

**KRISHNA DURO DE OLIVEIRA**

**Carcinogênese induzida por 7, 12- dimetilbenzantraceno em  
camundongos geneticamente modificados com deleção em um  
dos alelos do gene da conexina 43**

**São Paulo**

**2011**

**KRISHNA DURO DE OLIVEIRA**

**Carcinogênese induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno em camundongos selvagens e geneticamente modificados com deleção em um dos alelos do gene da conexina 43**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa Dra Maria Lucia Zaidan Dagli

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo)

T.2471  
FMVZ

Oliveira, Krishna Duro de  
Carcinogênese induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno em camundongos selvagens e geneticamente modificados com deleção em um dos alelos do gene da conexina 43 / Krishna Duro de Oliveira. – 2011.  
109 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.  
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli.

1. DMBA. 2. Carcinogênese. 3. Conexinas. 4. Neoplasias. 5. Junção gap.  
I. Título.

*Comissão de Ética no uso de animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Carcinogênese mamária induzida por DMBA em camundongos geneticamente modificados portadores e não portadores de deleção em um dos alelos do gene da conexina 43", protocolado sob o nº1876/2010, utilizando 250 (duzentos e cinquenta) camundongos, sob a responsabilidade da Profa Dra Maria Lúcia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/01/2010.

We certify that the Research "Mammary carcinogenesis induced by DMBA in genetically engineered mice with and those without a deletion in one allele of the gene for connexin 43", protocol number 1876/2010, utilizing 250 (two hundred fifty) mice, under the responsibility Profa Dra Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 01/20/2010.

São Paulo, 21 de janeiro de 2010

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Krishna Duro

Título: Carcinogênese induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno em camundongos geneticamente modificados com deleção em um dos alelos do gene da conexina 43

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

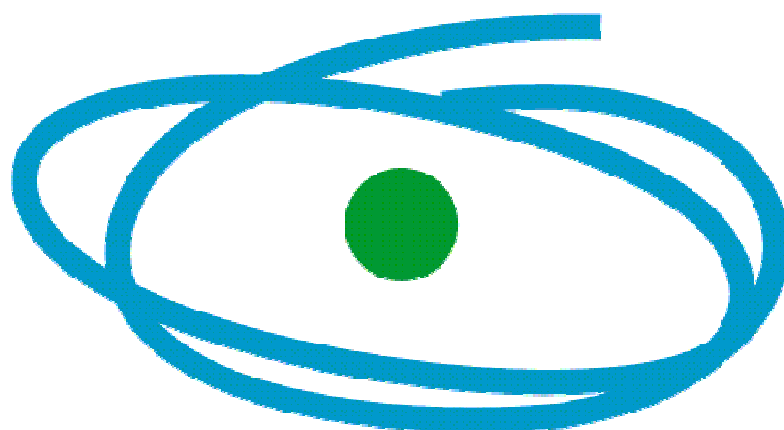
*Às pequenas criaturas de cujas vidas me apropriei em  
nome da ciência.*

*Eu sinto muito por isso... foi necessário.*

**Esta tese teve apoio financeiro das seguintes Instituições de fomento à pesquisa:**



**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**



**C A P E S**

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**

## *Agradecimentos*

*A Deus, força maior em que acredito, minha gratidão sempre e por todas as coisas!*

*À família que me recebeu na Terra, cuidando e auxiliando com os meios necessários e possíveis para alcançar o lugar onde me encontro: minha mãe (Vera Lúcia), meu pai (José Antonio) e minha avó Ináh, aí onde estão, espero que estejam em paz e possam sentir minha eterna gratidão e amor! Vocês foram as pessoas mais importantes na minha vida!*

*À família que construí e constituí hoje a motivação maior para tudo, desde acordar até as noites sem dormir para escrever esta tese:*

*Marcelo, meu querido marido e amigo, de inestimável valor, admirável força e inteligência, a quem de certa forma devo esta fase da minha vida ... é o meu companheiro na vida, estamos crescendo juntos, em todos os sentidos!*

*Maia, minha filha, inspiração, amor maior, minha maior riqueza e alegria! Sua presença torna tudo mais leve, faz tudo valer a pena! Como é linda ...*

*À minha orientadora, Maria Lúcia Zaidan Dagli, para quem mal tenho palavras para agradecer... alguém que, mesmo sem me conhecer, deu-me algo de muito valor, oportunidade! Sua generosidade, inteligência e bondade a tornam uma das pessoas mais especiais que já conheci!*



*Ao Professor Idércio, pela atenção, carinho, generosidade e exemplo desde o primeiro dia. É, certamente, um dos responsáveis por tudo isso.*

*Aos meus amigos, desde todas as vidas! Meus irmãos na eternidade, cujos laços transcendem o que o PCR poderia alcançar! Aos que pertencem a este plano e também aos que estão no outro, anjos queridos a quem devo o que palavras quaisquer poderiam traduzir. Destes, os que esta memória atual registra e estão diretamente envolvidos com minha trajetória profissional: Pedro, Isis, Valíria, Marcos, Marilene, Krishna, Panamá, Flavinha, Fernanda, Mayra, Jankerle, Achiciane e Séfora.*

*A todos do laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, pessoas com quem convivi e tanto aprendi nos últimos anos: Gregory Mennecier, Ivone, Bruno, Lucas, Tereza, Daniel Sanches, Tarso Felipe, Kátia Kimura, Gisele, Zilá e Heidge.*

*Em especial quero agradecer a duas pessoas cujas atitudes fizeram total diferença para realização deste trabalho e hoje, mais do que pessoas da minha relação profissional, para mim tornaram-se representantes da mais nobre palavra do dicionário: AMIZADE.*

*Márcia Kazumi, uma pessoa excepcional, em todos os sentidos! Inteligente, amiga, honesta, justa, humana, são tantos os adjetivos que poderia gastar folhas escrevendo sobre o quanto admiro e sou grata a esta pessoa encantadora e inspiradora do bem!*

*Marguete, a grande mãe do laboratório, seu senso de justiça, alegria e sinceridade a tornam exemplo de caráter. Pessoa*

*dísposta, com boa vontade e eficiência, que faz do laboratório mais do que um lugar produtivo, mas sobretudo bom de se estar! Obrigada por tudo!*

*A Marcello Tedardi, pelo trabalho acima das suas obrigações, pela aplicação e boa vontade sempre.*

*À Luciana Torres, pelo auxílio inesperado, indireto, porém fundamental para conclusão do trabalho.*

*À Cláudia Morí, pela sua ajuda e orientações no manejo dos camundongos, sempre com boa vontade!*

*À Andreia Latorre pela ajuda no treinamento com o manejo dos camundongos com a gavagem.*

*As profissionais da secretaria de pós-graduação, Cláudia Lima, Daura e Marli por toda atenção,*

*A dona Lúcia, Rosiris, Idalina, Herculano, Shilrei, Adriana, Milena, Cláudia Faria e demais funcionários do VPT pelo convívio agradável e auxílio sempre que necessário.*

*Jamais poderia deixar de agradecer aos mestre de outrora, aqueles com quem tudo isso começou: ao Mestre dos Mestres, Professor Carlos Hubinger Tokarnia, pela imensa oportunidade de aprender, entre outras coisas menos importantes, que humildade e saber podem andar juntos! E como é bonito! E ao Dr. Paulo Vargas Peixoto, pela iniciação na Patologia, pela orientação no Mestrado e pelos conhecimentos primordiais para minha formação!*

*A todos os meus ex-alunos, ex-residentes e ex-colegas de trabalho do Centro Universitário Vila Velha, UVV, ES, onde trabalhei por 10 anos! Fundamental na minha trajetória profissional. O interessante, é que o medo de perder o emprego, foi que me impulsionou ao Doutorado... acabei pedindo demissão! Voltas que o mundo dá para nos levar para onde temos que ir!*

*Embora não estejam tão diretamente envolvidos com este projeto profissional e de vida, sinto que sem cada uma destas pessoas abaixo não seria o que sou, portanto talvez nada disto fosse possível:*

*Igor e Andrei, meus irmãos, cujo convívio, sobretudo enquanto morávamos sob o mesmo teto, é peça importantíssima que constituiu as bases do que sou.*

*Meu avô Otello, cuja presença na Terra ainda tenho o privilégio de ter, segundo pai, protetor, generoso e presente sempre.*

*Meu avô Joaquim (in memoriam), o “vô paraíba” querido e tão amoroso..., e minha avó Zulima (in memoriam), culta, tão distinta e admirável, figuras inesquecíveis da minha infância e certamente com sua grande parcela de responsabilidade sobre aquilo que me tornei.*

*Queridos tios Zé, Leila, Nadilson e Geraldo, sua amizade para com meus pais foram força para mim também.*

*Aos meus mais recentes pais, Angela e Antonino, e tios Walkyría e Sylvio, além da tão doce vó Maria (in memoriam), inesquecível figura do bem, enfim, a família que “ganhei de*

*brinde ao adquirir o marido”! Pelo acolhimento, presença e apoio, de todas as formas possíveis!*

*À FAPESP pelo auxílio financeiro ao Projeto.*

*À CAPES pela bolsa de estudos.*

**“O saber conduz á consciência da ignorância”**

(Atribuído a Sócrates)

## RESUMO

OLIVEIRA, K.D. **Carcinogênese induzida 7,12-dimetilbenzantraceno em camundongos geneticamente modificados com deleção em um dos alelos do gene da conexina 43.** [Carcinogenesis induced by 7,12-Dimethylbenzanthracene in mice genetically modified with deletion in one allele of the connexin 43 gene]. 2011. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O papel das junções intercelulares comunicantes do tipo *gap* e das proteínas que as compõem, as conexinas, tem sido alvo de numerosos estudos no campo da oncologia. Com a finalidade de compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos no processo carcinogênico e desenvolver novas armas contra o câncer, estes estudos têm se mostrado promissores, porém com muitas perguntas ainda a serem respondidas. Com o objetivo de avaliar a interferência da conexina 43 no processo carcinogênico, administramos o carcinógeno DMBA, um hidrocarboneto aromático policíclico, nas doses hebdomadárias de 1 mg durante 9 semanas, à camundongos BALB/c geneticamente modificados heterozigotos para a conexina 43 (Cx43<sup>+/-</sup>) e *wild-type* (Cx43<sup>+/+</sup>). O desenvolvimento de neoplasias ocorreu em 100% dos animais que receberam DMBA, porém de forma variável quanto ao tempo, tipo e número de neoplasias. No total, 6 tipos neoplásicos foram observados, incluindo neoplasias mamária, linfoma, pulmonar, gástrica, cutânea e ovariana, nesta ordem de prevalência. Com relação às neoplasias mamárias, as mamas abdominais foram as mais acometidas e o adenoacantoma foi o tipo histológico mais comum. No pulmão, estômago e pele, o tipo neoplásico mais comum em cada um foi, respectivamente, adenocarcinoma alveolar papilar, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células escamosas queratinizante. Foi observada diferença estatística significativa na incidência de tumores ovarianos, entre os grupos Cx43<sup>+/-</sup> e Cx43<sup>+/+</sup>, com maior incidência em animais Cx43<sup>+/-</sup>, indicando interferência da Cx43 neste processo carcinogênico. Apenas os animais Cx43<sup>+/-</sup> desenvolveram este tipo neoplásico, o qual foi representado exclusivamente por tumores da célula da granulosa. Não houve diferença estatística significativa na incidência dos demais tumores, embora, em números absolutos, a incidência de quase todas, à exceção das neoplasias cutâneas,

tenha sido maior nos Cx43+/- . O mesmo se repetiu com relação ao desenvolvimento de metástases, cujo fenótipo foi observado apenas em neoplasias mamárias e gástricas. A utilização de doses elevadas (9mg) de DMBA parece interferir na resposta, mais notadamente a pulmonar. As conexinas atuam de forma complexa e variável entre os diferentes tumores e entendimento da relação das conexinas com o câncer depende do entendimento molecular do controle da expressão das conexinas. Com este trabalho esperamos contribuir para evolução dos estudos relativos ao seu papel no processo carcinogênico e, desta forma, auxiliar no desenvolvimento de meios de prevenir e combater o câncer.

Palavras-chave: DMBA. Carcinogênese. Conexinas. Neoplasias. Junção *gap*.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, K.D. **Carcinogenesis induced by 7,12-Dimethylbenzanthracene in mice genetically modified with deletion in one allele of the connexin 43 gene** [Carcinogênese induzida por 7,12-dimetilbenztraceno em camundongos geneticamente modificados com deleção em um dos alelos do gene da conexina 43]. 2011. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2011.

The role of the intercellular communication of gap junctions and of the proteins that form these junctions, the connexins, has been the subject of numerous studies in the field of oncology. In order to better understand the molecular mechanisms involved in the carcinogenic process and develop new weapons against cancer, these studies have shown promising, but with many questions still to be answered. Aiming to evaluate the interference connexin 43 in the carcinogenic process the carcinogen DMBA, one aromatic hydrocarbon polycyclic, was administered to genetically modified BALB;c mice heterozygous for the connexin 43 (Cx43 +/-) and wild-type (Cx43 +/+). The development of cancer occurred in 100% of animals receiving DMBA, but in different timing, types and number of tumors. In total, six types of neoplasm were observed, including breast, lymphoma, lung, gastric, skin and ovarian cancers, in that order of prevalence. Regarding breast cancer, abdominal breasts were the most affected and adenoacanthoma was the most common histological type. In the lung, stomach and skin, the most common tumor type in each was, respectively, papillary alveolar adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and keratinizing squamous cell carcinoma. There was statistically significant difference in the incidence of ovarian tumors among groups Cx43 + / - and Cx43 + / -, indicating interference of the expression of Cx43 +/- in the carcinogenic process. Only animals of the Cx43 + / - developed this tumor type, which was represented exclusively by granulosa cell tumors. There was no statistically significant difference in the incidence of other tumors, although in absolute numbers, the incidence of almost all, except for skin cancers, was higher in Cx43 + / -. The same was repeated with respect to the development of metastases, whereas observed only in breast and gastric cancers. The use of high doses (9 mg) of DMBA appears to interfere with the carcinogenic response, most notably in the lung. Connexins act in complex and



variable ways among different tumors and understanding of the relationship of connexins in cancer depends on understanding the molecular control of expression of connexins. With this work we hope to contribute to the development of studies about role of connexins in the carcinogenic process and thus help in developing ways to prevent and fight cancer.

Keywords: DMBA. Carcinogenesis. Connexins. Neoplasms. GAP Junction.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estruturação da conexina.....	30
Figura 2 – Representação esquemática dos passos de síntese, arranjo e degradação das junções gap.....	31
Figura 3 – Ilustração da via de degradação das conexinas pelo endossomo precoce e endossomo tardio.....	33
Figura 4 – Imagem esquemática de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.....	42
Figura 5 – Via do AhR.....	47
Figura 6 – Fórmula estrutural de uma molécula de 7,12-dimetilbenzantraceno.....	49
Figura 7 – Esquema da ativação metabólica do DMBA por diolepoxidação na região bay da molécula por P450 e epóxido hidrolase.....	51
Figura 8 – Imagem do gel de agarose, apresentando a marcação das bandas que correspondem aos amplicons que identificam os camundongos Cx43 <sup>+/+</sup> e Cx43 <sup>+/-</sup> .....	62
Figura 9 – Esquema da distribuição anatômica das glândulas mamárias em camundongos.....	69
Figura 10 – Imagens de alterações macroscópicas observadas nos camundongos Cx43 <sup>+/+</sup> que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg.....	103
Figura 11 – Imagens de alterações macroscópicas observadas nos camundongos Cx43 <sup>+/+</sup> que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg.....	104
Figura 12 – Imagens de alterações macroscópicas observadas nos camundongos Cx43 <sup>+/-</sup> que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg.....	105

Figura 13 –	Imagens de alterações macroscópicas observadas nos camundongos Cx43 +/- que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg.....	106
Figura 14 –	Fotomicrografias de cortes histopatológicas (hematoxilina e eosina) das neoplasias observadas nos camundongos Cx43 +/- que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg.....	107
Figura 15 –	Fotomicrografias de cortes (hematoxilina e eosina) das neoplasias observadas nos camundongos Cx43 +/- que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg.....	108
Figura 16 –	Fotomicrografias de cortes histopatológicos (hematoxilina e eosina) das neoplasias observadas nos camundongos Cx43 +/- que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg.....	109
Quadro 1 –	Estudo da expressão das conexinas em várias amostras de tumores humanos .....	37
Gráfico 1 –	Tempo de sobrevida após o início do surgimento de neoplasias macroscopicamente detectáveis, decorrente da administração do DMBA aos camundongos Cx43+/- e Cx43+/+.....	64
Gráfico 2 –	Prababilidade de sobrevida desde o início da administração do DMBA aos camundongos Cx43+/- e Cx43+/+.....	65
Gráfico 3 –	Análise da variação média de peso ao longo do expemento em ambos os grupos experimentais, mostrando não haver diferença significativa. A queda acentuada do número de animais nas últimas semanas podem ter comprometido o traçado em Cx43+/-.....	66
Gráfico 4 –	Incidência dos diferentes tipos neoplásicos nos grupos experimentais Cx43+/- e Cx43+/+.....	68
Gráfico 5 –	Incidência de neoplasias por localização mamária de acordo com o genótipo (Cx43+/- e Cx43+/+).....	72

Gráfico 6 –	Incidência dos tipos histológicos de neoplasia mamária apresentados pelos grupos experimentais Cx43+/- e Cx43+/-, decorrente da administração de DMBA.....	78
Gráfico 7 –	Incidência dos tipos histológicos de neoplasias pulmonares apresentados pelos grupos experimentais Cx43+/- e Cx43+/-, decorrente da administração de DMBA.....	80
Gráfico 8 –	Incidência dos tipos histológicos de neoplasias cutâneas apresentados pelos grupos experimentais Cx43+/- e Cx43+/-, decorrente da administração de DMBA.....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Incidência de neoplasias nos diferentes órgãos de acordo com genótipo (Cx43 +/- e Cx 43 +/-), segundo avaliação macroscópica e confirmação microscópica dos 130 animais que receberam o carcinógeno DMBA. São Paulo, 2010 a janeiro de 2011.....	70
Tabela 2 –	Incidência de neoplasias por localização mamária de acordo com o genótipo (Cx43+/- e Cx43+/+). São Paulo, 2010 a janeiro de 2011.....	71
Tabela 3 –	Comparação do número de neoplasias metastáticas em relação ao número de animais com neoplasias em cada grupo genotípico (Cx43+/- e Cx43+/+) e com o número total de neoplasias em cada grupo. São Paulo, 2010 a janeiro de 2011.....	72
Tabela 4 –	Comparação do número de neoplasias gástricas e ocorrência de metástases entre os genótipos diferentes (Cx43+/- e Cx43+/+). São Paulo, 2010 a janeiro de 2011.....	73
Tabela 5 –	Achados neoplásicos descritivos quanto à classificação histológica dos tipos primários em relação ao número total de neoplasias em cada grupo. São Paulo, 2010 a janeiro de 2011.....	83
Tabela 6 –	Achados neoplásicos descritivos quanto à classificação histológica dos tipos neoplásicos primários e metastáticos, em relação ao número total de animais que apresentaram neoplasia em cada grupo e no geral. São Paulo, 2010 a janeiro de 2011.....	84
Tabela 7 –	Análise comparativa dos achados neoplásicos descritivos quanto à classificação histológica dos tipos primários em relação ao número total de animais portadores de neoplasias em cada grupo. São Paula, 2010 a janeiro de 2011.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AhR	Aryl hydrocarbon receptor
CIJG	Comunicação intercelular por junções <i>gap</i>
cm	Centímetro
Cx	Conexinas
DMBA	12-dimetilbenzantraceno
FMVZG	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Gramas
HAPs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
JG	Junção <i>gap</i>
kDa	KiloDáltons
kg	Kilograma
M	Mol
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
PCR	Reação Polimerase em Cadeia

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	26
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	28
2.1	<b>JUNÇÕES GAP E CONEXINAS</b> .....	28
2.1.1	Estrutura e função das JG .....	28
2.1.2	<b>CONEXINAS (CX)</b> .....	30
2.1.2.1	Biossíntese das Cx .....	30
2.1.2.2	Degradação das Cx .....	32
2.1.2.3	Renovação das Cx .....	33
2.1.2.4	Expressão de Cxs em células e tecidos normais e neoplásicos.....	35
2.2	<b>CONEXINAS E CARCINOGENESE</b> .....	38
2.3	<b>CARCINOGENESE</b> .....	40
2.4	<b>7,12-DIMETILBENZANTRACENO (DMBA)</b> .....	40
2.4.1	Aspectos gerais dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos(HAPs)	42
2.4.1.1	Importância epidemiológica.....	43
2.4.1.2	Características físico-químicas .....	44
2.4.1.3	Metabolismo e ação deletéria .....	44
2.4.2	O receptor aril hidrocarbono (AhR).....	46
2.4.3	As enzimas do sistema citocromo P450 (CYP) .....	47
2.5	<b>CARCINOGENESE POR DMBA</b> .....	49
2.6	<b>CAMUNDONGOS CX43 +/-</b> .....	52

<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	54
3.1	OBJETIVO GERAL.....	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	54
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56
4.1	ANIMAIS .....	56
4.1.1	<b>Camundongos heterozigotos para Cx43</b> .....	56
4.1.2	<b>Certificado de Biossegurança e normas para a manutenção e trabalhos em contenção com animais geneticamente modificados</b> .....	57
4.2	DESENHO EXPERIMENTAL .....	57
4.3	GENOTIPAGEM .....	58
4.4	ANÁTOMO-PATOLOGIA .....	59
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	59
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	62
5.1	GENOTIPAGEM .....	62
5.2	ACHADOS CLÍNICOS .....	63
5.3	CARCINOGENESE .....	65
5.3.1	<b>Tumores de mama</b> .....	68
5.3.2	<b>Metástases</b> .....	72
5.4	ACHADOS DE NECROPSIA .....	75
5.4.1	<b>Tumores de mama</b> .....	74
5.4.2	<b>Tumores cutâneos</b> .....	74
5.4.3	<b>Cavidade torácica</b> .....	75



5.4.4	<b>Cavidade abdominal</b> .....	75
5.4.5	<b>Tecido linfático</b> .....	76
5.5	<b>CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS NEOPLASIAS OBSERVADAS</b> .....	76
5.5.1	<b>Neoplasias mamárias</b> .....	77
5.5.2	<b>Neoplasias pulmonares</b> .....	79
5.5.3	<b>Neoplasias cutâneas</b> .....	80
5.5.4	<b>Neoplasias gástricas</b> .....	81
5.5.5	<b>Linfomas</b> .....	82
5.5.6	<b>Neoplasia ovariana</b> .....	82
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	87
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	93
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95
	<b>APÊNDICE A</b> .....	103
	<b>APÊNDICE B</b> .....	107

## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo das conexinas e da sua relação com a carcinogênese e a progressão tumoral, tem alcançado grande importância na oncologia, tanto por auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos, quanto por fornecer perspectivas de intervenção contra o câncer, incluindo prevenção, identificação de fatores prognósticos e terapia (KANCZUGA-KODA et al, 2007). As unidades formadoras das junções gap, canais localizados na membrana que realizam comunicação intercelular, são responsáveis por processos fisiológicos como proliferação, diferenciação e homeostase celular (VINKEN et al., 2006; DAGLI; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2007; KANCZUGA-KODA et al, 2007).

Neste contexto, o presente trabalho se propõe a estudar a interferência da conexina 43 na carcinogênese induzida por 7,12 dimetilbenzantraceno, por meio da administração do carcinógeno a camundongos geneticamente modificados para deficiência de Cx43. Aspectos qualitativos e quantitativos serão apresentados, comparados e discutidos entre os dois grupos experimentais e confrontados aos dados encontrados na literatura.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Considerando-se a diversidade e complexidades dos temas relacionados à presente pesquisa, os mesmos serão divididos em itens e subitens nesta revisão, de forma a permitir uma melhor compreensão.

### 2.1 JUNÇÕES *GAP* (JG) E CONEXINAS

As junções comunicantes do tipo *gap*, inicialmente descritas no final dos anos 60 (MESNIL, 2002), representam regiões especializadas na membrana celular de duas células vizinhas, que as aproxima sem que ocorra fusão entre as mesmas e permite a comunicação entre ambas as células (CHIPMAN et al., 2003).

#### 2.1.1 Estrutura e função das JG

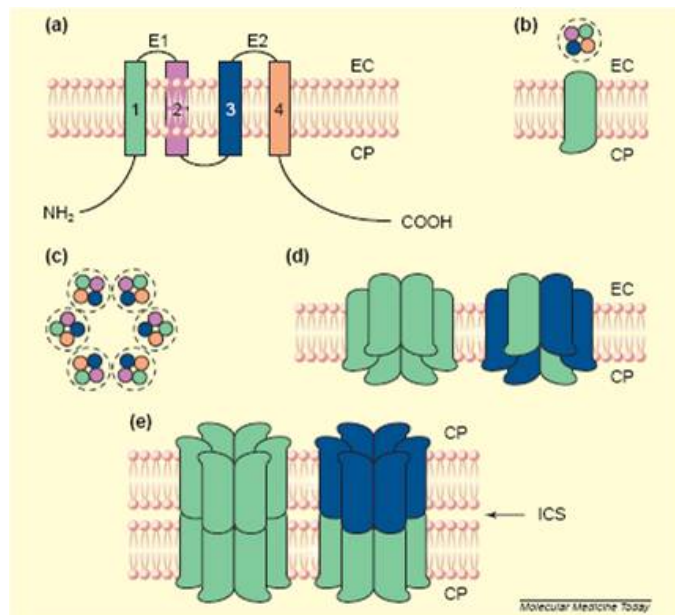
As JG constituem-se em canais entre células adjacentes que permitem o transporte de moléculas de até 1000 Da, incluindo íons, segundos mensageiros e metabólitos (CHIPMAN et al., 2003). Desta forma, muitos papéis fisiológicos tem sido atribuído às JG, como participação na homeostase, morfogênese, diferenciação, controle do crescimento celular e apoptose (KANCZUGA-KODA et al, 2007).

Tais propriedades garantem a estes importantes canais de comunicação intercelular participar não só da manutenção de tecidos normais como também do desenvolvimento de neoplasias (LI; HERLYN, 2000; TORRES et al., 2005; DAGLI; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2007). O fluxo de moléculas através das JG é considerado um mecanismo chave em praticamente todos os processos do ciclo da vida de uma célula (VINKEN et al., 2006; DAGLI; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2007). Sabe-se que a sinalização via JG está especialmente alterada no câncer. Além

disso, acredita-se que estes canais de membrana estejam envolvidos no processo de metástase (KANCZUGA-KODA et al, 2007).

As JG não são idênticas em todos os tecidos, porém são sempre compostas por seis unidades básicas chamadas conexinas (Cx). As conexinas formam os conéxons, que são hemi-canais transmembrana. A ligação face a face de dois conéxons entre células forma então uma JG (TORRES ET AL, 2005). Logo, cada canal é composto de 12 moléculas de Cx ao redor de um poro central (UNGER et al., 1999).

As JG podem ser formadas por conéxons idênticos, chamados homotípicos, ou diferentes, heterotípicos. Os conéxons podem também ser formados por conexinas diferentes, chamados heteroméricos, ou iguais, denominados homoméricos (LI e HERLYN, 2000) (figura 1).



Fonte: (LI; HERLYN, 2000)

Figura 1 – Estruturação da conexina. (a) Topologia transmembrana de uma conexina. (b) Vista superior e vista lateral de uma conexina. (c) Vista superior de um conéxon. A região três (em azul) da conexina é formada por aminoácidos hidrofóbicos e está alinhada para formar o interior do canal. (d) Conéxon homomérico e heteromérico (e) JG homotípicas e heterotípicas, respectivamente.

## 2.1.2 CONEXINAS

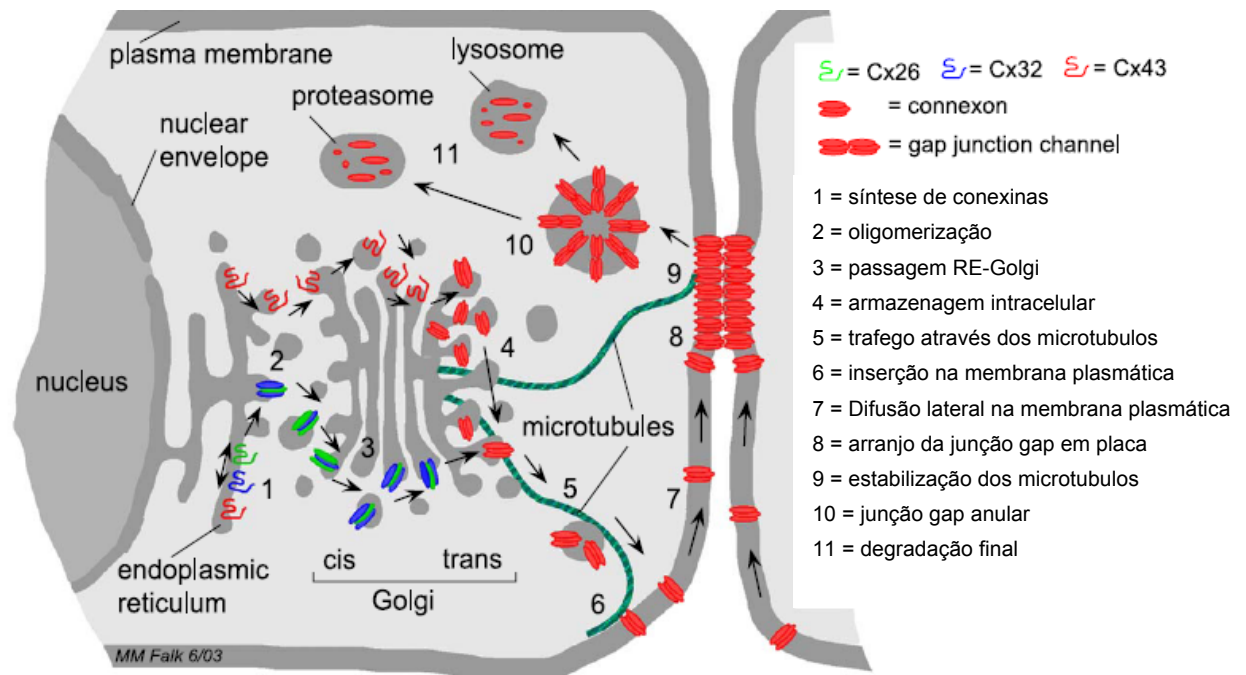
Apesar de existirem estudos demonstrando a existência de conéxons formados por conexinas iguais e diferentes, nem todas as conexinas são compatíveis para formação de um conéxon (HAASS, SMALLEY e HERLYN, 2004). As conexinas possuem uma estrutura semelhante composta de quatro domínios transmembrana, duas voltas em domínio extracelular, uma volta no citoplasma e duas extremidades citosólicas, uma N-terminal, e outra C-terminal (Figura 1) (VINKEN et al., 2006). Os tipos de conexinas que formam as JG influenciam sua seletividade e desse modo controla a especificidade da comunicação intercelular das JG (HAASS et al., 2004).

Com relação às nomenclaturas, dois sistemas classificam as conexinas. Um sistema é baseado no comprimento e similaridade da seqüência do domínio intracitoplasmático. Neste sistema é usado o prefixo JG, as letras  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$  de acordo com as características citadas anteriormente e ainda um sufixo numérico de acordo com a ordem de descoberta. Outro sistema de classificação, sendo o inclusive o mais usual, é baseado no peso molecular da conexina. Neste sistema utiliza-se um prefixo Cx seguido do número de peso molecular da conexina (LI; HERLYN, 2000).

### 2.1.2.1 Biossíntese das conexinas

A expressão das proteínas constituintes da membrana, incluindo as conexinas, é regulada de forma estreitamente controlada e envolvendo uma série de etapas e mecanismos conforme mostrado na figura 2 (VANSLYKE; MUSIL, 2003). Ressalta-se que o padrão de expressão das proteínas obedece aos padrões específicos dos diferentes tecidos e às vias regulatórias que controlam sua síntese,

trafego intracelular, arranjo e degradação (MUSIL et al., 2000; SEGRETAIN; FALK, 2004).



Fonte: (SEGRETAIN; FALK, 2004)

Figura 2 – Representação esquemática dos passos de síntese, arranjo e degradação das junções gap. A biosíntese e degradação das junções gap envolvem (1) a síntese de conexinas na membrana do retículo endoplasmático, (2) oligomerização em homômeros e heterômeros, (3) passagem através do complexo de Golgi, (4) armazenamento intracelular dentro da membrana *trans* Golgi, (5) trafego através dos microtubulos, (6) inserção dos conexons na membrana plasmática, (7) difusão lateral dos conexons na membrana plasmática, (8) agregação individual de canais intercelulares tipo junção gap, (9) estabilização das junções gap nos microtubulos, (10) internalização da placa de canais na forma de junções anulares e (11) completa degradação através das vias lisossomal e proteossomal.

A biosíntese de conexinas se dá pela inserção inicial de um mRNA no retículo endoplasmático para que ocorra sua tradução, sendo posteriormente transportado para o complexo de Golgi e daí para a membrana plasmática (DE MAIO et al., 2002; HERVÉ et al., 2007). No entanto, com relação a Cx26 parece

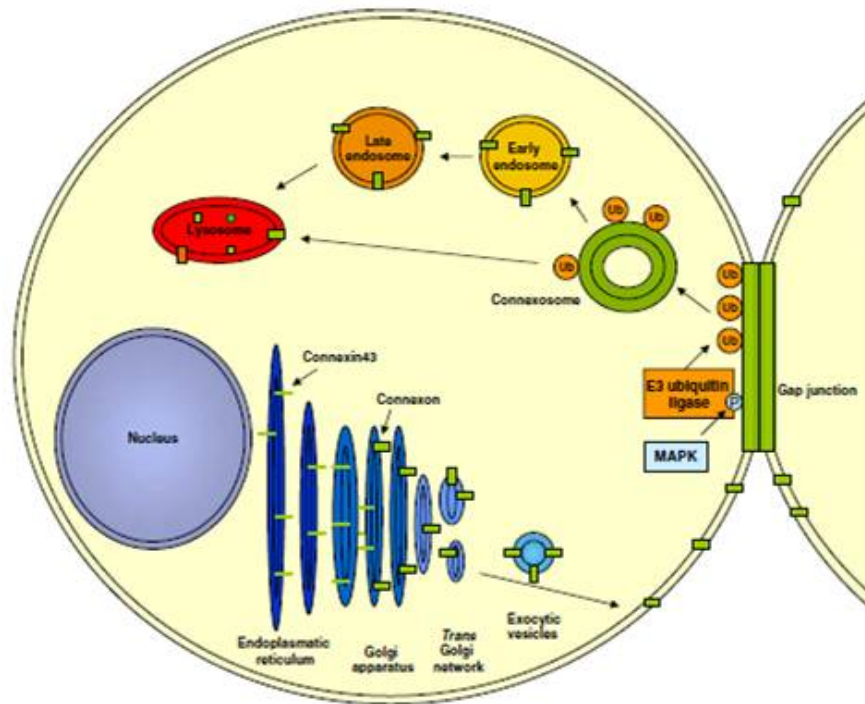


haver uma via independente do complexo de Golgi. O processo de oligomerização das conexinas para formação dos conéxons ainda é tema de debate, onde alguns pesquisadores atribuem ao retículo endoplasmático (RE) essa função, outros ao complexo de Golgi e outros a uma região especializada do RE, os CIREG (compartimentos intermediários entre o RE e o Golgi) (LAMPE; LAU, 2000; LAIRD, 2005).

#### 2.1.2.2 Degradação das Cxs

As principais vias de degradação das Cxs são a via lisossomal e a proteossômica. Após a síntese, oligomerização em conéxons, tráfego para a membrana e formação das placas juncionais, se inicia o processo de degradação das conexinas (LAIRD, 2005; LEITHE; RIVEDAL, 2007).

A degradação das conexinas se inicia por processo de endocitose, onde, a JG, com os fragmentos da membrana das duas células que a formam, são endocitados. Assim forma-se o conexossomo ou junção *Gap* anular, uma vesícula pentalaminar com dupla membrana, originada então de fragmentos das membranas e das junções gap das duas células envolvidas. A forte interação entre os conéxons é responsável pela não dissociação nesse processo. A partir daí, duas vias lisossomais são possíveis. Em uma o conexossomo pode se fundir com um lisossomo e desta forma promover a degradação direta das junções gap e, na sequência, das conexinas que as formavam. Na outra via de degradação ocorre com a maturação do conexossomo para dentro de um endossomo multivesicular. Nessa via ocorre o tráfego das conexinas do endossomo precoce para o tardio, antes da degradação das conexinas nos lisossomos (VANSLYKE; MUSIL, 2003; SEGRETAIN; FALK, 2004) (figura 3). A via proteossomal embora ainda não tenha sido completamente elucidada parece estar envolvida na via de degradação de conexinas em estado não fosforilado (SPRAY, 1998; HERVÉ et al., 2007; KJENSETH et al., 2010).



Fonte: (LEITHE; RIVEDAL, 2007)

Figura 3 – Ilustração da via de degradação das conexinas pelo endossomo precoce (*early endosome*) e endossomo tardio (*late endosome*).

### 2.1.2.3 Renovação das conexinas

O processo de renovação de muitos canais de membrana, entre eles das junções *gap*, está diretamente relacionado com a síntese e degradação das proteínas que os compõe e exibe um padrão relativamente rápido (SAFFITZ et al., 2000). Os processos de síntese e degradação estão estreitamente relacionados com

a estabilidade das proteínas e podem estar envolvidos também na regulação de sua atividade (SEGRETAIN; FALK, 2004). A expressão de uma determinada proteína em uma célula depende de uma fina regulação entre vários processos tais como a transcrição gênica, processamento do mRNA, síntese e arranjo da proteína, modificações pós-traducionais, transporte para a superfície da célula, ancoragem ao citoesqueleto, regulação da endocitose e degradação controlada da proteína (BEARDSLEE et al., 1998; HERVÉ et al., 2007).

Diferentes tipos celulares podem apresentar meia-vida diferente para as mesmas proteínas. Isso pode estar envolvido com a cinética de degradação e síntese de proteínas e também com a renovação da proteína em questão (HERVÉ et al., 2007). Deve-se considerar que distúrbios no metabolismo celular, como acidificação do citosol e aumento da concentração de glicose, podem alterar a expectativa de vida das Cxs. Já com relação a variações de temperatura e expectativa de vida das Cxs este fator não parece ser importante em homeotermos, situação que parece exercer influencia em pecilotermos (LAMPE; LAU, 2004).

Outro fator que está envolvido na meia vida das conexinas é a fosforilação. A fosforilação é uma ferramenta pós-traducional muito relevante na fisiologia celular e que é explorada pela natureza em diversas vias como mecanismo controlador em processos como proliferação e diferenciação celular, atividade enzimática, formação e degradação de complexos proteicos, motilidade, dentre outros. Parece ser muito importante na meia vida das Cxs (SÁEZ et al., 1998; LAMPE; LAU, 2000; KING, T. J.; LAMPE, 2005). Os mecanismos envolvidos na regulação da formação junções gap através da fosforilação das conexinas são bem complexos e dependem da conexina e kinase específica envolvida e, dependendo da conexina, seu efeito pode ser tanto de aumento quanto de diminuição de sua meia-vida (LAMPE; LAU, 2004).

Em um balanço geral, uma vez que as conexinas têm meia-vida menor que a meia-vida da célula, sua taxa de renovação é essencial para o balanço homeostático

celular e certamente está intimamente sincronizado com os eventos que regulam os níveis de junções *gap* presentes na superfície celular (HERVÉ et al., 2007).

#### 2.1.2.4 Expressão de Cxs em células e tecidos normais e neoplásicos

As conexinas estão distribuídas no diferentes tecidos e de forma bastante complexa. À exceção das células musculares estriadas adultas, dos espermatozoides e das células circulantes sanguíneas, todos os tecidos expressam uma ou várias conexinas e uma mesma conexina é geralmente encontrada em vários tecidos ou tipos celulares (AVANZO, 2005). A Cx 43 é a conexina mais amplamente distribuída, enquanto as Cx 33, 44 e 31 apresentam expressão mais restrita. Combinações ocorrem no mesmo tecido e inclusive na mesma placa. Por exemplo as cx 37 e 40 são co-expressas em vários tecidos, mas à níveis diferentes, enquanto as Cx 26 e 32 se apresentam na mesma placa juncional nos hepatócitos (GUERRIER et al., 1995).

Células que em seu genótipo normal apresentavam determinado nível de conexinas, em genótipos neoplásicos apresentavam diferença significativa tanto em quantidade de conexinas quanto em CIJG (YAMASAKI, 1991). Essas alterações podem ser tanto para mais quanto para menos e o que se acredita hoje, embora ainda sob investigação, é que as conexinas desempenhem papel de supressor de tumor nos estágios iniciais do câncer e facilite a invasão e metástase nos estágios mais avançados da doença (CRONIER et al., 2009; NAUS; LAIRD, 2010).

Algumas neoplasias têm mostrado menor expressão de conexinas em relação as suas células originais normais, como é o caso do hepatocarcinoma e os hepatócitos, onde a Cx 32 é menos expressa no tecido neoplásico (YANO et al.,

2001; EDWARDS et al., 2008). Glândula mamária normal, lesões hiperplásicas e neoplásicas benignas apresentaram um padrão específico de expressão de Cx 26 e 43 enquanto que lesões neoplásicas mostraram ter um padrão de Cx 26 superexpresso, porém com localização intracitoplasmática, diferente do que se espera, que é uma marcação em membrana (MESNIL et al., 2005; TORRES et al., 2005; MCLACHLAN et al., 2007). No quadro 1 pode-se observar o padrão heterogêneo entre os diversos tipos e entre células alteradas e não alteradas em relação à expressão das conexinas (MESNIL et al., 2005).

Quadro 1 - Estudo da expressão das conexinas em várias amostras de tumores Humanos (linhagem de células e amostras de tecidos). Fonte: MESNIL et al., 2005

Órgão/tecido	Patologia	Modelo	Expressão de Cx
<b>Mama</b>	Tecido normal	Tecido	Cx 26(-) Cx 43 marcou células mioepiteliais
	Lesões benignas	Tecido	Cx 43 marcou células mioepiteliais
	Carcinoma ductal	Tecido	Cx 43 marcou células mioepiteliais
	Carcinoma Lobular	Tecido	Cx 26(-) e Cx 43 (-)
	Carcinoma invasivo	Tecido	↑ Cx 26 (marcação intracitoplasmática + heterogênea: 15/27 amostras)
<b>Fígado</b>	Normal	Tecido	Cx 32(+), Cx 26(+) e Cx 43(-)
	Carcinoma hepatocelular	Tecido	Cx26 ↓, Cx32 = citoplasmática <sup>a</sup> Cx43 ↑ (citoplasmática)
<b>Pulmão</b>	Normal	Tecido	Cx26 (-), Cx32 (-), Cx43 (+)
	Carcinoma	Linhagem de células	Cx43 ↓ <sup>b</sup>
	Carcinoma de células pequenas	Tecido	Cx26 ↑, Cx32 (-), Cx43 ↓
	Adenocarcinomas e carcinomas epidermóides	Tecido	Cx43↑, Cx32 (-) pouco diferenciado
<b>Pele</b>	Normal	Tecido	Cx 43
	Carcinoma de células basais e carcinomas epidermóides	Tecido	Cx 43↓ <sup>c</sup>
	Carcinoma de células basais	Tecido	Cx 43↓ e Cx 26 ↓ <sup>d</sup>

*a - Deficiência no padrão normal de coloração da Cx 32 e localização alterada da marcação da Cx 26 em alguns tumores*

*b - comparada com células epiteliais de pulmão não transformadas*

*c - pequeno numero de junções gap pequenas e localização citoplasmática da Cx 43.*

*d -heterogeneidade da Imunofluorescência da Cx 26 com impressão de estar com marcação mais pronunciada na periferia dos tumores.*

## 2.2 CONEXINAS E CARCINOGENESE

As junções comunicantes do tipo GAP constituem-se de conexinas e representam uma especialização da membrana que permite a comunicação entre células adjacente. Atuam no processo de proliferação celular, fundamental para reprodução, crescimento e renovação das células, nas diversas fases da vida, mas também na proliferação celular neoplásica. O papel das JG e das conexinas na proliferação celular é complexo e ainda está sob investigação (DAGLI; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, 2007).

Já em 1966 foi descrito a ausência de JG em células cancerosas (LOEWENSTEIN, 1966) e desde então diversos estudos vem sendo realizados, buscando entender a correlação entre a expressão das conexinas e o câncer. Sabe-se que a perda ou diminuição da função das JG, frequentemente associada à mudança de expressão das conexinas, podem participar da progressão de uma variedade de tumores. Os tipos de conexinas, que tiveram sua expressão alterada, variam de acordo com o tipo de neoplasia (HAASS et al., 2010).

A participação de comunicações intercelulares aberrantes via JG na carcinogênese e o papel de supressão tumoral de genes da conexina foram bem documentados. No entanto, é necessária uma explicação clara para o papel de conexinas que estão localizados no compartimento intracelular de células cancerosas, bem como sua participação na apoptose e metástase (KANCZUGA-KODA et al., 2007).

É interessante notar que mutações em genes que codificam as conexinas são raramente observadas. Por isso a perda das comunicações intercelulares por JG parece estar envolvida em localizações ou expressões aberrantes destas (LI; HERLYN, 2000). Diversas pesquisas têm demonstrado também que a comunicação intercelular por JG em células cancerosas é deficiente seja por baixa expressão das conexinas, tráfico alterado para a membrana celular destas ou baixa habilidade para formar junções gap funcionais (KING, T.; BERTRAM, 2005). Dois dos maiores mecanismos que podem estar envolvidos na baixa regulação das conexinas são a

metilação dos genes que a codificam e a fosforilação pós-tradução da própria conexina (CHIPMAN et al., 2003). A interferência das modificações observadas nas JG e conexinas durante a proliferação celular geralmente resulta em diminuição nas comunicações intercelulares por JG, porém a relevância funcional destas alterações neste processo ainda é tema de grande discussão (VINKEN et al., 2006). Alguns experimentos têm sugerido que as conexinas exerçam influência na proliferação celular por mecanismos dependentes da comunicação por JG e também por outros independentes (ZHANG et al., 2003). Desta forma as conexinas teriam influência na proliferação celular não só por serem subunidades formadoras das JG, que são canais para inúmeros moduladores da proliferação celular, mas também por sua própria presença ou parte de sua molécula, atuando diretamente no controle da expressão gênica e desta forma no crescimento celular (CHIPMAN et al., 2003).

Localizações aberrantes das conexinas e/ou relações de determinadas conexinas com alteração na expressão de genes envolvidos com apoptose, como Bcl-2, Bak e Bax, tem sido observado em algumas neoplasias (KANCZUGA-KODA et al., 2007).

Ainda existem muitas questões a respeito da interferência das conexinas na proliferação celular, mas o que se observa nas neoplasias, embora muitas exceções venham sendo relatadas, é uma redução na comunicação por JG. Evidências substanciais sugerem que uma baixa regulação sustentada das comunicações intercelulares por JG forneça um estímulo promotor de neoplasias (CHIPMAN et al., 2003).

Outro fato observado é que a deficiência de conexinas aumenta a susceptibilidade tanto para carcinogênese espontânea quanto para induzida quimicamente, embora a inibição do crescimento causada por transfecção de genes que codificam conexinas, nem sempre esteja associada ao aumento da atividade das comunicações por JG (VINKEN et al., 2006).

Em um estudo *in vitro*, observou-se que a deleção de um dos alelos da conexina 43 resultou em diminuição da comunicação intercelular e aumento da taxa de proliferação celular de pneumócitos tipo II de camundongos Cx43<sup>+/-</sup> (AVANZO et al., 2007).



O papel das conexinas no processo metastático é um dos pontos importantes a serem desvendados na progressão neoplásica. Observou-se expressão aumentada de conexinas 43 e 26 em metástases em linfonodos de tumor de mama que não as expressava e o mesmo com relação a conexina 26 em metástases de melanoma. Segundo Kanczuga-koda et al. (2007), uma hipótese que explicaria em parte esta relação, seria que apenas as células com capacidade de expressar conexina estabeleceriam a comunicação necessária com as células endoteliais para invadir os vasos e se disseminar.

### 2.3 CARCINOGENÊSE

Conceitua-se a carcinogênese como um processo de múltiplas etapas que atencede o aparecimento de neoplasia (ROBINS; COTRAN, 2005). É classicamente dividido em 3 fases então denominadas como iniciação, promoção e progressão, nesta ordem (SCHEDIN; ELIAS, 1984).

Durante a fase de iniciação ocorre um dano permanente e irreversível ao DNA (PITOT; DRAGAN, 1991). Agentes físicos (ex.: radiação ultravioleta e ionizante), químicos (ex.: hidrocarbonetos aromáticos), microbiológicos (ex.: vírus) ou genéticos (hereditariedade) podem provocá-los (ROBINS; COTRAN, 2005). Como a divisão celular é um pré-requisito para ocorrência da mutação, fatores endógenos ou exógenos são necessários para promover o tumor (PITOT; DRAGAN, 1991). Na fase de promoção ocorre a expansão das células fenotipicamente alteradas (FABER; SARMA, 1987) a partir de um estímulo que pode ser decorrente da ação de um fator de crescimento ou algum xenobiótico. A fase de progressão caracteriza-se pela irreversibilidade conferida às células pelas alterações genéticas, incluindo alto potencial proliferativo, capacidade invasiva e metastática, além das alterações bioquímicas já presentes nas fases anteriores. Nas fases de iniciação e promoção, mutágenos e promotores devem cooperar intimamente no sentido de que as células

pré-malignas derivadas do clone iniciado se tornem completamente malignas (PITOT; DRAGAN, 1991).

O processo metastático ainda é pobremente entendido, embora seja o principal responsável pelas mortes nos casos de câncer. Sabe-se que a invasão prediz a capacidade de gerar metástase e que a ação de fatores de crescimento e moléculas da matriz atuam através de receptores nas membranas citoplasmáticas das células tumorais desencadeando cascatas de sinalização intracelular, direta ou indiretamente relacionada com a metástase. Especificamente no caso dos carcinomas, ocorre diminuição na expressão de E-caderina e ativação do citoesqueleto, resultando por sua vez em perda da conexão intercelular e projeção citoplasmática que conduz a mobilização através da membrana basal e do estroma, além de estabelecer novos contatos. A repetição deste ciclo gera a metástase. Há indício de que a transição epitelial-mesenquimal esteja envolvida na capacidade de invasão do estroma, em situações onde há quebra da adesão intercelular dependente de E-caderina e aumento da motilidade celular (GUARINO, 2007).

Logo, carcinogênese é certamente um processo de várias etapas e multifatorial bem mais complexo que o descrito anteriormente no paradigma iniciação-promoção-progressão (IRIGARAY; BELPOMME, 2010).

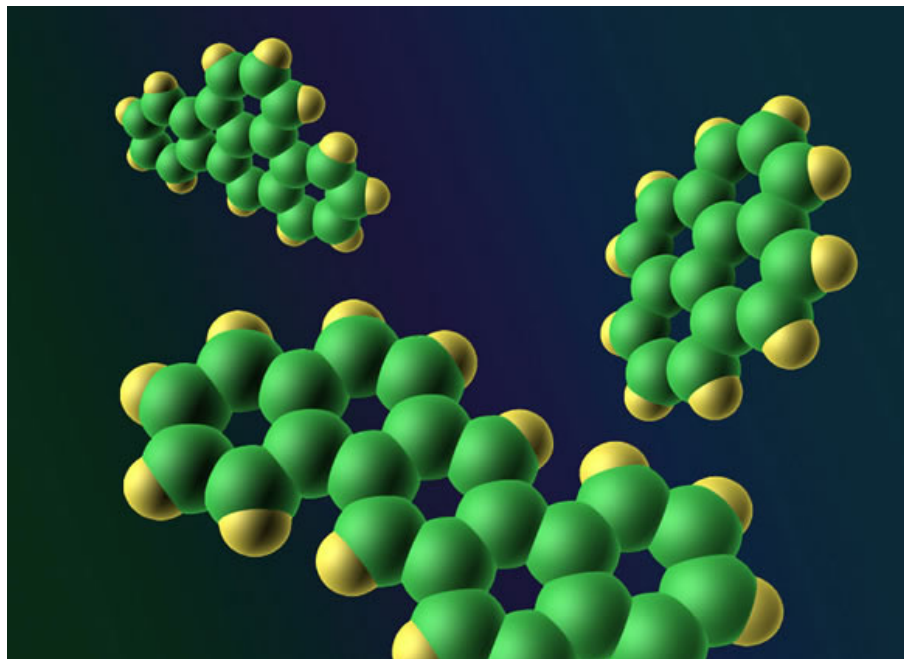
#### 2.4 7,12-DIMETILBENZANTRACENO (DMBA )

O DMBA é uma substância química pertencente ao grupo dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), em cuja família se encontram a maior parte dos carcinógenos químicos (CURRIER et al., 2005). De uma maneira geral, os HAPs necessitam ser metabolizados pelo sistema enzimático P450, onde CYPs específicas quanto a órgãos e moléculas químicas catalisam sua ação carcinogênica e imunossupressora, entre outras ações deletérias já definidas (ROWLANDS; GUSRAFSSON, 1997; IRIGARAY; BELPOMME, 2010). O receptor

Aril hidrocarbono (AhR) desempenha papel fundamental neste processo, atuando no controle da resposta biológica aos HAP como fator transcricional para codificação das enzimas que metabolizam xenobióticos, as CYPs, além de atuarem na proliferação e diferenciação celular (MARLOWE; PUGA, 2005; GALVÁN et al. 2005).

#### 2.4.1 Aspectos gerais dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs)

Os HAPs compreendem mais de 100 compostos orgânicos que se caracterizam por apresentarem 2 ou mais anéis aromáticos condensados (CAMARGO; TOLEDO, 2002) (Figura 1).



Fonte: Ferreira, AS; Mendes, A; Cruz, C. (2007/2008). Disponível em [http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g8\\_hap/index.html](http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g8_hap/index.html),

Figura 4 - Imagem esquemática de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

#### 2.4.1.1 Importância epidemiológica

São substâncias, bem como os seus derivados nitrados e oxigenados, amplamente encontradas no ambiente. São produzidos, predominantemente, a partir da combustão incompleta de matéria orgânica e são observados como contaminantes de solos, ar, água e alimentos (CAMARGO; TOLEDO, 2002). São considerados poluentes orgânicos de importância ambiental e toxicológica, uma vez que promovem ação pré-carcinogênica e/ou mutagênica para homens e animais (IARC, 1983; LOPES; ANDRADE, 1996). Podem ser emitidos a partir de fontes naturais, como queima espontânea de florestas e emissões vulcânicas, ou antropogênicas, que representam o processo principal. Estes incluem queima de madeira para produção de carvão, operações de transporte e refinação do [petróleo](#), [incineração](#) de resíduos domésticos e industriais, queimas de matéria orgânica de campos e florestas, geração de [energia](#) via queima de combustíveis fósseis, queima de querosene para a formação de [benzeno](#), [tolueno](#) e outros solventes orgânicos, emissão de motores de veículos (particularmente a diesel), fumo do [tabaco](#), e incêndios (CARDOSO; ALABURDA, 2008).

Por serem compostos altamente lipofílicos (LIN; ZHU, 2005), são rapidamente absorvidos por todas as vias de [acesso](#) orgânico (inalação, exposição oral e dérmica). A quantidade absorvida por inalação varia de acordo com o grau de contaminação atmosférica e a absorção de HAPs inalados ocorre principalmente através dos brônquios e em menor quantidade através dos alvéolos pulmonares. A absorção percutânea dá-se por difusão passiva e é rápida, embora com extensão de absorção variável entre os compostos e podendo ser afectada pelo veículo associado. Quando ingeridos, os HAPs são captados por compostos lipofílicos, sua absorção é rápida e aumenta na presença de óleos no tracto gastrointestinal. A solubilidade dos HAPs e a presença de bile também influencia a absorção. Os HAPs distribuem-se em quase todos os [tecidos](#), sendo as glândulas mamárias e outros tecidos gordos, locais importantes de depósitos, embora não haja acumulação significativa devido ao rápido metabolismo. O armazenamento ocorre principalmente nos rins, fígado e tecido adiposo, com pequenas quantidades no [baço](#), glândulas adrenais e [ovários](#). Seus metabólitos podem ser encontrados em níveis elevados no

tracto gastrointestinal, independentemente da via de administração, como resultado da excreção hepatobiliar. Há transferência placentária, porém de forma limitada e, deste modo, os níveis fetais não são tão elevados como na mãe; estão presentes no leite materno (YARK, 1983).

#### 2.4.1.2 Características físico-químicas

As características físico-químicas dos HPAs são amplamente influenciadas pelo sistema de duplas conjugadas que esta classe de compostos apresenta. À temperatura ambiente todos os HPAs são sólidos e apresentam, comumente, altas temperaturas de fusão e ebulição, baixas pressão de vapor e solubilidade em água. Os dois últimos parâmetros tendem a apresentar valores menores a medida que aumenta a massa molecular (LOPES; ANDRADE; ANDRADE, 1996). Alguns HPAs são semi-voláteis, porém, muitos deles podem ser transportados até longas distâncias e serem adsorvidos em material particulado (LIN; ZHU, 2005; GODOI, 2004). HPAs com 2 ou 3 anéis aromáticos estão quase totalmente na fase de vapor; aqueles com 4 anéis encontram-se numa posição intermediária. Os HPAs com 5 ou mais anéis aromáticos são encontrados predominantemente em particulados (cinzas ou fuligens cujas partículas são menores que 2,5  $\mu\text{m}$ ) (CONDE, 2004).

#### 2.4.1.3 Metabolismo e ação deletéria

A lipofilia é umas de suas propriedades fundamentais para a carcinogênese, pois lhe permite se acumular no tecido adiposo para posteriormente ser liberado no sangue, alcançando os tecidos alvos (MCTIERNAN, 2007). O HAP na verdade é um

pró-carcinógeno, pois precisa ser ativado metabolicamente pelo sistema do citocromo P540, gerando metabólitos capazes então de formar adutos com o DNA. Caracterizam-se por serem estáveis e volumosos, não podendo ser reparados pelos sistemas de reparação (IRIGARAY; BELPOMME, 2010).

Sua lipofilia lhes permite penetrar facilmente as membranas celulares (JACOBY; ZIEGLER, 1990; NERBERT; DALTON, 2006). Apresentam metabolismo complexo, o que ocorre em todos os tecidos que contém gordura e envolve vias diversas. Embora a finalidade seja excretá-los, o processo metabólico acaba possibilitando uma ação tóxica e/ou carcinogênica (IRIGARAY; BELPOMME, 2010).

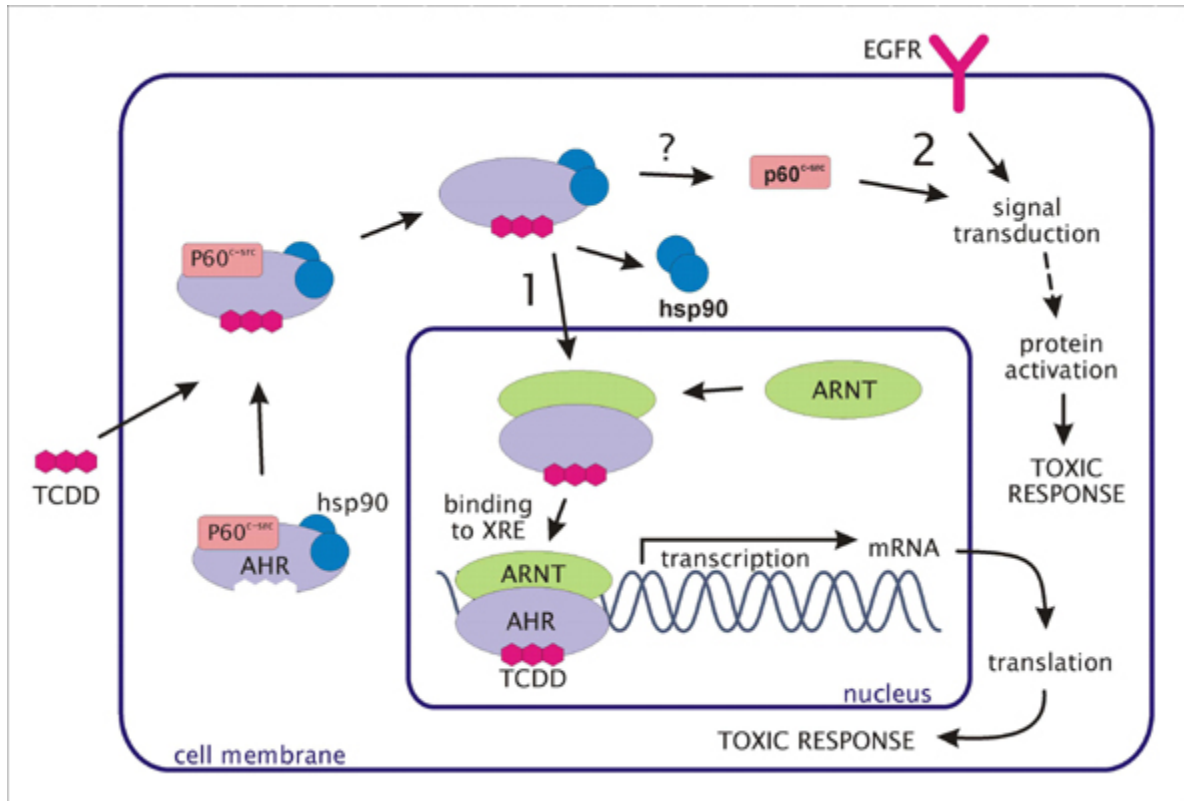
As maiores rotas de eliminação destas substâncias após metabolismo hepático são predominantemente as [fezes](#) e, em níveis muito baixos, a [urina](#) (PELKONEN; NEBERT, 1989). A ação deletéria dos HAP compreende danos aos sistemas respiratório, digestório, hepático, genitourinário, tegumentar e linfematopoioético, passando por alterações menos graves como irritação e tosse, até imunossupressoras e o desenvolvimento de neoplasias (IRIGARAY; BELPOMME, 2010).

O câncer é o efeito tóxico dos HAPs de maior significado. O citocromo P450 adiciona oxigênio ao anel, tornando-o mais solúvel em água e criando âncoras para a ligação de grupos volumosos como açúcares ou glutathione (IRIGARAY; BELPOMME, 2010). De uma maneira geral, estes compostos são convertidos a óxidos e dihidrodíóis, que são oxidados a diol epóxidos. Ambos os metabólitos reagem com o DNA. Os óxidos podem formar adutos estáveis com o DNA e os diol epóxidos podem formar adutos estáveis e depurinadores com o DNA por meio de carbânions eletrofílicos (SHIMADA; FUJI-KURIYAMA, 2004). A reatividade dos óxidos e dos diol epóxidos é dependente da topologia (ex região bay, região fjord, tipos de anel), e a reatividade dos diol epóxidos é dependente de fatores tais como estereoquímica e grau de planaridade. Tanto os adutos estáveis como os depurinativos são formados primeiro com adeninas e guaninas e induzem mutações que estão fortemente associadas.

#### 2.4.2 O receptor aril hidrocarbono (AhR)

O AhR é um fator transcricional de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos e de genes envolvidos no crescimento e diferenciação celular; sendo dependente de um ligante . Está amplamente distribuído em células e tecidos, situa-se no citoplasma e após se ligar ao ligante, por exemplo um HAP, entra no núcleo e se liga à sequências específicas do DNA, flanqueando os genes regulados pelo AhR (MARLOWE; PUGA, 2005; FUJI-KURIYAMA; MIMURA, 2003) .

Quando um HAP se liga ao AhR, este se complexa com *Heat-Shock* 90 (hsp90) e este é translocado para o núcleo, libera a molécula de hsp90 e se dimeriza com o co-fator AhR-Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) (TROMBINO et al. 2000; FUJI-KURIYAMA; MIMURA, 2003), formando o complexo heterodimérico AhR-Arnt que vai ligar os metabólitos xenobióticos na região promotora do genes alvo para ativar sua expressão (FUJI-KURIYAMA; MIMURA, 2003) (figura 5). Ligantes que se combinam com AhR ativam a transcrição de genes-alvo que codificam para as três CYP1s e, também e de forma independente, ativam genes que controlam respostas celulares, tais a proliferação celular, controle do ciclo celular e apoptose. Conseqüentemente, a ativação do AhR pode induzir um amplo espectro de efeitos co-carcinogênicos e promotores tumorais. São exemplos as dioxinas, que atuam como promotores de tumor, e dos HAP, que produzem co-carcinógenos, pela ação das CYPS (NEBERT, 1990) e, conseqüentemente, a ativação de co-carcinógenos LPAHs em promotores de tumor e HPAHs em promotores do tumor e mutagênicos. Além disso, a ativação de genes CYP, como CYP1A1 pode gerar radicais livres através da indução de estresse oxidativo (IRIGARAY; BELPOMME, 2010).



Fonte: <http://www.helsinki.fi/science/dentenv/dioxin.html>,

Figura 5 – Via do AhR.

E provável que o AhR atue por diversas vias e que ocorra *cross-talk* com outros receptores nucleares capazes de um controle tecido-específico e célula-específica de expressão de genes (IRIGARAY; BELPOMME, 2010).

#### 2.4.3 As enzimas do sistema citocromo P450 (CYP)

O sistema citocromo P450 constitui-se de uma superfamília de enzimas do tipo monoxigenases que contém fração heme (NELSON et al., 1996). É encontrado



em diversas espécies de mamíferos, incluindo camundongos, desempenhando, através de determinado número de enzimas, um papel decisivo na ativação de carcinógenos (GUENGERICK, 1997).

As enzimas citocromo P540 participam, em maioria, do metabolismo oxidativo de drogas, substâncias exógenas, como contaminantes ambientais, e substratos endógenos (GUENGERICK, 1997; ROWLANDS; GUSTAFSSON, 1997). Desta forma, atuam na toxicidade dos xenobióticos, o que depende substancialmente da relação entre a bioativação e a desintoxicação. Os membros da família CYP1, 1A1, 1A2 e 1B1, são de particular interesse por sua capacidade de metabolizar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) a metabólitos reativos.

As enzimas CYP1 são expressas de maneira tecido-específica (GUENGERICH, 1997; ROWLANDS; GUSTAFSSON, 1997) e podem ser induzidas por ativação de AhR a partir da sua interação com substâncias tóxicas ambientais, tais como os bifenil policlorados, dioxina, e HAPs (ROWLANDS; GUSTAFSSON, 1997).

A CYP1A2 é expressa primariamente no fígado e a CYP1A1 não é expressa constitutivamente em tecido algum, sendo induzida por dioxinas e hidrocarbonetos aromáticos em quase todos os tecidos (KIMURA et al., 1986).

A CYP1B1 é expressa constitutivamente em tecidos esteroideogênicos, como a adrenal, os ovários e os testículos, e é induzível por ligantes do receptor aril hidrocarbono, adrenocorticotropina, hormônios peptídeos e AMPc, sendo expressa em tecidos responsivos a esteróides, como útero, mama e próstata; embora não seja expressa nos principais órgãos metabólicos. Desta forma, tem-se que CYP1B1 é uma enzima cuja expressão em tecidos reprodutivos e diversos tecidos neoplásicos, somado à sua capacidade de ativar metabolicamente HA, apresenta um papel importante na carcinogênese química (BUTERS et al. 1999).

## 2.5 CARCINOGENESE POR DMBA

O DMBA é um carcinógeno frequentemente utilizado em modelos experimentais na pesquisa oncológica (AVANZO, 2008). Seu potencial para carcinogênese mamária sobretudo, tem sido um dos principais focos dos estudos que permitem, por exemplo, investigar substâncias moduladoras da tumorigênese (BARROS et al., 2004).

De modo geral, o DMBA (figura 6) conduz ao aumento da atividade de AhR e, conseqüentemente, da expressão das enzimas CYP, convertendo o HAP em compostos intermediários do tipo epóxido mutagênicos, capazes de formarem adutos com o DNA (TALMUSKI et al., 1973; HOFFMAN; GAY, 1981.).

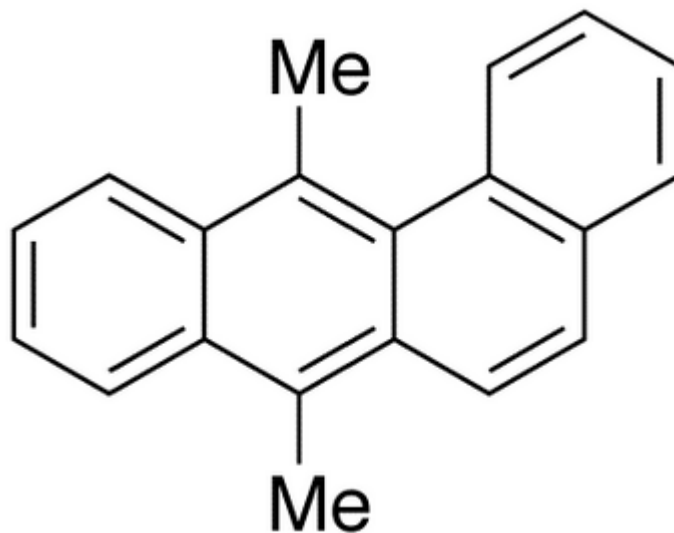


Figura 6 – Fórmula estrutural de uma molécula de 7,12-dimetilbenzantraceno.

Sabe-se que as CYP1A1 e CYP1A2 são capazes de converterem o DMBA em 3 compostos epóxidos mutagênicos, 7-hidroximetil-12-metilbenzantraceno, 12-hidroximetil-7-benzantraceno e o 7,12-dimetil-idroxibenzantraceno. Com a administração do DMBA, todos os 3 metabólitos são observados no fígado, enquanto na mama apenas os monohidróxidos (TALMUSKI et al., 1973).

A CYP1B1 também metaboliza o DMBA (POTTENGER; JEFFCOATE, 1990; POTTENGER et al., 1991; CRESPI et al., 1997) e, embora também seja induzível, como os outros membros da família CYP1 (CYP1A1 e CYP1A2) (SUTTER et al., 1994), observa-se um padrão de expressão que a difere das demais (BUTERS et al., 1999).

Mostrou-se que a CYP1B1 é essencial para que ocorra formação de adutos no DNA a partir da ação do HAP em vários tecidos periféricos, incluindo ovário, testículo, útero e pele. No entanto, observou-se um aumento paradoxal na formação de tumores pulmonares em camundongos *knockout* para CYP1B1, enquanto outros tumores diminuíram (BUTERS et al., 2003).

Mais notadamente a CYP1A1, mas também outras enzimas, podem atuar na carcinogênese por DMBA em tecidos suscetíveis de camundongos *knockout* para CYP1B1 enquanto a CYP1B1 dos camundongos selvagens pode ter efeito protetor contra carcinogênese por DMBA em células menos suscetíveis (GALVÁN et al., 2005).

Outros experimentos com camundongos *knockouts* para CYP1B1, demonstraram efeito protetor da ausência da enzima contra carcinogênese de linfomas pelo DMBA, enquanto animais normais desenvolviam linfomas e toxicidade na medula óssea (STOILOV; AKARSU; SARFARAZI, 1997 apud BUTERS et al., 1999).

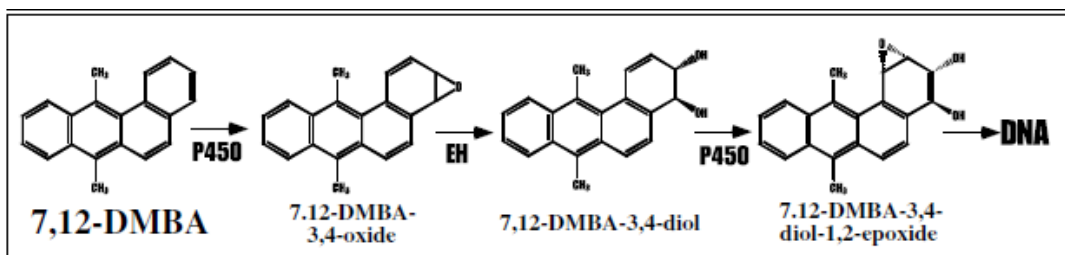
Notou-se também que camundongos *knockouts* para CYP1B1 retinham a capacidade de induzir CYP1A1 no fígado, indicando que esta não é a fonte da lesão de medula óssea induzida pelo DMBA (HEIDEL et al., 2000).

Outro aspecto importante é o fato de que a CYP1B1 é expressa no fígado e rim apenas em níveis muito baixos, mesmo após exposição a HAPs (SAVAS et al.,

1994). Enquanto CYP1A1 está presente em níveis substanciais após a mesma exposição (BUTERS et al. 1999).

Na mesma linha de experimentos, observou-se um aumento na expressão de CYP1A1 em pulmão de camundongos *knockouts* para CYP1B1, comparado aos selvagens, quando da administração do DMBA, e, mais uma vez, um aparente aumento na incidência de tumores pulmonares. Como a expressão de CYP1B1 é essencialmente ausente em cada um dos principais órgãos metabólicos, é improvável que a remoção de CYP1B1 alterasse a farmacocinética do DMBA. Embora haja indício de que CYP1A1 aumente a tumorigênese pulmonar, os autores consideram pouco provável que haja influência na geração de linfoblastomas de acordo com seus resultados. Além disso, CYP1A1 é várias vezes mais ativa que CYP1B1 na metabolização do DMBA, apesar de produzir apenas pequena parte de alguns metabólitos carcinogênicos e por conseguinte ser possivelmente ineficiente na ativação de HCPs (CHRISTOU et al, 1994). Apesar disso, a maior parte de 3,4 dihidrodíol, um dos metabólitos carcinogênicos do DMBA, surge a partir de altos níveis de CYP1A1 (POTTENGER; JEFCOATE, 1990).

Abaixo se apresenta a via de ativação metabólica do DMBA (figura 7).



Fonte: (Shimada; Fuji-Kuiyama, 2003).

Figura 7 – Esquema da ativação metabólica do DMBA por diolepoidação na região bay da molécula por P450 e epóxido hidrolase

## 2.6 CAMUNDONGOS Cx43 +/-

O advento da ciência genética e a sua evolução ao longo de mais de um século e meio de pesquisas, descortinou os princípios da hereditariedade e alcançou a possibilidade de imitar eventos biológicos em laboratório através da manipulação genética de seres vivos. Tal fato vem revolucionar o conhecimento biomédico, permitindo vislumbrar novas possibilidades terapêuticas (CHAIBLE et al., 2010).

Reaume et al. criaram em 1995 os camundongos deficientes em conexina 43, com o intuito de analisar a influência da deleção total do gene desta conexina sobre o desenvolvimento do embrião, cuja expressão é observada já no estágio de blástula. Os pesquisadores constataram um desenvolvimento intra-uterino normal, porém, após o nascimento os camundongos sobreviviam não mais do que alguns minutos. Os animais apresentam uma malformação cardíaca incompatível com a vida extra-uterina, sem o suprimento de oxigênio e nutrientes maternos. Na época, especulou-se a cerca da possibilidade do envolvimento de outras conexinas como uma tentativa de compensação pela deficiência da Cx43.

Algum tempo depois foi demonstrado que a deficiência total de cx43 determina também malformação em outros locais, incluindo crânio, mandíbula, clavícula, costelas e antebraço (LECANDA et al., 2000).

Dada à inviabilidade de camundongos *knockouts* para Cx43 (Cx43<sup>-/-</sup>) e, em contrapartida, também à importância da mesma na homeostase celular e tecidual, animais heterozigotos (Cx43 +/-) tem sido utilizados nos diversos estudos sobre o papel desta proteína nos processos fisiológicos e de desenvolvimento de neoplasias (AVANZO, 2005).

OBJETIVOS

### 3 OBJETIVOS

Podemos dividi-los em geral e específicos.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel da conexina 43 no processo de carcinogênese induzida pela administração por gavagem do carcinógeno 7,12-dimetilbenzantraceno em camundongos BALB/c.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar modelo de carcinogênese administrando DMBA por gavagem camundongos geneticamente modificados para a conexina 43 (Cx43<sup>+/-</sup>) ou selvagens (Cx43<sup>+/+</sup>);
- Avaliar a sobrevivência dos animais após o início do experimento;
- Realizar avaliação macroscópica, qualitativa e quantitativa, das neoplasias desenvolvidas;
- Realizar avaliação microscópica, qualitativa e quantitativa, das neoplasias desenvolvidas em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina;
- Comparar e analisar os resultados observados nos camundongos Cx43<sup>+/-</sup> e nos Cx43<sup>+/+</sup>;

## **MATERIAL E MÉTODOS**



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Dispõe-se o capítulo na seguinte ordem de apresentação:

### 4.1 ANIMAIS

O modelo experimental escolhido foram os camundongos da linhagem BALB/c, manipulados geneticamente para deleção de um dos alelos da Cx43.

#### 4.1.1 Camundongos heterozigotos para Cx43

Os camundongos deficientes em Cx43 foram originalmente estabelecidos por Reaume et al. (1995) e adquiridos dos Laboratórios Jackson (Paris) pela International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, França. Estes animais foram gentilmente doados pelo Dr. Hiroshi Yamasaki (Kanagawa - Japão) ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em cujo biotério se encontram seus descendentes atualmente. O *background* genético original destes camundongos era proveniente da linhagem C57BL/6.

Como os camundongos *knockout* para Cx43 (Cx43<sup>-/-</sup>) morrem ao nascer devido à malformação cardíaca (REAUME et al., 1995), no presente trabalho foram utilizados os camundongos Cx43<sup>+/-</sup> (heterozigoto) e Cx43<sup>+/+</sup> (selvagem). Utilizamos animais deficientes para a Cx43 com *background* genético da linhagem Balb/c.

#### 4.1.2 Certificado de Biossegurança e normas para a manutenção e trabalhos em contenção com animais geneticamente modificados

O biotério do Departamento de Patologia da FMVZ – USP, bem como o Laboratório de Oncologia Experimental, possuem extensão do certificado de biossegurança da FMVZ-USP (CQB no. 100/99), de acordo com as informações da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), com base na instrução normativa da CTNBio nº. 12, publicada no Diário Oficial da União nº. 100-E, de 28 de maio de 1998, Seção 1, páginas 10-12. Os animais estão alojados em sala isolada na área de criação do Biotério da FMVZ – USP, que foi especialmente preparada para recebê-los. Para tanto, foram vedadas todas as possíveis passagens de insetos e de camundongos. Há cartazes indicativos da presença deles nos locais em que serão manipulados. Os referidos animais permaneceram em caixas de policarbonato, sob condições controladas de temperatura ( $20\pm 4^{\circ}$  C) e umidade relativa do ar (45% - 75%), sob um ciclo de 12 horas de claro/escuro. Os animais recebiam água (filtrada,  $\text{pH} \pm 7.0$ ) e ração padronizada (Nuvilab-CR1®,) *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo comitê de bioética da FMVZ/USP com o número de protocolo 1876/2010.

#### 4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 150 animais, inicialmente separados em grupo controle (GC) e grupo experimental (GE), contendo 20 e 130 animais respectivamente. No GE, cada animal recebeu doses hebdomadárias de 1mg de DMBA diluído em 0,5 ml de óleo de milho (Liza®) por gavagem, alcançando a dose total de 9 mg por animal ao final do mesmo número de semanas. No GC, os animais foram submetidos ao mesmo tratamento, porém recebendo óleo de milho comercial puro; foram utilizadas sondas diferentes para cada grupo. Posteriormente os animais foram genotipados e separados em grupos de camundongos geneticamente manipulados heterozigotos ( $\text{Cx43}^{+/-}$ ) e camundongos selvagens ( $\text{Cx43}^{+/+}$ ) com vistas à comparação dos

resultados. Os camundongos foram desmamados com quatro semanas de vida e entraram no experimento com idade variando de 6 a 10 semanas. Todos os animais, do início ao fim do experimento, eram pesados semanalmente. Inspeção e palpação eram realizadas, a princípio, nos dias de pesagem. Quando da detecção de sinais clínicos, a observação passava a ser em espaços de tempo mais estreitos, de acordo com a gravidade do quadro. Todos os animais ou evoluíram para óbito, ou foram eutanasiados *in extremis* ou ainda, no caso dos animais controles, ao final de 12 meses de experimento. Os animais foram eutanasiados com tiopental sódico na sobredose de 200 mg/kg de peso vivo, seguindo-se exame anátomo-patológico e coleta de amostras teciduais.

### 4.3 GENOTIPAGEM

Para a identificação do genótipo dos animais a serem utilizados neste experimento, coletou-se um fragmento de 0.5 cm da cauda de cada exemplar. Cada fragmento era identificado e colocado em nitrogênio líquido para posterior armazenamento em freezer -80°C até o momento da extração do DNA. Nesta etapa, as amostras eram maceradas e colocadas em microtubos contendo tampão de extração acrescido de proteinase K, para sofrer digestão; processo realizado em banho-maria à 65°C durante 2 horas. Seguindo-se o protocolo, as amostras eram então acrescidas de tampão de lise, homogeneizadas e centrifugadas durante 20 minutos (15.000 rpm e a 4°C). Cerca de 200 µl da fase aquosa eram transferidos para um novo tubo, sendo adicionado 400 µl de etanol absoluto e 20 µl de acetato de sódio 3M (pH 5.2) a fim de precipitar o DNA. Após centrifugação por 10 minutos e 5.000 rpm (4°C), o DNA era lavado com etanol 70% e dissolvido em 200 µl de TE (Tris/EDTA). Na sequência, procedia-se à quantificação do DNA no BioPhotometro com vistas a padronizar a concentração do mesmo para amplificação no termociclador. Desta forma o DNA de cada camundongo era analisado por PCR com primers para os genes: **Cx43** senso 5'CCCCACTCTCACCTATGTCTCC3' e anti-senso 5'ACTTTTGCCGCCTAGCTATCCC3'; **NEO** senso 5'GGCCACAGTCGATGAATCCAG3' e anti-senso 5'TATCCATCATGGCTGATGCAA3' (YAMAKAGE et al., 1998). A reação da polimerase em cadeia (PCR) para a Cx43 foi realizada durante 1 ciclo, na condição

de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos à 94°C por 30s, 55°C por 1 minuto, 72°C por 4 minutos, 1 ciclo à 72°C por 4 minutos e 1 ciclo à 4°C por 60 minutos

#### 4.4 ANATOMO-PATOLOGIA

Após o óbito, todos os animais foram pesados (PV) e necropsiados. Fragmentos de tumor e de órgãos, alterados ou não macroscopicamente, foram coletados e fixados nas soluções de formalina 10% e metacarn (60% metanol, 60% clorofórmio e 10% ac. acético glacial), por 24 e 3 horas respectivamente, e então colocados em álcool 70%. O material foi processado pelos métodos histológicos de rotina, incluídos em parafina, cortados em 5 µm de espessura e corados por hematoxilina e eosina (TILLMANN et al., 1999). Parte dos tumores em condições de análise foi congelada em nitrogênio líquido e mantida em freezer -80°C para avaliação posterior pelas técnicas de biologia molecular (RT-PCR e Western Blot). A avaliação histopatológica dos tumores foi feita seguindo os critérios adotados pela International Agency for Research on Cancer (IARC), Organização Mundial de Saúde (WHO) (TUROSOV; MOHR, 1994).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram resumidas por grupo de estudo pelas estatísticas descritivas pertinentes: média, desvio padrão (dp), mediana, valores mínimo e máximo para as variáveis quantitativas e frequências absoluta e relativa (%) para as variáveis categóricas.

Os grupos foram comparados quanto às variáveis categóricas pelo Teste do Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher, de acordo com a indicação.

Foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes na comparação entre os grupos quanto às variáveis de tempo.

As curvas de sobrevida total foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e o teste do Log Rank foi utilizado para comparar as curvas de sobrevida dos grupos de estudo.

Adotou-se o nível de significância de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ) e níveis descritivos (p-valores) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

RESULTADOS

## 5 RESULTADOS

Os resultados observados serão apresentados em tópicos, considerando que nenhuma alteração, de qualquer natureza, foi observada nos animais controles.

### 5.1 GENOTIPAGEM

A caracterização genotípica dos camundongos quanto à conexina 43 se dá pela visualização de uma ou duas bandas no gel de agarose. Os Cx43<sup>+/+</sup> apresentam uma única banda e os Cx43<sup>+/-</sup> duas. A presença do gene neo e do gene Cx43 gera as duas bandas indicando se tratar de Cx34 <sup>+/-</sup> (figura 1).

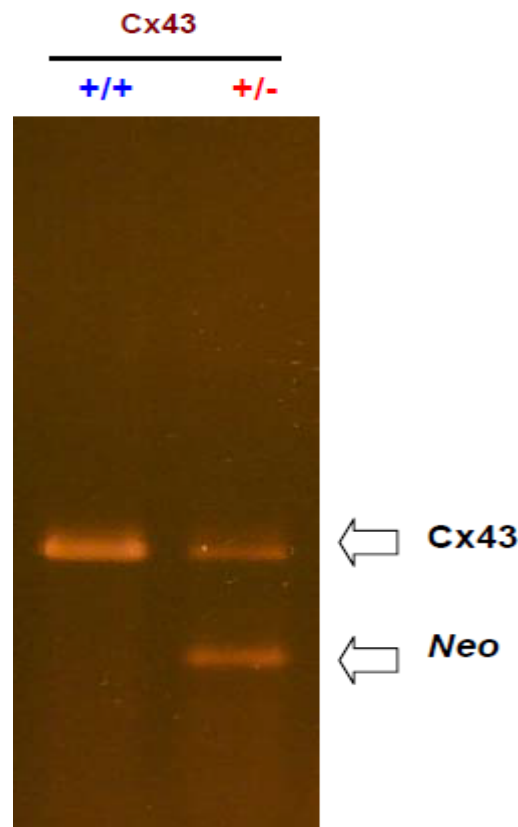


Figura 1 – Imagem do gel de agarose, apresentando a marcação das bandas que correspondem aos amplicons que identificam os camundongos Cx43<sup>+/+</sup> e Cx43<sup>+/-</sup>

A identificação genotípica pelo método de PCR resultou em 85 animais Cx43+/+ e 65 Cx43+/-, permitindo assim comparação dos resultados clínicos e patológicos.

## 5.2 ACHADOS CLÍNICOS

As principais alterações observadas foram as tumorais. No entanto, alterações cutâneas inespecíficas, tais como alopecia e lesões crostosas circulares (figura 10 - A) também foram observadas aleatoriamente distribuídas e em quantidade variável. Não houve diferença expressiva entre os grupos.

Lesões cutâneas crostosas em placas ou nódulos e exofíticas (figuras 11 - B, 12 - C, D e H, 13 - G) foram observadas com menor frequência e entraram na análise das lesões tumorais. Também não houve diferença estatística significativa (Tabela 1).

O surgimento das lesões neoplásicas externamente identificáveis nos animais heterozigotos ocorreu em média de 116 dias ( $\pm 25,03$ ) após o início da administração, tempo mínimo 89 e máximo 162 dias. Entre os homozigotos a média ficou em 103 dias ( $\pm 22,63$ ), tempo mínimo de 53 e máximo de 125 dias. Não houve diferença estatística significativa pelo teste do Log-Rank ( $p = 0,1811$ ).

Distensão abdominal marcada foi observada em 84 % e 85%, respectivamente, dos animais Cx43+/+ e Cx43+/- que fizeram carcinomatose decorrente de carcinoma gástrico (figuras 10A, 11B e 13G), conforme avaliação posterior.

A sobrevida após o aparecimento dos tumores nos animais heterozigotos ocorreu em média de 35 dias ( $\pm 31,01$ ), tempo mínimo 2 e máximo 93 dias. Entre os homozigotos a média ficou em 35 dias ( $\pm 31,12$ ), tempo mínimo de 5 e máximo de 110 dias. Não houve diferença estatística significativa pelo teste do Log-Rank ( $P = 0,5611$ ). O gráfico da sobrevida após a detecção dos tumores é melhor visualizado no gráfico 1.



### tempo para início dos sintomas

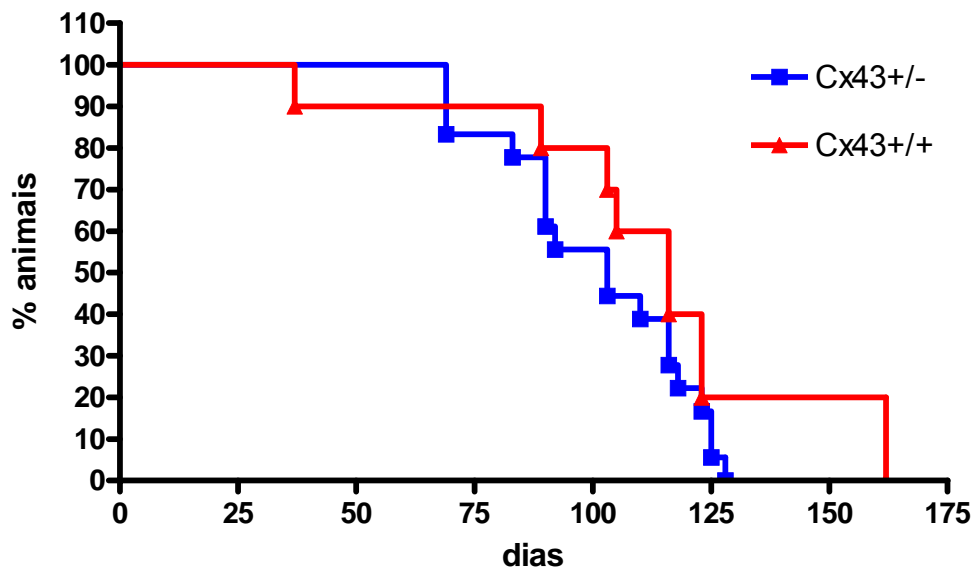


Gráfico 1 – Tempo de sobrevivência após o início do surgimento de neoplasias macroscopicamente detectáveis, decorrente da administração do DMBA aos camundongos Cx43+/- e Cx43+/+.

Considerando-se a sobrevivência após o início da administração do carcinógeno também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de animais ( $p = 0,9858$ ) (gráfico 2). No grupo Cx43+/-, o menor período foi 58 dias e o maior 238 dias, com média  $152 \pm 40$ . No grupo Cx43+/+, o menor período foi 91 dias e o maior 243, com média  $156 \pm 50$ .

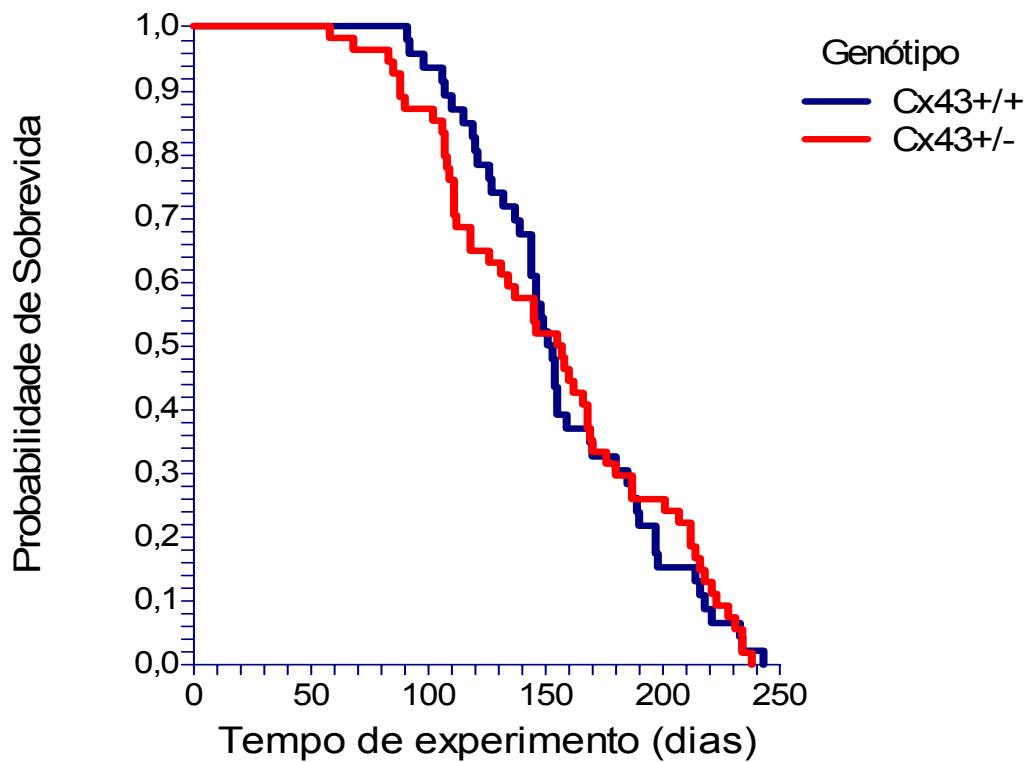


Gráfico 2 – Probabilidade de sobrevivência desde o início da administração do DMBA aos camundongos Cx43+/- e Cx43+/+.

Na análise do peso ao longo do tempo não se observou diferença significativa. No entanto, paralelamente ao desenvolvimento dos tumores, todos os animais tiveram perda de massa corpórea visível e igualmente progressiva (gráfico 3).

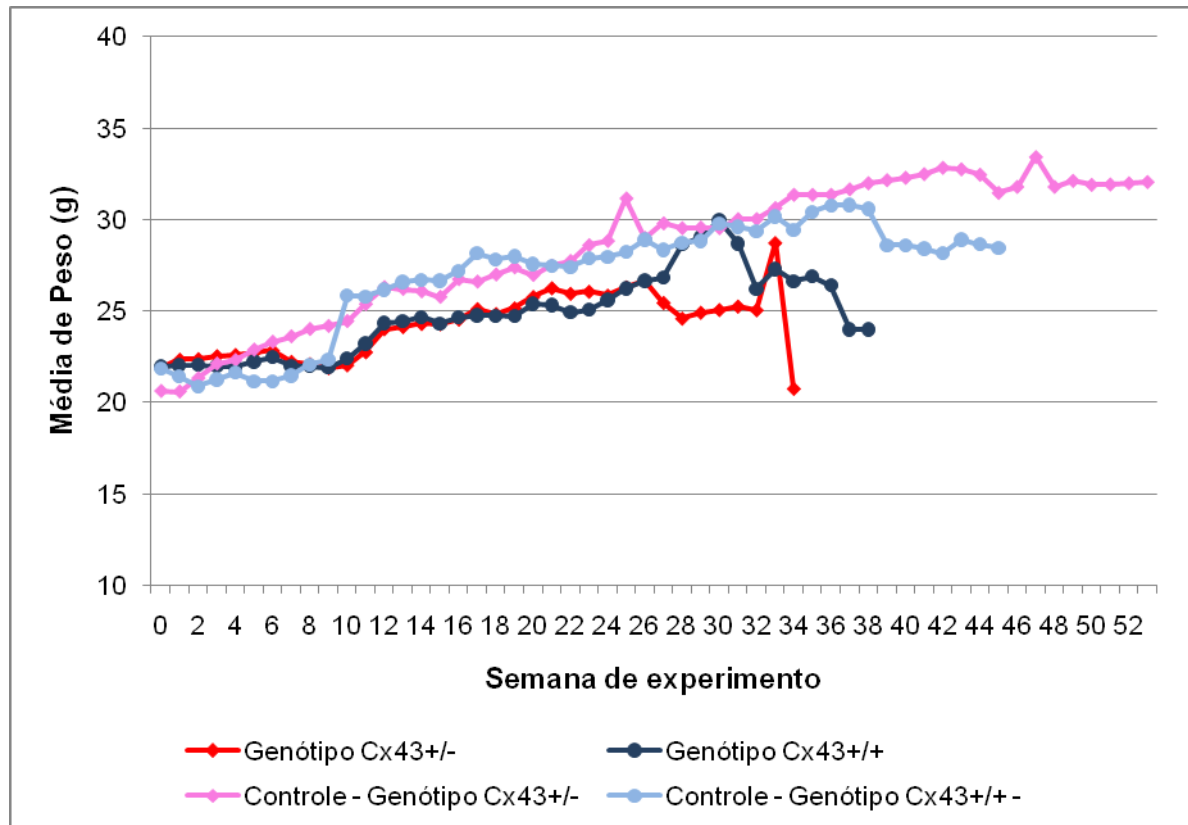


Gráfico 3 – Análise da variação média de peso ao longo do experimento em ambos os grupos experimentais, mostrando não haver diferença significativa. A queda acentuada do número de animais nas últimas semanas podem ter comprometido o traçado em Cx43+/-.

### 5.3 CARCINOGENESE

Todos os animais que receberam DMBA desenvolveram ao menos um tipo de neoplasia. Os tipos neoplásicos, quanto à histogênese, incluíram tumores de mama, tecido linfóide, estômago, pulmão, pele e ovário, nesta ordem, do mais para o menos frequente. Deve-se considerar que nenhum dos animais Cx43+/+ apresentou tumor ovariano. Porém a ordem de prevalência foi a mesma em ambos os grupos. Na tabela 1 encontram-se os valores gerais quanto à incidência dos tipos neoplásicos em ambos os grupos, conforme descorre-se a seguir.

Numa análise geral, independente do grupo e ocorrência simultânea de mais de um tipo neoplásico por animal, observou-se um total de 211 tumores em 130

animais, que 50% dos animais apresentaram tumores de mama, 39,2% linfomas, 27,7% neoplasias gástricas, 24,6% pulmonares, 13,1% cutâneas e 6,9 % ovarianas.

O grupo Cx43+/- continha 85 animais, sendo 10 destes animais controles. Dos 75 que receberam DMBA, 100% desenvolveram neoplasia evoluindo ao óbito ou sendo sacrificado *in extremis*. Num total de 133 tipos neoplásicos diferentes quanto a origem, constatou-se uma média de 1,8 tumores por animal.

No grupo Cx43+/, com 65 animais, sendo 10 controles, igualmente observou-se o desenvolvimento de neoplasias em 100% dos animais que receberam o carcinógeno. Num total de 77 tipos neoplásicos diferentes quanto a origem, a média de neoplasias por animal foi 1,4.

O grupo Cx43+/- apresentou maior número de neoplasias em quase todos os tipos neoplásicos com exceção dos tumores de pele, onde observou-se 10,7% de neoplasias cutâneas contra 16,4% do grupo Cx43+/+.

No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais quanto aos percentuais de acometimento por neoplasia nos órgãos: mama ( $p = 3747$ ), linfócitos ( $p = 0,5664$ ), estômago ( $p = 0,6254$ ), pulmão (0,0614) e pele ( $p = 0,3412$ ). E foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de animais quanto ao percentual de acometimento por neoplasia no ovário ( $p = 0,0101$ ), onde o grupo de genótipo Cx43+/- apresentou maior acometimento do que o grupo de genótipo Cx43+/+, com percentuais de 12% e 0% respectivamente

A incidência dos diferentes tipos neoplásicos em ambos os grupos é melhor visualizada no gráfico 4.

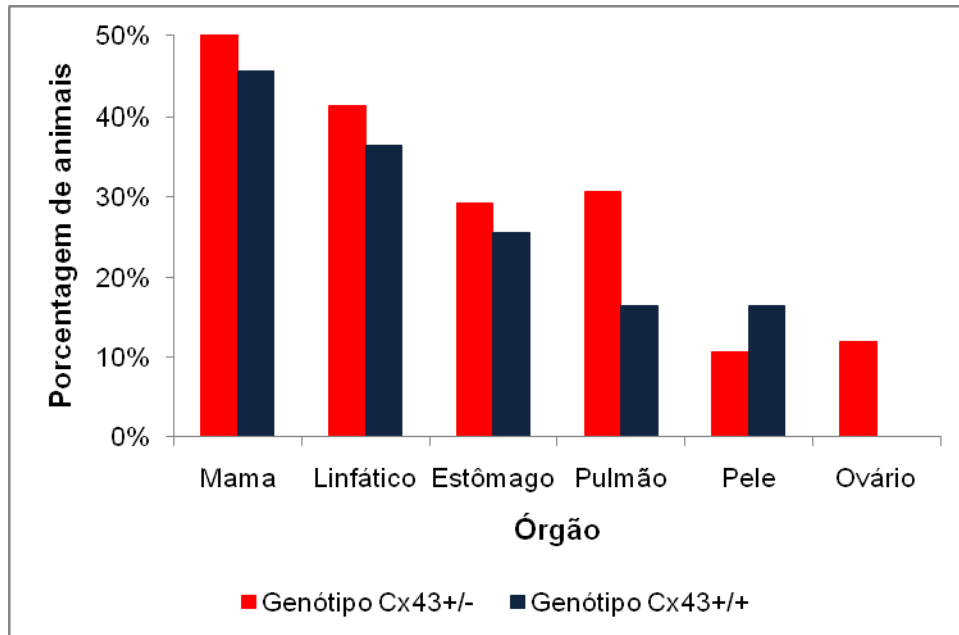


Gráfico 4 – Incidência dos diferentes tipos neoplásicos nos grupos experimentais Cx43+/- e Cx43+/+.

### 5.3.1 Tumores de mama

Dos 65 animais que apresentaram tumor de mama, 40 eram Cx43+/- e 25 Cx43+/+, correspondendo respectivamente a 53,3% e 45,5% do total de tipos neoplásicos encontrados em cada grupo. Cada animal apresentou uma ou duas neoplasias mamárias em localizações diferentes, totalizando 62 e 48 neoplasias e uma média de 1,9 e 1,6 neoplasia por animal, respectivamente para Cx43+/- e Cx43+/+, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à distribuição do número de neoplasias mamárias ( $p = 0,1330$ ) (tabela 2).

Analisou-se a incidência de neoplasias quanto a localização glandular mamária. As fêmeas de camundongos apresentam 5 pares de mama, denominados cervical, torácico cranial, torácico caudal, abdominal e inguinal (figura 9) (SQUARTINI; PINGITORES, 1994). Como houve dificuldade em diferenciar a localização exata das neoplasias situadas na região torácica, estabelecemos por designá-las em conjunto como MTs. Desta forma, nos referimos às localizações

anatômicas como como M1 (cervicais), MTs (torácicas cranial e caudal), M4 (abdominal) e M5 (caudal).

De uma maneira geral, mais de 50% das neoplasias ocorreram em M4, seguido de 30% em MTs, 10,9% em M5 e 6,4% em M1. Em ambos os grupos a ordem de prevalência foi a mesma, com M4 correspondendo a 45 % e 62% nos grupos Cx 43 +/- e Cx 43 +/- respectivamente, seguido de 38,7% e 18,8% em MTs, 11,3% e 10,4% em M5 e 4,8% e 6,4% em M1 (gráfico 2). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de animais quanto à distribuição por localização das neoplasias mamárias ( $p = 0,1199$ ) (tab.2).

Os dados são melhor visualizados no gráfico 5.

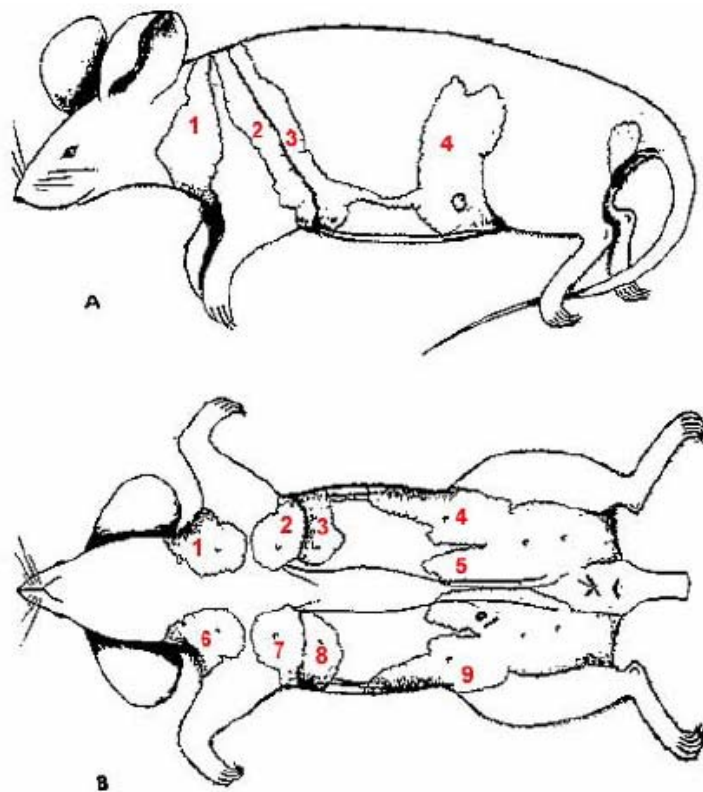


Figura 9 – Esquema da distribuição anatômica das glândulas mamárias em camundongos com vista lateral (A) e ventral (B). Fonte: Squartini; Pingitore, 1994. Numeradas de 1 a 10, representam-se as mamas então classificadas como cervical, torácica cranial, torácica caudal, abdominal e inguinal e esquerdas (1 a 5 respectivamente) e cervical, torácica cranial, torácica caudal, abdominal e inguinal direitas (6 a 10, respectivamente).

Tabela 1 - Incidência de neoplasias (N) nos diferentes órgãos de acordo com genótipo (Cx43 +/- e Cx 43 +/-), segundo avaliação macroscópica e confirmação microscópica dos 130 animais (A) que receberam o carcinógeno DMBA, considerando que todos desenvolveram pelo menos algum tipo de neoplasia. São Paulo, 2010 a janeiro de 2011

Órgãos	GENÓTIPOS						Total de animais portadores de neoplasia, de acordo com tipo tumoral	% geral de cada tipo tumoral no total de animais portadores de neoplasia (n=130)	p-valor
	Cx43+/- (n=75)			Cx43+/+ (n=55)					
	Número de animais portadores de N	% de animais com N dentro do genótipo (75)	% animais acometidos no total N (133)	Número de animais portadores de N	% de animais com N dentro do genótipo (55)	% animais acometidos no total N (77)			
Mama	40	53,3	30,1	25	45,5	32,5	65	50	0,3747
Linfático	31	41,33	23,3	20	36,4	26	51	39,2	0,5664
Estômago	22	29,3	16,5	14	25,5	18,2	36	27,7	0,6254
Pulmão	23	30,7	17,3	9	16,4	11,7	32	24,6	0,0614
Pele	8	10,7	6,0	9	16,4	11,7	17	13,1	0,3412
Ovário	9	12	6,8	0	0	0,0	9	6,9	0,0101
<b>Total de neoplasias</b>	133			77			210		
<b>N/A</b>		<b>133/75 = 1,8</b>			<b>77/55 = 1,4</b>				

Tabela 2 - Incidência de neoplasias por localização mamária de acordo com o genótipo (Cx43+/- e Cx43+/+). São Paulo, 2010 a janeiro de 2011

Local	Genótipo		Total (n = 110)
	Cx43+/- (n = 62)	Cx43+/+ (n = 48)	
<b>M1</b>	3 (4,8%)	4 (8,3%)	7 (6,4%)
<b>MTs</b>	24 (38,7%)	9 (18,8%)	33 (30,0%)
<b>M4</b>	28 (45,2%)	30 (62,5%)	58 (52,7%)
<b>M5</b>	7 (11,3%)	5 (10,4%)	12 (10,9%)
<b>p-valor</b>	0,1199		

M1 = mama cervical; MTs = mamas torácicas cranial e caudal; M4 = mama abdominal; M5 = mama inguinal; TT = total de tumores;

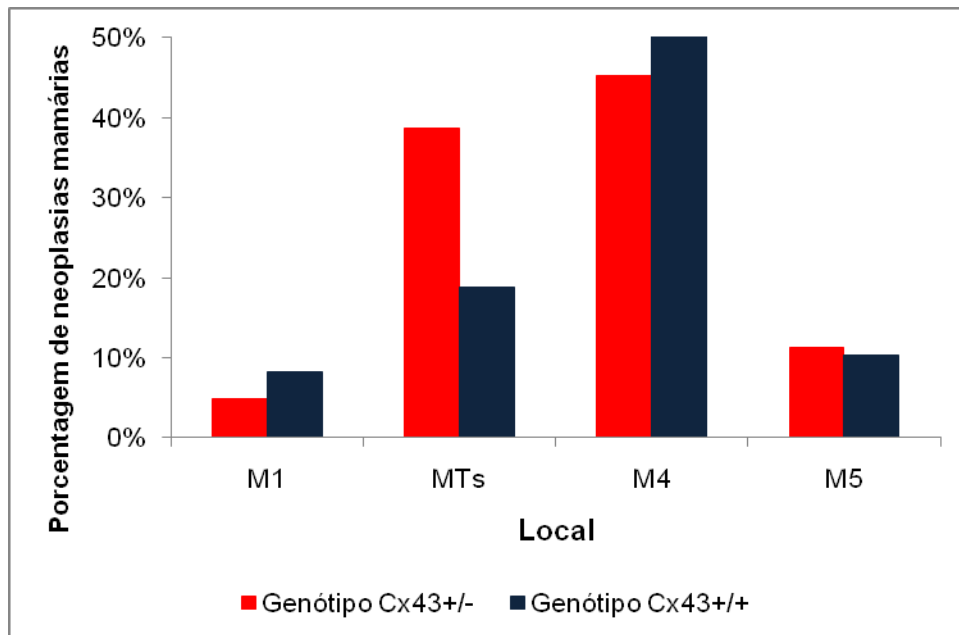


Gráfico 5- Incidência de neoplasias por localização mamária de acordo com o genótipo (Cx43+/- e Cx43+/+).



### 5.3.2 Metástases

Dos 130 animais que desenvolveram neoplasia, apenas 17 apresentaram progressão para metástase, correspondendo a 13,1%. Comparando-se os grupos, observou-se uma discreta maior incidência no grupo Cx43+/-, o qual apresentou uma taxa de 13,3% contra 12,7% do Cx43+/+.

As neoplasias que produziram metástase incluíram carcinomas mamários e gástricos em ambos os grupos, correspondendo respectivamente, nos grupos Cx43+/- e Cx43+/+, a 7,5% e 9,1% do total de tipos neoplásicos em cada grupo (133 e 77) (tabela 3).

Tabela 3 – Comparação do número de neoplasias metastáticas em relação ao número de animais com neoplasias em cada grupo genotípico (Cx43+/- e Cx43+/+) (considerando-se que apenas um tipo neoplásico foi metastático em cada animal), e com o número total de neoplasias em cada grupo. Com base nestes dados pode-se apresentar a incidência de tumores por animal em cada grupo e no geral. São Paulo, 2010 a janeiro de 2011.

	Genótipo		Total
	Cx43 +/-	Cx43 +/+	
<b>Número total de animais com neoplasia</b>	75	55	130
<b>Número total de neoplasias</b>	133	77	210
<b>Número de neoplasias com comportamento metastático</b>	10	7	17
<b>% de metástases em relação ao total de animais com neoplasia</b>	13,3	12,72	13,1
<b>% de metástases em relação ao total de neoplasias</b>	7,5	9,1	8,1
<b>Número de neoplasias / animal</b>	1,8	1,4	1,6

Quando comparamos especificamente a incidência de metástase secundária ao carcinoma gástrico entre os grupos, constatamos taxas de 36,4% (8 em 22 Cx43 +/-) e 35,7% (5 em 14 Cx43+/+), sem diferença estatisticamente significativa ( $p=0,9685$ ) (tab.4).

Houve metástase para o pulmão de neoplasias mamárias e gástricas (figuras 10E, 11F, 12F). Para a cavidade abdominal, com implantação e infiltração de órgãos e tecidos, incluindo fígado, baço, rim, pâncreas, diafragma, musculatura da parede abdominal, mesentério e serosas intestinais, observou-se metástase trans-celômica, caracterizando-se o processo denominado carcinomatose (figuras 10B, 10C, 10D e 11E).

Tabela 4 – Comparação do número de neoplasias gástricas e ocorrência de metástases entre os genótipos diferentes (Cx43+/- e Cx43+/+). São Paulo, 2010 à janeiro de 2011.

	Genótipo		Total (n = 36)
	Cx43+/- (n = 22)	Cx43+/+ (n = 14)	
<b>Metástase</b>	8 (36,4%)	5 (35,7%)	13 (36,1%)
<b>p-valor</b>	0,9685		

É interessante notar que, independente do grupo, dos 17 tipos tumorais que metastatizaram, 13 constituíam-se de carcinomas gástricos, correspondendo 76,5%. Apenas 1 dos 17, pertencente ao grupo Cx43+/+, apresentou metástase para o pulmão, com valor percentual igual à 5,9% neste grupo. 100% das metástases no grupo Cx43+/- foram trans-celômicas (carcinomatose).

## 5.4 ACHADOS DE NECROPSIA

As alterações observadas à necropsia serão apresentadas separadamente por tipo tumoral e regiões anatômicas.

A única alteração observada à necropsia dos animais controles foi espessamento dos cornos uterinos, também observada em animais experimentais.

### 5.4.1 Tumores de mama

A maior parte das neoplasias mamárias apresentava-se ulcerada e/ou com extensas áreas de necrose, eventualmente com exsudato purulento quase sempre mais evidente à superfície de corte; seus tamanhos variaram de 0,3 a 4,5 cm de diâmetro (figuras 10G, 11E, 13H e 13I), apresentavam aspecto predominantemente branco e friável à superfície de corte, eventualmente cárneo e avermelhado. Comportamento infiltrativo na musculatura abdominal e de membro pélvico foi observado em alguns tumores com mais de 2 cm de diâmetro.

### 5.4.2 Tumores cutâneos

Os tumores cutâneos apresentavam-se como nódulos, placas ou cornos queratinizados; os dois primeiros variavelmente crostosos e/ou ulcerados (Figuras 11E, 12C, 13H). À superfície de corte apresentavam aspecto branco friável. Apresentavam distribuição aleatória focal ou multifocal.

### 5.4.3 Cavernidade tórácica

À abertura da cavernidade torácica as alterações observadas compreenderam hemotórax e presença de massa branca mediastínica (linfoma) (figura 3.B, apêndice A), geralmente maior do que o coração. O hemotórax foi observado apenas em 2 animais, ambos Cx43+/- e apresentando linfoma multicêntrico com acometimento pulmonar (determinado microscopicamente), um deles formação de massa mediastínica e o outro com nódulos pulmonares. Em um destes casos observou-se atelectasia quase massiva dos pulmões, os quais também apresentavam nódulos (figura 4.D, apêndice A). As formações observadas nos pulmões se caracterizaram por apresentarem nódulos brancos acinzentados de menos de 0,1 a 0,3 cm de diâmetro que variavam de 1 a muitos nódulos (figuras 11D, 12E e 13D).

### 5.4.4 Cavernidade abdominal

Os animais que apresentavam o abdome distendido, revelaram à sua abertura presença de líquido de moderada densidade, vermelho (hemoperitônio) ou vermelho amarronzado (hemoperitônio com peritonite) e presença de numerosos nódulos milimétricos brancos espalhados pela cavernidade, aderidos ou implantados em todos órgãos e musculaturas diafragmática e abdominal de forma variável (carcinomatose) (figuras 10B, 10C e 10D).

Grandes formações gástricas (figuras 13A e 13B) brancas e friáveis até espessamentos da mucosa, igualmente brancos e friáveis ou farináceos foram observados e caracterizaram as neoplasias gástricas observadas, porém

preservando a integridade da serosa, com um única exceção no grupo Cx43 +/- onde houve perfuração.

O tipo neoplásico com menor incidência observada foi o tumor de ovário, apresentando-se sempre unilaterais e vermelhos. Os mesmo foram restritos ao grupo Cx43+/- (figuras 11G, 12E e 12G).

Espessamento dos cornos uterinos foi observado em quase todos os animais controles e também em grande parte dos animais que receberam o DMBA e sobreviveram por mais tempo.

#### 5.4.5 **Tecido Linfático**

Os linfonodos superficiais (figura 12A) e internos apresentaram-se aumentados difusamente e acentuadamente, esplenomegalia (figura 11H) e grandes massas mediastínicas caracterizaram de forma variável os linfomas em ambos os grupos (12B).

### 5.5 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS NEOPLASIAS OBSERVADAS

Apresentaremos as observações microscópicas das neoplasias de acordo com à classificação histológica e sua incidência dentro dos diferentes tipos. Uma apresentação geral da classificação histopatológica, é apresentada nas tabelas 5 e 6. Na tabela 5 dispõem-se as taxas de neoplasias primárias em relação ao total de neoplasias em cada grupos. Na tabela 6, dispõem-se as taxas de neoplasias em relação ao total de animais portadores de neoplasia, considerando também a incidência de metástase.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais quanto às distribuições dos tipos histológicos das neoplasias

encontradas nos órgãos: pele ( $p = 0,4181$ ), pulmão ( $p = 0,3233$ ), mama ( $p = 0,5396$ ) e estômago ( $p = 0,5361$ ). A análise comparativa é apresentada na tabela 7.

### 5.5.1 Neoplasias mamárias

A maior variação de tipos histológicos foi observada nos tumores de mama, incluindo, de uma maneira geral, adenoacantomas, adenocarcinomas tipo A (adenocarcinoma tubular simples), adenocarcinoma tipo B (adenocarcinoma cístico hemorrágico ou cístico papilar), adenocarcinoma tipo C (fibroadenoma), tumor organóide (adenocarcioma moluscóide), adenocarcinoma indiferenciado e fibrossarcoma. A distribuição descrita a seguir pode ser melhor visualizada no gráfico 6.

Adenoacantoma foi o tumor de maior incidência no grupo Cx43 +/- e na contagem geral, independente do grupo. Apresentou os característicos cistos córneos, elevada atividade mitótica, com presença de figuras atípicas, comportamento infiltrativo e metastático (figuras 15C, 15D, 15E e 15F), tendo sido observado metástase de adenoacantoma para o pulmão.

Adenocarcinoma tipo B foi o segundo de maior incidência no grupo Cx43+/+ e no geral, e foi o de maior incidência no grupo Cx43+/+. Caracterizou-se por apresentar heterogeneidade, com áreas tubulares, túbulo-papilares e numerosos cistos, por vezes com projeções papilares para luz e preenchidos por sangue ou líquido eosinofílico; igualmente ao adenoacantoma, mostrou comportamento infiltrativo e elevada taxa de mitose, com presença de figuras atípicas e pleiomorfismo marcado.

Adenocarcinoma tipo A foi o terceiro tumor em incidência nos 3 contingentes. Apresentou padrão tubular relativamente homogêneo.

No grupo Cx43 +/- foram observados ainda outros 4 tipos neoplásicos, sendo 1 de cada tipo e representados por adenocarcinoma indiferenciado, fibrossarcoma, tumor organóide e adenocarcinoma tipo C.

Nenhum outro tipo tumoral foi observado no grupo Cx43+/. De todos os tipos neoplásicos, apenas o adenoacantoma fez metastástase para o pulmão.

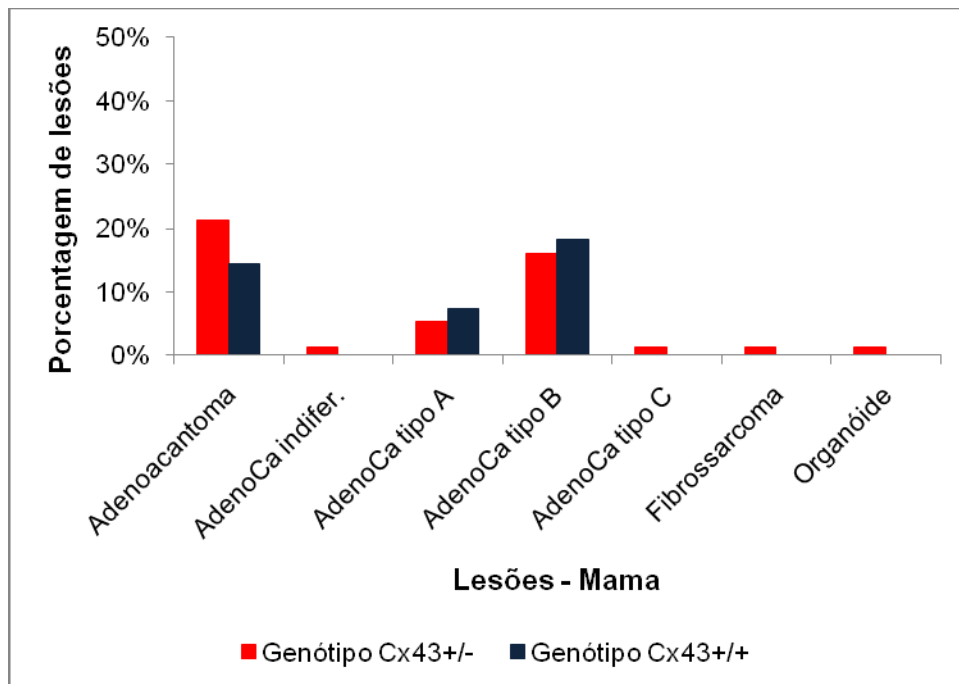


Gráfico 6 – Indicência dos tipos histológicos de neoplasia mamária apresentados pelos grupos experimentais Cx43+/- e Cx43+/+, decorrente da administração de DMBA.

### 5.5.2 Neoplasias pulmonares

Excluindo-se os linfomas e os tumores metastáticos, os tumores pulmonares constituíram-se de 4 tipos histológicos e incluíram adenoma, adenocarcinoma brônquico, adenocarcinoma alveolar e carcinoma de células escamosas queratinizante. A distribuição e incidência descritas a seguir podem ser melhor visualizadas no gráfico 7.

O adenocarcinoma alveolar tipo papilar (figura 14F) foi o de maior incidência em ambos os grupos. Adenoma alveolar (figuras 16E e 16F) foi o segundo de maior incidência em ambos os grupos. Segundo a classificação histológica da WHO (1994), a presença de projeções papilares é indício de malignidade, o que levou-se em consideração na hora de classificá-los, uma vez que, de uma maneira geral, não se caracterizaram por grande atipia celular.

O grupo Cx43 +/- apresentou um caso de adenocarcinoma brônquico (figuras 16c e 16D) e o Cx43+/+ um caso de carcinoma de células escamosas.

Linfomas foram observados em 10 dos 75 animais do grupo heterozigoto e em 5 dos 55 selvagens.

Observou-se metástase de tumor de mama do tipo adenoacantoma para o pulmão em 2 heterozigotos e de carcinoma gástrico em 1 selvagem. Em um dos camundongos selvagens encontrou-se neoplasia epitelial de natureza incerta (metástase?). O mesmo apresentou tumor de mama, adenocarcinoma tipo B, e carcinoma gástrico.



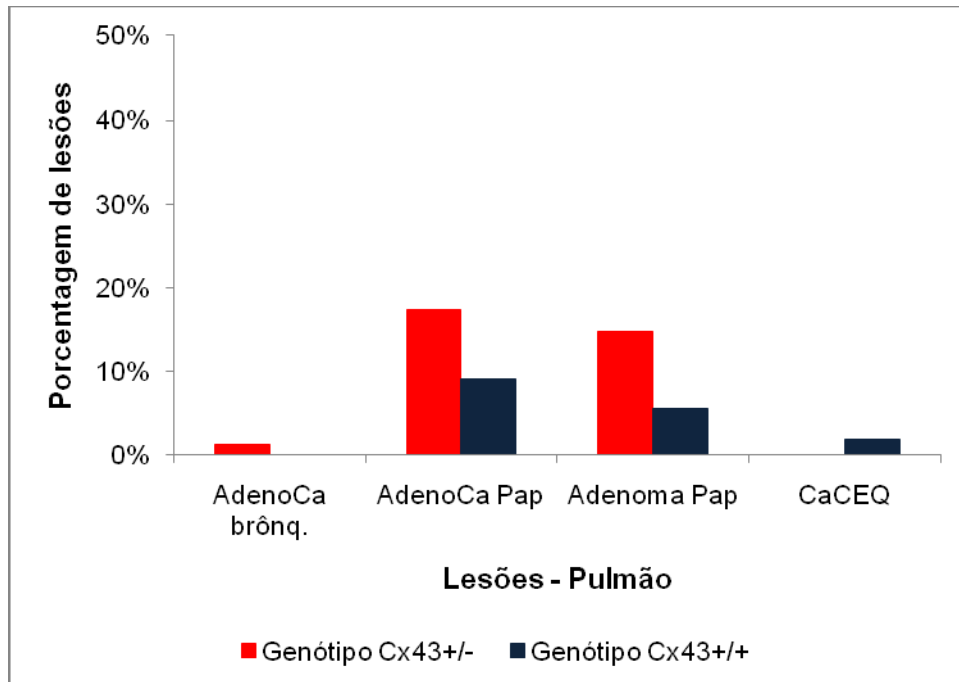


Gráfico 7 – Indicência dos tipos histológicos de neoplasia pulmonar apresentados pelos grupos experimentais Cx43+/- e Cx43+/-, decorrente da administração de DMBA.

### 5.5.3 Neoplasias cutâneas

Lesões pré-neoplásicas, representadas por hiperplasia, displasia e hiperqueratose, foram observadas em 2 dos 75 animais Cx43+/- e 1 dos 55 animais Cx43 +/+ que receberam DMBA.

As lesões neoplásicas cutâneas incluíram apenas dois tipos, o papiloma e o carcinoma de células escamosas queratinizante (figura 15A e 15B). Houve prevalência do carcinoma de células escamosas no grupo selvagem e exclusividade da mesma no grupo dos heterozigotos.

Um único caso de papiloma foi observado, ocorrendo no grupo dos selvagens. A distribuição e incidência dos tipos neoplásicos podem ser melhor visualizados no gráfico 8.

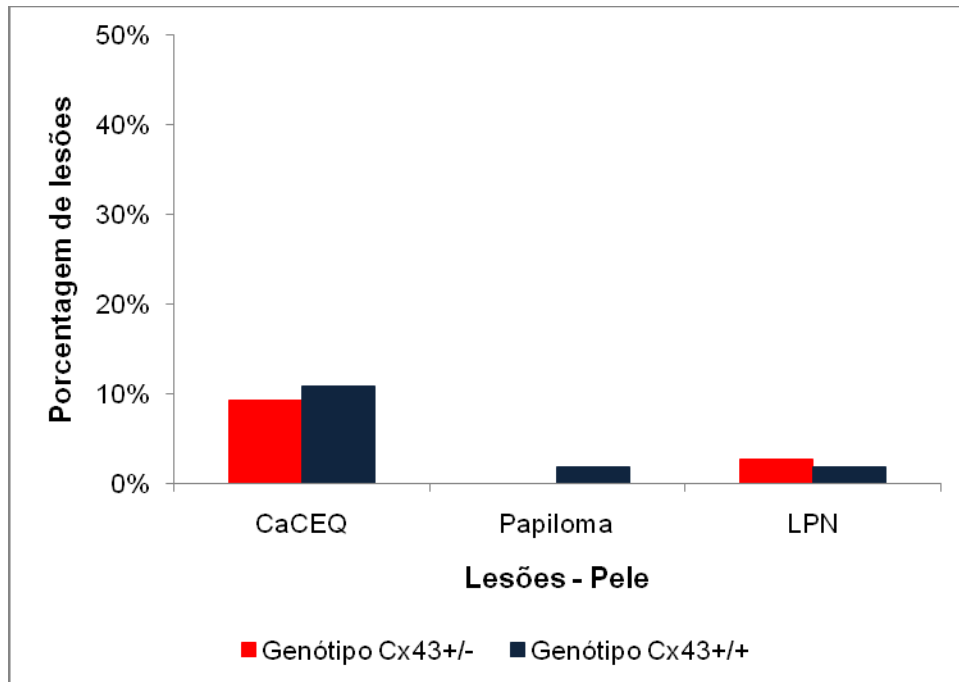


Gráfico 8 – Indicência de lesão pré-neoplásica e dos tipos histológicos de neoplasia cutânea apresentados pelos grupos experimentais Cx43+/- e Cx43+/+, decorrente da administração de DMBA.

#### 5.5.4 Neoplasias gástricas

Apenas dois tipos histológicos primários de neoplasias gástricas foram observados, incluindo carcinoma de células escamosas da mucosa aglandular e adenocarcinoma da mucosa glandular. Os únicos 2 adenocarcinomas encontrados foram apresentados por Cx43+/- . Lesão pré-neoplásica foi observada em um animal heterozigoto (figura 16A).

A incidência de carcinoma de células escamosas foi maior no grupo heterozigoto. Em ambos os grupos a referida neoplasia mostrou-se extremamente agressiva (figura 14A), infiltrando os tecidos adjacentes, como o fígado (figuras 14C

e 14E), baço (figura 14B) e pâncreas, desprendendo-se e se implantando nas superfícies serosas da cavidade e embolizando. Caracterizou-se por pleiomorfismo acentuado, elevada taxa de mitose e presença freqüente de figuras de mitose atípicas.

#### **5.5.5 Linfomas**

O segundo tipo neoplásico de maior incidência em ambos os grupos se comportou variavelmente quanto a distribuição, envolvendo órgãos como o fígado (Figura 14D), pulmão e rim, onde apresentava um padrão predominantemente perivascular, além dos tecidos linfóides. Apresentou pleiomorfismo e atividade mitótica variável entre os animais.

#### **5.5.6 Neoplasia ovariana**

A única neoplasia ovariana encontrada foi o tumor de células da granulosa, com apresentação predominantemente folicular, presença freqüente de luteinização e presença do padrão angietásico predominando em 2 tumores (figura 16B).

**Tabela 5** – Achados neoplásicos descritivos quanto à classificação histológica dos tipos primários em relação ao número total de neoplasias em cada grupo. São Paulo, 2010 a janeiro de 2011.

Órgãos com neoplasia ou lesão pré-neoplásica	Genótipo	
	Cx43+/- (n = 180)	Cx43+/+ (n = 118)
<b>Pele</b>		
CaCEQ	7 (3,9%)	6 (5,1%)
Papiloma	0 (0,0%)	1 (0,9%)
LPN	2 (1,1%)	1 (0,9%)
<b>Pulmão</b>		
adenoCa brônq.	1 (0,6%)	0 (0,0%)
adenoCa alveolar	13 (7,2%)	5 (4,2%)
adenoma alveolar	11 (6,1%)	3 (2,5%)
CaCE	0 (0,0%)	1 (0,9%)
Linfoma	10 (5,6%)	5 (4,2%)
<b>Mama</b>		
Adenoacantoma	16 (8,9%)	8 (6,8%)
tumor indifer.	1 (0,6%)	0 (0,0%)
adenoCa tipo A	4 (2,2%)	4 (3,4%)
adenoCa tipo B	12 (6,6%)	10 (8,5%)
adenoCa tipo C	1 (0,6%)	0 (0,0%)
Fibrossarcoma	1 (0,6%)	0 (0,0%)
Organóide	1 (0,6%)	0 (0,0%)
<b>Peritônio</b>		
Linfoma	1 (0,6%)	1 (0,9%)
<b>Fígado</b>		
Linfoma	12 (6,7%)	12 (10,1%)
<b>Baço</b>		
Linfoma	22 (12,2%)	22 (18,64%)
<b>Pâncreas</b>		
Linfoma	0 (0,0%)	1 (0,9%)
<b>Linfonodo</b>		
Linfoma	29 (16,1%)	21 (17,8%)
<b>Estômago</b>		
CaCE	21 (11,7%)	12 (10,1%)
adenoCa	2 (1,1%)	0 (0,0%)
Linfoma	0 (0,0%)	1 (0,9%)
<b>Rins</b>		
Linfoma	6 (3,3%)	2 (1,7%)
<b>Ovário</b>		
Tumor cél. Granulosa	7 (3,9%)	2 (1,7%)

LPN = lesão pré-neoplásica; Ca = carcinoma; CaCE = carcinoma de células escamosas; CaCEQ = carcinoma de células escamosas queratinizante.

**Tabela 6** – Achados neoplásicos descritivos quanto à classificação histológica dos tipos neoplásicos primários e metastáticos, em relação ao número total de animais que apresentaram neoplasia em cada grupo e no geral. São Paulo, 2010 a janeiro de 2011.

Órgãos com neoplasia – Lesões	Genótipo		Total (n = 130)
	Cx43+/- (n = 75)	Cx43+/+ (n = 55)	
<b>Pele</b>			
I-CaCEQ	7 (9,3%)	6 (10,9%)	13 (10,0%)
I-Papiloma	0 (0,0%)	1 (1,8%)	1 (0,8%)
LPN	2 (2,7%)	1 (1,8%)	3 (2,3%)
<b>Pulmão</b>			
I - AdenoCa brônq.	1 (1,3%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)
I - AdenoCa Pap	13 (17,3%)	5 (9,1%)	18 (13,8%)
I - Adenoma Pap	11 (14,7%)	3 (5,5%)	14 (10,8%)
I - Ca CEQ	0 (0,0%)	1 (1,8%)	1 (0,8%)
II (adenoacant)	3 (4,0%)	0 (0,0%)	3 (2,3%)
II (epit.)*	0 (0,0%)	1 (1,8%)	1 (0,8%)
II (estôm)	0 (0,0%)	1 (1,8%)	1 (0,8%)
Linfoma	10 (13,3%)	5 (9,1%)	15 (11,5%)
<b>Mama</b>			
I – adenoacantoma	16 (21,3%)	8 (14,5%)	24 (18,5%)
I - adenoCa indifer.	1 (1,3%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)
I - adenoCa tipo A	4 (5,3%)	4 (7,3%)	8 (6,2%)
I - AdenoCa tipo B	12 (16,0%)	10 (18,2%)	22 (16,9%)
I - adenoCa tipo C	1 (1,3%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)
I – fibrossarcoma	1 (1,3%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)
I – organóide	1 (1,3%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)
<b>Peritônio</b>			
II (estôm)	8 (10,7%)	7 (12,7%)	15 (11,5%)
Linfoma	1 (1,3%)	1 (1,8%)	2 (1,5%)
<b>Fígado</b>			
II – CaCE do estômago	1 (1,3%)	4 (7,3%)	5 (3,8%)
Linfoma	12 (16,0%)	12 (21,8%)	24 (18,5%)
<b>Baço</b>			
II – CaCE do estômago	2 (2,7%)	2 (3,6%)	4 (3,1%)
Linfoma	22 (29,3%)	22 (40,0%)	44 (33,8%)
<b>Pâncreas</b>			
II (estôm)	0 (0,0%)	1 (1,8%)	1 (0,8%)
Linfoma	0 (0,0%)	1 (1,8%)	1 (0,8%)
<b>Tec.Linfático</b>			
Linfoma	29 (38,7%)	21 (38,2%)	50 (38,5%)
<b>Estômago</b>			
I - Ca CE	21 (28,0%)	12 (21,8%)	33 (25,4%)
I - Adenocarcinoma	2 (2,7%)	0 (0,0%)	2 (1,5%)
Linfoma	0 (0,0%)	1 (1,8%)	1 (0,8%)
<b>Rins</b>			
Linfoma	6 (8,0%)	2 (3,6%)	8 (6,2%)
<b>Ovário</b>			
tumor cél. Granulosa	7 (9,3%)	2 (3,6%)	9 (6,9%)

I = neoplasia primária; II = neoplasia metastática. LPN = lesão pré-neoplásica; Ca = carcinoma; CaCE = carcinoma de células escamosas; CaCEQ = carcinoma de células escamosas queratinizante.

**Tabela 7** – Análise comparativa dos achados neoplásicos descritivos quanto à classificação histológica dos tipos primários em relação ao número total de neoplasias em cada grupo. São Paulo, 2010 a janeiro de 2011.

Órgãos com neoplasia – Lesões	Genótipo		Total
	Cx43+/-	Cx43+/+	
<b>Pele</b>	n = 9	n = 8	n = 17
I-CaCEQ	7 (77,8%)	6 (75,0%)	13 (76,5%)
I-Papiloma	0 (0,0%)	1 (12,5%)	1 (5,9%)
LPN	2 (22,2%)	1 (12,5%)	3 (17,6%)
p-valor	0,4181		
<b>Pulmão</b>	n = 25	n = 9	n = 34
I - AdenoCa brônq.	1 (4,0%)	0 (0,0%)	1 (2,9%)
I - AdenoCa Pap	13 (52,0%)	5 (55,6%)	18 (52,9%)
I - Adenoma Pap	11 (44,0%)	3 (33,3%)	14 (41,2%)
I - Ca CEQ	0 (0,0%)	1 (11,1%)	1 (2,9%)
p-valor	0,3233		
<b>Mama</b>	n = 36	n = 22	n = 58
I - adenoacantoma	16 (44,4%)	8 (36,4%)	24 (41,4%)
I - adenoCa indifer.	1 (2,8%)	0 (0,0%)	1 (1,7%)
I - adenoCa tipo A	4 (11,1%)	4 (18,2%)	8 (13,8%)
I - AdenoCa tipo B	12 (33,3%)	10 (45,5%)	22 (37,9%)
I - adenoCa tipo C	1 (2,8%)	0 (0,0%)	1 (1,7%)
I – fibrossarcoma	1 (2,8%)	0 (0,0%)	1 (1,7%)
D I – organóide	1 (2,8%)	0 (0,0%)	1 (1,7%)
p-valor	0,5396		
<b>Estômago</b>	n = 23	n = 12	n = 35
I - Ca CE	21 (91,3%)	12 (100,0%)	33 (94,3%)
I - Adenocarcinoma	2 (8,7%)	0 (0,0%)	2 (5,7%)
p-valor	0,5361		

DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

Com o objetivo principal de avaliar a influência da deficiência de conexina 43 na carcinogênese, administramos o carcinógeno DMBA. Os resultados demonstraram que a partir da oitava semana, as neoplasias começaram a se desenvolver, acometeram 100% dos animais e apresentaram-se de modo diverso. Com a mesma ordem de prevalência, observou-se em ambos os grupos, neoplasias mamárias, linfomas, neoplasias gástricas, pulmonares, pulmonares, de pele e ovário.

Comparando-se as taxas de incidência entre os grupos de animais quanto ao acometimento por neoplasia, foi encontrada diferença estatística significativa apenas na incidência de tumores de ovário, tendo o mesmo sido observado exclusivamente no grupo Cx43+/-.

Sabe-se que a conexina 43 é expressa no tecido ovariano, onde, junto com a conexina 37 constituem as principais conexinas formadoras de junções gap. É regulada por gonadotropinas a nível transcricional, traducional e pós-traducional e é indispensável no controle da foliculogênese e ovogênese. Além de suas funções fisiológicas parece atuar aí como supressor tumoral ([GERSHON](#); [PLAKS](#); [DEKEL, 2008](#)). Segundo Fernstrom et al. (2002), proteínas das junções comunicantes do tipo gap estão frequentemente diminuídas em células neoplásicas, incluindo células do carcinoma ovariano. Este grupo de pesquisadores realizou um interessante trabalho *in vitro* com vistas a terapia gênica, utilizando a Cx43 direcionada à neoplasia ovariana. Transfectaram células de carcinoma ovariano com Cx43 e observaram diminuição da proliferação celular e ainda um aumento da sensibilidade à adriamicina, sugerindo que a comunicação por JG e/ou a conexina 43 é capaz de suprimir o fenótipo neoplásico das células do carcinoma ovariano e sua baixa expressão está envolvida na transformação neoplásica destas células.

Nossas observações neste trabalho corroboram fortemente este papel atribuído à Cx43, cuja deficiência deve favorecer a carcinogênese ovariana.



Especificamente nos casos dos tumores pulmonares, os dados obtidos se contrapõem ao observados por Avanzo et al. (2004). Os autores observaram que a deleção de um dos alelos resultou em incidência significativamente maior de tumores pulmonares, enquanto em nosso estudo não constatamos tal diferença. Há que se considerar que Avanzo et al. (2004) trabalharam com outro carcinógeno, a uretana. Adicionalmente, outro aspecto interessante é a possível influência da dose. Em um experimento, onde se administrou DMBA para camundongos Balb/c, nas doses de 1, 3, 6 e 9 mg por animal, na análise histopatológica dos tumores apresentados pelos 70 animais experimentais, observou-se uma incidência maior de tumores pulmonares nas menores doses, 1 e 3 mg, com taxas de 33,33% e 26,70% respectivamente, enquanto a dose de 9mg, a mesma usada por nós, correspondeu a 10,50% (OLIVEIRA et al. 2010, dados não publicados).

A incidência maior de tumores de mama aqui observada se repete em outros trabalhos com DMBA em camundongos. Na maior parte deles a incidência de tumores de mama é seguida pela de pulmão, variando quanto aos demais. Nestes trabalhos as doses também são menores alcançando até 6 mg por animal (WIJNHOFEN et al., 2005; CURRIER et al, 2005; LU et al.; 2006, AVANZO, 2008).

Entre os tumores de mama mais freqüente, na ordem de prevalência, observamos em primeiro lugar o adenoacantoma, seguido de adenocarcinoma tipo B e Adenocarcinoma tipo A. Mesma incidência foi observada por Medina (1974). Outros trabalhos mostram incidências semelhantes (LANE et al., 1985; LU et al., 2006)

O Adenoacantoma se caracteriza por formar cistos córneos e ter pontencial metastático (SQUARTINI; PUNGETORE, 1994), o que pudemos confirmar (figuras 15C, 15D e 15E).

Com relação aos tumores de pele, nós não só não observamos diferenças significantes para indicar uma possível interferência da deficiência de conexinas na carcinogênese cutânea, como em números absolutos tivemos uma incidência maior da mesma nos camundongos selvagens (9 em 55 animais Cx43+/+ contra 8 em 75 animais Cx+/-). Embora a conexina 43 seja expressa na camada basal da epiderme e na derme, já foi demonstrado que a deleção de um dos alelos da mesma em camundongos submetidos à estímulo carcinogênico com DMBA parece não

contribuir significativamente ou mesmo não interferir nos eventos moleculares da carcinogênese cutânea (YAMAKAGE et al., 2000).

Ainda sobre as lesões neoplásicas cutâneas, é interessante observar a presença de lesões pré-neoplásicas, papilomas e carcinomas epidermóides, indicando possível progressão tumoral, conforme foi indicado na literatura (SAKAI; TANAKA; SHIRAKAWA, 2004).

No que diz respeito às lesões cutâneas não neoplásicas, observadas exclusivamente nos animais que receberam o DMBA, de ambos os grupos, são compatíveis com dermatopatias comuns em animais imunossuprimidos, tais como dermatofitose e piodermite. O exame direto do pêlo de alguns destes animais revelou presença de numerosos artroconídeos ectotrix, sugerindo dermatofitose. Estas alterações apareceram ainda quando os animais recebiam o carcinógeno, cujo efeito imunossupressor é bem conhecido (SMITH; SMITH; WHITE., 2010)

Não observamos diferença estaticamente significativa também com relação a incidência de linfomas, embora tenhamos encontrado, mais uma vez, uma incidência maior em números absolutos no grupo Cx43+/- (41.3% contra 36,4%).

[Krenács](#) e [Rosendaal](#) (1995) identificaram por imunohistoquímica, à microscopia confocal, as conexinas 25, 32 e 43 em tecido linfóide normal, reativo e “doente”. A conexina 43 foi detectada nas células foliculares dendríticas positivas para CD21 e CD35, em torno de células lymphoendothelial moderadamente positivas para o Fator VIII, CD31 e catepsina-D, e um pouco no endotélio vascular, incluindo endotélio de vênulas estreitas fortemente positivas para o Fator VIII e CD31. Foi observada também co-localizada com proteínas desmossômicas, desmoplaquina e desmogleina, nas células dendríticas, sugerindo que a aderência celular tenha um papel na formação de junção *gap*. A maior parte foi encontrada em células que revestem os seios medulares de linfonodos envolvidos em doenças malignas em células dendríticas foliculares das zonas claras dos centros germinativos, onde há linfócitos amadurecendo, mas principalmente proliferando. Os autores sugerem que estas junções podem desempenhar um papel na regulação do crescimento dos centros germinativos e na integração de sinais, controlando e ativando células dendríticas e células que revestem os seios. Logo, é possível que haja interferência da conexina 43 no processo carcinogênico do tecido linfóide.

Há estudos que associam câncer gástrico e carcinomatose com alteração na expressão de conexina 43 (TANG et al., 2010). No entanto, embora tenhamos observado incidência numérica maior no grupo deficiente em Cx43 quanto a presença da neoplasia primária, a análise estatística dos nossos resultados apontam em sentido contrário, sobretudo com relação à possibilidade da Cx43 interferir na metástase trans-celômica, onde inclusive as taxas foram muito próximas (36,4% e 35,7%, para Cx43+/- e Cx43+/+ respectivamente).

Sabe-se que a Cx 26 está envolvida no processo metastático de melanomas (SAITO-KATSURAGE et al. 1007), e câncer de mama humanos. É atribuída a ela a capacidade das células neoplásicas se comunicarem com células endoteliais e invadirem vasos (GUARINO, 2007).

Não se observou, no presente trabalho, diferença estatística significativa quanto a incidência de metástases entre os grupos normais e deficientes em Cx43. Se a expressão de Cx26 poderia atuar ou não favoravelmente à metástase neste caso é uma questão a ser investigada, uma vez que também é atribuído à Cx26, bem como à Cx43, efeito supressor tumoral (MCLACHLAN et al., 2007). Sua perda também foi associada à malignidade (GOTOH et al., 2006). Seria necessário também avaliar a expressão da conexina 26 nestes tumores.

A diversidade de tumores e comportamentos observados por nós suscita também para o fato deste se tratar de um modelo carcinogênico muito eficiente, inclusive para produção de estudos *in vitro*.

O período de tempo para o desenvolvimento de tumores variou bastante em ambos os grupos, os quais apresentaram valores de média e DP, sem diferença significativa estatisticamente. Curiosamente, o período mais estreito foi observado no grupo Cx43+/-, ficando em 7,6 semanas, e o período mais longo foi observado no grupo Ca43+/+, ficando em 23,1 semanas. Segundo a literatura, o menor período para aparecimento de tumor induzido por DMBA que encontramos, foi observado em ratos que receberam dose única de 15 / 100 g de peso vivo e levou 30 dias. Nos chama atenção pela dose elevada e a velocidade rápida para o aparecimento dos sinais (HASLAN; BERN, 1977). O menor período em camundongos foi 10 semanas (LANE et al., 1985; CURRIER et al., 2005; AVANZO, 2008).

Observamos na literatura também muita variação quanto ao início dos sinais clínicos neoplásicos. Interessantemente, Avanzo (2008) observou o início do desenvolvimento neoplásico a partir da semana 10 nas doses menores, 1 e 3 mg, e na dose de 9 mg a partir apenas da semana 16. Embora tenha demorado mais para o início, mostrou evolução mais rápida. Parece haver influência, porém de forma não muito clara, da dose total e se ela é fracionada ou não (HASLAM; BERN, 1977; LANE et al., 1985; MEDINA; KITRELL, 2004; BARROS, et al., 2004; CURRIER et al., 2005).

Com relação ao peso, embora não tenha sido observada diferença estatística significativa, em todos os animais observou-se claramente perda progressiva de massa muscular com evidenciação dos processos espinhosos das vértebras. Contudo, isto não se refletia da mesma forma no peso, provavelmente por ganho de massa neoplásica, inclusive com alguns animais ganhando peso.

A ausência de diferença estatisticamente significativa quanto à sobrevida, desde o início dos sinais clínicos ou da administração, somado à ausência de interferência no processo metastático, indica que a deficiência da conexina 43 não interfere no fenótipo neoplásico quanto à agressividade, embora possa interferir na carcinogênese, como apontado na análise estatística dos tumores ovarianos e nos números absolutos referentes a incidência de tumor de mama, gástrico, pulmão ou tecido linfóide.

Está claro, de acordo com a revisão e com os nossos resultados, que as conexinas atuam de forma complexa e variável entre os diferentes tumores e que o entendimento da relação das conexinas com o câncer depende do entendimento molecular do controle da expressão das conexinas. Seu estudo tem sido promissor com relação à terapia gênica, porém ainda requer estabelecer os mecanismos moleculares envolvidos em situações específicas. E a produção de animais *knockout* e transgênicos, como os camundongos Cx43<sup>+/-</sup> utilizados no presente trabalho, é fundamental para responder a estas questões.

CONCLUSÕES

## 7 CONCLUSÕES

A deficiência da Cx43 interferiu seletivamente na carcinogênese por DMBA em camundongos:

- Camundongos deficientes em conexina 43 desenvolveram número significativamente maior de neoplasias ovarianas quando tratados com DMBA.
- Camundongos deficientes em cx43 não apresentaram diferenças quanto a incidência de neoplasias mamárias, pulmonares, gástricas, linfomas e cutâneas, quando tratados com DMBA.
- O uso de camundongos geneticamente modificados, deficientes em conxina 43, foi importante para a obtenção destes resultados, tendo permitido a constatação destes fenômenos *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

AVANZO, G. U. **Padronização de modelo decarcinogênese mamária induzido quimicamente por DMBA em camundongos**. 2008. 62f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

[AVANZO, J. L.](#) **Carcinogênese pulmonar em camundongos portadores de deleção em um dos alelos do gene da Cx43**. 2005. 303f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

[AVANZO, J. L.](#); [MENNECIER, G.](#); [MESNIL, M.](#); [HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.](#); [FUKUMASU, H.](#); [DA SILVA, T. C.](#); [RAO, K. V.](#); [DAGLI, M. L.](#) Deletion of a single allele of Cx43 is associated with a reduction in the gap junctional intercellular communication and increased cell proliferation of mouse lung pneumocytes type II. **Cell Prolif.** 2007 Jun; v. 40, n. 3, p.411-21, 2007.

BARROS, A. S. D.; MURANAKA, E. N. K.; JO MORI, L.; PELIZON, H. T. C.; IRIYA, K.; GIOCONDO, G.; PINOTTI, J. A. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12- dimethylbenz(a)anthracene. **Rev. Hosp. Clin.**, v.59, n. 5, p. 257-261, 2004.

BUTERS, J. T. M.; SAKAI, S.; RICHTER, T.; PINEAU, T.; ALEXANDER, D.L.; SAVAS, U.; DOEHMER, J.; WARD, J. M.; JEFCOATE, C. R.; GONZALEZ, F. J. Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lymphomas. **Biochemistry**, v.96, n.5, 1977–1982.

[BUTERS, J.](#); [QUINTANILLA-MARTINEZ, L.](#); [SCHOBER, W.](#); [SOBALLA, V. J.](#); [HINTERMAIR, J.](#); [WOLFF, T.](#); [GONZALEZ, F. J.](#); [GREIM, H.](#) CYP1B1 determines susceptibility to low doses of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovarian cancers in mice: correlation of CYP1B1-mediated DNA adducts with carcinogenicity. **Carcinogenesis**, v.24, n.2, p.327-34, 2003.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Avaliação da contaminação de diferentes grupos de alimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Braz J Food Technol.**; v. 5, p.19-26, 2002.

CARDOSO, [M. S. F.](#); [ALABURDA](#), J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão, **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v.67 n.1, p. 64-68 2008.

CARYSTINOS, G. D.; BIER, A.; BATIST, G. The role of connexin-mediated cell-cell communication in breast cancer metastasis. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.**, v. 6, n. 4, p. 431-440, 2001.



CONDE, F. J.; AYALA, J. H.; AFONSO, A. M.; GONZÁLEZ, V. Optimization of a sampling method to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from incomplete biomass combustion. **Anal Chim Acta**. v. 524, n. 287-94, 2004.

CHRISTOU, M., SAVAS, U., SPINK, D. C., GIERTHY, J. F., JEFSCOATE, C. R. Coexpression of human CYP1A1 and a human analog of cytochrome P450-EF in response to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin in the human mammary carcinoma-derived MCF-7 cells. **Carcinogenesis**, v.15, p.725– 732, 1994.

CURRIER, N.; SOLOMON, S. E.; DEMICCO, E. G.; CHANG, D. L. F.; FARAGO, M.; YING, H.; DOMINGUEZ, I.; SONENSHEIN, G. E.; CARDIF, R. D.; XIAO, Z.X.J.; SHERR, D. H.; SELDIN, D. C. Oncogenic signaling pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors. **Toxicol. pathol.** v. 33, p. 726-737, 2005.

CHAIBLE, L. M. ; CORAT, M. A. ; ABDELHAY, E.; DAGLI, M. L. Z. Review article Genetically modified animals for use in research and biotechnology. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 1469-1482, 2010.

CHIPMAN, J. K.; MALLY, A.; EDWARDS, G. O. Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. **Toxicol. Sci.**, v. 71, n. 2, p. 146-153, 2003.

CRONIER, L.; CRESPIAN, S.; STRALE, P.; DEFAMIE, N.; MESNIL, M. Gap junctions and cancer: new functions for an old story. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 11, n. 2, p. 323-338, 2009.

DAGLI, M. L.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Roles of gap junctions and connexins in non-neoplastic pathological processes in which cell proliferation is involved. **J Membr. Biol.**, v. 218, n. 1-3, p. 79-91, 2007.

DE MAIO, A.; VEGA, V. L.; CONTRERAS, J. E. Gap junctions, homeostasis, and injury. **J. Cell Physiol.**, v. 191, n. 3, p. 269-282, 2002.

EDWARDS, G.; JONDALE, S.; CHEN, T.; CHIPMAN, J. A quantitative inverse relationship between connexin32 expression and cell proliferation in a rat hepatoma cell line. **Toxicology**, v. 253, n. 1-3, p. 46-52, 2008.

FUJI-KURIYAMA, Y.; MIMURA, J. Transcriptional roles of AhR in expression of biological effects induced by endocrine disruptors. **Pure Appl. Chem.** v. 75, p. 1819–1826. 2003.

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

GODOI, A.F; RAVINDRA, K.; GODOI, R. H. M.; ANDRADE, S. J.; SANTIAGO-SILVA, M.; VAECK, L.V.; GRIEKEN, R. V. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. **J Chromatogr.** v.1027, n.49-53, 2004.

GUERRIER A, FONLUPT P, MORAND I, RABILLOUD R, AUDEBET C, KRUTOVSKIKH V, GROS D, ROUSSET B, MUNARI-SILEM Y. [Gap junctions and cell polarity: connexin32 and connexin43 expressed in polarized thyroid epithelial cells assemble into separate gap junctions, which are located in distinct regions of the lateral plasma membrane domain.](#) **J Cell Sci.** v. 108, p. 2609-17, 1995

HAASS, N. K.; RIPPERGER, D.; WLADYKOWSKI, E.; DAWSON, P.; GIMOTTY, P. A.; BLOME, C.; FISCHER, F.; SCHMAGE, P.; MOLL, I.; BRANDNER, J. M. Melanoma progression exhibits a significant impact on connexin expression patterns in the epidermal tumor microenvironment. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 133, n. 1, p. 113-124, 2010.

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S.; HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **J. Mol. Histol.**, v. 35, n. 3, p. 309-318, 2004.

HERVÉ, J.; DERANGEON, M.; BAHBOUHI, B.; MESNIL, M.; SARROUILHE, D. The connexin turnover, an important modulating factor of the level of cell-to-cell junctional communication: comparison with other integral membrane proteins. **J. Membr. Biol.**, v. 217, n. 1-3, p. 21-33, 2007.

HEIDEL, S. M.; MACWILLIAMS, P. S.; BAIRD, W. M.; DASHWOOD, W. M.; BUTERS, J. T.; GONZALEZ, F. J.; LARSEN, M. C.; CZUPRYNSKI, C. J.; JEFCOATE, C. R. Cytochrome P4501B1 mediates induction of bone marrow cytotoxicity and preleukemia cells in mice treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. **Cancer Res.** v. 60, n. 13, p. 3454– 3460, 2000.

HOFFMAN, D. J.; GAY, M. L. Embryotoxic effects of benzo[a]pyrene, chrysene and 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene in petroleum hydrocarbon mixtures in mallard ducks. **J Toxicol Environ Health A.** v.7, n. 5, p. 775-787, 1981 .

GUENGERICH, F.P. [Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species.](#) **Chem Biol Interact.** v.106, n.3, p.161-82, 1997.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans: Polynuclear Aromatic Compounds. [Acesso em 15/06/2011]. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>

IRIGARAY, P. Overweight/obesity and cancer genesis: more than a biological link. **Biomed. Pharmacother**, v.61, p.665–678, 2007.

IRIGARAY, P., BELPOMME, D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. **Carcinogenesis.** v. 31, n2, p.135–148, 2010.

[POTTENGER, L. H.](#); [JEFCOATE, C. R.](#) Characterization of a novel cytochrome P450 from the transformable cell line, C3H/10T1/2. **Carcinogenesis.** v.11, n.2, p.321-7, 1990.

KANCZUGA-KODA, L.; SULKOWSKI, S.; KODA, M.; WINCEWICZ, A.; RUTKOWSKI, T.; MONIUSZKO, M. The Role of Connexins in Carcinogenesis:

Review of Current Knowledge **Current Signal Transduction Therapy**, v.2, p. 49-56, 2007.

KING, T.; BERTRAM, J. Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1719, n. 1-2, p. 146-160, 2005.

KING, T. J.; LAMPE, P. D. Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1719, n. 1-2, p. 24-35, 2005.

KIMURA, S.; GONZALEZ, F. J.; NEBERT, D. W. Tissue-specific expression of the mouse dioxin-inducible P1450 and P3450 genes: differential transcriptional activation and mRNA stability in liver and extrahepatic tissues. **Mol. Cell. Biol.** 6, 1471–1477, 1986.

KJENSETH, A.; FYKERUD, T.; RIVEDAL, E.; LEITHE, E. Regulation of gap junction intercellular communication by the ubiquitin system. **Cell. Signal.**, v. 22, n. 9, p. 1267-1273, 2010.

LAIRD, D. W. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1711, n. 2, p. 172-182, 2005.

LAMPE, P. D.; LAU, A. F. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n. 7, p. 1171-1186, 2004.

LAMPE, P. D.; LAU, A. F. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, n. 2, p. 205-215, 2000.

LEITHE, E.; RIVEDAL, E. Ubiquitination of gap junction proteins. **J. Membr. Biol.**, v. 217, n. 1-3, p. 43-51, 2007.

LIN D, TU Y, ZHU L. Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. **Food Chem Toxicol.** v. 43, p. 41-8, 2005.

LECANDA, F; WARLOW, P. A. M. SHEIKH, S., FURLAN, F., STEINBERG, T.H., ROBERTO CIVITELLI. Connexin43 Deficiency Causes Delayed Ossification, Craniofacial Abnormalities, and Osteoblast Dysfunction. **The Journal of Cell Biology**, v.151, n.4, p.931–943; 2000.

LOEWENSTEIN, W. R. Permeability of membrane junctions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 137, n. 2, p. 441-472, 1966.

LOEWENSTEIN, W. R.; KANNO, Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. **Nature**, v. 209, n. 5029, p. 1248-1249, 1966.

LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Quim Nova.** v.19, n.5, p. 497-516, 1996

- MARLOWE, J. L.; PUGA, A. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. **J Cell Biochem.** v.96, p. 1174-1184, 2005
- MCLACHLAN, E.; SHAO, Q.; LAIRD, D. W. Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. **J. Membr. Biol.**, v. 218, n. 1-3, p. 107-121, 2007.
- MESNIL, M. Connexins and cancer. **Biol. Cell**, v. 94, n. 7-8, p. 493-500, 2002.
- MESNIL, M.; CRESPIAN, S.; AVANZO, J. L.; ZAIDAN-DAGLI, M. L. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1719, n. 1-2, p. 125-145, 2005.
- MUSIL, L. S.; LE, A. C.; VANSLYKE, J. K.; ROBERTS, L. M. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 33, p. 25207-25215, 2000.
- NAUS, C.; LAIRD, D. Implications and challenges of connexin connections to cancer. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 10, n. 6, p. 435-441, 2010.
- NEBERT, D. W. Drug metabolism. Growth signal pathways. **Nature.** v. 347, p. 709–710, 1990.
- NEBERT, D. W.; DALTON, T. P. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 947–960, 2006.
- [NELSON, D.R.](#); [KOYMANS, L.](#); [KAMATAKI, T.](#); [STEGEMAN, J.J.](#); [FEYEREISEN, R.](#); [WAXMAN, D.J.](#); [WATERMAN, M.R.](#); [GOTOH, O.](#); [COON, M.J.](#); [ESTABROOK, R.W.](#); [GUNSALUS, I.C.](#); [NEBERT, D.W.](#) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v.6, n.1, p.1-42, 1996
- PELKONEN, O.; NEBERT, D. W. Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Etiologic Role in Carcinogenesis. **Pharmacological Reviews.** v. 34, n. 2:189-222. 1982.
- PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB Journal**, v. 5, p. 2280–2286, 1991.
- [REAUME, A. G.](#), [SOUSA, P. A.](#); [KULKARNI, S.](#); [LANGILLE, B. L.](#); [ZHU, D.](#); [DAVIES, T.C.](#); [JUNEJA, S. C.](#); [KIDDER, G.M.](#); [ROSSANT, J.](#) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. **Science.** v. 267; n. 5205; p. 1831-4, 1995
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R.S. Patologia - Bases Patológicas das doenças. 7ªed., Rio de Janeiro, Elsevier Editora LTDA, 2005, p. 281-356.
- ROWLANDS, J. C.; GUSTAFSSON, J. A. Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. **Crit. Rev. Toxicol.** v.27 n. 2, p.109–134, 1997
- SÁEZ, J. C.; MARTÍNEZ, A. D.; BRAÑES, M. C.; GONZÁLEZ, H. E. Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 5, p. 593-600, 1998.

SAFFITZ, J. E.; LAING, J. G.; YAMADA, K. A. Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. **Circ. Res.**, v. 86, n. 7, p. 723-728, 2000.

SAKAI, Y.; TANAKA, M.; SHIRAKAWA, M. Lymphocyte changes in peripheral blood, spleen, and liver in DMBA-induced squamous cell carcinoma of mouse cheek skin. *Odontology*. v. 92; p. 36-42, 2004.

SAITO-KATSURAGI, M.; ASADA, H.; NIIZEKI, H.; KATOH, F.; MASUZAWA, M.; TSUTSUMI, M.; KUNIYASU, H.; ITO, A.; NOJIMA, H.; MIYAGAWA, S. Role for connexin 26 in metastasis of human malignant melanoma: communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26. *Cancer*, v. 110, n. 5, p. 1162-1172, 2007.

SCHEDIN, P.; ELIAS, A. Multistep tumorigenesis and the microenvironment **Breast Cancer Res**, v.6, p.93-101, 2004.

SEGRETAIN, D.; FALK, M. M. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1662, n. 1-2, p. 3-21, 2004.

SMITH, D. C.; SMITH, M. J.; WHITE, K. L. [Systemic immunosuppression following a single pharyngeal aspiration of 1,2:5,6-dibenzanthracene in female B6C3F1 mice.](#) **J. Immunotoxicol.** v.7, n.3, p.219-31. 2010

SEGRETAIN, D.; FALK, M. M. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1662, n. 1-2, p. 3-21, 2004.

[SUTTER, T.R.](#); [TANG, Y.M.](#); [HAYES, C.L.](#); [WO, Y.Y.](#); [JABS, E.W.](#); [LI, X.](#); [YIN, H.](#); [CODY, C.W.](#); [GREENLEE, W.F.](#) Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. **J Biol Chem.**, v.269, n.18, p.13092-9, 1994.

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

SPRAY, D. C. Gap junction proteins: where they live and how they die. **Circ. Res.**, v. 83, n. 6, p. 679-681, 1998.

SQUARTINI, F.; PINGITORE, R. Tumors of the mammary gland. In: Turusov V.S., Mohr U. Pathology of tumours in laboratory animals. **Tumors of the Mouse**, 2 ed. Lyon France - IARC Scientific Publication (WHO) n. 111, cap. 2, p. 47-99, 1994.

TAMULSKI, T. S.; MORREA, C. E.; DAO, L. D. Comparative Metabolism of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in Liver and Mammary Tissue. **Cancer Research.** v.33, p. 3117-3122, 1973.

TORRES, L. N.; MATERA, J. M.; VASCONCELLOS, C. H.; AVANZO, J. L.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; DAGLI, M. L. Expression of connexins 26 and 43 in

canine hyperplastic and neoplastic mammary glands. **Vet. Pathol.**, v. 42, n. 5, p. 633-641, 2005.

TURUSOV V. S., MOHR U. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumors of the Mouse, 2 ed. Lyon France - IARC Scientific Publication, v.II, n.111(WHO), 776p.1994.

UNGER, V. M.; KUMAR, N. M.; GILULA, N. B.; YEAGER, M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. **Science**, v.283, n.5405, p1176-80, 1999.

VANSLYKE, J. K.; MUSIL, L. S. Degradation of connexins from the plasma membrane is regulated by inhibitors of protein synthesis. **Cell Commun. Adhes.**, v. 10, n. 4-6, p. 329-333, 2003.

VINKEN, M.; VANHAECKE, T.; PAPELEU, P.; SNYKERS, S.; HENKENS, T.; ROGIERS, V. Connexins and their channels in cell growth and cell death. **Cell Signal.**, v. 18, n. 5, p. 592-600, 2006.

WYAMASAKI, H. Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis. **Environ. Health. Perspect.**, v. 93, n., p. 191-197, 1991.

YANO, T.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; OMORI, Y.; YAMASAKI, H. Reduction of malignant phenotype of HEPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 10, p. 1593-1600, 2001.

YAMASAKI, H.; KRUTOVSKIKH, V.; MESNIL, M.; TANAKA, T.; ZAIDAN-DAGLI, M. L.; OMORI, Y. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. **C R Acad Sci III.**, v.322; n. 2-3; p. 151-9, 1999.

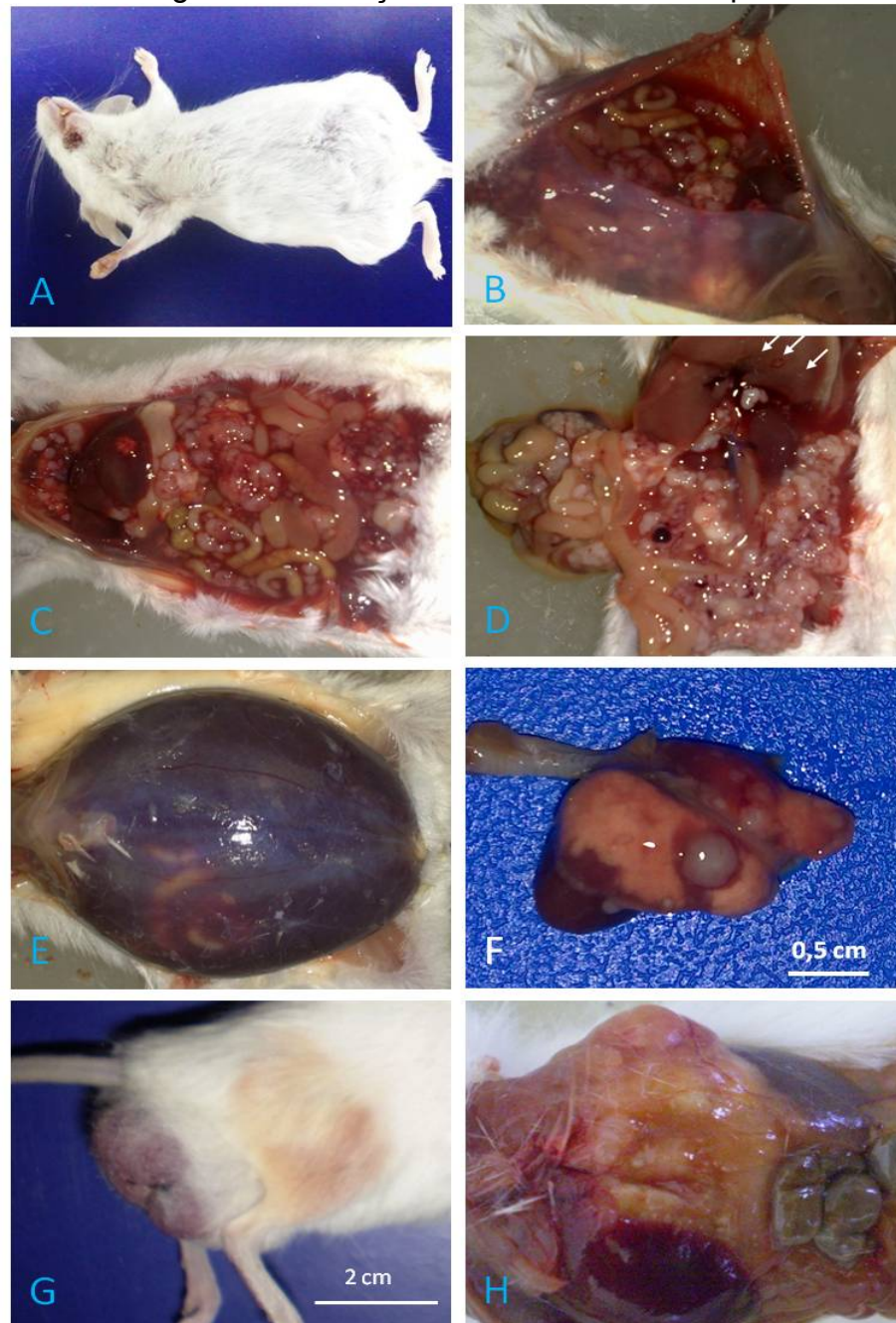
ZHANG, Y. W.; KANEDA, M.; MORITA, I. The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 45, p. 44852-44856, 2003.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; BU, H.; YANG, G.; LI, S.; GUO, L. Studies of intercellular communication in human rhabdomyosarcoma cell lines of different metastatic potential. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, v. 30, n. 6, p. 448-451, 2001.

ZHAO, Z.; DENG, H. Roles of gap junctions in tumorigenesis. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, v. 36, n. 3, p. 203-205, 2007.

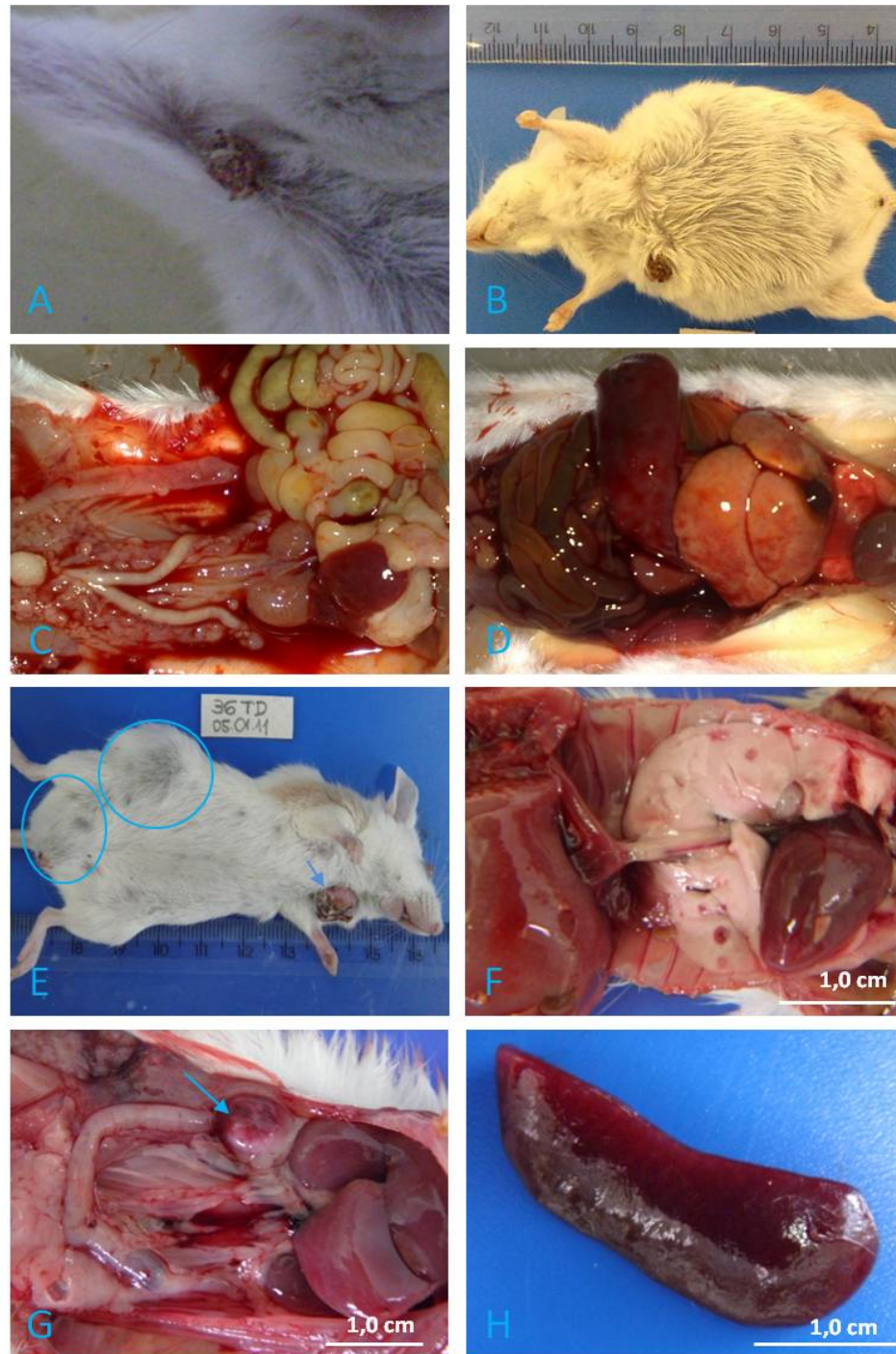
APÊNDICES

APÊNDICE A  
Imagens de alterações observadas à necropsia

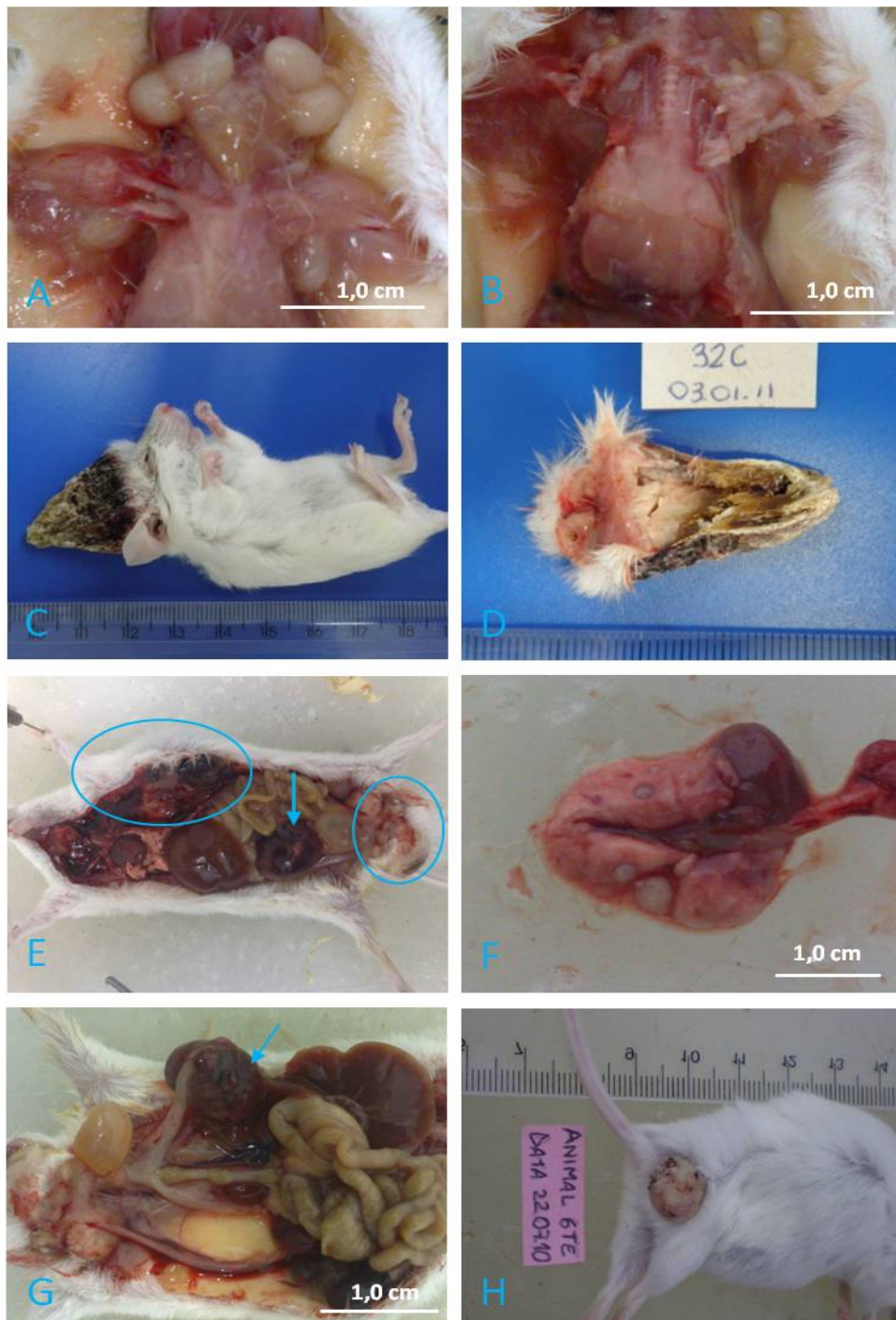


**Figura 10** – Imagens de alterações macroscópicas observadas nos camundongos Cx43 +/- que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg; A. Abdômem distendido e formação cutânea castanha, ligeiramente exofítica e crostosa, situada próxima à comissura labial direita; B. Abdômem aberto do animal mostrado em A revelando efusão hemorrágica moderada e numerosos nódulos brancos nas serosas (carcinomatose), melhor visualizados em C e D; C. Nota-se nódulos no diafragma e fígado (setas); D. Mesentério difusamente nodular; notar discretos pontos brancos de infiltração neoplásica no fígado (setas). E. Animal com abdômem acentuadamente distendido, com paredes musculares delgadas permitindo visualizar o hemoperitônio; F. Pulmões com nódulos cinzas de 0,1 a 0,3 cm; G. tumor de mama (adenocarcinoma tipo B) em mama inguinal direita; H. cavidade abdominal revelando grande massa no estômago aderindo-aos órgãos adjacentes.





**Figura 11** – Imagens de alterações macroscópicas observadas nos camundongos Cx43 +/- que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg: A. Lesão cutânea castanha, ligeiramente exofítica e crostosa, situada em região exilar direita; B. Abdomem acentuadamente distendido e lesão cutânea de mesmo aspecto da imagem A; C. Notam-se numerosos nódulos milimétricos na região do retroperitônio e ligamento largo do útero (carcinomatose); D. Notar esplenomegalia acentuada, fígado pálido e aumentado moderadamente e líquido seroso avermelhado na cavidade; E. Animal com duas formações mamárias, uma em mama inguinal e a outra em mama abdominal (círculos), e uma cutânea e exofítica moderadamente, parcialmente crostosa, parcialmente lisa e alopecica; F. Pulmões com pontos e nódulos avermelhados de menos de 0,1 cm de diâmetro. G. tumor em ovário direito (seta). H. Baço aumentado e irregular.

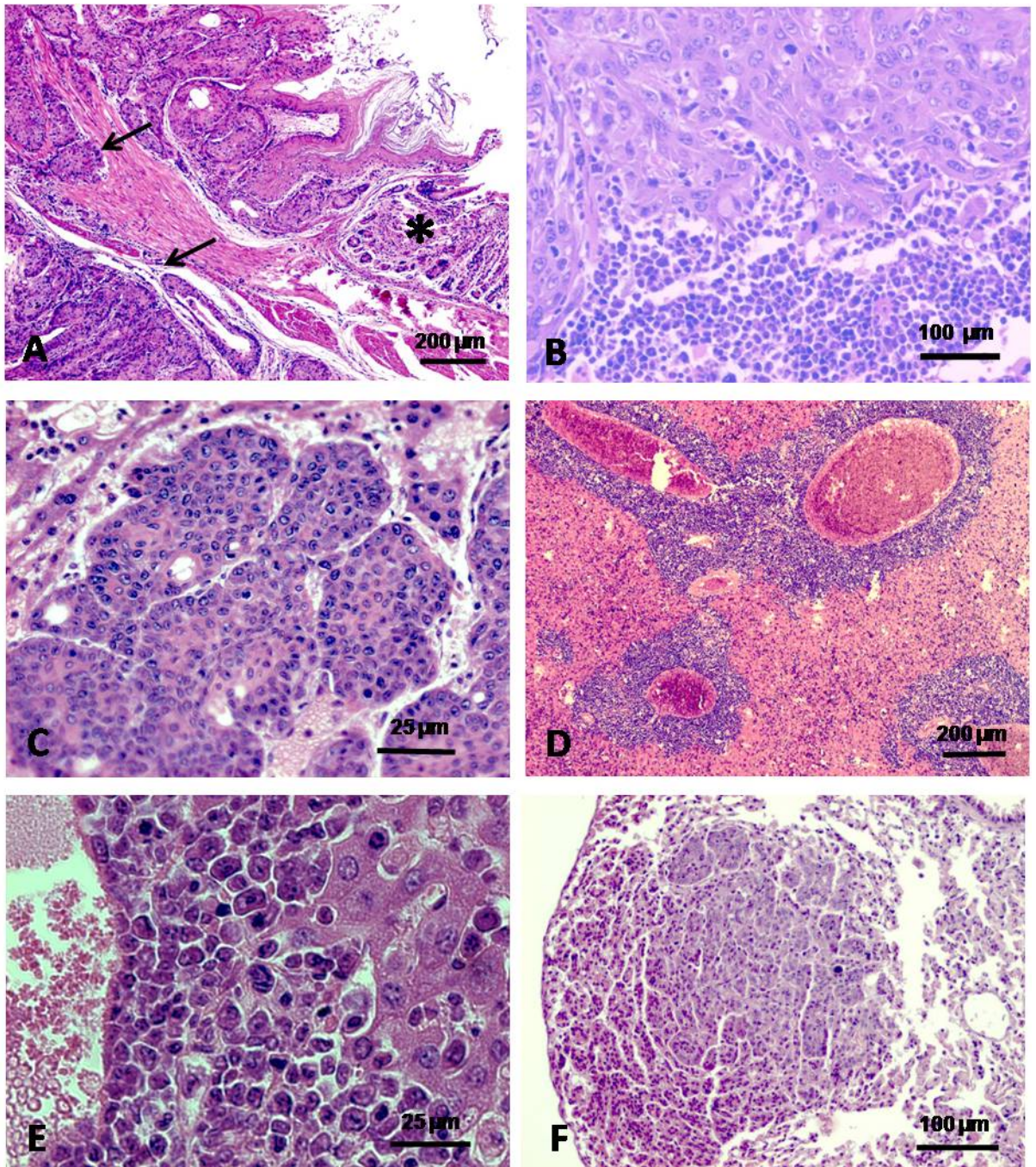


**Figura 12** – Imagens de alterações macroscópicas observadas nos camundongos Cx43 +/- que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg: A. Linfonodos submandibulares e pré-escapulares acentadamente aumentados; B. Massa grande e branca acinzentada em região mediastínica (mesmo caso A); C. Grande formação córnea exofítica; D. Superfície de corte da lesão em C; E. Animal apresentando duas formações mamárias, uma em mama inguinal esquerda e a outra em mama torácica esquerda (círculos), e uma formação em ovário direito; F. Pulmões com nódulos avermelhados de até 0,3 cm de diâmetro (mesmo caso E); G. tumor em ovário direito (seta). H. Formação cutânea exofítica de superfície lisa e branca, com pequenos focos crostosos em região posterior lateral de coxa direita.

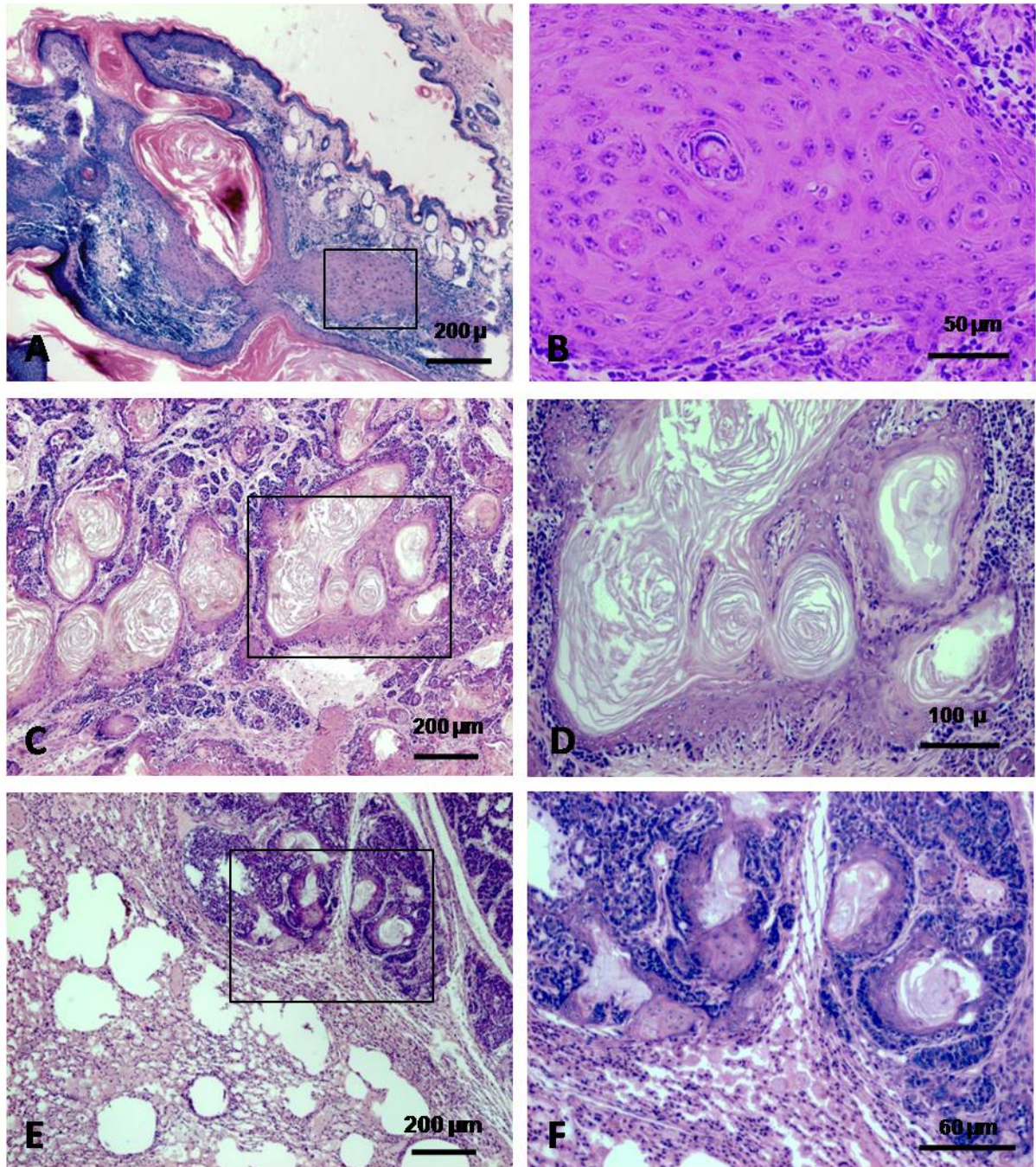


**Figura 13** – Imagens de alterações macroscópicas observadas nos camundongos Cx43 +/- que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg: A. Grande formação branca acinzentada em estômago e pequenos nódulos milimétricos aleatoriamente distribuídos pelo peritônio (carcinomatose); B. Mesmo caso A, mostrando nódulos no diafragma (carcinomatose); C. Hemotórax; D. Mesmo caso C, mostrando pulmões atelectásicos e com nódulos; E. Grande massa branca-acinzentada no baço (metástase do carcinoma gástrico); F. Animal com abdômen distendido acentuadamente (carcinomatose) com lesões cutâneas crostosas exofíticas como cornos cutâneos. G. Tumor em mama torácica direita. H. Tumor em mama torácica esquerda; animal caquético.

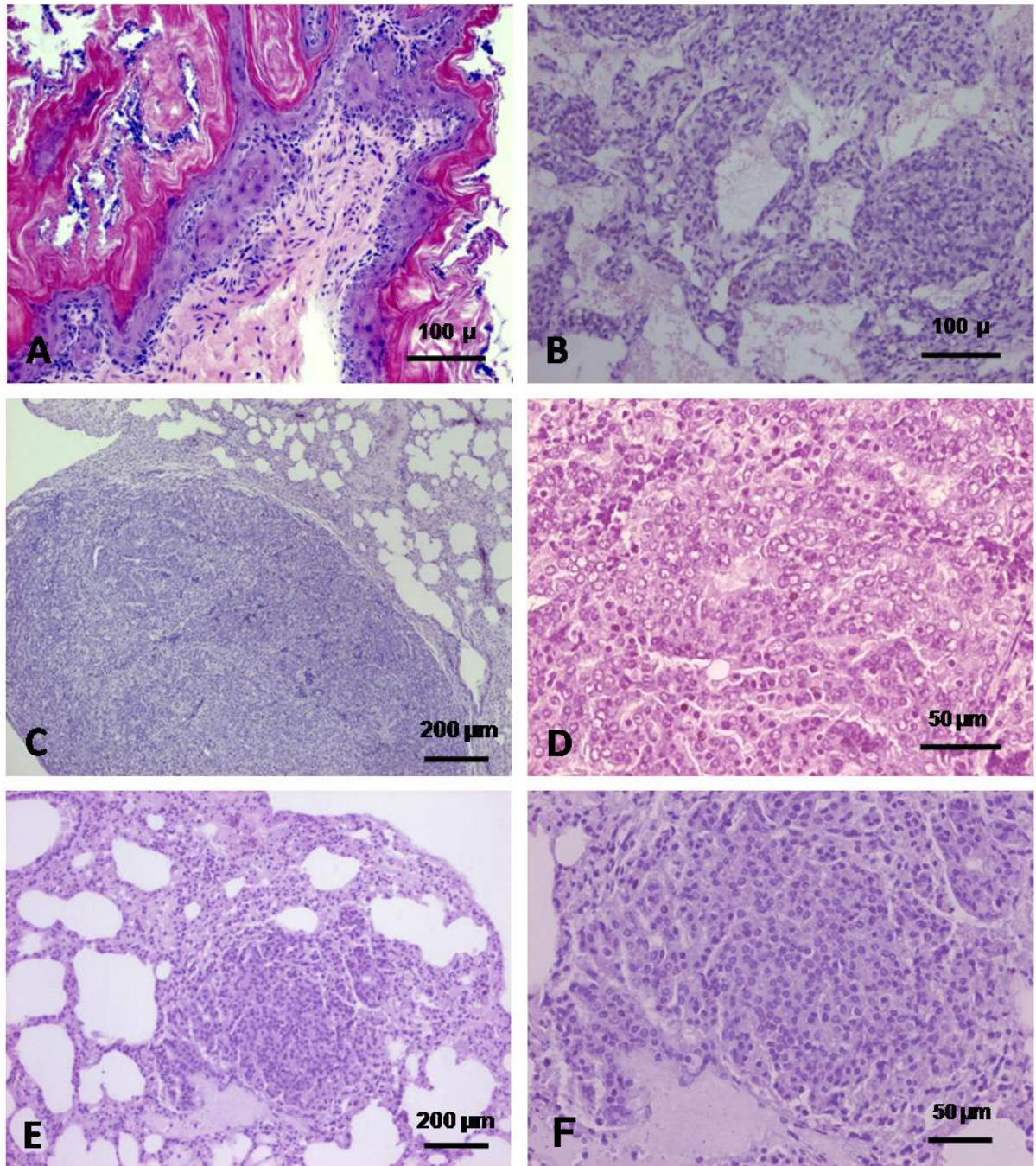
APÊNDICE B  
Imagens das alterações microscópicas



**Figura 14** – Fotomicrografias de cortes histopatológicos (hematoxilina e eosina) das neoplasias observadas nos camundongos Cx43 +/+ que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg: A. Carcinoma de células escamosas da região aglandular infiltrado a musculatura (setas); notar região glandular normal (\*); B. Carcinoma gástrico infiltrando o baço; C. Carcinoma gástrico infiltrando o fígado e comprimindo cordões de hepatócitos; D. Linfoma infiltrando o fígado de forma mais concentrada ao redor de vasos; E. Linfoma proliferando em fígado; notar pleiomorfismo acentuado e atividade mitótica proeminente; F. Pulmão com adenocarcinoma papilar alveolar.



**Figura 15** – Fotomicrografias de cortes (hematoxilina e eosina) das neoplasias observadas nos camundongos Cx43 +/- que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomadárias de 1mg: A. Pele com carcinoma de células escamosas; B. Destaque de A, mostrando focos de queratinização concêntrica incipiente e comportamento infiltrativo abaixo à esquerda; C. Tumor de mama - adenoacantoma; D. Destaque de C, evidenciando a formação de cistos córneos; E. Pulmão com metástase de adenoacantoma mamário; F. Destaque de E, evidenciando pequenos cistos córneos em focos metastáticos de adenoacantoma mário;



**Figura 16** – Fotomicrografias de cortes histopatológicos (hematoxilina e eosina) das neoplasias observadas nos camundongos Cx43 +/- que receberam 9mg de DMBA por gavagem em doses hebdomádrias de 1mg: A. Mucosa aglandular do estômago - displasia e hiperqueratose acentuada, caracterizando lesão pré-neoplásica; B. Tumor de células da granulosa angiectásico; C. Pulmão com carcinoma brônquico; D. Destaque de C, evidenciando pleiomorfismo acentuado; E. Pulmão com adenoma alveolar sólido ; F. Destaque de E; notar população celular sólida relativamente uniforme;