LÍLIAN RÊGO DE CARVALHO

**INFLAMAÇÃO E CÂNCER HEPÁTICO E PULMONAR EM
CAMUNDONGOS SELECIONADOS PARA MÁXIMA OU MÍNIMA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA**

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

São Paulo
2013

LÍLIAN RÊGO DE CARVALHO

**INFLAMAÇÃO E CÂNCER HEPÁTICO E PULMONAR EM
CAMUNDONGOS SELECIONADOS PARA MÁXIMA OU MÍNIMA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Olga Célia Martinez Ibañez

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Carvalho, Lílian Rêgo de.

Inflamação e câncer hepático e pulmonar em camundongos selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda / Lílian Rêgo de Carvalho. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Olga Célia Martinez Ibañez.

Dissertação (Mestrado) – 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: Inverse susceptibility to hepatic and lung cancer in mouse lines selected according to the acute inflammatory response.

1. Camundongos 2. Inflamação 3. Câncer 4. Imunologia 5. Carcinógenos químicos 6. Imunogenética I. Ibañez, Profa. Dra. Olga Célia Martinez II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB010/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):   Lílian Rêgo de Carvalho.

Título da Dissertação: Inflamação e câncer hepático e pulmonar em camundongos selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda.

Orientador(a):   Profa. Dra. Olga Célia Martinez Ibañez.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **148** nas fls. **95** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Olga Célia Martinez Ibañez, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Inflamação e câncer hepático e pulmonar em camundongos selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda** do qual participam o(s) alunos **Lílian Rêgo de Carvalho** e os pesquisadores **Wafa Koury Cabrera, Andreia Borrego, Marcelo De Franco, Orlando Garcia Ribeiro Filho, Nancy Starobinas**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **13.12.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 13 de dezembro de 2010.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para mais essa etapa da minha vida.

À minha orientadora Dra. Olga Ibañez, por ter me aceitado como aluna e me ensinado pacientemente. Foram dois anos bastante produtivos. Obrigada por estar ao meu lado, sempre me ajudando e me incentivando em meus projetos. Obrigada pelas conversas, pelos momentos de descontração, pelos conselhos e advertências, pelo carinho, por tudo! Ao acompanhá-la pude aprender coisas além da técnica. Esses ensinamentos vou levar por toda a minha vida acadêmica. Eu a admiro muito. Muito obrigada.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan Dr. Marcelo de Franco, Dr. Orlando Garcia, Dra. Nancy Starobinas, Dr. José Ricardo Jensen, Dra. Mônica Spadafora, Dra. Milene de Franco, Dra. Solange Carbonara, Dra. Solange Massa e Dra. Ariene, meu muito obrigada pela pronta ajuda sempre que precisei e também pela agradável companhia. Obrigada Dra. Andrea Borrego por me ajudar nesses dois anos com os experimentos quando eu não entendia quase nada e também pela amizade carinhosa. Obrigada, Dra. Wafa Cabrera, com quem fiz a maior parte dos experimentos, sentirei muitas saudades de trabalhar ao seu lado! Obrigada por tudo o que me ensinou e pelo carinho com o qual me tratou todo esse tempo.

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação Prof. Dr. Alexandre Barbuto, Profa. Dra. Lourdes Isaac e Prof. Dra. Ana Lepique pelas críticas e sugestões ao trabalho. O momento da minha qualificação de mestrado foi muito importante para o meu crescimento científico. Muito obrigada.

Aos professores que tive ao longo do programa regular de mestrado, obrigada pelo ensino, pelas críticas e pelos conselhos. À secretária da pós-graduação, Eni, muito obrigada por me atender e me ajudar nas minhas solicitações. Ao professor que me acompanhou no meu Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, o Prof. Dr. Ronni Brito, pela oportunidade que tive de aprendizado ao ser monitora da sua disciplina, muito obrigada. Também sou grata ao João, secretário da graduação, pela grande ajuda quando fui monitora.

Aos amigos que fiz no laboratório Aline Lavezo, Tatiane Gaparelo, Layra Albuquerque, Alessandra Suppa, Priscilia Aguilar, Mara Correa, Marcela Bordenalli, Jussara Fernandes, Mariana Perlati, Camila Moreira, Cristiano Rossato, Priscila Lara, Thais Rodrigues, Miriam Franchini, Fernanda Ampessan, Renata Nunes, Iana Katz, Ariane e Dani o meu muito obrigada! Tive muita sorte de conhecer pessoas tão boas e solícitas. Com vocês aprendi muito, ganhei grandes amigos e quero levar para a vida toda. Para a vida toda, não é,

amadinhas? Obrigada pelas brincadeiras, pelas conversas, os desabafos e, principalmente, por sempre me ajudarem quando precisei. Vocês são todos especiais e sou muito grata a cada um.

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan Mara Irineu, Andressa Rogge, Sandra Ottoboni, Tânia Vieira, Neusa Miranda e Ronaldo, obrigada pela ajuda, pelos reagentes e tampões, as lâminas e tantas coisas necessárias para o bom funcionamento do meu trabalho. Além disso, muito obrigada pela boa convivência, pela amizade e conversas.

Aos funcionários do Biotério Marinalva Lima, Marinalva Santos, Aline Sabbatini, Celso, Juca, Manoel Cerqueira e Rosa Maria pelo cuidado e manutenção dos animais utilizados nos experimentos. Não tivemos tanta convivência, mas sou muito grata pelo trabalho que têm com os animais que precisei.

Aos meus amigos de São Paulo pelos bons momentos e também por entenderem quando eu não podia participar. Obrigada *Tchuros* (Milessa, Vivi e Alan), aprendi muito com a amizade de vocês! Obrigada a Pedro e LÍlian, pela amizade, as saídas e os momentos juntos. Nunca mais ouvir música será a mesma coisa depois das paródias de vocês! Obrigada ao Emídio, pelas atitudes e conversas sensatas, pelos conselhos e por sempre me apresentar as coisas boas que essa enorme cidade tem pra oferecer. Obrigada Marina Wall, amiga, vizinha e companheira de estudos. Quantas vezes estive ao meu lado pra me confortar ou sofrer junto. Obrigada, lindinha! Obrigada ao Zé pelos momentos de descontração e pelas boas risadas. Ao Sr. Roberto e sua esposa Uda pela amizade e apoio aos estudos. A todos os meus amigos não nomeados aqui, vocês foram muito importantes nesses dois anos e serão sempre. Muito obrigada!

Pela amizade e nutrição espiritual, sou muito grata a Rosana e Mario (dindos queridos). Obrigada pelo amor, bondade e carinho. Sou grata também ao Pe. Rocha e a todo o pessoal da comunidade pelos bons momentos que tivemos.

Aos meus amigos de Teresina pelo afago distante e pelas mensagens e ligações carinhosas. Muito obrigada! Eu não teria resistido à saudade se não fossem vocês me ajudando, mandando mensagens e boas energias, fazendo ligações e me recebendo com tanto amor quando ia a Teresina, mesmo depois de tanto tempo longe. Obrigada Clarisse Cortez, por sempre estar ao meu lado. Obrigada Zaira Fernandes, por tantas TPMs e chocolates juntas, mesmo que por telefone! Lucas de Deus, obrigada pelos conselhos e conversas. Raquel Holanda, Anely Carmo e Camila Peixe pela amizade tão antiga, apesar da distância. Aline Marques, amiga linda, pelas conversas e por ter colaborado no trabalho com a leitura das lâminas. Aos amigos dos meus pais, que também se tornaram meus amigos, obrigada pela

torcida e carinho. Em especial a Val, que sempre me recebeu com tanto amor e me inseriu em reuniões de sua família, muito obrigada! A todos os meus amigos, muitíssimo obrigada, vocês são realmente muito importantes!

Aos meus professores de Teresina, obrigada pela formação que recebi. Obrigada pelos conselhos e advertências. Vocês também tiveram grande importância nessa caminhada.

A Deus, pelas bênçãos, pelas oportunidades recebidas e por sempre me guiar em meu caminho. Aos meus pais Alduina, Paulo, Inácio e Kênia pelo amor e incentivo. Fui presenteada com quatro pais maravilhosos que sempre contribuíram para minha formação profissional e pessoal, cada um à sua maneira linda. Vocês tinham razão e sempre têm: tudo nos pode ser retirado, menos os estudos. Agradeço pelas conversas e conselhos. Agradeço pelos “puxões de orelha”. Como eu teria imensa dificuldade ao longo do meu mestrado se não tivesse assistido às aulas de inglês que vocês me matriculavam todo ano! Obrigada pela educação que recebi. Cada um de vocês quatro têm uma participação especial na minha vida.

Aos meus familiares e irmãos Ivo, João, Isabela e Lucas obrigada pelo carinho, apoio e torcida mesmo que distante. Obrigada pelo carinho com que me recebiam nas férias. Sei que os encontros ficaram difíceis, mas obrigada por me receberem com tanto amor quando pudemos nos encontrar. Agradeço aos que vieram me visitar e também aos que não puderam por problemas de tempo ou finanças. Sei que a correria do dia a dia consome nosso tempo e às vezes não podemos fazer tudo o que queremos, mas quero que saibam que amo muito vocês e sou imensamente grata por tudo. São muitos nomes, mas obrigada a cada um de vocês por todo o apoio. Eu amo muito vocês!

Ao meu marido Antonio, presentinho que recebi do céu, por ter me ajudado ao longo dessa caminhada. Estudou comigo, ajudou-me a formatar textos e tantas outras coisas do mundo científico que eu não conhecia. Sempre com amor e companheirismo. Obrigada por tudo, meu amor, você é uma influência linda em minha vida.

Por fim, agradeço ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

A todos o meu muito obrigada!

A vida tem-se ensinado que nenhuma coisa é simples, que só às vezes o parece, e que é justamente quando mais o parecer que mais nos convidará duvidar.

(José Saramago, em O Homem Duplicado).

RESUMO

CARVALHO, L. R. **Inflamação e câncer hepático e pulmonar em camundongos selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda.** 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A inflamação é um componente essencial presente no microambiente tumoral, sendo relacionada a muitos tipos de câncer, como o de pulmão e de fígado. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de fatores genéticos relacionados à inflamação no desenvolvimento do câncer através da análise da progressão tumoral em camundongos AIRmax e AIRmin, geneticamente selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória. Os carcinomas foram induzidos pela injeção de Uretana ou DEN. 32 semanas após dose, a maioria dos AIRmax apresentaram tumores hepáticos, enquanto AIRmin foram resistentes. O contrário aconteceu com câncer de pulmão: todos os AIRmin foram acometidos e poucos AIRmax apresentaram pequenas lesões. As proteínas de fase aguda IL-6, TNF- α e IL-1 β são importantes nesse processo, pois tiveram aumento de produção em órgãos alvo horas após injeção. Análises da expressão gênica de proteínas do inflamassoma, responsável pela produção de IL-1 β , através da técnica de PCR *array*, sugerem que AIRmax e AIRmin possuem diferenças nas cascatas de sinalização via TLR que desencadeiam maior expressão gênica de proteínas de sinalização *downstream* em AIRmax, com consequente maior produção de IL-1 β . Os resultados sugerem que um grupo de *loci* gênicos polimórficos relacionados à resistência/suscetibilidade a carcinogênese foram diferencialmente segregados em AIRmax e AIRmin durante a seleção para máxima ou mínima inflamação e as variantes alélicas destes genes, agindo no ambiente de cada tecido, poderiam influenciar o aparecimento e desenvolvimento de tumores nestes animais. Inflamação é um importante fator de risco para o desenvolvimento de tumores e estudos estão sendo conduzidos para identificar fatores genéticos comuns relacionados à resistência/ suscetibilidade ao câncer e ao controle da reação inflamatória.

Palavras-chave: Camundongos. Inflamação. Câncer. Imunologia. Carcinógenos Químicos. Imunogenética.

ABSTRACT

CARVALHO, L. R **Inverse susceptibility to hepatic and lung cancer in mouse lines selected according to the acute inflammatory response.** 2013. 69 p. Masters thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Inflammatory components are an essential part of the tumor microenvironment being crucial in some types of cancer. Our objective was to study the influence of genetic factors relevant to inflammatory response regulation on cancer development by the comparative analysis of carcinogen-induced liver and lung tumors in AIRmax and AIRmin mouse strains, genetically selected for maximum and minimum inflammatory responsiveness. The carcinomas were induced by the injection of Urethane or DEN. 32 weeks after treatment, most AIRmax had liver tumors whereas AIRmin mice were resistant. The inverse occurred in lungs: all AIRmin were affected and the incidence in AIRmax was 27.3%. The acute phase proteins IL-6, TNF- α and IL-1 β seem to be important in this process, with increased production in target organs hours after drug injection. Gene expression analysis of inflammasome proteins, responsible for the production of IL-1 β , by PCR *array*, suggest that AIRmax AIRmin have differences in TLR pathway signaling cascades that trigger greater gene expression of downstream signaling proteins in AIRmax, with consequent greater production of inflammatory cytokines. These results suggest that a group of polymorphic genetic loci relevant for resistance / susceptibility to cancer were differentially segregated in AIRmax and AIRmin mouse lines during selection for maximal or minimal inflammation and these genes' allelic variants, acting within the tissue environment, might influence tumor onset and development in these mice. Inflammation is an important risk factor for tumor development and studies are being conducted in order to identify the common genetic factors related to resistance / susceptibility to cancer and to inflammatory reaction control.

Keywords: Mice. Inflammation. Cancer. Immunology. Chemical Carcinogens. Immunogenetics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIR - Resposta inflamatória aguda
ASC - Proteína que contem um domínio CARD
CARD - Domínio de recrutamento de caspase
CyP2E1 - Citocromo P450, família 2, subfamília E, polipeptídeo 1
Ct - *Cycle threshold*
CXCL1 - Quimiocina ligante 1 (Motivo C-X-C)
DAMP - Padrão molecular associado a dano
DC - Célula dendrítica
DEN - Dietilnitrosamina
DMBA - 9,10-dimetil-benzantraceno
DMH - Dimetilhidrazina
HCC - Hepatocarcinoma
IARC - Agência internacional de pesquisa em câncer
IL-1 α - Interleucina 1 alfa
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IL-6 - Interleucina 6
IL-18 - Interleucina 18
INCA - Instituto nacional do câncer
INF - Interferon
ip - Intraperitoneal
IRF - Fatores reguladores de interferon
KC - Célula de Kupffer
LPS - lipopolissacarídeo
MAPk - Proteína quinase ativada por mitógeno
mRNA - RNA mensageiro
MyD88 - Fator de diferenciação mielóide 88
NALP3 - Receptor do tipo NOD contendo domínio pirina (ou NLRP3)
NAIP - Proteína inibidora de apoptose neuronal
NFkB - Fator nuclear kappa B
NK - Células *Natural Killer*
NLR - Receptor do tipo NOD (*NOD like receptor*)
NLRC - Receptor do tipo NOD contendo domínio CARD

NLRP3 - Receptor do tipo NOD contendo domínio pirina (ou NALP3)
NOD - Domínio de ligação de nucleotídeo (*Nucleotide-binding Domain*)
P2X7 - Receptor purinérgico da membrana celular
PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PRR - Receptores de reconhecimento de padrões
PYD - Domínio pirina
qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real
QTL - *Quantitative trait loci*
SNP - *Single nucleotide polymorphism*
sc - subcutâneo
TA - Temperatura ambiente
TIR - Receptor de Toll/Interleucina 1
TLR - Receptor do tipo Toll (*Toll like receptor*)
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TPA - 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato
TRAM - Receptor do tipo Toll associado a molécula adaptadora
TRIF - Receptor do tipo Toll associado a ativador de interferon
VC - Vinil carbamato
VCE - Epóxido de vinil carbamato

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da placa de 96 poços utilizada para realização do PCR <i>array</i>	38
Figura 2 - Modelo da placa utilizada na reação de PCR <i>array</i>	38
Figura 3 – Aspectos macroscópicos de fígado de camundongos AIRmax após tratamento com Uretana	40
Figura 4 – Aspectos macroscópicos de pulmão de camundongos AIRmin após tratamento com Uretana	41
Figura 5 – Aspectos microscópicos de pulmão de AIRmax e AIRmin após tratamento com Uretana.....	42
Figura 6 – Aspectos microscópicos de fígado de camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com Uretana.....	43
Figura 7 – Aspectos macroscópicos de pulmão de camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN	45
Figura 8 – Aspectos macroscópicos de fígado de camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN	46
Figura 9 – Aspectos macroscópicos de fígado de camundongos AIRmax machos após tratamento com DEN	46
Figura 10 – Aspectos microscópicos de fígado de camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN	47
Figura 11 – Aspectos microscópicos de pulmão de camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN	48

Figura 12 – Comparativo da análise da expressão de mRNA de citocinas inflamatórias em fígado de AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN	49
Figura 13 – Produção de citocinas inflamatórias em sobrenadante de macerado de fígado de AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN	50
Figura 14 – Produção de citocinas inflamatórias em sobrenadante de macerado de pulmão de AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN	51
Figura 15 – Produção de IL-1 β em plasma de AIRmax e AIRmin submetidos ao protocolo LPS e ATP e em tempos após tratamento com DEN	52
Figura 16 – Expressão relativa de genes em células sanguíneas de camundongos AIRmax e AIRmin normais ou tratadas com LPS e ATP.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resistência/suscetibilidade a diversos tipos de câncer utilizando carcinógenos químicos diferentes em camundongos AIRmax e AIRmin	25
Tabela 2 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na síntese de mRNA	34
Tabela 3 – Incidência de tumores hepáticos e pulmonares em camundongos AIRmax e AIRmin após injeção de Uretana.....	41
Tabela 4 – Incidência de tumores hepáticos e pulmonares em camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN	44
Tabela 5 – Multiplicidade e volume de tumores hepáticos e pulmonares em AIRmax e AIRmin 32 semanas após tratamento com DEN	45
Tabela 6 – Comparativo da análise de expressão de mRNA de genes do complexo inflamassoma em placa de PCR <i>array</i> de células sanguíneas de animais AIRmax e AIRmin controles e tratadas com LPS e ATP	53
Tabela 7 - Comparativo da análise de expressão de mRNA de genes do complexo inflamassoma em placa de PCR <i>array</i> de células sanguíneas de animais AIRmax e AIRmin tratadas com LPS e ATP em comparação com seus respectivos controles	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 <u>Inflamação e câncer</u>	19
1.2 <u>Câncer pulmonar</u>	20
1.3 <u>Câncer hepático</u>	21
1.4 <u>Camundongos selecionados segundo a reatividade inflamatória apresentam diferente suscetibilidade à carcinogênese química</u>	22
1.5 <u>O complexo enzimático inflamassoma</u>	25
1.6 <u>Relevância do tema</u>	28
2 OBJETIVO	29
2.1 <u>Objetivo geral</u>	29
2.2 <u>Objetivos específicos</u>	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 <u>Animais</u>	30
3.2 <u>Indução de carcinogênese química</u>	30
3.2.1 <u>Etil Carbamato (Uretana)</u>	30
3.2.2 <u>DiEtilNitrosamina (DEN)</u>	30
3.3 <u>Análise histológica</u>	31
3.4 <u>Avaliação da produção de citocinas inflamatórias por ELISA</u>	32
3.5 <u>Extração de mRNA de fígado</u>	33
3.6 <u>Síntese de DNA complementar (cDNA)</u>	33
3.7 <u>Sequência de primers utilizados nos ensaios de Reação da Polimerase em Cadeia em tempo real (qPCR)</u>	34
3.8 <u>Quantificação da expressão dos genes de citocinas em células de fígado e pulmão de camundongos por qPCR</u>	35
3.9 <u>Análise da resposta do inflamassoma</u>	36
3.10 <u>Extração de mRNA de sangue</u>	36
3.11 <u>Síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA de sangue</u>	37
3.12 <u>Quantificação da expressão dos genes do inflamassoma em células de sangue de camundongos por array de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR array)</u>	37
3.13 <u>Análise estatística</u>	39

4 RESULTADOS	40
<u>4.1 Desenvolvimento de tumores induzidos por carcinógenos químicos em animais AIRmax e AIRmin .....</u>	<u>40</u>
4.1.1 <i>Tratamento com Uretana induz tumores hepáticos e pulmonares .....</i>	40
4.1.2 <i>Tratamento com DEN induz tumores hepáticos e pulmonares .....</i>	43
<u>4.2 Tratamento com DEN induz produção de citocinas pró-inflamatórias .....</u>	<u>48</u>
<u>4.3 Camundongos AIRmax e AIRmin respondem de maneira diferente ao protocolo de ativação do inflamassoma NLRP3 .....</u>	<u>51</u>
<u>4.4 Camundongos AIRmax e AIRmin possuem expressão gênica diferente de proteínas relacionadas à cascata de ativação do inflamassoma.....</u>	<u>52</u>
 5 DISCUSSÃO	 56
 6 CONCLUSÃO.....	 65
 REFERÊNCIAS	 66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação e câncer

A resposta inflamatória desempenha importante papel em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral, incluindo iniciação, promoção, transformação maligna, invasão e metástase (GRIVENNIKOV et al., 2010; LIN; KARIN, 2007). São as reações celulares do hospedeiro ao estresse que guiam sua resposta inflamatória e causam grandes impactos na formação e progressão do câncer (DRANOFF, 2004). É evidente que um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento, estroma ativado e agentes promotores de dano ao DNA pode potencializar ou promover o risco de transformação neoplásica de células em proliferação. Portanto, infecções crônicas e inflamação são riscos para muitos tipos de câncer (BALKWILL; MANTOVANI, 2012).

Durante a progressão tumoral, a presença de inflamação pode atuar como fator facilitador ou inibidor do crescimento desordenado de células. É a expressão de vários mediadores inflamatórios, bem como a quantidade e o estado de ativação de diferentes tipos celulares no microambiente tumoral, que vão guiar a resposta para promoção ou inibição tumoral (LIN; KARIN, 2007). Isso sugere que inflamação facilitadora do tumor e a imunidade antitumoral coexistam em diferentes pontos ao longo do caminho da progressão do mesmo e são as condições do microambiente que controlam esse balanço (BUI; SCHREIBER, 2007).

Hanahan e Weinberg (2011) descreveram como característica facilitadora do câncer a “inflamação promotora do tumor” (*tumor-promoting inflammation*). Os mesmo autores, no ano de 2000, explicaram que, numa transformação maligna, as células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico e adquirem uma sucessão de *hallmarks* ou marcadores. Assim, o processo de múltiplos passos da patogênese do tumor pode ser racionalizado pela necessidade de as células neoplásicas incipientes adquirirem características que lhes permitam tornar-se tumorigênicas. Naquela época já havia indícios de que a resposta inflamatória associada ao tumor tinha efeito, paradoxal para o momento, de aumentar a tumorigênese, ajudando células neoplásicas a adquirir esses marcadores. Na década que se seguiu, a pesquisa sobre as interseções entre inflamação e patogênese do câncer floresceu, produzindo manifestações abundantes e convincentes sobre o seu importante efeito indutor de tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Inflamação pode contribuir para a capacidade de malignização celular, pois atua no microambiente do tumor produzindo substâncias importantes nesse processo, incluindo

fatores de crescimento que sustentam a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a morte das células, fatores angiogênicos e fatores de degradação da matriz extracelular, promovendo invasão e metástase. Além disso, as células inflamatórias podem liberar substâncias químicas e espécies reativas de oxigênio, que são ativamente mutagênicos para as células alteradas, acelerando sua evolução genética para estados de malignidade elevada (GRIVENNIKOV et al., 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Portanto, o microambiente tumoral é peça fundamental no processo de transformação maligna celular. Cada tecido possui parênquima, células e fatores solúveis locais diferentes, e isso pode interferir significativamente no desenvolvimento do tumor. Assim, resistência e / ou suscetibilidade a um determinado tipo de câncer podem estar intimamente relacionadas ao tecido acometido e à resposta imune desencadeada e mantida naquele tecido.

1.2 Câncer pulmonar

O câncer de pulmão é a causa mais comum de morte por câncer no mundo, com número total de casos de aproximadamente 1,2 milhões por ano. O fumo é a principal causa desse tipo de câncer e a proporção de casos atribuível ao tabagismo chegou a 90% em populações que fazem uso prolongado do cigarro (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 2004). No Brasil, foi responsável por 21.867 mortes em 2010, sendo o tipo que mais fez vítimas (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2012).

Para a indução de câncer pulmonar em camundongos, utiliza-se o carcinógeno químico Uretana (Etil carbamato). A Uretana é um químico que se forma espontaneamente durante o processo de fermentação. As células de levedura excretam ureia que pode ser reabsorvida e usada como uma fonte de nutrientes azotados. É a reação da ureia com o etanol que resulta na formação de etil carbamato. A exposição humana a Uretana pode ocorrer inadvertidamente, através do excesso de consumo de bebidas alcoólicas e de produtos alimentares fermentados, bem como através da utilização de tabaco (FORKERT, 2010).

A Uretana é metabolizada por enzimas da família do citocromo P450 (família 2E1 – Cyp2E1), ocasionando a bioativação da droga via formação de vinil carbamato (VC) e subsequente metabolização desse composto em epóxido de vinil carbamato (VCE), que é muito reativo com DNA e considerado o último metabólito carcinogênico da Uretana (GHANAYEM, 2007). Quando injetada em camundongos adultos, a droga é rapidamente distribuída pelo corpo e mais de 90% é metabolizada em 24h (NERY, 1968).

Uma pequena proporção desse carcinógeno parece ser responsável por uma variedade de efeitos observados em animais, incluindo tumorigênese e mutações, principalmente em pulmão, fígado, baço, timo e rim (NERY, 1968). Dragani et al. (1991), utilizaram a Uretana numa dose subcutânea (sc) de 300 mg/kg para gerar tumor de fígado e pulmão em camundongos de 7 dias de vida. Após 30 semanas foram encontrados nódulos pulmonares na maioria dos camundongos.

1.3 Câncer hepático

No homem, dentre os tumores originados no fígado, o mais frequente é o hepatocarcinoma (HCC), responsável por aproximadamente 80% dos casos (INCA, 2013). O HCC é a terceira causa mais comum de mortalidade por câncer e a sexta causa mais comum de incidência de câncer em todo o mundo. Embora seja relativamente raro em países desenvolvidos em comparação com os em desenvolvimento, a incidência de câncer de fígado primário aumentou durante as últimas décadas nos Estados Unidos e em vários países europeus. Ultimamente, mais evidências têm sido apresentadas para o risco de câncer de fígado entre aqueles que consomem exagerada e prolongadamente bebida alcoólica, que têm doença cirrótica e infecções por vírus da hepatite B e C (IARC, 2010). No Brasil, foi responsável por 7.720 mortes em 2010, sendo 4.409 homens e 3.312 mulheres (INCA, 2013).

O carcinógeno químico mais utilizado em hepatocarcinogênese experimental é o dietilnitrosamina (DEN) pela sua capacidade de causar danos no DNA de camundongos (FAUSTO; CAMPBELL, 2010). De acordo com Lee et al. (2004), o modelo de neoplasia hepática induzida por DEN em camundongos é um bom representante do HCC humano de prognóstico ruim.

DEN é um líquido solúvel em água e em solventes orgânicos. Ele tem sido usado como carcinógeno experimental principalmente pela sua capacidade de formar adutos de DNA, de ser hepatotóxico, de induzir proliferação celular, lesões pré-neoplásicas e tumorigênese. O DEN é hidroxilado em α -hidroxilnitrosamina, uma reação mediada principalmente pela família Cyp2E1 do citocromo P450. A clivagem desse produto libera o íon etil diazônio, um agente eletrofílico que reage com bases do DNA gerando adutos. Uma única injeção pós-natal dessa droga pode causar câncer no fígado em camundongos (VERNA; WHYSNER; WILLIAMS, 1996).

Administração de DEN pode causar citotoxicidade e influenciar na proliferação celular e taxa de replicação do DNA (VERNA; WHYSNER; WILLIAMS, 1996). Os hepatócitos,

principalmente aqueles da região centrolobular, metabolizam o DEN e os metabólitos gerados podem induzir aumento de intermediários reativos do oxigênio, causando a morte dessas células e uma proliferação compensatória (WU et al., 2010).

O hepatocarcinógeno DEN induz liberação de $\text{TNF}\alpha$ por células de Kupffer (WU et al., 2010) e como revisto por Diehl (2000), a indução do TNF é um dos eventos que acontecem mais cedo numa inflamação hepática, desencadeando a liberação de uma cascata de outras citocinas que objetivam recrutar células inflamatórias e iniciar fibrogênese. Os hepatócitos possuem uma variedade de receptores de citocinas, como $\text{IL1-}\alpha$, $\text{IL1-}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 e as células de Kupffer (KC), linfócitos T e outras células são recrutados para o local da lesão e produzem fatores pró-inflamatórios (RAMADORI; ARMBRUST, 2001; YEH; CHAN, 2010).

É sabido também que estrogênio pode proteger os hepatócitos da transformação maligna via inibição da secreção de IL-6 pelas células de Kupffer, um processo crítico para o HCC induzido por DEN (NAUGLER et al., 2007; YEH; CHAN, 2010). A incidência do HCC é aproximadamente três vezes maior em homens que em mulheres, e a maioria dos modelos experimentais comprova essa diferença entre sexo (FAUSTO; CAMPBELL, 2010). Naugler et al. (2007) propuseram que o estrogênio inibe a produção de IL-6 em fêmeas, o que explica sua baixa incidência tumoral. Assim, uma alta atividade androgênica funciona como promotor do tumor de fígado, enquanto uma alta atividade do estrogênio funciona como supressor do tumor (YEH; CHAN, 2010).

Muitos trabalhos utilizam DEN com sucesso para induzir tumores em fígado. De acordo Fausto e Campbell (2010), a tumorigênese induzida por DEN varia com idade, sexo, dose e linhagem de camundongo. As doses utilizadas na literatura variam entre 5-25 mg/kg intraperitoneal (ip) em camundongos mais novos (geralmente 15 dias de vida) e 100 mg/kg ip em mais velhos (6-8 semanas de vida). Os trabalhos que utilizam o DEN em camundongos adultos o fazem para uma análise aguda do processo inflamatório, caso contrário, precisam utilizar outra droga como promotora do tumor. Diferentemente, os camundongos mais novos desenvolvem câncer com apenas uma injeção ip, não sendo necessário o uso de um promotor.

1.4 Camundongos selecionados segundo a reatividade inflamatória apresentam diferente suscetibilidade à carcinogênese química

Duas linhagens de camundongos foram produzidas por seleção genética no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan de acordo com a intensidade da resposta

inflamatória aguda (*Acute Inflammatory Response*, AIR) a partículas de um material quimicamente inerte, a poliacrilamida (Biogel P100), e foram denominadas AIRmax (para alta resposta) e AIRmin (para baixa resposta) (IBAÑEZ et al., 1992). A resposta inflamatória aguda foi avaliada pela contagem do número de células infiltradas e pela concentração de proteínas no exsudato inflamatório produzido 24h após a injeção subcutânea do Biogel no dorso dos camundongos.

Esta seleção foi iniciada por uma população heterogênea oriunda do acasalamento equilibrado entre oito linhagens isogênicas (A/J, DBA/2J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/cJ e C57BL/6J), para realizar uma seleção bidirecional com um fundo genético conhecido. A seleção genética bidirecional é um método poderoso, pois permite concentrar nas linhagens obtidas muitas variantes alélicas nos diversos *loci* que estão implicados na variação fenotípica de interesse. A população resultante dos cruzamentos a partir das linhagens descritas acima foi chamada de F0, pois foi utilizada como população inicial, e cada representante possuía, teoricamente, uma combinação aleatória de 12,5% do conjunto gênico de cada uma das oito linhagens isogênicas.

Assim, a seleção foi iniciada pelo acasalamento de camundongos nos extremos de resposta alta ou baixa entre si, evitando cruzamentos consanguíneos, procedimento repetido em gerações consecutivas, culminando em um máximo de separação fenotípica entre as duas linhagens AIRmax e AIRmin após cerca de 20 gerações. A diferença observada entre as linhagens é de cerca de 20 a 30 vezes no número de leucócitos que migraram ao sítio inflamatório em resposta ao Biogel, com predomínio de neutrófilos (85%), e de 2,5 vezes na concentração de proteínas do exsudato (RIBEIRO et al., 2003).

O processo de seleção das linhagens AIRmax e AIRmin promoveu uma progressiva divergência entre elas, com redução da variância dentro de cada linhagem quanto à expressão dos caracteres de interesse. Com isso, houve um acúmulo progressivo de múltiplos genes exercendo efeitos aditivos sobre o fenótipo selecionado, estimando-se o número de *loci* gênicos ou QTL (*quantitative trait loci*) controladores da AIR entre 7 e 11 (BIOZZI et al., 1998; IBAÑEZ et al., 1992).

Embora não tenha sido considerado como caráter de seleção, estes animais divergiram também no fenótipo de resistência e suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores induzidos em diferentes órgãos e por diferentes agentes carcinogênicos (Tabela 1). AIRmax mostraram-se resistentes e AIRmin suscetíveis à carcinogênese de pele induzida por 9,10-dimetil-benzantraceno (DMBA) e 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) (BIOZZI et al., 1998) e também à carcinogênese de pulmão induzida por Uretana (MARIA et al., 2003). Neste

trabalho, foi constatado uma incidência de tumores pulmonares em 100% dos animais AIRmin e em apenas 13% dos AIRmax e observou-se no parênquima pulmonar das duas linhagens uma infiltração de granulócitos e mononucleares com persistência em AIRmin (além de 21 dias pós injeção do carcinógeno) e declínio em AIRmax (14-21 dias após injeção) (MARIA et al., 2003). O aparecimento de tumores renais também foi observado somente nos animais 180 dias AIRmin após o tratamento com Uretana (dados não publicados).

O contrário aconteceu com câncer de cólon induzido por dimetilhidrazina (DMH), onde foi observado resistência em AIRmin e suscetibilidade em AIRmax (DI PACE et al., 2006). Este mesmo tratamento, entretanto, induziu tumores pulmonares apenas nos AIRmin. Há também divergência na resposta entre as linhagens com relação a câncer de fígado e pulmão induzidos por Uretana, onde AIRmax é suscetível a câncer hepático porém resistente a câncer pulmonar, perfil contrário dos animais AIRmin (dados não publicados).

Corroborando com esses dados, um estudo comparativo empregando técnica de *microarrays*, para a análise da expressão global de genes no pulmão de animais AIRmax e AIRmin evidenciou que existe um perfil específico de expressão gênica no pulmão normal que diferencia as duas linhagens, além de um padrão linhagem-específico de modulação gênica durante a tumorigênese pulmonar (DE FRANCO et al., 2010).

Assim, nota-se que a suscetibilidade/resistência ao câncer está intimamente relacionada à inflamação. Independente do carcinógeno utilizado, animais da linhagem de alta resposta inflamatória aguda são resistentes a câncer de pele, pulmão e rim, e sensíveis a câncer de fígado e cólon (Tabela 1). Dessa forma, o ambiente tumoral e / ou os fatores genéticos segregados no processo de seleção das linhagens tem papel importante no desenvolvimento do câncer. Estas observações ressaltam o papel de fatores genéticos que controlam a inflamação na suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer, e também o papel específico de células locais controlando a imunidade ao desenvolvimento do tumor.

Tabela 1 – Resistência/suscetibilidade a diversos tipos de câncer utilizando carcinógenos químicos diferentes em camundongos AIRmax e AIRmin

Órgão	Tratamento	AIRmax	AIRmin
Pele	DMBA + TPA	---	+++
	DMBA	---	+++
Pulmão	DMBA	---	+++
	DMH	---	+++
	Uretana	---	+++
Rim	Uretana	---	+++
Fígado	Uretana	+++	---
Cólon	DMH	+++	---

Legenda: +++ suscetibilidade; --- resistência.

1.5 O complexo enzimático inflamassoma

Receptores Toll-like (TLR) e NOD-like (NLR), são famílias de receptores de reconhecimento de padrões (PRR), que desempenham um papel central na defesa do hospedeiro pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Vários membros da família TLR foram identificados em mamíferos (13 TLR em camundongos e 11 em seres humanos). Estes TLRs são capazes de sentir estruturas moleculares que são distintas do padrão molecular do hospedeiro, mas são frequentemente encontradas em bactérias, fungos, vírus, protozoários, como por exemplo, lipopolissacarídeos (LPS). Vários genes inflamatórios são ativados através de TLR e NLR culminando no controle de agentes patogênicos, geração de resposta inflamatória, e indução da resposta imunitária adaptativa (KAWAI; AKIRA, 2006).

A interação inicial de microrganismos com células da imunidade inata, especialmente macrófagos e células dendríticas (DC), é essencial para a indução da resposta imune a patógenos invasores e sua detecção ocorre através dos PRRs. Entre muitas famílias de PRRs, TLRs e NLRs têm sido descritos como elementos centrais no desencadeamento de respostas imunes. TLRs são proteínas transmembranas que contêm domínio extracelular rico em leucina - responsáveis pelo reconhecimento do ligante - e uma porção citoplasmática TIR (Receptor Toll/interleucina 1) responsável por iniciar a sinalização intracelular (KAWAI; AKIRA, 2006).

Esse reconhecimento e sinalização induzem o recrutamento de moléculas adaptadoras, tais como fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), MyD88- *adaptor like* / proteína associada a TIR (MAL / Tirap), receptor Toll associado a ativador de interferon (TRIF) ou receptor Toll associado a molécula adaptadora (TRAM). Estas moléculas adaptadoras realizam a transdução de sinais e ativam quinases e fatores de transcrição, tais como o fator nuclear kappa B (NFκB), quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), e fatores reguladores de interferon (IRF), culminando com a produção de moléculas efetoras, citocinas inflamatórias, e interferons do tipo I, responsáveis pelos resultados das respostas imunes a PAMPs (FRANCHI et al., 2009).

Os NLRs têm localização citosólica e compreendem vários membros representativos das subfamílias NOD, como NLRP (Família NLR contendo domínio pirina, também chamado NALP), NLRC (família NLR contendo domínio CARD) e NAIP (fatores inibidores de apoptose neuronal). Os NLR contêm três domínios: (1) domínio efetor e variável N-terminal, como por exemplo, o domínio de recrutamento de caspase (CARD) e o domínio pirina (PYD), (2) um domínio NOD central e essencial para a sua ativação (*Nucleotide-binding Domain*) e (3) um domínio C-terminal contendo repetições ricas em leucina, que se presume ser responsável pelo reconhecimento de ligantes NLR (DAVIS et al., 2001; FRANCHI et al., 2009).

Alguns membros da família NLR formam inflamassomas, complexos oligoméricos multi proteicos compostos por um membro da família NLR e moléculas adaptadoras, tais como ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). A interação do domínio C-terminal com os seus agonistas desencadeia a indução da oligomerização do domínio central, trazendo a proximidade da porção efetora de NLR com moléculas adaptadoras. A formação dos inflamassomas leva ao recrutamento e ativação de cascatas de NFκB ou caspase-1 e, dependendo do tipo de NLR recrutado, resulta em secreção de IL-1β, IL-18, IL-33 e indução de piroptose dependente de caspase-1 (BORTOLUCI; MEDZHITOV, 2010; DINARELLO, 2009; FRANCHI et al., 2009; MARTINON; TSCHOPP, 2007).

Quatro membros da família NLR têm sido descritos como componentes de inflamassomas: NLRP1b (também chamado NALP1), NLRP3 (também conhecido como NALP3 ou criopirina), NLRC4 (ou IPAF), e NAIP5. Até a presente data, o complexo inflamassoma mais bem caracterizado é o NLRP3. A ativação deste NLR leva ao recrutamento dos componentes ASC e caspase-1. Sua formação ocorre através da interação entre o domínio PYD e ASC que, por sua vez, ativam pró-caspase-1 através da porção amino-terminal do domínio CARD (MARTINON; TSCHOPP, 2007; ZITVOGEL et al., 2012).

Dessa forma, o NLRP3 forma um complexo citoplasmático importante regulador da inflamação e necessário para ativação proteolítica da caspase-1 que é essencial para a clivagem da pró IL-1 β e pró IL-18 em seus produtos ativos. IL-1 β madura está relacionada a muitas reações imunes, incluindo o recrutamento de células inflamatórias para o sítio de infecção, enquanto IL-18 é importante para a produção de interferon gama (IFN γ) e ativação de células *Natural Killer* (NK) (FRANCHI et al., 2009; TSCHOP; SCHRODER, 2010).

A ativação do inflamassoma NLRP3 pode ocorrer por numerosos estímulos, quimicamente e estruturalmente diferentes, como PAMPS ou moléculas associadas a stress ou perigo, como cristais de ácido úrico, asbesto e sílica, dano a membrana, efluxo intracelular de potássio, intermediários reativos do oxigênio e ATP, o qual é liberado em locais de dano celular ou necrose. Quando ocorre essa liberação, há a ativação do P2X7 (receptor purinérgico da membrana celular), que desencadeia um rápido efluxo de potássio da célula, ativando o inflamassoma (DAVIS et al., 2011; HORNUNG et al., 2008; LIU, XIAO; LI, 2011; STAGG; SMYTH, 2010; TSCHOP; SCHRODER, 2010).

O mecanismo pelo qual o NLRP3 detecta essa diversidade de sinais é desconhecido, uma vez que eles não são estruturalmente relacionados. A ativação do NLRP3 *in vitro* geralmente requer dois sinais: um é fornecido por um ligante de TLR, como LPS, e o outro pelos muitos estímulos que provocam alteração de membrana plasmática ou integridade da membrana lisossomal, como o ATP (FRANCHI et al., 2009; LABASI et al., 2002).

Muitos trabalhos estudam a ativação do NLRP3 em doenças pulmonares e hepáticas, pois pulmão e fígado são tecidos ricos em macrófagos residentes: os macrófagos alveolares no pulmão e as células de Kupffer no fígado. Boaru et al. (2012) estudaram a expressão de diferentes inflamassomas em várias subpopulações celulares de hepatócitos e demonstraram que o NLRP3 tem alta expressão gênica nas células de Kupffer. Em pulmão, a indução química de processo inflamatório ativa NLRP3, com consequente aumento de produção de IL-1 β e IL-18 (HAMILTON JR et al., 2012).

No modelo AIR, há uma diferença entre as duas linhagens selecionadas na produção de IL-1 β pela estimulação do inflamassoma em ensaio *in vitro* de ativação de células sanguíneas com LPS seguido de ATP (Protocolo descrito por Labasi et al., 2002). Os AIRmax produzem níveis muito altos de IL-1 β , enquanto os AIRmin secretam muito pouco da citocina ou não são respondedores. Este fenótipo é associado geneticamente à resposta inflamatória induzida pelo Biogel (característica considerada para a seleção das linhagens), associação comprovada pelo teste positivo de co-segregação das duas características em população de segregantes F2, resultante do inter cruzamento de AIRmax com AIRmin e por associação

altamente significativa de ambas com marcadores de polimorfismo de DNA do tipo SNPs (*single nucleotide polymorphism*) no locus *Irm1* (*inflammatory response regulator 1*) descrito recentemente neste modelo (VORRARO et al., 2010).

1.6 Relevância do tema

A abordagem que envolve inflamação relacionada ao câncer para um ensaio terapêutico ou preventivo ainda não está cientificamente estabelecida, como afirmam os autores Balkwill e Mantovani (2001). O modelo de camundongos AIRmax e AIRmin tem sido empregado para estudos da interferência da imunidade inata na defesa natural contra infecções, doenças autoimunes e desenvolvimento de tumores. Como descrito acima, foram encontradas diferenças importantes entre as linhagens na suscetibilidade a várias doenças, em especial as relacionadas ao desenvolvimento de tumores quimicamente induzidos. Os camundongos AIRmax são muito resistentes e os AIRmin são muito suscetíveis a protocolos clássicos de indução química de tumores na pele e nos pulmões, fenótipos que são herdados conjuntamente aos do potencial de resposta inflamatória. Os resultados fornecem uma demonstração formal de que um grupo de *loci* gênicos controla a resposta inflamatória e a suscetibilidade/resistência a diversos tipos de cânceres. Estas duas linhagens constituem, portanto, modelo original que possibilita estabelecer uma relação entre a genética da resposta inflamatória e a suscetibilidade/resistência ao câncer, permitindo identificar os *loci* gênicos, ou QTL, que influenciam os dois fenótipos, bem como estudar a influência do microambiente inflamatório na progressão desta doença.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Estudar a influência dos fatores genéticos segregados nas linhagens AIRmax e AIRmin relacionados ao controle da inflamação, na resistência ou suscetibilidade a processos cancerígenos no pulmão e no fígado.

2.2 Objetivos específicos

- analisar comparativamente a suscetibilidade das linhagens ao desenvolvimento de tumores de fígado e de pulmão induzidos por carcinógenos químicos (DEN e Uretana);
- analisar a produção de citocinas inflamatórias nos órgãos alvo;
- analisar a ativação do complexo inflamassoma.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da Seleção AIR (geração F₅₅) obtidos por processo de seleção genética bidirecional, de acordo com a intensidade da resposta inflamatória aguda máxima (linhagem AIRmax) e mínima (linhagem AIRmin), induzida pela injeção subcutânea de partículas de poliacrilamida (Biogel P-100). Estes animais são produzidos e mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, e foram manipulados conforme as normas das boas práticas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan e do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Os grupos de animais foram formados constituindo um número equivalente de camundongos machos e fêmeas com idades variando entre 01 semana (recém-nascidos), 02 semanas (jovens) ou 06 a 08 semanas (adultos), com peso corpóreo variando entre 05 e 25 gramas, conforme o delineamento experimental estabelecido.

3.2 Indução de carcinogênese química

3.2.1 Etil Carbamato (Uretana)

Camundongos recém-nascidos receberam uma única dose de 300 mg/kg de Uretana (diluída em solução salina), administrada por via subcutânea (sc). Após 38 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados, em câmara de CO₂, e em seguida necropsiados para investigar o aparecimento de lesões tumorais nos vários órgãos, principalmente pulmão e fígado. Alguns órgãos dos grupos controle e tratado foram coletados e conservados em formalina para posterior análise histopatológica.

3.2.2 DiEtilNitrosamina (DEN)

- a) Avaliação da resposta aguda: Camundongos jovens (15 a 20 dias) foram tratados com uma única dose de DEN (25 mg/kg de peso, diluída em solução salina) administrada por via intraperitoneal (ip), para análise da resposta induzida pelo carcinógeno, após 2, 4, 8, 14 e 24 horas do tratamento. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂,

e em seguida foram necropsiados para coleta de tecidos e fluidos. Fígado e pulmão foram retirados e macerados em 1,5 ml de PBS 1x, submetidos a uma centrifugação e o sobrenadante foi retirado e guardado em freezer -80 °C para uma análise por ELISA. Um pequeno fragmento do fígado foi retirado para extração de RNA total para investigar a expressão de genes de proteínas secretadas no processo inflamatório local. Esse fragmento foi conservado em RNA Later (solução saturada de Sulfato de Amônia, tamponada com Citrato de Sódio e ácido Bórico, pH 5,2), para a conservação do RNA do tecido e utilizado para extração de RNA total para investigar a expressão de genes de proteínas secretadas no processo inflamatório local.

- b) Avaliação da resposta crônica: Camundongos jovens foram tratados com uma única dose de DEN (25 mg/kg de peso), administrada por via ip. Após 32 semanas do tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e em seguida necropsiados para observação de lesões tumorais presentes nos órgãos viscerais, e coleta de fluidos conforme descrito no tópico anterior. Fígado e pulmão foram retirados e conservados em RNA Later. Antes da retirada dos pulmões, estes órgãos foram inflados com aproximadamente 1500 µl de RNA Later para a melhor conservação do tecido pulmonar. Fígado e pulmão que apresentaram nódulos tiveram os mesmos medidos com a ajuda de um paquímetro para posterior cálculo de volume tumoral. Alguns deles foram coletados e conservados em formalina para posterior análise histopatológica.

3.3 Análise histológica

Fígado e Pulmão de camundongos foram retirados, cortados com ajuda de lâminas de bisturi e embebidos em formol (10%) tamponado com PBS. O material foi submetido à inclusão em parafina e cortado em micrótomo na espessura de 4 µm. A coloração foi realizada com hematoxilina e eosina. Os laudos foram emitidos pela patologista Dra. Aline Marques dos Santos, da Universidade de Brasília (UNB).

3.4 Avaliação da produção de citocinas inflamatórias por ELISA

A produção de citocinas inflamatórias em fígado e pulmão dos camundongos submetidos a indução de carcinogênese química foi avaliada utilizando o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Para tanto, utilizou-se kits específicos para as diferentes citocinas avaliadas (IL-6, TNF- α e IL-1 β) da BD Biosciences (BD Biosciences, New Jersey, USA). Em cada ensaio, foram consideradas as recomendações do fabricante, referente às concentrações dos anticorpos monoclonais recombinantes, utilizados como controle positivo, e dos anticorpos de captura e ligação, como também das proteínas e seus ligantes utilizados como sensibilizantes e reveladores da reação enzimática.

Placas de 96 poços da marca Nunc-maxysorp (Nunc-Maxysorp, Roskilde, Denmark), específicas para ELISA, foram marcadas com os correspondentes anticorpos de captura diluídos no respectivo tampão, de acordo com as recomendações do fabricante. As placas foram então incubadas *overnight* a 4 °C. Após este intervalo, os anticorpos excedentes foram removidos mediante sucessivas lavagens com PBS acrescido de 0,05% de *Tween* 20 (PBS-T). Em seguida as placas foram bloqueadas com PBS suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF), e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente (TA), com o intuito de minimizar as ligações inespecíficas.

As amostras de soro foram então aplicadas na relação 1:2 diluídas em PBS+SBF 10%. Como controle positivo, utilizamos diluição seriada na relação 1:2 do anticorpo monoclonal recombinante específico de cada citocina estudada, a partir da concentração inicial indicada pelo fabricante. Após duas horas de reação a TA e de sucessivas lavagens com PBS-T, o anticorpo de detecção foi aplicado. A reação foi incubada por 1 h a TA e então as placas foram novamente lavadas com PBS-T.

Para a sensibilização da interação enzimática utilizamos avidina conjugada a peroxidase. Este processo foi mantido durante 30 minutos a TA, protegido da luz. Para revelação da reação, as placas foram novamente lavadas com PBS-T adicionando-se em seguida a solução de Tetrametilbenzidina (TMB), utilizada como revelador. O processo de revelação foi interrompido com a aplicação da solução de ácido sulfúrico 2 N. A quantificação da reação foi realizada em leitor de ELISA automático sendo os valores expressos em absorbância, medida com o filtro de 450 nm. A medida em absorbância foi transformada em pg/ml, com base nos cálculos de regressão linear dos valores da curva padrão do anticorpo monoclonal específico dosado simultaneamente com as amostras experimentais.

3.5 Extração de mRNA de fígado

Para extração de RNA total foram utilizadas amostras dos órgãos congeladas em RNA Later. Utilizou-se o kit de extração RNA spin – Mini GE Healthcare (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). Aproximadamente 30 mg do tecido foram retirados e homogeneizados numa alíquota contendo Tampão RA1 (350 µl) e β-mercaptoetanol (3,5 µl), misturando imediatamente e realizando a quebra do tecido com material cirúrgico. As amostras foram centrifugadas por 3 minutos em velocidade de 11.000 g. O sobrenadante foi retirado e transferido para unidades de minifiltros RNAspin, que purificam as amostras e reduzem a viscosidade, sendo centrifugados por 1 minuto a 11.000 g. Logo depois, a coluna foi descartada e o filtrado transferido para um novo microtubo coletor de 1,5 ml. Para ajustar as condições de ligação ao RNA, foi adicionado 350 µl de etanol (70%) nas amostras, passando no vórtex por 2 a 5 segundos.

Para a ligação do RNA, utilizou-se nova coluna RNA spin que foi colocada em tubo coletor de microcentrífuga de 2 ml. As amostras foram homogeneizadas, passadas pela coluna e centrifugadas por um minuto a 8.000 g. As colunas foram retiradas e transferidas para um novo tubo coletor. Para a dessalinização da membrana de sílica utilizou-se 350 µl de MDB (*Membrane Desalting Buffer*) e centrifugou-se a 11.000 g por 1 minuto para secar a membrana. A coluna foi retirada e o sobrenadante descartado para retornar a coluna para o tubo coletor, onde foi realizada a digestão do DNA com *Dnase I reconstituted*, incubando em temperatura ambiente por 15 minutos. Logo após, foram realizadas múltiplas lavagens da coluna com solução tampão e por último a eluição do RNA com H₂O (*RNase free*).

A integridade do RNA total assim como a confirmação da concentração medida previamente no aparelho nanodrop (GE Healthcare), foram constatadas após eletroforese em gel de agarose preparado a 1% em tampão TBE 1X (pH = 8) contendo 0,01% de bromofenol. A corrida eletroforética ocorreu a 60 V por 1 h para a visualização das bandas de RNA.

3.6 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para avaliar a expressão de mRNA o cDNA foi transcrito a partir do RNA total extraído conforme metodologia descrita na seção 3.5 utilizando o Kit *Superscript III* da Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). A síntese do cDNA foi feita através de uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado: 10 µl de RNA total a 100 ng/µl (contendo 1 µg do RNA), 1 µL de oligo dT (50 µl), 1 µl de dNTP (10 µl) e 2 µl de água

livre de RNase. Essa mistura foi homogeneizada e aquecida por 5 min a 65 °C. Após isso, as amostras foram resfriadas a 4 °C por 1 minuto.

Em seguida, foram adicionados os reagentes nas concentrações iniciais de 1 µl da enzima *Superscript III - Reverse Transcriptase*, 4 µl de tampão 5x concentrado (específico para a enzima – 250 mM Tris-HCL pH 8,3, 375 mM KCL e 15 mM MgCl₂) e 1 µL de dTT (100 µM), todos os produtos pertencentes ao kit da Invitrogen. Acrescentou-se 6 µl dessa solução a cada amostra. A mistura foi submetida à temperatura de 50 °C por 50 min e, para inativar a reação, 70 °C por 15 min. As reações foram incubadas em aparelho termociclador MJ Research.

3.7 Sequência de primers utilizados nos ensaios de Reação da Polimerase em Cadeia em tempo real (qPCR)

Para a amplificação dos cDNAs dos genes *Il6*, *tnf*, e *Il1b* utilizou-se sequências sintéticas (*primers*) listadas na Tabela 2. Estes *primers* foram desenhados para *éxons* que flanqueiam *íntrons* de grande tamanho (~1000 pb) evitando assim a amplificação de possível DNA genômico contaminante presente nas amostras. Como controle positivo da expressão dessas moléculas, determinou-se paralelamente em todas as amostras a expressão gênica da *ppia* (ciclofilina), que é constitutivamente expressa por células de mamíferos.

Tabela 2 - Sequência de *primers* utilizados na síntese de mRNA

<i>Primer</i>	<i>Sense</i>	<i>Anti-sense</i>	<i>pb</i>
<i>il1b</i>	TTGACGGACCCCAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCCTCA	205
<i>il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TGTATCCCAGGTAGCTATGG	209
<i>tnf</i>	TCTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC	213
<i>ppia</i>	AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT	AAATGCCCCGCAAGTCAAAAG	91

Legenda: pb - pares de bases

3.8 Quantificação da expressão dos genes de citocinas em células de fígado e pulmão de camundongos por qPCR

A cada amostra de cDNA (2 µl) foi adicionada uma mistura contendo 1 µL de cada *primer* (*reverse* e *forward*) a 5 mM, 12,5 µl de *Platinum SYBR Green* qPCR Supermix-UDG (Invitrogen), e 8,5 µL de água para se completar o volume final de 25 µl de reação.

As reações foram incubadas em aparelho Chromo 4 (MJ *research*) e submetidas às seguintes condições: fase inicial de incubação por 2 min a 50 °C, ativação da enzima (*hot start*) por 5 min a 95 °C, amplificação por 40 ciclos através de etapas sucessivas de desnaturação (20 segundos a 90 °C) e anelamento (35 segundos a 60 °C). A aquisição da fluorescência incorporada a sequência de dupla fita amplificada em cada ciclo é realizada na etapa final pelo aparelho Chromo 4. A cada amostra foi atribuído um valor de Ct (*cycle threshold*) referente ao número de ciclos necessários para que a fluorescência incorporada às duplas fitas amplificadas comece a se elevar acima da fluorescência de fundo, ou seja, no início da fase log de amplificação. Essa fase depende diretamente da quantidade de cópias das sequências alvo, que ocorrem inicialmente em cada amostra.

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido à dissociação (*melting*), elevando-se a temperatura de 55 °C a 90 °C e a fluorescência foi adquirida a cada 1 °C, registrando-se a temperatura de dissociação da dupla fita do material amplificado, o que indica o tamanho e a especificidade do produto amplificado em cada região. Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa *Opticon Monitor Analysis Software 2.03*.

O nível de expressão gênica de cada citocina em cada amostra foi expresso através dos valores do Ct. Para quantificar os resultados obtidos utilizamos o método *threshold* comparativo, descrito em Liviak et al. (2001), em que fórmulas aritméticas são usadas para calcular níveis de expressão relativos com um calibrador, que pode ser uma amostra controle ou não tratada. A quantidade do gene alvo, normalizado para um endógeno (gene constitutivo) e relativa à amostra calibradora é dada pela fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ em que } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{amostra}) - \Delta Ct (\text{calibrador})$$

O delta Ct é o Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene constitutivo. Assim, a equação representa a expressão normalizada em relação à amostra calibradora. Em nossos experimentos utilizamos como amostra calibradora o delta Ct do controle não tratado de cada linhagem a ser analisada.

3.9 Análise da resposta do inflamassoma

Animais adultos AIRmax e AIRmin foram sangrados por punção retrorbitária com a ajuda de pipetas heparinizadas. O sangue heparinizado (250 µl) foi colocado em tubos eppendorf com capacidade para 1,5 ml onde se acrescentou LPS (concentração final 2 µg/ml) e 200 µL de meio (RPMI + gentamicina). O material foi incubado por 03 horas a 37 °C em ambiente com CO₂ a 5%. Após esse período, foram acrescentados 10 mM de ATP e incubados por mais 2 horas nas mesmas condições descritas. O material foi centrifugado e o sobrenadante retirado para dosagem de citocinas por ELISA conforme descrito na seção 3.4.

3.10 Extração de mRNA de sangue

Para extração de RNA total foram utilizadas amostras de sangue de animais tratados ou não com LPS e ATP. Utilizou-se o kit RNA/ DNA/ *protein purification* da Norgen (Norgen Biotek Corporation, Thorold, Ontario, Canada). As etapas seguintes foram realizadas conforme orientação do fabricante: A suspensão foi transferida para um tubo falcon com 700 µl de solução de lise, homogeneizando bem em vortex. O material foi centrifugado (1 minuto a 14.000 rpm) e o sobrenadante utilizado para os próximos passos. 400 µl de álcool absoluto foram adicionados e homogeneizados bem em vortex por 10 segundos. Nesta fase o material foi retirado e transferido para colunas em duas etapas: Inicialmente 600 µl e após centrifugação a 14.000 rpm por 4 minutos, repetindo-se o procedimento com o restante. Nesta fase, a coluna esteve sempre em observação e, caso algum material não passasse completamente, mais uma centrifugação foi realizada até a coluna ficar “seca”. Logo após, foram realizadas múltiplas lavagens da coluna com solução tampão e por último a eluição do RNA com H₂O (RNase *free*). O RNA extraído teve sua integridade e qualidade medidos em plataforma *Bio Analyser*, de acordo com a instrução do fabricante (Bio Analyser, Waldbronn, Germany) e apenas materiais com RIN (RNA *integrity number*) acima de 7 foram utilizados.

3.11 Síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA de sangue

Para avaliar a expressão de mRNA o cDNA foi transcrito a partir do RNA total extraído conforme metodologia descrita na seção 3.10 utilizando o Kit RT² *First Strand* da QIAGEN (Qiagen, Germantown, USA). A síntese do cDNA foi feita através de uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado: Numa primeira fase, 8 µl de RNA total a 62,5 ng/µl (contendo 0,5 µg do RNA por tubo) foi adicionado a 2 µL de *Buffer* GE. Essa mistura foi homogeneizada e aquecida por 5 min a 42 °C. Após isso, as amostras foram resfriadas a 4 °C por 1 minuto.

Em seguida, foram adicionados os reagentes nas conforme indicação do fabricante: 4 µl do *Buffer* C3, 1 µl do *Control* P2, 3 µL de água RNase free e 2 µL de RE3 (RT *enzyme mix* 3), todos os produtos pertencentes ao kit. Acrescentou-se 8 µl dessa solução a cada amostra, homogeneizando bem. A mistura foi submetida à temperatura de 42 °C por 15 minutos e, para inativar a reação, 95 °C por 5 minutos. As reações foram incubadas em aparelho MJ *Research*.

3.12 Quantificação da expressão dos genes do inflamassoma em células de sangue de camundongos por *array* de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR *array*)

Para avaliar a expressão gênica de proteínas relacionadas ao inflamassoma, utilizou-se placa de PCR *array* da marca SABiosciences da QIAGEN (RT² Profiler^{TM} PCR Array Mouse Inflammasome PAMM-097A). Esta placa permite a análise de 84 genes envolvidos nas funções do inflamassoma por amostra. A placa é constituída por 96 poços marcados por primers específicos, sendo 84 genes alvo, 5 genes constitutivos (*housekeeping*s ou HK), 1 controle negativo (*genomic DNA control* ou GDC), 3 controles da transcrição reversa (*reverse transcriptase control* ou RTC) e 3 controles positivos de PCR (*Positive PCR control* ou PPC) (Figura 1). O modelo da placa utilizada contendo os genes avaliados está ilustrado na Figura 2.

Figura 1 - Representação esquemática da placa de 96 poços utilizada para realização do PCR array

Fonte: Adaptado de SABiosciences (2012).

Figura 2 - Modelo da placa utilizada na reação de PCR array

Aim2	Bcl2	Bcl2l1	Birc2	Birc3	Card6	Casp1	Casp12	Casp8	Ccl12	Ccl5	Ccl7
A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
Cd40lg	Cflar	Chuk	Ciita	Ctcb	Cxcl1	Cxcl3	Fadd	Hsp90aa1	Hsp90ab1	Hsp90b1	Ihhb1
B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
Ifng	Ikbkb	Ikbkg	Il12a	Il12b	Il18	Il1b	Il33	Il6	Irak1	Irf1	Irf2
C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
Irf5	Map3k7	Tab1	Tab2	Mapk1	Mapk11	Mapk12	Mapk13	Mapk3	Mapk8	Mapk9	Meiv
D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
Myd88	Naip1	Naip5	Nfkb1	Nfkb2	Nfkb3	Nlr4	Nlr5	Nlrp12	Nlrp1a	Nlrp3	Nlrp4b
E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
Nlrp4e	Nlrp5	Nlrp6	Nlrp9b	Nlrp1	Nod2	P2rx7	Panx1	Pea15a	Pstpip1	Ptgs2	Pycard
F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
Stk30	Rela	Ripk2	Sugt1	Tirap	Tnf	Tnfr1	Tnfr4	Tnfr8	Tra6	Txnip	Xiap
G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
Gusb	Hprt	Hsp90ab1	Gapdh	Actb	MGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC
H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

Fonte: SABiosciences (2013).

O cDNA oriundo de RNA extraído do sangue de cada animal e de boa qualidade foi utilizado para a confecção do mix a ser aplicado em cada poço da placa de 96 poços. Esse cDNA (20 µl) foi reconstituído em 91 µl de água RNase free. O mix foi preparado de acordo com a orientação do fabricante da seguinte forma: 1248 µl de água RNase free, 102 µl de cDNA e 1350 µl da enzima. O mix foi bastante homogeneizado e distribuído cuidadosamente

nos poços, na quantidade de 25 µl, com a ajuda de uma pipeta multicanal. A placa foi centrifugada a 1200 rpm por 30 segundos para afastar a possibilidade de bolhas.

Logo em seguida, essa placa foi colocada em aparelho Chromo 4 (MJ *research*) e submetida às seguintes condições: 10 min a 95 °C, 15 s a 95 °C, 35 s a 55 °C e 30 s a 72 °C (de acordo com as orientações do fabricante e totalizando um tempo de reação de 2 horas e 57 minutos). A aquisição da fluorescência incorporada a sequencia de dupla fita amplificada em cada ciclo é realizada na etapa final pelo aparelho Chromo 4. A cada amostra foi atribuído um valor de Ct (*cycle threshold*) referente ao número de ciclos necessários para que a fluorescência incorporada às duplas fitas amplificadas comece a se elevar acima da fluorescência de fundo, ou seja, no início da fase log de amplificação. Essa fase depende diretamente da quantidade de cópias das sequências alvo, que ocorrem inicialmente em cada amostra.

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido à dissociação (*melting*), elevando-se a temperatura de 55 °C a 90 °C e a fluorescência foi adquirida a cada 1 °C, registrando-se a temperatura de dissociação da dupla fita do material amplificado, o que indica o tamanho e a especificidade do produto amplificado em cada região. O nível de expressão gênica de cada citocina em cada amostra foi expresso através dos valores do Ct. Para quantificar os resultados obtidos utilizamos o método disponível no site do fabricante (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). O fabricante utiliza, para cálculos de diferença de expressão, a mesma fórmula descrita na seção 3.11 e a amostra calibradora utilizada foi o animal não tratado para cada linhagem avaliada.

3.13 Análise estatística

As diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de t de Student ou análise de variâncias (ANOVA); diferenças entre proporções de animais acometidos de tumores ou não foram analisadas por teste exato de Fisher; diferenças entre valores dos parâmetros de crescimento tumoral foram analisadas por teste não paramétrico de Mann-Whitney. Foi estabelecido como nível mínimo de significância valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento de tumores induzidos por carcinógenos químicos em animais AIRmax e AIRmin

4.1.1 Tratamento com Uretana induz tumores hepáticos e pulmonares

Camundongos AIRmax e AIRmin de 7 dias de idade receberam uma dose subcutânea (sc) de 300 mg/kg de Uretana (diluída em solução salina) e foram avaliados após 8, 16, e 38 semanas para pesquisa de lesões em vários órgãos internos. Após 16 semanas observou-se que somente 01 de 17 camundongos AIRmax macho possuía lesão hepática visível (Tabela 3). O tumor de fígado observado às 16 semanas era de aspecto amarelado, arredondado e bem definido, medindo 1 mm de diâmetro e único. Apenas após 38 semanas visualizou-se lesões hepáticas grandes e em maior quantidade acometendo somente a linhagem AIRmax, principalmente os machos (Figura 3). Da mesma forma, as alterações pulmonares só se tornaram múltiplas e grandes após 38 semanas, porém acometeram preferencialmente a linhagem AIRmin (Figura 4), sem distinção de sexo (Tabela 3). Na análise histopatológica as lesões foram caracterizadas como hepatocarcinomas e adenocarcinomas pulmonares primários (detalhes nas legendas das Figuras 5 e 6).

Figura 3 - Aspectos macroscópicos de fígado de camundongos AIRmax após tratamento com Uretana

Legenda: Fígado de camundongos, 38 semanas após tratamento com Uretana (300 mg/kg sc aos 7 dias de idade). (A) AIRmax macho com múltiplos nódulos amarelados de contornos irregulares e AIRmax fêmea (B) com apenas um nódulo <1 mm de diâmetro.

Figura 4 - Aspectos macroscópicos de pulmão de camundongos AIRmin após tratamento com Uretana

Legenda: Pulmão de camundongos AIRmin 38 semanas após tratamento com Uretana (300 mg/kg sc aos 7 dias de idade). As imagens ilustram visão pulmonar anterior (A) e posterior (B). Observar os nódulos pulmonares amarelados, geralmente múltiplos (seta).

Tabela 3 - Incidência de tumores hepáticos e pulmonares em camundongos AIRmax e AIRmin após injeção de Uretana

Camundongos		Incidência de tumor em fígado		Incidência de tumor em pulmão	
		16 sem	38 sem	16 sem	38 sem
AIRmax	Machos	1/17 (5.9%)	11/11 (100%)	1/17 (5.9%)	3/11 (27.3%)
	Fêmeas	0/17 (0%)	3/11 [#] (27.3%)	2/17 (11.8%)	3/11 (27.3%)
	Total	1/34 (2.9%)	14/22 (63.6%)	3/35 (8.6%)	6/22 (27.3%)
AIRmin	Machos	0/16 (0%)	0/9* (0%)	12/16* (75%)	9/9* (100%)
	Fêmeas	0/17 (0%)	0/10* (0%)	13/17* (76.5%)	10/10* (100%)
	Total	0/33 (0%)	0/19* (0%)	25/33* (75.8%)	19/19* (100%)

Legenda: * $p < 0,05$ AIRmax vs AIRmin; # $p < 0,05$ macho vs fêmea da mesma linhagem. Teste exato de Fischer.

Figura 5 - Aspectos microscópicos de pulmão de AIRmax e AIRmin após tratamento com Uretana.

Legenda: Cortes histológicos de pulmão de camundongos AIRmax e AIRmin após 38 semanas do tratamento com Uretana. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). **A.** AIRmin macho, aumento 25 x. Nota-se adenocarcinoma (seta) invadindo todo o parênquima pulmonar e causando necrose adjacente (•). Observa-se lesão de aspecto glandular, característica do adenocarcinoma (seta) **B.** AIRmax fêmea, aumento 25 e 200 x. Nota-se tumor menor, bem delimitado em área de parênquima normal e lesão de aspecto glandular característica de adenocarcinoma (seta). Observa-se também infiltrado inflamatório mononuclear peritumoral (#).

Figura 6 - Aspectos microscópicos de fígado de camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com Uretana.

Legenda: Cortes histológicos de fígado de camundongos AIRmax e AIRmin 38 semanas após tratamento com Uretana. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) **A.** Fígado de AIRmin macho com arquitetura lobular preservada, aumento 25 x. **B.** Hepatocarcinoma de alto grau em AIRmax macho, aumento 100 e 400 x. Notar completa alteração do parênquima hepático, com aumento da vascularização. Nota-se acentuado pleiomorfismo celular, esteatose hepática (seta preta) e discreto infiltrado inflamatório (seta vermelha).

4.1.2 Tratamento com DEN induz tumores hepáticos e pulmonares

Camundongos AIRmax e AIRmin de 15 dias de idade receberam uma dose intraperitoneal (ip) de 25 mg/kg de DEN (diluído em solução salina) e foram avaliados após 8, 16 e 32 semanas para pesquisa de lesões em órgãos internos. Após 16 semanas, nenhum animal possuía nódulos visíveis em fígado, porém alguns animais possuíam pequenos nódulos pulmonares e em maior frequência nos camundongos AIRmin que nos AIRmax (Tabela 4).

Após 32 semanas de tratamento, observaram-se inúmeros tumores hepáticos e pulmonares, conforme apresentado na Tabela 4. Os nódulos pulmonares apresentavam características semelhantes em todos os animais acometidos, sendo elas: pequeno tamanho (1 a 3 mm), bem delimitados, circulares e de coloração amarelada (Figura 7). Já os nódulos

hepáticos possuíam características bem diferentes (Figura 8): em animais AIRmin machos e AIRmax fêmeas, esses nódulos eram arredondados, bem delimitados e de coloração amarelada enquanto os AIRmax machos apresentaram maior incidência, maior volume e multiplicidade tumoral hepática, com tumores mal delimitados e invasivos (Figura 9 e Tabela 5). Nas figuras 10 e 11 notam-se as características microscópicas dos nódulos hepáticos e pulmonares. Camundongos AIRmin fêmeas não foram acometidos por câncer de fígado.

Tabela 4 - Incidência de tumores hepáticos e pulmonares em camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN

Camundongos		Incidência de tumor em fígado	Incidência de tumor em pulmão	
		32sem	16sem	32sem
AIRmax	Machos	14/16 (87.5%)	3/20 (15%)	7/16 (43.7%)
	Fêmeas	5/16 [#] (31.2%)	0/16 (0%)	3/16 (18.7%)
	Total	19/32 (59.4%)	3/36 (8,3%)	10/32 (31.2%)
AIRmin	Machos	6/15 (40%)	6/20 (30%)	11/15 (73.3%)
	Fêmeas	0/16 [#] (0%)	4/18 (22,2%)	13/16 (81.2%)
	Total	6/31* (19.4%)	10/38 (26,3%)	24/31* (77.4%)

Legenda: *p < 0,05 AIRmax vs AIRmin; # p<0,05 machos vs fêmeas da mesma linhagem. Teste exato de Fischer.

Tabela 5 - Multiplicidade e volume de tumores hepáticos e pulmonares em AIRmax e AIRmin 32 semanas após tratamento com DEN

Órgão	Camundongo		Multiplicidade	Volume total (dp)	Volume médio (dp)
Fígado	AIRmax	Macho	13,88	316,85 (670,49)	18,65 (38,26)
		Fêmea	0,75	0,85 (1,86)	0,35 (0,8)
		Total	7,31	158,85 (493,25)	9,5 (28,2)
	AIRmin	Macho	0,73	2,12 (4,45)	1,58 (4,17)
		Fêmea	0,00	0,00	0,00
		Total	0,35	1,02 (3,23)*	0,77 (2,96)*
Pulmão	AIRmax	Macho	1,19	2,34 (3,57)	1,11 (1,61)
		Fêmea	0,38	0,16 (0,41)	0,07 (0,18)
		Total	0,78	1,25 (2,73)	0,59 (1,24)
	AIRmin	Macho	2,00	2,79 (3,09)	1,11 (1,11)
		Fêmea	1,69	3,28 (3,06)	1,66 (1,41)
		Total	1,84	3,04 (3,04)*	1,39 (1,28)*

Legenda: dp – desvio padrão; * $p < 0,05$ AIRmax vs AIRmin. Teste t de Student.

Figura 7 - Aspectos macroscópicos de pulmão de camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN

Legenda: Pulmão de camundongos AIRmax e AIRmin 32 semanas após tratamento com DEN (25 mg/kg em animais de 15 dias de idade). Esse padrão tumoral foi semelhante em todas as linhagens, com maior incidência em AIRmin.

Figura 8 - Aspectos macroscópicos de fígado de camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN

Legenda: Fígado de camundongos AIRmax e AIRmin 32 semanas após tratamento com DEN (25 mg/kg em animais de 15 dias de idade).

Figura 9 - Aspectos macroscópicos de fígado de camundongos AIRmax machos após tratamento com DEN

Legenda: A figura representa fígado de camundongos AIRmax machos 32 semanas após tratamento com DEN (25 mg/kg em animais de 15 dias de idade).

Figura 10 - Aspectos microscópicos de fígado de camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN

Legenda: Corte histológico de fígado de animais 32 semanas após tratamento com DEN. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) **A.** AIRmin macho, fígado com HCC de alto grau. Notar arquitetura lobular alterada à custa de nódulos neoplásicos. Esses nódulos são constituídos por células similares aos hepatócitos, formando cordões e formando pseudo ácinos. Observa-se aumento da vascularização permeando células tumorais (setas vermelhas). Não há processo inflamatório ou fibrose peritumoral, aumento 200 x. **B.** Hepatocarcinoma em AIRmax fêmea. Fígado apresentando arquitetura lobular alterada à custa de nódulos neoplásicos. Observa-se aumento da vascularização permeando células tumorais. Não há processo inflamatório ou fibrose peritumoral. Observar nódulo central indicado pela seta em aumento 25 x. Em aumento maior, 200 x, observa-se células tumorais similares aos hepatócitos, formando cordões e se distribuindo em macrotrabéculas (seta preta). **C.** AIRmax macho, aumento 25 x. Proliferação neoplásica maligna constituída por hepatócitos atípicos dispostos em macrotrabéculas (seta preta), formando arranjo pseudoacinar. Nota-se ainda área de extensa necrose tumoral (*). Em aumento maior, 200 x, observa-se melhor as macrotrabéculas.

Figura 11 - Aspectos microscópicos de pulmão de camundongos AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN

Legenda: Corte histológico de pulmão de animais 32 semanas após tratamento com DEN. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). **A.** AIRmin macho, aumento 25 e 200 x. Nota-se adenocarcinoma bem delimitado em área de parênquima normal (*). Observa-se, em maior aumento, lesão de aspecto glandular, característica do adenocarcinoma (seta preta) **B.** AIRmax fêmea, aumento 25 e 200x. Proliferação neoplásica maligna com aspecto glandular, caracterizando adenocarcinoma pulmonar (seta) diferenciando-se do tecido pulmonar normal (*).

4.2 Tratamento com DEN induz produção de citocinas pró-inflamatórias

Para a avaliação do estímulo causado pelo DEN no fígado, o estudo da expressão quantitativa de genes de citocinas foi realizado por técnica de qPCR. O RNA total foi extraído de células do fígado estimuladas ou não com 25 mg/kg do carcinógeno em animais de 15 dias de vida. Foi realizados pools do material genético correspondendo a amostras de 3 machos e 3 fêmeas AIRmax, e 3 machos e 3 fêmeas AIRmin, não tratados (controles) e estimulados com a mesma dose de DEN e eutanasiados após 2, 4, 8, 14 e 24 h da injeção. Na figura 12, observa-se a análise da expressão gênica de TNF- α , IL-6 e IL-1 β em relação ao gene constitutivo e à amostra calibradora (controles não tratados).

Animais de 15 dias tratados com DEN numa dose de 25 mg/kg, 32 semanas pós-tratamento também tiveram o fígado retirado para análise da expressão dessas citocinas, porém não houve expressão gênica relativa (dados não mostrados).

Figura 12- Comparativo da análise da expressão de mRNA de citocinas inflamatórias em fígado de AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN

Legenda: Figura representa comparativo da análise da expressão de mRNA para IL-6, IL-1β e TNF-α em pool de RNA extraído de células do fígado de camundongos AIRmax e AIRmin para cada horário. Os animais receberam injeção ip de 25 mg/kg de DEN diluído em salina e após 2, 4, 8, 14 e 24 h foram eutanasiados.

O tratamento com DEN induziu a expressão de IL-6 e TNF-α no fígado que aumentou progressivamente com o tempo, com índices maiores nos animais suscetíveis AIRmax. Aparentemente não houve modulação da expressão de IL-1β.

Em vista destes resultados de expressão gênica, decidiu-se então avaliar a produção local dessas proteínas. Para isso, realizamos a dosagem através do método de ELISA em sobrenadante do macerado do fígado desses animais. Os resultados estão expostos na Figura 13. A dosagem dessas proteínas foi realizada também no sobrenadante do macerado do pulmão (Figura 14).

Coincidindo com os resultados de expressão gênica, esses animais tiveram produção de IL-6 e TNF-α no fígado. Apesar da ausência de estimulação da expressão gênica de IL-1β em fígado, houve estímulo da produção da citocina pelo carcinógeno, com aumento significativo a partir das 8 horas após o tratamento e em maiores concentrações nos animais suscetíveis AIRmax.

Figura 13 - Produção de citocinas inflamatórias em sobrenadante de macerado de fígado de AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN

Legenda: Produção de IL-6, IL-1β e TNF-α em sobrenadante de macerado de fígado de camundongos AIRmax e AIRmin (3 machos e 3 fêmeas). Os animais receberam injeção ip de 25 mg/kg de DEN diluído em salina e após 2, 4, 8, 14 e 24 h foram eutanasiados. A curva da concentração do recombinante foi estabelecida por regressão linear dos mínimos quadrados dos valores de DO obtidos. A sensibilidade dos ensaios foi de: 62,5 pg/ml para IL-6, 156,25 pg/ml para IL-1β e 31,25 pg/ml para TNF-α. Legenda: *p<0,05 tratado vs controle; ** p<0,05 AIRmax vs AIRmin; # p<0,05 macho vs fêmea da mesma linhagem; teste t de Student.

Na análise de sobrenadante de pulmões dos mesmos animais, constatou-se a partir das 2 h de tratamento a presença de IL-6, das 14 h de TNF-α e das 4 h da IL-1β, com declínio às 24 h. Neste órgão não houve diferenças consistentes dos níveis destas citocinas entre as duas linhagens.

Figura 14 - Produção de citocinas inflamatórias em sobrenadante de macerado de pulmão de AIRmax e AIRmin após tratamento com DEN

Legenda: Produção de IL-6, IL-1β e TNF-α em sobrenadante de macerado de pulmão de camundongos AIRmax e AIRmin (3 machos e 3 fêmeas). Os animais receberam injeção ip de 25 mg/kg de DEN diluído em salina e após 2, 4, 8, 14 e 24 h foram eutanasiados. A curva da concentração do recombinante foi estabelecida por regressão linear dos mínimos quadrados dos valores de DO obtidos. A sensibilidade dos ensaios foi de: 62,5 pg/ml para IL-6, 156,25 pg/ml para IL-1β e 31,25 pg/ml para TNF-α. Legenda: *p<0,05 tratado vs controle; **p<0,05 AIRmax vs AIRmin; #p<0,05 macho vs fêmea da mesma linhagem; teste t de Student

4.3 Camundongos AIRmax e AIRmin respondem de maneira diferente ao protocolo de ativação do inflamassoma NLRP3

Amostras de 250 µL de sangue de animais AIRmax e AIRmin foram incubadas por 03 horas com LPS (concentração final 2 µg/ml) e acrescentados 10 mM de ATP por mais 02 horas. O material foi centrifugado e o sobrenadante retirado para dosagem de IL-1β por ELISA. Na Figura 15 estão apresentados os níveis das dosagens desta citocina encontrados no plasma de camundongos tratados ou não com carcinógeno.

Figura 15 - Produção de IL-1 β em plasma de AIRmax e AIRmin submetidos ao protocolo LPS e ATP e em tempos após tratamento com DEN

Legenda: Produção de IL-1 β por camundongos AIRmax e AIRmin (8 de cada para o grupo controle e 15 de cada para o grupo tratado com DEN; 8, 16 e 32 semanas após injeção). Os animais foram sangrados e o material submetido a protocolo com LPS e ATP. A dosagem da citocina foi feita no plasma. Diferenças estatisticamente significantes entre linhagens AIRmax e AIRmin (* $p < 0,05$ utilizando teste t de Student). A curva da concentração do recombinante foi estabelecida por regressão linear dos mínimos quadrados dos valores de DO obtidos. A sensibilidade dos ensaios foi de 312,5 pg/ml.

4.4 Camundongos AIRmax e AIRmin possuem expressão gênica diferente de proteínas relacionadas à cascata de ativação do inflamassoma

Animais sem tratamento com carcinógeno tiveram seu sangue retirado e submetido ao mesmo protocolo de LPS e ATP descrito na seção anterior. Após isso, o material foi submetido a tratamento para extração de RNA de sangue. RNA íntegro e de boa qualidade foi utilizado para produção de cDNA para que o PCR *array* fosse realizado. Dessa forma, 84 genes puderam ser avaliados simultaneamente. Utilizou-se um “n” de 3 amostras de sangue de animais por grupo, sendo 3 AIRmax e 3 AIRmin tratados com LPS e ATP e 3 não tratados (controles) de cada linhagem. Foram feitas comparações intra e interlinhagens entre grupos tratados e controle. Nesta análise, a média geométrica dos Ct dos 5 genes constitutivos presentes no *array* foi usada para normalização do ensaio. Em todas as amostras, observou-se variação dos níveis de expressão gênica, sendo que, aproximadamente 20 a 25 dos 84 genes alvo avaliados não foram detectados (limite de detecção considerado foi para Ct > 35).

Para a maioria dos genes a expressão relativa não variou entre os grupos. Os resultados de genes onde foi encontrada diferença significativa em alguma comparação estão

expostos nas Tabelas 6 e 7. Embora não apresentando diferença de expressão entre os grupos, incluiu-se na Tabela 6 alguns genes que são relacionados à cascata de ativação do inflamassoma NLRP3, que é o objeto deste estudo.

Na comparação entre células controle, observa-se maior expressão relativa de *nfkbia* em AIRmax e de *mapk3* e de *nlrp6* em AIRmin. Nas preparações de células tratadas com LPS e ATP, houve maior expressão de *mapk12* e de *tirap* em AIRmax e de *mapk9* em AIRmin (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparativo da análise de expressão de mRNA de genes do complexo inflamassoma em placa de PCR array de células sanguíneas de animais AIRmax e AIRmin controles e tratadas com LPS e ATP

Gene	AIRmax vs AIRmin controles		AIRmax vs AIRmin tratadas	
	Expressão relativa*	p**	Expressão relativa *	p**
<i>caspl</i>	-1,70	0,29	1,75	0,26
<i>cxcl1</i>	4,58	0,13	1,73	0,34
<i>il18</i>	1,35	0,35	1,15	0,79
<i>il1b</i>	1,41	0,08	2,39	0,10
<i>il6</i>	-2,02	0,37	-2,39	0,15
<i>mapk12</i>	-2,46	0,39	2,87	0,02
<i>mapk3</i>	-2,77	0,02	-1,26	0,29
<i>mapk9</i>	-1,74	0,77	-2,17	0,04
<i>myd88</i>	2,09	0,17	-1,07	0,55
<i>nfkbia</i>	1,78	0,02	1,03	0,74
<i>nlrp3</i>	2,43	0,26	2,24	0,21
<i>nlrp6</i>	-3,96	0,02	-2,38	0,21
<i>p2rx7</i>	1,27	0,76	1,91	0,46
<i>ptgs2</i>	1,72	0,35	2,35	0,25
<i>pycard</i>	1,13	0,74	-1,01	0,77
<i>sugt1</i>	-1,22	0,65	1,99	0,28
<i>tirap</i>	1,01	0,81	3,56	0,00005
<i>tnf</i>	1,73	0,27	-1,53	0,50

Legenda: * A expressão relativa é a expressão gênica normalizada do grupo tratado dividido pelo controle. ** p < 0,05 utilizando teste t de Student. Análise realizada de acordo com as orientações do fabricante.

Na comparação das preparações de células ativadas em relação aos respectivos controles, observou-se modulação significativa apenas em AIRmin, com aumento de expressão de *cxcl1*, *nfkbia*, *ptgs2* e *tnf* e diminuição de *mapk3* e de *sugt1*. Alterações no

mesmo sentido ocorreram nas preparações dos AIRmax, mas sem significância, devido a variações entre as amostras (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparativo da análise de expressão de mRNA de genes do complexo inflamassoma em placa de PCR *array* de células sanguíneas de animais AIRmax e AIRmin tratadas com LPS e ATP em comparação com seus respectivos controles

Gene	AIRmax tratadas vs controle		AIRmin tratadas vs controle	
	<i>Expressão relativa*</i>	p**	<i>Expressão relativa*</i>	p
<i>cxcl1</i>	4,10	0,24	10,85	0,01
<i>mapk3</i>	-1,17	0,39	-2,57	0,027
<i>nfkbia</i>	1,95	0,09	3,38	0,003
<i>ptgs2</i>	6,31	0,19	4,63	0,037
<i>sugt1</i>	-1,25	0,78	-3,05	0,045
<i>tnf</i>	2,84	0,13	7,55	0,026

Legenda: * A expressão relativa é a expressão gênica normalizada do grupo tratado dividido pelo controle. ** p < 0,05 utilizando teste t de Student. Análise realizada de acordo com as orientações do fabricante.

Como ilustração, na Figura 16 estão apresentados os valores de expressão relativa de alguns genes de proteínas expostas nas Tabelas 6 e 7, tomando como amostra calibradora as preparações provenientes de células de sangue normal de animais AIRmin.

Figura 16 – Expressão relativa de genes em células sanguíneas de camundongos AIRmax e AIRmin normais ou tratadas com LPS e ATP

Legenda: Fold change - expressão relativa; Control group - AIRmin controle (amostra calibradora); Group 1 - AIRmax controle; Group 2 - AIRmax tratado com LPS e ATP; Group 3 - AIRmin tratado com LPS e ATP; Fonte: SABiosciences (2013).

5 DISCUSSÃO

Os tumores podem induzir respostas imunológicas inatas ou adaptativas, mas essa reação não é suficiente, na grande maioria das vezes, para a eliminação do câncer. O sistema imune, ao sentir a presença de células alteradas ou neoplásicas, logo “arma” uma defesa contra o dano percebido. Porém, será que a resposta iniciada pelo sistema imune com o intuito de eliminar a alteração pode também contribuir para seu crescimento? Que fatores são produzidos nesse meio que poderiam orientar a resposta para eliminação ou progressão tumoral?

O componente inflamatório de um tumor em desenvolvimento inclui uma população diversa de leucócitos, os quais liberam uma variedade de citocinas que promovem a angiogênese e quimiotaxia, mediadores citotóxicos, agentes perfurantes de membrana e metaloproteases que degradam a matriz extracelular. A inflamação crônica pode induzir danos no DNA de células em proliferação através da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que são produzidas normalmente para combater a agressão (SMYTH et al., 2004). Talvez por esse motivo, muitos cânceres humanos são etiologicamente relacionados a processos de inflamação e infecção crônicas, como o câncer gástrico (relacionado à infecção por *Helicobacter pylori*), câncer intestinal (relacionado à doença inflamatória intestinal), câncer de fígado (relacionado à hepatite viral ou alcoólica), dentre outros.

As linhagens de camundongos, denominadas AIRmax e AIRmin, foram desenvolvidas com o objetivo de se analisar o controle genético da resposta inflamatória aguda e identificar os genes envolvidos nesse processo. À medida que foram estudados, esses animais responderam de maneira significativamente diferente a vários protocolos clássicos de indução de doenças inflamatórias, infecciosas e cânceres.

Com relação à carcinogênese, AIRmin mostraram-se sensíveis a protocolos de indução de câncer de pele, rim e pulmão, enquanto AIRmax são resistentes. O contrário aconteceu quando se induziu câncer de cólon e fígado. Essa diferença é explicada somente pelo fato de distintas regiões anatômicas acometidas possuírem um microambiente tumoral diferente? Ou seria causada por diferenças genéticas entre linhagens? Uma hipótese é de que, no processo de desenvolvimento das linhagens AIRmax e AIRmin, alguns genes polimórficos relacionados a resistência/suscetibilidade ao câncer foram segregados juntamente com os que regulam o fenótipo de máxima ou mínima inflamação e essas variantes alélicas, aliadas a diferenças metabólicas e celulares do tecido alvo, podem ser responsáveis pela diferença de suscetibilidade observada nas linhagens. Corroborar esta hipótese a constatação de que as duas

linhagens apresentaram fenótipos divergentes de resistência ou de suscetibilidade, a todos os protocolos de carcinogênese testados, independentemente da natureza dos produtos químicos e das vias de aplicação (Tabela 1).

Sabe-se, então, que animais AIRmin são suscetíveis a câncer de pulmão induzido pelo carcinógeno químico Uretana, como descrito por Maria et al. (2003) e Ribeiro et al. (2005). Utilizando o mesmo carcinógeno em experimentos posteriores, observou-se que apenas animais AIRmax desenvolviam câncer hepático, mas esse dado não foi completamente caracterizado. Portanto, decidiu-se repetir o protocolo de indução tumoral com Uretana e observar a formação nodular hepática, bem como comparar esse processo utilizando um protocolo de indução com uma nova droga, o DEN, potente indutor de hepatocarcinoma. Esperava-se, com isso, caracterizar a suscetibilidade da linhagem AIRmin a câncer de pulmão e da linhagem AIRmax a câncer de fígado, mesmo usando carcinógenos diferentes, além de estudar a diferença entre linhagens.

Interessantemente, esse fenótipo se repetiu, confirmando que essa diferença não é só uma propriedade da droga, mas também do tecido envolvido e provavelmente da resposta inflamatória. Observou-se o aparecimento de tumores pulmonares preferencialmente nos AIRmin e de tumores hepáticos nos AIRmax após tratamentos com Uretana ou DEN.

Nas figuras 3 e 4, pode-se observar lesões em pulmão de animal AIRmin e fígado de animal AIRmax tratados com Uretana. Alguns animais AIRmax também apresentaram nódulos pulmonares, porém de menor número e tamanho. Nenhum animal AIRmin possuiu nódulo hepático. Como a Uretana é potente indutor de câncer pulmonar, nota-se que todos os AIRmin são acometidos após 38 semanas de tratamento, contra aproximadamente 30% dos AIRmax (Tabela 3). Neste mesmo tempo, observa-se que todos os animais AIRmax machos possuem nódulos hepáticos e nenhum AIRmin apresenta lesão neste órgão. As fêmeas tiveram menor predisposição ao desenvolvimento de câncer no fígado e isso acontece por razões hormonais (DE MARIA et al., 2002; YEH; CHEN, 2010). Naugler et al. (2007) mostraram que os machos têm incidência menor do câncer quando recebem estrogênio exógeno e as fêmeas ficam mais suscetíveis quando têm seus ovários retirados.

Com o intuito de caracterizar a alteração encontrada, em alguns órgãos foi feita análise histológica (Figuras 5 e 6). Nota-se que as lesões encontradas em pulmão são caracterizadas como adenocarcinomas primários, pois é possível observar formação pseudoglandular, característica desse tipo de câncer. Observa-se na Figura 5 o aspecto característico de formação de pseudoglândula, visível em toda a extensão da foto. Alguns nódulos apresentaram infiltrado inflamatório crônico discreto (Figura 5B) e necrose peritumoral

(Figura 5A). As alterações pulmonares não tiveram diferenças entre sexo, mas ocorreram em maior proporção e incidência nos AIRmin. Isso pode ser relacionado a dados anteriores, os quais demonstraram que os AIRmin apresentam um padrão de inflamação pulmonar persistente, enquanto AIRmax tem uma resposta maior inicial, mas que é rapidamente resolvida. Assim, é provavelmente esse padrão de inflamação em AIRmin que promove a formação de adenocarcinomas (MARIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005). À análise histológica do fígado desses animais, nota-se que os AIRmax desenvolveram hepatocarcinoma de alto grau, apresentando esteatose hepática e infiltrado inflamatório leve com predomínio mononuclear (Figura 6B). Animais AIRmin não tiveram alterações à microscopia do fígado (Figura 6A).

Após tratamento com DEN, observa-se que a grande maioria dos camundongos AIRmax machos desenvolveu hepatocarcinoma (HCC) (Tabela 4 e Figura 8). Os machos são mais acometidos que as fêmeas porque, como já discutido, elas possuem estrógeno em maior quantidade, o que confere proteção. Nota-se, então, que nenhuma fêmea AIRmin possui nódulo hepático e que machos AIRmin e fêmeas AIRmax têm aproximadamente a mesma incidência e padrão de acometimento (Figuras 8 e 9). Esses mesmos animais desenvolveram também nódulos pulmonares (Tabela 4 e Figura 7), numa maior incidência em AIRmin, concordando com os resultados obtidos com o protocolo de indução por Uretana.

A análise histológica do fígado de animais tratados com DEN, mostra que todos os nódulos, tanto em AIRmax quanto em AIRmin machos, são constituídos por hepatocarcinomas de alto grau (Figura 10). Alguns animais apresentaram também esteatose hepática e infiltrado inflamatório leve com predomínio mononuclear e raros neutrófilos. Os AIRmax machos foram acometidos por lesões mais invasivas, com formação de macrotrabéculas, muitas vezes apresentando processo inflamatório em espaços porta ou região ductal e depósitos de bile. Os nódulos pulmonares apresentados pelos camundongos foram caracterizados como adenocarcinoma primário (Figura 11).

Já era esperado que o DEN desencadeasse HCC após 32 semanas de tratamento, como indicam os trabalhos. Também se esperava que as fêmeas tivessem uma menor incidência. Porém, por que as linhagens têm uma diferença de incidência? E por que essa diferença diverge entre órgãos? Assim, formulou-se a seguinte hipótese: o ambiente tumoral é diferente, tanto entre fígado e pulmão quanto entre órgãos de linhagens diferentes e alguns genes que segregaram juntamente com o fenótipo de inflamação no processo de seleção das linhagens são responsáveis por essa diferença. A segregação diferencial de alelos de genes que interferem na carcinogênese nas duas linhagens poderia ter sido casual, por deriva genética,

ou estes genes teriam um efeito no fenótipo de inflamação e por este motivo foram segregados.

Com relação à carcinogênese pulmonar, resultados recentes de rastreamento genômico com marcadores de polimorfismo em ensaios de *linkage* neste modelo, demonstraram que um locus denominado *Pas1* (*pulmonary adenoma susceptibility 1*) que mapeia na porção distal do cromossomo 6 e que é um fator genético principal pela suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores de pulmão, está também associado ao fenótipo de inflamação. No caso do fígado, constatou-se sinais de *linkage* significantes de alelos de marcadores de polimorfismo, com a suscetibilidade/resistência ao desenvolvimento de tumores, na região distal do cromossomo 2 e proximal do cromossomo 9, sem haver entretanto, coincidências com regiões mapeadas que controlam a inflamação (dados não publicados).

Sabe-se que um microambiente tumoral é parte essencial de todos os tumores e esse ambiente pode ser peça importante na resposta, a favor ou contra a tumorigênese (BALKWILL; MANTOVANI, 2012; GRIVENNIKOV et al., 2010; MANTOVANI et al., 2008); também ele desempenha importante papel na modulação de processos de fibrose hepática, hepatocarcinogênese, invasão tumoral e metástase (YANG et al., 2011). A rede de proteínas presente em vários tumores é rica em citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e quimiocinas, mas em geral não possui elementos envolvidos numa resposta imune específica e sustentada. Há evidências de que os mediadores presentes podem contribuir diretamente para o desenvolvimento e progressão maligna do tumor (BALKWILL; MANTOVANI, 2001).

Citocinas são liberadas em resposta a uma diversidade de estresse celular, como lesões causadas por carcinógenos, infecção e inflamação, atuando para controlar o estresse celular e minimizar o dano tecidual. Enquanto a contenção eficaz do insulto promove reparação tecidual, a incapacidade de resolvê-lo pode levar a uma persistência na produção de citocinas e a uma exarcebação da destruição do tecido. Assim, as reações celulares do hospedeiro ao estresse podem ter impacto sobre várias etapas na formação e progressão do câncer (DRANOFF, 2004).

Nesse contexto, as citocinas mais estudadas são TNF- α , IL-6 e IL-1 como revisado por Balkwill e Mantovani (2012). Neste trabalho, decidiu-se analisar os níveis de expressão dos genes, bem como das concentrações destas proteínas no fígado e pulmões nas fases iniciais do tratamento com o DEN como carcinógeno. Como resultado, notou-se um aumento na expressão gênica de IL-6 e TNF- α , com uma tendência maior em AIRmax que AIRmin e pico às 14 h após a injeção de DEN (Figura 12).

Esses resultados são parcialmente condizentes com os encontrados na literatura. Naugler et al. (2007) mostraram que há um pico na expressão gênica de IL-6 e TNF- α 4 h após a injeção da mesma dose de DEN em camundongos C57B6, sendo maior em machos que em fêmeas com relação a IL-6. Utilizando o modelo AIRmax e AIRmin, observou-se um pico às 14 h, com diferenças entre linhagens e maior em macho, igualando-se entre sexo às 24 h para IL-6. Para TNF- α também se observou um pico as 14 h apenas em machos AIRmax, igualando-se às fêmeas da mesma linhagem às 24 h. As diferenças encontradas entre linhagem e entre sexo levam a crer que há uma participação importante dessas citocinas na progressão do hepatocarcinoma. Não houve expressão gênica de IL-1 β no fígado desses camundongos.

Em seguida, realizou-se uma análise da produção local dessas citocinas inflamatórias, tanto em fígado quanto em pulmão de animais tratados com DEN. Com relação à produção de IL-6 (Figura 13), há maiores concentrações no fígado de machos AIRmax comparado aos AIRmin. As fêmeas das duas linhagens não apresentaram um padrão definido, com oscilações nos vários tempos estudados. A produção dessa citocina só é significativamente maior em machos AIRmax que em fêmeas, 14 h após a dose de DEN, o que sugere que, no modelo utilizado, a IL-6 não deve ser essencial na diferença de suscetibilidade ao câncer entre os dois sexos.

Essa mesma citocina tem um padrão diferente de expressão no pulmão: há produção por todos os animais com pico 2 h após dose de DEN e sem diferenças importantes entre linhagens. A quantidade liberada, entretanto, é bem menor que no fígado e nota-se que após 24 h da injeção da droga, a IL-6 não é mais detectada (Figura 14).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória considerada um fator anti-apoptótico importante, pois a maioria dos genes alvo dessa proteína está envolvida na progressão do ciclo celular e supressão de apoptose, o que destaca sua importância na tumorigênese (LIN; KARIN, 2007). Além disso, a IL-6 é uma proteína de fase aguda e sua concentração está aumentada em condições de dano hepático como hepatite (NAUGLER et al., 2007). Como os níveis de IL-6 estão aumentados principalmente em fígado horas após dose de DEN, essa citocina deve ter papel importante no desenvolvimento do hepatocarcinoma. Observa-se que AIRmax tem níveis maiores que AIRmin, o que contribui para a veracidade dessa hipótese.

Com relação à citocina TNF- α , há também, em fígado (Figura 13), um pico de produção às 14 h, maior em AIRmax que AIRmin, diferentemente do pulmão (Figura 14), com pouca liberação dessa citocina às 14 h e 24 h e sem diferença entre linhagens. TNF- α é

um grande mediador da inflamação, agindo tanto na destruição quanto na recuperação tecidual, pois induz morte celular no local da inflamação, estimula fator de crescimento de fibroblasto, pode destruir vasos sanguíneos ou induzir fator angiogênico. Da mesma forma, na doença maligna, altos níveis de TNF destroem os vasos sanguíneos tumorais, mas quando ele é produzido cronicamente, pode agir como um promotor endógeno do tumor (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Portanto, a presença dessa citocina com pico às 14 h maior em AIRmax em fígado sugere que TNF α possa ter participação importante na diferença encontrada de suscetibilidade entre linhagens.

A citocina inflamatória IL-1 β também tem um papel importante no câncer relacionado à inflamação. A quantidade de IL-1, o tipo das células malignas, o estágio do tumor e a rede global e local de citocinas e seus receptores influenciam na malignidade tumoral (SMYTH et al., 2004). TNF e IL-1 aumentam a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e algumas células tumorais têm receptores para moléculas de adesão e usam deles (típicos de migração leucocitária) para atingir outras regiões anatômicas (BALKWILL; MANTOVANI, 2001), contribuindo para invasão e metástase.

Mesmo com a expressão gênica de IL-1 β não significativa em órgãos de animais tratados, decidiu-se quantificar a presença dessa proteína em fígado e pulmão por técnica de ELISA e encontrou-se grande liberação de IL-1 β tanto em fígado quanto em pulmão (Figuras 13 e 14). A quantidade liberada em pulmão não foi tão expressiva quanto no fígado, havendo um pico às 4 h maior em AIRmax macho e uma restituição do valor basal 24 h, porém, observa-se uma grande produção em fígado. Essa liberação, de certa forma, acompanha o ritmo de secreção das outras citocinas inflamatórias: Há uma maior produção em AIRmax macho, com início 2 h após injeção e pico as 14 e 24 h. Em 24 h, AIRmax fêmea iguala-se em produção a AIRmax macho, porém a diferença entre linhagens continua, o que sugere que essa citocina está relacionada à diferença encontrada entre elas.

O papel da IL-1 β no câncer é bastante discutido na literatura; sabe-se que essa citocina afeta a ativação da imunidade antitumoral mediada por linfócitos T e tem efeitos distintos em diversos tipos de câncer, dependendo do microambiente tumoral. (BALKWILL; MANTOVANI, 2012). A IL-1 β é uma importante citocina pró-inflamatória e sua produção se deve, em parte, ao complexo enzimático multiproteico inflamassoma. Inflamassomas são complexos multiproteicos que funcionam como plataformas para a ativação de caspase-1 e podem ser classificados de acordo com o seu receptor principal em NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6 e AIM2 (ZITVOGEL et al., 2012). O inflamassoma NLRP3 é importante regulador

da inflamação e necessário para ativação proteolítica da caspase-1 que, por sua vez, é essencial para a clivagem da pró IL-1 β e pró IL-18 em seus produtos ativos (FRANCHI et al., 2009). Em geral, a liberação ativa de IL-1 β a partir de monócitos de sangue é firmemente controlada, menos de 20% do total do precursor de IL-1 β (pró-IL-1 β) é processado e liberado. O mecanismo de aumento patológico da secreção de IL-1 β em doença auto-inflamatória é normalmente a ativação de caspase-1. (DINARELLO, 2009).

O fígado, devido a sua localização anatômica pode estar exposto a inúmeras bactérias que vêm da via intestinal através da veia porta, que drena sangue venoso do baço e do trato gastrointestinal para esse órgão e essas bactérias podem funcionar como sinais de perigo para a ativação do inflamassoma, que pode ser acionado por padrões microbianos (PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos) (DAVIS et al., 2011; STAGG; SMYTH, 2010; TSCHOP; SCHRODER, 2010). Maeda (2010) e Seki e Brenner (2008) explicaram a influência da flora microbiana e do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) no câncer de fígado, pois alguns tipos celulares presentes no parênquima hepático possuem expressão de TLR4 em sua superfície, o que, num processo inflamatório com aumento de TNF- α e LPS, pode contribuir para fibrogênese. Camundongos deficientes em TLR4 e MyD88 têm uma diminuição na incidência, tamanho e número de lesões cancerosas no fígado, indicando uma forte contribuição da sinalização via TLR em hepatocarcinogênese (SEKI; BRENNER, 2008).

Dapito et al. (2012) observaram que a microbiota intestinal e o TLR4 não têm papel na iniciação tumoral, porém têm influência importante na promoção da carcinogênese. Após experimentos em camundongos selvagens e TLR4 mutante, eles concluíram que animais deficientes em TLR4 têm 80% menos câncer hepático e o tratamento com LPS aumenta essa incidência. Os autores sugerem ainda uma forte ligação entre inflamação e câncer, afirmando que lesão hepática crônica faz com que células locais e/ou células iniciadas (precursoras de lesões tumorais) se tornem dependentes de sinais inflamatórios para sua sobrevivência. Assim, como a maioria dos HCCs ocorre em fígados portadores de lesões crônicas, mas muitos modelos de camundongos não possuem lesão crônica, é possível que a contribuição da via inflamatória para o HCC humano venha sendo subestimada (DAPITO et al., 2012).

Sabendo da importância do TLR4 para a promoção tumoral do HCC de acordo com o estudo desses autores e, sabendo ainda que as linhagens AIR são capazes de gerar inflamações crônicas, pode-se pensar na possibilidade de a ativação do inflamassoma estar envolvida na diferença de incidência do câncer. Ainda mais, o fato de que há produção local de IL-1 β sem haver alterações na expressão gênica dessa citocina, sugere que a ativação desse complexo

enzimático seja a fonte de IL-1 β produzida nos órgãos desses animais. Sabe-se também que muitos estímulos podem ativar o complexo inflamassoma e a ativação de outros receptores, como TLR, podem atuar nesse processo. Estudos indicam ainda que o complexo inflamassoma pode ter uma resposta importante no câncer, com a produção de citocinas inflamatórias capazes de ativar linfócitos citotóxicos contra células tumorais (GHIRINGHELLI et al., 2009).

Hipotetizando que o complexo inflamassoma poderia ter alguma importância na modulação da resposta ao câncer no modelo em questão, sangue de animais tratados ou não com DEN foram submetidos ao protocolo clássico de ativação do complexo NLRP3 através de estímulo com LPS e ATP. Por facilidade técnica, os ensaios foram feitos no sangue periférico. Como resultado, percebeu-se que a resposta em camundongos não tratados com carcinógeno permaneceu similar à resposta em camundongos tratados (Figura 15), porém AIRmax secretaram muito mais IL-1 β quando comparados com AIRmin. Essa diferença basal entre as linhagens na secreção de IL-1 β é definida geneticamente através de um locus no cromossomo 7, que possui gene(s) envolvidos na regulação da resposta inflamatória e produção dessa citocina segregado durante a seleção bidirecional das linhagens (VORRARO et al., 2010).

Pensando em aprofundar ainda mais o estudo dessa diferença, uma análise por PCR *array* da expressão gênica de proteínas relacionadas ao complexo inflamassoma foi realizada em RNA extraído de sangue de animais tratados *in vitro* com LPS e ATP. Observa-se nas Tabelas 6 e 7 uma tendência de modulação gênica devido ao estímulo significativo em algumas situações. A maioria dos Cts dos genes alvo possuíam frequentes variações entre preparações do mesmo grupo, o que prejudicou o resultado.

Na Tabela 6, quando se compara apenas AIRmax e AIRmin tratados, observa-se que esses animais possuem expressão significativamente diferente de *mapk9*, *mapk12* e *tirap*. Todas as células eucarióticas usam múltiplas MAP (proteína ativada por mitógeno) quinases para a transdução de sinal e elas estão envolvidas em diversos processos celulares, incluindo crescimento celular, migração, sobrevivência e outras funções essenciais ao desenvolvimento (LI; LIU; ZHANG, 2011). Os três genes encontrados diferencialmente expressos entre as linhagens codificam proteínas de cascatas de sinalização intracelular, e, dentre esses genes, o de maior significância estatística foi *tirap*, com maior expressão nos AIRmax.

TIRAP tem papel importante na imunidade inata, pois é via de sinalização de receptores do tipo Toll (TRL), que contêm repetições ricas em leucina flanqueadas por

motivos ricos em cisteína característicos nas suas regiões extracelulares e um domínio de homologia TIR citoplasmático. Esses domínios também são encontrados nas caudas citoplasmáticas dos receptores das interleucinas 1 e 18 (IL-1 e IL-18), e vias de sinalização semelhantes são utilizadas pelos TLR, IL-1 e IL-18 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; HORNOG; BARTON; MEDZHITOV, 2001). A maior expressão do gene *tirap* (cerca de 3,5 vezes) nos AIRmax em relação aos AIRmin, em decorrência da ativação das células com LPS e ATP, poderia estar relacionada com a diferença de produção de IL-1 β que caracteriza estas linhagens (Figura 15).

O resumo dos resultados apresentados na Figura 16, quando se utilizou a amostra AIRmin controle como calibradora, evidencia que o estímulo *in vitro* utilizado provocou a modulação da expressão gênica de algumas proteínas do inflamassoma, apesar de não se ter percebido diferenças significativas. Destaca-se os maiores níveis de transcritos de *nlrp3* e de *ptgs2* nas preparações dos AIRmax e de *il6* e de *tnf* em AIRmin.

O uso de triplicatas biológicas para a realização dos ensaios de PCR *array* não foi suficiente para se obter resultados conclusivos. Uma análise posterior utilizando mais animais deverá ser realizada para se confirmar esses dados e provavelmente candidatar mais genes. Por outro lado, durante o protocolo de ativação do inflamassoma, as células sanguíneas permanecem em incubação por um período longo (5 horas) e isso pode ter impedido a detecção de variações de expressão gênica que teriam ocorrido precocemente.

Os resultados obtidos com monócitos circulantes podem, portanto, servir apenas como um indicador do potencial de ativação do inflamassoma para a secreção de citocinas por células especializadas do fígado (células de Kupffer) e do pulmão (macrófagos alveolares). Para ensaios futuros, pretende-se adaptar a técnica em ensaios com RNA extraído destes órgãos.

Neste contexto, resultados do laboratório, com o emprego de técnica para análise de transcriptoma por *microarrays*, demonstraram que pulmões normais de camundongos AIRmax e AIRmin possuem expressão diferenciada de múltiplos genes em categorias importantes para o processo inflamatório, como migração leucocitária e adesão celular (DE FRANCO et al., 2010). Diferenças de perfil de expressão gênica foram encontradas também em fígado, em categorias funcionais como resposta de defesa e ciclo celular (dados não publicados), corroborando com a hipótese de que diferenças constitutivas de expressão gênica no tecido alvo distinguem indivíduos resistentes ou suscetíveis à carcinogênese.

6 CONCLUSÃO

Animais AIRmax e AIRmin, os quais possuem fenótipos de alta e mínima resposta inflamatória, também diferem na resposta à carcinogênese química causada por DEN e Uretana. AIRmax são sensíveis a câncer de fígado, enquanto AIRmin são resistentes. O contrário acontece em pulmão e esse fenótipo se repete independente do carcinógeno utilizado. Em relação ao hepatocarcinoma induzido por DEN, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 têm papel importante na sua promoção, contribuindo para a sensibilidade da linhagem AIRmax, que apresentou alta produção das mesmas após injeção. Além disso, o perfil de expressão gênica de proteínas relacionadas à ativação do inflamassoma NLRP3 parece ser responsável pela maior produção de IL-1 β pelas células de sangue de animais da linhagem AIRmax após estímulo *in vitro*.

Assim, esses resultados sugerem que variantes de genes que foram segregados em AIRmax e AIRmin interferem na suscetibilidade à carcinogênese através da modulação da reação inflamatória no órgão acometido. A consistência dos resultados de comportamento diferenciado das linhagens AIRmax e AIRmin a protocolos variados de carcinogênese em diferentes órgãos demonstra a importância dos genes que regulam a inflamação na incidência e progressão de doenças malignas.

REFERÊNCIAS*

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. **Sem. Cancer Biol.**, v. 22, p. 33-40, 2012.
- _____. Inflammation and cancer: back to virchow? **Lancet**, v. 357, p. 539-545, 2001.
- BIOZZI, G. et al. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 337-346, 1998.
- BOARU, S. G. et al. Expression analysis of inflammasomes in experimental models of inflammatory and fibrotic liver disease. **J. Inflamm.**, v. 9, n. 1, p. 49, 2012.
- BORTOLUCI, K. R.; MEDZHITOV, R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 67, p. 1643–1651, 2010.
- BUI, J. D.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, n. 2, p. 203-208, 2007.
- DAPITO, D. H. et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. **Cancer Cell**, v. 17, n. 21, p. 504-516, 2012.
- DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P. Y. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 29, p. 707–735, 2011.
- DE FRANCO, M. D. et al. Transcriptome of normal lung distinguishes mouse lines with different susceptibility to inflammation and to lung tumorigenesis. **Cancer Lett.**, v. 294, n. 2, p. 187-194, 2010.
- DE MARIA, N.; MANNO, M.; VILLA, E. Sex hormones and liver cancer. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 193, p. 59-63, 2002.
- DI PACE, R. F. et al. 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.
- DIEHL, A. M. Cytokine regulation of liver injury and repair. **Immunol. Rev.**, v. 174, p. 160-171, 2000.
- DINARELLO, C. A.; Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 519-550, 2009.

---

* De acordo com:

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

DRAGANI, T. A.; MANENTI, G.; DELLA PORTA, G. Quantitative analysis of genetic susceptibility to liver and lung carcinogenesis in mice. **Cancer Res.**, v. 51, p. 6299-6303, 1991.

DRANOF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 4, p. 11-22, 2004.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S. Mouse models of hepatocellular carcinoma. **Semin. Liver. Dis.**, v. 30, n. 1, p. 87-98, 2010.

FORKERT, P. G. Mechanisms of lung tumorigenesis by ethyl carbamate and vinyl carbamate. **Drug. Met. Rev.**, v. 42, n. 2, p. 355-378, 2010.

FRANCHI, L. et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nat. Immunol.**, v. 10, n. 3, p. 241-247, 2009.

GHANAYEM, B. I. Inhibition of urethane-induced carcinogenicity in Cyp2e1^{-/-} in comparison to Cyp2e1^{+/+} mice. **Toxicol. Sci.**, v. 95, n. 2, p. 331-339, 2007.

GHIRINGHELLI, F. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. **Nat. Med.**, v. 15, n. 10, p. 1170-1178, 2009.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell.**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

HAMILTON JR, R. F. et al. NLRP3 inflammasome activation in murine alveolar macrophages and related lung pathology is associated with MWCNT nickel contamination. **Inhal. Toxicol.**, v. 24, n. 14, p. 995-1008, 2012.

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

_____. The hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HORNOG, T.; BARTON, G. M.; MEDZHITOV, R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 9, p. 835-841, 2001.

HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminium salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nat. Immunol.**, v. 9, n. 8, p. 847-856, 2008.

IBAÑEZ, O. M. et al. Genetics of nonspecific immunity: bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, n. 10, p. 2555-2563, 1992.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Tobacco Smoke. **IARC Monographs**, v. 83, p. 1179-1187. 2004.

_____. Alcohol consumption and ethyl carbamate: cancer of the liver. **IARC Monographs**, v. 96, p. 399-418, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Câncer de pulmão**. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao> Acesso em: 09 jun. 2012.

_____. **Tipos de câncer: fígado**. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao> Acesso em: 22 jan. 2013.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death Differ.**, v. 13, p. 816-825, 2006.

LABASI, J. M. et al. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. **J. Immunol.**, v. 168, p. 6436-6445, 2002.

LEE, J. S. et al. Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. **Nat. Gen.**, v. 36, n. 12, p. 1306-1311, 2004.

LI, M.; LIU, J.; ZHANG, C. Evolutionary history of the vertebrate mitogen activated protein kinases family. **Plos One**, v. 6, n. 10, p. 1-13, 2011.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation and cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 5, p. 1175-1184, 2007.

LIU, Y.; XIAO, Y.; LI, Z. P2X7 receptor positively regulates MyD88-dependent NFkB activation. **Cytokine**, v. 55, p. 229-236, 2011.

MAEDA, S. NF- κ B, JNK, and TLR signaling pathways in hepatocarcinogenesis. **Gastroenterol. Res. Pract.**, v. 2010, p. 1-10, 2010.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, p. 436-444, 2008.

MARIA, D. A. et al. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas 1) locus affects inflammatory response. **Oncogene**, v. 22, p. 426-432, 2003.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. **Cell Death Differ.**, v. 14, p. 10-22, 2007.

NAUGLER, W. E. et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. **Science**, v. 317, n. 121, p. 121-124, 2007.

NERY, R. Some aspects of the metabolism of urethane and N-hydroxyurethane in rodents. **Biochem. J.**, v. 106, n. 1, p. 1-13, 1968.

RAMADORI, G.; ARMBRUST, T. Cytokines in the liver. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 13, n. 7, p. 777-784, 2001.

RIBEIRO, O. G. et al. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J. Lekoc. Biol.**, v. 74, n. 4, p. 497-506, 2003.

_____. Genetic selection for high acute inflammatory response confers resistance to lung carcinogenesis in the mouse. **Exp. Lung Res.**, v. 31, n. 1, p. 105-16, 2005.

SABIOSCIENCES. **RT² profiler PCR array palte layout**. Disponível em: <<http://www.sabiosciences.com>>. Acesso em: 20 Nov 2012.

_____. **RT² profiler^{TM} PCR array mouse inflammasomes**. Disponível em: <<http://www.sabiosciences.com>>. Acesso em: 11 Jan 2013.

_____. **RT² profiler PCR array data analysis version 3.5**. Disponível em: <<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>>. Acesso em: 31 Jan 2013.

SEKI, E.; BRENNER, D. A. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. **Hepatology**, v. 48, p. 322-335, 2008.

SMYTH, M. J. et al. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. **Immunolog. Rev.**, v. 202, p. 275-293, 2004.

STAGG, J.; SMYTH, M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. **Oncogene**, v. 29, p. 5346-5358, 2010.

TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 210-215, 2010.

VERNA, L.; WHYSNER, J.; WILLIAMS, G. M. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. **Pharmacol. Ther.**, v. 71, n. 1-2, p. 57-81, 1996.

VORRARO F. et al. Genetic control of IL-1beta production and inflammatory response by the mouse *Irm1* locus. **J. Immunol.**, v. 185, n. 3, p. 1616-1621, 2010.

WU, Y. et al. Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in the liver. **Oncogene**, v. 29, p. 2228–2237, 2010.

YANG, J. D.; NAKAMURA, I.; ROBERTS, L. R. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets. **Sem. Cancer Biol.**, v. 21, p. 35-43, 2011.

YEH, S. H.; CHEN, P. J. Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. **Oncology**, v. 78, p. 172–179, 2010. Suppl. 1.

ZITVOGEL, L. et al. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune response. **Nat. Immunol.**, v. 13, n. 4, p. 343-351, 2012.