IL-6 é produzida no sítio de inflamação, principalmente por macrófagos e monócitos, e desempenha um papel crucial na produção de proteínas de fase aguda. As proteínas de fase aguda refletem a presença e a intensidade da inflamação e podem ser usadas como marcadores para diagnóstico e evolução (GABAY, 2006).

Entretanto, Xing e colaboradores (1998) identificaram um componente antiinflamatório na ação da IL-6 na resposta inflamatória local e sistêmica. Eles demonstraram que a IL-6 é essencial no controle da extensão da resposta inflamatória aguda, atuando particularmente no controle dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Em doenças crônicas (incluindo tumores) a IL-6 não desempenha somente o papel de indutora de reações de fase aguda como também ajuda no desenvolvimento da resposta específica celular e humoral (KOPF et al., 1994; XING et al., 1994; ROMANI et al., 1996; RUZEK et al., 1997; RAMSAY et al., 1994; MULE et al., 1992), incluindo diferenciação de células B, secreção de imunoglobulinas e ativação de células T.

O principal evento que distingue a mudança da resposta inflamatória aguda para a crônica é o recrutamento de monócitos para o sítio inflamatório. E a IL-6 desempenha papel importante nessa transição (KAPLANSKI et al., 2003). O complexo formado entre a IL-6 e sIL-6R α pode induzir células endoteliais a produzirem IL-8 e MCP-1, além de induzir expressão de moléculas de adesão (ROMANO et al., 1997). A manutenção da produção de IL-6 no sítio inflamatório também induz a apoptose dos neutrófilos infiltrados. A fagocitose desses neutrófilos pelos macrófagos leva ao aumento da secreção do TGF- β e de MCP-1 e diminui a produção de IL-8, ajudando na mudança do padrão de quimiocinas e favorecendo o recrutamento de monócitos (MELNICOFF, HORAN e MORAHAN, 1989; DOHERTY et al., 1988).

Levando em consideração os dados da literatura, podemos entender a diferença na expressão local da IL-6 nas linhagens. Nos nossos resultados, em 6 horas há uma expressão maior nos animais AIRmax, apesar do AIRmin sob

estímulo também apresentar níveis diferentes do seu controle. Nesse tempo, estão privilegiadas as funções inflamatórias da IL-6, com o estímulo da produção de proteínas de fase aguda e a migração de neutrófilos, fato comprovado pelas fotos dos histológicos. Já em 24 horas, a situação se inverte e passamos a ter maiores expressões nos animais AIRmin. Segundo a nossa hipótese, os animais AIRmax estão retornando a sua homeostase, portanto, é natural que os níveis de IL-6 estejam menores, uma vez que ela já realizou sua função inflamatória e anti-inflamatória, modulando a produção de citocinas. Já nos AIRmin ela estaria atuando na modificação do padrão de células recrutadas e conseqüentemente na cronificação do processo inflamatório. Aos 30 dias, os animais AIRmax apresentam níveis equivalentes ao seu controle, enquanto que os animais AIRmin ainda apresentam níveis elevados da citocina, indicando uma manutenção do processo inflamatório. Além disso, nas fotos dos histológicos podemos observar uma modificação no padrão das células infiltradas e onde antes predominavam os polimorfonucleares, aos 30 dias a maior população observada são os mononucleares.

A superfamília do TGF- β consiste em citocinas multifuncionais que regulam o crescimento e a diferenciação celular, remodelamento de tecido, resposta imune e angiogênese. Em mamíferos, existem três isoformas principais, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Na maioria dos tipos celulares, possuem as mesmas atividades biológicas. A pele é o maior alvo dessa citocina. Alterações nas suas vias de sinalização afetam diretamente o desenvolvimento do câncer de pele (WANG, 2001). O TGF- β também possui ações paradoxais na carcinogênese de pele, apresentando uma ação bifásica. Enquanto nas fases de iniciação e promoção o TGF- β parece exercer efeito supressor de tumor, na fase de progressão ele parece ser promotor. Embora os mecanismos ainda não estejam completamente esclarecidos, o controle da progressão do ciclo celular parece ser um dos importantes fatores pelo qual o TGF- β medeia o efeito supressor de tumor (SATTERWHITE, 1994). Além disso, Glick e colaboradores (1996, 1999) sugeriram que a manutenção da estabilidade genômica também pode ser importante e, finalmente, a indução de apoptose via Smads também pode contribuir para esse efeito (BENASSI et al., 1997), embora ainda não existam evidências *in vivo*. Em contraste com esse efeito supressor, o TGF- β também tem

sido implicado como fator promotor de tumor, já que ele tem potentes efeitos no remodelamento da matriz extracelular (LETTERIO e ROBERTS, 1997), angiogênese (PEPPER, 1997) e supressão imune (BOTINGER et al., 1997). No nosso modelo, os AIRmax têm expressão aumentada dessa citocina em 24 horas, o que não ocorre no AIRmin. Como essa fase é o início da promoção, podemos ver esse aumento como um fator supressor de tumor, o que pode colaborar para o fenótipo final de resistência.

A IL-10 desempenha papel importante no controle do crescimento do tumor e metástases através dos seus efeitos no sistema imune e inibindo a angiogênese. Da mesma forma que o TGF- β , ela pode exercer efeito pró-tumoral, já que a produção de TGF- β pelas células tumorais induz a produção de IL-10 pelos macrófagos, que por sua vez vão suprimir a atividade anti-tumoral dos próprios macrófagos (STEARNS et al., 1999). Mas, aparentemente, o principal efeito da IL-10 é anti-angiogênico e, portanto, antitumoral. Apesar do AIRmin também apresentar níveis consideráveis de IL-10, eles ainda são aparentemente maiores e mais persistentes nos AIRmax. Essa citocina, combinada com o TGF- β 1, estaria exercendo um papel antiinflamatório no microambiente tumoral.

A expressão gênica da Caspase 8 deve ser observada com cuidado, na medida em que o RNA foi extraído da pele como um todo e não podemos afirmar quais células estão entrando em apoptose. Poderíamos dizer que em 24 horas os animais AIRmax possuem níveis maiores de expressão de Caspase 8 porque estão eliminando as células defeituosas ou, mais provavelmente, estão induzindo a apoptose das células inflamatórias, uma vez que o processo inflamatório está claramente descendente. Já aos 30 dias, a expressão nos AIRmin é maior, o que poderia ser explicado pelo fato da manutenção da inflamação crônica, na qual existe uma constante chegada e morte de células no local.

Dados preliminares observados em experimentos de qPCR indicam uma expressão maior de Bcl2 na pele dos AIRmax em todos os tempos analisados, além de uma grande repressão desse gene nos AIRmin aos 30 dias. Da mesma forma, o p53 foi inicialmente analisado e nas duas linhagens, nos tempos de 6 e 24 horas os níveis de expressão foram praticamente iguais ao controle. Mas houve uma grande repressão do gene nos animais AIRmin aos 30 dias, o que pode ser indicativo da colaboração desse supressor de tumor na diferenciação do

fenótipo. Como dito anteriormente, esses dados são preliminares e precisam ser confirmados com experimentos posteriores.

Enfim, essa seria a primeira hipótese. A de que o balanço entre as citocinas pró e antiinflamatórias no microambiente tumoral poderia ser responsável pela distinção do fenótipo. A segunda refere-se ao fato de que células epidermais, quando submetidas a um estímulo de *stress* agudo, entram em um processo de senescência acelerada, interrompendo o seu ciclo celular e tornando-se não-responsivas a citocinas e fatores de crescimento do ambiente. Novamente, os resultados do qPCR e do histológico serão retomados para embasamento da hipótese.

Existem dois tipos de senescência: a senescência replicativa e a senescência induzida por *stress*. Esse assunto, anteriormente pouco estudado, tem adquirido relevância na medida em que pode representar um mecanismo anti-tumoral. Muitos estudos têm revelado que diversas células podem tornar-se rapidamente senescentes em resposta a vários estresses fisiológicos (LLOYD, 2002). A senescência parece ser um dos muitos programas biológicos que podem ser ativados pela célula, como a apoptose e a suspensão transitória do ciclo celular (BEN-PORATH e WEINBERG, 2004). Entre os estresses que podem levar a célula à senescência estão: agentes que causam dano de DNA, *stress* oxidativo, ativação de oncogenes e perturbações metabólicas (LLOYD, 2002; FAIRWEATHER et al., 1987; CHEN e AMES, 1994; VENABLE et al., 1995; SERRANO et al., 1997; ROBLES e ADAMI, 1998).

Os mecanismos envolvidos na senescência celular são pouco conhecidos. Sabemos que duas das principais proteínas supressoras de tumor, pRb e p53, desempenham importante papel na senescência. Entretanto, a contribuição relativa do pRb e p53 parece ser diferente entre as espécies e tecidos. Acredita-se que duas vias principais que regulam o ciclo celular, a via do p53-p21 e a via do p16-pRb, estão envolvidas na senescência. Tanto o p21 quanto o p16 acumulam-se em células senescentes e aparentemente a via p53-p21 é importante para o estabelecimento e a via p16-pRb para a manutenção da senescência celular. Além desses marcadores, no estágio avançado da senescência ocorre acúmulo de SA- β -gal (β -galactosidase associada a senescência) e mudança da morfologia celular. Outra possível hipótese a respeito das vias em questão é que a ativação não é seqüencial, e sim, o p21 é importante

na senescência replicativa e o p16 na senescência induzida por *stress* (ISHIKAWA, 2003). Mais importante é que Yeager e colaboradores (1998) sugeriram que a senescência celular induzida por *stress* dependente de p16-pRb funciona como supressor de tumor *in vivo*.

Além dos estímulos iniciais, outros fatores parecem ser importantes na indução da chamada “senescência acelerada”, como o NF- κ B, sendo este último indutor da parada do ciclo celular via p21 (ZHANG et al., 2004) e de resistência a apoptose (CHATURVEDI et al., 1999, 2003). Finalmente, os queratinócitos senescentes secretam proteínas que potencialmente medeiam efeitos anti-tumorais, como o TGF- β 1 (TREMAIN et al., 2000; NICKOLOFF et al., 2004).

Assim, analisando essas informações e os dados gerados pelo qPCR, podemos propor um modelo (**Figura 38**) para resistência dos AIRmax que inclui:

1. Estímulos estressantes: **DMBA**: indutor de dano de DNA, causando uma mutação que ativa o oncogene *Ras*; **Stress oxidativo**: com o início do tratamento com TPA ocorre grande migração de granulócitos, na sua maioria neutrófilos, a princípio, e mais tardiamente de mononucleares que desempenham suas funções na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; **Exposição a citocinas pró-inflamatórias**: a alta produção de IL-1 β , IL-12, TNF- α e IFN- γ podem causar uma interrupção irreversível do ciclo celular e levar os queratinócitos a uma resistência a apoptose, por ativação do NF- κ B.

2. Produção de TGF- β 1;

3. Os queratinócitos ativam o programa de senescência prematura ou acelerada e passam a não responder mais ao estímulo do promotor, através da interrupção do ciclo celular;

4. As células que sofreram mutação e que seriam a origem do câncer não se proliferam, impedindo o desenvolvimento do tumor.

FIGURA 38: Modelo proposto de resistência a tumorigênese induzida quimicamente em animais geneticamente selecionados para alta resposta inflamatória aguda (AIRmax).

Sabemos que existem diferenças fenotípicas claras entre AIRmax e AIRmin, e o trabalho prosseguiu no sentido de identificar quais genes são responsáveis por essas diferenças. Durante o processo de seleção das linhagens os alelos responsáveis pela alta ou baixa expressão dos fenótipos selecionadores (infiltrado celular e extravasamento protéico) foram fixados em homozigose. Assim, eles codificam expressões diferenciadas para uma série de eventos celulares. Primordial é saber como os genes desses animais foram selecionados e como eles se comportam diante do estímulo selecionador e dos diversos estímulos geradores dos fenótipos estudados.

Entre as linhas de pesquisa do laboratório de Imunogenética está o mapeamento de QTL que estão relacionados com a resposta inflamatória e com os sub-fenótipos estudados pelos diversos projetos em andamento. Com a identificação desses QTL e a verificação de quais genes estão contidos nesses *loci* podemos verificar se efetivamente ocorrem diferenças alélicas e

possivelmente de expressão desses genes e candidatá-los como responsáveis pela determinação dos fenótipos.

Como dito na introdução, a seleção genética realizada para formação das linhagens AIRmax e AIRmin resultou em animais que mantiveram o seu “background” genético heterogêneo, porém com genes responsáveis por modulação do processo inflamatório fixados em homozigose. Ainda retomando as informações anteriormente citadas, foi estimado que 11 QTL estão envolvidos no fenótipo AIR e estudos já realizados nessas linhagens indicam fortemente a presença de possíveis QTL moduladores da inflamação nos cromossomos 1, 5, 6, 7, 11 e 13.

Verificando a expressão de alguns genes localizados nesses prováveis QTL obtivemos dados que confirmam algumas suposições. No cromossomo 1 temos duas regiões de interesse: em 70 Mb a região do *Slc11a1*, que contém além do mesmo, os genes *Il1r2*, *Cd28* e *Il8rb* e em 130 Mb os genes *Il10* e *Chi3l1*. Além disso, no cromossomo 3 foi observada uma região de genes diferencialmente expressos relacionados a inflamação, aproximadamente em 90 Mb, que incluem *Tlr2*, *Adam15*, *Ilf2*, *Mcl1*, *Cd53* e *Vcam1*. No cromossomo 6 também se agruparam genes diferencialmente expressos relacionados a proliferação celular e transdução de sinal, enquanto que no cromossomo 11 a maioria dos genes diferencialmente expressos agrupou-se em categorias envolvidas na migração celular e reações inflamatórias. Interessantemente, alguns genes localizados nessas regiões como *Cd28*, *Il8rb*, *Il10*, *Tlr2*, *Adam15* e *Stat3* também se apresentam diferencialmente expressos entre os controles dos animais AIRmax e AIRmin.

O *Slc11a1* é um gene de efeitos pleiotrópicos e interfere na ativação de macrófagos e nas suas funções microbidas (BARTON, WHITEHEAD e BLACKWELL, 1995), na produção de IL-1 β e TNF- α (KITA et al., 1992) e na expressão de moléculas MHC de classe II (WOJCIECHOWSKI et al., 1999). Existe no Laboratório de Imunogenética sub-linhagens da seleção AIR que possuem o gene em questão em homozigose, com os alelos que determinam a funcionalidade ou não da proteína codificada pelo *Slc11a1*. Os animais das sub-linhagens apresentam diferenças tanto para resposta inflamatória induzida pelo Biogel como para diversos sub-fenótipos estudados, como a infecção por bactérias intracelulares, o choque endotóxico por LPS (BORREGO et al., 2006), a

artrite experimental provocada por pristane (PETERS et al., 2007), o reparo tecidual (De FRANCO et al., 2007) e a suscetibilidade ao câncer de pele (dados não publicados). As grandes diferenças entre os animais AIRmax e AIRmin nos controles e após estímulo com Biogel na expressão de genes compreendidos na região do *S11a1* sugerem fortemente que os mesmos estejam envolvidos na regulação de diversos eventos da inflamação e de outros fenótipos de interesse.

No cromossomo 6 foi descrito um gene candidato para regulação dos fenótipos de resposta inflamatória e suscetibilidade ao câncer de pulmão: o *Kras2* (MARIA et al., 2003). Esse gene é reprimido nos principalmente nos animais AIRmin após o estímulo com Biogel, juntamente com outros (*Atp6v1*, *Tnfrsf1*, *Cd9*, *Ccnd2* e *lapp*).

Esse mesmo padrão é observado para alguns genes do cromossomo 11 sabidamente relacionados com inflamação aguda e resistência a infecções bacterianas (BORREGO et al., 2006; WELLS et al., 2003). Além disso, essa região é sintênica ao cromossomo humano 5q31-q33 que está relacionada com resistência a diversas doenças (DESSEIN et al., 1999). No nosso modelo, entre os genes observados nesse provável QTL de modulação de resposta inflamatória (*Ccl8*, *Igf1bp4*, *Epx*, *Itga2b*, *Icam2*) o principal candidato é o *Stat3*, já que está envolvido na migração de neutrófilos (HURST et al., 2002), carcinogênese (HODGE, HURT e FARRAR, 2005), resistência a apoptose (WANG et al., 2008) e choque endotóxico (CARRITHERS et al., 2005).

Outro resultado interessante é a categorização dos genes ativados nos AIRmax e reprimidos nos AIRmin após o estímulo com Biogel, lembrando que o Biogel foi o agente selecionador para estabelecimento das linhagens. Os genes ativados nos AIRmax agruparam-se em uma categoria principal: comunicação celular/sinalização intracelular. Esses dados podem justificar, em nível molecular, o que Ribeiro e colaboradores demonstraram em 2003 em nível celular. Na caracterização da medula dos animais de ambas as linhagens foi mostrado que as células provenientes da medula dos AIRmax são mais reativas a citocinas granulopoiéticas quando comparadas com os AIRmin e também com camundongos BALB/c, respondendo com intensa e rápida proliferação. Além disso, essas mesmas células possuem maior e mais rápida capacidade de aumentar a expressão de receptores para citocinas envolvidas na diferenciação de eosinófilos e neutrófilos (IL-5R e principalmente, GM-CSFR). Esses são

eventos altamente potencializados por uma sinalização intracelular eficiente, e o fato dos genes responsáveis por eles estarem ativados nos AIRmax após o estímulo poderia explicar, em parte, a maior e mais rápida capacidade de resposta da medula desses animais.

Já os genes reprimidos nos AIRmin agruparam-se em três categorias principais: proliferação/ciclo celular, metabolismo de DNA e metabolismo de RNA, levando-nos a crer que a resposta de produção de células na medula desses animais estaria prejudicada. Além disso, quando pensamos na capacidade de resolução do processo inflamatório e retorno a homeostase, alguns genes da categoria “ciclo celular” tornam-se especialmente importantes, pois codificam proteínas relacionadas à regulação da apoptose como *Jun*, *Kit*, *Cybb*, *Casp3*, *Tlr2*, *Nfkb1* e *Il1b*.

Esses dados nos permitem dizer que a utilização do Biogel como agente selecionador do fenótipo “resposta inflamatória aguda” gerou, em uma ponta da seleção, animais com células de medula altamente capazes de produzir novas células através de sua especialização na transdução de sinal intracelular e ativação de vias efetoras, os AIRmax. Por outro lado, na outra ponta da seleção, estão os animais AIRmin, com os genes responsáveis pela proliferação e ciclo celular reprimidos, retardando a geração de novas células em resposta ao estímulo e o processo de resolução.

Ao avaliarmos os genes diferencialmente expressos, obtivemos confirmações para algumas hipóteses. Na comparação da expressão gênica entre os controles, temos como categoria sobre-representada no controle AIRmax “resposta de defesa/inflamatória”. Esse resultado indica que, ao final do processo de seleção genética, esses animais já respondem de forma basal diferenciada para a resposta inflamatória, o que está de acordo com o objetivo da criação das linhagens. Mas a resposta inflamatória é composta de vários eventos. Ao observarmos os principais genes incluídos nessa categoria, podemos destacar *Cxcl1* e *Cxcl2*. As quimiocinas codificadas por esses genes estão entre os mais importantes mediadores inflamatórios para recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos (KOBAYASHI, 2008). Lembrando um dos parâmetros de avaliação para realizar a seleção genética foi o infiltrado celular, esse resultado sugere, a princípio, que a característica da resposta inflamatória selecionada nos

animais AIRmax está relacionada, principalmente, com a expressão de quimiocinas e seus receptores.

Já quando os animais foram estimulados pelo Biogel e sua medula analisada quanto a expressão gênica 24 horas depois, pudemos observar quatro principais categorias nos animais AIRmax: resposta de defesa/inflamatória, biossíntese de macromoléculas, metabolismo de coenzimas e quimiotaxia de células imunes. Essas categorias são extremamente coerentes com o esperado para esses animais, uma vez que após o estímulo eles passam a se diferenciar ainda mais para resposta inflamatória, para atividade intracelular, para produção de citocinas e quimiocinas e para capacidade quimiotática. Na verdade, ocorre uma ampliação do padrão observado para o controle, com mais etapas da resposta inflamatória sendo representadas. Nesse caso, conseguimos observar genes que codificam quimiocinas, seus receptores e também moléculas de adesão como *Cxcl2*, *Ccl8*, *Ccr1*, *Ccr2*, *Itgam*, *Itgb2*, *Icam1*, *Il8rb* e *Vcam1*; genes envolvidos na granulopoese e maturação de neutrófilos como *Stat3*, *Cebpb*, *Tlr2*, *Tnfrsf1a*, *Il6*, *Il10*, *Il1b* e *Il8rb*, além do *Csfr3*; e genes envolvidos na sinalização intracelular como *Myd88* e *Cd14*.

A primeira parte da análise do microarray foi destinada a caracterizar as linhagens quanto a sua expressão gênica global na medula. Na segunda parte analisamos a expressão gênica global na medula desses mesmos animais, agora submetidos a outro estímulo: um estímulo de inflamação crônica. Lembrando o que já foi dito anteriormente, estaremos analisando a fase de promoção da tumorigênese cutânea no intuito de sugerir uma regulação gênica comum.

A primeira diferença clara nos resultados derivados dos dois estímulos é na quantidade e na direção de genes modulados nas linhagens. Enquanto a maior parte dos genes modulados após o estímulo por Biogel eram reprimidos no AIRmin (740 genes), após o estímulo com TPA ambas as linhagens apresentam maior quantidade de genes ativados (406 nos AIRmax e 227 nos AIRmin).

Entre as categorias sobre-representadas nos genes ativados no AIRmax estão: transporte de íons e transdução de sinal. Isso indica que a inflamação crônica também ativa genes com funções semelhantes aos ativados na inflamação aguda, embora eles sejam diferentes e em menor número. Então, independente do estímulo, os animais AIRmax possuem uma maior capacidade de ativação das suas células de medula óssea. Já os genes reprimidos no

AIRmax agrupam-se em uma categoria específica e muito interessante: morfogênese do epitélio. Para discutir esse fato é preciso lembrar como funciona no processo de tumorigênese e o papel do TPA como promotor. Recordando, o TPA é o agente que induz a proliferação celular e, apesar da proliferação celular não ser capaz de causar o câncer, uma proliferação em um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento, estroma ativado e agentes promotores de dano de DNA certamente potencializa ou promove o risco de desenvolvimento de neoplasias. O acúmulo de desarranjos genéticos na célula e a perda de regulação de seu crescimento e diferenciação determinam o aparecimento do tumor (BISHOP, 1991; RUOSLAHT, 1996). Assim, o TPA induz a proliferação celular e as deleções e mutações provocadas pelo DMBA vão acumulando-se. Nos AIRmax, esse mesmo agente consegue reprimir alguns genes responsáveis pela formação de novas células do epitélio o que acarretará menos chances de proliferar células mutadas e mesmo células normais, podendo configurar um fator de resistência a formação de tumores.

Entre as categorias sobre-representadas nos genes ativados no AIRmin estão: transdução de sinal Rho-GTPase, metabolismo de ácido nucléico e angiogênese.

A família da Rho-GTPase (incluindo RhoA, Rac e Cdc42) são mediadores chave para a dinâmica do citoesqueleto (HALL, 1998) e tem sido apontadas recentemente como reguladores cruciais da adesão celular mediada por caderinas (BRAGA et al., 1997; TAKAISHI et al., 1997; HORDIJK et al., 1997; JOU e NELSON, 1998; FOX et al., 2005). As caderinas são uma superfamília de receptores de transmembrana de adesão célula-célula envolvidos em vários processos biológicos como desenvolvimento, morfogênese e metástases de tumor (TAKEICHI, 1995; TEPASS et al., 2000; YAP, 1998; NOLLET, BERX e ROY, 1999). As caderinas ligam as células adjacentes através de seus domínios extra-celulares. Os domínios intracelulares medeiam a reorganização do citoesqueleto e promovem sinais intracelulares através da interação com as cateninas. Duas são as principais: p120 e β -catenina e ambas desempenham papéis significativos no núcleo, regulando a proliferação e a capacidade de invasão da célula. Existem fortes evidências de que a p120 age, pelo menos em parte, através da regulação das Rho-GTPases. Tanto a p120 quanto as Rho-

GTPases desempenham papéis essenciais na regulação da adesão intercelular. A p120 pode promover a adesão célula-célula ou a motilidade celular, dependendo de fatores que regulam a afinidade do complexo. Além disso, as cascatas de sinalização mediadas pela Rho-GTPase (por exemplo, MAP-kinase e NF- κ B) podem estender os efeitos da p120 a eventos adicionais, como sobrevivência, crescimento e capacidade de invasão das células (Van ROY e Mc CREA, 2005).

Então, podemos dizer que alguns genes ativados no AIRmin após o tratamento com TPA são responsáveis por processos de proliferação, motilidade, adesão e capacidade de invasão das células; além disso, outra categoria sobre-representada entre esses genes é angiogênese, outro fator crucial para o desenvolvimento e manutenção de tumores, assim como para formação de metástases. Levando em consideração esses resultados, podemos sugerir que esses eventos desencadeados pelo TPA colaboram para a maior suscetibilidade dessa linhagem ao desenvolvimento de tumores de pele.

Entre os genes reprimidos no AIRmin a categoria sobre-representada mais interessante é a proliferação de linfócitos, constituída pelos genes *Cd28* e *Cd40lg*. Sabemos que a resposta inata é a primeira linha de combate, mas a resposta adquirida começa a ser ativada em seguida. Como dito anteriormente, os mecanismos de resistência do organismo que impedem ou inibem o crescimento ou disseminação das células tumorais vão da resposta primária mediada por células e fatores solúveis até a produção de anticorpos e células citotóxicas dirigidos contra os antígenos tumorais. As respostas imune adaptativa e inata interagem para prevenir a malignidade. O fato da proliferação de linfócitos estar reprimida nos animais AIRmin após o tratamento com TPA pode significar uma diminuição na resposta adquirida desses animais. Sabemos que não há diferenças para a resposta de produção de anticorpos totais contra antígenos de salmonela (ARAÚJO et al., 1998) e contra HSP65 (VIGAR et al., 2000), apesar de haver diferença no padrão de produção (Th1/Th2). Talvez mais importante seja a possível diminuição da proliferação e provavelmente da ativação de linfócitos T. Principalmente nos linfócitos T CD8+, já que esse tipo celular desempenha papel essencial no controle de células tumorais, através da sua capacidade de reconhecer células alteradas e desencadear sua morte por citotoxicidade. Então, poderíamos sugerir mais um mecanismo que poderia colaborar na suscetibilidade

do AIRmin: diminuição na população normal de linfócitos, dificultando o controle e eliminação das células tumorais.

Quando analisamos os genes diferencialmente expressos após o estímulo com TPA 30 dias percebemos que os genes expressos no AIRmax agruparam-se em uma categoria genérica, já que “modificação de proteínas” pode ter diferentes significados, variando com o tipo de alteração e a especificidade das proteínas. Porém um dos genes citado nessa categoria, o *B3gnt2*, tem uma função muito interessante e talvez possa indicar o caminho da modificação das proteínas que ocorrem nos AIRmax.

A β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (*B3gnt2*) é uma polilactosamina-sintase. Segundo Togayachi e colaboradores (2007) a deficiência de polilactosaminas aparentemente está envolvida em doenças imunológicas. Esses autores sugerem que as mesmas podem ser um fator regulatório do sistema imune suprimindo respostas imunes excessivas e regulando os níveis basais de reações imunes. Embora o mecanismo ainda não esteja totalmente esclarecido, aparentemente duas moléculas co-estimulatórias, CD28 e CD19, estão envolvidas nessa regulação, já que apresentam polilactosaminas na sua constituição. Camundongos *B3gnt2*^{-/-} apresentam maior proliferação de linfócitos T e hiperproliferação de linfócitos B após estímulo. Além disso, os macrófagos desses animais apresentaram maiores níveis de CD14 na superfície (TOGAYACHI et al., 2007), indicando o papel dessa proteína na regulação e homeostase do sistema imune. Assim, esse mecanismo regulatório estaria sendo ativado nos AIRmax, favorecendo a resolução e ajudando a impedir o processo de cronificação da inflamação.

Os genes diferencialmente expressos nos AIRmin agruparam-se em categorias interessantes, como morfogênese e adesão celular. Entre os genes citados nessa última categoria estão *Itgb2l*, *Pecam1*, *Fcgbp*, *Cdh5*, *Cdh16* e *Stab2*. Esses genes estariam favorecendo a adesão e transmigração de vários tipos celulares, incluindo leucócitos e células tumorais. Além de moléculas de adesão, esses genes codificam moléculas responsáveis por motilidade celular e adesão célula-célula. As caderinas (*Cdh5* e *Cdh16*) já foram discutidas nesse capítulo bem como sua importância no contexto de invasão celular. Vale lembrar que elas estão envolvidas em vários processos biológicos como desenvolvimento, morfogênese e metástases de tumor (TAKEICHI, 1995; TEPASS et al., 2000;

YAP, 1998; NOLLET, BERX e ROY, 1999). As estabilinas (*Stab1* e *Stab2*) são receptores homeostáticos que ligam sinais do ambiente externo a processos vesiculares intracelulares, criando impacto no padrão de secreção dos macrófagos (KZHYSHKOWSKA, GRATCHEV e GOERDT, 2006). Estudos histológicos demonstraram que a *Stab1* é expressa em macrófagos teciduais e células endoteliais sinusóides no organismo saudável; essa expressão aumenta durante processos de inflamação crônica e tumorigênese. A *Stab2* é exclusivamente localizada nas células endoteliais sinusóides (POLITZ et al., 2002; FALKOWSKI et al., 2003). Diferentes autores descrevem a expressão de estabilinas em várias condições angiogênicas, incluindo reparo tecidual, vascularização de tumores e condições de inflamação crônica da pele (SALMI et al., 2004; GOERDT, BHARDWAJ e SORG, 1993). Assim, esses genes sendo expressos nos AIRmin após o tratamento com TPA indicam uma maior propensão a formação de metástases nesses animais, visto que a migração, adesão e invasão estão favorecidas, além da angiogênese.

Hoje em dia, cada vez mais pesquisadores defendem a idéia de que a inflamação aguda combate o câncer, enquanto a crônica o favorece. Diante disso, temos um modelo excepcional para estudar as relações entre esses dois fenótipos. Os animais AIRmax têm grande capacidade inflamatória aguda e alto poder de resolução da inflamação e são resistentes aos tumores de pele, e os animais AIRmin possuem uma capacidade inflamatória baixa e pequeno poder de resolução quando comparados com os AIRmax e são suscetíveis aos mesmos tumores. Como as expressões foram observadas na medula óssea, e ela por si já é um órgão linfóide, todos os resultados afetam, de alguma forma, a resposta imune. Podemos sugerir que os genes modulados nos AIRmax apontam os eventos da resposta inflamatória que podem ser fatores de resistência ao tumores de pele, assim como os genes modulados nos AIRmin, fatores de suscetibilidade.

Nossos resultados avaliados em conjunto permitem evidenciar mecanismos envolvidos na regulação da intensidade inflamatória e na resistência/susceptibilidade à carcinogênese, além de indicar grupos de genes diferencialmente expressos e/ou combinações alélicas, específicos dos fenótipos estudados, como possíveis biomarcadores de progressão da doença ou alvos de terapia em estudos clínicos.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Os animais AIRmax possuem menor incidência e multiplicidade de tumores de pele induzidos quimicamente quando comparados aos AIRmin.
- ✓ Na avaliação histológica após aplicação epicutânea de TPA os animais AIRmax apresentaram um infiltrado maior do que o observado nos AIRmin, principalmente em 24 horas; o infiltrado de ambas as linhagens foi predominantemente polimorfonuclear; aos 30 dias os animais AIRmax apresentam um infiltrado semelhante aos AIRmin em qualidade (predominantemente mononuclear) mas absolutamente diferente em quantidade (menos células).
- ✓ Os animais AIRmax apresentam, após aplicação epicutânea de TPA, uma reação inflamatória aguda, com grande migração de células e com altos níveis transcricionais de genes de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ em 6 horas. Os animais AIRmin também apresentam respostas semelhantes, mas em intensidade bem menor.
- ✓ Em 24 horas, o AIRmax aumenta o infiltrado celular e também alguns níveis de expressão de citocinas inflamatórias, como o da IL-1 α , IL-12 e IFN- γ , mantém o nível de expressão de IL-1 β , diminui a expressão de IL-6 e TNF- α e, mais importante, aumenta os níveis de IL-10 e TGF- β 1, além da Caspase-8, eventos que ocorrem com menor intensidade nos AIRmin.
- ✓ Aos trinta dias o infiltrado celular é maior nos animais AIRmin e é maior a expressão de IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α e Caspase-8 quando comparados com os AIRmax.
- ✓ No cromossomo 1 existem duas regiões que agrupam genes diferencialmente expressos entre AIRmax e AIRmin: em 70 Mb a região do *Slc11a1*, que contém além do mesmo, os genes *Il1r2*, *Cd28* e *Il8rb* e em 130 Mb os genes *Il10* e *Chi3l1*.

- ✓ No cromossomo 3 existe uma região que agrupa genes diferencialmente expressos entre AIRmax e AIRmin aproximadamente em 90 Mb, que incluem *Tlr2*, *Adam15*, *Ilf2*, *Mcl1*, *Cd53* e *Vcam1*.
- ✓ No cromossomo 6 também se agruparam genes diferencialmente expressos relacionados a proliferação celular e transdução de sinal (*Kras2*, *Atp6v1*, *Tnfrsf1*, *Cd9*, *Ccnd2* e *lapp*).
- ✓ No cromossomo 11 a maioria dos genes diferencialmente expressos agrupou-se em categorias envolvidas na migração celular e reações inflamatórias (*Ccl8*, *Igfbp4*, *Stat3*, *Epx*, *Itga2b*, *Icam2*).
- ✓ Alguns genes localizados nessas regiões acima descritas como *Cd28*, *Ii8rb*, *Ii10*, *Tlr2*, *Adam15* e *Stat3* também se apresentam diferencialmente expressos entre os controles dos animais AIRmax e AIRmin.
- ✓ Após o estímulo com Biogel, alguns genes responsáveis pela comunicação celular/sinalização intracelular são ativados na medula dos AIRmax; outros genes responsáveis por proliferação/ciclo celular, metabolismo de DNA e RNA são reprimidos na medula dos AIRmin sob o mesmo estímulo.
- ✓ Os animais controle (não submetidos a tratamento) AIRmax possuem genes de resposta de defesa/inflamatória com expressão 4 vezes maior em relação aos AIRmin.
- ✓ Os animais AIRmax submetidos ao estímulo com Biogel possuem genes de resposta de defesa/inflamatória, biossíntese de macromoléculas, metabolismo de coenzimas e quimiotaxia de células imunes com expressão 4 vezes maior em relação aos AIRmin.
- ✓ Após o estímulo com TPA, alguns genes responsáveis por transporte de íons e transdução de sinal são ativados e outros genes responsáveis por morfogênese de epitélio são reprimidos na medula dos AIRmax sob o mesmo estímulo.

- ✓ Após o estímulo com TPA, alguns genes responsáveis por transdução de sinal Rho-GTPase, metabolismo de ácido nucléico e angiogênese são ativados e outros genes responsáveis por proliferação de linfócitos são reprimidos na medula dos AIRmin sob o mesmo estímulo.
- ✓ Os animais AIRmax submetidos ao estímulo com TPA possuem genes de modificação de proteínas com expressão 4 vezes maior em relação aos AIRmin.
- ✓ Os animais AIRmin submetidos ao estímulo com TPA possuem genes de morfogênese e adesão celular com expressão 4 vezes maior em relação aos AIRmax.

REFERÊNCIAS*

- AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S. K.; PANDEY, M. K.; SETHI, G. Inflammation and cancer: How hot is the link? **Bioch. Pharmacol.**, v. 72, p. 1605-1621, 2006.
- AKASHI, H.; HAM, H. J.; IIZAKA, M.; NAKAMURA, Y. Growth-suppressive effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on 11 colon-cancer cell lines and fluorescence differential display of genes whose expression is influenced by sulindac. **Int. J. Cancer**, n. 88, p. 873-880, 2000.
- ALBINA, J. E.; REICHNER, J. S. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 17, p. 39-53, 1998.
- ANGIOLILLO, A. L.; SGADARI, C.; TAUB, D. D.; LIAO, F.; FARBER, J. M.; MAHESHWARI, S.; KLEINMAN, H. K.; REAMAN, O. H.; TOSATO, O. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 155-162, 1995.
- ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W. H. K.; MOUTON, D.; SEMAN, N.; IBÁÑEZ, O. M. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 2913-2920, 1998.
- ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors signaling and modulation. **Science**, v. 281, p. 1305-1308, 1998.
- BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M. An inflammatory link. **Nature**, v. 431, p. 405-406, 2004.
- BARON, J. A.; SANDLER, R. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. **Annu. Rev. Med.**, v. 51, p. 511-523, 2000.
- BARTON, C. H.; WHITEHEAD, S. H.; BLACKWELL, J. M. Nramp transfection transfers lty/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. **Mol. Med.**, v. 1, p. 267-279, 1995.
- BENASSI, L.; OTTANI, D.; FANTINI, F.; MARCONI, A.; CHIODINO, C.; GIANNETTI, A.; PINCELLI, C. 1,25-dihydroxyvitamin D3, transforming growth factor beta 1, calcium, and ultraviolet radiation induce apoptosis in cultured human keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, n. 109, p. 276-282, 1997.
- BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R. A. When cells get stressed: an integrative view os cellular senescence. **J. Clin. Invest.**, v. 113, n. 1, p. 8-13, 2004.
- BERLINER, N. Molecular biology of neutrophil differentiation. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 5, p. 49-53, 1998.
- BEVILACQUA, M.; BUTCHER, E.; FURIE, B.; GALLATIN, M.; GIMBONE, M.; HARLAN, J.; KISHIMOTO, K.; LASKY, L.; McEVER, R. Selectins: a family of adhesion receptors. **Cell**, n. 67, p. 233, 1991.

* De acordo com:

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

- 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. Effects of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 337-346, 1998.
- BISHOP, M. J. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, v. 64, p. 235-248, 1991.
- BORGEAT, P.; NACCACHE, P. H. Biosynthesis and biological activity of leukotriene B4. **Clin. Biochem.**, v. 23, p. 459-468, 1990.
- BORREGO, A.; PETERS, L.C.; JENSEN, J.R.; ROBEIRO, O.G.; CABRERA, W.H.K.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBÁÑEZ, O.M.; DE FRANCO, M. Genetic determinants of acute inflammation regulate Salmonella infection and modulate Slc11a1 gene (formerly Nramp1) effects in selected mouse lines. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 12-13, p. 2766-2771, 2006.
- BOTTINGER, E. P.; LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. **Kidney Int.**, v. 51, p. 1355-1360, 1997.
- BOWDEN, G. T. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signaling. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 23-35, 2004.
- BRAGA, V. M.; MACHESKY, L. M.; HALL, A.; HOTCHIN, N. A. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. **J. Cell. Biol.**, v. 137, p. 1421-1431, 1997.
- BRANDLEY, B. K.; SWIEDLER, S. J.; ROBBINS, P. W. Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules. **Cell**, v. 63, p. 861-863, 1990.
- BRUNDA, M. J.; LUISTRO, L.; HENDRZAK, J. A.; FOUNTOLAKIS, M.; GAROTTA, G.; GATELY, MK. Role of interferon-gamma in mediating the antitumor efficacy of interleukin-12. **J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.**, v. 17, p. 71-75, 1995.
- BUCKLEY, C. D.; PILLING, D.; LORD, J. M.; AKBAR, A. N.; SCHEEL-TOELLNER, D. and SALMON, M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. **Trends Immunol.**, v. 22, p. 199-204, 2001.
- BUCKMAN, S.Y.; GRESHAM, A.; HALE, P.; HRUZA, G.; ANAST, J.; MASFERRER, J.; PENTLAND, A.P. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: Implications for the development of skin cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 723-729, 1998.
- BUTCHER, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition-three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell**, v. 67, p. 1033-1036, 1991.
- CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; De FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBÁÑEZ, O. M.; STAROBINAS, N. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1571-1579, 2002.
- CARRITHERS, M.; TANDON, S.; CANOSA, S.; MICHAUD, M.; GRAESSER, D.; MADRI, J. A. Enhanced susceptibility to endotoxic shock and impaired STAT3 signaling in CD31-deficient mice. **Am. J. Pathol.**, v. 166, p. 185-196, 2005.

CASTONGUAY, A.; RIOUX, N.; DUPERRON, C.; JALBERT, G. Inhibition of lung tumorigenesis by NSAIDS: A working hypothesis. **Exp. Lung Res.**, n. 24, p. 605-615, 1998.

CAVALLO, F.; SIGNORELLI, P.; GIOVARELLI, M.; MUSIANI, P.; MODESTI, A.; BRUNDA, M. J. et al. Antitumor efficacy of adenocarcinoma cells engineered to produce interleukin 12 (IL-12) or other cytokines compared with exogenous IL-12. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 89, p. 1049-1058, 1997.

CHAN, K. S.; SANO, S.; KIGUCHI, K.; ANDERS, J.; KOMAZAWA, N.; TAKEDA, J.; DiGIOVANNI, J. Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 720-728, 2004.

CHATURVEDI, V.; QIN, J.; DENNING, M. F.; CHOUBEY, D.; DIAZ, M. O.; NICKOLOFF, B. J. Apoptosis in proliferating, senescent and immortalized keratinocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 33, p. 23358-23367, 1999.

CHATURVEDI, V.; CESNIAJ, M.; BACON, P.; PANELLA, J.; CHOUBEY, D.; DIAZ, M. O.; NICKOLLOF, B. J. Role of INK4a/Arf locus-encoded senescent checkpoints activated in normal and psoriatic keratinocytes. **Am. J. Pathol.**, v. 162, p. 161-179, 2003.

CHEN, Q.; AMES, B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 4130-4134, 1994.

CHRISTOPHERSON II, K.; HROMAS, R. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. **Stem Cells**, v. 19, p. 388-396, 2001.

CHU, G.; BALASUBRAMANIAN, N.; TIBSHIRANI, R.; TUSHER, V. **SAM "Significance Analysis of Microarrays" Users guide and technical document**. Stanford, CA: Stanford University, 2006. 41 p.

CINES, DB.; POLLAK, E. S.; BUCK, C. A.; LOSCALZO, J.; ZIMMERMAN, G. A.; McEVER, R. P.; POBER, J. S.; WICK, T. M.; KONKLE, B. A.; SCHWARTZ, B. S.; BARNATHAN, E. S.; McCRAE, K. R.; HUG, B. A.; SCHMIDT, A. M.; STERN, D. M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, v. 15, n. 10, p. 3527-3561, 1998.

CLIFFORD, D. P.; REPINE, J. E. Hydrogen peroxide mediated killing of bacteria. **Mol. Cell Biochem.**, v. 10, n. 3, p. 143-149, 1982.

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

CUI, J. et al. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. **Science**, v. 278, p. 1623-1626, 1997.

De FRANCO, M.; CARNEIRO, P. S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; CABRERA, W. K.; IBÁÑEZ, O. M. Slc11a1 (Nramp1) alleles Interact with acute inflammation loci modulate wound-healing traits in mice. **Mamm. Genome**, v. 18, n. 4, p. 263-269, 2007.

DEMANT, P. Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. **Nat. Rev. Genet.**, v. 4, p. 721-734, 2003.

DESSEIN, A. J.; MARQUET, S.; HENRI, S.; EI WALI, N. E.; HILLAIRES, D.; RODRIGUES, V.; PRATA, A.; ALI, Q. M.; GHARIB, B.; De REGI, M.; MAGZOU, M. M.; SAEED, O. K.

- ABDELHAMEED, A. A.; ABEL, L. Infection and disease in human shistosomiasis mansoni are under distinct major gene control. **Microbes Infect.**, v. 1, n. 7, p. 561-567, 1999.
- DEVREOTES, P. N.; ZIGMOND, S. H. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and *Dictyostelium*. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 4, p. 649-686, 1988.
- DI PACE, R. F.; MASSA, S.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; De FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBÁÑEZ, 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.
- DIAMOND, M. S.; SPRINGER, T. A. A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. **J. Cell. Biol.**, v. 120, p. 545-556, 1993.
- DINARELLO, C. A. The proinflammatory cytokines Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor and treatment of the septic shock syndrome. **J. Infect. Dis.**, v. 163, p. 1177-1184, 1991.
- DITSWORTH, D.; ZONG, W. X. NF-kappaB: key mediator of inflammation-associated cancer. **Cancer Biol. Ther.**, v. 3, n. 12, p. 1214-1216, 2004.
- DOHERTY, D. E.; DOWNEY, G. P.; WORTHEN, G. S.; HASLETT, C.; HENSON, P. M. Monocyte retention and migration in pulmonary inflammation. Requirement for neutrophils. **Lab. Invest.**, v. 59, p. 200-213, 1988.
- FAIRWEATHER, D. S.; FAX, M.; MARGISON, G. P. The in vitro lifespan of MRC-5 cells in shortened by 5-azacytidine-induced demethylation. **Exp. Cell Res.**, v. 168, p. 153-159, 1987.
- FALKOWSKI, M.; SCHLEDZEWSKI, K.; HANSEN, B.; GOERDT, S. Expression of stabilin-2, a novel fasciclin-like hyaluronan receptor protein, in murine sinusoidal endothelia, avascular tissues, and at solid/liquid interfaces. **Histochem. Cell Bio.**, v. 120, p. 361-369, 2003.
- FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Role of oxygen-derived free radical and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **Am. J. Pathol.**, v. 107, p. 395-418, 1982.
- FERNANDEZ, N. C.; LEVRAUD, J. P.; HADDADA, H.; PERRICAUDET, M.; KOURILSKY, P. High frequency of specific CD8+ T cells in the tumor and blood is associated with efficient local IL-12 gene therapy of cancer. **J. Immunol.**, v. 162, p. 609-617, 1999.
- FILER, A.; PITZALIS, C. and BUCKLEY, C. D. Targeting the stromal microenvironment in chronic inflammation. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 6, p. 393-400, 2006.
- FIORETTI, F.; FRADELIZI, D.; STOPPACCIARO, A.; RAMPONI, S.; MINTY, A.; SOZZANI, S.; GARLANDA, C.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A. Reduced tumorigenicity and augmented leukocyte infiltration after monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) gene transfer: perivascular accumulation of dendritic cells in peritumoral tissue and neutrophil recruitment within the tumor. **J. Immunol.**, v. 161, p. 342-346, 1998.
- FLOHÉ, L.; GIERTZ, H.; BECKMANN, R. Free radical scavengers as anti-inflammatory drugs. In: LEE, C. Y. (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer, 1979. v. 59.
- FORD-HUTCHINSON, A. W. Activation of leukotriene production in granulocytes: effects on cell activation. **Immunol. Ser.**, v. 57, p. 87-106, 1992.

FOX, D. T.; HOMEM, C. C.; MYSTER, S. H.; WANG, F.; BAIN, E. E.; PEIFER, M. Rho1 regulates *Drosophila* adherens junctions independently of p120ctn. **Development**, v. 132, p. 4819-4831, 2005.

FUNKHOUSER, E. M.; SHARP, G. B. Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. **Cancer**, v. 76, p. 1116-1119, 1995.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Res. Ther.**, v. 8, s. 2: S3, 2006.

GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. New York: Raven Press, 1992.

GARCIA-RODRIGUEZ, L. A.; HUERTA-ALVAREZ, C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Epidemiology**, v. 12, n. 1, p. 88-93, 2001.

GARIBOLDI, M.; SPINOLA, M.; MILANI, S.; PIGNATIELLO, C.; KADOTA, K.; BONO, H.; HAYASHIZAKI, Y.; DRAGANI, T. A.; OKAZAKI, Y. Gene expression profile of normal lungs predicts genetic predisposition to lung cancer in mice. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 9, p. 1-8, 2003. (a)

GARIBOLDI, M.; PEISSEL, B.; FABBRI, A.; SARAN, A.; ZAFFARONI, D.; FALVELLA, F. S.; SPINOLA, M.; TANUMA, J.; PAZZAGLIA, S.; MANCUSO, M. T.; MAURICHI, A.; BARTOLI, C.; CATALTEPE, S.; SILVERMAN, G. A.; PILOTTI, S.; HAYASHIZAKI, Y.; OKAZAKI, Y.; DRAGANI, T. A. SCCA2-like serpins mediate genetic predisposition to skin tumors. **Cancer Res.**, v. 63, p. 1871-1875, 2003. (b)

GASSE, P.; MARY, C.; GUENON, I.; NOULIN, N.; CHARRON, S.; SCHNYDER-CANDRIAN, S.; SCHNYDER, B.; AKIRA, S.; QUESNIAUX, V. F.; LAGENTE, V.; RYFFEL, B.; COUILLIN, I. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 12, p. 3786-3799, 2007.

GERONDAKIS, S.; GROSSMANN, M.; NAKAMURA, Y.; POHL, T.; GRUMONT, R. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knock outs. **Oncogene**, v. 18, p. 6888-6895, 1999.

GIULIETTI, A.; OVERBERG, 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.

GLICK, A. B.; WEINBERG, W. C.; WU, I. H.; QUAN, W.; YUSPA, S. H. Transforming growth factor beta1 suppresses genomic instability independent of a G1 arrest, p53, and Rb. **Cancer Res.**, n. 56, p. 3645-3650, 1996.

GLICK, A.; POPESCU, N.; ALEXANDER, V.; UENO, H.; BOTTINGER, E.; YUSPA, S. H. Defects in transforming growth factor signaling cooperate with a Ras oncogene to cause rapid aneuploidy and malignant transformation of mouse keratinocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 96, p. 14949-14954, 1999.

GOERDT, S.; BHARDWAJ, R.; SORG, C. Inducible expression of MS-1 high-molecular-weight protein by endothelial cells of continuous origin and by dendritic cells/macrophages *in vivo* and *in vitro*. **Am. J. Pathol.**, v. 142, p. 1409-1422, 1993.

- GRANGER, D. N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leukoc. Biol.**, v. 55, p. 662-675, 1994.
- HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science** v. 279, p. 509-514, 1998.
- HAQQANI, A.; SANDHU, J.; BIRNBOIM, H. Constitutive expression of interleukin-8 by mutatact cells markedly affects their tumor biology. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 243, 2001.
- HAYDEN, M. S.; WEST, A. P.; GHOSH, S. NF-kappaB and the immune response. **Oncogene**, v. 25, p. 6758-6780, 2006.
- HEVIN, M. B.; FRIGUET, B.; FAUVE, R. M. Inflammation and anti-tumor resistance. V. Production of a cytostatic factor following cooperation of elicited polymorphonuclear leukocytes and macrophages. **Int. J. Cancer**, v. 46, p. 533-538, 1990.
- HODGE, D. R.; HURT, E. M.; FARRAR, W. L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 41, p. 2502-2512, 2005.
- HOGG, N. The leukocyte integrins. **Immunol. Today**, v. 10, p. 111-114, 1989.
- HONG, S.; GRONERT, K.; DEVECHAND, P.; MOUSSIGNAC, R-L.; SERHAN, C. N. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood and glial cells: autacoids in anti-inflammation. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 14677-14687, 2003.
- HORDIJK, P. L.; TEN KLOOSTER, J. P.; VAN DER KAMMEN, R. A.; MICHIELS, F.; OOMEN, L. COLLARD, J. G. Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. **Science**, v. 278, p. 1464-1466, 1997.
- HOSACK, D. A.; DENNIS, G.; SHERMAN, B. T.; LANE, H. C.; LEMPICKI, R. A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. **Genome Biol.**, v. 4, n. 10, R70, 2003.
- HUBER-LANG, M.; YOUNKIN, E. M.; SARMA, J. V.; RIEDEMANN, N.; McGUIRE, S. R.; LU, K. T.; KUNKEL, R.; YOUNGER, J. G.; ZETOUNE, F. S.; WARD, P. A. Generation of C5a by phagocytic cells. **Am. J. Pathol.**, v. 161, n. 5, p. 1849-1859, 2002.
- HURST, S. M.; McLOUGHLIN, R. M.; MONSLOW, J.; OWENS, S.; MORGAN, L.; FULLER, G. M.; TOPLEY, N.; JONES, S. A. Secretion of oncostatin M by infiltrating neutrophils: regulation of IL-6 and chemokine expression in human mesothelial cells. **J. Immunol.**, v. 169, p. 5244-5251, 2002.
- IBAÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H. K.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; SANT'ANNA, O.; DRECRENSIFOND, C.; MONTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of acute inflammation: bidirecional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 2555-2563, 1992.
- IIZAKA, M.; FURUKAWA, Y.; TSUNODA, T.; AKASHI, H.; OGAWA, M.; NAKAMURA, Y. Expression profile analysis of colon cancer cells in response to sulindac or aspirin. **Biochem. Bioph. Res. Comm.**, v. 292, p. 498-512, 2002.
- ISHIKAWA, F. Cellular senescence, an unpopular yet trustworthy tumor suppressor mechanism. **Cancer Sci.**, v. 94, p. 944-947, 2003.

- ISSEKUTZ, A. C.; ISSEKUTZ, T. B. Quantitation and kinetics of blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, and IL-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha and IFN-gama. **J. Immunol.**, v. 151, n. 4, p. 2105-2115, 1993.
- JAGELS, M. A.; DAFFERN, P. J.; ZURAW, B. L.; HUGLI, T. E. Mechanisms and regulation of polymorphonuclear leukocyte and eosinophil adherence o human airway epithelial cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 21, p. 418-427, 1999.
- JAKOBSSON, P. J.; THOREN, S.; MORGENSTERN, R.; SAMUELSSON, B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential drug target. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 7220-7225, 1999.
- JOU, T. S.; NELSON, W. J. Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. **J. Cell Biol.**, v. 142, p. 85-100, 1998.
- KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO-JULIAN, F.; MANTOVANI, A.; FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol.**, v. 24, p. 25-29, 2003.
- KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, n. 10, p. 749-759, 2005.
- KITA, E.; EMOTO, M.; OKU, D.; NISHIKAWA, F.; HAMURO, A.; KAMIKAIDOU, N.; KASHIBA, S. Contribution of interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of ltyr mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 51, p. 244-250, 1992.
- KOBAYASHI, Y. Neutrophil infiltration and chemokines. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 307-316, 2006.
- KODAMA, T.; TAKEDA, K.; SHIMOZATO, O.; HAYAKAWA, Y.; ATSUTA, M.; KOBAYASHI, K. et al. Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 1390-1396, 1999.
- KOLB, H.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. **Immunol. Today**, v. 13, p. 157-160, 1992.
- KOPF, M.; BAUMANN, H.; FREER, G.; FREUDENBERG, M.; LAMERS, M.; KISHIMOTO, T.; ZINKERNAGEL, R.; BLEUTHMANN, H.; KOHLER, G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. **Nature**, v.368, p. 339-342, 1994.
- KUPPER, T. S.; LEE, F.; BIRCHALL, N.; CLARK, S.; DOWER, S. Interleukin 1 binds to specific receptors on human keratinocytes and induces granulocyte macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein: a potencial autocrine role for interleukin 1 in epidermis. **J. Clin. Invest.**, v. 82, p. 1787, 1988.
- KUSHNER, I. Regulation of the acute phase response by cytokines. **Perspect. Biol. Med.**, v. 36, p. 611-622, 1996.
- KZHYSHKOWSKA, J.; GRATCHEV, A.; GOERDT, S. Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions. **J. Cell Mol. Med.**, v. 10, n. 3, p. 635-649, 2006.

- LAMPUGNANI, M. G.; DEJANA, E. Interendothelial junctions: structure, signaling and functional roles. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 9, p. 674-682, 1997.
- LASTER, A. D.; GREENBERG, S. M. and LEDER, P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 219-231, 1995.
- LAWRENCE, T.; GILROY, D. W.; COLVILLE-NASH, P. R.; WILLOUGHBY, D. A. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. **Nat. Med.**, v. 7, p. 1291-1297, 2001.
- LEROY, P.; SLOS, P.; HOMANN, H.; ERBS, P.; POITEVIN, Y.; REGULIER, E. et al. Cancer immunotherapy by direct in vivo transfer of immunomodulatory genes. **Res. Immunol.**, v. 49, p. 681-684, 1998.
- LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. TGF-beta: a critical modulator of immune cell function. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, n. 84, p. 244-250, 1997.
- LEVY, B. D.; CLISH, C. B.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 612-619, 2001.
- LEY, K.; GAEHTGENS, P.; FENNIE, C.; SINGER, M. S.; LASKY, L. A.; ROSEN, S. D. Lectin-like cell adhesion molecule I mediates leukocyte rolling in mesenteric venules *in vivo*. **Blood**, v. 77, p. 2553-2555, 1991.
- LIND, M. H.; ROZELL, B.; WALLIN, R. P.; van HOGELINDEN, M.; LJUNGGREN, H. G.; TOFTGARD, R.; SUR, I. Tumor necrosis factor 1-mediated signaling is required for skin cancer development induced by NF-kappaB inhibition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 4972-4977, 2004.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LLOYD, A. C. Limits to lifespan. **Nat. Cell Biol.**, v. 4, p. E25-E27, 2002.
- LLOYD, A. R.; OPPENHEIM, J. J. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. **Immunol. Today**, v. 13, p. 169-172, 1992.
- LOZUPONE, F.; LUCIANI, F.; VENDITTI, M.; RIVIOLTINI, L.; PUPA, S.; PARMIANI, G.; BELARDELLI, F.; FAIS, S. Murine granulocytes control human tumor growth in SCID mice. **Int. J. Cancer**, v. 87, p. 569-573, 2000.
- MACKAY, C. R. Chemokines: immunology's high impact factors. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 95-101, 2001.
- MADDOX, J. F.; HACHICHA, M.; TAKANO, T.; PETASIS, N. A.; FOKIN, V. V.; SERHAN, C. N. Lipoxin A₄ stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein linked lipoxin A₄ receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 6972-6978, 1997.
- MADDOX, J. F.; SERHAN, C. N. Lipoxin A₄ and B₄ are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 137-146, 1996.

- MADERNA, P.; YONA, S.; PERRETTI, M. and GODSON, C. Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). **J. Immunol.**, v. 174, p. 3727-3733, 2005.
- MAJNO, G.; PALADE, G. E. Studies on inflammation. I. Effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 11, p. 571-605, 1961.
- MARIA, D. A.; MANENTI, G.; GALBIATI, F.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; BARRERA, R. G.; PETTINICCHIO, A.; De FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA, M.; DRAGANI, T. A.; IBAÑEZ, O. M. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. **Oncogene**, v. 22, n. 3, p. 426-432, 2003.
- MARIA, D. A.; RIBEIRO, O.G.; PIZZOCARO, K. F.; De FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; STAROBINAS, N.; GALLOIS, V.; SIQUEIRA, M.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O.M. Resistance to melanoma metastases in mice selected for high acute inflammatory response. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 2, p. 337-42, 2001.
- MARKS, F; FURSTENBERGER, G. Cancer chemoprevention through interruption of multistage carcinogenesis. The lessons learnt by comparing mouse skin carcinogenesis and human large bowel cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 314-329, 2000.
- McMAHON, B.; MITCHELL, S.; BRADY, H. R.; GODSON, C. Lipoxins: revelations on resolution. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 22, p. 391-395, 2001.
- MELNICOFF, M. J.; HORAN, P. K.; MORAHAN, P. S. Kinetics of changes in peritoneal-cell populations following acute inflammation. **Cell Immunol.**, v. 118, p. 178-191, 1989.
- MILLER, M. D.; KRANGEL, M. S. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotatic and inflammatory cytokines. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 27-46, 1992.
- MIYATA, R.; IWABUCHI, K.; WATANABE, S.; SATO, N.; NAGAOKA, I. Short exposure of intestinal epithelial cells to TNF-alpha and histamine induces Mac-1-mediated neutrophil adhesion independent of protein synthesis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66, p. 437-446, 1999.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.
- MOORE, R. J. et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. **Nat. Med.**, v. 5, p. 828-831, 1999.
- MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumours: Old stories and new ideas. **Eur. J. Cancer**, v. 42, p. 735-744, 2006.
- MULE, J. J.; CUSTER, M. C.; TRAVIS, W. D.; ROSENBERG, S. A. Cellular mechanisms of the antitumor activity of recombinant IL-6 in mice. **J. Immunol.**, v. 148, p. 2622-2629, 1992.
- MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Lab. Invest.**, v. 82, n. 5, p. 521-533, 2002.
- MURPHY, J. E.; MORALES, R. E.; SCOTT, J.; KUPPER, T. S. IL-1 alpha, innate immunity, and skin carcinogenesis: the effect of constitutive expression of IL-1 alpha in epidermis on chemical carcinogenesis. **J. Immunol.**, v. 170, n. 11, p. 5697-5703, 2003.

MURPHY, J.; ROBERT, C.; KUPPER, T. Interleukin 1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. **J. Invest. Dermatol.**, v. 114, p. 602, 2000.

NAKAMURA, Y.; KOZUKA, M.; NANIWA, K.; TAKABAYASHI, S.; TORIKAI, K.; HAYASHI, R.; SATO, T.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 35, n. 9, p. 997-1007, 2003.

NASTALA C. L.; EDINGTON, H. D.; MCKINNEY, T. G.; TAHARA, H.; NALESNIK, M. A.; BRUNDA, M. J. et al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in associated with IFN- γ production. **J. Immunol.**, v. 153, p. 1697-1706, 1994.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 19-26, 2002.

NICKKOLLOF, B. J.; BEN-NERIAH, Y.; PIKARSKY, E. Inflammation and Cancer: is the link as simple as we think? **J. Invest. Dermatol.**, v. 124, p. x-xiv, 2005.

NOLLET, F.; BERX, G.; ROY, F. V. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. **Mol. Cell Biol. Res. Comm.**, v. 2, p. 77-85, 1999.

NOZAWA, H. et al. Loss of transcription factor IRF-1 affects tumor susceptibility in mice carrying the Ha-ras transgene or nullizygosity for p53. **Genes Dev.**, v. 13, p. 1240-1245, 1999.

O'BYRNE, K. J.; DALGLEISH, A. G. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. **Brit. J. Cancer**, v. 85, p. 473-483, 2001.

OLD, L. J. Tumor necrosis factor. **Sci. Am.**, n. 258, n. 59, p. 609-675, 1988.

OSHIMA, M.; DINCHUK, J. E.; KARGMAN, S. L.; OSHIMA, H.; HANCOCK, B.; KWONG, E.; TRZASKOS, J. M.; EVANS, J. F.; TAKETO, M. M. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **Cell**, n. 87, p. 803-809, 1996.

PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. New York: Lippincott-Raven, 1998.

PEARSON, M. J.; LIPOWSKY, H. H. Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary venules of rat mesentery. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 279, n. 4, p. H1460-H1471, 2000.

PEPPER, M. S. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis and vessel wall integrity. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 8, p. 21-43, 1997.

PERERA, F. P. Molecular epidemiology: Insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 88, p. 496-509, 1996.

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

PHILIP, M.; ROWLEY, D. A.; SCHREIBER, H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. **Semin. Cancer Biol.**, v. 14, p. 433-439, 2004.

- PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Methods**, v. 38, p. 161-170, 1980.
- PIKARSKY, E.; PORAT, R. M.; STEIN, I.; et al. NF-kappaB functions as a tumor promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, v. 431, p. 461-466, 2004.
- POBER, J. S. Effects of tumor necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. **Ciba Found.Symp.**, v. 131, p. 170-184, 1987.
- POLITZ, O.; GRATCHEV, A.; McCOURT, P. A.; SCHLEDZEWSKI, K.; GUILLOT, P.; JOHANSSON, S.; SVINENG, G.; FRANKE, P.; KANNICHT, C.; KZHYSHKOWSKA, J.; LONGATI, P.; VELTEN, F. W.; JOHANSSON, S.; GOERDT, S. Stabilin-1 and -2 constitute a novel family of fasciclin-like hyaluronan receptor homologues. **Biochem. J.**, v. 362, p. 155-164, 2002.
- QIN, J.; BACON, P.; GHATURVEDI, V.; NICKOLOFF, B. J. Role of NF-kappaB activity in apoptotic response of keratinocytes mediated by interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha and tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligant. **J. Invest. Dermatol.**, v. 117, n. 4, p. 898-907, 2001.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **Br. J. Pharmacol.**, v. 92, p. 181-187, 1987a.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. The anti-aggregatory properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, v. 92, p. 639-646, 1987b.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet**, v. 2, p. 1057-1058, 1987c.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 148, p. 1482-1489, 1987d.
- RAKHMILEVICH, A. L.; JANSSEN, K.; TURNER, J.; CULP, J.; YANG, N-S. Cytokine gene therapy of cancer using gene gun technology: superior antitumor activity of interleukin-12. **Hum. Gene Ther.**, v. 8, p. 1303-1311, 1997.
- RAMSAY, A. J.; HUSBAND, A. J.; RAMSHAW, I. A.; BAO, S.; MATTHAEI, K. I.; KOEHLER, G.; KOPT, M. The role of IL-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. **Science**, v. 264, p. 561-563, 1994.
- 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 acute inflammatory response confers resistance to lung carcinogenesis in the mouse. **Exp. Lung Res.**, v. 31, n. 1, p. 105-116, 2005.
- RIBEIRO, O. G.; MARIA, D. A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERT, S.; CABRERA, W. H. K.; MORISSET, J.; IBÁÑEZ, O. M. and SEMAN, M. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, p. 497-506, 2003.

- RIGGS, P. K.; ANGEL, J. M.; ABEL, E. L.; DiGIOVANNI. Differential gene expression in epidermis of mice sensitive and resistant to phorbol ester skin tumor promotion. **Mol. Carcinogenesis**, v. 44, p. 122-136, 2005.
- ROBLES, S. J.; ADAMI, G. R. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16NK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. **Oncogene**, v. 16, p. 1113-1123, 1998.
- ROCCA, B.; FITZGERALD, G. A. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 603-630, 2002.
- ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; TONIATTI, C.; PUCCHETTI, P.; BISTONI, F.; POLI, V. Impaired neutrophil response and CD41 T helper cell 1 development in interleukin-6-deficient mice infected with *Candida albicans*. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 1345-1355, 1996.
- ROMANO, M.; SIRONI, M.; TONIATTI, C.; POLENTARUTTI, N.; FRUSCELLA, P.; GHEZZI, P.; FAGGIONI, R.; LUINI, W.; VAN HINSBERGH, V.; SOZZANI, S. et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. **Immunity**, v. 6, p. 315-325, 1997.
- ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 217-242, 2000.
- RUOSLAHTI, E. How cancer spreads. **Sci. Am.**, v. 275, p. 72-77, 1996.
- RUZEK, M. C.; MILLER, A. H.; OPAL, S. M.; PEARCE, B. D.; BIRON, C. A. Characterization of early cytokine responses and an interleukin-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 1185-1192, 1997.
- SALMI, M.; KOSKINEN, K.; HENTTINEN, T.; ELIMA, K.; JALKANEN, S. CLEVER-1 mediates lymphocyte transmigration through vascular and lymphatic endothelium. **Blood**, v. 104, p. 3849-3857, 2004.
- SARAN, A.; NEVEU, T.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; PAZZAGLIA, S.; REBESSI, S.; DORIA, G.; BIOZZI, G. Genetics of chemical carcinogenesis: analysis of bidirectional selective breeding inducing maximal resistance or maximal susceptibility to 2-stage skin tumorigenesis in the mouse. **Int. J. Cancer**, v. 88, p. 424-431, 2000.
- SATTERWHITE, D. J.; MOSES, H.L. Mechanisms of transforming growth factor-beta 1-induced cell cycle arrest. **Invasion Metastasis**, n. 14, p. 309-318, 1994.
- SCHLINGEMANN, J; HESS, J; WROBEL, G; BREITENBACH, U; GEBHARDT, C; STEINLEIN, P; KRAMER, H; FÜRSTENBERGER, G; HAHN, M; ANGEL, P; LICHTER, P. Profile of gene expression induced by the tumour promotor TPA in murine epithelial cells. **Int. J. Cancer**, v.104, p. 699-708, 2003.
- SERHAN, C. N. A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 122, p. 305-321, 2004.
- SERHAN, C. N.; BRAIN, S. D.; BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; HASLETT, C.; O'NEILL, L. A. J.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G.; WALLACE, J. L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB J.**, v. 21, p. 325-332, 2007.

SERHAN, C. N.; FIORE, S.; BREZINSKI, D. A.; LYNCH S. Lipoxin A₄ metabolism by differentiated HL-60 cells and human monocytes: conversion to novel 15-oxo and dihydro products. **Biochemistry**, v. 32, p. 6313-6319, 1993.

SERRANO, M.; LIN, A. W.; McCURRACH, M. E.; BEACH, D.; LOWE, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16NK4a. **Cell**, v. 88, p. 593-602, 1997.

SHACTER, E.; WEITZMAN, S. A. Chronic inflammation and cancer. **Oncology**, v. 16, p. 217-226, 2002.

SHARP, C.; WARREN, A.; OSHIMA, T.; WILLIAMS, L.; LI, H.; ALEXANDER, J. S. Poly ADP ribose-polymerase inhibitors prevent the upregulation of ICAM-1 and E-selectin in response to Th1 Cytokine stimulation. **Inflammation**, v. 25, n. 3, p. 157-163, 2001.

SHISHODIA, S.; AGGARWAL, B. B. Nuclear factor- kappaB: a friend or a foe in cancer? **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, n. 6, p. 1071-1080, 2004.

SMITH, W. L.; LANGENBACH, R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. **J. Clin. Invest.**, v. 107, n. 12, p. 1491-1495, 2001.

SNYDERMAN, R.; UHING, R. J. Chemoattractant stimulus-response coupling. In **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. New York: Raven Press, 1992. p. 421-439.

SOIFFER, R.; LYNCH, T.; MIHM, M.; JUNG, K.; RHUDA, C.; SCHMOLLINGER, J. C.; HODI, F. S.; LIEBSTER, L.; LAM, P.; et al. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent anti-tumor immunity in patients with metastatic melanoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 22, p. 13141-13146, 1998.

SOUZA, V. R. C. **Análise de polimorfismo de regiões cromossômicas envolvidas na resistência/susceptibilidade à indução de tumores de pele em linhagens de camundongos selecionados segundo a reatividade inflamatória aguda**. 2002. 47 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v. 346, p. 425-434, 1990.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 827-872, 1995.

SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 827-872, 1995.

SPRINGER, T. A.; LASKY, L. A. Cell adhesion. Sticky sugars for selectins. **Nature**, v. 349, p. 196-197, 1991.

STACK, E.; DuBOIS, R. N. Regulation of cyclo-oxygenase-2. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 15, n. 15, p. 787-800, 2001.

STEARNS, M. E.; GARCIA, F. U.; FUDGE, K.; RHIM, J.; WANG, M. Role of interleukin 10 and transforming growth factor β 1 in the angiogenesis and metastasis of human prostate primary tumor lines from orthotopic implants in severe combined immunodeficiency mice. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, p. 711-720, 1999.

- STIFFEL, C.; IBÁÑEZ, O. M.; RIBEIRO, O. G.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and their interline crosses. **Exp. Clin. Immunogenet.**, v. 7, n. 4, p. 221-233, 1990.
- SUGANUMA, M.; OKABE, S.; MARINO, M. W.; SAKAI, A.; SUEOKA, E.; FUJIKI, H. Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. **Cancer Res.**, v. 59, p. 4516-4518, 1999.
- TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **J. Clin. Invest.**, v. 107, p. 7-11, 2001.
- TAKAISHI, K.; SASAKI, T.; KOTANI, H.; NISHIOKA, H.; TAKAI, Y. Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. **J. Cell Biol.**, v. 139, p. 1047-1059, 1997.
- TAKEICHI, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 7, p. 619-627, 1995.
- TANNENBAUM, C. S.; WICKER, N.; ARMSTRONG, D.; TUBBS, R.; FINKE, J.; BUKOWSKI, R. M. et al. Cytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL-12. **J. Immunol.**, v. 156, p. 693-699, 1996.
- TEPASS, U.; TRUONG, K.; GODT, D.; IKURA, M.; PEIFER, M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 1, p. 91-100, 2000.
- THOMPSON, C. F. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, p. 1456-1462, 1995.
- TIDBALL, J. G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 27, p. 1022-1032, 1995.
- TILG, H.; DINARELLO, C. A.; MIER, J. W. IL-6 and PPAS: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. **Immunol. Today**, v. 18, p. 428-432, 1997.
- TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 15-23, 2001.
- TOGAYACHI, A.; KOZONO, Y.; ISHIDA, H.; ABE, S.; SUZUKI, N.; TSUNODA, Y.; HAGIWARA, K.; KUNO, A.; OHKURA, T.; SATO, N.; SATO, T.; HIRABAYASHI, J.; IKEHARA, Y.; TACHIBANA, K. and NARIMATSU, H. Polylactosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 40, p. 15829-15834, 2007.
- TREMAIN, R.; MARKO, M.; KINNIMULKI, V.; UENO, H.; BOTTINGER, E.; GLICK, A. Defects in TGF-beta signaling overcome senescence of mouse keratinocytes expressing v-Ha-ras. **Oncogene**, v. 19, p. 1698-1709, 2000.
- TRINCHIERI, O. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 251-276, 1995.
- TRIPP, C. S.; BLOMME, E. A.; CHINN, K. S.; HARDY, M. M.; LaCELLE, P.; PENTLAND, A. P. Epidermal COX-2 induction following ultraviolet irradiation: Suggest mechanism for the role of COX-2 inhibition in photoprotection. **J. Invest. Dermatol.**, v. 121, p. 853-861, 2003.

- TSENG, W. W.; DEGANUTTI, A.; CHEN, M. N.; SAXTON, R. S.; LIU, C. D. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (Vioxx) induces expression of cell cycle arrest genes and slows tumor growth in human pancreatic cancer. **J. Gastrointest. Surg.**, v. 6, n. 6, p. 838-844, 2002.
- VAN HOGELINDEN, M.; ROZELL, B. L.; AHRLUND-RICHTER, L.; TOFTGARD, R. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited rel/nuclear factor-kappaB signaling. **Cancer Res.**, n. 59, n. 14, p. 3299-3303, 1999.
- Van ROY, F. M.; McCREA, P. D. A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 956-964, 2005.
- VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 38, p. 97-120, 1998.
- VASQUEZ-BRAVO, Y. **Aspectos da resposta inflamatória aguda em linhagens de camundongos com reatividade máxima e mínima obtidas por seleção genética bidirecional.** 1996. 50 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- VENABLE, M. E.; LEE, J. Y.; SMYTH, M. J.; BIELAWSKA, A.; OBEID, L. M. Role of ceramide in cellular senescence. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 30701-30708, 1995.
- VIDEM, V.; STRAND, E. Changes in neutrophil surface-receptor expression after stimulation with FMLP, endotoxin, interleukin-8 and activated complement compared to degranulation. **Scand. J. Immunol.**, v. 59, p. 25-33, 2004.
- VIGAR, N. D.; CABRERA, W. H.; ARAUJO, L. M.; RIBEIRO, O. G.; OGATA, T. R.; SIQUEIRA, M.; IBÁÑEZ, O. M.; De FRANCO, M. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, n. 2, p. 431-437, 2000.
- VIRCHOW, R. **Die krankhaften Geschwülste: 30 Vorlesungen gehalten während des Wintersemesters. Vorlesungen über Pathologie.** Berlin: Hirschwald, 1862-1863.
- WANG, J.; OUYANG, C.; CHEN, X.; FU, B.; LU, Y.; HONG, Q. STAT3 inhibits apoptosis of human renal tubular epithelial cells induced by ATP depletion/recovery. **Nephron Exp. Nephrol.**, v. 108, p. e11-e18, 2008.
- WANG, X. Role of TGF β signaling in skin carcinogenesis. **Micros. Res. Tech.**, n. 52, p. 420-429, 2001.
- WEISS, P. A. A cell is not an island entire of itself. **Perspect. Biol. Med.**, v. 14, p. 182-205, 1971.
- WELLS, C. A.; RAVASI, T.; FAULKNER, G. J.; CARNINCI, P.; OKAZAKI, Y.; HAYASHIZAKI, Y.; SWEET, M.; WAINWRIGHT, B. J.; HUME, D. A. Genetic control of the innate immune response. **BMC Immunol.**, v. 26, p. 4-5, 2003.
- WERT, S. E. et al. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 5972-5977, 2000.
- WILES, M. E.; WELBORN, R.; GOLDMAN, G.; HECHTMAN, H. B.; SHEPRO, D. Tromboxane-induced neutrophil adhesion to pulmonary microvascular and aortic endothelium is regulated by CD18. **Inflammation**, v. 15, p. 181-197, 1991.

- WILGUS, T. A.; KOKI, A. T.; ZWEIFEL, B. S.; KUSEWITT, D. F.; RUBAL, P. A.; OBERYSZYN, T. M. Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. **Mol. Carcinogen.**, v. 38, p. 49-58, 2003.
- WOJCIECHOWSKI, W.; DeSANCTIS, J.; SKAMENE, E.; RADZIOCH, D. Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin involves class II transactivator and depends on the Nramp1 gene. **J. Immunol.**, v. 163, p. 2688-2696, 1999.
- XING, Z.; BRACIAK, T.; JORDANA, M.; CROITORU, K.; GRAHAM, F. L.; GAULDIE, J. Adenovirus-mediated cytokine gene transfer at tissue sites: overexpression of IL-6 induces lymphocytic hyperplasia in the lung. **J. Immunol.**, v. 153, p. 4059-4069, 1994.
- XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X. F.; ACHONG, MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 311-320, 1998.
- YAGER, T. R.; DeVRIES, S.; JARRAD, D. F.; KAO, C.; NAKADA, S. Y.; MOON, T. D.; BRUSKEWITZ, R.; STADLER, W. M.; et al. Overcoming cellular senescence in human cancer pathogenesis. **Genes Dev.**, v. 12, p. 163-174, 1998.
- YAO, L.; SGADARI, C.; FURUKE, K.; BLOOM, E. T.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; TOSATO, G. Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. **Blood**, v. 93, p. 1612-1621, 1999.
- YAP, A. S. The morphogenetic role of cadherin cell adhesion molecules in human cancer: a thematic review. **Cancer Investig.**, v. 16, p. 252-261, 1998.
- YOUNG, M. R.; LI, J. J.; RINCON, M.; FLAVELL, R. A.; SATHYANARAYANA, B. K.; HUNZIKER, R.; COLBURN, N. Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 9827-9832, 1999.
- ZANG, H.; YI, X.; SUN, X.; YIN, N.; SHI, B.; WU, H.; WANG, D.; WU, G.; SANG, Y. Differential gene regulation by the SRC family of coactivators. **Genes Dev.**, v. 18, n. 14, p. 1753-1765, 2004.

ANEXOS

Anexo A – Lista de genes com expressão 4 vezes maior nos animais AIRmax controle em relação aos AIRmin.

neuropeptide Y (Npy)
LOC328809 similar to MHC class Ib antigen Qa-1c
chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (Cxcl2)
Cd44 CD44 antigen
Mid1 midline 1
forkhead box N2 (Foxn2)
Ccdc88c coiled-coil domain containing 88C
EG631624 predicted gene
type VI collagen alpha 3 subunit mRNA
villin-like protein (Villp)
response to metastatic cancers 1 (Rmcs1)
Gm1410 gene model 1410, (NCBI)
Clc1 chloride intracellular channel 1
PDZ and LIM domain 4 (Pdlim4)
chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (Cxcl1)
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (Nr4a1)
Lrrk2 leucine-rich repeat kinase 2
leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 4 (Lrfn4)
Ndufa12 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12
triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (Trem1)
Aim1 absent in melanoma 1-like
CDK5 regulatory subunit associated protein 1 (Cdk5rap1)
Ankrd33b ankyrin repeat domain 33B
tescalcin (Tesc)
IgG kappa light chain variable region mRNA
diacylglycerol O-acyltransferase 1 (Dgat1)
gene model 1960, (NCBI) (Gm1960)
Ift140 intraflagellar transport 140 homolog (Chlamydomonas)
V alpha F37, T cell receptor alpha chain mRNA, partial cds.
Ig unproductively rearranged kappa-chain VJ5C mRNA from plasmacytoma S107C
macrophage receptor with collagenous structure (Marco)
histocompatibility 2, Q region locus 10 (H2-Q10)
N-acylsphingosine amidohydrolase (alkaline ceramidase) 3 (Asah3)
Adc arginine decarboxylase
interleukin 1 beta (Il1b)
Xylb xylulokinase homolog (H. influenzae)

Anexo B – Lista de genes com expressão 4 vezes maior nos animais AIRmin controle em relação aos AIRmax.

histocompatibility 2, class II antigen E alpha (H2-Ea)
coronin, actin binding protein 2A (Coro2a)
olfactory receptor 642 (Olfr642)
Iqcc IQ motif containing C
B and T lymphocyte associated (Btla)
zinc finger protein 84 (Zfp84)
Fc receptor, IgG, high affinity I (Fcgr1)
cat eye syndrome chromosome region, candidate 5 homolog (human) (Cecr5)
Lin37 lin-37 homolog (C. elegans)
CD28 antigen (Cd28)
olfactory receptor 1125 (Olfr1125), mRNA
Hook3 hook homolog 3 (Drosophila)
Fam159b family with sequence similarity 159, member B
olfactory receptor 155 (Olfr155)
Glt25d2 glycosyltransferase 25 domain containing 2
EG243302 predicted gene
CCCTC-binding factor (Ctcf)
solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2 (Slc15a2)
serine/threonine kinase 3 (Ste20, yeast homolog) (Stk3)
insulin related protein 2 (islet 2) (Isl2)
Lrrc39 leucine rich repeat containing 39
H2-DMb1 histocompatibility 2, class II, locus Mb1
membrane-bound transcription factor protease, site 1 (Mbtps1)
Gnas GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus
Arrdc2 arrestin domain containing 2
transmembrane 9 superfamily member 2 (Tm9sf2)
carnitine O-octanoyltransferase (Crot)
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (Galnt3)
Sfrp1 secreted frizzled-related protein 1
Eno1 enolase 1, alpha non-neuron
S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 (Ahcy1)
testis specific gene A14 (Tsga14)
F-box only protein 3 (Fbxo3), transcript variant 2
Gm1672 gene model 1672, (NCBI)
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (Hnrpu)
Alkbh6 alkB, alkylation repair homolog 6
solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1 (Slc4a1)
mAB-15C5 mRNA for immunoglobulin gamma-1 chain, V-CH1 (part)
glutamate receptor, ionotropic, NMDA2C (epsilon 3) (Grin2c)
thymopoietin (Tmpt)
chaperonin subunit 8 (theta) (Cct8)
NOD-derived CD11c +ve dendritic cells cDNA, RIKEN clone:F630040K05 product:hypothetical protein, full insert sequence
Slc35e1 solute carrier family 35, member E1
phenylalanine-tRNA synthetase-like, beta subunit (Farslb)
(continua)

Rab6b RAB6B, member RAS oncogene family
Rpgrip1 retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1
Axin1 axin 1
glycoprotein 2 (zymogen granule membrane) (Gp2)
gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit delta (Gabrd)
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 5 (Tnfsf5)
Ig heavy chain mRNA V-D-J region, 5' end
membrane protein, palmitoylated (Mpp1)
solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 3 (Slc28a3)
chaperonin subunit 2 (beta) (Cct2)
eukaryotic translation initiation factor 4A2 (Eif4a2)
paired-Ig-like receptor A1 (Pira1), mRNA
carbohydrate sulfotransferase 10 (Chst10)
Mapk1 mitogen-activated protein kinase 1
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (Abcg2)
SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated) (Sh3bp5)
zinc finger protein 87 (Zfp87)
sorting nexin 1 (Snx1)
Ig rearranged gamma-chain mRNA, clone AN01g
glycolipid transfer protein (Gltp)
DNA primase, p58 subunit (Prim2)
Sfrs1 splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)
Fcrla Fc receptor-like A
Rmi1 RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog (S. cerevisiae)
B lymphoid kinase (Blk)
nucleolar protein 5 (Nol5)

Anexo C – Lista de genes com expressão 4 vezes maior nos animais AIRmax estimulados com Biogel 24 horas em relação aos AIRmin.

hematopoietic cell specific Lyn substrate 1 (Hcls1)
serum amyloid A 3 (Saa3)
chaperonin subunit 2 (beta) (Cct2)
transforming growth factor, beta induced (Tgfb1)
chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (Cxcl2)
maltase-glucoamylase, mRNA (cDNA clone IMAGE:5252339), with apparent retained intron
vasodilator-stimulated phosphoprotein (Vasp)
multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase 1 (Minpp1)
phosphodiesterase 4C, cAMP specific (Pde4c)
isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble (Idh1)
septin 5 (Sept5)
B-cell translocation gene 2, anti-proliferative (Btg2)
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (Cebpb)
ubiquitin-activating enzyme E1, Chr X (Ube1x)
exosome component 9 (Exosc9)
FBJ osteosarcoma oncogene (Fos)
response to metastatic cancers 1 (Rmcs1)
chitinase 3-like 1 (Chi3l1)
glutathione reductase 1 (Gsr)
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon (Nfkbie)
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 11 (Ms4a11)
ARP1 actin-related protein 1 homolog A (yeast) (Actr1a)
heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein) (Hspa5)
diacylglycerol O-acyltransferase 1 (Dgat1)
cyclin D3 (Ccnd3)
cell division cycle 42 homolog (S cerevisiae) (Cdc42)
transgelin 2 (Tagln2)
matrix metalloproteinase 9 (Mmp9)
urokinase plasminogen activator receptor (Plaur)
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma (Gadd45g)
src-like adaptor (Sla)
paired-Ig-like receptor A4 (Pira4), mRNA
schlafen 4 (Slfn4)
myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl1)
regulator of G-protein signaling 19 interacting protein 1 (Rgs19ip1)
pleckstrin homology-like domain, family B, member 2 (Phldb2)
leukotriene B4 receptor 1 (Ltb4r1)
valyl-tRNA synthetase 2-like, mRNA (cDNA clone MGC:67220 IMAGE:5698461)
ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1 (Rps6ka1)
G protein-coupled receptor kinase 6 (Gprk6)
interferon gamma receptor (Ifngr)
destrin (Dstn)
prolactin regulatory element binding (Preb)
microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1 (Mapre1)
prominin 1 (Prom1)
(continua)

Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1 (Rassf1)
FK506 binding protein-like (Fkbp1)
solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2 (Slc3a2)
cysteine and glycine-rich protein 1 (Csrp1)
sortilin-related receptor, LDLR class A repeats-containing (Sorl1)
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (Nr4a1)
H2A histone family, member Y (H2afy)
proteoglycan, PG-M
interleukin 1 receptor, type II (Il1r2)
G0/G1 switch gene 2 (G0s2)
integrin beta 2 (Itgb2)
kelch-like 2, Mayven (Drosophila) (Klhl2)
branched chain aminotransferase 2, mitochondrial (Bcat2)
myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88)
hydroxyacylglutathione hydrolase-like (Haghl)
actin related protein 2/3 complex, subunit 4 (Arpc4)
tumor-associated calcium signal transducer 2 (Tacstd2)
homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1 (Herpud1)
core promoter element binding protein (Copeb)
kinesin family member 1B (Kif1b), transcript variant 1
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5 (Slc7a5)
histocompatibility 2, T region locus 23 (H2-T23)
synaptogyrin 2 (Syng2)
protein phosphatase 4, catalytic subunit (Ppp4c)
CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast) (Cap1)
chaperonin subunit 7 (eta) (Cct7)
cleblind-like 1 (Drosophila) (Mbnl1)
sialyltransferase 8 (alpha-2, 8-sialyltransferase) A (Siat8a)
clusterin (Clu)
inhibitor of DNA binding 1 (Idb1)
ATPase, H+ transporting, V1 subunit A, isoform 1 (Atp6v1a1)
pre B-cell leukemia transcription factor 3 (Pbx3)
autophagy 5-like (S cerevisiae) (Apg5l)
tubulin, beta 5 (Tubb5)
SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1 (Samsn1)
zona pellucida 3 receptor (Zp3r)
regulator of G-protein signaling 1 (Rgs1)
chemokine (C-C motif) ligand 8 (Ccl8)
zinc finger protein 289 (Zfp289)
methyl-CpG binding domain protein 3 (Mbd3)
integrin alpha 2b (Itga2b)
CD14 antigen (Cd14)
FGFR1 oncogene partner 2 (Fgfr1op2)
tumor protein D52 (Tpd52)
phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoribosylaminoimidazole, succinocarboxamide synthetase (Paics)
hemopoietic cell phosphatase (Hcph)
spermidine synthase (Srm)
annexin A2 (Anxa2)
heterogeneous nuclear ribonucleoproteins methyltransferase-like 2 (S cerevisiae) (Hrmt1l2)

(continua)

cytochrome b-245, beta polypeptide (Cybb)
solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2 (Slc11a2)
CD53 antigen (Cd53)
capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1, mRNA (cDNA clone IMAGE:3484905)
unc-93 homolog B (C elegans) (Unc93b)
BING4 protein (Bing4)
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13 (Psm13)
ATP synthase, H ⁺ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit (Atp5b)
cathepsin C (Ctsc)
small nuclear ribonucleoprotein B (Snrbp)
toll-like receptor 1 (Tlr1)
myo-inositol 1-phosphate synthase A1 (Isyna1)
developmentally regulated RNA binding protein 1 (Drbp1)
RAB20, member RAS oncogene family (Rab20)
CD200 cell surface glycoprotein receptor (LOC271375)
ATPase, H ⁺ transporting, V1 subunit B, isoform 2 (Atp6v1b2)
coproporphyrinogen oxidase (Cpox)
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta (Gadd45b)
WW domain binding protein 1 (Wbp1)
glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial (Gpd2)
inosine 5'-phosphate dehydrogenase 1 (Impdh1)
isocitrate dehydrogenase 3 (NAD ⁺) alpha (Idh3a)
ATP citrate lyase (Acly)
Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide (Fcer1g)
immediate early response 3 (Ier3)
CD37 antigen (Cd37)
glycogen synthase 3, brain (Gys3)
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1 (Ptpn1)
gene model 169, (NCBI) (Gm169)
spinocerebellar ataxia 10 homolog (human) (Sca10)
ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast) (Actr2)
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta) (Agpat2)
phosphofructokinase, liver, B-type (Pfkfb)
ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast) (Ube2m)
XPA binding protein 2 (Xab2)
macrophage erythroblast attacher (Maea)
eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 2 (Eif4g2)
integral membrane protein 2C (Itm2c)
mitogen activated protein kinase 13 (Mapk13)
nucleoporin 210 (Nup210)
chemokine (C-C motif) receptor 1 (Ccr1)
RNA polymerase II transcriptional coactivator (Rpo2tc1)
C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, superfamily member 9 (Clecsf9)
RAB24, member RAS oncogene family (Rab24)
N-myristoyltransferase 1 (Nmt1)
transmembrane 9 superfamily member 2 (Tm9sf2)
serine/threonine kinase 19 (Stk19)
dermatan 4 sulfotransferase 1 (D4st1)
histocompatibility 2, Q region locus 1 (H2-Q1)
(continua)

glycogenin 1 (Gyg1)
fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human) (Fus)
transglutaminase 1, K polypeptide (Tgm1)
immunoglobulin superfamily, member 4B (Igsf4b)
hexosaminidase A (Hexa)
chaperonin subunit 8 (theta) (Cct8)
death-associated kinase 3 (Dapk3)
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2 (Cited2)
arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B) (Rnpep)
ferritin light chain 1 (Ftl1)
insulin-like growth factor binding protein 2 (Igfbp2)
interleukin 6 (Il6)
ubiquitin-like 1 (sentrin) activating enzyme E1A (Uble1a)
ATPase, H ⁺ transporting, V0 subunit D isoform 1 (Atp6v0d1)
glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble (Got1)
succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp) (Sdhb)
structure specific recognition protein 1 (Ssrp1)
secretory carrier membrane protein 2 (Scamp2)
interferon-related developmental regulator 1 (Ifird1)
pleckstrin homology domain containing, family J member 1 (Plekhj1)
villin-like protein (Villp)
adenylosuccinate lyase (Adsl)
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2 (Atp6ap2)
solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1 (Slc11a1)
C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 5 (Clecsf5)
ARF6

Anexo D – Lista de genes com expressão 4 vezes maior nos animais AIRmin estimulados com Biogel 24 horas em relação aos AIRmax.

cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (Cdkn2a)
MHC (ACA/J(H-2K-f) class I antigen (LOC56628)
angiopoietin-like 3 (Angptl3)
B and T lymphocyte associated (Btla)
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6 (Abcc6)
sulfotransferase family 1E, member 1 (Sult1e1)
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5 (Dnajb5)
histocompatibility 2, class II antigen E alpha (H2-Ea)
phospholipase C, epsilon 1 (Plce1)
olfactory receptor 1377 (Olfr1377), mRNA
golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing (Gopc)
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 16 (Cyp3a16)
nerve growth factor, alpha, mRNA (cDNA clone MGC:25388 IMAGE:4911885)
retinoic acid early transcript 1, alpha (Raet1a)
zinc finger protein 29 (Zfp29)
olfactory receptor 642 (Olfr642)
myelin transcription factor 1-like (Myt1l)
ELK1, member of ETS oncogene family (Elk1)
procollagen, type XIII, alpha 1 (Col13a1)
transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix) (Tcf15)
coronin, actin binding protein 2A (Coro2a)
olfactory receptor 1356 (Olfr1356), mRNA
Fer3-like (Drosophila) (Ferd3l)
chordin-like 2 (Chrdl2)

Anexo E – Lista de genes com expressão 4 vezes maior nos animais AIRmax estimulados com TPA 30 dias em relação aos AIRmin.

hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 1 (Hcn1)
natriuretic peptide precursor type C (Nppc)
peroxisomal biogenesis factor 13 (Pex13)
IFN-alpha induced mouse embryonic fibroblast mRNA
pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1 (Pdha1)
xylosyltransferase II (Xylt2)
vascular endothelial growth factor C (Vegfc)
Ig mu-chain (J606 family) mRNA V-region (VJ), from hybridoma BC-1004-mu
THAP domain containing 7 (Thap7)
glycoprotein 38 (Gp38)
nucleotide binding protein 2 (Nubp2)
mannoside acetylglucosaminyltransferase 1-like (Mgat1l)
caspase 3, apoptosis related cysteine protease (Casp3)
adult male testis cDNA, RIKEN clone:4931419A11 product:TRANSKETOLASE (FRAGMENT) homolog [Mus musculus], full insert sequence
glutamine repeat protein-1 mRNA
chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (Cxcl2)
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (Cebpb)
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10 (Serpib10)
CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)-like 2 (Cd36l2), mRNA
filamin, beta, mRNA (cDNA clone IMAGE:4913636)
cadherin 3 (Cdh3)
ribosome binding protein 1 (Rrbp1)
SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like (Sh3bgrl)
ARP8 actin-related protein 8 homolog (S cerevisiae) (Actr8)
eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked (Eif1ay)
actin, gamma, cytoplasmic (Actg)
olfactory receptor 799 (Olfr799), mRNA
phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited (Pde3b)
cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (Cyfip2)
GRB2-related adaptor protein (Grap)
Kv channel interacting protein 4 (Kcnip4)
olfactory receptor 480 (Olfr480), mRNA
CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2 (Cd2bp2)
latexin (Lxn)
asparaginase like 1 (Asrgl1)
cerebellin 1 precursor protein (Cbln1)
isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha (Idh3a)
solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2 (Slc23a2)
olfactory receptor 539 (Olfr539), mRNA
melanocyte proliferating gene 1 (Myg1), mRNA
olfactory receptor 1330 (Olfr1330)
vaccinia related kinase 3 (Vrk3)
protein phosphatase 2a, catalytic subunit, beta isoform (Ppp2cb)
CD14 antigen (Cd14)
(continua)

distal-less homeobox 1 (Dlx1)
C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, superfamily member 10 (Clecsf10)
galactose mutarotase (Galm)
elaC homolog 1 (E coli) (Elac1)
thioredoxin domain containing 4 (endoplasmic reticulum) (Txndc4)
corticotropin releasing hormone receptor 2 (Crhr2)
glutathione reductase 1 (Gsr)
developmentally regulated RNA binding protein 1 (Drbp1)
aprataxin (Aptx)
procollagen, type IV, alpha 4 (Col4a4)
zinc finger protein (mkr5) mRNA, 3' end
synaptotagmin 10 (Syt10)
trans-prenyltransferase (Tprt)
coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3 (F2rl3)
ring finger protein 32 (Rnf32)
Ig unproductively rearranged kappa-chain VJ5C mRNA from plasmacytoma S107C
replication factor C (activator 1) 2 (Rfc2), mRNA
WASP family 1 (Wasf1)
calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit (Cacna1c)
leptin receptor gene-related protein (Obrgrp)
sortilin-related receptor, LDLR class A repeats-containing (Sorl1)
matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein, mRNA (cDNA clone IMAGE:3710932)
carnitine O-octanoyltransferase (Crot)
transmembrane channel-like gene family 4 (Tmc4)
histocompatibility 2, T region locus 23 (H2-T23)
interleukin enhancer binding factor 2 (Ilf2)
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (Slc2a1)
killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 22 (Klra22)
cytokine receptor-like factor 1 (Crlf1)
solute carrier family 39 (zinc transporter), member 4 (Slc39a4)
inositol polyphosphate-5-phosphatase B (Inpp5b)
ATPase, H+ transporting, V1 subunit A, isoform 1 (Atp6v1a1)
conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase (Chuk)
cDNA sequence BC005537 (BC005537)
Rho GTPase activating protein 10 (Arhgap10)
S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 (Ahcy1)
t-complex-associated-testis-expressed 1-like (Tcte1l)
RAB28, member RAS oncogene family
thyroid stimulating hormone receptor (Tshr)
keratin complex 2, basic, gene 5 (Krt2-5)
N-myristoyltransferase 1 (Nmt1)
estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9 (Ebag9)
immune-responsive gene 1 (Irg1) mRNA, 3' end of cds
cytoplasmic linker 2 (Cyln2)
leucine-rich PPR-motif containing (Lrpprc)
FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3)
vasodilator-stimulated phosphoprotein, mRNA (cDNA clone MGC:18907 IMAGE:4240907)
kinesin family member 1C (Kif1c)
CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3 (Cdc42ep3)
(continua)

isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble (Idh1)
chemokine (C-C motif) ligand 6 (Ccl6)
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A (Ppp1r9a)
adenine phosphoribosyl transferase (Aprt)
pancreas specific transcription factor, 1a (Ptf1a)
solute carrier family 30 (zinc transporter), member 7 (Slc30a7)
otoraplin (Otor), mRNA
ubiquitin-activating enzyme E1, Chr X (Ube1x)
homeo box D13 (Hoxd13)
Nedd4 family interacting protein 2 (Ndfip2)
response to metastatic cancers 1 (Rmcs1)
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 30 (Dhx30)
ankyrin repeat, family A (RFXANK-like), 2 (Ankra2)
A kinase (PRKA) anchor protein 8 (Akap8)
lysyl oxidase (Lox)
calpain 10 (Capn10)
G protein-coupled receptor kinase 6 (Gprk6)
ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide (Atp7a)
myosin XV (Myo15), transcript variant 1
acyl-malonyl condensing enzyme (Amac1)
stromal antigen 1 (Stag1)
ubiquitination factor E4B, UFD2 homolog (S cerevisiae) (Ube4b)
fragile X mental retardation gene 2, autosomal homolog (Fxr2h)
glucosidase 1 (Gcs1)
ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 5 (Rps6ka5)
sarcoma amplified sequence (Sas)
reticulocalbin (Rcn)
Rho-associated coiled-coil forming kinase 2 (Rock2)
cell division cycle 37 homolog (S cerevisiae)-like (Cdc37l)
Ig active H-chain VJ region, 5' cds
chemokine-like factor super family 5 (Cklfsf5)
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (Galnt1)
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3B (Htr3b)
ryanodine receptor 1, skeletal muscle (Ryr1), mRNA
diacylglycerol O-acyltransferase 1 (Dgat1)
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12C (Ppp1r12c)
golgi coiled coil 1 (Gcc1)
endothelin 1 (Edn1)
melatonin receptor 1A (Mtnr1a)
syntaxin 3 (Stx3), transcript variant C
large tumor suppressor 1 (Lats1) mRNA
zinc finger protein 110 (Zfp110)
WD repeat and SOCS box-containing 1 (Wsb1)
HIV-1 tat interactive protein 2, homolog (human) (Htatip2)
nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) (Nasp)
alpha 4 protein mRNA, 5' end
growth factor independent 1 (Gfi1)
replication protein A2 (Rpa2)
histocompatibility 2, M region locus 105 mRNA
(continua)

differentially expressed in FDCP 6 (Def6)
ATP citrate lyase (Acly)
G protein-coupled receptor 63 (Gpr63)
myotubularin related protein 4 (Mtmr4)
zinc finger protein 364 (Zfp364)
kinase insert domain protein receptor (Kdr)
bridging integrator 3 (Bin3)
ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 4 (Arl6ip4)
F-box only protein 32 (Fbxo32)
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4 (Kcnj4)
renin 1 structural (Ren1)
SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1 (Samsn1)
nitrilase 1 (Nit1)
SNF1-like kinase (Snf1lk)
serum amyloid A 3 (Saa3)
cysteine and glycine-rich protein 3 (Csrp3)
patched homolog 2 (Ptch2)
synaptic vesicle glycoprotein 2 b (Sv2b)
syntaxin binding protein 2 (Stxbp2)
inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 1 (Impa1)
villin-like protein (Villp)
CD37 antigen (Cd37)
phosphoglucomutase 3 (Pgm3)

Anexo F – Lista de genes com expressão 4 vezes maior nos animais AIRmin estimulados com TPA 30 dias em relação aos AIRmax.

calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (Camk4)
cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp17a1)
MHC (ACA/J(H-2K-f) class I antigen (LOC56628)
vomer nasal 1 receptor, G6 (V1rg6), mRNA
histocompatibility 2, class II antigen E alpha (H2-Ea)
gene trap insertion site 4-1 (Gt4-1)
solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2 (Slc1a2)
growth arrest specific 2 (Gas2)
baculoviral IAP repeat-containing 4 (Birc4)
nuclear factor, erythroid derived 2,-like 1 (Nfe2l1)
oxysterol binding protein-like 5 (Osbp15)
isovaleryl coenzyme A dehydrogenase (Ivd)
cadherin 5 (Cdh5)
ATPase family, AAA domain containing 2 (Atad2)
cerebellin 3 precursor protein (Cbln3)
bactericidal/permeability-increasing protein-like 1 (Bpil1)
G protein-coupled receptor 61 (Gpr61)
autoimmune regulator (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy) (Aire)
olfactory receptor 497 (Olfr497), mRNA
casein kinase II, alpha 1 polypeptide (Csnk2a1)
brain-specific angiogenesis inhibitor 2 (Bai2)
tyrosine kinase, non-receptor, 2 (Tnk2)
cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 3 (Chrn3), transcript variant 2
olfactory receptor 1125 (Olfr1125), mRNA
alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked homolog (human) (Atrx)
urotensin 2 (Uts2)
heat shock factor 1 (Hsf1)
F-box only protein 34 (Fbxo34)
chitotriosidase (Chit1) mRNA
interferon (alpha and beta) receptor 2 (Ifnar2)
immunoglobulin kappa chain V-J regions mRNA, clone MRL1-332, partial cds.
carbonic anhydrase 7 (Car7)
T-cell leukemia, homeobox 3 (Tlx3)
forkhead box G1 (Foxg1)
engrailed 1 (En1)
WD repeat domain 17 (Wdr17)
mannose receptor, C type 2 (Mrc2)
B and T lymphocyte associated (Btla)
splicing factor 3a, subunit 1 (Sf3a1)
EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1 (Emr1)
angiopoietin (Agpt)
seminal vesicle protein, secretion 7 (Svs7)
keratin associated protein 14 (Krtap14)
polymerase (DNA directed), lambda (Poll)
olfactory receptor 642 (Olfr642)
(continua)

tyrosine aminotransferase (Tat)
aquaporin 3 (Aqp3)
matrilin 4 (Matn4)
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 3 (Slc7a3)
forkhead box A2 (Foxa2)
contactin 2, mRNA (cDNA clone IMAGE:5704592)
tripartite motif protein 9 (Trim9)
pregnancy-specific glycoprotein 23 (Psg23)
carbohydrate sulfotransferase 10 (Chst10)
homeo box A11 (Hoxa11)
netrin 3 (Ntn3)
olfactory receptor 921 (Olfr921)
coagulation factor C homolog (Limulus polyphemus) (Coch)
REST corepressor 3 (Rcor3)
microtubule-associated protein 2 (Mtap2)
stabilin 2 (Stab2)
cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp7a1)
integrin beta 2-like (Itgb2l)
seizure related gene 6 (Sez6)
GATA binding protein 6 (Gata6)
sodium channel, voltage-gated, type III, beta (Scn3b)
actinin alpha 2 (Actn2)
histone deacetylase 7A (Hdac7a)
Fc receptor, IgG, high affinity I (Fcgr1)
claudin 11, mRNA (cDNA clone MGC:14055 IMAGE:4190031)
WNT1 inducible signaling pathway protein 2 (Wisp2)
solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4 (Slc4a4)
scaffold protein, ankyrin repeats and SAM domain containing (Sans)
transcription factor CP2-like 3 (Tcfcp2l3)
nerve growth factor, alpha, mRNA (cDNA clone MGC:25388 IMAGE:4911885)
olfactory receptor 937 (Olfr937)
interleukin 17 receptor (Il17r)
olfactory receptor 853 (Olfr853), mRNA
lectin, galactose binding, soluble 7 (Lgals7), mRNA
dihydropyrimidinase (Dpys)
chimerin (chimaerin) 2 (Chn2)
olfactory receptor 820 (Olfr820)
hairy and enhancer of split 1 (Drosophila) (Hes1)
Bcl2-interacting killer-like (Biklk)
platelet/endothelial cell adhesion molecule (Pecam)
asrij protein (Asrij)
synaptosomal-associated protein 91 (Snap91)
glutamate receptor, ionotropic, delta 2 (Grid2) interacting protein 1 (Grid2ip)
ring finger protein 17 (Rnf17)
xylosyltransferase 1 (Xylt1)
aldehyde oxidase 1 (Aox1)
cadherin 16 (Cdh16)
olfactory receptor 1231 (Olfr1231)
interleukin 1 alpha (Il1a)

Anexo G – Lista de genes em comum modulados nos animais AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho) submetidos a inflamação aguda (Biogel) e crônica (TPA).

	Biogel	TPA
serum amyloid A 3 (Saa3)	18,04	3,62
chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (Cxcl2)	11,72	23,74
isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble (Idh1)	8,93	5,25
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (Cebpb)	8,25	21,64
ubiquitin-activating enzyme E1, Chr X (Ube1x)	8,08	5,05
response to metastatic cancers 1 (Rmcs1)	7,59	5,00
glutathione reductase 1 (Gsr)	7,47	8,03
diacylglycerol O-acyltransferase 1 (Dgat1)	6,92	4,24
matrix metalloproteinase 9 (Mmp9)	6,74	2,60
regulator of G-protein signaling 19 interacting protein 1 (Rgs19ip1)	6,18	3,38
Leo1, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog	6,07	15,10
Vars2 valyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (putative)	6,02	0,30
Gm1873 gene model 1873, (NCBI)	5,96	5,57
G protein-coupled receptor kinase 6 (Gprk6)	5,71	4,82
solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2 (Slc3a2)	5,28	3,00
sortilin-related receptor, LDLR class A repeats-containing (Sorl1)	5,13	6,83
interleukin 1 receptor, type II (Il1r2)	5,04	3,39
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5 (Slc7a5)	4,79	2,15
histocompatibility 2, T region locus 23 (H2-T23)	4,77	6,66
synaptogyrin 2 (Syng2)	4,73	2,30
clusterin (Clu)	4,59	2,34
ATPase, H+ transporting, V1 subunit A, isoform 1 (Atp6v1a1)	4,56	6,19
SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1 (Samsn1)	4,49	3,64
St8sia1 ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1	4,42	2,85
CD14 antigen (Cd14)	4,32	9,37
EG631624 predicted gene, EG631624	4,31	10,26
solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2 (Slc11a2)	4,25	2,67
unc-93 homolog B (C elegans) (Unc93b)	4,22	0,34
Palld palladin, cytoskeletal associated protein	4,19	5,38
toll-like receptor 1 (Tlr1)	4,11	2,77
developmentally regulated RNA binding protein 1 (Drbp1)	4,09	7,87
Mid1 midline 1	4,07	4,08
isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha (Idh3a)	4,02	12,15
Vasp vasodilator-stimulated phosphoprotein	4,01	5,51
ATP citrate lyase (Acly)	3,96	3,78
CD37 antigen (Cd37)	3,92	3,55
mitogen activated protein kinase 13 (Mapk13)	3,83	2,88
N-myristoyltransferase 1 (Nmt1)	3,76	5,67
Cyp26b1 cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	3,71	0,18
glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble (Got1)	3,63	2,71
villin-like protein (Villp)	3,57	3,56
brain abundant, membrane attached signal protein 1 (Basp1)	3,50	2,04
renin 1 structural (Ren1)	3,45	3,65

(continua)

DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24 (Ddx24)	3,45	0,28
beta1,3 N-acetylglucosaminyltransferase Lc3 synthase (Beta3GnT5) mRNA	3,45	2,23
syntaxin binding protein 2 (Stxbp2)	3,45	3,57
ring finger protein 125 (Rnf125)	3,42	2,77
PDZ and LIM domain 4 (Pdlim4)	3,27	2,93
DNA (cytosine-5)-methyltransferase (Dnmt1) mRNA	3,25	0,33
polo-like kinase 1 (Drosophila) (Plk1)	3,23	3,39
SNF1-like kinase (Snf1Ik)	3,20	3,63
interleukin enhancer binding factor 2 (Ilf2)	3,18	6,65
aryl-hydrocarbon receptor (Ahr)	3,17	2,12
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain (Acads)	3,16	2,04
ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide (Atp7a)	3,12	4,81
glucosidase 1 (Gcs1)	3,11	4,54
inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 1 (Impa1)	3,11	3,57
Ahcy S-adenosylhomocysteine hydrolase	3,07	2,22
netrin 3 (Ntn3)	3,00	0,21
melanocyte proliferating gene 1 (Myg1), mRNA	3,00	11,55
UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (B3gnt1)	2,97	3,56
centromere protein E, mRNA (cDNA clone IMAGE:6811557)	2,96	7,81
Ppp1r3b protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B	2,95	2,84
Krt42 keratin 42	2,94	0,29
cleft lip and palate associated transmembrane protein 1 (Clptm1)	2,93	2,37
nucleotide binding protein 2 (Nubp2)	2,91	31,85
adenine phosphoribosyl transferase (Aprt)	2,90	5,17
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (Slc2a1)	2,89	6,64
platelet/endothelial cell adhesion molecule (Pecam)	2,86	0,24
adenosine deaminase (Ada)	2,83	2,09
protein-tyrosine sulfotransferase 2 (Tpst2)	2,82	2,76
transducin (beta)-like 3 (Tb13)	2,79	2,05
sulfotransferase family 1D, member 1 (Sult1d1)	2,79	0,30
protein phosphatase 2a, catalytic subunit, beta isoform (Ppp2cb)	2,79	10,22
Nacc1 nucleus accumbens associated 1, BEN and BTB (POZ) domain containing	2,78	0,31
Klf9 Kruppel-like factor 9	2,77	4,46
App amyloid beta (A4) precursor protein	2,76	2,88
killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 22 (Klra22)	2,76	6,56
aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2 (Aldh3a2)	2,75	2,75
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A (Ppp1r9a)	2,72	5,18
Mfsd11 major facilitator superfamily domain containing 11	2,72	3,38
nuclear factor, erythroid derived 2,-like 1 (Nfe2l1)	2,67	0,06
3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2 (Papss2)	2,66	2,76
bridging integrator 3 (Bin3)	2,65	3,71
expressed sequence AI467484 (AI467484)	2,65	2,34
macrophage receptor with collagenous structure (Marco)	2,64	2,72
diaphanous homolog 1 (Drosophila) (Diap1)	2,63	0,39
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Aralar), member 12 (Slc25a12)	2,62	2,51
Alkbh5 alkB, alkylation repair homolog 5 (E. coli)	2,59	4,99
basic transcription element binding protein 1 (Bteb1)	2,59	0,28
Fbxl13 F-box and leucine-rich repeat protein 13	2,57	3,29
glucosidase, beta, acid (Gba)	2,56	2,77
(continua)		

Wdr44 WD repeat domain 44	2,55	3,41
MAD homolog 4 (Drosophila) (Smad4)	2,54	2,43
caspase 3, apoptosis related cysteine protease (Casp3)	2,54	27,54
polycystic kidney and hepatic disease 1 (Pkhd1)	2,53	0,44
t-complex-associated-testis-expressed 1-like (Tcte1l)	2,52	5,90
integrin beta 2-like (Itgb2l)	0,40	0,22
aldehyde oxidase 1 (Aox1)	0,40	0,25
cytoplasmic linker 2 (Cyln2)	0,40	5,59
Cgn cingulin	0,40	0,47
Pcsk6 proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	0,39	3,50
histone 2, H2bb (Hist2h2bb)	0,39	0,42
tripartite motif protein 34 (Trim34)	0,39	0,26
lipin 1 (Lpin1), transcript variant 2	0,36	0,34
Hook3 hook homolog 3 (Drosophila)sequence	0,36	0,28
Aim2 absent in melanoma 2	0,36	0,19
SH3-binding kinase (Sbk)	0,35	0,50
Rnf212 ring finger protein 212	0,35	0,27
She src homology 2 domain-containing transforming protein E	0,34	0,29
Fam55b family with sequence similarity 55, member B	0,34	0,26
homeo box D13 (Hoxd13)	0,33	5,03
Cd300e CD300e antigen	0,33	0,46
synaptoporin (Synpr)	0,33	0,36
olfactory receptor 1125 (Olfr1125), mRNA	0,32	0,11
Cercam cerebral endothelial cell adhesion molecule	0,31	0,45
SLAM family member 7 (Slamf7)	0,29	0,49
NOD-derived CD11c +ve dendritic cells cDNA, RIKEN clone:F630119K15	0,29	0,25
protamine 1 (Prm1), mRNA	0,28	0,39
LOC67527 murine leukemia retrovirus	0,28	0,20
Ccdc28b coiled coil domain containing 28B	0,28	0,32
T-cell leukemia, homeobox 3 (Tlx3)	0,28	0,14
Zfp207 zinc finger protein 207	0,27	0,35
carbonic anhydrase 7 (Car7)	0,26	0,13
D10Bwg1379e DNA segment, Chr 10, Brigham & Women's Genetics 1379 expressed	0,24	0,28
olfactory receptor 642 (Olfr642)	0,20	0,18
Klk1b3 kallikrein 1-related peptidase b3	0,20	0,23
Gm633 gene model 633	0,19	0,44
lqcc IQ motif containing C	0,18	0,10
histocompatibility 2, class II antigen E alpha (H2-Ea)	0,13	0,05
B and T lymphocyte associated (Btla)	0,10	0,15
MHC (ACA/J(H-2K-f) class I antigen (LOC56628)	0,05	0,02