FERNANDO YUTAKA MONIWA HOSOMI

Efeitos da deleção do gene para conexina 32 sobre aspectos pró e anti-inflamatórios no modelo de desmielinização tóxica do brometo de etídio

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

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. Paulo César Maiorka

São Paulo
2010

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2236
FMVZ

Hosomi, Fernando Yutaka Moniwa
Efeitos da deleção do gene para conexina 32 sobre aspectos pró e anti-inflamatórios no modelo de desmielinização tóxica do brometo de etídio / Fernando Yutaka Moniwa Hosomi. -- 2010.
68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2010.

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

1. Conexinas. 2. Camundongos. 3. Encefalite. 4. Brometo de etídio. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da expressão de fatores pró e anti-inflamatórios por RT-PCR em camundongos Knock-Out para conexina 32 experimentalmente desmielinizados por Brometo de Etídeo", protocolado sob o nº974/2006, utilizando 50 (cinqüenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Maiorka está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/09/06".

(We certify that the Research "Evaluation of pro-inflammatory and anti-inflammatory factors expression by RT-PCR in experimentally demyelinated connexin 32 Knock-Out mice by Ethidium bromide", protocol number 974/2006, utilizing 50 (fifty) mice, under the responsibility of Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 09/13/2006).

São Paulo, 14 de setembro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - 05508-270 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 - fones: (11) 309107676/7671 - e-mail: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: HOSOMI, Fernando Yutaka Moniwa

Título: Efeitos da deleção do gene para conexina 32 sobre aspectos pró e anti-inflamatórios no modelo de desmielinização tóxica do brometo de etídio

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

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr._____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr._____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedicado aos meus pais, a quem devo tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Prof. Dr. Paulo César Maiorka;

Aos amigos, colegas e funcionários do Departamento de Patologia;

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, Dr. Ênio Mori e Dra. Cláudia Madalena Cabrera Mori;

Aos amigos, colegas e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal;

Aos amigos e colegas;

À família;

À Sra. Elza Faquim e equipe da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice;

À FAPESP, Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 06/58520-6).

EPÍGRAFE

Um velho monge disse ao seu discípulo: “Dentro de mim vivem dois cães: Um deles é bondoso, diligente, gentil e amigável; o outro é violento, interesseiro, desconfiado e traiçoeiro. Eles vivem brigando entre si.” O discípulo então perguntou: “Então, dentre os dois, quem vencerá?” Ao que o mestre então respondeu:

“Aquele que eu alimentar.”

‘Antiga parábola japonesa’

RESUMO

HOSOMI, F. Y. M. **Efeitos da deleção do gene para conexina 32 sobre aspectos pró e anti-inflamatórios no modelo de desmielinização tóxica do brometo de etídio.** [Effects of deletion of the connexin 32 gene on pro and antiinflammatories effects in the ethidium bromide toxic demyelination model]. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As junções comunicantes são estruturas celulares que permitem o trânsito de moléculas entre as células, desempenhando funções de sinalização e transporte intercelular. São formadas por proteínas denominadas conexinas e representam estruturas-chave no funcionamento de tecidos altamente complexos e integrados, como o sistema nervoso central (SNC). O presente estudo avalia os efeitos da deleção da conexina 32 (Cx32) na inflamação e regeneração/cicatrização do SNC após 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós-injeção intracerebral de brometo de etídio em camundongos deletados para Cx32 e camundongos normais. Para tanto, quantificou-se a expressão dos genes para fator de necrose tumoral alfa (TNFα), fator de crescimento transformador beta 1 (TGFβ1), metaloproteinase 3 (MMP3), metaloproteinase 9 (MMP9) e inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP1), através de PCR em tempo real. Os resultados indicam variáveis diferenças no padrão de expressão, incluindo variação na expressão de todos os genes pesquisados no período de 3 dias pós-injeção, ápice dos mecanismos de inflamação aguda. Estes resultados sugerem que a conexina 32 pode desempenhar funções importantes na sinalização molecular do processo inflamatório e regenerativo/cicatricial do sistema nervoso central.

Palavras-chave: Conexinas. Camundongos. Encefalite. Brometo de etídio.

ABSTRACT

HOSOMI, F. Y. M. **Effects of deletion of the connexin 32 gene on pro and antiinflammatories effects in the ethidium bromide toxic demyelination model**. [Efeitos da deleção do gene para conexina 32 sobre aspectos pró e anti-inflamatórios no modelo de desmielinização tóxica do brometo de etídio]. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Gap junctions are cellular structures that allow transit of molecules between cells, performing intercellular signaling and transportation. They are formed by proteins denominated connexins and represent key structures in highly complex and integrated tissues, such as the central nervous system (CNS). The present study evaluates the effects of connexin 32 (Cx32) deletion upon CNS inflammation and regeneration/cicatrization after 1, 3, 7, 10 and 20 days after intracerebral injection of ethidium bromide in Cx32 Knock Out and normal mice. To accomplish so, Real Time PCR gene expression quantification was performed uppon tumour necrosis factor alpha (TNFα), transforming growth factor beta 1 (TGFβ1), metalloproteinase 3 (MMP3), metalloproteinase 9 (MMP9) and tissue inhibitor of metalloproteinases 1(TIMP1) genes. Results indicate variable differences in the expression pattern, including difference in expression of all evaluated genes in the 3 days after injection period, apex of the acute inflammation mechanisms. These results suggest that Cx32 may perform important functions on molecular inflammatory and regenerative/cicatrization signalling in the CNS.

Keywords: Connexins. Mice. Encephalitis. Ethidium bromide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da célula eucariota, mostrando as organelas. 1, nucléolo; 2, núcleo; 3, ribossomo; 4, vesícula; 5, retículo endoplasmático rugoso; 6, aparelho de Golgi; 7, citoesqueleto; 8, retículo endoplasmático liso; 9, mitocôndria; 10, vacúolo; 11, citoplasma; 12, lisossomo; 13, centríolos em centrossomo..... 22

Figura 2 – Diagrama mostrando o Dogma central da biologia molecular expandido.... 23

Figura 3 – Diagrama da estrutura básica de um neurônio do SNP, mostrando a bainha de mielina..... 25

Figura 4 – Representação esquemática das junções comunicantes (*Gap junctions*) entre dois segmentos de membranas citoplasmáticas (à esquerda). Cada membrana contribui com um conexon, formado por seis proteínas conexinas (1), totalizando um canal formado por doze conexinas. Cada proteína conexina possui quatro domínios transmembrana (DTM). Legenda: Compartimento intracelular (IC); membrana citoplasmática (MC); espaço extracelular (EC); Domínio aminoterminal (DAT); Alças extracelulares (AEC); Alça citoplasmática (AC); Domínio carboxiterminal (DCT)..... 29

Figura 5 – O Ying e Yang das funções das metaloproteinases no sistema nervoso central, mostrando os "benefícios" e "malefícios" da atividade desta família de enzimas na fisiopatologia neurológica..... 32

Figura 6 – Gaiola de criação e manutenção de animais geneticamente modificados. Os espaços vazados da tampa são cobertos por papel de filtro específico.... 35

Figura 7 – Esquema que ilustra alguns passos da extração de DNA. O fragmento da cauda é macerado com o auxílio de uma placa gelada. No tubo é mostrada a disposição do material após a centrifugação..... 36

Figura 8 – Amostra de gel com os genótipos dos camundongos: amostras indicativas de animais KO são representadas pelas bandas leves de 414pb (inferiores), amostras indicativas de animais normais representadas pelas bandas pesadas (superiores)..... 38

Figura 9 – Detalhes do processo cirúrgico de inoculação de brometo de etídio. A) Camundongo tricotomizado posicionado sobre plataforma aquecida no equipamento de cirurgia estereotáxica. B) Esquema indicativo do trajeto da agulha e local de inoculação do brometo de etídio. C) Fotografia de encéfalo através de iluminação ultravioleta demonstrativa do local de inoculação de brometo de etídio. D) Demonstração da inserção da agulha

Hamilton® em camundongo..... 39

Figura 10 – Fotografia de eletroforese em gel de agarose de amostra de RNA total extraído. As duas bandas mais brilhantes no alto da figura indicam as frações ribossômicas 18s e 25s..... 42

Figura 11 – Representação esquemática da disposição das amostras utilizadas. Note que nas linhas A, C e E encontram-se amostras selvagens e nas linhas B, D e F as amostras KO..... 50

Figura 12 – Fotografia sob luz ultravioleta de gel de agarose corado com brometo de etídio 0,1%, mostrando bandas de sequências amplificadas de amostra, 7 dias, KO, mostrando a correta amplificação dos segmentos-alvo. Da direita para a esquerda: GAPDH (107pb), TIMP1 (90pb), MMP9 (76pb), MMP3 (66pb), TGFβ1 (58pb), TNFα (63pb) e referência de peso molecular (*ladder*). As moléculas mais leves encontram-se na porção mais superior da imagem..... 53

Figura 13 – Exemplo de imagem capturada da tela de resumo de erros (*QC summary*), após reação de Real Time – PCR de amostras de 3 dias. Notar a ausência de notificações de erros (*Flags*)..... 54

Figura 14 – Exemplo de imagem capturada da tela de trabalho do programa SDS 2.1, após reação de Real Time – PCR de amostras de três (3) dias. Notar o padrão adequado de amplificação no gráfico ao centro e a ausência de notificações de erros (*Flags*) nos poços representados à direita da tela..... 54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráficos demonstrando as alterações fisiopatológicas que ocorrem no SNC de camundongos normais (A) e *KO* para Cx32 (B) durante os processos de desmielinização e remielinização no modelo de brometo de etídio. Legenda: BE: metabolização do BE. M-OL: morte de oligodendrócitos. M-AS: morte de astrócitos. RM-OL: remielinização pelos oligodendrócitos. RM-CS: remielinização pelas células de Schwann. AS-RA: reação astrocitária. Macrófagos: presença desse tipo celular na lesão..... 28

Gráfico 2 – Ausência de amplificação de alvos em amostra de RNA total previamente à transcrição reversa, grupo de 3 dias. Notar a detecção de somente ruído (fluorescência basal). Tela do programa SDS v2.1 (Applied Biosystems INC.)..... 44

Gráfico 3 – Exemplo referente ao gráfico de amplificação de diluição seriada de razão 10 (1:10), alvo TGFβ1 e controle endógeno GAPDH, amostra Testemunha KO. Notar o baixo desvio padrão entre as replicatas e o intervalo equidistante entre as diluições, com intervalo aproximado de 3,2 C_T, condizente com a razão de diluição 1:10 utilizada..... 46

Gráfico 4 – Gráfico representativo das medidas de eficiência de reação do gene alvo TGFβ1 (reta acima) e controle endógeno GAPDH (reta abaixo). Notar a inclinação semelhante das duas retas e o baixo desvio padrão das replicatas (pontos vermelhos) do controle endógeno. 46

Gráfico 5 – Valores de eficiência de amplificação dos genes para TNFα, TGFβ1, MMP3, MMP9, TIMP1 e controle endógeno GAPDH. Notar as faixas de eficiência dos alvos próximas de 100%, com desvio em relação ao controle endógeno inferior a 10%..... 48

Gráfico 6 – Exemplo de gráfico de regressão linear de ΔC_T (GAPDH-TGFβ1) vs. log. da concentração. Notar que o coeficiente angular < 0,1..... 48

Gráfico 7 – Gráfico comparativo entre os valores médios de ΔCT e respectivos desvios padrão da expressão gênica de TNFα dos grupos selvagem (*Wild Typ*e - WT) e deletados (*Knock Out* – KO) aos 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós injeção e grupo testemunha (0). Asterisco (*): presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e KO..... 57

Gráfico 8 – Gráfico comparativo entre os valores médios de ΔCT e respectivos desvios padrão da expressão gênica de TGFβ1 dos grupos selvagem (*Wild Type* - WT) e deletados (*Knock Out* – KO) aos 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós injeção e grupo testemunha (0). Asterisco (*): presença de diferença

estatisticamente significante entre os grupos WT e KO..... 58

Gráfico 9 – Gráfico comparativo entre os valores médios de ΔCT e respectivos desvios padrão da expressão gênica de MMP3 dos grupos selvagem (*Wild Type* - WT) e deletados (*Knock Out* – KO) aos 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós injeção e grupo testemunha (0). Asterisco (*): presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e KO..... 58

Gráfico 10 – Gráfico comparativo entre os valores médios de ΔCT e respectivos desvios padrão da expressão gênica de MMP9 dos grupos selvagem (*Wild Type* - WT) e deletados (*Knock Out* – KO) aos 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós injeção e grupo testemunha (0). Asterisco (*): presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e KO..... 59

Gráfico 11 – Gráfico comparativo entre os valores médios de ΔC_T e respectivos desvios padrão da expressão gênica de TIMP1 dos grupos selvagem (*Wild Type* - WT) e deletados (*Knock Out* – KO) aos 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós injeção e grupo testemunha (0). Asterisco (*): presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e KO..... 59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Especificações das quantidades e produtos que foram utilizados para a formulação do *mix* a ser utilizado na reação de PCR..... 37

Quadro 2 – Sequência dos *primers* utilizados na reação de PCR (Invitrogen Inc.)..... 37

Quadro 3 – Relação de componentes e volumes utilizados do kit High Capacity cDNA Reverse transcription com inibidor de RNAse, para reação de transcrição reversa (RT)..... 43

Quadro 4 – Relação dos ensaios (*assays*) Taqman utilizados, sequências dos *primers forward*, código do produto e tamanho das sequências amplificadas (*amplicons*)..... 51

Quadro 5 – Relação de reagentes e volumes utilizados por reação de PCR em tempo real..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Detalhamento dos grupos e das datas de coleta de materiais para PCR em tempo real, camundongos experimentais..... 40

Tabela 2 – Detalhamento dos grupos e das datas de coleta de materiais para PCR em tempo real, camundongos testemunha..... 40

Tabela 3 – Relação de tempos e temperaturas de ciclagem utilizadas na reação de transcrição reversa (RT)..... 43

Tabela 4 – Relação de temperatura, tempo e número de ciclos utilizados no PCR em tempo real..... 52

Tabela 5 – Valores médios dos C_Ts e ΔC_Ts das replicatas dos grupos selvagens (*Wild Type*). ΔC_Ts médios estão à direita de seus respectivos C_Ts. Valores médios dos grupos e respectivos desvios padrão estão indicados..... 55

Tabela 6 – Valores médios dos C_Ts e ΔC_Ts das replicatas dos grupos deletados (*Knock Out*). ΔC_Ts médios estão à direita de seus respectivos C_Ts. Valores médios dos grupos e respectivos desvios padrão estão indicados..... 56

Tabela 7 – Resultados do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney comparando os valores de ΔC_T dos grupos WT e KO para os ensaios para TNFα, indicando a existência ou não de diferença entre os grupos e o respectivo valor de significância. Valores de ΔC_T e $\Delta\Delta C_T$ e respectivos desvio padrão e variação relativa de expressão dos grupos WT e KO para o ensaio para TNFα. Valores acima de um (1) apontam para aumento de expressão, enquanto valores menores que um apontam para redução de expressão..... 60

Tabela 8 – Resultados do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney comparando os valores de ΔC_T dos grupos WT e KO para os ensaios para TGFβ1, indicando a existência ou não de diferença entre os grupos e o respectivo valor de significância. Valores de ΔC_T e $\Delta\Delta C_T$ e respectivos desvio padrão e variação relativa de expressão dos grupos WT e KO para o ensaio para TGFβ1. Valores acima de um (1) apontam para aumento de expressão, enquanto valores menores que um apontam para redução de expressão..... 60

Tabela 9 – Resultados do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney comparando os valores de ΔC_T dos grupos WT e KO para os ensaios para MMP3, indicando a existência ou não de diferença entre os grupos e o respectivo valor de significância. Valores de ΔC_T e $\Delta\Delta C_T$ e respectivos desvio padrão e variação relativa de expressão dos grupos WT e KO para o ensaio para MMP3. Valores acima de um (1) apontam para aumento de expressão, enquanto valores menores que um apontam para redução de expressão..... 60

Tabela 10 – Resultados do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney comparando os valores

de ΔC_T dos grupos WT e KO para os ensaios para MMP9, indicando a existência ou não de diferença entre os grupos e o respectivo valor de significância. Valores de ΔC_T e $\Delta\Delta C_T$ e respectivos desvio padrão e variação relativa de expressão dos grupos WT e KO para o ensaio para MMP9. Valores acima de um (1) apontam para aumento de expressão, enquanto valores menores que um apontam para redução de expressão..... 61

Tabela 11 – Resultados do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney comparando os valores de ΔC_T dos grupos WT e KO para os ensaios para TIMP1, indicando a existência ou não de diferença entre os grupos e o respectivo valor de significância. Valores de ΔC_T e $\Delta\Delta C_T$ e respectivos desvio padrão e variação relativa de expressão dos grupos WT e KO para o ensaio para TIMP1. Valores acima de um (1) apontam para aumento de expressão, enquanto valores menores que um apontam para redução de expressão..... 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	Brometo de etídio
CD	Grupamentos de diferenciação (Cluster differentiation)
CT	Ciclo limiar (*Cycle threshold*)
Cx	Conexina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAE	Encefalite autoimune experimental
EM	Esclerose múltipla
FMVZ	Faculdade de medicina veterinária e zootecnia
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato de-hidrogenase
GCJ	Junções comunicantes das células gliais
kDa	Quilodalton
KO	Deletado (*Knock Out*)
MMP	Metaloproteinase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNAt	RNA transportador
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TE	Tris-Ácido etilenodiaminotetracético
TGFβ1	Fator transformador de crescimento beta 1
Th	Linfócito T auxiliador (*helper*)
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
UNG	Uracil-N-Glicosilase
USP	Universidade de São Paulo
VPS	Departamento de medicina preventiva e saúde animal
VPT	Departamento de patologia
WT	Selvagem (*wild type*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
2 OBJETIVOS 20
2.1 Objetivos específicos 20
3 REVISÃO DE LITERATURA 21
3.1 Estrutura dos seres vivos – Células, tecidos, órgãos e sistemas 21
3.2 A estrutura da célula e o dogma central da biologia 21
3.3 O sistema nervoso e suas células 23
3.4 Inflamação, regeneração e cicatrização 25
3.5 Inflamação, regeneração e cicatrização no SNC 26
3.6 O modelo desmielinizante do brometo de etídio (BE) 26
3.7 Encefalite experimental autoimune 28
3.8 Conexinas 29
3.9 Fator de necrose tumoral alfa (TNFα) 30
3.10 Fator de crescimento transformador beta tipo um (TGFβ1) 31
3.11 Metaloproteinases de matriz (MMPS) 32
3.12 Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPS) 33
4 MATERIAIS E MÉTODO 34
4.1 Produção dos reagentes biológicos – Camundongos 34
4.2 Certificado de biossegurança e normas para a manutenção e trabalhos em contenção com animais geneticamente modificados 35
4.3 Genotipagem dos animais 35
4.4 Cirurgias 38
4.5 Coleta de material para PRC em tempo real 39
4.6 Extração e quantificação de RNA 40
4.7 Transcrição reversa 42
4.8 Verificação de contaminação por DNA genômico e especificidade dos ensaios 43
4.9 Validação do método de C_T comparativo e verificação de eficiência 44
4.10 PCR quantitativo em Tempo Real no StepOne Detection System (Applied Biosystems) 48
4.11 Eletroforese em gel de agarose pós-amplificação 52
4.12 Análise dos dados 53
7 CONCLUSÕES 65
REFERÊNCIAS 66

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem–se observado no panorama mundial, principalmente nos países desenvolvidos, o aumento da longevidade nas populações humanas, com subsequente aumento da porcentagem de cidadãos idosos. Este aumento da idade média pode ser atribuído, entre outras causas, aos avanços da medicina e a melhorias na qualidade de vida, com incremento do acesso à informação e sanidade básica (LICHTENBERG, 2000; OMS, 2004). Nestes países, observa-se também o aumento da longevidade nos animais de companhia, com proporção cada vez maior de animais atingindo idades mais avançadas. Curiosamente, estes animais desenvolvem afecções ligadas à senilidade de forma semelhante e correlacionada com afecções humanas, como neoplasias, distúrbios locomotores e neurológicos, entre outras.

Desta forma, os estudos de modelos de afecções em animais, além de contribuirem com a determinação da patogenia, terapêutica e análise de casuística em medicina veterinária, permitem também o aprofundamento dos conhecimentos na medicina humana, com inegável benefício ao avanço científico. Os camundongos, sendo pequenos, resistentes e de reprodução rápida, se tornaram o principal organismo-modelo para estudos em genética molecular. Muitas mutações de ocorrência natural são conhecidas, muitas vezes imitando os efeitos das mutações correspondentes em humanos (ALBERTS et al., 2007).

As junções celulares comunicantes (ou junções tipo GAP) são elementos de comunicação intracelular e intercelular presentes na maioria dos tecidos e que permitem a passagem de moléculas de até 1kDa, como nutrientes, metabólitos, moléculas sinalizadoras etc (DERMIETZEL; SPRAY, 1993). Estas junções são formadas por conjuntos de proteínas conhecidas como conexinas (Cx), as quais são subdivididas e classificadas em dezenas de subtipos, entre ela a conexina 32. Para investigar a importância e as funções da conexina 32, foi desenvolvida uma linhagem específica de camundongos na qual o gene para a conexina 32 não é expresso. Utilizando-se esta linhagem de camundongos, o presente trabalho avalia os efeitos da deleção do gene para a conexina 32 sobre a expressão gênica de diferentes genes relacionados ao estímulo e ao controle do processo inflamatório, assim como os processos regenerativos e cicatrizantes que ocorrem no sistema nervoso central (SNC) após um estímulo produzido por uma injeção de brometo de etídio. Para tanto, utilizou-se o recurso da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para avaliar a expressão dos genes para fator de necrose tumoral alfa (TNFα), fator de crescimento transformador beta 1 (TGFβ1), metaloproteinase 3 (MMP3), metaloproteinase 9 (MMP9), inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP1) e Gliceraldeído 3-fosfato de-hidrogenase (GAPDH).

2 OBJETIVOS

- Investigar a importância e as funções da conexina 32 no processo inflamatório e reparador/cicatrizante do SNC

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar comparativamente animais selvagens (*Wild type* ou WT) e deletados (*Knock Out* ou KO) quanto à expressão dos genes para fator de necrose tumoral alfa (TNFα), fator de crescimento transformador beta 1 (TGFβ1), metaloproteinase 3 (MMP3), metaloproteinase 9 (MMP9), inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP1) e Gliceraldeído 3-fosfato de-hidrogenase (GAPDH) em seu estado normal (Grupos testemunha);
- Avaliar comparativamente animais selvagens (*Wild type* ou WT) e deletados (*Knock Out* ou KO) quanto à expressão dos genes para fator de necrose tumoral alfa (TNFα), fator de crescimento transformador beta 1 (TGFβ1), metaloproteinase 3 (MMP3), metaloproteinase 9 (MMP9), inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP1) e Gliceraldeído 3-fosfato de-hidrogenase (GAPDH) nos períodos de 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós-injeção de brometo de etídio (Grupos experimentais);
- Avaliar a evolução da expressão dos referidos genes ao longo dos períodos de 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós-injeção de brometo de etídio separadamente em cada linhagem estudada (WT ou KO);
- Padronizar as técnicas de coleta e armazenamento de material, extração de ácidos nucléicos, transcrição reversa, PCR em tempo real e análise de dados para estudos em sistema nervoso central para utilização no Laboratório de Neuropatologia Experimental e Comparada.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Estrutura dos seres vivos – Células, tecidos, órgãos e sistemas

Um organismo, para ser considerado "vivo", deve ser capaz de três ações básicas: "nascer", "multiplicar-se ou reproduzir-se" e "morrer". A célula é a unidade estrutural e funcional básica de todos os organismos vivos conhecidos. Ela é a menor unidade da vida que pode ser classificada como uma entidade viva e é frequentemente referida como o "bloco de construção" da Vida. Alguns organismos, como a maioria das bactérias, são unicelulares (consistem de uma única célula). Outros organismos, como os seres humanos, são multicelulares (possuindo cerca de 10 trilhões de células, ou 10^{13} células). Nestes organismos, todas estas células encontram-se organizadas na forma de tecidos (como o tecido muscular, o tecido nervoso etc) e órgãos (como o coração, o cérebro etc). Mas qualquer que seja o organismo (uni ou multicelular), a célula é o veículo no qual está contida toda a informação genética do indivíduo (ALBERTS et al., 2007).

Um sistema (ou aparelho) orgânico é um conjunto de órgãos que funcionam em conjunto para desempenhar uma função. São exemplos de sistemas (ou aparelhos) orgânicos o sistema respiratório (nariz, laringe, traqueia, pulmões etc), o circulatório (coração, artérias, veias, capilares etc) etc. Entre estes sistemas, encontramos o sistema nervoso (SN), uma complexa rede de células cuja função é integrar, coordenar e controlar as diferentes atividades dentro de um organismo e deste organismo com seu ambiente (e outros organismos) (ALBERTS et al., 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

3.2 A estrutura da célula e o dogma central da biologia

Como visto anteriormente, a célula é a menor estrutura de um organismo que se pode considerar "viva". Nos organismos eucariotos (como os seres humanos, os cães, os camundongos etc) as células são formadas por um revestimento lipoproteico em bicamada (denominada membrana plasmática), o qual é preenchido por uma substância coloide complexa (citoplasma), na qual encontram-se imersas diferentes estruturas funcionais

(organelas) e um (ou mais) núcleo(s) (Figura 1). É no núcleo onde encontramos a maior parte da informação genética da célula, organizada na forma de cadeias de ácido desoxirribonucleico ou DNA.

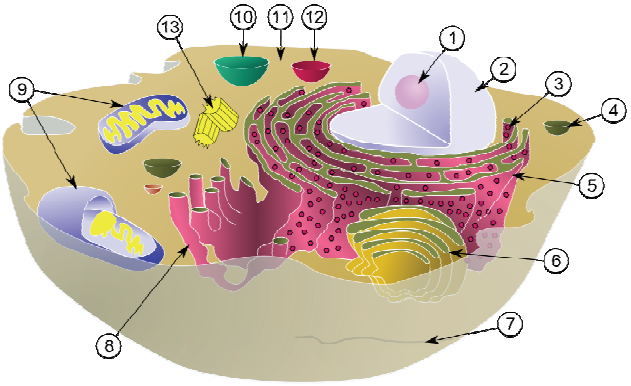


Figura 1 – Representação esquemática da célula eucariota, mostrando as organelas. 1, nucléolo; 2, núcleo; 3, ribossomo; 4, vesícula; 5, retículo endoplasmático rugoso; 6, aparelho de Golgi; 7, citoesqueleto; 8, retículo endoplasmático liso; 9, mitocôndrias; 10, vacúolo; 11, citoplasma; 12, lisossomo; 13, centríolos em centrossomo. De Creative Commons Attribution-ShareAlike License

As informações genéticas encontram-se codificadas no DNA na forma de genes, a unidade básica da hereditariedade de um organismo vivo. Desta forma encontramos no DNA basicamente toda a informação de um organismo e todas as instruções para a produção e funcionamento das diferentes substâncias que o compõe, entre elas os carboidratos (ou açúcares), os lipídeos (óleos ou gorduras) e as proteínas. As proteínas (ou polipeptídeos) são compostos formados por cadeias de estruturas menores denominadas aminoácidos (peptídeos). Em última instância, pode-se considerar que as proteínas são as moléculas mais importantes responsáveis pela estrutura (anatomia) e funções (fisiologia) de um organismo, pois elas catalizam e permitem a maior parte dos processos que ocorrem nas células.

Para que a infomações codificadas contidas nos genes (no DNA) possam ser traduzidas na forma de proteínas, é necessária a participação de moléculas intermediárias de uma substância denominada ácido ribonucleico ou RNA. Existem diferentes tipos de RNA, entre eles o chamado RNA mensageiro (RNAm), responsável por intermediar o fluxo da informação genética do DNA para RNA (em um processo denominado transcrição) e do RNA para proteínas (em um processo denominado tradução) (ALBERTS et al., 2007). Esta relação em fluxo, juntamente com a capacidade do DNA de replicar-se, foi denominada “Dogma central da biologia molecular” (Figura 2), tal como proposto por Francis Crick, um dos responsáveis pela descoberta do DNA. Ao longo dos anos, novas vias de síntese foram

descobertas e adicionadas ao dogma. Desta forma, temos atualmente que: O DNA é capaz de se duplicar (replicação); o DNA é capaz de originar uma molécula de RNA (transcrição); o RNA é capaz de originar uma molécula de proteina (tradução); o RNA é capaz de originar uma molécula complementar de DNA (transcrição reversa); uma molécula de RNA é capaz de originar uma versão complementar de si (replicação de RNA); o DNA é capaz de originar proteínas (tradução direta) (MCCARTHY; HOLLAND, 1965; ALBERTS et al., 2007).

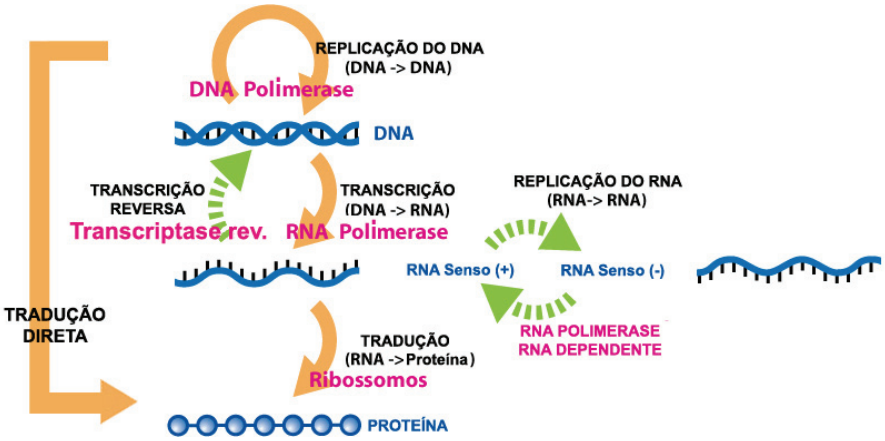


Figura 2 – Diagrama mostrando o Dogma central da biologia molecular expandido. Modificado de Creative Commons Attribution-ShareAlike License

O tipo e a quantidade de genes que são codificados-transcritos-traduzidos em um organismo é o que determina tudo aquilo que este organismo é e tudo aquilo que este organismo faz (embora a maioria das sociedades humanas admita existir "algo mais"). Uma das formas que os organismos usam para controlar o processo de transcrição é denominada expressão gênica, um complexo mecanismo bioquímico mediado por metilações, acetilações e outras alterações fisico-quimicas entre o DNA e o RNA. A expressão gênica pode ser medida através de um método denominado Reação em cadeia da polimerase em tempo real, método este utilizado no presente trabalho e explicado posteriormente.

3.3 O sistema nervoso e suas células

Para fins didáticos, o sistema nervoso de organismos vertebrados (com algumas variações) como o ser humano, o cão, o camundongo etc é dividido entre sistema nervoso

central (SNC, composto pelo encéfalo e pela medula espinhal) e o sistema nervoso periférico (SNP, composto pelos nervos periféricos). O sistema nervoso é composto por diferentes células, entre elas os neurônios e as células da glia (astrócitos, oligodendrócitos, micróglia, células de Schwann etc):

- Os neurônios: São células altamente especializadas responsáveis pela geração, processamento, transmissão e recepção de sinais eletro-químicos (sinapses, entre outros). São formadas, grosso modo, por um corpo celular (ou soma, onde se localiza o núcleo) e um axônio e seu terminal. O axônio é um basicamente um prolongamento do corpo celular e é responsável pela condução do impulso nervoso até outra(s) célula(s). Em muitos neurônios, o axônio encontra-se envolto por uma bainha de substância isolante (como um fio elétrico), denominada mielina (Figura 3).
- Os astrócitos: São células em formato de estrela (*astro*) presentes no encéfalo e na medula espinhal. São responsáveis por diferentes funções, entre elas funções estruturais, suporte metabólico, regulação do equilíbrio orgânico (homeostase), modulação da comunicação intercelular, vasomodulação, promoção da atividade mielinizante, constituição e manutenção da barreira hemato-encefálica, constituição e manutenção da membrana de glia limitante e reparos no sistema nervoso central.
- A micróglia: São células com atividade de defesa (macrófagos) residentes do sistema nervoso e são responsáveis pela sua proteção e manutenção, através da elicitação de resposta inflamatória, remoção de debris celulares e outras substâncias, apresentação de antígenos, mecanismos de citotoxicidade e promoção do reparo.
- Oligodendrócitos: São células de suporte aos neurônios, sendo responsáveis pela produção e manutenção da mielina no sistema nervoso central e pela regulação do microambiente perineuronal. Um único oligodendrócito pode produzir até 300 nodos de mielina, em centenas de neurônios diferentes simultaneamente.
- Células de Schwann: São células de suporte aos neurônios e são responsáveis pela produção e manutenção da mielina no sistema nervoso periférico (Figura 3) (ALBERTS et al., 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Em condições específicas em que a integridade da glia limitante é comprometida, células de Schwann são capazes de promover a remielinização de axônios no sistema nervoso central (GRAÇA, 1989).

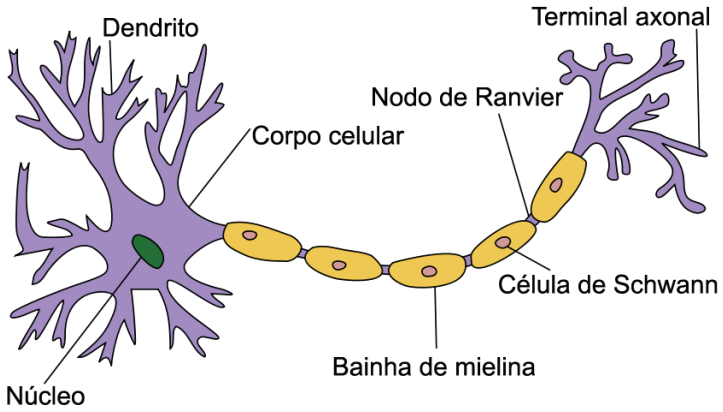


Figura 3 – Diagrama da estrutura básica de um neurônio do SNP, mostrando a bainha de mielina. De Creative Commons Attribution-ShareAlike License

3.4 Inflamação, regeneração e cicatrização

A inflamação (do latim *Inflammatio*) constitui-se de uma reação altamente complexa e estereotipada do organismo a uma lesão, objetivando a cura do organismo. Ela inicia-se imediatamente após a ocorrência do estímulo lesivo e termina com a cura/regeneração/cicatrização da lesão ou com a morte do organismo. Ela caracteriza-se classicamente por seu cinco sinais cardeais (tais como definidos por Celsus e Galeno): Calor, rubor, tumor, dor e perda de função. É mediada por diferentes eventos de ordem vascular (vasodilatação, aumento da permebilidade vascular etc), celular (quimiotaxia de leucócitos, fagocitose etc) e molecular (liberação de fatores pró-inflamatórios, anti-inflamatórios, fatores tróficos, quimiotáticos etc), sendo finamente controlada por diversos mecanismos regulatórios.

A regeneração é a restituição de um tecido perdido ou lesado ao seu estado original, tal como era antes da ocorrência da lesão. Ela é observada, por exemplo, após a remoção de lobos hepáticos (hepatectomia parcial), na qual observa-se a restituição praticamente total do figado, através da multipliação e reposição por células de tipo idêntico ao das células perdidas. Já a cicatrização é a restituição de um tecido lesado pela deposição de um tecido de tipo diferente ao que foi perdido. Ela é observada, por exemplo na pele, quando após um corte ou lesão que comprometa as células epiteliais, verifica-se a proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno, por vezes terminando com um tecido de aspecto e função diferentes do original (cicatriz). Estes dois processos de restituição tecidual, da mesma forma que a inflamação, são processos finamente orquestrados e que dependem de mecanismos celulares e

moleculares complexos para que não ocorram em desequilíbrio (MCGAVIN; ZACHARY, 2009).

3.5 Inflamação, regeneração e cicatrização no SNC

As particularidades anatômicas, fisiológicas e imunológicas do sistema nervoso tornam a resposta inflamatória e a regeneração/cicatrização neste sistema igualmente peculiar. Em primeiro lugar, temos a presença da barreira hemato-encefálica, composta por células endoteliais firmemente conectadas por junções oclusivas e projeções astrocitárias. Esta formação fornece ao sistema nervoso central um ambiente imunológicamente diferenciado. A ocorrência de inflamação no SNC predispõe à desagregação de parte destas junções oclusivas e a fenestrações na parede endotelial, permitindo a passagem de substâncias que normalmente não seriam capazes de adentrar o SNC. A ausência de vasos linfáticos neste tecido, a remodelação tecidual pós-lesional por células da glia (cicatriz glial), e a presença e atividade de macrófagos residentes (micróglia) são outros exemplos das peculiarides deste sistema (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004). A micróglia desempenha um papel fundamental na proteção e manutenção do sistema nervoso central. Entretanto, a liberação de mediadores inflamatórios por estas células, as quais originalmente visam a proteção e manutenção tecidual, pode causar danos, estando desta forma associada a processos degenerativos no SNC. Muitas terapias para diferentes afecções do sistema nervoso central utilizam medicamentos imunossupressores ou moduladores da resposta inflamatória como forma de limitar os danos decorrentes da resposta macrofágica (GIULIAN, 1995).

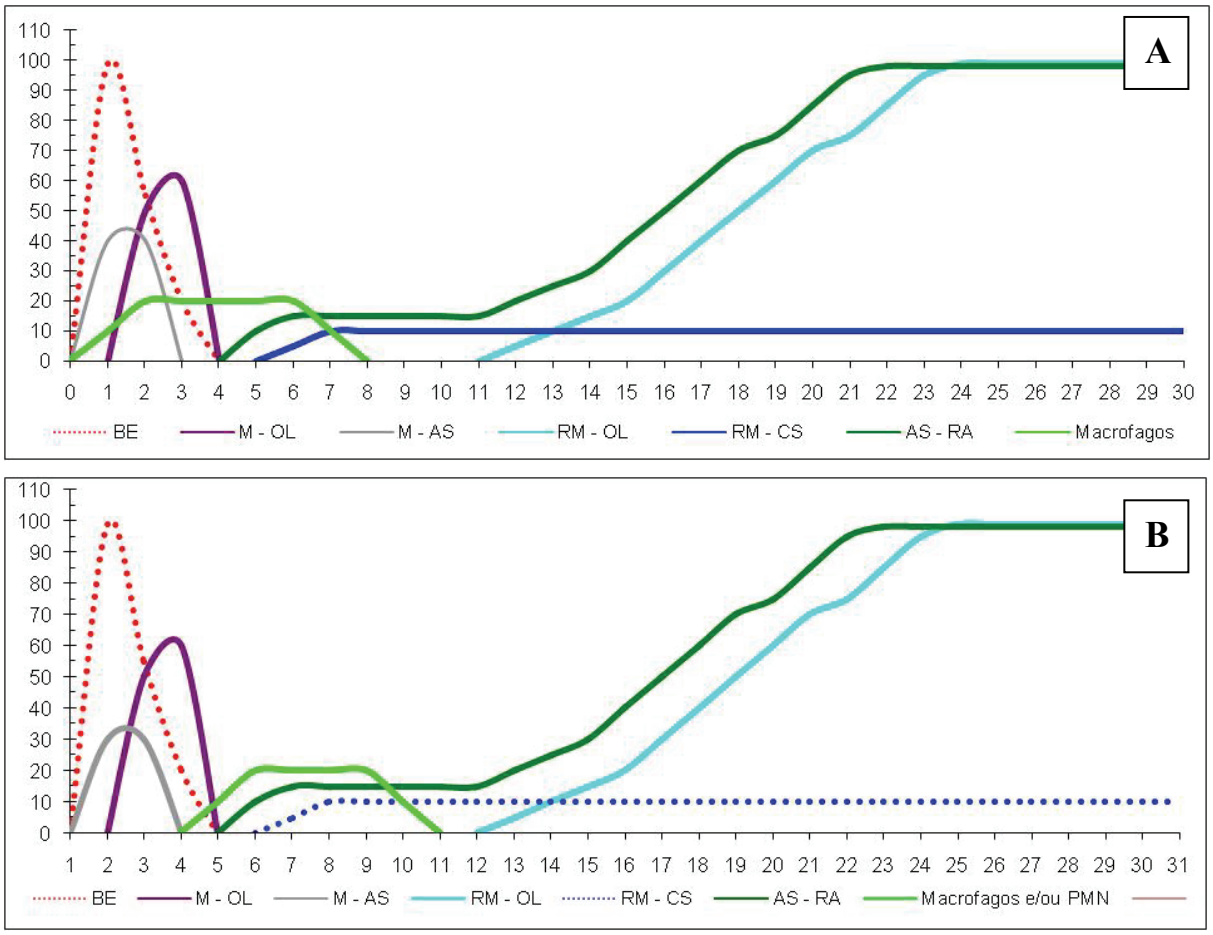
3.6 O modelo desmielinizante do brometo de etídio (BE)

O brometo de etídio (BE) é um corante púrpura fluorescente, que atua por intercalação nos ácidos nucléicos. No modelo experimental desmielinizante ele é gliotóxico, atuando de maneira seletiva no SNC e SNP, capaz de promover desmielinização primária dose dependente e com preservação das estruturas vasculares (GRAÇA, 1989), ao provocar morte dos oligodendrócitos, bem como dos astrócitos e dos precursores de oligodendrócitos (Gráfico

1) (BECKER; GREEN, 2002). A desmielinização do SNC induzida por BE é seguida por remielinização por oligodendrócitos e células de Schwann. O modelo de desmielinização experimental por BE tem sido útil na demonstração de que células de Schwann são capazes de reparar bainhas de mielina de axônio no SNC em muitas situações quando axônios e a membrana de glia limitante são destruídos, mesmo quando eles são induzidos a produzir suas próprias fibras colágenas (GRAÇA; BLAKEMORE, 1986; GRAÇA, 1988). O desaparecimento inicial de astrócitos e da membrana de glia limitante permite a invasão do SNC pelas células de Schwann, objetivando a reconstrução de bainhas de mielina perdidas.

O modelo de desmielinização do BE iniciou-se em ratos Wistar, e foi desenvolvido para estudar detalhadamente o processo de degradação das bainhas de mielina e a sua posterior reparação, servindo de modelo para o estudo de doenças desmielinizantes, como a esclerose múltipla (EM). Muitas variantes do modelo foram desenvolvidas, a maioria no sistema nervoso central (GRAÇA, 1986), incluindo estudos da relação entre o processo de desmielinização/remielinização e a fisiologia das conexinas, como o presente trabalho.

Em lesões de desmielinização crônica como as presentes na esclerose múltipla, a falta de remielinização é mais fortemente atribuída a um desequilíbrio da reação imune do organismo do que à presença da cicatriz glial, a qual impediria parcial ou totalmente a migração e atividade remielinizante dos oligodendrócitos. Estudos anteriores demonstraram a presença de células progenitoras de oligodendrócitos mesmo em cérebros adultos com lesões de esclerose múltipla. Esta presença possibilitaria a atividade remielinizante e, consequentemente, uma possível abordagem terapêutica. Contudo, o complexo ambiente molecular no qual a remielinização ocorre continua em grande parte desconhecido. Por esta razão, estudos de biologia molecular são fundamentais na determinação de quais fatores relacionados à remielinização estão desregulados em lesões desmielinizantes recorrentes ou crônicas (FRANKLIN; BAYLEY; BLAKEMORE, 1996).



Fonte: Cortesia de Ramos A. T.

Gráfico 1 – Gráficos demonstrando as alterações fisiopatológicas que ocorrem no SNC de camundongos normais (A) e *KO* para Cx32 (B) durante os processos de desmielinização e remielinização no modelo de brometo de etídio. Legenda: BE: metabolização do BE. M-OL: morte de oligodendrócitos. M-AS: morte de astrócitos. RM-OL: remielinização pelos oligodendrócitos. RM-CS: remielinização pelas células de Schwann. AS-RA: reação astrocitária. Macrófagos: presença desse tipo celular na lesão

3.7 Encefalite experimental autoimune

A encefalite experimental autoimune (EAE) é uma afecção imunomediada por linfócitos T e serve como um modelo de doenças como a esclerose múltipla. Estudos anteriores demonstraram que fatores pró e anti-inflamatórios como o TNFα e o TGFβ desempenham importantes funções na indução da EAE em ratos (TANUMA et al., 1997).

O modelo de encefalite experimental autoimune é consagrado para o estudo da resposta antígeno-específica responsável pela agressão tipo Th1 ao sistema nervoso central. Contudo este modelo possui severas limitações na avaliação da resposta inflamatória própria do SNC, já que se vale se um estímulo desencadeador antigênico estranho ao organismo, o

que impõe vieses e interferências na avaliação da resposta da glia ao estímulo desmielinizante.

O modelo desmielinizante do brometo de etídio fornece uma opção metodológica a este modelo desmielinizante, sem a utilização de complexos antigênicos, permitindo avaliar a resposta inflamatória e regenerativa das células gliais sem a interferência e os vieses oriundos da resposta imunológica externa à barreira hemato-encefálica.

3.8 Conexinas

As junções comunicantes (também conhecidas como junções tipo GAP) são sítios na membrana celular com canais intercelulares compostos por doze subunidades, denominadas proteínas conexinas. Cada conexina é composta por quatro domínios transmembrânicos, duas alças extracitoplasmáticas, dois domínios intracitoplasmáticos e uma alça intracitoplasmática (Figura 4).

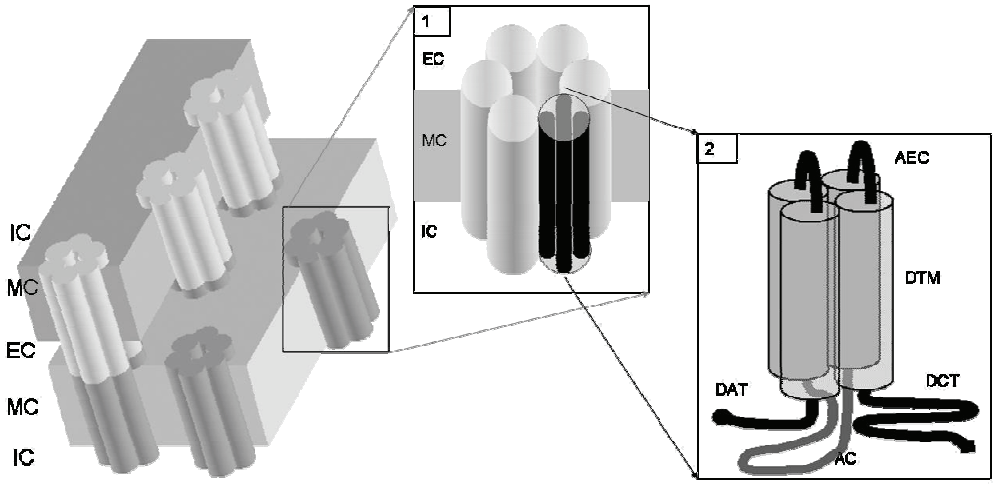


Figura 4 – Representação esquemática das junções comunicantes (Gap junctions) entre dois segmentos de membranas citoplasmáticas (à esquerda). Cada membrana contribui com um conexon, formado por seis proteínas conexinas (1), totalizando um canal formado por doze conexinas. Cada proteína conexina possui quatro domínios transmembrana (DTM). Legenda: Compartimento intracelular (IC); membrana citoplasmática (MC); espaço extracelular (EC); Domínio aminoterminal (DAT); Alças extracelulares (AEC); Alça citoplasmática (AC); Domínio carboxiterminal (DCT)

Este tipo de ligação representa uma maneira eficiente de comunicação intercelular em muitos tecidos, incluindo o tecido nervoso, e funciona como passagens para trocas de íons, mensageiros secundários e metabólitos entre as células, permeáveis a moléculas de até um (1) kDa (DERMIETZEL; SPRAY, 1993). A expressão de conexinas e a comunicação intercelular através das junções comunicantes são muito importantes para a regulação de funções como a motilidade, proliferação e sobrevivência celular, comunicação e transporte intercelular de substâncias. As junções comunicantes ocorrem na maioria dos tecidos, porém estas estruturas são particularmente importantes no sistema nervoso, local onde a estrutura tecidual é mais complexa e mais interconectada do que em outros tecidos. As principais funções das conexinas no sistema nervoso dos vertebrados envolvem a sincronização de subpopulações específicas de neurônios e a manutenção da comunicação interglial, com grande importância na dinâmica do processo inflamatório no SNC (DERMIETZEL, 1998). Trabalhos recentes demonstraram a alteração da expressão de proteínas conexinas após EAE (BRAND-SCHIEBER et al., 2005; ROSCOE; KIDDER; KARLIK, 2007). Outros trabalhos demonstraram a correlação da expressão de conexinas e atividade de metaloproteinases no coração, após lesão hipóxica, sugerindo a inter-relação destes elementos na resposta à lesão em diversos tecidos (LINDSEY et al., 2006).

3.9 Fator de necrose tumoral alfa (TNFα)

Duas citocinas dos organismos vertebrados são especialmente importantes na elicitação das respostas inflamatórias: O fator de necrose tumoral alfa (TNFα) e a interleucina 1. O TNFα é o principal mediador da resposta inflamatória aguda, produzido principalmente por células mononucleares fagocíticas ativadas. Sua atuação inicia-se através da ligação e ativação de receptores de membrana (TNFR) e continua através da intermediação dos fatores nucleares de células B ativadas amplificador de cadeias leves kappa (NF-κB), uma família de proteínas regulatórias dos genes latentes que jazem no coração da maior parte das respostas inflamatórias, juntamente de outros segundos mensageiros (ALBERTS et al., 2007). A principal atividade do TNFα é verificada no estímulo e recrutamento de neutrófilos e monócitos para sítios inflamatórios. Isto é realizado através da estimulação da expressão de moléculas de adesão pelas células do endotélio vascular, como selectinas e receptores para

integrinas neutrofílicas. Adicionalmente, sabe-se que esta molécula é capaz de aumentar os níveis de expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior do tipo I, aumentando a atividade citotóxica de linfócitos CD8+ (ABBAS; LICHTMAN, 2003). No SNC, sabe-se que o TNFα é capaz de inibir a comunicação intercelular através das junções comunicantes e que o TNFα aumenta os níveis de conexina 43 fosforilada em culturas de astrócitos primários, mas não em culturas de gliomas (HAGHIKIA et al., 2008).

3.10 Fator de crescimento transformador beta tipo um (TGFβ1)

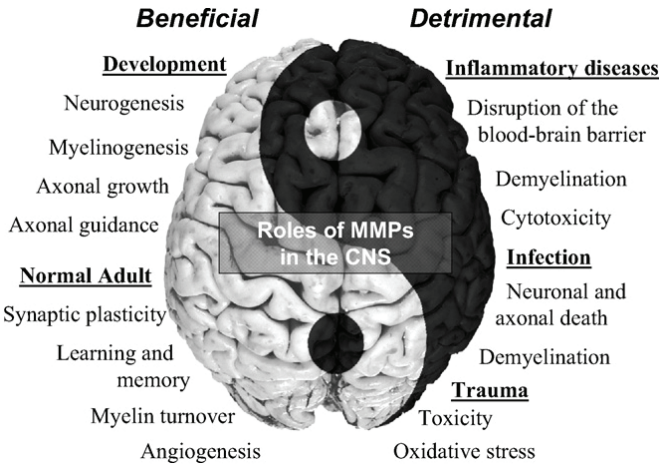
O fator de crescimento transformador beta tipo um (TGFβ1) faz parte de uma família de citocinas com atividade imunossupressora, através da inibição da proliferação de linfócitos T e B (e outras células), da inibição da ativação de macrófagos e células endoteliais e antagonismo da ação do principal fator ativador de macrófagos, o Interferon gama (INFγ). Camundongos deletados (*KO)* para TGFβ apresentam lesões inflamatórias e linfoproliferação descontroladas. (ABBAS; LICHTMAN, 2003). Os elementos da família do TGFβ são poderosos reguladores do crescimento, diferenciação e síntese de matriz extracelular por células do tecido conjuntivo, desempenhando uma grande variedade de ações dependendo do tipo de célula-alvo e a combinação de outros fatores e componentes da matriz extracelular presentes, sendo especialmente importante no reparo de lesões, com a estimulação de fibroblastos e promoção da formação de cadeias de colágeno, sendo de grande importancia na regulação de enzimas proteinases. Em diversos tipos de tecido, o TGFβ é fundamental no processo de remodelação que sucede e acompanha o processo de reparo e cura de lesões. Sua atividade também é fundamental no controle da proliferação celular, através da inibição da divisão celular. A perda da inibição do crescimento exercida pelo TGFβ contribui para a gênese de diversos tipos de câncer em humanos, como do cólon e do pâncreas. Sua atividade também é importante na seleção negativa de subpopulações de células do sistema imune como células T citotóxicas, inibindo a proliferação e a atividade de subpopulações reativas contra os próprios antígenos, o que poderia levar a afecções autoimunes (ALBERTS et al., 2007).

Estudos anteriores demonstraram que o TGFβ é expresso em altos níveis nas células dos infiltrados inflamatórios no SNC durante todas as fases de evolução da EAE, numa possível tentativa de limitação da extensão do processo inflamatório (TANUMA et al., 1997).

Estudos recentes tem demonstrado que o TGFβ é capaz de alterar de forma significativa a expressão de conexinas em determinados tecidos, seja na forma da diminuição da expressão (LIM; MAUBACH; ZHUO, 2009) ou indução da expressão. Estas variações podem ser explicadas pelas complexas interrelações que esta família de citocinas estabelece com os mecanismos de proliferação, diferenciação e transformação celular (no caso de neoplasias), altamente dependente de uma intrincada rede de comunicação intercelular, da qual as junções comunicantes são peças vitais (TACHEAU et al., 2008).

3.11 Metaloproteinases de matriz (MMPS)

As metaloproteinases de matriz são uma família de proteinases zinco-dependentes, responsáveis pela degradação de proteínas encontradas no meio extracelular, atuando em uma miríade de processos fisiológicos, como no equilíbrio produção/remodelação/degradação de proteínas teciduais, na migração/diapedese de leucócitos e na invasão e metástase tumoral, sendo fundamentais no processo de regeneração e cicatrização tecidual (Figura 5).



Fonte: (AGRAWAL et al., 2008).

Figura 5 – O Ying e Yang das funções das metaloproteinases no sistema nervoso central, mostrando os "benefícios" e "malefícios" da atividade desta família de enzimas na fisiopatologia neurológica.

Vinte e três MMPs foram descritas em camundongos até o presente momento, incluindo duas isoformas da MMP-1 (TOFT-HANSEN et al., 2007). Dentre as MMPs, seis (MMP-14, 15, 16, 17, 24 e 25) são referidas como metaloproteinases de matriz ligadas a membrana (MT-MMPs). A atividade destas enzimas depende de uma complexa rede regulatória, que envolve inibidores específicos e outros fatores, como o TGFβ (AGRAWAL; LAU; YONG, 2008).

Estudos com animais deletados para o gene da MMP-12 demonstraram que a resposta inflamatória nestes animais mediante o estímulo da EAE tende à polarização para uma resposta do tipo Th1 (correlacionada às respostas de auto-imunidade, através do aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias), em detrimento da resposta Th2, demonstrando uma ação protetora das MMPs na resposta inflamatória auto-imune (WEAVER et al., 2005).

3.12 Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPS)

A homeostase protéica é um processo finamente orquestrado em um organismo saudável. Pequenos desequilíbrios no equilíbrio *produção/remodelação/degradação* de proteínas podem levar a diversas afecções, como a artrite reumatóide e o quelóide (HAYASHI; NISHIMURA; KUMAGAI, 2008). No sistema nervoso central, este equilíbrio pode ser observado em processos benéficos como a mielinogênese e o processo de aprendizado, e em processos lesivos como a degradação da barreira hemato-encefálica e estresse oxidativo, entre muitos outros processos. Por esta razão, os mecanismos de controle da atividade das metaloproteinases de matriz são diversos e trabalham de forma complementar entre si. Entre estes mecanismos, podemos citar os controles na transcrição gênica, a produção das MMPs na forma de pró-enzimas e a existência/atividade dos Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs), elementos de controle da atividade das MMPs (AGRAWAL; LAU; YONG, 2008).

Quatro (4) TIMPs foram descritas em camundongos até o presente momento, identificadas com número de um a quatro. Seu número reduzido em relação ao número de MMPs existentes mostra que a atividade destes inibidores é relativamente inespecífica, com cada TIMP possuindo capacidade de controlar a atividade de mais de uma MMP. Relata-se também ação redundante da parte destas, de forma que algumas MMPs têm sua atividade regulada em maior ou menor grau por mais de uma TIMP (TOFT-HANSEN et al., 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Produção dos reagentes biológicos – Camundongos

A linhagem de animais KO alvo deste experimento corresponde a uma décima geração (F10), fruto de um cruzamento inicial C57Bl/6 x ADCx32 de animais portadores da deleção para a conexina 32, pré-definidos por PCR. Estes foram sequencialmente cruzados e adaptados ao *background* C57Bl/6. Esta consagrada linhagem de camundongos isogênicos é tida por muitos grupos como uma das mais adequadas para experimentos de investigação imunológica (JACKSON LABORATORY, 2008). A utilização destes animais de background bem definido melhora consideravelmente a reprodutibilidade do experimento.

Trinta (30) camundongos F10 foram produzidos no Biotério do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), criados e mantidos de acordo com as normas de biossegurança para animais geneticamente modificados nível um. Foram acasalados machos da linhagem C57Bl/6 (genótipo $Cx32^{Y/+}$) com uma ou duas fêmeas C57Bl/6 heterozigotas (genótipo $Cx32^{+/-}$), portadoras de deleção parcial do gene da conexina 32. Como o gene da conexina 32 está localizado no cromossomo X, parte dos filhotes machos provenientes desses acasalamentos apresenta o genótipo $Cx32^{Y/-}$ e parte o genótipo $Cx32^{Y/+}$. Todos os animais foram identificados, genotipados por PCR e separados. Desta forma, todos os animais puderam ser utilizados, alocados nos grupos deletados ou KO (animais $Cx32^{Y/-}$) ou nos grupos selvagens ou WT (animais $Cx32^{Y/+}$), em conformidade com princípios de utilização humanitária de animais na pesquisa.

Todos os animais foram mantidos no referido biotério em salas adequadas à criação de camundongos geneticamente modificados, mantidos em gaiolas de polipropileno medindo 30x20x13cm, com filtro na parte superior da tampa, servindo como uma barreira extra e evitando o contato dos animais com o meio externo (Figura 6). A cama utilizada consistiu de uma base de maravalha de *pinnus* autoclavada, trocada duas vezes por semana. As gaiolas eram dispostas em prateleiras de perfilado metálico em salas com sistema de ar condicionado central, com 20 a 30 trocas totais de ar por hora e controle de temperatura e umidade relativa do ar, 22±2 °C e 55±10%, respectivamente. A iluminação era artificial, controlada por "*timer*", com ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Ração comercial para

camundongos (CR1 – Nuvital) e água filtrada e autoclavada foram oferecidas *ad libitum* durante todo o experimento. As condições de alojamento e manejo dos animais obedeceram estritamente normas éticas internacionais, em especial àquelas do *National Research Council* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

Figura 6 – Gaiola de criação e manutenção de animais geneticamente modificados. Os espaços vazados da tampa são cobertos por papel de filtro específico (removido aqui para visualização)

4.2 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 possui extensão do certificado de biossegurança da FMVZ–USP (CQB no. 100/99), de acordo com as informações da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) e 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.

4.3 Genotipagem dos animais

Para verificação do perfil genético, foi coletada de cada animal uma amostra de cauda com aproximadamente um (1) cm de comprimento. Esta coleta foi realizada com uma tesoura limpa e desinfetada com álcool iodado entre um animal e outro. As caudas dos camundongos foram embrulhadas em papel alumínio, identificadas, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e conservadas a -80ºC até a análise.

Para a extração do DNA a cauda foi macerada com martelo em placa metálica em gelo e colocada em um tubo plástico de dois (2) ml identificado, juntamente com 200µl de tampão de lise com proteinase K (16,67µl/ml de tampão). A incubação foi feita durante duas (2) horas a 37ºC. Após este período, foram adicionados 200µl de tampão de lise (sem proteinase K) às amostras e homogeneizadas em vórtex, e deixadas em incubação em temperatura ambiente durante 15 minutos. Na etapa seguinte, o tubo foi centrifugado durante 20 minutos, a 10.000 RPM. a 4°C em centrifuga refrigerada (5810R – Eppendorff); o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de onde foram aspirados cerca de 250µl, evitando-se pegar a interfase ou o precipitado (Figura 7).

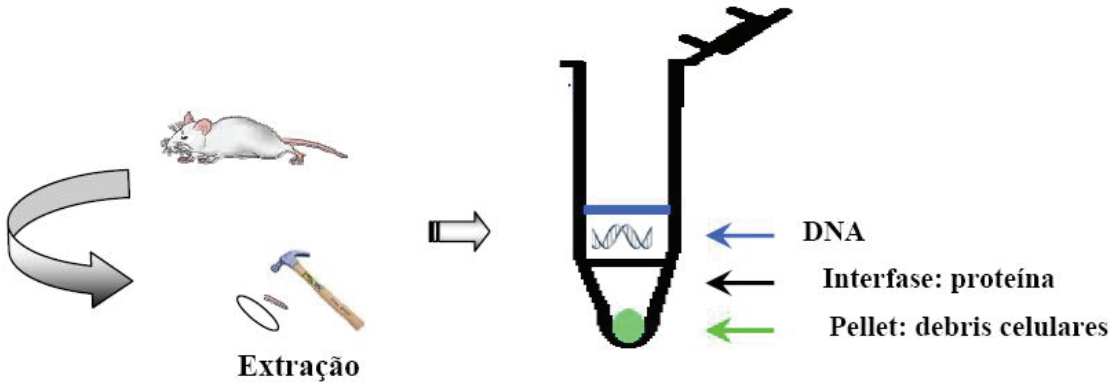


Figura 7 - Esquema que ilustra alguns passos de extração de DNA. O fragmento da cauda é macerado com o auxílio de uma placa gelada. No tubo é mostrada a disposição do material após a centrifugação

Com os tubos mantidos em gelo, foram adicionados 500µl de etanol 100% gelado ao sobrenadante, juntamente com 25µl de acetato de sódio 3M gelado e homogeneizados suavemente até o aparecimento da medusa. O material foi então centrifugado por 10 minutos a 6.000 RPM a 4°C e o sobrenadante desprezado por inversão. Foram então adicionados 500µl de etanol 70% para a remoção do excesso de sal. Nova centrifugação foi realizada durante 10 minutos a 6.000 RPM a 4° C e o sobrenadante desprezado por inversão. Os tubos

ficaram invertidos na própria bancada para remoção do excesso de etanol. O *pellet* obtido foi re-suspendido em 200µl de solução de Tris/EDTA (TE), e incubados em banho-maria a 65ºC durante 30 minutos, após o qual as amostras de DNA foram quantificadas (1:20) na razão A260/280 em biofotômetro (Biophotometer Plus, Eppendorf).

Para a elaboração da reação de PCR, as amostras foram diluídas para a concentração de 100ng/µl em TE. Para a reação de PCR foi preparado um "mix", conforme descrito no Quadro 1. Foram utilizados na reação de PCR três primers (Quadro 2), que podem resultar em uma ou duas bandas após a eletroforese em gel de agarose, dependendo da sequência dos genes com os quais eles se alinharam. O peso molecular das bandas é indicativo do perfil genético dos animais, sendo que a exibição de uma única banda de 414pb corresponde ao perfil KO, mais leve que o controle selvagem (Figura 8).

MIX	**Quantidade**
DNA (50 - 100ng/µl)	1 – 2 µl
Kappa® HotMix	20 µl
Primer KO WT NEO (10pMol/µl)	1 µl
Primer KO WT 3 (10pMol/µl)	1 µl
Primer KO NEO 3 (10pMol/µl)	1 µl
H2O	0 – 1 µl
Total	**25 µl**

Quadro 1 - Especificações das quantidades e produtos que foram utilizados para a formulação do *mix* a ser utilizado na reação de PCR

Primer	**Sequência**
Cx32 KO–WT-NEO	5' 5' – CCATAAGTCAGGTGTAAAGGAGC – 3'
CX32 KO-NEO	3' 5' – ATCATG CGAAACGATCCTCATCC – 3'
CX32 KO-WT	3' 5' – AGATAAGCTGCAGGGACCATAGG – 3'

Quadro 2 - Sequência dos *primers* utilizados na reação de PCR (Invitrogen Inc.)

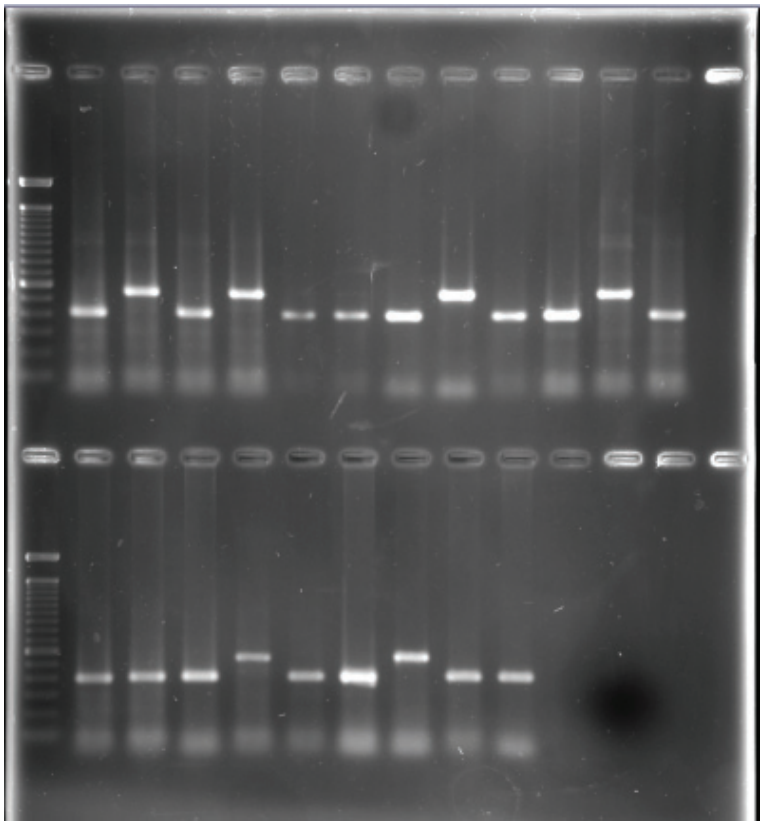


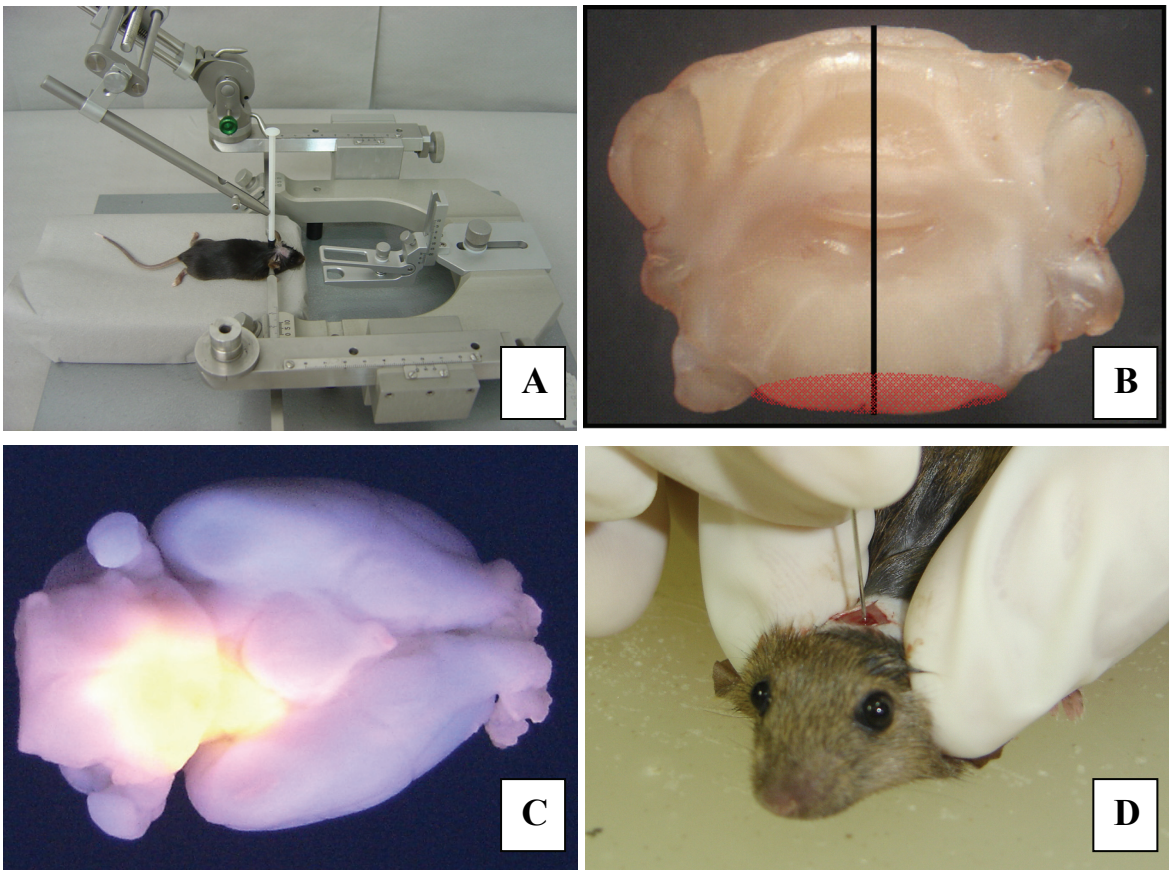
Figura 8 – Amostra de gel com os genótipos dos camundongos: amostras indicativas de animais KO são representadas pelas bandas leves de 414pb (inferiores), amostras indicativas de animais normais representados pelas bandas pesadas (superiores)

4.4 Cirurgias

Para a cirurgia, os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina na dose de 4 mg/kg e 20 mg/kg respectivamente, por via intraperitoneal e foi realizada tricotomia na região da cabeça, atrás dos olhos e entre as orelhas.

Foi realizada uma incisão na pele com 1,5 cm sobre da linha média da abóbada do crânio. Os animais foram então posicionados em um equipamento de cirurgia estereotáxica (Stereotaxic Alignment System, Kopf Instruments) sobre uma plataforma aquecida, de forma a evitar-se hipotermia durante o procedimento anestésico (Figura 9A). Uma perfuração no crânio, atrás do tentório do cerebelo, foi realizada com uma agulha 25x08 limitada por uma pinça Kelly a um (1) mm do final do bisel. Com auxílio das guias com controle milimétrico do aparelho estereotáxico, uma injeção foi realizada com seringa Hamilton® de 5 μl, com precisa injeção de 5 μl na cisterna basal (Figura 9B e 9C) de forma lenta, seguida da lenta retirada da agulha, de forma a se evitar refluxo (Figura 9D). As incisões de pele foram

suturadas com fio nylon 5-0 com pontos simples separados. Os animais foram acompanhados até se recuperarem totalmente da anestesia, acondicionados em ambiente aquecido e resguardados da luz incidente. Foram mantidos em observação e tratados com morfina por, no mínimo, 48 horas de 8 em 8 horas com dose de 1,5 mg/kg por via subcutânea.



Fonte: Fotografias B, C e D cortesia de Ramos A. T.

Figura 9 – Detalhes do processo cirúrgico de inoculação de brometo de etídio. A) Camundongo tricotomizado posicionado sobre plataforma aquecida no equipamento de cirurgia estereotáxica. B) Esquema indicativo do trajeto da agulha e local de inoculação do brometo de etídio. C) Fotografia de encéfalo através de iluminação ultravioleta demonstrativa do local de inoculação de brometo de etídio. D) Demonstração da inserção da agulha Hamilton® em camundongo

4.5 Coleta de material para PRC em tempo real

Para se obter amostras representativas das diferentes etapas do processo inflamatório e regenerativo/cicatricial nos camundongos, os animais foram eutanasiados e tiveram seus encéfalos coletados nos dias 1, 3, 7, 10 e 20 após a cirurgia de injeção (Tabela 1).

Adicionalmente, foi realizada a eutanásia e coleta de encéfalos de cinco (5) camundongos WT e cinco (5) camundongos KO, os quais não receberam qualquer tipo de tratamento (grupos testemunha ou grupo zero [0]) (Tabela 2). O propósito do grupo testemunha é servir como controle de expressão-base dos genes pesquisados, desta forma compondo juntamente com os grupos experimentais um quadro representativo da expressão dos fatores pró e anti-inflamatórios participantes da resposta orgânica no modelo do brometo de etídio.

Tabela 1 – Detalhamento dos grupos e das datas de coleta de materiais para PCR em tempo real, camundongos experimentais

	Camundongos Experimentais	
Dias	**F1 KO para Cx32**	**C57BL/6**
1	5 animais	5 animais
3	5 animais	5 animais
7	5 animais	5 animais
10	5 animais	5 animais
20	5 animais	5 animais
Total	**50 animais**	

Tabela 2 – Detalhamento dos grupos e das datas de coleta de materiais para PCR em tempo real, camundongos testemunha

	Camundongos Testemunha	
Dias	**F1 *KO* para Cx32**	**C57BL/6**
-	5 animais	5 animais
Total	**10 animais**	

No protocolo de eutanásia e coleta de material, os animais receberam intraperitonealmente uma dose letal de solução de pentobarbital (5 mg). Quando abolido o reflexo podal, os animais foram decapitados, e as cabeças acondicionadas em invólucros de papel alumínio estéreis e livres de RNAse. Estes foram então rapidamente congelados em vapor de nitrogênio líquido e armazenados em ultrarrefrigerador a -80° C para posterior processamento.

Adicionalmente, uma nova amostra da cauda de cada camundongo foi coletada para a confirmação do genótipo utilizando-se a metodologia descrita anteriormente.

4.6 Extração e quantificação de RNA

As cabeças armazenadas a -80º C tiveram seus encéfalos cuidadosamente e rapidamente removidos. Foi coletada a área de encéfalo correspondente ao ponto de inoculação, totalizando 30µg de tecido. A esta amostra foi adicionada 200µl de solução preservadora de RNA (RNAlater *frozen tissue* [Ambion INC, Applied Biosystems INC.]), a qual não apenas inibe a ação de RNAses, mas favorece a preservação do RNA durante o processo de descongelamento do material. As amostras foram colocadas em tubos de centrifugação livres de nucleotídeos, aos quais foi adicionada solução de lise, com subsequente procedimento de extração de RNA por kit comercial, segundo instrução do fabricante (Kit MagMAX, Applied Biosystems INC.), o qual inclui etapa de tratamento com DNAseI. Ao final do processo foi obtido 100µl de solução purificada de RNA total, a qual foi aliquotada e congelada a -80º C.

Para a quantificação do RNA total, amostras das alíquotas foram diluídas 10:90, ou seja, 10µl do RNA total diluídas em 90µl de H_2O DEPC, homogeneizadas suavemente e quantificadas em espectrofotômetro (Eppendorf Biophotometer Plus) a 260nm com o equipamento zerado com água DEPC. Valores adequados de pureza foram considerados aqueles com razão entre 1,75 e 2,00, sendo que os quantidades obtidas de RNA variaram entre 30ng/µl e 120ng/µl.

Adicionalmente, foi realizada eletroforese em gel de agarose para verificação da extração apropriada do RNA total. Amostras de 10µl foram adicionadas a 2µl de tampão de carregamento (*Loading buffer*) em um gel de agarose a 1%, submetidos a eletroforese a 80V, corados com brometo de etídio a 0,1% e fotografados sob luz ultravioleta (Figura 10).

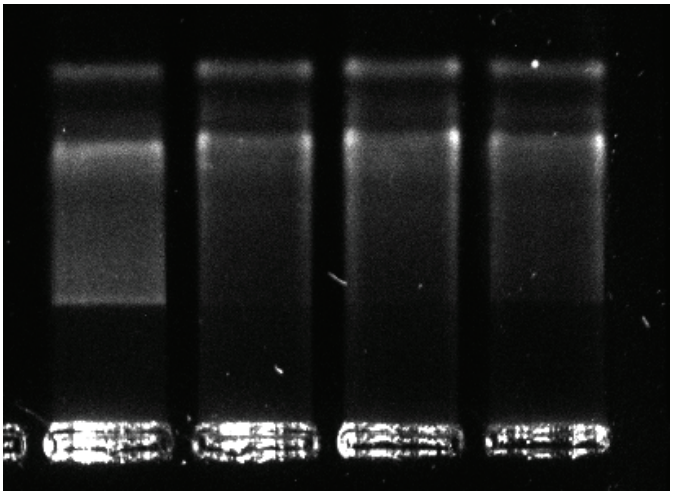


Figura 10 – Fotografia de eletroforese em gel de agarose de amostra de RNA total extraído. As duas bandas mais brilhantes no alto da figura indicam as frações ribossômicas 18s e 25s

4.7 Transcrição reversa

A transcrição reversa do RNA total foi realizada utilizando-se o kit de transcrição High Capacity cDNA Reverse Transcription com inibidor de RNAse (código 4374966, Applied Biosystems INC.). Em um tubo contendo o preparado de master mix recomendado pelo fabricante foi adicionado um volume da solução de RNA total contendo um máximo de 20μg de RNA total (Quadro 3). Os tubos foram termociclados por um tempo total aproximado de duas horas e quinze minutos, segundo protocolo do fabricante (Tabela 3) em um termociclador Eppendorf® Mastercycler. Ao final do processo, obteve-se uma solução de cDNA, a qual foi quantificada em biofotômetro (Biophotometer Plus, Eppendorf), aliquotada e congelada a -80º C para PCR em tempo real posterior.

Componente	Volume por reação
Tampão de RT 10X	2,0µl
Mix de dNTPs 25X	0,8µl
Primers randômicos 10X	2,0µl
Transcriptase reversa Multiscribe	1,0µl
Inibidor de RNase	2,0µl
H2O livre de nuclease	3,2µl
Amostra de RNA total	10µl
Total por reação	**20**µl

Quadro 3 – Relação de componentes e volumes utilizados do kit Capacity cDNA Reverse transcription com inibidor de RNAse, por reação de transcrição reversa (RT)

Tabela 3 – Relação de tempos e temperaturas de ciclagem utilizadas na reação de transcrição reversa (RT)

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
Temperatura	25º C	37º C	85º C	4º C
Tempo	10 min.	120 min.	5s	∞

4.8 Verificação de contaminação por DNA genômico e especificidade dos ensaios

Foi realizado o PCR em tempo real de amostras de RNA total extraído, anteriormente à transcrição reversa, de forma a se verificar a ausência de amplificação das sequências-alvo, causadas por possível contaminação do extraído de RNA por DNA genômico e/ou falta de especificidade dos ensaios. Conforme esperado, não foi verificado amplificação nas respectivas avaliações (Gráfico 2).

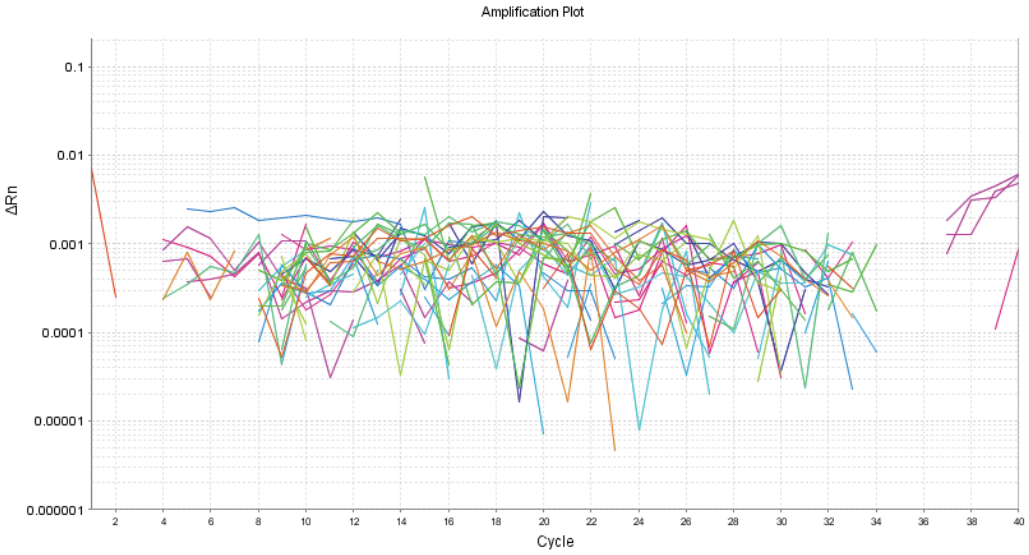


Gráfico 2 – Ausência de amplificação de alvos em amostra de RNA total previamente à transcrição reversa, grupo de 3 dias. Notar a detecção de somente de ruído (fluorescência basal). Tela do programa SDS v2.1 (Applied Biosystems INC.)

4.9 Validação do método de C_T comparativo e verificação de eficiência

O cálculo dos resultados de ensaios de quantificação por PCR quantitativo em tempo real pode ser realizado de duas formas: quantificação absoluta e quantificação relativa. Ensaios de quantificação absoluta são utilizados para quantificar amostras desconhecidas, comparando-se suas quantidades com uma curva padrão, o que depende da utilização de uma amostra padrão que possua quantidades conhecidas do número de cópias de uma determinada sequência. Ensaios de quantificação relativa, como o utilizado no presente projeto, são utilizados para analisar alterações na expressão gênica em uma determinada amostra relativamente a outra amostra de referência (por ex.: amostra controle).

Os métodos de calculo para quantificação relativa incluem o método da curva padrão e o método do C_T (*Cycle Threshold* ou Ciclo Limiar) comparativo (método este utilizado no presente projeto).

De forma resumida, o método da curva padrão depende da utilização de uma curva padrão, constituída pela amplificação de genes (genes de interesse e genes de controle endógeno) de uma determinada amostra em uma diluição seriada, de forma a se poder inferir os resultados da reação. Este método possui as desvantagens de requerer o uso de uma curva padrão em cada uma das reações, o que impões vieses causados pelas pipetagens das diluições

seriadas, além de aumentar significativamente o uso de reagentes em cada experimento, com o concomitante aumento dos custos.

O método do C_T comparativo é semelhante ao método da curva padrão, exceto pelo fato de que este utiliza a fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta CT}$ para atingir o mesmo resultado para a quantificação relativa. Para se utilizar o método do C_T comparativo, é necessária a realização de um experimento de validação para demonstrar se a eficiência das amplificações do gene alvo e do controle endógeno são aproximadamente iguais. A vantagem da utilização do método do C_T comparativo é que não é necessário utilizar-se uma curva padrão em cada experimento, aumentando significativamente o rendimento das reações e reduzindo os custos experimentais, além de eliminar a possibilidade de erros na diluição das amostras na construção das curvas padrão.

Os valores de eficiência foram medidos usando-se o método do coeficiente angular (*slope*) de C_T para os genes do fator de necrose tumoral alfa (TNFα), fator de crescimento transformador beta 1 (TGFβ1), metaloproteinase 3 (MMP3), metaloproteinase 9 (MMP9) e inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP1). Este método envolveu a amplificação em tempo real de uma diluição seriada em escala de um para dez (1:10) de uma amostra (em replicatas) e a determinação dos valores de C_T para cada diluição. Um gráfico de C_T versus concentração relativa de cDNA foi construída. Com este método, uma inclinação esperada de uma diluição de razão dez (1:10) de um *template* de DNA é -3,32 quando a eficiência de reação é 100%, com diferença de C_T entre as diluições em torno de 3,2 C_T, visto que a cada C_T há aproximadamente o dobro de sequências amplificadas, já que a reação é exponencial de base dois (2) (Gráfico 3).

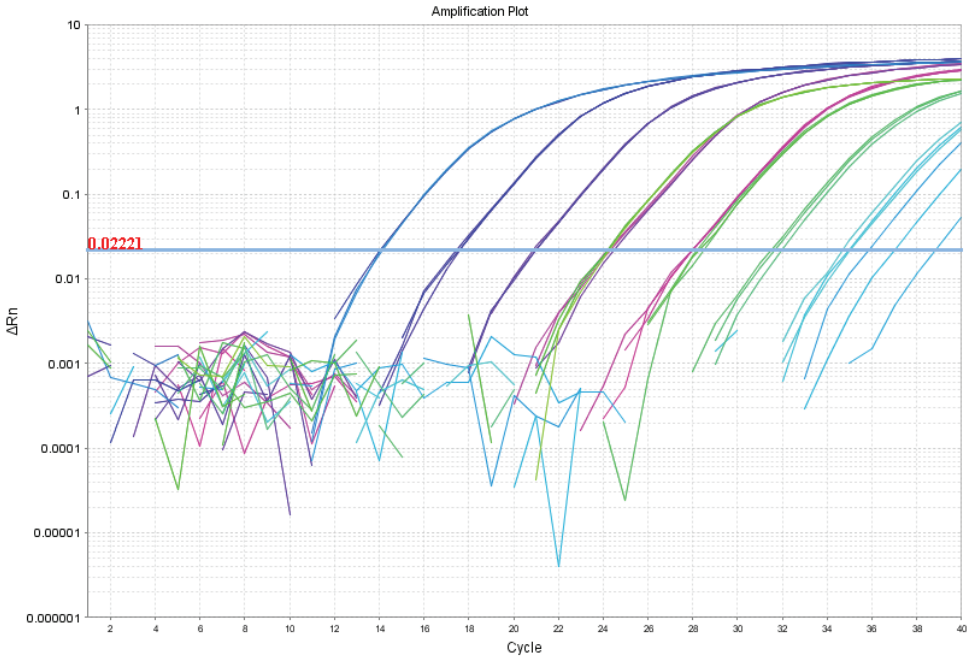


Gráfico 3 – Exemplo referente ao gráfico de amplificação de diluição seriada de razão 10 (1:10), alvo TGFβ1 e controle endógeno GAPDH, amostra testemunha KO. Notar o baixo desvio padrão entre as replicatas e o intervalo equidistante entre as diluições, com intervalo aproximado de 3,2 C_T, condizente com a razão de diluição 1:10 utilizada

Com base nos dados de C_T obtidos das amplificações nas respectivas diluições, foram construídas retas de medida de eficiência de amplificação dos genes alvo (fórmula geral da reta: y=ax+b), juntamente com o controle endógeno GAPDH, com a obtenção dos valores de coeficiente angular das retas (*slope*) (Gráfico 4).

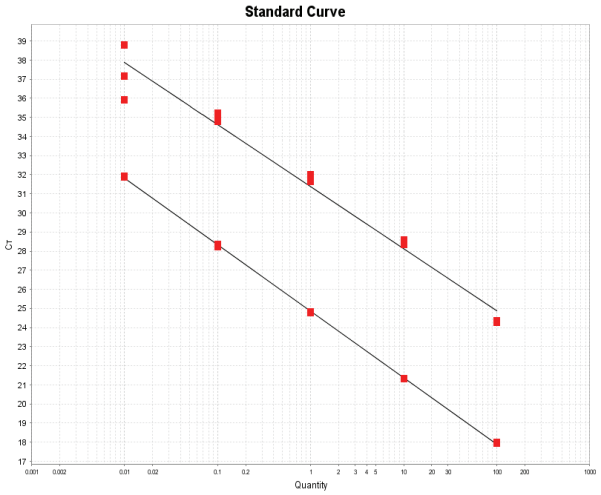


Gráfico 4 – Gráfico representativo das medidas de eficiência de reação do gene alvo TGFβ1 (reta acima) e controle endógeno GAPDH (reta abaixo). Notar a inclinação próxima das duas retas e o baixo desvio padrão das replicatas (pontos vermelhos) do controle endógeno

Os dados oriundos da amplificação dos alvos (TNFα, TGFβ1, MMP3, MMP9 e TIMP1) nas diferentes diluições foram então comparados com os dados oriundos da amplificação do controle endógeno nas diferentes diluições através da fórmula para o cálculo da eficiência, tal como se segue:

$$Ef = (10^{(1/slope)} - 1) \text{ X } 100$$

Onde Ef representa a eficiência de amplificação e *slope* representa o coeficiente angular da reta formada.

Este cálculo e seus gráficos foram obtidos utilizando-se o programa SDS 2.1 (Applied Biosystems INC.). O *primer* para TNFα apresentou *slope* de -3,291 e eficiência de 101,307%; o primer para TGFβ1 apresentou *slope* de -3,245 e eficiência de 103,296%; o primer para MMP3 apresentou *slope* de -3,37 e eficiência de 98,032%; o *primer* para MMP9 apresentou slope de -3,51 e eficiência de 92,078% e o primer para TIMP1 apresentou *slope* de -3,397 e eficiência de 96,959%. Já o controle endógeno GAPDH apresentou *slope* de -3,488 e eficiência de amplificação de 93,493%. Estes dados revelaram que todos os primers para os referidos genes alvo encontram-se dentro das especificações do fabricante, com faixa de eficiência próxima de 100%, com desvio de mais ou menos dez por cento (10%) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006) (Gráfico 5) e com graus de eficiência semelhantes entre si (coeficiente angular calculado via regressão linear de ΔC_T vs. log. da concentração < 0.1) (Gráfico 6) e, portanto, aptos para a realização das avaliações por PCR em tempo real pelo método relativo por comparação de ΔΔCt.

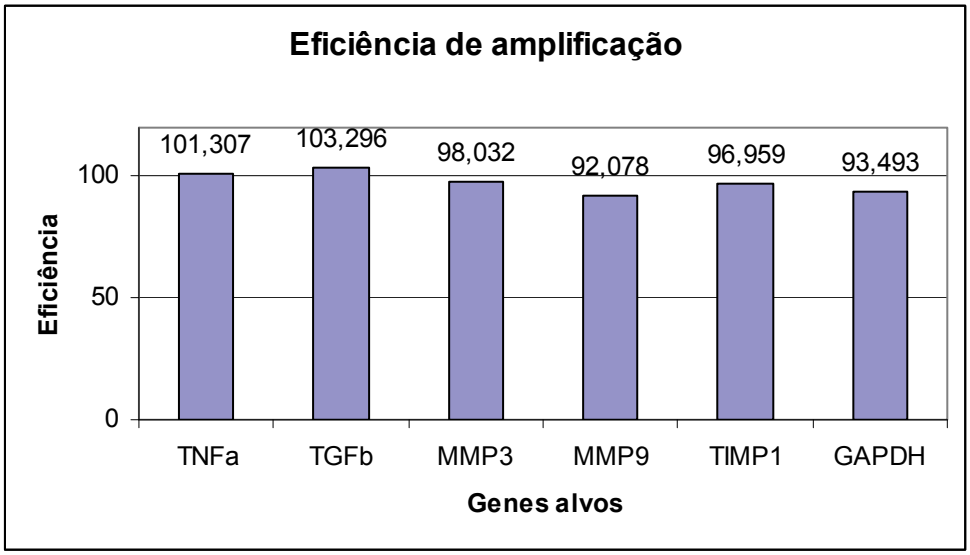


Gráfico 5 – Valores de eficiência de amplificação dos genes para TNFα, TGFβ1, MMP3, MMP9, TIMP1 e controle endógeno GAPDH. Notar as faixas de eficiência dos alvos próximas de 100%, com desvio em relação ao controle endógeno inferior a 10%

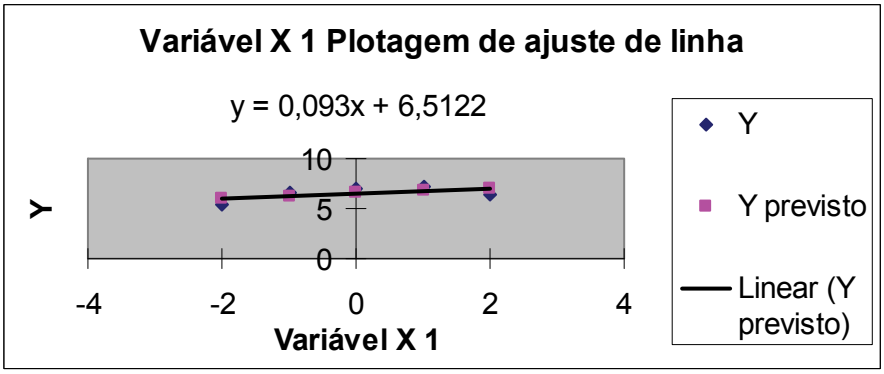


Gráfico 6 – Exemplo de gráfico de regressão linear de ΔC_T (GAPDH-TGFβ1) vs. log. da concentração. Notar que o coeficiente angular < 0,1

4.10 PCR quantitativo em Tempo Real no StepOne Detection System (Applied Biosystems)

Após a validação foram realizadas as reações de PCR em tempo real (*Real Time* quantitative PCR ou RT-qPCR) no aparelho StepONE (Applied Biosystems INC.) do Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia – Labmas – Anexo A, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), FMVZ–USP. No PCR em tempo

real, as fases de anelamento, extensão e denaturação ocorrem durante os ciclos de maneira similar ao PCR convencional, uma vez que o StepOne é um termociclador com um emissor LED acoplado a uma câmera CCD. A diferença é que a amplificação da sequência-alvo é detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre mediante à liberação do fuoróforo da sonda (*probe*). A quantificação relativa da amplificação é feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho.

À medida que a reação de amplificação se processa, um gráfico é construído. Neste gráfico, a ordenada corresponde ao número de cópias e a abscissa ao número de ciclos. Diferentemente do sistema convencional de amplificação, onde o que se observa é o número de cópias final (medição *end-point*), no PCR quantitativo em tempo real a amplificação é detectada quando condições "ótimas" para o PCR são mantidas, ou seja, na chamada fase exponencial da reação, na qual os substratos para a amplificação estão presentes nas concentrações ideais. Pelas características do sistema de PCR quantitativo em tempo real, é possível determinar o perfil de amplificação. O ponto na abscissa que correspondente ao início do trecho linear é chamado de C_T (*Cycle Threshold* ou Ciclo Limiar) e este valor é utilizado para a comparação relativa da expressão gênica: quanto menor o C_T, teoricamente mais expresso é o gene em questão; a diferença de 1 C_T representa aproximadamente o dobro de expressão (considerando-se uma eficiência de reação de 100%).

O sistema adotado para a detecção da expressão dos genes alvo e para controle endógeno (*house keeping*) é o sistema *TaqMan*. Neste sistema, além do par de *primers*, é necessária a utilização de uma sonda (*probe*) que, por ter uma temperatura de anelamento mais alta (cerca de 10º C de diferença), se hibridiza de forma específica com a fita molde antes do par de *primers*. A sonda é composta na sua extremidade 5' por um fluoróforo R (*reporter dye* ou fluorocromo sinalizador) cuja fluorescência, quando a sonda está integra, é bloqueada pelo *quencher* inibidor de fluorescência.

Por meio da atividade 5' exo-nuclease da Taq polimerase, o fluoróforo é clivado e a fluorescência estimulada pelos LEDs do sistema é capturada pela câmera CCD do equipamento. Assim, durante o processo de extensão iniciado pelo par de *primers*, a sonda se separa da fita molde, ocorrendo liberação do fluoróforo. Em cada fase de anelamento, a sonda se liga à dupla fita, é fragmentada e libera fluorescência que é, portanto, proporcional ao número de cópias.

As placas de 48 poços do equipamento StepOne foram mapeadas para utilização de seis (6) conjuntos de oito (8) tubos (6 strips MicroAmp® Optical 8-Tube Strip, 0.2 ml,

Applied Biosystems INC.), de forma a acomodar duas amostras (uma amostra referente ao camundongo WT e uma amostra referente ao camundongo KO) com 3 replicatas de cada para cada um dos seis (6) genes, mais seus respectivos controles negativos (Figura 11), de forma que os animais do grupo deletados (KO) pudessem ser diretamente comparado com suas contrapartes selvagens (WT) com relação ao todos os genes e com o menor erro possível.

Figura 11 – Representação esquemática da disposição das amostras utilizadas. Note que nas linhas A, C e E encontram-se amostras selvagens e nas linhas B, D e F as amostras KO

Foram utilizados os seguintes ensaios (*assays*) Taqman® (Applied Biosystems INC.) para os seguintes genes: Fator de necrose tumoral alfa – TNFα (Código Mm99999068_m1), Fator transformador de crescimento beta 1 – TGFβ1 (Código Mm00441726_m1), metaloproteinase 3 – MMP3 (Código Mm00440295_m1), metaloproteinase 9 – MMP9 (Código Mm00442991_m1), inibidor tecidual de metaloproteinases 1 – TIMP1 (Código Mm00441818_m1) e controle endógeno gliceraldeído 3-fosfato de-hidrogenase – GAPDH (Código 4352932E), todas com sonda (*probe*) MGB/FAM e referência passiva normalizadora ROX (Quadro 4). Os ensaios para os alvos selecionados foram desenhados para que as respectivas sondas cubram junções exon-exon dos genes associados, desta forma não detectando DNA genômico, prevenindo problemas com relação à contaminação com a presença deste no extraído de RNA total.

Ensaio (*assay*)	Sequência do primer *Forward*	Código	Tamanho do *Amplicon* (pb)
TNFα	GTAGCCCACGTCGTAGCAAACCACC	Mm99999068_m1	63
TGFβ1	ACCAAGGAGACGGAATACAGGGCTT	Mm00441726_m1	58
MMP3	GGATGTCACTGGTACCAACCTATTC	Mm00440295_m1	66
MMP9	ATCTTCCAGTACCAAGACAAAGCCT	Mm00442991_m1	76
TIMP1	CAACTCGGACCTGGTCATAAGGGCT	Mm00441818_m1	90
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	4352932E	107

Quadro 4 – Relação dos ensaios (*assays*) Taqman utilizados, sequencia dos primers forward, código do produto e tamanho da sequencia amplificada (*amplicon*)

As reações individuais foram montadas de forma a totalizar 20µl cada, utilizando 10µl de TaqMan® Genotyping Master Mix (Código 4371355, Applied Biosystems INC.), 1µl dos respectivos ensaios (*assays*) e 9µl de cDNA diluído em água DEPC de forma a utilizar 20ng de cDNA por reação, considerando-se 10% de excesso (Quadro 5). Os tubos foram então lacrados com tampas ópticas (MicroAmp® Optical 8-Cap Strip, Applied Biosystems INC.), sem contato manual.

Reagente	Quantidade por reação
Master Mix	10µl
Ensaio (assay)	1µl
cDNA + H_2O DEPC	9µl
Total por reação	20µl

Quadro 5 – Relação de reagentes e volumes utilizados por reação de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em modo padrão (*Standard*) ao longo de aproximadamente uma hora e vinte minutos, incluindo as seguintes etapas: uma

etapa de 50º C por 2 min. (ativação da enzima Uracil-N-Glicosilase [UNG]), uma etapa de 95º C por 10 min. (ativação da enzima Amplitaq Gold Ultra Pure) e quarenta (40) ciclos de 95º C por 15 s (denaturação) e 60º C por 1 min. (anelamento e extensão) (Tabela 4). A atividade da UNG é um recurso para evitar a contaminação por produtos de PCR previamente amplificados, uma das maiores fontes de contaminação das reações de PCR. Ao utilizar sempre uma uracila nas amplificações, a UNG serve como controle de contaminações (*carry-ove*r), degradando somente moléculas de DNA dupla fita contendo uracila.

Após as termociclagens, as amostras foram conservadas a 4º C até realização de eletroforese em gel de agarose pós-amplificação.

Tabela 4 – Relação de temperatura, tempo e número de ciclos utilizados no PCR em tempo real

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Ativação da enzima UNG	50º C	2min	1
Ativação da enzima Amplitaq gold UP	95º C	10min	
Denaturação	95º C	15s	40
Anelamento e extensão	60º C	1min	

4.11 Eletroforese em gel de agarose pós-amplificação

Para a verificação da correta amplificação dos segmentos-alvo foi realizada a eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação resultantes da termociclagem em tempo real. Amostras de 15µl foram adicionadas a 2µl de tampão de carregamento (*loading buffer*) em um gel de agarose a 1%, submetidos a eletroforese a 80V, corados com brometo de etídio a 0,1% e observados sob luz ultravioleta (Figura 12). Observou-se a correta amplificação dos segmentos-alvo, verificados pelo peso molecular compatível com o informado pelo fabricante.

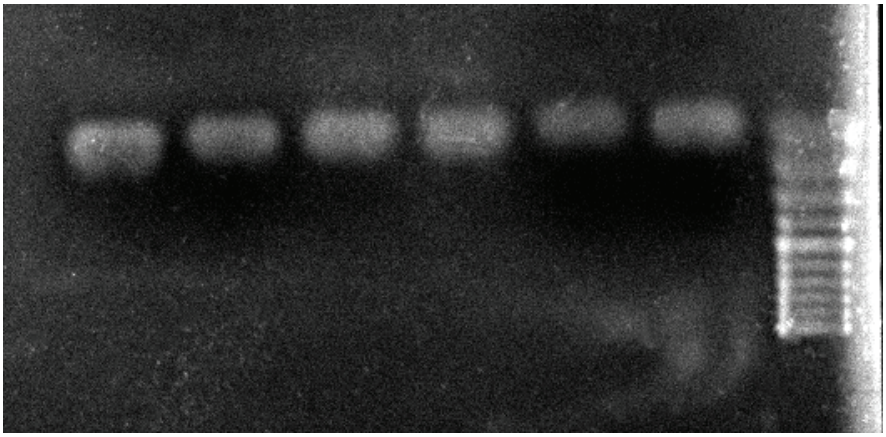


Figura 12 – Fotografia sob luz ultravioleta de gel de agarose corado com brometo de etídio 0,1%, mostrando bandas de sequências amplificadas de amostra, 7 dias, KO, mostrando a correta amplificação dos segmentos-alvo. Da direita para a esquerda: GAPDH (107pb), TIMP1 (90pb), MMP9 (76pb), MMP3 (66pb), TGFβ1 (58pb), TNFα (63pb) e referência de peso molecular (*ladder*). As moléculas mais leves encontram-se na porção mais superior da imagem

4.12 Análise dos dados

A coleta dos dados pelo equipamento de PCR tempo real StepONE Applied Biosystems INC.) foi realizada pelo programa SDS StepONE 2.01 (Applied Biosystems INC.), o qual realiza a coleta de dados como linha base (*baseline*), ciclo limiar (*cycle threshold*, C_T), diferença de C_T (ΔC_T) e diferença das diferenças de C_T ($\Delta\Delta C_T$), gerando gráficos em tempo real. Além disso, o programa fornece detalhados relatórios de erros (*QC Summary*) (Figura 13) quando estes ocorrem (como falhas na amplificação, altos desvios padrão de replicatas etc), relatando-os na forma de notificações (*flags*) (Figura 14). Tais relatórios são de grande valia na análise dos dados e busca de possíveis erros. Os respectivos valores de C_T, ΔC_T, $\Delta\Delta C_T$ e suas respectivas médias e desvios padrão foram então tabulados (Tabelas 5 e 6).

QC Summary

Flag Summary

Total Wells:	48	Processed Wells:	48	Manually Omitted Wells:	0	Targets Used:	6
Wells Set Up:	48	Flagged Wells:	0	Analysis Omitted Wells:	0	Samples Used:	2

Flag Details

Flag:	Name	Frequency	Wells
AMPNC	Amplification in negative control	0	
BADROX	Bad passive reference signal	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	0	
NOAMP	No amplification	0	
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
SPIKE	Noise spikes	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	0	
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	0	
BLFAIL	Baseline algorithm failed	0	
THOLDFAIL	Thresholding algorithm failed	0	
CTFAIL	CT algorithm failed	0	

Figura 13 – Exemplo de imagem capturada da tela de resumo de erros (*QC summary*), após reação de Real Time – PCR de amostras de 3 dias. Notar a ausência de notificações de erros *(Flags*)

Figura 14 – Exemplo de imagem capturada da tela de trabalho do programa SDS 2.1, após reação de Real Time – PCR de amostras de três (3) dias. Notar o padrão adequado de amplificação no gráfico ao centro e a ausência de notificações de erros (*Flags*) nos poços representados à direita da tela

Tabela 5 – Valores médios dos C_Ts e ΔC_Ts das replicatas dos grupos selvagens (Wild Type). ΔC_Ts médios estão à direita de seus respectivos C_Ts. Valores médios dos grupos e respectivos desvios padrão estão indicados

	Wild type										
	TNFα	**ΔC_T**	**TGFβ1**	**ΔC_T**	**MMP3**	**ΔC_T**	**MMP9**	**ΔC_T**	**TIMP1**	**ΔC_T**	**GAPDH**
Testemunha 1	36,416	14,649	31,963	10,2	36,459	14,692	33,67	11,903	35,943	14,176	21,767
Testemunha 2	33,695	13,944	28,965	9,214	35,825	16,074	31,715	11,964	33,225	13,474	19,751
Testemunha 3	34,761	14,313	30,011	9,563	34,733	14,285	31,95	11,502	32,534	12,086	20,448
Testemunha 4	33,568	12,887	29,664	8,983	36,549	15,868	31,853	11,172	32,371	11,69	20,681
Testemunha 5	34,845	14,037	30,361	9,553	36,132	15,324	32,523	11,715	33,755	12,947	20,808
Média	**34,657**	**13,966**	**30,193**	**9,502**	**35,94**	**15,249**	**32,342**	**11,651**	**33,566**	**12,875**	**20,691**
Desvio Padrão	**1,146**	**0,6630**	**1,116**	**0,458**	**0,733**	**0,76**	**0,803**	**0,323**	**1,44**	**1,01**	**0,727**
24 horas 1	34,877	17,232	29,75	12,11	33,03	15,385	31,932	14,287	29,161	11,516	17,645
24 horas 2	31,953	10,125	30,895	9,067	31,948	10,12	29,962	8,134	30,924	9,096	21,828
24 horas 3	34,247	13,219	29,436	8,408	33,968	12,94	31,47	10,442	31,999	10,971	21,028
24 horas 4	33,834	13,762	29,886	9,814	32,828	12,756	30,967	10,895	30,551	10,479	20,072
24 horas 5	32,648	12,385	30,173	9,91	33,141	12,878	31,292	11,029	30,843	10,58	20,263
Média	**33,512**	**13,345**	**30,028**	**9,861**	**32,983**	**12,816**	**31,125**	**10,957**	**30,696**	**10,528**	**20,167**
Desvio Padrão	**1,192**	**2,578**	**0,552**	**1,395**	**0,723**	**1,864**	**0,738**	**2,198**	**1,018**	**0,898**	**1,572**
3 dias 1	35,866	14,927	30,612	9,673	36,21	15,271	32,84	11,901	31,823	10,884	20,939
3 dias 2	35,87	14,927	30,653	9,71	36,649	15,706	33,007	12,064	33,631	12,688	20,943
3 dias 3	36,41	15,45	29,983	9,023	36,796	15,836	33,665	12,705	33,413	12,453	20,96
3 dias 4	35,724	14,965	30,142	9,383	36,222	15,463	32,879	12,12	32,659	11,9	20,759
3 dias 5	36,453	15,266	30,758	9,571	37,962	16,775	33,544	12,357	33,326	12,139	21,187
Média	**36,065**	**15,107**	**30,43**	**9,472**	**36,768**	**15,81**	**33,187**	**12,229**	**32,97**	**12,013**	**20,958**
Desvio Padrão	**0,34**	**0,239**	**0,344**	**0,281**	**0,716**	**0,582**	**0,388**	**0,312**	**0,737**	**0,699**	**0,152**
7 dias 1	33,237	10,294	30,956	8,013	32,919	9,976	32,441	9,498	32,557	9,614	22,943
7 dias 2	33,377	11,434	31,367	9,424	36,224	14,281	33,433	11,49	33,532	11,589	21,943
7 dias 3	35,003	14,066	29,764	8,827	35,346	14,409	31,464	10,527	32,95	12,013	20,937
7 dias 4	34,153	11,965	32,141	9,953	35,211	13,023	33,811	11,623	33,384	11,196	22,188
7 dias 5	35,508	13,803	31,366	9,661	36,461	14,756	33,097	11,392	33,658	11,953	21,705
Média	**34,256**	**12,312**	**31,119**	**9,176**	**35,232**	**13,289**	**32,849**	**10,906**	**33,216**	**11,273**	**21,943**
Desvio Padrão	**0,993**	**1,602**	**0,87**	**0,77**	**1,402**	**1,964**	**0,924**	**0,897**	**0,455**	**0,983**	**0,729**
10 dias 1	33,481	13,964	32,324	12,81	36,495	16,978	33,994	14,477	34,269	14,752	19,517
10 dias 2	34,619	14,79	31,616	11,79	35,799	15,969	33,915	14,086	34,371	14,542	19,83
10 dias 3	36,753	18,394	32,076	13,72	35,348	16,989	34,446	16,087	35,652	17,293	18,359
10 dias 4	34,354	14,333	30,121	10,1	35,145	15,123	33,243	13,222	33,703	13,682	20,021
10 dias 5	33,151	13,321	30,928	11,1	36,098	16,268	33,822	13,992	33,716	13,886	19,83
Média	**34,472**	**14,96**	**31,413**	**11,9**	**35,777**	**16,266**	**33,884**	**14,373**	**34,342**	**14,831**	**19,511**
Desvio Padrão	**1,411**	**1,993**	**0,896**	**1,416**	**0,548**	**0,778**	**0,431**	**1,061**	**0,794**	**1,446**	**0,669**
20 dias 1	35,239	15,799	28,891	9,451	34,553	15,113	30,892	11,452	31,879	12,439	19,44
20 dias 2	33,928	16,135	27,421	9,628	36,342	18,549	30,189	12,396	29,472	11,679	17,793
20 dias 3	36,848	16,061	29,884	9,097	33,913	13,126	31,983	11,196	33,277	12,49	20,787
20 dias 4	35,788	15,897	29,337	9,446	35,051	15,16	31,329	11,438	32,426	12,535	19,891
20 dias 5	35,821	15,436	29,927	9,542	34,159	13,774	-	-	33,815	13,43	20,385
Média	**35,525**	**15,866**	**29,092**	**9,433**	**34,804**	**15,144**	**31,086**	**11,621**	**32,174**	**12,515**	**19,659**
Desvio Padrão	**1,065**	**0,274**	**1,027**	**0,202**	**0,962**	**2,094**	**0,754**	**0,53**	**1,685**	**0,621**	**1,16**

Tabela 6 – Valores médios dos C_Ts e ΔC_Ts das replicatas dos grupos deletados (Knock Out). ΔC_Ts médios estão à direita de seus respectivos C_Ts. Valores médios dos grupos e respectivos desvios padrão estão indicados

	Knock Out										
	TNFα	**ΔC_T**	**TGFβ1**	**ΔC_T**	**MMP3**	**ΔC_T**	**MMP9**	**ΔC_T**	**TIMP1**	**ΔC_T**	**GAPDH**
Testemunha 1	35,453	15,008	29,633	9,188	37,431	16,986	32,929	12,484	35,508	15,063	20,445
Testemunha 2	34,984	14,475	29,294	8,785	36,961	16,452	33,206	12,697	35,548	15,039	20,509
Testemunha 3	35,235	14,373	29,834	8,972	37,222	16,36	33,153	12,291	35,269	14,407	20,862
Testemunha 4	34,572	13,632	29,878	8,938	36,578	15,638	32,728	11,788	34,055	13,115	20,94
Testemunha 5	34,744	14,358	29,218	8,832	36,732	16,346	32,692	12,306	34,735	14,349	20,386
Média	**34,998**	**14,369**	**29,571**	**8,943**	**36,985**	**16,356**	**32,942**	**12,313**	**35,023**	**14,395**	**20,628**
Desvio Padrão	**0,357**	**0,491**	**0,304**	**0,157**	**0,348**	**0,48**	**0,261**	**0,376**	**0,631**	**0,791**	**0,254**
24 horas 1	34,649	17,453	29,962	12,77	31,182	13,986	32,952	15,756	29,034	11,838	17,196
24 horas 2	34,726	13,898	29,954	9,126	34,475	13,647	30,435	9,607	31,555	10,727	20,828
24 horas 3	34,779	13,594	29,997	8,812	33,968	12,783	32,943	11,758	31,325	10,14	21,185
24 horas 4	35,061	14,982	30,321	10,24	33,511	13,432	32,446	12,367	30,981	10,902	20,079
24 horas 5	34,377	14,996	29,671	10,29	32,876	13,495	31,767	12,386	30,267	10,886	19,381
Média	**34,718**	**14,985**	**29,981**	**10,25**	**33,202**	**13,469**	**32,109**	**12,375**	**30,632**	**10,899**	**19,734**
Desvio Padrão	**0,246**	**1,517**	**0,231**	**1,554**	**1,274**	**0,439**	**1,053**	**2,206**	**1,017**	**0,61**	**1,58**
3 dias 1	34,444	13,532	28,942	8,03	34,563	13,651	31,748	10,836	30,944	10,032	20,912
3 dias 2	34,804	14,212	29,945	9,353	33,318	12,726	31,594	11,002	30,956	10,364	20,592
3 dias 3	35,075	14,362	29,24	8,527	35,737	15,024	32,781	12,068	31,913	11,2	20,713
3 dias 4	35,175	14,045	29,781	8,651	34,939	13,809	32,476	11,346	31,67	10,54	21,13
3 dias 5	34,374	14,034	28,978	8,638	34,138	13,798	31,674	11,334	30,88	10,54	20,34
Média	**34,774**	**14,037**	**29,377**	**8,64**	**34,539**	**13,802**	**32,055**	**11,317**	**31,273**	**10,535**	**20,737**
Desvio Padrão	**0,361**	**0,313**	**0,462**	**0,473**	**0,901**	**0,818**	**0,572**	**0,513**	**0,482**	**0,426**	**0,302**
7 dias 1	36,178	13,235	32,823	9,88	36,953	14,01	34,025	11,082	35,699	12,756	22,943
7 dias 2	35,553	13,267	31,858	9,572	36,537	14,251	33,984	11,698	34,852	12,566	22,286
7 dias 3	36,065	13,454	32,171	9,56	36,6	13,989	33,48	10,869	34,821	12,21	22,611
7 dias 4	36,304	13,474	32,299	9,469	36,839	14,009	33,721	10,891	35,074	12,244	22,83
7 dias 5	36,819	13,921	31,854	8,956	36,666	13,768	32,784	9,886	34,309	11,411	22,898
Média	**36,184**	**13,47**	**32,201**	**9,487**	**36,719**	**14,005**	**33,599**	**10,885**	**34,951**	**12,237**	**22,714**
Desvio Padrão	**0,456**	**0,274**	**0,399**	**0,335**	**0,173**	**0,171**	**0,506**	**0,652**	**0,503**	**0,515**	**0,271**
10 dias 1	36,158	14,448	34,743	13,03	-	-	35,972	14,262	36,871	15,161	21,71
10 dias 2	35,919	15,52	32,424	12,03	36,217	15,818	32,813	12,414	35,004	14,605	20,399
10 dias 3	36,567	19,75	30,328	13,51	35,903	19,086	21,903	5,086	33,803	16,986	16,817
10 dias 4	36,312	15,499	32,82	12,01	36,615	15,802	31,121	10,308	35,405	14,592	20,813
10 dias 5	35,601	12,308	32,779	9,486	36,921	13,628	35,108	11,815	34,932	11,639	23,293
Média	**36,111**	**15,505**	**32,619**	**12,01**	**36,414**	**16,084**	**31,383**	**10,777**	**35,203**	**14,597**	**20,606**
Desvio Padrão	**0,37**	**2,709**	**1,57**	**1,555**	**0,446**	**2,25**	**5,633**	**3,482**	**1,106**	**1,922**	**2,392**
20 dias 1	36,344	14,712	31,282	9,65	36,192	14,56	33,948	12,316	33,702	12,07	21,632
20 dias 2	35,479	13,998	31,053	9,572	36,169	14,688	32,48	10,999	34,497	13,016	21,481
20 dias 3	34,306	13,379	29,867	8,94	36,824	15,897	32,688	11,761	34,035	13,108	20,927
20 dias 4	36,134	14,231	31,625	9,722	36,836	14,933	33,078	11,175	35,133	13,23	21,903
20 dias 5	36,785	14,248	32,879	10,34	-	-	31,712	9,175	36,721	14,184	22,537
Média	**35,81**	**14,114**	**31,341**	**9,645**	**36,505**	**15,02**	**32,781**	**11,085**	**34,818**	**13,122**	**21,696**
Desvio Padrão	**0,963**	**0,486**	**1,085**	**0,499**	**0,375**	**0,605**	**0,82**	**1,187**	**1,192**	**0,751**	**0,59**

Os dados de ΔC_T dos genes para TNFα, TGFβ1, MMP3, MMP9 e TIMP1 dos grupos WT e KO (Gráficos 7, 8, 9, 10, e 11) foram comparados usando-se o teste de hipóteses não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney (YUAN et al., 2006) através do programa Minitab® 15.1.1.0. A hipótese alternativa "presença de diferença entre as amostras [*not equal*]" foi determinada com intervalo de confiança de 0,95. Os grupos referentes aos genes TNFα (3 e 20 dias), TGFβ1 (Testemunha e 3 dias), MMP3 (Testemunha e 3 dias), MMP9 (Testemunha e 3 dias) e TIMP1 (Testemunha e 3 dias) revelaram diferenças estatisticamente relevantes entre os respectivos grupos WT e KO ($P<0,05$). Os demais grupos não revelaram diferenças estatisticamente relevantes dos valores. Posteriormente, calculou-se o valor de diferença dos níveis de expressão (*Fold Difference*) com base na equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11). Estes valores denotam as diferenças na expressão dos respectivos genes (TNFα, TGFβ1, MMP3, MMP9 e TIMP1) entre os grupos WT e KO.

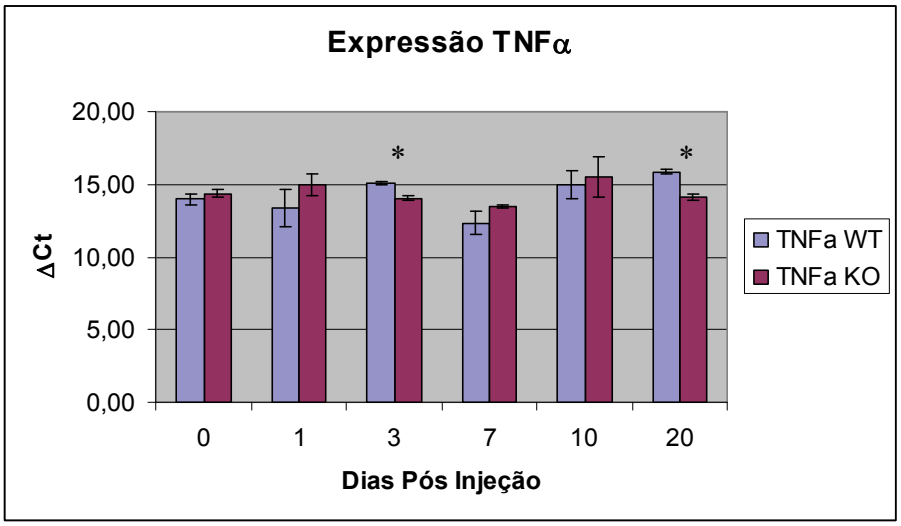


Gráfico 7 – Gráfico comparativo entre os valores médios de ΔCT e respectivos desvios padrão da expressão gênica de TNFα dos grupos selvagem (Wild Type – WT) e deletados (Knock Out – KO) aos 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós injeção e grupo testemunha (0). Asterisco (*): presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e KO.

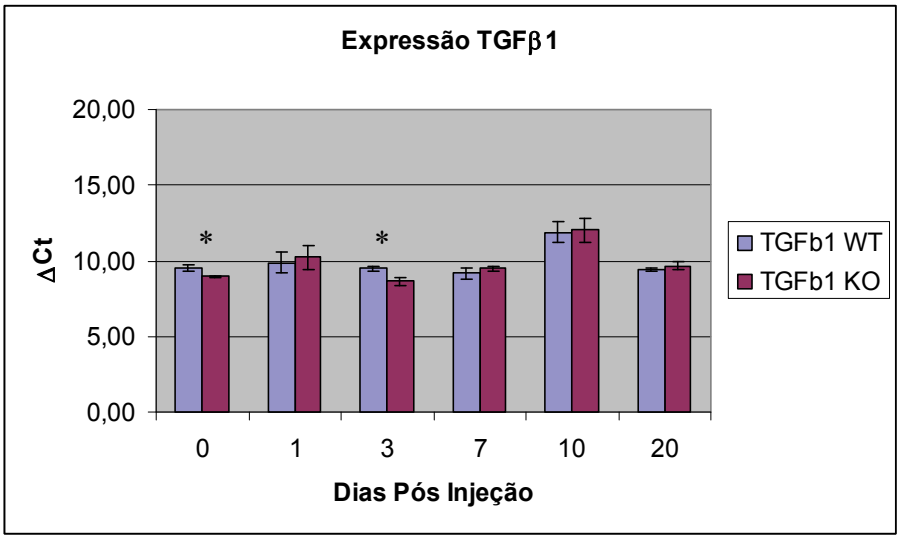


Gráfico 8 – Gráfico comparativo entre os valores médios de ΔCT e respectivos desvios padrão da expressão gênica de TGFβ dos grupos selvagem (Wild Type - WT) e deletados (Knock Out – KO) aos 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós injeção e grupo testemunha (0). Asterisco (*): presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e KO.

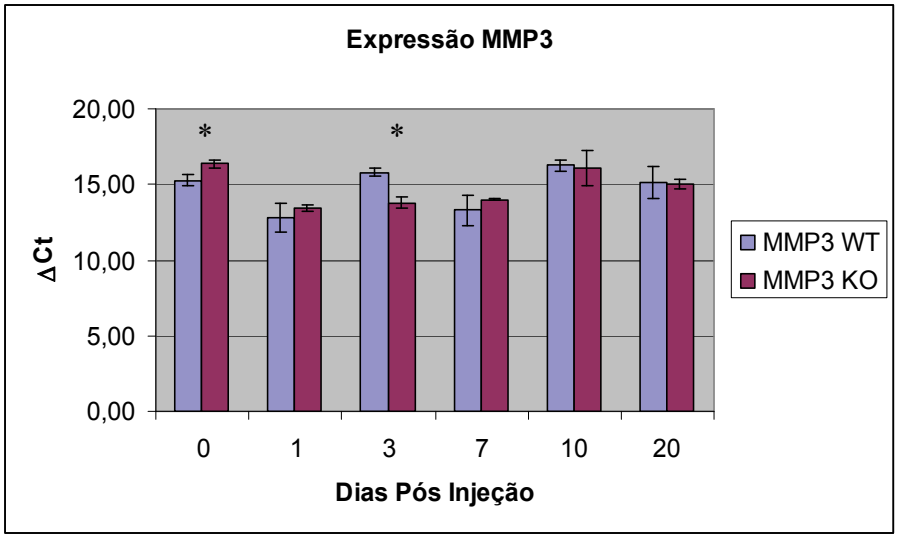


Gráfico 9 – Gráfico comparativo entre os valores médios de ΔCT e respectivos desvios padrão da expressão gênica de MMP3 dos grupos selvagem (Wild Type - WT) e deletados (Knock Out – KO) aos 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós injeção e grupo testemunha (0). Asterisco (*): presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e KO.

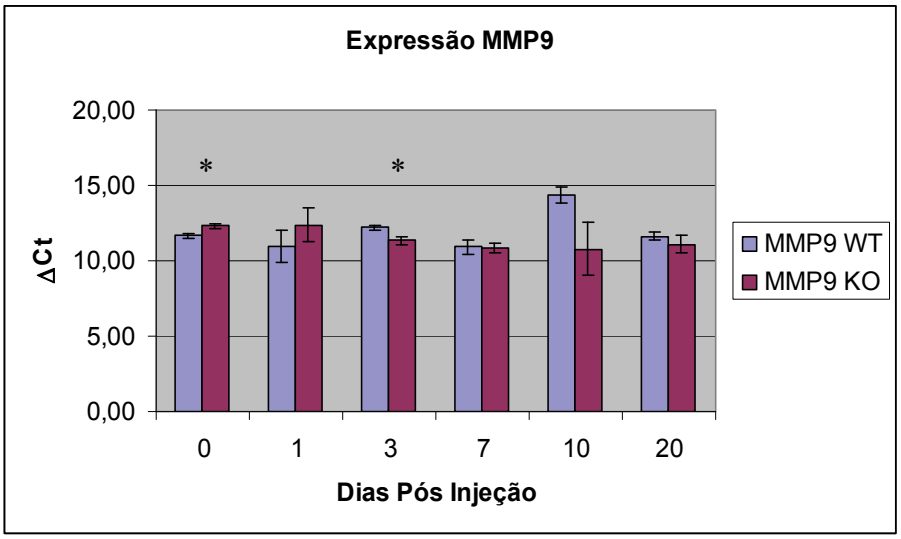


Gráfico 10 – Gráfico comparativo entre os valores médios de ΔCT e respectivos desvios padrão da expressão gênica de MMP9dos grupos selvagem (Wild Type - WT) e deletados (Knock Out – KO) aos 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós injeção e grupo testemunha (0). Asterisco (*): presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e KO.

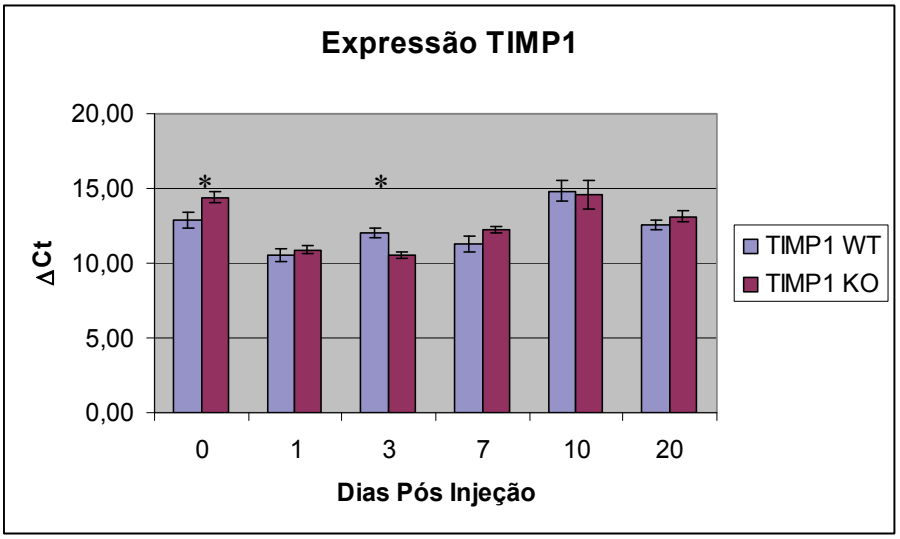


Gráfico 11 – Gráfico comparativo entre os valores médios de ΔC_T e respectivos desvios padrão da expressão gênica de TIMP1 dos grupos selvagem (Wild Type - WT) e deletados (Knock Out – KO) aos 1, 3, 7, 10 e 20 dias pós injeção e grupo testemunha (0). Asterisco (*): presença de diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e KO.

Tabela 7 – Resultados do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney comparando os valores de ΔC_T dos grupos WT e KO para o ensaio para TNFα, indicando a existência ou não de diferença entre os grupos e o respectivo valor de significância. Valores de ΔC_T e $\Delta\Delta C_T$ e respectivos desvio padrão e variação relativa de expressão dos grupos WT e KO para o ensaio para TNFα. Valores acima de um (1) apontam para aumento de expressão, enquanto valores menores que um apontam para redução de expressão

TNFα						
Dia	**Significância**	**Conclusão**	**ΔC_T TNFα WT**	**ΔC_T TNFα KO**	**$\Delta\Delta C_T$ KO-WT**	**Variação Relativa**
0	0,2963	Iguais	13,97±0,66	14,37±0,49	0,40±0,55	0,52
1	0,1437	Iguais	13,34±2,57	14,98±1,51	1,64±2,19	0,07
3	0,0122	Diferentes	15,11±0,23	14,04±0,31	-1,07±0,38	1,61
7	0,5309	Iguais	12,31±1,60	13,47±0,27	1,16±0,38	0,34
10	0,5309	Iguais	14,96±1,15	15,51±2,70	0,54±2,10	0,16
20	0,0122	Diferentes	15,87±0,27	14,11±0,48	-1,75±0,65	2,15

Tabela 8 – Resultados do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney comparando os valores de ΔC_T dos grupos WT e KO para o ensaio para TGFβ1, indicando a existência ou não de diferença entre os grupos e o respectivo valor de significância. Valores de ΔC_T e $\Delta\Delta C_T$ e respectivos desvio padrão e variação relativa de expressão dos grupos WT e KO para o ensaio para TGFβ1. Valores acima de um (1) apontam para aumento de expressão, enquanto valores menores que um apontam para redução de expressão

TGFβ1						
Dia	**Significância**	**Conclusão**	**ΔC_T TGFβ WT**	**ΔC_T TGFβ1 KO**	**$\Delta\Delta C_T$ KO-WT**	**Variação Relativa**
0	0,0216	Diferentes	9,50±0,45	8,94±0,15	-0,56±0,29	1,2
1	0,5309	Iguais	9,86±1,39	10,25±1,55	0,39±1,86	0,21
3	0,0216	Diferentes	9,47±0,28	8,64±0,47	-0,83±0,41	1,34
7	0,6761	Iguais	9,18±0,77	9,49±0,33	0,31±0,43	0,6
10	0,8345	Iguais	11,90±1,41	12,01±1,55	0,11±1,56	0,31
20	0,2101	Iguais	9,43±0,20	9,65±0,49	0,21±0,62	0,56

Tabela 9 – Resultados do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney comparando os valores de ΔC_T dos grupos WT e KO para o ensaio para MMP3, indicando a existência ou não de diferença entre os grupos e o respectivo valor de significância. Valores de ΔC_T e $\Delta\Delta C_T$ e respectivos desvio padrão e variação relativa de expressão dos grupos WT e KO para o ensaio para MMP3. Valores acima de um (1) apontam para aumento de expressão, enquanto valores menores que um apontam para redução de expressão

MMP3						
Dia	**Significância**	**Conclusão**	**ΔC_T MMP3 WT**	**ΔC_T MMP3 KO**	**$\Delta\Delta C_T$ KO-WT**	**Variação Relativa**
0	0,0367	Diferentes	15,25±0,76	16,36±0,48	1,11±0,54	0,32
1	0,2963	Iguais	12,82±1,86	13,47±0,43	0,65±1,64	0,2
3	0,0122	Diferentes	15,81±0,58	13,80±0,81	-2,01±0,65	2,55
7	0,6761	Iguais	13,29±1,96	14,01±0,17	0,72±0,32	0,49
10	0,5403	Iguais	16,27±0,77	16,08±2,25	-0,18±0,86	0,62
20	1,0000	Iguais	15,14±2,09	15,02±0,60	-0,12±0,84	0,61

Tabela 10 – Resultados do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney comparando os valores de ΔC_T dos grupos WT e KO para o ensaio para MMP9, indicando a existência ou não de diferença entre os grupos e o respectivo valor de significância. Valores de ΔC_T e $\Delta\Delta C_T$ e respectivos desvio padrão e variação relativa de expressão dos grupos WT e KO para o ensaio para MMP9. Valores acima de um (1) apontam para aumento de expressão, enquanto valores menores que um apontam para redução de expressão

MMP9						
Dia	**Significância**	**Conclusão**	**ΔC_T MMP9 WT**	**ΔC_T MMP9 KO**	**$\Delta\Delta C_T$ KO-WT**	**Variação Relativa**
0	0,0367	Diferentes	11,65±0,32	12,31±0,37	0,66±0,41	0,48
1	0,2963	Iguais	10,96±2,19	12,37±2,20	1,42±1,74	0,11
3	0,0367	Diferentes	12,23±0,31	11,32±0,51	-0,91±0,43	1,39
7	1,0000	Iguais	10,91±0,89	10,89±0,51	-0,02±0,70	0,62
10	0,0601	Iguais	14,37±1,06	10,78±0,65	-3,60±0,79	6,96
20	0,3913	Iguais	11,62±0,53	11,09±3,48	-0,54±0,79	0,84

Tabela 11 – Resultados do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney comparando os valores de ΔC_T dos grupos WT e KO para o ensaio para TIMP1, indicando a existência ou não de diferença entre os grupos e o respectivo valor de significância. Valores de ΔC_T e $\Delta\Delta C_T$ e respectivos desvio padrão e variação relativa de expressão dos grupos WT e KO para o ensaio para TIMP1. Valores acima de um (1) apontam para aumento de expressão, enquanto valores menores que um apontam para redução de expressão

TIMP1						
Dia	**Significância**	**Conclusão**	**ΔC_T TIMP1 WT**	**ΔC_T TIMP1 KO**	**$\Delta\Delta C_T$ KO-WT**	**Variação Relativa**
0	0,0367	Diferentes	12,87±1,010	14,39±0,791	1,52±0,831	0,2
1	0,6761	Iguais	10,53±0,898	10,90±0,610	0,37±1,694	0,24
3	0,0216	Diferentes	12,01±0,699	10,54±0,426	-1,48±0,522	1,94
7	0,0601	Iguais	11,27±0,983	12,24±0,515	0,96±0,300	0,42
10	0,8345	Iguais	14,83±1,446	14,60±1,922	-0,23±0,694	0,73
20	0,2963	Iguais	12,51±0,621	13,12±0,751	0,61±0,654	0,42

5 RESULTADOS

Os dados acima apresentados sugerem a existência de diferença nos padrões de expressão de parte dos genes pesquisados e em parte dos grupos, comparativamente entre os grupos deletados para Cx32 e os grupos controles selvagens ($P<0,05$). Esta diferença reflete-se como aumentos dos níveis de expressão (*Up-regulation*) ou reduções dos níveis de expressão (*Down-regulation*) dos genes pesquisados, a saber:

- O grupo testemunha apresentou variação da expressão dos genes para TGFβ1 (120% em relação ao controle); MMP3 (32% em relação ao controle); MMP9 (48% em relação ao controle) e TIMP1 (20% em relação ao controle);
- O grupo de 3 dias pós-inoculação apresentou variação da expressão dos genes para TNFα (161% em relação ao controle), TGFβ1 (131% em relação ao controle), MMP3 (255% em relação ao controle), MMP9 (139% em relação ao controle) e TIMP1 (194% em relação ao controle);
- O grupo do período de 20 dias pós-inoculação apresentou variação da expressão para o gene TNFα (215%).

Os níveis de expressão dos genes nos demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($P>0,05$).

6 DISCUSSÃO

Em 2004, somente alguns poucos trabalhos descreviam as ações de citocinas pró-inflamatórias sobre as junções comunicantes das células gliais (GJC). Nos últimos anos, o número de publicações descrevendo os efeitos de citocinas e estímulos patogênicos sobre as GJC aumentou dramaticamente (KIELIAN, 2008). Neste contexto, o presente projeto é, até o conhecimento de seus autores, o primeiro a investigar o caminho contrário: Investigar a influencia das conexinas no processo inflamatório no sistema nervoso central (SNC).

Estudos anteriores utilizando o modelo do brometo de etídio em ratos Wistar demonstraram a presença e atividade linfocítica tanto no tronco encefálico quanto na medula espinhal pós-lesão, presença esta atribuída como sendo parte do influxo inflamatório induzido pelo brometo (GRAÇA, 1989; SANCHEZ, 2006) Tais experimentos confirmaram a suspeita de que há pouca interferência imune nas lesões mediadas pelo BE, sendo a presença de linfócitos nos estágios iniciais de desmielinização apenas um componente de comunicação com os macrófagos, os quais seriam as reais células efetoras dentro do SNC (ZSUZSA; RAINE; HART, 1994).

No presente trabalho verificou-se que o grupo testemunha KO, que não recebeu nenhum procedimento ou manipulação que pudesse elicitar uma resposta inflamatória, mostrou significativa diminuição da expressão da expressão de MMP3, MMP9 e TIMP1 e significativo aumento da expressão de TGFβ1 quando comparado ao seu controle selvagem. Adicionalmente, verificou-se significativo aumento de expressão de todos os genes pesquisados (TNFα, TGFβ1, MMP3, MMP9 e TIMP1) no grupo de 3 dias pós-inoculação. Importante salientar que este período corresponde ao pico dos mecanismos de resposta inflamatória aguda. No grupo de 20 dias pós-injeção, verificou-se significante aumento da expressão de TNFα.

Estudo anterior que investigou o modelo do BE em ratos Wistar imunossuprimidos com ciclosporina observou que nos primeiros dias após a injeção o número de macrófagos ativados no SNC era inferior ao do encontrado em animais imunocompetentes (BONDAN; LALLO; GRAÇA, 2008). Em período intermediário de lesão (14 dias), o número de macrófagos ativados nos animais imunossuprimidos demonstrou ser significativamente maior do que nos animais imunocompetentes. Em períodos posteriores de lesão (21 dias) o número de células reativas em animais tratados volta a ser mais baixo, comparado com os controles.

Este aumento transitório é semelhante ao verificado no presente estudo para os genes MMP3, MMP9 e TIMP1, relacionados à resposta tecidual à lesão. Nestes genes observa-se uma redução no nível de expressão dos genes alvo (*down-regulation*) dos animais testemunha, associado a um aumento de expressão (up-regulation) somente no período de 3 dias. A maior parte dos resultados nos demais períodos sugere uma baixa na expressão; contudo o grau de significância da diferença ficou acima (P>0,05) do intervalo de confiança de 95%.

Paralelamente, trabalho de Ramos et al. investigou comparativamente o padrão de desmielinização e remielinização no sistema nervoso periférico entre camundongos deletados para Cx32 e normais. Este trabalho indicou que a ausência de Cx32 não alterou o padrão de resposta tecidual, lançando as possibilidades de que ou a Cx32 não seja critica para o processo remielinizante ou que outras proteínas sejam expressas em seu lugar; as candidatas em potencial incluindo as Cx 46 e Cx 43 (RAMOS et al., 2009).

Entretanto, há de se considerar a real viabilidade e adequação do método utilizado, tendo em vista o fato de uma lesão focal como a injeção de brometo ser altamente variável. Sanchez et al. em seu estudo envolvendo injeções de BE no SNC ratos Wistar observou indícios de reatividade astrocitária distantes das bordas da lesão (SANCHEZ et al., 2006). Embora o método tenha identificado diferenças significantes, certamente o protocolo utilizado é mais adequado para a verificação de diferenças de expressão que acometam um órgão ou tecido de forma mais difusa.

Estudos *in vivo* de diversos grupos têm produzido resultados conflitantes na contextualização das GJC nas afecções do SNC. Considerando-se que o cérebro é um órgão complexo, com relações intrincadas entre seus mecanismos celulares, químicos e moleculares, não é inesperado que modelos utilizando diferentes mecanismos lesivos, em diferentes locais de lesão obtenham conclusões distintas (KIELIAN, 2008).

Em resumo, nosso conhecimento na caracterização dos efeitos inflamatórios sobre as GJC no SNC tem crescido consideravelmente; contudo são necessários novos estudos que definam as consequências biológicas de tais alterações no contexto da patologia do SNC (KIELIAN, 2008), como o presente estudo.

7 CONCLUSÕES

Com base no exposto, conclui-se que existem diferenças nos padrões de expressão dos genes para fator de necrose tumoral alfa (TNFα), fator de crescimento transformador beta 1 (TGFβ1), metaloproteinase 3 (MMP3), metaloproteinase 9 (MMP9), inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP1) entre camundongos deletados (KO) para o gene da conexina 32 e camundongos selvagens (WT), em condições normais e em resposta ao estímulo inflamatório e regenerativo/cicatricial promovido por injeção intracerebral de solução de brometo de etídio. Os níveis de expressão gênica dos genes avaliados apresentam padrões variáveis ao longo dos períodos avaliados em comparação ao grupo testemunha tanto no grupo selvagem como no grupo deletado.

A metodologia e os protocolos de cirurgia, armazenagem, extração e purificação de DNA, genotipagem, extração e purificação de RNA total, quantificação, transcrição reversa, validação de ensaios e PCR em tempo real mostraram-se adequadas para a avaliação de expressão gênica no presente trabalho, podendo ser aplicada a outras linhas de pesquisa de interesse.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2003. 576 p.

AGRAWAL, S. M.; LAU, L.; YONG, V. W. MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad; **Seminars in Cell & Developmental Biology,** v. 19, p. 42-51, 2008.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 5. Ed. New York: Garland Science, 2007. 1392 p.

APPLIED BIOSYSTEMS. Application note; Taqman® gene expression assays amplification efficiency of Taqman® gene expression assays. 2006. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040377.pdf>. Acesso em: 1 jul. 2009.

BECKER, D.; GREEN, C. Gap junction-mediated interactions between cells. In: FLEMING, T. P. **Cell-cell interactions a practical approach**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2002. p. 47-70.

BONDAN, E. F.; LALLO, M. A.; GRAÇA, D. L. Ultrastructural study of the effects of cyclosporine in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide demyelinating model. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 66, n. 2b, p. 378-384, 2008.

BRAND-SCHIEBER, E.; WERNER, P.; IACOBAS, D. A.; IACOBAS, S.; BEELITZ, M.; LOWERY, S. L.; SPRAY, D. C.; SCEMES, E. Connexin43, the major gap junction protein of astrocytes, is down-regulated in inflamed white matter in an animal model of multiple sclerosis. **Journal of Neuroscience Research,** v. 80, p. 798-808, 2005.

DERMIETZEL, R.; SPRAY, D. C. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? **Trends Neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 186-192, 1993.

DERMIETZEL, R.; SPRAY, D. C. From neuro-glue ('Nervenkitt') to glia: a prologue. **Glia**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 1998.

GIULIAN, D. Glia as part of the immune system. In: KETTENMANN, H.; RANSON, B. R. (Ed.). **Neuroglia**. New York: Oxford University Press, 1995. p. 671-684.

GRAÇA, D. L.; BLAKEMORE, W. F. Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 12, p. 593-605, 1986.

GRAÇA, D. L. Efeitos de uma droga desmielinizante gliotóxica no sistema nervoso central. II. Biologia das células de Schwann durante a fase de reparação do tecido. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 47, p. 268-273, 1989.

HAGHIKIA, A.; LADAGE, K.; LAFENETRE, P.; HAGHIKIA, A.; HINKEROHE, D.; SMIKALLA, D.; HAASE, C. G.; DERMIETZEL, R.; FAUSTMANN, P. M. Intracellular

application of TNF-alpha impairs cell to cell communication via gap junctions in glioma cells. **Journal of Neurooncology**, v. 86, p. 143-152, 2008.

HAYASHI, N.; NISHIMURA, K.; KUMAGAI, S. New biomarkers for rheumatoid arthritis. **Rinsho Byori,** v. 56, n. 4, p. 297-308, 2008.

JACKSON LABORATORY. **Strain Description for C57bl/6 inbred mice**. Falta data. Disponível em: <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>. Acesso em: 1 jun. 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

KIELIAN, T. Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. **Journal of Neurochemistry,** v. 106, n. 3, p. 1000-1016, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease.** 7. ed. Philadelphia: Elsevier, 2004. 1552 p.

LICHTENBERG, F. R. **Sources of U.S. longevity increase, 1960 –1997.** Germany: CESifo, 2000. 62 p. (CESifo Working Paper Series; Working Paper, n. 405).

LIM, M. C.; MAUBACH, G.; ZHUO, L. TGF-beta1 down-regulates connexin 43 expression and gap junction intercellular communication in rat hepatic stellate cells. **European Journal of Cell Biology**; v. 88, n. 12, p. 719-30, 2009.

LINDSEY, M. L.; ESCOBAR, G. P.; MUKHERJEE, R.; GOSHORN, D. P.; SHEATS, N. J.; BRUCE, J. A.; MAINS, I. M.; HENDRICK, J. K.; HEWETT, K. W.; GOURDIE, R. G.; MATRISIAN, L. M.; SPINALE, F. G. Matrix Metalloproteinase-7 Affects Connexin-43 Levels, Electrical Conduction, and Survival After Myocardial Infarction; **Circulation,** v. 27, p. 2919-2928, 2006.

MCCARTHY, B. J.; HOLLAND, J. J. Denatured DNA as a direct template for in vitro protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 54, p. 880-886, 1965.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia veterinária.** 4. ed. Rio de Janeiro: Campus Elsevier, 2009. 1476 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide **for the Care and Use of Laboratory Animals.** Washington D.C.: National Academic Press, 1996. 125 p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Towards age-friendly primary health care. Active ageing series**. França, 2004. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241592184.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2009.

RAMOS, A. T.; MAIORKA, P. C.; DAGLI, M. L.; HOSOMI, F. Y. M.; VIOLIN, K. B.; LATORRE, A. O.; VIOTT, A DE M.; MASUDA, E. K.; TROST, M. E.; MARTINS, T. B.; GRAÇA, D. L. Remyelination in experimentally demyelinated connexin 32 knockout mice. **Arquivos de Neuropsiquiatria,** v. 67, n. 2B, p. 488-493, 2009.

ROSCOE, W. A.; KIDDER, G. M.; KARLIK, S. J. Experimental allergic encephalomyelitis in connexin 43-heterozygous mice. **Cell Communication & Adhesion**, v. 14, n. 2, p. 57-73, 2007.

SANCHEZ, M.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A.; SINHORINI, I. L.; DAGLI, M. L. Z.; MAIORKA, P. C.; PEREIRA, L. A. V. D.; GRAÇA, D. L. Marcação imuno-histoquímica da resposta macrofágica e astrocitária no tronco encefálico de ratos Wistar submetidos ao modelo gliotóxico do brometo de etídio e tratados com ciclofosfamida. **Arquivos de Neuropsiquiatria,** v. 64, n. 3-B, p. 787-793, 2006.

TACHEAU, C.; FONTAINE, J.; LOY, J.; MAUVIEL, A.; VERRECCHIA, F. TGF-beta induces connexin43 gene expression in normal murine mammary gland epithelial cells via activation of p38 and PI3K/AKT signaling pathways, **Journal of Cell Physiology**, v. 217, n. 3, p. 759-68, 2008.

TANUMA, N.; KOJIMA, T.; SHIN, T.; AIKAWA, Y.; KOHJI, T.; ISHIHARA, Y.; MATSUMOTO, Y. Competitive PCR quantification of pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis; **Journal of Neuroimmunology,** v.73, p. 197-206, 1997.

TOFT-HANSEN, H.; BABCOCK, A. A.; MILLWARD, J. M.; OWENS, T. Downregulation of membrane type-matrix metalloproteinases in the inflamed or injured central nervous system**; Journal of Neuroinflammation**, v. 4, n. 24, p. 1-9, 2007.

WEAVER, A.; SILVA, A. G.; NUTTALL, R. K.; EDWARDS, D. R.; SHAPIRO, S. D.; RIVEST, S.; YONG V. W. An elevated matrix metalloproteinase (MMP) in an animal model of multiple sclerosis is protective by affecting Th1/Th2 polarization. **The FASEB Journal Express**, v. 19, p. 1668-1670, 2005.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F.; STEWART JR., C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 85, p. 1-12, 2006.

ZSUZSA, F.; RAINE, C. S.; HART, M. N. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. **Immunology Today,** v. 15, p. 218-24, 1994.