MARA ADRIANA CORRÊA

**PARTICIPAÇÃO DO GENE *Slc11a1* NA MODULAÇÃO DA
RESPOSTA IMUNE NA ARTRITE INDUZIDA POR PRISTANE
EM CAMUNDONGOS SELECIONADOS PARA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA**

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

São Paulo
2014

MARA ADRIANA CORRÊA

**PARTICIPAÇÃO DO GENE *Slc11a1* NA MODULAÇÃO DA
RESPOSTA IMUNE NA ARTRITE INDUZIDA POR PRISTANE
EM CAMUNDONGOS SELECIONADOS PARA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Marcelo De Franco

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Corrêa, Mara Adriana.

Participação do gene Slc11a1 na modulação da resposta imune na artrite induzida por pristane em camundongos selecionados para resposta inflamatória aguda / Mara Adriana Corrêa. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Franco.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Genes reguladores da intensidade de inflamação e da artrite experimental.

Versão do título para o inglês: Slc11a1 gene involvement in the modulation of immune response during pristane-induced arthritis in mice genetically selected for acute inflammatory response.

1. Artrite 2. Slc11a1 3. Macrófago 4. Citocinas 5. Inflamação 6. Pristane I. Corrêa, Prof. Dr. Marcelo de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0208/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mara Adriana Corrêa.

Título da Tese: Participação do gene Slc11a1 na modulação da resposta imune na artrite induzida por pristane em camundongos selecionados para resposta inflamatória aguda.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo de Franco.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **021** nas fls. **84** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Marcelo De Franco, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Participação de gene Slc 1a1 na modulação da resposta imune na artrite induzida por pristane em camundongos selecionados para resposta inflamatória aguda** do qual participou(aram) o(s) **Mara Adriana Corrêa, Jussara Gonçalves Fernandes, Mariana Perlati dos Santos, Tatiane Aparecida Canhamero Gaspardo e os pesquisadores Olga Célia Martinez, Orlando Ribeiro Filho, Nancy Starobinas, Wafa Koury Cabrera, José Ricardo Jensen**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA) em **09.04.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 12 de abril de 2010.

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

Profa.Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

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

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

Of.CEUA.019.13

São Paulo, 05 de abril de 2013.

REF.: Protocolo nº 21/10.

"Participação de gene Slc 1al na modulação da resposta imune na artrite induzida por pristane em camundongos selecionados para resposta inflamatória aguda "

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 09.04.2016.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

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

Ilmo.Sr.
Prof Dr. Marcelo De Franco
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Participação do gene Slc11a1 na modulação da resposta imune na artrite induzida por pristane em camundongos selecionados para resposta inflamatória aguda" **protocolo nº 701/10**, sob a responsabilidade de Marcelo de Franco e Mara Adriana Corrêa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **11/02/2010**.

We certify that the research entitled "The gene Slc11a1 participation in the modulation of the immune response on pristane-induced arthritis in genetically selected mice for the acute inflammatory response", **protocol nº 701/10**, under the responsibility of Marcelo de Franco and Mara Adriana Corrêa, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 02/11/2010

Vigência do Projeto: 03/2010 – 03/2014 Laboratório de Imunogenética	Nº de animais/espécie 320/camundongos AIRmax RR 320/camundongos AIRmax SS
--	--

São Paulo, 17 de fevereiro de 2010.

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

Dedico esta tese a minha família! Em especial, a minha querida mãe Rosa.

Por todo amor, confiança e incentivo ao longo desta jornada!

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador, Dr. Marcelo De Franco pela oportunidade, ensinamentos, amizade, ética, por proporcionar o meu crescimento profissional com novos desafios e principalmente, por acreditar em minha capacidade. Muito Obrigada!!

A Dra. Olga Célia Ibañez pelos ensinamentos preciosos ao longo destes 4 anos, dedicação, carinho e atenção.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan: Dra. Wafa Hanna Cabrera, Dr. Orlando Garcia Ribeiro, Dra Nancy Starobinas, Dra. Andrea Borrego, Dr. José Ricardo Jensen, Dra. Mônica Spadafora, Dra. Milene Tino De Franco, Dra. Solange Carbonare e Dra. Solange Massa pelo convívio, carinho, sugestões e auxílio na realização deste estudo.

Aos professores da banca do exame de qualificação: Dra. Sônia Jancar, Dra. Lourdes Isaac e Dr. Niels Olsen Câmara pela contribuição valiosa no presente trabalho e para o meu crescimento científico.

Ao professor Dr. Antonio Condino Neto que foi meu supervisor no estágio do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) pelo aprendizado e conselhos importantes em sala de aula.

Ao pesquisador Dr. Tommaso Dragani do Istituto dei Tumori de Milão, Itália por me receber em seu laboratório e possibilitar a aquisição de conhecimento e experiência durante o meu estágio.

Aos professores do Departamento de Imunologia do ICB-USP por contribuírem para o meu crescimento científico com sugestões e disciplinas ministradas.

Ao Prof. Dr. José Luiz Guerra pelas análises histopatológicas e discussões.

À Dra. Eliana Blini Marengo pelas discussões científicas, ensinamentos e amizade.

Aos amigos do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan: Tatiane Gasparelo, Layra Albuquerque, Lilian Rego, Cristiano Rossato, Marcela Bordenalli, Aline Lavezo, Priscila Lara, Priscilia Aguilar, Thais Rodrigues, Fernanda Ampessan, Jussara Fernandes, Alessandra Suppa, Felipe Almeida, Tamíris Guidugli, Jéssica Walendy, Fernanda Vinci, Flávia Juscele, Karen Frangiotti, Natalia Pimenta, Verena, Renata Nunes, Mariana Perlati,

Camila Moreira pelo carinho, amizade, descontração no dia-a-dia e pela convivência agradável. Obrigada!

À Dra Iana Katz pela ajuda nos experimentos e amizade.

Aos funcionários do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan: Mara Irineu, Sandra Ottoboni, Andressa Rogge, Neusinha Miranda, Tânia Vieira e Ronaldo pelo auxílio técnico, preparo dos materiais necessários para o andamento desta pesquisa e prontidão para ajudar. Ao pessoal do Biotério: Aline Sabbatini, Rosa Maria, Gustavo, Marinalva Lima, Celso, S. Juca, Manoel Cerqueira pelo cuidado e manutenção dos animais, imprescindíveis neste estudo.

Às secretárias Maria Eni, Amanda e Jotelma do Departamento de Imunologia do ICBIV-USP e, ao Celso Pereira do ICBIII-USP por pacientemente nos auxiliarem nos caminhos burocráticos da Pós Graduação.

As amigas queridas Karina Scaramuzzi, Lidiane Zito Grund, Cinthya Kimori Okamoto, Isadora Maria Villas-Boas e Renata Bueno pela presença constante, carinho, ajuda laboratorial e científica e, por tornarem meus dias mais agradáveis na grande metrópole. Em especial, “as queridas Tatis”: Tatiane Canhamero Gasparelo e Tatiani Donato pelo apoio, momentos de descontração e amizade incondicional. Obrigada!

A minha mãe Rosa e aos meus irmãos Marcos e Mariana que não mediram esforços para que eu concluísse mais esta conquista!! Amo vocês!

A minha querida avó Enedina e meu tio Alcides Brizzi Jr pessoas fundamentais na minha vida, pelo carinho e incentivo ao longo desta etapa.

Ao meu esposo Roberto (Nono) pelo amor, paciência e companheirismo nesta caminhada! Agradeço a Deus, por colocar em meu caminho esta pessoa companheira tornando meus dias mais suaves e alegres. Obrigada por tudo!

As famílias Corrêa, Brizzi, Giuseppin e Lima Giacoia pelo amor incondicional e apoio ao longo de toda a minha vida. Que sorte a minha!

A todos que contribuíram para a realização desta tese.

A realização desta tese foi possível graças ao apoio científico da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2009/18414-0) e do CNPq.

RESUMO

CORRÊA, M. A. **Participação do gene *Slc11a1* na modulação da resposta imune na artrite induzida por pristane em camundongos selecionados para resposta inflamatória aguda.** 2014. 133 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A artrite induzida por pristane (PIA) em camundongos AIRmax homozigotos para o alelo *R* e *S* do gene *Slc11a1* foi usada para avaliar a influência do polimorfismo deste gene na resposta imune, mais especificamente na ativação de macrófagos peritoneais durante a PIA. Estudos anteriores mostraram que a presença do alelo *S* do gene *Slc11a1* aumentou a incidência e a severidade da PIA em AIRmax^{SS}, sugerindo que este gene ou outro próximo esteja interagindo com o *loci* da inflamação para modular a PIA. O tratamento com pristane nos animais AIRmax^{SS} induziu infiltrado intenso composto por linfócitos, monócitos/macrófagos e neutrófilos. Macrófagos AIRmax^{SS} apresentaram perfis de expressão gênica e celular exacerbados durante a PIA, com expressão/produção elevada de H₂O₂, NO, IL-1 β , IL-6, TNF- α e várias quimiocinas. Entretanto, o alelo *R* do gene *Slc11a1* foi capaz de regular a intensidade de ativação do macrófago de forma mais eficiente que o alelo *S* e controlar desenvolvimento da artrite. Houve acometimento do rim, pulmão e timo durante a PIA. Nossos dados sugerem que o gene *Slc11a1* modula a ativação dos macrófagos envolvidos na suscetibilidade a PIA e estas linhagens representam um modelo murino para o estudo da artrite reumatoide.

Palavras-chave: Artrite. *Slc11a1*. Macrófago. Citocinas. Inflamação. Pristane.

ABSTRACT

CORRÊA, M. A. *Slc11a1* gene involvement in the modulation of immune response during pristane-induced arthritis in mice genetically selected for acute inflammatory response. 2014. 133 p. Ph. D. thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Pristane-induced arthritis (PIA) in AIRmax mice homozygous for *Slc11a1* *R* and *S* allele was used in this study to characterize the role of *Slc11a1* polymorphisms on immune response, more specifically in the activation of peritoneal macrophages during PIA. Previous reports showed the presence of *S* allele of *Slc11a1* increased the incidence and severity PIA in AIRmax^{SS}, suggesting that this gene or another closed-linked gene interacts with inflammatory loci to modulate PIA. Pristane treatment induced intense infiltration of lymphocytes, monocytes/macrophages and neutrophils in AIRmax^{SS} animals. AIRmax^{SS} macrophages demonstrated exacerbated cellular and gene expression profiles during PIA, with higher expression/production of H₂O₂, NO, IL-1 β , IL-6, TNF- α and chemokines. However, *Slc11a1* *R* allele could be regulating macrophage activation intensity more efficiently than the *S* allele and control the development of arthritis. There was involvement of kidney, lung and thymus during PIA. Our data suggest that the *Slc11a1* gene modulates macrophage activation involved in PIA susceptibility and these lines represent a murine model of rheumatoid arthritis.

Keywords: Arthritis. *Slc11a1*. Macrophage. Cytokines. Inflammation. Pristane.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIR- Resposta Inflamatória Aguda
cDNA – DNA complementar
CCP – Peptídeo citrulinado cíclico
CHR - Cromossomo
CIA – *Collagen induced arthritis*
CSF - Fator estimulador de colônias
dsDNA – Ácido desoxirribonucleico de dupla fita
FITC – *Fluorescein Isothiocyanate*
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HSP – *Heat shock protein*
IFN- γ – Interferon gama
MCP-1 – Monocyte chemoattractant Protein-1
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1 α – *Macrophage Inhibitory protein - 1 α*
MMP – Metaloproteinase de matriz
NO – Óxido Nítrico
O₂⁻ - Ânion superóxido
PE – Ficoeritrina
PIA – Artrite induzida por pristane
qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa
QTL – *Quantitative Trait Loci*
RA – *Rheumatoid Arthritis*
RNA_m – RNA mensageiro
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
SLE – *Systemic Lupus Erythematosus*
TGF- β – Fator de crescimento tumoral
TNF- α – Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema usado para produção da população fundadora (F0) com o intercruzamento de oito linhagens isogênicas de camundongos, para a produção das linhagens AIRmax e AIRmin. Estão indicados os alelos R ou S do gene <i>Slc11a1</i> de cada linhagem isogênica.....	26
FIGURA 2. Sobrevida dos camundongos submetidos a PIA.....	42
FIGURA 3. Massa corpórea dos animais AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS} durante a PIA.....	44
FIGURA 4. Número total de células da cavidade peritoneal de AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS}	46
FIGURA 5. Contagem diferencial das células do peritônio dos camundongos AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS} após 2, 7, 14 e 180 dias da indução de artrite por pristane (PIA).....	48
FIGURA 6. Análise fenotípica das populações de células marcadas com F480 e CD11b após 2, 7, 14 e 180 dias do tratamento com pristane (PIA) em camundongos AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS}	50
FIGURA 7. Análise fenotípica das populações de células marcadas com Gr1 e CD11b após 2, 7, 14 e 180 dias do tratamento com pristane (PIA) em camundongos AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS}	52
FIGURA 8. Análise fenotípica das populações de células marcadas com CD19 e CD23 após 2, 7, 14 e 180 dias do tratamento com pristane (PIA) em camundongos AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS}	54
FIGURA 9. Análise fenotípica das populações de células marcadas com CD4 e CD8 após 2, 7, 14 e 180 dias do tratamento com pristane (PIA) em camundongos AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS}	56
FIGURA 10. Quantificação das citocinas no soro de animais AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS} após 7, 14 e 180 dias da indução de artrite por pristane.....	58
FIGURA 11. Produção de NO por macrófagos peritoneais de animais AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS}	60
FIGURA 12. Liberação de H ₂ O ₂ em macrófagos peritoneais de animais AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS}	62
FIGURA 13. Quantificação das citocinas presentes no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais de animais AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS} após 2, 14 e 180 dias da indução de artrite por pristane.....	64
FIGURA 14. Número de genes ativados e reprimidos nos macrófagos peritoneais AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS} PIA <i>versus</i> respectivos controles.....	67

FIGURA 15. Análise da expressão gênica de macrófagos peritoneais de AIRmax ^{RR} PIA versus AIRmax ^{RR} controle.....	68
FIGURA 16. Análise da expressão gênica de macrófagos peritoneais de AIRmax ^{SS} PIA versus AIRmax ^{SS} controle.....	70
FIGURA 17. Distribuição cromossômica dos genes modulados nos macrófagos peritoneais AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS} após PIA.....	72
FIGURA 18. Dosagem de albumina e creatinina no soro dos camundongos submetidos a PIA.....	74
FIGURA 19. Morfologia das patas dos camundongos AIRmax ^{SS} na fase crônica da PIA.....	77
FIGURA 20. Histopatologia das articulações da pata de camundongos submetidos a PIA.....	78
FIGURA 21. Fotomicrografia representativa do rim controle de camundongos AIRmax.....	80
FIGURA 22. Análise histopatológica do rim após indução de artrite por pristane (PIA).....	81
FIGURA 23. Análise morfológica dos órgãos dos camundongos AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS} na fase crônica da PIA.....	83
FIGURA 24. Histologia do timo de camundongos AIRmax ^{SS} submetidos a PIA.....	84
FIGURA 25. Histopatologia do pulmão de camundongos injetados com pristane.....	86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Autoimunidade	18
1.2 Artrite reumatoide	19
1.3 Modelos experimentais de artrite	23
1.4 Seleção genética de linhagens segundo a Reação Inflamatória Aguda	25
1.5 Gene <i>Slc11a1</i> , sublinhagens AIR e PIA	28
2 OBJETIVO GERAL	32
2.1 Objetivos específicos	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Camundongos	33
3.2 Indução e avaliação da artrite induzida por pristane	33
3.3 Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS}	33
3.3.1 <i>Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)</i>	34
3.3.2 <i>Quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	34
3.4 Análise fenotípica das células peritoneais por citometria de fluxo	35
3.5 Quantificação das citocinas pelo método Multiplex	35
3.6 Dosagem de albumina e creatinina	36
3.7 Análise da expressão gênica (qPCR)	36
3.7.1 <i>Extração de RNA</i>	36
3.7.2 <i>Obtenção do DNA complementar (cDNA)</i>	37
3.7.3 <i>Quantificação da expressão gênica das quimiocinas por PCR em Tempo Real</i>	38
3.8 Análise Histológica	40
3.9 Análise Estatística	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Curva de sobrevivência dos camundongos AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS} durante a PIA	41
4.2 Análise da massa corpórea dos camundongos AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS} durante a PIA	43
4.3 Caracterização das populações celulares do peritônio de camundongos AIRmax ^{RR} e AIRmax ^{SS} após indução de artrite por pristane	45
4.3.1 <i>Número total de células</i>	45
4.3.2 <i>Avaliação morfológica da população peritoneal</i>	47

4.3.3 Citometria de fluxo	49
4.3.3.1 Células <i>F4/80⁺CD11b⁺</i>	49
4.3.3.2 Células <i>Gr1⁺CD11b⁺</i>	51
4.3.3.3 Linfócitos <i>B (B1 e B2)</i>	53
4.3.3.4 Linfócitos <i>T (CD4 e CD8)</i>	55
4.4 Avaliação do perfil de citocinas do soro	57
4.5 Análise da ativação dos macrófagos peritoneais	59
4.5.1 Produção de óxido nítrico (<i>NO</i>).....	59
4.5.2 Liberação de peróxido de hidrogênio (<i>H₂O₂</i>).....	61
4.5.3 Perfil de citocinas do sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais.....	63
4.5.4 Análise de expressão gênica relativa – <i>PCR Array</i>	65
4.6 Avaliação da função renal através dos níveis albumina e creatinina	73
4.7 Caracterização dos efeitos locais e sistêmicos do pristane nos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}	75
4.7.1 Análise da articulação da pata.....	75
4.7.2 Análise do rim.....	79
4.7.3 Análise do timo.....	82
4.7.4 Análise do pulmão.....	85
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICE A – Pristane-induced arthritis loci interact with the <i>Slc11a1</i> gene to determine susceptibility in mice selected for high inflammation	115
APÊNDICE B – The effect of phosphoethanolamine intake on mortality and macrophage activity in mice with Solid Ehrlich Tumor	126

1 INTRODUÇÃO

1.1 Autoimunidade

A falha na tolerância ao próprio desencadeia a autoimunidade (ABBAS; LITCHTMAN; PILLAI, 2012). Os estudos referentes às doenças autoimunes tais como diabetes, artrite reumatoide (RA) e o lúpus eritematoso sistêmico (SLE) destacam as múltiplas interações genéticas e ambientais (GREGERSEN; BEHRENS, 2006).

Alguns dos principais fatores ambientais estão associados com a fase inicial do desenvolvimento da autoimunidade, por exemplo: os agentes infecciosos, vacinas, drogas, tabaco e estresse (AHARON MAOR; SHOENFELD, 1998; SARAUX et al., 1999; SHOENFELD, 1998, 2008).

Segundo Carvalho et al. (2009), os agentes infecciosos podem desencadear a autoimunidade por: 1-) mimetismo molecular: quando o agente infeccioso possui um epítipo estruturalmente similar ao antígeno próprio (PROAL; ALBERT; MARSHALL, 2013; ROSE; MACKAY, 2000; WUCHERPFENNING, 2001). 2-) Dispersão de epítopos: ocorre quando há ativação local exagerada de células apresentadoras de antígenos devido a inflamação gerando processamento excessivo de antígenos bem como a apresentação destes. Consequentemente, pode ativar um grande número de células T com ampla especificidade, desencadeando a autoimunidade. 3-) Efeito *bystander*: quando a produção elevada de citocinas, induzida por agentes infecciosos ou seus produtos, gera a expansão de células T autorreativas cujo número prévio/inicial é insuficiente para desencadear a doença (MURALI-KRISHNA et al., 1998).

Cohen e Shoenfeld (1996) descreveram que alguns dos adjuvantes que são usados em vacinas para aumentar a imunogenicidade podem desencadear doenças autoimunes em indivíduos suscetíveis. Corroborando esta hipótese, estudos com hidrocarbonetos adjuvantes (óleos minerais) em modelos animais descrevem a indução de lúpus e respectivas manifestações clínicas (por ex. artrite e nefrite) (CARVALHO; PEREIRA; SHOENFELD, 2009; SHOENFELD; ROSE, 2004).

As doenças autoimunes como RA, SLE, Esclerose múltipla, doença de Graves e doença de Chron também têm sido associadas com o tabaco. Algumas pesquisas reconhecem o tabagismo como um dos fatores de risco para o desenvolvimento da RA (CARVALHO; PEREIRA; SHOENFELD, 2009; COSTENBADER et al., 2006; STOLT et al., 2003; VESSEY et al., 1987). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o risco é maior em

homens quando comparado às mulheres e ainda, que a interação gene e ambiente pode ser responsável pelo aumento da severidade da RA em fumantes (incluindo a formação de nódulos reumatoides, aumento da destruição das cartilagens e da incidência de doença pulmonar e ainda, diminuição das habilidades funcionais) (MASDOTTIR et al., 2000; WOLF, 2000). A combinação tabagismo e inflamação pulmonar pode aumentar o número de peptídeos citrulinados no pulmão e subsequente a isso, gerar anticorpos contra estas proteínas citrulinadas (anti-CCP). Tal fenótipo ocorre preferencialmente em indivíduos fumantes portadores do genótipo HLA-DR β 1 (KAPITÁNY et al., 2008; KLARESKOG et al., 2006). Os alelos do gene HLA-DR β 1 do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) descritos como DRB*0401, DRB*0404 e DRB*0101 estão associados significativamente com a incidência de artrite reumatoide humana (FIRESTEIN, 2003; GREGERSEN; SILVER; WINCHESTER, 1987; KLARESKOG et al., 2006). Outros estudos sugerem que genes fora do MHC regulem a suscetibilidade a RA visto que o HLA-DRB é responsável por apenas uma parte da variabilidade fenotípica de origem genética (entre 30-50%) (DEIGHTON; WALKER, 1991).

Outro fator ambiental relacionado com a autoimunidade é o efeito do estresse sobre a resposta imune. Neste caso, os hormônios neuroendócrinos podem atuar como um “gatilho” durante o estresse, e assim desencadear a desregulação do sistema imune por alterar ou amplificar a produção de citocinas, resultando em doenças autoimunes. Vários tipos de transmissores neuroendócrinos podem iniciar a autoimunidade, incluindo: epinefrina, norepinefrina, acetilcolina, substância P, peptídeos vasoativos intestinais, glucagon, insulina, citocinas, fatores de crescimento, dentre outras substâncias. O estresse físico ou psicológico além de ser um fator participante, também pode ser a causa para a exacerbação da doença criando um círculo vicioso (SHOENFELD et al., 2008).

A interação dos diversos fatores genéticos, ambientais e hormonais durante a patogênese pode sobrepor a etiologia da autoimunidade dificultando a compreensão dos mecanismos que geram a quebra da tolerância do sistema imune. A interação complexa desses fatores é denominada “Mosaico da Autoimunidade” (CARVALHO; PEREIRA; SHOENFELD, 2009; AMITAL; GERSHWIN; SHOENFELD, 2006).

1.2 Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide é uma doença autoimune caracterizada pela inflamação crônica das articulações e subsequente destruição da cartilagem e dos ossos. A articulação é

constituída por superfícies ósseas, recobertas pela cartilagem articular, ligamentos e membrana sinovial (cápsula fibrosa). A cápsula delimita a cavidade preenchida pelo líquido sinovial. A membrana sinovial é constituída por sinoviócitos do tipo A (macrófagos sinoviais) e do tipo B (fibroblastos sinoviais), além de vasos sanguíneos e nervos sensoriais. Já a cartilagem articular é composta por matriz extracelular (colágenos, proteoglicanos e ácido hialurônico) (MARTEL-PELLETIER; WELSCH; PELLETIER, 2001) e pelos condrócitos (NAGASE; KASHIWAGI, 2003). Cerca de 40% do infiltrado celular sinovial quer como infiltrado difuso ou em folículos discretos são constituídos por células T. Os fibroblastos sinoviais ativados na artrite influenciam o acúmulo e a sobrevivência de linfócitos na membrana sinovial (PAP et al., 2000). Estes fibroblastos funcionam como fontes importantes de IL-6 que são quimioatraentes para células TCD4⁺ (FRANZ et al., 1998). Outros tipos celulares estão presentes como as células dendríticas sinoviais que são potentes ativadores de células T e NK. Na artrite experimental, células dendríticas geneticamente manipuladas têm sido usadas na imunoterapia desta patologia (MORITA et al., 2005).

A intensa degradação do colágeno é um processo irreversível e contribui para a perda da função articular na artrite reumatoide (MORT; BILLINGTON, 2001). As células sinoviais e os condrócitos durante o desenvolvimento da artrite produzem quantidades elevadas de metaloproteases de matriz extracelular as quais destroem o tecido conectivo (FIRESTEIN; PAINE; LITTMAN, 1991; MCCACHREN, 1991). Consequentemente, ocorre a formação do *pannus*, devido à proliferação de fibroblastos sinoviais, macrófagos e infiltração de outras células inflamatórias em resposta as citocinas secretadas na cápsula articular culminando no aumento da expressão de metaloproteínases de matriz (do inglês: Matrix metalloproteinases, MMPs) tais como as collagenases, gelatinases e estromelisinases, amplificando o processo artrítico (CHOY; PANAYAI, 2001; LI; HSU; MOUNTZ et al., 2012; YIN et al., 2002).

Segundo Varghese (2006), as MMPs pertencem a uma família de enzimas proteolíticas dependentes de zinco que tem a habilidade em degradar a maioria das proteínas de matriz extracelular. As MMPs podem atuar sobre várias proteínas, que não são de matriz, incluindo: citocinas, quimiocinas, receptores e peptídeos antimicrobianos. Após a proteólise, as MMPs liberam fragmentos de proteínas de matriz que podem atuar como quimioatraentes para células presentes em outros sítios (PARKS; LÓPEZ-BOADO; WILSON, 2001). As metaloproteases são divididas em grupos: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases (MMP-2, MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11, MMP-12), e MMPs associadas à membrana (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, também denominadas MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-17) (VAN DER LANN et al.,

2000). Em condições normais, os níveis basais de MMPs produzidos são baixos. No entanto, a superexpressão de MMPs está relacionada à patogênese de várias doenças, tais como neuroinflamação, arterioesclerose, câncer, artrites, doenças periodontais e outras (VARGHESE et al., 2006).

Os mediadores inflamatórios e as células têm participação fundamental na modulação da RA. O TNF- α é uma glicoproteína da membrana celular de 26 kDa e representa um importante mediador pró-inflamatório expresso em níveis elevados na sinóvia inflamada (BRADLEY, 2008; PENNICA et al., 1984; VASSALI, 1992; YIN et al., 2002). Esta citocina pode ativar neutrófilos, diferenciar leucócitos mononucleares e atuar na migração celular (LO et al., 1992). O TNF- α também induz a produção de MMPs endógenas, como as gelatinases (PARTRIDGE; JEFFREY; MALIK, 1993) que promovem a degradação de componentes extracelulares específicos e amplificam a reação inicial da artrite. O TNF- α é uma das citocinas liberadas pela adamlisina TACE também conhecida com ADAM17 (BLOBEL, 1997; MOSS et al., 1997). ADAM 10, 12 e TACE são ativadas em resposta aos reativos de oxigênio e também podem ativar pró-formas latentes de outras metaloproteases, além de induzir apoptose (FISHER et al., 2004; FU et al., 2001; SAARI et al., 1990). Nos tecidos as MMPs são inibidas pelos TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*). Apesar do aumento da expressão de TIMPs na artrite reumatoide, a degradação proteolítica na cartilagem articular ainda ocorre, sugerindo um desequilíbrio entre a atividade da MMP e do TIMP a favor da metaloprotease (NAWROCKI et al., 1994; TAKIZAWA et al., 2000).

Os macrófagos estão envolvidos em diversas fases da resposta inflamatória. Dentre suas funções está a ligação da imunidade inata com a imunidade adaptativa. Estes fagócitos são capazes de fagocitar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T (VILACRES-ERIKSON, 1995); os macrófagos também atuam na remoção de células apoptóticas (ADEREM e UNDERHILL, 1999); resolução de processos inflamatórios (LEIBOVICH e ROSS, 1975); angiogênese (POLVERINI et al., 1977); reparo e remodelamento tissular (WERB; GORDON, 1975). A superexpressão de moléculas de MHC-classe II, citocinas pró-inflamatórias ou regulatórias (IL-1, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-18, TNF- α), fatores de crescimento (GM-CSF, IL-3), quimiocinas (IL-8, MIP-1 e MCP-1), metaloproteinases (BRESNIHAN, 1999; BURMESTER et al., 1997) são característicos de macrófagos ativados e estes têm grande participação nas fases aguda e crônica da artrite reumatoide (LI; HSU; MOUNTZ et al., 2012).

No processo artrítico a presença de macrófagos sinoviais representa uma importante fonte de Óxido Nítrico (NO) e de espécie reativas de oxigênio (ROS) (MCINNES et al., 1996;

MIESEL; MURPHY; KRÖGER, 1996). Com base no padrão de ativação, os macrófagos podem ser classificados em M1 e M2 de acordo com a sua função (BISWAS; MANTOVANI, 2010). Assim, macrófagos M1 provenientes de linhagens que exibem padrão Th1 de resposta (C57Bl/6 e B10A) são caracterizados pela produção de NO em resposta ao LPS ou IFN- γ exógeno (MILLS et al., 2000). Os M1 são produtores eficientes de moléculas efetoras (reativos de oxigênio e intermediários de nitrogênio) e citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF, IL-6); proporcionam resistência contra parasitas intracelulares e tumores (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2007). Os macrófagos descritos como M2 participam da polarização de respostas Th2; promovem a morte e a encapsulação de parasitas (NOEL et al., 2004); são ativados quando expostos à IL-4, IL-13, imunocomplexos, IL-10, glicocorticóides, vitamina D3 (MANTOVANI et al., 2004); possuem altos níveis de receptores *scavenger*, manose e do tipo galactose (MANTOVANI; SICA; LOCATTI, 2007); estão presentes no reparo tecidual e no remodelamento (LI; HSU; MOUNTZ et al., 2012; WYNN, 2004). Os macrófagos M2 produzem níveis elevados de TGF- β 1. O padrão de ativação assumido por esses macrófagos é independente de linfócitos T ou B, uma vez que os macrófagos de camundongos C57Bl/6 e BALB/c com padrões de resposta Th1 e Th2, respectivamente e animais NUDE ou SCID apresentaram a mesma polarização (MILLS et al., 2000). Fato que sugere a importância das citocinas produzidas por essas células na regulação de suas funções.

Os macrófagos podem ser ativados para defesa ou reparo tecidual (ALBINA; ABATE; MASTROFRANCESCO, 1993; LI; HSU; MOUNTZ et al., 2012). A via óxido nítrico sintase induzível (iNOS), produz NO e citrulina (via destrutiva) usando a arginina como substrato. Esta via está relacionada com a defesa (ADAMS; HAMILTON, 1984; NATHAN; HIBBS, 1991). A via arginase, produz ornitina e uréia (via construtiva) e está envolvida com a cicatrização (CANELLAKIS, 1979; NATHAN; HIBBS, 1991; WILLIAMS-ASHMAN; CANELLARIS, 1979; WU; MORRIS, 1998). O excesso de NO inibe a replicação celular e impede o reparo. Já a ornitina promove estes processos visto que, é um precursor das poliaminas e do colágeno (ALBINA; ABATE; MASTROFRANCESCO, 1993; NATHAN; HIBBS, 1991; WU; MORRIS, 1998).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre de vida curta sintetizado a partir da L-arginina pelas NO sintases (NOS) (NATHAN et al., 1992; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). Este mediador inflamatório é produzido nas articulações devido à ação das iNOS em macrófagos, fibroblastos sinoviais, osteoblastos e condrócitos, por influência de endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias tais como IL1 e TNF α , contribuindo com a amplificação do processo artrítico. (GRABOWSKI; MACPHERSON; RALSTON, 1996; PACHER;

BECKMAN; LIAUDET, 2007; STEFANOVIC et al., 1994). Neste contexto, Sakurai et al. (1995) demonstraram que a combinação de IL1 β , TNF α e LPS aumenta a produção de NO por sinoviócitos e condrócitos isolados na artrite reumatoide. Estudos com animais *knockout* para iNOS mostraram que estes são resistentes a artrite induzida por colágeno (CUZZOCREA et al., 2002; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). Em humanos, níveis elevados de nitrato/nitrito circulantes (FARREL et al., 1992), expressão exacerbada de iNOS nos tecidos sinoviais (MCINNES et al., 1996; SAKURAI et al., 1995) e quantidades anormais de NO foram encontradas em pacientes artríticos (CONNOR et al., 1995).

1.3 Modelos experimentais de artrite

Os modelos experimentais são ferramentas importantes na tentativa de esclarecer os “gatilhos” para o desenvolvimento de doenças autoimunes humanas, como a artrite reumatoide. Tais modelos propiciam o entendimento dos mecanismos das doenças e possíveis estratégias terapêuticas (KOBZDA et al., 2014; WOOLEY et al., 1991).

Experimentalmente, a artrite pode ser induzida por adjuvantes (LIU et al., 2009; ROVENSKY et al., 2009), por colágeno tipo II (JEONG et al., 2009), proteoglicanos, pristane (óleo mineral) (PETERS et al., 2007; POTTER; WAX, 1981), por antígenos, que consistem em uma reação intra-articular à injeção de um antígeno (p.ex.: ovalbumina metilada) ao qual o animal é previamente sensibilizado (YAMAKI et al., 2007), agentes infecciosos (p.ex.: Mycoplasma, parede de estreptococos) (HAKKARAINEN et al., 1992; JORDAN et al., 1981) e por *zymosan* (BEZERRA et al., 2004; KEYSTONE et al., 1977). Além destes modelos, existem camundongos que apresentam uma mutação pontual em um único gene, chamado ZAP70, que desencadeia a artrite crônica espontaneamente (SAKAGUCHI et al., 2003).

As citocinas TNF α , IL1 β e IL-6 são expressas na fase inicial e parecem ser importantes para o desencadeamento de diversas doenças inflamatórias. As citocinas IL-6 e IL1 β são responsáveis por direcionar o desenvolvimento da artrite induzida por antígenos (AIA) e também, da artrite induzida por adjuvante (AA) (*Mycobacterium butyricum* em suspensão de óleo mineral) (POHLERS et al., 2005; SIMON et al., 2001; SZEKANECZ et al., 2000). Alonzi e colaboradores (1998) comprovaram, em camundongos Il6 *knockouts*, que a citocina IL-6 é primordial na fase inicial da artrite induzida por colágeno (AIC). O modelo de camundongos K/BxN, transgênicos para o receptor de célula T e molécula de classe II do MHC A(g7), que desenvolvem artrite inflamatória severa, é caracterizado pela presença de células B, T, anticorpos que reconhecem glicose-6-fosfato isomerase (GPI) e deposição de

imunocomplexos nas articulações sendo regulado principalmente pela citocina IL1 (MANGIALAIO et al., 1999). Já os camundongos que possuem uma mutação pontual no gene Zap-70 (*Zap-70 Mutation Model* ou SKG) cujo produto é uma molécula chave na transdução de sinal em células T, que resulta numa alteração no limiar da seleção tímica, com seleção positiva de células T autoimunes apresentam artrite crônica. A incidência e severidade da RA nestes animais são reduzidas significativamente após a deleção dos genes *Tnf*, *Il1*, ou *Il6*. Este último, em particular é crucial para o início da fase crônica visto que sua deleção impede o processo de erosão da artrite neste modelo (FERRACCIOLI et al., 2010).

O modelo de artrite induzida por pristane (PIA – *Pristane-induced arthritis*) caracteriza-se por uma doença inflamatória crônica, tardia e com uma progressão que varia de 60 a 200 dias de acordo com a linhagem utilizada (PATTEN et al., 2004; POTTER; WAX, 1981; WOOLEY et al., 1989). Este modelo é caracterizado pela presença de células TCD4⁺, células B, fator reumatoide, anticorpos anti-dsDNA (*Double strand DNA*), Hsp (*Heat shock protein*) e anticorpos contra colágeno (MORGAN et al., 2004; STASIUK et al., 1997; THOMPSON et al., 1990; WOOLEY et al., 1989). Na PIA, a inflamação e a destruição das articulações assemelham-se às encontradas na RA humana. As características histológicas principais são hiperplasia sinovial, erosão da cartilagem, e formação de *pannus* (BEDWELL, ELSON; HINTON, 1987; HOPKINS; FREEMONT; JAYSON, 1984; PATTEN et al., 2004; WOOLEY et al., 1989). Estas características são observadas em linhagens de camundongos BALB/cJ e DBA/1 dias após a injeção de pristane (POTTER; WAX, 1981; WOOLEY et al., 1989).

Inicialmente, o óleo mineral pristane (2,6,10, 14-tetrametilpentadecano) foi utilizado para a indução de plasmocitomas na cavidade peritoneal de camundongos, porém foi observado que aproximadamente 20% dos camundongos BALB/cAn e 70% de BALB/cJ desenvolveram artrite após 4 meses ou mais da injeção intraperitoneal de pristane (POTTER; WAX, 1981). Uma das hipóteses sobre o mecanismo de ação do pristane na artrite foi elaborada por Thompson e colaboradores (1990). Estes autores sugerem que, como o óleo mineral pristane persiste na cavidade peritoneal poderia promover a apresentação repetida de autoantígenos por um longo período de tempo. Assim, a presença do pristane no peritônio causaria uma lesão seguida de aumento de permeabilidade vascular no intestino expondo antígenos bacterianos da microbiota para cavidade peritoneal, ativando ainda mais o sistema imune. Esse processo poderia ocasionar o desenvolvimento de anticorpos anti-hsp65 (de 65kDa) bacteriano culminando na autoimunidade (BARKER; WELLS, 1996). Thompson e Elson (1993) mostraram que linhagens suscetíveis à PIA (camundongos DBA/1), quando

mantidos em condições livres de patógenos específicos (SPF), são resistentes à artrite desencadeada pelo óleo mineral. Entretanto, quando esses animais são transferidos para o ambiente convencional tem a suscetibilidade a artrite restaurada demonstrando o papel da microbiota na PIA (PROAL; ALBERT; MARSHALL, 2013).

O modelo de PIA em camundongos pode compartilhar algumas manifestações clínicas com o lúpus, que incluem artrite, glomerulonefrite mediada por imunocomplexos e lesão pulmonar. Em geral, a artrite ligada ao lúpus não é erosiva embora alguns casos não respeitem esta regra.

O pristane é um hidrocarboneto encontrado em quantidades pequenas em várias plantas, organismos marinhos (algas), no óleo bruto e também é um constituinte comum do óleo mineral refinado a partir do petróleo. Os hidrocarbonetos podem induzir inflamação e aumentar a resposta imunológica, principalmente aqueles com cadeia de ~12 carbonos. Essas propriedades têm sido aplicadas no desenvolvimento de vacinas, em que os óleos hidrocarbonetos são comumente incorporados como adjuvantes potentes para aumentar a resposta à imunização (EHRICH et al., 1945; REEVES et al., 2009; WILNER et al., 1963). Estudos epidemiológicos sugerem que a exposição ocupacional ao óleo mineral ou aos resíduos de petróleo está associada com a incidência de artrite reumatoide e, possivelmente ao lúpus em humanos (DAHLGREN et al., 2007; REEVES et al., 2009; SVERDUP et al., 2005). Questiona-se que alguns hidrocarbonetos que possuem propriedades adjuvantes poderiam estimular doenças inflamatórias ou autoimunes em humanos e animais. Em humanos, a penetração cutânea acidental desses óleos hidrocarbonetos ocasiona uma reação inflamatória intensa, frequentemente com necrose na pele, perda permanente da função articular da mão, havendo às vezes necessidade de amputação dos dedos afetados (VALENTINO; RAPISARDA; FENGA, 2003). A aspiração de óleo mineral pode causar “pneumonia lipóide” (SPICKARD, 1994) caracterizada por lesão inflamatória pulmonar que se assemelha com a estrutura dos lipogranulomas murinos; a ingestão de óleo mineral induz lesões similares nos linfonodos e na parede de vênulas hepáticas em fígados humanos (DINCISOY; WEESNER; MACGEE, 1982). Desta forma, novos estudos são necessários sobre os mecanismos de ação dos hidrocarbonetos no desenvolvimento de doenças autoimunes em humanos.

1.4 Seleção genética de linhagens segundo a Reação Inflamatória Aguda

Para estudar os mecanismos genéticos que controlam a intensidade da resposta inflamatória aguda, linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para máxima

(AIRmax) ou mínima (AIRmin) reatividade inflamatória aguda (*AIR - acute inflammatory reaction*) foram produzidas no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan (IBANÉZ et al., 1992) em colaboração com o Instituto Curie de Paris.

O processo de seleção das linhagens de máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) resposta inflamatória aguda teve como população de origem os descendentes de cruzamentos entre 8 linhagens isogênicas distintas (A/J, DBA/2J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/cJ e C57BL/6J), para realizar uma seleção bidirecional com um fundo genético conhecido (**Figura 1**). A seleção genética bidirecional é um método poderoso, pois permite concentrar nas linhagens obtidas muitas variantes alélicas nos diversos *loci* que estão implicados na variação fenotípica de interesse.

Figura 1. Esquema usado para produção da população fundadora (F0) com o inter cruzamento de oito linhagens isogênicas de camundongos, para produção das linhagens AIRmax e AIRmin. Estão indicados os alelos R ou S do gene *Slc11a1* de cada linhagem isogênica.

(FONTE: CANHAMERO et al., 2014)

A população gerada (F0) apresentava uma heterogeneidade genética alta, sendo que cada indivíduo apresentava uma mistura do *pool* gênico de cada uma das oito linhagens isogênicas parentais (STIFFEL et al., 1990).

A população F0 foi submetida ao estímulo inflamatório pela injeção subcutânea de Biogel P100 (microesferas de poliacrilamida insolúveis, não imunogênicas e não biodegradáveis). A intensidade de inflamação foi avaliada pela concentração de células e proteínas no exsudato inflamatório local colhido 24 horas após. Obteve-se uma grande variação nas respostas individuais que obedeceram uma distribuição normal de frequências para os dois fenótipos. Inicialmente no processo seletivo, os acasalamentos foram realizados com base no valor fenotípico individual diante dos parâmetros estudados, selecionando os animais com valores fenotípicos situados nos extremos da curva de Gauss. Assim, para a produção da linhagem AIRmax foram selecionados os animais que apresentaram altos níveis de celularidade e proteínas, enquanto para a produção da linhagem AIRmin foram selecionados para os respectivos acasalamentos, animais com níveis baixos de celularidade e proteínas. Para minimizar a consaguinidade da colônia não foram realizados acasalamentos entre irmãos e primos (IBAÑEZ et al., 1992; RIBEIRO, 1994).

O procedimento foi repetido em gerações consecutivas e após 20 gerações admitiu-se ter atingido o limite de Seleção, quando, teoricamente, os alelos dos genes envolvidos na determinação dos fenótipos de alta ou baixa resposta inflamatória estariam fixados em homozigose em cada linhagem, porém mantendo-se um *background* heterogêneo (BIOZZI et al., 1998; IBAÑEZ et al., 1992). Por métodos de análise genética quantitativa foi estimada a possível participação de 7 a 11 *loci* gênicos ou QTL (*Quantitative trait loci*) na determinação do caráter selecionador.

Ribeiro et al. (2003) observaram que a diferença de intensidade da resposta inflamatória aguda entre os animais da linhagem AIRmax e AIRmin era resultante de elementos convergentes durante o processo de Seleção Genética Bidirecional. A linhagem AIRmax diverge dos AIRmin devido a: - a) maior produção de neutrófilos na medula óssea; b) maior produção de fatores quimiotáticos nos exsudatos inflamatórios locais (C3a, C5a, MIP-2, proteína 14 induzível de fator de crescimento de fibroblasto, proteína precursora de linfotaxia); c) resistência diferenciada à apoptose espontânea dos neutrófilos extravasados no sítio inflamatório.

A diferença fenotípica interlinhagens não está limitada à resposta inflamatória ocasionada pelo Biogel, mas também a outros agentes flogísticos como a carragenina, zymosan (VASQUEZ-BRAVO, 1996), infecção (ARAÚJO et al., 1998), ao veneno de *Bothrops jararaca* (CARNEIRO et al., 2002); à uretana (DE FRANCO et al., 2010) e ao 7-12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)/ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (GALVAN et al., 2010).

As alterações genéticas decorrentes do processo seletivo interferiram também na resistência ou suscetibilidade destas linhagens a doenças autoimunes (DE FRANCO et al., 2014; SANTOS-JÚNIOR et al., 2005; VIGAR et al., 2000); tumorais (BIOZZI et al., 1998; DE FRANCO et al., 2010; DE SOUZA et al., 2008; DI PACE et al., 2006; GALVAN et al., 2010; ; JENSEN et al., 2013; MARIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005), infecciosas (ARAÚJO et al., 1998) e na regeneração tecidual (DE FRANCO et al., 2007) e no prejuízo da mielopoiese (KATZ et al., 2014).

1.5 Gene *Slc11a1*, sublinhagens AIR e PIA

O gene *Nramp1* (*natural resistance-associated macrophage protein 1*) codifica uma proteína integral de membrana altamente hidrofóbica com ~ 80-100 kDa com 12 domínios transmembrânicos (VIDAL et al., 1993). Na literatura, o gene *Nramp1* também é encontrado com a denominação *Slc11a1* “*Solute Carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1*”. Pertence a uma família de proteínas conservadas existentes desde bactérias a humanos. Estudos demonstraram que o gene *Slc11a1* é altamente expresso em fagócitos profissionais humanos e de camundongos (GOVONI et al., 1997; VIDAL et al., 1993). Nos tecidos de camundongos, o RNAm do *Slc11a1* é detectado exclusivamente no baço e fígado (VIDAL et al., 1993). Em outro estudo, com macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 foi observado que a expressão do gene nestas células poderia ser aumentada por meio da exposição à LPS e IFN- γ , bem como a outros estímulos inflamatórios (GOVONI et al., 1997). Em humanos, a expressão do gene *Slc11a1* foi detectada nos pulmões, fígado, baço e de forma abundante nos leucócitos do sangue periférico (CELLIER; BELOUCHI; GROS, 1997).

Mutações no *Slc11a1* têm um forte efeito sobre a taxa de crescimento de microrganismos durante a infecção por *L. donovani*, de algumas espécies de *Mycobacterium* (*M. bovis*, *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. lepraemurium* e *S. Typhimurium*) (VIDAL et al., 1995). Em camundongos, a suscetibilidade a infecções está associada à substituição do aminoácido glicina por ácido aspártico na posição 169, causada por uma mutação pontual na região codificadora do quarto domínio transmembrânico do gene. Portanto, o alelo normal (R) do gene *Slc11a1* produz uma proteína funcional na membrana do fagolisossomo, enquanto o alelo mutado (S) produz uma proteína não funcional (MALO; SKAMENE, 1994; VIDAL et al., 1995). Sugere-se que o *Slc11a1* regula a replicação de parasitas intracelulares por alterar o microambiente do fagolisossomo.

Uma das hipóteses seria que a proteína *Slc11a1* retira os cátions de Fe^{+2} das hemácias senescentes fagocitadas, do fagolisossomo para o citoplasma do macrófago (ATKINSON; BARTON, 1999). Um efeito direto deste transporte está relacionado com a resistência à infecção em que o macrófago que possui o alelo normal do gene *Slc11a1* (*Slc11a1^R*) realizaria o transporte eficiente de íons para fora do fagolisossomo sem disponibilizar cátions essenciais para o crescimento (como Fe^{+2}) e para o metabolismo bacteriano (como Zn^{+2} e Mn^{+2}) (ATKINSON e BARTON, 1999; CELLIER; BELOUCHI; GROS, 1996; CROSA et al., 1997; GOMES; APPELBERG, 1998). Outra hipótese propõe que a proteína normal transportaria o ferro para o interior do fagolisossomo, favorecendo a reação de Fenton/Harber-Weiss, que gera radicais hidroxila altamente tóxicos para a bactéria (KHUN et al., 2001).

Em 1998, Araújo e colaboradores observaram durante os estudos de infecção por *Salmonella Typhimurium* realizados nas linhagens da Seleção de Inflamação, um desvio de frequência do alelo S do gene *Slc11a1*, de 25% na população inicial (F0) para 60% nos animais AIRmin e apenas 9% nos AIRmax. Dessa forma, foi sugerido que o desvio tenha ocorrido devido ao processo seletivo e que o gene *Slc11a1* ou algum outro gene muito próximo a ele poderia ser um dos QTL envolvidos na regulação da intensidade da reação inflamatória aguda.

No intuito de caracterizar as linhagens bem como de investigar se os *loci* que regulam a Resposta inflamatória aguda estariam envolvidos com a autoimunidade, as linhagens AIRmax e AIRmin foram submetidas ao protocolo de indução de artrite por pristane (VIGAR et al., 2000).

Vigar et al. (2000) observaram que a incidência de artrite induzida por pristane nos animais AIRmax era de 50% aos 120 dias, atingindo 65% dos animais aos 200 dias de indução; já nos camundongos AIRmin a incidência era de 7% aos 180 dias demonstrando que esta linhagem era resistente à PIA. Estes autores ainda observaram que o haplótipo de resistência à artrite induzida por pristane em camundongos isogênicos (HESSE; BAYRAK; MITCHISON, 1996) descrito com H-2^b do MHC era expresso predominantemente na linhagem AIRmax enquanto que o haplótipo de suscetibilidade H2q e H-2d descritos como permissivos à PIA (WOOLEY, 1989) estavam presentes nos camundongos AIRmin. Tais resultados associados ao trabalho de Araújo et al. (1998) indicaram a participação de *loci* fora do MHC no desenvolvimento da artrite experimental sugerindo que a região onde está o gene *Slc11a1* poderia ser um destes *loci*.

Peters et al. (2007) observaram nos animais AIRmax submetidos à artrite induzida por pristane (PIA) um desequilíbrio nos alelos, sendo a frequência do alelo S nos animais

AIRmax suscetíveis de 71%, enquanto todos os animais AIRmax resistentes à artrite experimental eram homozigotos para o alelo R do gene *Slc11a1*. Sugeriram assim a participação deste gene na modulação da PIA, com o alelo R determinando a resistência enquanto o alelo S do gene *Slc11a1* condicionaria a maior suscetibilidade da linhagem AIRmax^{SS}.

A herança conjunta das características de grau de inflamação e de desenvolvimento de artrite pode indicar, portanto que a seleção das linhagens AIRmax e AIRmin, com base na intensidade da resposta inflamatória aguda, segregou também genes que interferem na suscetibilidade à artrite. Assim, estes camundongos representam um modelo original e adequado para identificar a possível modulação induzida pelo gene *Slc11a1* neste fenótipo.

Para investigar a participação do gene *Slc11a1* como um possível QTL regulador da intensidade da resposta inflamatória aguda e o seu efeito modulador no desenvolvimento da PIA foram produzidas quatro sublinhagens de camundongos homozigotas para os alelos de R e S deste gene (AIRmax^{RR}; AIRmax^{SS}; AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}). Estes animais foram obtidos por meio de cruzamentos assistidos por genotipagem a partir das linhagens AIRmax e AIRmin selecionadas (PETERS et al., 2007). A resposta inflamatória dos animais AIRmax^{RR} foi superior à dos AIRmax^{SS}, entretanto a diferença com os AIRmin foi mantida, bem como a heterogeneidade do *background* genético (BORREGO et al., 2006; PETERS et al., 2007).

Peters et al. (2007) submeteram as sublinhagens AIR homozigotas para os alelos do gene *Slc11a1* ao protocolo de artrite induzida por pristane. Eles observaram no fenótipo de incidência que, 29,4% dos animais AIRmax^{RR} desenvolveram artrite aos 150 dias, enquanto 70,6% dos AIRmax^{SS} desenvolveram PIA aos 180 dias. Os AIRmin^{RR} mostraram-se totalmente resistentes, enquanto 13,3% dos animais AIRmin^{SS} desenvolveram artrite somente aos 210 dias de avaliação. O *score* médio de gravidade de artrite nos AIRmax^{SS} foi duas vezes maior que o dos AIRmax^{RR}. Peters (2009) identificou um grande número de genes diferencialmente expressos na pata dos camundongos AIRmax^{SS} envolvidos com a resposta inflamatória e quimiotaxia (*Ccl3*, *Ccl7*, *C3ar1*, *Il10*, *Stat3*, *Tirap*, *Trem1*, *Trem3*, *Mefv*, *Ptx3*, *Chi3l3* e *Kras*). Os resultados demonstraram a participação do gene *Slc11a1* na modulação da artrite experimental em camundongos da Seleção de Inflamação, sugerindo que a região cromossômica onde está localizado o gene *Slc11a1* no cromossomo 1 seja uma região reguladora da resposta inflamatória aguda e da suscetibilidade à artrite induzida por pristane.

Amano et al. (2009) observaram que o soro de animais AIRmax^{RR} não apresentava atividade hemolítica dependente de complemento devido a ausência do componente C5. Os pesquisadores confirmaram que esta deficiência observada nos AIRmax^{RR} era decorrente da

mesma mutação, previamente descrita por Westsel et al. (1990, 1991) em linhagens deficientes de C5 (A/J, AKR, DBA2, NZB/B1N, SWR and B10.D2/oSnJ.). Esta mutação ocorre devido a deleção de 2 pares de base no exon 7 do gene *Hc* que codifica um produto não funcional (~210 aminoácidos) o qual é degradado rapidamente via intracelular. Três das oito linhagens isogênicas utilizadas na geração da população inicial (F0) para selecionar AIRmax e AIRmin são deficientes de C5 (A/J, SWR/J e DBA2/J) e as outras linhagens apresentam o componente C5 (BALB/c, C57BL/6, CBA, SJL and P). O grau de incidência/severidade baixos de artrite observados em animais AIRmax que carregam o alelo R em homozigose pode ser em parte devido à ausência do componente C5 do sistema complemento nestes animais.

O fenótipo de regeneração tecidual nestas sublinhagens foi investigado pelo nosso grupo e observou-se que este processo é mais rápido em animais AIRmax^{SS} quando comparado aos AIRmax^{RR}. Este fato sugere que o alelo *S* é capaz de modular os eventos iniciais da inflamação e favorecer a restauração do tecido (CANHAMERO et al., 2010 e 2014).

O modelo de camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} tem sido empregado em estudos de interferência da imunidade inata na defesa natural contra infecções, doenças autoimunes e desenvolvimento de tumores. Como descrito acima, foram encontradas diferenças importantes entre as linhagens na suscetibilidade a artrite induzida por pristane. Os camundongos AIRmax^{RR} são mais resistentes e os AIRmax^{SS} são muito suscetíveis a PIA, fenótipo herdado conjuntamente aos do potencial de resposta inflamatória. Estas duas linhagens constituem, portanto, modelo original que possibilita estabelecer uma relação entre a genética da resposta inflamatória e a suscetibilidade a artrite reumatoide, demonstrando a importância do polimorfismo do gene *Slc11a1*.

A nossa hipótese no presente trabalho é que a interação do alelo *S* do gene *Slc11a1* com o fundo genético AIRmax pode favorecer uma resposta inflamatória crônica, enquanto na presença do alelo *R* predomine uma resposta aguda. Para testar essa hipótese, realizamos a caracterização da resposta imune de camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} durante a PIA, com ênfase no perfil de ativação dos macrófagos, visto que a proteína SLC11a1 está presente na membrana do fagolisossomo destes fagócitos.

2 OBJETIVO GERAL

Estudar a influência dos alelos do gene *Slc11a1* na resposta imune das sublinhagens de alta reatividade inflamatória (AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}) na artrite induzida por pristane.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotipicamente as populações celulares presentes na cavidade peritoneal no curso da PIA;
- Analisar comparativamente nas duas sublinhagens a ativação de macrófagos por meio do perfil de expressão gênica e proteica de citocinas e quimiocinas, e da produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio;
- Caracterizar a resposta inflamatória local (patas) e sistêmica (soro, rim, pulmão, timo, baço e linfonodos poplíteos) na fase crônica da PIA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas (2 a 4 meses de idade) das sublinhagens da Seleção de Inflamação, homozigotos para os alelos R e S do gene *Slc11a1* (AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}), produzidos por meio de cruzamentos assistidos por genotipagem das linhagens AIRmax. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (21/10) e pela Comissão de Ética no Uso de animais do Instituto Butantan (CEUAIB) (701/10).

3.2 Indução e avaliação da artrite induzida por pristane

Os animais receberam duas injeções via intraperitoneal (i.p.) de 0,5 mL de pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane – Sigma Chemical Co., EUA) com intervalo de 60 dias. Estes animais foram avaliados 2, 7, 14 e 180 dias após a indução de artrite por pristane (PIA). Os animais artríticos também foram avaliados quanto à gravidade da doença por avaliação visual e atribuição de *score*. O *score* da artrite foi determinado de 0 a 3 para cada pata (**0** = normal; **1** = leve inchaço, vermelhidão; **2** = inchaço edematoso pronunciado, vermelhidão; **3** = inchaço grave, vermelhidão e rigidez nas articulações). O *score* máximo possível é 12 para cada animal (DE FRANCO et al., 2014; JENSEN et al., 2006; PETERS et al., 2007).

3.3 Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}

A cavidade peritoneal dos camundongos (AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}) foi lavada com 5 mL de meio RPMI estéril após o estímulo com pristane em diferentes períodos (2, 7, 14 e 180 dias). A suspensão de células foi lavada com 5 mL de PBS por duas vezes para remoção do excesso de óleo pristane e ressuspensa em meio RPMI 1640 suplementado (10% de soro fetal bovino, 0,2 mM L-glutamina, 10 µg/mL gentamicina). As células foram ajustadas na concentração adequada de acordo com os protocolos dos ensaios celulares (quantificação da liberação de H₂O₂, produção de óxido nítrico e citometria de fluxo).

Alíquotas das suspensões foram utilizadas na preparação de lâminas para a determinação das subpopulações celulares presentes no peritônio. Para tanto, lâminas com a concentração de 5×10^4 células/mL foram submetidas à citocentrifugação (80 g) por 5 minutos e coradas com Panótipo. Foram analisadas 200 células e determinada a porcentagem de cada população celular.

3.3.1 Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)

A quantificação do óxido nítrico (NO) foi realizada de acordo com Reação Colorimétrica de Griess. Alíquotas de 100 μ L da suspensão de células peritoneais (1×10^7 células/mL) foram semeadas em uma placa de 96 poços, fundo chato e incubadas por 2 h à 37 °C e 5% de CO₂. Após este período, a placa foi lavada com PBS duas vezes e incubada com 100 μ L de meio RPMI 1640 suplementado (10% de soro fetal bovino, 0,2 mM L-glutamina, 10 μ g/mL gentamicina) por 48 horas à 37 °C e 5% de CO₂. Para a dosagem do NO, 50 μ L do sobrenadante da cultura foram adicionados a 50 μ L do Reagente de Griess (sulfonilamida 1% em ácido fosfórico 5% e N-(1-naftil)etilenediamine 0,1% - Sigma Chemical Co.). A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Labsystems Multiscan EIA), utilizando-se filtro de 540 nm e um branco composto por 50 μ L de RPMI-1640 adicionado a 50 μ L de Reagente de Griess. Os resultados obtidos em densidade óptica (D.O) foram transformados em μ M de NO₂⁻/10⁶células, mediante equação de regressão linear com base em uma curva padrão com concentrações conhecidas NaNO₂ (2,5, 5, 10, 25 e 50 μ M).

3.3.2 Quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O método utilizado foi o descrito por Pick e Mizel (1981). O número de células foi ajustado para 2×10^6 /mL em solução de vermelho de fenol (140 nM NaCl; 10 nM de tampão fosfato pH7; 5,5 nM de dextrose; 0,56 nM de vermelho de fenol; 0,01 mg/mL de peroxidase raiz forte tipo II). Alíquotas de 100 μ L da suspensão de células foram distribuídas em placa de 96 wells (NUNC). Em metade dos poços foram adicionados 10 μ L (20 ng) de PMA (*Phorbol Myristate Acetate* - Sigma Chemical Co.). A placa foi incubada por uma hora na estufa, a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período de incubação, 10 μ L de NaOH (1N) foram adicionados a cada poço para interromper a reação. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Labsystems Multiscan EIA), utilizando-se filtro de 620 nm e um branco composto de solução de vermelho de fenol e NaOH 1N. Os resultados obtidos em densidade óptica (D.O) foram

transformados em nanomoles de $\text{H}_2\text{O}_2/2 \times 10^5$ células, mediante equação de regressão linear com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 nmoles de H_2O_2).

3.4 Análise fenotípica das células peritoneais por citometria de fluxo

Células viáveis do peritônio, após lise das hemácias (4,15 g de NH_4Cl , 0,84 g NaHCO_2 , 1 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0) foram submetidas à citometria de fluxo. Alíquotas de 100 μL da suspensão celular a 1×10^7 células/mL foram incubadas com anticorpo que bloqueia a porção $\text{Fc}\gamma\text{III}/\text{Fc}\gamma\text{II}$ (CD16/CD32) por 10 min a 4°C. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais dirigidos às moléculas: granulócitos-Ly-6G e Ly-6C (GR-1, clone: RB6-8C5)/FITC, cadeia α da MAC-1 (CD11b, clone: M1/70)/PE; macrófagos - F4/80 (Clone: BM8)/FITC; células dendríticas - CD11c (Clone:HL3)/Biotin anti-mouse e linfócitos: CD19/PE-Cy5 (clone: MB19-1), CD3 ϵ chain (Clone: 145-2C11)/FITC, CD4 (Clone: GK 1.5)/APC-Cy5, CD8a (Ly-2)(Clone: 53-6.7)/PE e CD23/FITC. Como isótipos controles foram utilizados: IgG2b, de rato (clone: A95-1) marcado com Ficoeritrina (PE) ou Isotiocianato de fluoresceína (FITC). Todos os anticorpos foram obtidos da BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA). O registro de 30000 células foi considerado, utilizando FACSCantoII e analisado pelo programa FlowJo (Tree Star).

3.5 Quantificação das citocinas pelo método Multiplex

O sobrenadante dos macrófagos peritoneais e o soro dos animais após 2, 7, 14 e 180 dias da inoculação do pristane foram armazenados a -80°C até o momento do uso. A dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-17 e TGF- β foi realizada pelo método Bioplex utilizando o kit Milliplex – (Cód. MPXMCYTO-70K) (Millipore, Billerica - MA, USA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Resumidamente, a membrana da placa de 96 poços foi lavada com o tampão de lavagem do kit. Foram adicionados 25 μL de cada padrão e controles nos poços apropriados de acordo com fabricante. Posteriormente, os sobrenadantes ou soros foram adicionados aos poços. Em seguida, as esferas (*beads*) conjugadas com anticorpos anti-citocinas foram adicionadas e a placa incubada *overnight* a 4°C sob agitação. Após esse período, a placa foi novamente lavada com tampão, sendo então adicionado o anticorpo de detecção biotinilado e incubado por 1 h. A etapa seguinte foi adicionar a estreptavidina conjugada com PE (esta se liga ao anticorpo biotinilado) e incubar

por 30 minutos. Novas lavagens foram realizadas e as *beads* foram ressuspensas no tampão do kit e analisadas no Bioplex 200 *Suspension Array System*/ Luminex (Bio Rad, Hercules, CA) através do Software Bio-Plex Manager, versão 4.1 (Bio Rad, Hercules, CA). A análise dos dados foi realizada a partir da curva padrão para cada citocina, obtida a partir da medida da intensidade de fluorescência observada para concentrações diferentes de cada citocina, utilizando-se a regressão da curva de 4 parâmetros. Os resultados foram expressos em pg/mL. O limite de detecção para cada citocina analisada foi: IL-1 β = 2,7 pg/mL; IL-6 = 3,4 pg/mL; IL-10 = 8 pg/mL; TNF- α = 1,4 pg/mL; IL-17 = 0,8 pg/mL e TGF- β = 10 pg/mL.

3.6 Dosagem de albumina e creatinina

A creatinina sérica foi avaliada por meio do kit de Creatinina (Labtest, Minas Gerais, Brasil) que é baseado no método de Jaffe's. O volume empregado de soro foi 50 μ L.

A concentração de albumina sérica em g/dL foi determinada com o kit comercial Albumina (Labtest, Minas Gerais, Brasil). O volume de soro empregado foi 5 μ L.

3.7 Análise da expressão gênica (qPCR)

3.7.1 Extração do RNA

O RNA foi extraído dos macrófagos peritoneais dos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} 180 dias após a PIA e dos controles (PBS) com o RNAspin Mini Kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente: as células peritoneais foram plaqueadas por 2 h à 37 °C. Após este período a placa foi lavada por duas vezes antes de iniciar o processo de extração do RNA das células aderentes. Para que ocorresse a lise celular, 350 μ L de tampão RA1 e 3,5 μ L de β -mercaptoetanol foram adicionados aos poços. As amostras foram submetidas ao vórtex por 10 segundos. Após a lise, as amostras foram colocadas em um mini filtro RNAspin e centrifugadas durante 1 minuto por 13 000 g. Em seguida, o filtro foi descartado e o filtrado transferido para um novo tubo coletor de 1,5 mL.

Para o ajuste das condições de ligação do RNA foram adicionados junto ao filtrado 350 μ L de etanol 70% e estes foram submetidos ao vórtex de dois a cinco segundos.

Na etapa seguinte, as amostras foram homogeneizadas de duas a três vezes e colocadas em uma nova coluna de RNAspin localizada dentro de um tubo coletor de 2 mL e centrifugadas durante 30 segundos à 8 000 g. Após a centrifugação, a coluna foi transferida

para um novo tubo coletor. A remoção do sal promove uma digestão melhor pela DNase I. Assim, para dessalinizar a membrana de sílica, foram adicionados às amostras 350 µL de MDB (*Membrane Desalting Buffer*) e então centrifugadas a 11 000 g durante 1 minuto para a secagem da membrana. Na fase de digestão do DNA foram aplicados 95 µL de reação da DNase (10 µL de DNase I reconstituted + 100 µL do tampão de DNase) no centro da membrana de sílica da coluna. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos.

Posteriormente, as membranas de sílica foram lavadas e secas. Para este procedimento, 3 etapas foram requeridas. Na primeira lavagem, 200 µL de tampão RA2 (tampão que inativa a DNaseI) foram adicionados à coluna RNAspin, esta foi então centrifugada durante 1 minuto a 11 000 g. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para dentro de um novo tubo coletor. Na segunda lavagem foram adicionados à coluna RNAspin 600 µL de tampão RA3 e novamente as colunas foram centrifugadas por 1 minuto à 11 000 g. O sobrenadante obtido foi descartado e a coluna retornou ao tubo coletor.

Na terceira e última lavagem, 250 µL de tampão RA3 foram adicionados na coluna de RNAspin. Para garantir que a membrana ficasse completamente seca, mais uma centrifugação foi necessária por 2 minutos à 11 000 g. Ao término deste procedimento, a coluna foi colocada dentro de um tubo *nuclease free* de 1,5 mL. Para a eluição do RNA presente na membrana da coluna foram adicionados 50 µL de água livre de RNA diretamente sobre a membrana, que foi centrifugada por 1 minuto à 11 000 g.

A concentração de RNA das amostras foi mensurada por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 nm no aparelho Nanovue Plus (GE, USA) e expressa em unidades de densidade óptica (D.O.). Nesta etapa de quantificação foi observada a relação em torno de 2,0 para a razão RNA/Proteínas (260 nm/280 nm). A integridade dos RNAs foi analisada no aparelho Bioanalyzer (Agilent Technologies, Alemanha). Somente os RNAs com RIN (*RNA Integrity Number*) maior que 7 foram selecionados para a obtenção do cDNA.

3.7.2 Obtenção de DNA complementar (cDNA)

Para avaliar a expressão do RNAm, o cDNA foi transcrito a partir do RNA total extraído conforme o protocolo descrito anteriormente. A concentração de 0,5 µg/10 µL de RNA foi adicionada 1 µL de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (50 µM), 2 µL de água livre de RNase e 1 µL de oligonucleotídeos dNTP (10µM). A mistura foi homogeneizada e aquecida a 65 °C durante 5 minutos. Após este período, as amostras foram resfriadas por 1 minuto em banho de gelo.

Adicionou-se 1 µL da enzima SuperScript III RNase H⁻ Reverse Transcriptase – Invitrogen (200 U/mL); 1 µL de DTT (100mM), 4 µL de tampão 5x concentrado, específico para a enzima (250 mM Tris-HCL pH 8,3, 375 mM KCL e 15 mM MgCl₂). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 50 °C por 50 minutos e posteriormente inativadas a 70 °C por 15 minutos. As reações foram incubadas em aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200.

3.7.3 Quantificação da expressão gênica das quimiocinas por PCR em Tempo-Real

As reações de *PCR Array* foram realizadas com kit *RT² profiler PCR Array System Mouse Chemokines & Receptors* – PAMM-022ZA (SABiosciences; Frederick; MD, USA). Cada kit era composto por 12 placas de 96 poços. Em cada placa foi aplicada uma amostra controle ou experimental e, 84 genes diferentes foram analisados entre quimiocinas e respectivos receptores (**Tabela 1**). O protocolo foi realizado de acordo com o manual do fabricante. Resumidamente, para as reações do *PCR Array*, o mix era composto por: 1350 µL de 2X SABiosciences RT2 qPCR Master Mix, 102 µL cDNA diluído (20 µL cDNA puro + 91 µL água RNase-free) e 1248 µL de água RNase-free estéril. O mix foi homogeneizado cuidadosamente e 25 µL dessa solução foi distribuída em cada poço. As placas de *PCR Array* eram compostas por 5 controles endógenos (*housekeeping*) diferentes (*Gusb*, *Gapdh*, *Hsp90ab1*, *Actb* e *β2m*) e também por controles internos da placa como: MGDC – controle da contaminação do DNA genômico; RTC – controle da transcrição reversa; PPC – controle positivo para a PCR. As análises foram realizadas por meio do software da Qiagen (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>). Os genes endógenos utilizados nas análises foram *Actb* e *β2m*, previamente selecionado pelo software geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). O resultado foi expresso em *Fold change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), ou seja, foi indicada a mudança em vezes na expressão gênica relativa ao calibrador (animal controle da respectiva linhagem) permitindo a comparação entre os grupos experimentais e controles. Os valores de *p* foram calculados com base no *Test-t* de *Student* pelo programa da Qiagen.

Genes presentes na placa de *PCR Array* - Quimiocinas:

α Quimiocina (CXC Motif): *Cxcl1* (*Il8ra*), *Cxcl10* (*Inp10*), *Cxcl11* (*I-Tac/Ip-9*), *Cxcl12* (*Sdf1*), *Cxcl13*, *Cxcl14*, *Cxcl15*, *Cxcl16*, *Cxcl2* (*Il8rb*), *Cxcl3*, *Cxcl5* (*Ena-78/Lix*), *Cxcl9* (*Mig*).

β Quimiocina (CC Motif): *Ccl1* (*I309*), *Ccl11* (*Eotaxin*), *Ccl12*, *Ccl17* (*Tarc*), *Ccl19*, *Ccl2* (*Mcp-1*), *Ccl20* (*Mip-3a*), *Ccl22* (*Mdc*), *Ccl24* (*Eotaxin 2*), *Ccl25* (*Teck*), *Ccl26* (*Eotaxin 3*), *Ccl28*, *Ccl3* (*Mip-1a*), *Ccl4* (*Mip-1b*), *Ccl5* (*Rantes*), *Ccl6*, *Ccl7* (*Mcp-3*), *Ccl8* (*Mcp-2*), *Ccl9*.

γ Quimiocina (C Motif): *Xcl1*.

δ Quimiocina (CX3C Motif): *Cx3cl1*.

Receptores de Quimiocinas:

α Quimiocina (CXC Motif): *Cxcr1*, *Cxcr2*, *Cxcr3*, *Cxcr4*, *Cxcr5*, *Cxcr6*.

β Quimiocina (CC Motif): *Ccr1*, *Ccr11*, *Ccr10*, *Ccr2*, *Ccr3*, *Ccr4*, *Ccr5*, *Ccr6*, *Ccr7*, *Ccr8*, *Ccr9*.

γ Quimiocina (C Motif): *Xcr1*.

δ Quimiocina (CX3C Motif): *Cx3cr1*.

Atípicas: *Ackr2*, *Ackr4*, *Ccr12*, *Ackr3*, *Darc*.

Citocinas envolvidas na quimiotaxia: *Cmtm2a*, *Cmtm3*, *Cmtm4*, *Cmtm5*, *Cmtm6*, *Ifng*, *Il16*, *Il1b*, *Il4*, *Il6*, *Pf4*, *Ppbp*, *Tgfb1*, *Tnf*.

Receptores de Citocinas envolvidas na quimiotaxia: *C5ar1* (*Gpr77*), *Cmklr1*, *Fpr1*, *Gpr17*.

Outros genes envolvidos na quimiotaxia: *Hif1a*, *Itgam*, *Itgb2*, *Mapk1* (*Erk2*), *Mapk14* (*p38 MAPK*), *Slit2*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Tymp*.

Tabela 1. Disposição dos genes de quimiocinas/receptores na placa do PCR Array

Esquema da placa do PCR Array												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C5ar1 A01	Acr2 A02	Ccl1 A03	Ccl11 A04	Ccl12 A05	Ccl17 A06	Ccl19 A07	Ccl2 A08	Ccl20 A09	Ccl22 A10	Ccl24 A11	Ccl25 A12
B	Ccl26 B01	Ccl28 B02	Ccl3 B03	Ccl4 B04	Ccl5 B05	Ccl6 B06	Ccl7 B07	Ccl8 B08	Ccl9 B09	Ccr1 B10	Ccr10 B11	Ccr11 B12
C	Ccr2 C01	Ccr3 C02	Ccr4 C03	Ccr5 C04	Ccr6 C05	Ccr7 C06	Ccr8 C07	Ccr9 C08	Acr4 C09	Ccr12 C10	Cmklr1 C11	Cmtm2a C12
D	Cmtm3 D01	Cmtm4 D02	Cmtm5 D03	Cmtm6 D04	Cx3cl1 D05	Cx3cr1 D06	Cxcl1 D07	Cxcl10 D08	Cxcl11 D09	Cxcl12 D10	Cxcl13 D11	Cxcl14 D12
E	Cxcl15 E01	Cxcl16 E02	Cxcl2 E03	Cxcl3 E04	Cxcl5 E05	Cxcl9 E06	Cxcr1 E07	Cxcr2 E08	Cxcr3 E09	Cxcr4 E10	Cxcr5 E11	Cxcr6 E12
F	Acr3 F01	Darc F02	Fpr1 F03	Gpr17 F04	Hif1a F05	Ifng F06	Il16 F07	Il1b F08	Il4 F09	Il6 F10	Itgam F11	Itgb2 F12
G	Mapk1 G01	Mapk14 G02	Pf4 G03	Ppbp G04	Slit2 G05	Tgfb1 G06	Tlr2 G07	Tlr4 G08	Tnf G09	Tymp G10	Xcl1 G11	Xcr1 G12
H	Actb H01	B2m H02	Gapdh H03	Gusb H04	Hsp90a b1 H05	MGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

FONTE: Adaptado de SABiosciences (2014)

3.8 Análise Histológica

As patas traseiras, rins, pulmões, timo, baço e linfonodos poplíteos dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} controles e experimentais (180 dias após PIA) foram coletados e fixados em solução de formaldeído tamponado 4% (ph=7,2). O material foi submetido ao processo de desmineralização (somente as patas), seguido de desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Os cortes foram realizados no micrótomo com espessura de 5 µm e as lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e especificamente, os rins dos animais também foram corados por Ácido Periódico de Schiff (PAS). A análise foi realizada pelo patologista Prof. Dr. José Luiz Guerra.

3.9 Análise Estatística

As diferenças entre as médias foram calculadas pelo teste ANOVA seguido de teste de Bonferroni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para valores de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Curva de sobrevida dos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} durante a PIA

Para avaliar a toxicidade do pristane nas sublinhagens ao longo do tratamento foi realizada a curva de sobrevida.

Na análise da sobrevida dos animais submetidos à PIA por 180 dias, foi possível observar que os camundongos AIRmax^{SS} apresentaram taxa de sobrevida maior (86%) quando comparado aos AIRmax^{RR} (73%) (**Figura 2**). Cabe ressaltar que, 100% dos animais controles sobreviveram durante o mesmo período.

Figura 2. Sobrevida dos camundongos submetidos a PIA. Curva de sobrevida dos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} injetados duas vezes i.p com pristane. AIRmax^{RR} (n= 45) e AIRmax^{SS} (n= 44). Log-rank test. $p < 0,05$.

4.2 Análise da massa corpórea dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} durante a PIA

Com intuito de avaliar o efeito do pristane foi realizado o acompanhamento da massa corpórea das sublinhagens ao longo do protocolo de PIA. A análise da massa corpórea dos animais mostrou que os machos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} apresentaram massa maior quando comparado às fêmeas (**Figura 3A e 3B**). Os machos AIRmax^{SS} ganharam peso significativo em relação as fêmeas a partir de 150 dias de tratamento com pristane e o mesmo foi observado na comparação interlinhagens (**Figuras 3B e 3C**).

Figura 3. Massa corpórea dos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} durante a PIA. Camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} foram avaliados durante 180 dias após injeção de pristane quanto a massa corpórea (gramas). (AIRmax^{RR} n= 24; AIRmax^{SS} n=24). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão. (A)*p<0.05 comparação AIRmax^{RR} macho versus AIRmax^{RR} fêmea; (B)*p<0.05 comparação AIRmax^{SS} macho versus AIRmax^{SS} fêmea; (C)*p<0,05 comparação AIRmax^{RR} versus AIRmax^{SS}

4.3 Caracterização das populações celulares do peritônio de camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} após a indução de artrite por pristane

4.3.1 Número total de células

Os animais foram submetidos ao protocolo de artrite induzida por pristane e após 2, 7, 14 e 180 dias, o lavado peritoneal foi coletado com meio RPMI. A **Figura 4** mostra que os animais portadores do alelo *S* constitutivamente apresentam número de células maior do que a linhagem AIRmax^{RR}, que pode ser característico da linhagem. Após 2 dias da injeção de pristane houve um aumento significativo de células peritoneais nos AIRmax^{SS} em relação aos AIRmax^{RR}. Entretanto, nos tempos seguintes 7 e 14 dias, o número de células desta linhagem diminuiu significativamente. No período tardio de tratamento com pristane, aos 180 dias, a população de células peritoneais infiltradas aumentou nas duas linhagens analisadas.

Figura 4. Número total de células da cavidade peritoneal de AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. Células da cavidade peritoneal de camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} foram coletadas com meio RPMI e o número total avaliado aos 2, 7, 14 e 180 dias após a PIA, por meio da contagem em câmara de Malassez. Animais injetados com PBS foram considerados como controle negativo. Os resultados expressam a média $\pm$ erro padrão, n=12. * p<0,05 entre AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}; & p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{RR}; # p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{SS}.

4.3.2 Avaliação morfológica da população peritoneal

Lâminas com suspensões de células do peritônio dos diferentes tempos de tratamento foram preparadas no aparelho citospin. Após a coloração por Panótipo foi determinado o número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos na cavidade peritoneal dos camundongos. Para isso cerca de 200 células foram analisadas quanto à morfologia nuclear e coloração dos grânulos citoplasmáticos. Na **figura 5A-C**, os valores estão representados em número absoluto dos neutrófilos, macrófagos e linfócitos após o tratamento do pristane. Assim, foi possível observar que o número basal de macrófagos presentes nos AIRmax^{SS} é significativamente maior que nos AIRmax^{RR}. E ainda, que o tratamento com pristane afeta de forma significativa os macrófagos destes animais. Após 180 dias do protocolo de indução de artrite, as populações de neutrófilos (núcleo em rosca) e linfócitos aumentaram significativamente nos AIRmax^{SS}. Também foi possível observar um número maior de linfócitos infiltrados nos AIRmax^{RR} aos 7 dias em relação aos AIRmax^{SS}.

Figura 5. Contagem diferencial das células do peritônio dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} após 2, 7, 14 e 180 dias da indução de artrite por pristane (PIA). Os resultados foram expressos como média dos valores absolutos $\pm$ erro padrão, n=4 por grupo/tratamento. * p<0,05 entre AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}; & p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{RR}; # p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{SS}.

4.3.3 Citometria de fluxo

Para confirmar os dados anteriores, nosso próximo passo foi realizar a citometria de fluxo da população peritoneal. Células coletadas do peritônio de camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} em dias variados após a indução da PIA foram marcadas com anticorpos específicos contra moléculas de superfícies para granulócitos (GR1⁺CD11b⁺), linfócitos T (CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺), linfócitos B (CD19⁺) e macrófagos (F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁻).

O infiltrado composto por mononucleares e granulócitos induzido pelo pristane na cavidade peritoneal na linhagem suscetível AIRmax^{SS} foi mais intenso do que na linhagem AIRmax^{RR}, com maior frequência de macrófagos, linfócitos T e B e neutrófilos 180 dias após PIA.

4.3.3.1 Células F4/80⁺CD11b⁺

Os macrófagos são caracterizados fenotipicamente pela expressão da cadeia alfa da integrina Mac-1 (CD11b) e da glicoproteína F4/80. Entretanto, a expressão dessas moléculas não é homogênea entre as diferentes subpopulações de macrófagos (TAYLOR et al., 2003). Os macrófagos peritoneais também chamados de macrófagos residentes podem expressar níveis diferentes de F4/80 de acordo com as condições encontradas no microambiente caracterizando os diferentes estágios de ativação destas células. Na cavidade peritoneal, na ausência de inflamação ou estímulo, os macrófagos residentes expressam o fenótipo F4/80^{high} (GORDON; TAYLOR, 2005).

No ambiente peritoneal dos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} foram encontradas quatro subpopulações de macrófagos com os seguintes fenótipos F4/80^{high}CD11b^{high}, F4/80^{int}CD11b^{int}, F4/80^{low}CD11b^{int} e F4/80^{low}CD11b^{low} (**Figura 6**). O número basal de células destas subpopulações foi maior na linhagem AIRmax^{SS}. O tratamento com pristane provocou a diminuição de células F4/80^{high}CD11b^{high} e F4/80^{low}CD11b^{low} nas linhagens e após 180 dias aumentou significativamente as células com o fenótipo F4/80^{low}CD11b^{int} (macrófagos ativados) nos AIRmax^{SS}. Cabe ressaltar que todas as subpopulações identificadas eram CD11c⁻, dessa forma excluiu-se as células dendríticas

A

B

Figura 6. Análise fenotípica das populações de células marcadas com F480 e CD11b após 2, 7, 14 e 180 dias do tratamento com pristane (PIA) em camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. (A) Citograma representativo das populações celulares do peritônio evidenciadas pela marcação das moléculas de superfície F480/CD11b. (B) Representação do número absoluto das populações F4/80^{high}CD11b^{high}, F4/80^{int}CD11b^{int}, F4/80^{low}CD11b^{int} e F4/80^{low}CD11b^{low}. Os resultados expressam a média ± erro padrão, n= 4. * p<0,05 entre AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}; & p<0,05 entre o grupo controle o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{RR}; # p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{SS}.

4.3.3.2 Células $Gr1^+CD11b^+$

Ao longo do processo de maturação dos neutrófilos na medula óssea, a expressão das moléculas GR1 e CD11b aumenta progressivamente, sendo observado diferentes níveis de expressão destas moléculas de acordo com o estágio de maturação granulocítica. Durante a inflamação, granulócitos indiferenciados podem ser mobilizados da medula óssea para a circulação. Segundo Lagasse e Weissman (1996) as moléculas Gr1 e CD11b são compartilhadas em níveis diferentes por neutrófilos ($Gr1^{high}CD11b^{high/low}$), macrófagos ($Gr1^{low}CD11b^{high}$) e monócitos residentes ($Gr1^{neg}CD11b^+$) (Geissmann et al., 2003) na cavidade peritoneal.

A **Figura 7** mostra que a cavidade peritoneal dos animais AIRmax^{SS} apresentam constitutivamente número maior de monócitos residentes ($Gr1^{neg}CD11b^+$) (Geissmann et al., 2003) que os animais AIRmax^{RR}. Esta população diminui significativamente ao longo da cinética de tratamento com pristane (2, 7 e 180 dias). Aos 7 e 180 dias após PIA, neutrófilos ($Gr1^{high}CD11b^+$) foram recrutados para o sítio da inflamação sendo as células mais abundantes em AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}, respectivamente.

A

B

Figura 7. Análise fenotípica das populações de células marcadas com Gr1 e CD11b após 2, 7, 14 e 180 dias do tratamento com pristane (PIA) em camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. (A) Citograma representativo das populações celulares do peritônio evidenciadas pela marcação das moléculas de superfície Gr1CD11b. (B) Representação do número absoluto das populações Gr1^{neg}CD11b⁺ e Gr1^{high}CD11b⁺. Os resultados expressam a média $\pm$ erro padrão, n= 4. * p<0,05 entre AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}; & p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{RR}; # p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{SS}.

4.3.3.3 Linfócitos B (B1 e B2)

Na cavidade peritoneal de camundongos AIRmax^{RR} foi observado aumento significativo de células B aos 14 e 180 dias após PIA em relação ao grupo controle (**Figura 8A**). As células infiltradas foram predominantemente células B1(CD19⁺CD23⁻) (**Figura 8B**). Não foram encontradas diferenças significativas nas linhagens com relação à subpopulação B2 (C19⁺CD23⁺) (**Figura 8C**).

Figura 8. Análise fenotípica das populações de células marcadas com CD19 e CD23 após 2, 7, 14 e 180 dias do tratamento com pristane (PIA) em camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. Representação do número absoluto de linfócitos B totais (A), subpopulações B1 (CD19⁺CD23⁺) em (B) e B2 (CD19⁺CD23⁺) no peritônio em (C). Os resultados expressam a média $\pm$ erro padrão, n= 4. * p<0,05 entre AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}; & p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{RR}; # p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{SS}.

4.3.3.4 Linfócitos T (CD4 e CD8)

Diferentes populações de células T foram encontradas na cavidade peritoneal dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. No peritônio dos animais portadores do alelo *S* foi observada uma população basal maior de células CD3⁺CD4⁺ do que nos AIRmax^{RR}. Esta por sua vez, diminuiu significativamente nos períodos de 2, 7 e 14 dias e aumentou significativamente 180 dias após a PIA. Aos 7 dias, o número de células TCD4⁺ foi maior nos AIRmax^{RR} quando comparado à linhagem suscetível a artrite. A população de células CD3⁺CD8⁺ aumentou no período tardio significativamente nos animais AIRmax^{SS} (**Figura 9**).

A

Figura 9. Análise fenotípica das populações de células marcadas com CD4 e CD8 após 2, 7, 14 e 180 dias do tratamento com pristane (PIA) em camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. (A) Citograma representativo das populações celulares do peritônio evidenciadas pela marcação das moléculas de superfície CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺. (B) Representação do número absoluto das populações de linfócitos TCD4 e TCD8. Os resultados expressam a média $\pm$ erro padrão, n= 4. * p<0,05 entre AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}; & p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{RR}; # p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{SS}.

4.4 Avaliação do perfil de citocinas do soro

Com o objetivo de quantificarmos algumas citocinas séricas pró e anti-inflamatórias, camundongos das sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} foram injetados via intraperitoneal com óleo pristane. Após 7, 14 e 180 dias do tratamento os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital e os soros foram armazenados à -80 °C e dosados pelo kit Multiplex.

A **Figura 10** mostra que o tratamento com pristane aumenta significativamente as citocinas séricas IL6, TNF α e IL10 nos AIRmax^{SS} após 180 dias da indução de artrite por pristane. Por outro lado, os animais AIRmax^{RR} 7d após PIA têm um aumento significativo de IL-17 no soro. Por sua vez, a citocina TGF β apresentou-se elevada nos períodos de 7 e 14 dias de tratamento com pristane nos AIRmax^{SS}.

Figura 10. Quantificação das citocinas no soro de animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} após 7, 14 e 180 dias da indução de artrite por pristane. Os soros coletados dos animais foram estocados à -80°C e quantificados pelo ensaio do Multiplex (pg/mL). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, n=4. * p<0,05 entre AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}; & p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{RR}; # p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{SS}.

4.5 Análise da ativação dos macrófagos peritoneais

4.5.1 Produção de óxido nítrico (NO)

Para verificar se existem diferenças quanto à produção de NO por macrófagos peritoneais de animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}, as células aderentes à placa de 96 poços (após 2h de incubação à 37°C) foram estimuladas ou não por LPS, e deixadas em cultura por 48 horas. A **Figura 11** mostra a secreção de NO no sobrenadante após 2, 7, 14 e 180 dias após PIA. A análise dos resultados revelou que os macrófagos de ambas as sublinhagens estudadas produziram quantidade baixa de NO espontaneamente. Entretanto, aos 7 e 180 dias após PIA níveis significativos de NO foram produzidos pelos macrófagos dos animais AIRmax^{SS} quando estimulados por LPS.

Figura 11. Produção de NO por macrófagos peritoneais de animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. Macrófagos peritoneais de animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} foram coletados e a produção de NO avaliada em diferentes períodos (2, 7, 14 e 180 dias) após a PIA. As células foram incubadas por 48 horas *in vitro* na presença ou não de LPS. Células provenientes de animais inoculados com PBS foram consideradas como controles negativos. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão, n=10; * p<0,05 entre AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}; & p<0,05 entre o grupo controle e inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{RR}; # p<0,05 entre o grupo controle e inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{SS}.

4.5.2 Liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para quantificar a liberação de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}, as células aderentes à placa foram estimuladas ou não por PMA, e deixadas em cultura por 1 hora. A **Figura 12** mostra a liberação de H_2O_2 no sobrenadante das células após 2, 7, 14 e 180 dias após PIA. O resultado revelou que os macrófagos de ambas as linhagens são capazes de liberar H_2O_2 . Entretanto, houve liberação de peróxido de hidrogênio significativa por macrófagos AIRmax^{SS} aos 14 e 180 dias espontaneamente e também aos 7, 14 e 180 dias quando estimuladas com PMA.

Figura 12. Liberação de H_2O_2 em macrófagos peritoneais de animais $AIRmax^{RR}$ e $AIRmax^{SS}$. Macrófagos peritoneais de $AIRmax^{RR}$ e $AIRmax^{SS}$ foram coletados e a liberação de H_2O_2 foi avaliada nos períodos 2, 7, 14 e 180 dias após PIA. As células foram incubadas por 1 hora *in vitro* na presença ou não de PMA. Células provenientes de animais inoculados com PBS foram consideradas como controles negativos. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão, $n=10$. * $p<0,05$ entre $AIRmax^{RR}$ e $AIRmax^{SS}$; & $p<0,05$ entre o grupo controle e inoculado com pristane da linhagem $AIRmax^{RR}$; # $p<0,05$ entre o grupo controle e inoculado com pristane da linhagem $AIRmax^{SS}$.

4.5.3 Perfil de citocinas do sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais

Com o objetivo de quantificarmos algumas citocinas específicas de macrófagos peritoneais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} (2, 14 e 180 dias após PIA) plaqueamos estas células por 48 h e o sobrenadante da cultura foi dosado por meio do kit Multiplex.

A **Figura 13** revela que os macrófagos peritoneais dos animais AIRmax^{SS} produzem mais IL1- β , TNF- α , IL-6 do que as células fagocíticas portadoras do alelo *R*. Após 2 dias do tratamento com pristane houve aumento nos níveis de secreção de IL1- β , IL-10 nos camundongos AIRmax^{SS}. No período mais tardio (180 dias) algumas citocinas foram significativamente produzidas por AIRmax^{SS} : IL1- β , IL-6, TNF- α em relação a outra linhagem. Estas citocinas pró-inflamatórias podem potencializar a artrite neste modelo. Constitutivamente, os macrófagos AIRmax^{SS} secretam quantidades maiores de IL-1- β , TNF- α e MIP-2 do que os AIRmax^{RR} nas mesmas condições.

Figura 13. Quantificação das citocinas presentes no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais de animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} após 2, 14 e 180 dias da indução de artrite por pristane. Células peritoneais aderentes à placa de 96 poços foram incubadas por 48h em RPMI à 37°C. O sobrenadante coletado foi estocado à -80°C e quantificado pelo ensaio do Multiplex. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, n=4. * p<0,05 entre AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}; & p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{RR}; # p<0,05 entre o grupo controle e o inoculado com pristane da linhagem AIRmax^{SS}

4.5.4 Análise de expressão gênica relativa – PCR Array

O ensaio de *PCR Array* foi realizado com o intuito de avaliar a expressão de genes codificadores de fatores e receptores envolvidos na quimiotaxia em animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} durante a fase crônica da artrite induzida por pristane. As células peritoneais foram coletadas com meio RPMI e plaqueadas por 2 h à 37 °C para obtenção das células aderentes (macrófagos). Inicialmente foi realizada a extração do RNA mensageiro e em seguida, a síntese do cDNA dos macrófagos peritoneais de animais injetados com PBS (Controle) ou tratado com pristane por 180 dias (PIA). Dessa forma, 84 genes puderam ser avaliados simultaneamente. As amostras foram normalizadas através da subtração do valor dos genes constitutivos *Actb* e *β2m* (chamado de ΔCt) e calibradas por meio da subtração do valor de ΔCt calibrador, neste caso o grupo controle da respectiva linhagem. Os resultados foram expressos em *Fold change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Nesta análise determinou-se o número de genes modulados nos macrófagos peritoneais das linhagens. Os genes considerados ativados foram aqueles com expressão igual ou acima de quatro vezes em relação ao respectivo controle. Enquanto, que os genes reprimidos foram considerados aqueles em que a expressão foi quatro vezes menor que o respectivo controle. **As Figuras 14, 15 e 16** mostram que durante a inflamação crônica da artrite 31 genes quimiotáticos estão reprimidos e 4 genes ativados nos macrófagos AIRmax^{RR} PIA quando comparado ao respectivo controle (**Tabela 2**). Entretanto, perfil oposto é observado na modulação gênica dos macrófagos homozigotos para o alelo *S* com aumento de expressão significativa de 18 genes e somente 3 genes reprimidos em relação ao controle (**Tabela 3**).

Ainda na comparação AIRmax^{RR} PIA *versus* controle, observou-se modulação significativa com aumento de expressão de vários genes, entre eles: *Cxcr2* (42,6 vezes) e diminuição de *Cxcl1* (-179,37 vezes), *Cxcl3* (-68,35 vezes) e *Il6* (-186,47 vezes) (**Tabela 2**). Na análise AIRmax^{SS} PIA *versus* controle, observamos a expressão significativa de vários genes ativados, por exemplo: *Ccl12* (142,21 vezes), *Ccl8* (53,7 vezes), *Fpr1* (245,05 vezes) e *Cxcr1* (17,35 vezes) (**Tabela 3**).

Cabe ressaltar que o perfil de ativação dos genes demonstrado pelos AIRmax^{SS} pode contribuir para suscetibilidade maior a artrite nestes animais. Em contrapartida, os mecanismos de controle de ativação gênica demonstrados pelos AIRmax^{RR} podem regular negativamente os genes dificultando a instalação da artrite mesmo em camundongos com fundo genético selecionado para a alta inflamação.

Também avaliamos a distribuição cromossômica dos genes ativados e reprimidos nas linhagens estudadas. Observamos que houve distribuição dos genes modulados ao longo do genoma, com maior concentração nos cromossomos 1, 5, 9 e 11 (**Figura 17**).

Figura 14. Número de genes ativados e reprimidos nos macrófagos peritoneais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} PIA *versus* respectivos controles. Os macrófagos foram coletados 180 dias após a injeção de pristane (PIA) ou PBS (controle). n=4 por grupo controle e n=5 por grupo PIA.

Figura 15. Análise da expressão gênica de macrófagos peritoneais de AIRmax^{RR} PIA versus AIRmax^{RR} controle. Figura representativa genes ativados ou reprimidos dos macrófagos AIRmax^{RR} após PIA. Os macrófagos foram coletados aos 180 dias após injeção de pristane (PIA) ou PBS (controle). Análise realizada através do software da Qiagen (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>). n=4 grupo controle e n=5 grupo PIA, *p < 0,05.

Tabela 2. Expressão gênica AIRmax^{RR} PIA em relação ao controle

Gene	Expressão gênica relativa (Fold Change)	p<0,05
Cxcr1	4,48	0,014
Cxcr2	42,64	0,003
Xcl1	6,12	0,020
Ccl1	-8,18	0,000
Ccl11	-7,34	0,001
Ccl17	-5,12	0,006
Ccl19	-7,02	0,001
Ccl20	-7,74	0,000
Ccl24	-12,83	0,028
Ccl26	-7,57	0,000
Ccl28	-7,57	0,000
Ccl3	-5,24	0,006
Ccl4	-5,97	0,037
Ccl7	-7,19	0,013
Ccr10	-7,57	0,000
Ccr11	-7,26	0,001
Ccr6	-16,81	0,001
Cmtm2a	-8,20	0,005
Cmtm5	-7,57	0,000
Cx3cl1	-6,05	0,001
Cxcl1	-179,37	0,017
Cxcl10	-5,65	0,019
Cxcl13	-68,25	0,005
Cxcl15	-7,45	0,004
Cxcl2	-9,25	0,011
Cxcl3	-19,36	0,000
Cxcl5	-5,78	0,001
Cxcr5	-9,27	0,034
Darc	-8,34	0,000
Gpr17	-7,54	0,000
Il6	-186,47	0,001
Pf4	-24,73	0,002
Slit2	-7,57	0,000
Tymp	-7,12	0,001

Legenda: A expressão relativa é a expressão gênica normalizada do grupo tratado dividido pelo controle da respectiva linhagem. * p<0,05 utilizando teste t de *Student*. Análise realizada no software da Qiagen de acordo com as orientações do fabricante.

Figura 16. Análise da expressão gênica de macrófagos peritoneais de AIRmax^{SS} PIA versus AIRmax^{SS} controle. Figura representativa dos genes ativados ou reprimidos dos macrófagos AIRMax^{SS} após PIA. Os macrófagos foram coletados aos 180 dias após injeção de pristane (PIA) ou PBS (controle). Análise realizada através do software da Qiagen (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>, n=4 grupo controle e n=5 grupo PIA, *p < 0,05).

Tabela 3. Expressão gênica relativa AIRmax^{SS} PIA em relação ao controle

Genes	<i>Expressão gênica relativa (Fold Change)</i>	<i>*p < 0,05</i>
Ccl12	142,21	0,001
Ccl2	6,41	0,000
Ccl3	4,46	0,002
Ccl6	5,21	0,019
Ccl7	7,54	0,016
Ccl8	53,70	0,005
Ccr2	6,12	0,023
Ccr4	5,91	0,012
Ccr8	10,41	0,001
Ccr12	5,48	0,004
Cx3cr1	8,42	0,002
Cxcr1	17,35	0,001
Cxcr2	5,67	0,005
Fpr1	245,05	0,002
Ifng	10,78	0,000
Il4	6,84	0,005
Tlr4	4,13	0,027
Xcr1	5,66	0,012
Ccl24	-14,63	0,017
Cxcl1	-5,02	0,010
Cxcl13	-4,73	0,017

Legenda: A expressão relativa é a expressão gênica normalizada do grupo tratado dividido pelo grupo controle da respectiva linhagem. * p<0,05 utilizando teste t de *Student*. Análise realizada no software da Qiagen de acordo com as orientações do fabricante.

A - AIRmax^{RR}

B - AIRmax^{SS}

Figura 17. Distribuição cromossômica dos genes modulados nos macrófagos peritoneais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} após PIA. Os genes significativamente expressos nos macrófagos AIRmax^{RR} (A) e AIRmax^{SS} (B) identificados no ensaio de *PCR Array* foram agrupados nos respectivos cromossomos de acordo com o site *Mouse Genome Informatics* – MGI (<http://www.informatics.jax.org/>).

4.6 Avaliação da função renal através dos níveis de albumina e creatinina

Na artrite reumatoide alguns órgãos, como os rins e os pulmões estão habitualmente acometidos pela doença. Para identificar se os rins dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} estavam comprometidos após tratamento com pristane, determinamos as concentrações séricas de Albumina (g/dL) e Creatinina (mg/dL).

Este ensaio mostrou que não há diferença significativa de Albumina sérica entre as linhagens tratadas ou não com o óleo pristane (**Figura 18A**).

Na **Figura 18B** é possível observar que, há aumento significativo dos níveis de creatinina presentes nos soros dos camundongos portadores do alelo *S* indicando que há comprometimento renal dos animais durante a PIA. Já os AIRmax^{RR} não apresentaram variação deste metabólito no período avaliado.

Figura 18. Dosagem de albumina e creatinina no soro dos camundongos submetidos a PIA. O níveis de albumina (**A**) e creatinina (**B**) dos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} submetidos ou não (Controle) ao protocolo de PIA foram dosados por *Kit*. AIRmax^{RR} (n= 17) e AIRmax^{SS} (n= 28). Resultado expresso em média $\pm$ erro padrão, n=10; *p<0.05 comparação RR *versus* SS.

4.7 Caracterização dos efeitos locais e sistêmicos do pristane nos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}

Em humanos, a artrite reumatoide acomete grandes e pequenas articulações em associação com manifestações sistêmicas como: rigidez matinal, fadiga e perda de peso. Quando envolve outros órgãos, a morbidade e a gravidade da doença são maiores e pode diminuir a expectativa de vida em cinco a dez anos (BÉRTOLO et al., 2009). Dentre os órgãos principais envolvidos estão: pulmão, rim, timo, coração e linfonodos mediastinais.

Após 180 dias da injeção de pristane foram coletadas as patas traseiras e os seguintes órgãos: rins, pulmões, linfonodos poplíteos, baço e timo. As peças anatômicas foram fixadas em formalina tamponada 10% e submetidas à histologia para realização da coloração H/E.

De acordo análise histopatológica, o baço e os linfonodos poplíteos das sublinhagens não apresentaram alterações teciduais após 180 dias do protocolo de PIA.

4.7.1 *Análise da articulação da pata*

O aparecimento dos sintomas de artrite observáveis macroscopicamente em nosso modelo, isto é, eritema e ou edema nas patas, ocorre aproximadamente aos 90 dias após a injeção de pristane. A incidência de artrite nas articulações foi avaliada a olho nu pela presença ou ausência de inchaço nas articulações. Os animais artríticos também foram avaliados quanto à gravidade da doença por avaliação visual e atribuição de *score*. O *score* da artrite foi determinado de 0 a 3 para cada pata (0 = normal; 1 = leve inchaço, vermelhidão; 2 = inchaço edematoso pronunciado, vermelhidão; 3 = inchaço grave, vermelhidão e rigidez nas articulações). O *score* máximo possível é 12 para cada animal (DE FRANCO et al., 2014; JENSEN et al., 2006; PETERS et al., 2007) (**Figura 19**).

Nas articulações dos animais AIRmax^{SS} (*score* 12), após 180 dias do tratamento com pristane, foi observado um infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares (**Figura 20 G-H**), perda da organização estrutural da articulação, invasão da cavidade articular e destruição da cartilagem adjacente (**Figuras 20 F-J**). Os animais controles de ambas as linhagens injetados apenas com PBS apresentaram as estruturas histológicas preservadas confirmando que esta linhagem não desenvolve artrite espontaneamente (**Figura 20 A-E**).

Peters et al. (2007) no fenótipo de incidência da PIA que, 29,4% dos animais AIRmax^{RR} desenvolveram artrite aos 150 dias, enquanto 70,6% dos AIRmax^{SS} desenvolveram

PIA aos 180 dias. O *score* médio de gravidade de artrite nos AIRmax^{SS} foi duas vezes maior do que o dos AIRmax^{RR}. A baixa incidência de artrite observada em animais AIRmax que carregam o alelo R em homozigose pode ser devido à ausência do componente C5 do sistema complemento nestes animais (AMANO et al., 2009). Nossos experimentos neste projeto reproduziram os dados de incidência/severidade publicados anteriormente pelo nosso grupo.

Figura 19. Morfologia das patas dos camundongos AIRmax^{SS} na fase crônica da PIA. Figura representativa das patas de camundongos AIRmax^{SS} coletadas 180 dias após injeção de PBS (Controle) em (A e C) ou pristane (PIA) em (B, D, E e F). O *score* das patas foi realizado nos animais, sendo 3 o *score* máximo por pata e, 12 o *score* máximo de artrite por animal (patas dianteiras e traseiras acometidas pela doença).

Figura 20. Histopatologia das articulações da pata de camundongos submetidos a PIA. Figura representativa das patas de camundongos AIRmax^{SS} coletadas 180 dias após injeção de PBS (Controle – *score* 0) ou pristane (PIA, *score* 12). Em {A, B, C, D e E} observa-se preservação as estruturas histológicas preservadas no grupo controle. No grupo PIA, em {F, G, H, I e J}, há perda de organização estrutural da articulação acometida por infiltrado predominantemente mononuclear, invasão da cavidade articular e destruição da cartilagem adjacente. Aumento do original de 40x, 100x e 200x, respectivamente. Coloração H/E.

4.7.2 Análise do rim

Em vista do aumento da creatinina sérica nos camundongos AIRmax^{SS}, nosso próximo passo foi avaliar a histologia do rim das sublinhagens.

A **Figura 21** mostra a região cortical do rim do AIRmax^{SS} controle com corpúsculo renal, túbulos renais e interstício bem preservados (foto panorâmica) sem qualquer tipo de comprometimento renal.

Na **Figura 22** observa-se a presença de um infiltrado intersticial focal predominantemente mononuclear e a presença de cilindros hialinos no lúmen tubular (**Figura 22A**). Também foi possível visualizar em alguns cortes histológicos por meio de coloração específica (Ácido Periódico de Schiff), o espessamento discreto da membrana basal de túbulos renais e capilares glomerulares (**Figura 22E**). Cabe ressaltar, que as alterações descritas quanto à estrutura renal foram observadas nas duas sublinhagens após o tratamento prolongado com pristane independente do *score* de artrite. Entretanto, o infiltrado foi um pouco mais intenso na linhagem AIRmax^{SS}.

Figura 21. Fotomicrografia representativa do rim controle de camundongos AIRmax. Camundongos AIRmax^{SS} foram inoculados, via intraperitoneal, com 0,5mL de PBS (controle). Após eutanásia, os rins foram removidos e analisados em cortes de parafina corados com H/E. Em {A,B} observa-se na região cortical a presença dos corpúsculos e túbulos renais bem preservados assim como o interstício. Aumento original de 40X e 100X, respectivamente.

Figura 22. Análise histopatológica do rim após indução de artrite por pristane (PIA). Camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} foram inoculados, via intraperitoneal, com duas doses de 0,5mL de pristane com intervalo de 60 dias. Após 180 dias da primeira dose, os camundongos foram eutanasiados, os rins removidos e analisados em cortes de parafina corados com H/E ou PAS. Em {A,C} observa-se a presença de infiltrado intersticial focal de mononucleares e a presença de cilindros hialinos no lúmen tubular (seta); Em {E}, detalhe do capilar glomerular mostrando espessamento discreto da membrana basal (seta), corado por PAS. Em {B,D} observa-se infiltrado intersticial focal de mononucleares, perivascular, na cortical com corpúsculo renal e túbulos. {F} detalhe em maior aumento do infiltrado mononuclear perivascular e peritubular. Aumento original para {A,B}= de 100X; {C,D}= de 200X; {E,F}= de 400X.

4.7.3 Análise do timo

O timo é o sítio de maturação da célula T. É um órgão bilobado situado no mediastino anterior. Cada lobo é dividido em múltiplos lóbulos por septos fibrosos. Cada lóbulo consiste em um córtex externo e uma medula interna e contém células epiteliais estromais tímicas, macrófagos, células dendríticas e numerosos precursores de células T (timócitos) em vários estágios de maturação (ABBAS; LITCHTMAN; PILLAI, 2012). O timo mantém o seu tamanho até a idade jovem adulta e posteriormente, regride por atrofia (KRINKE, 2004).

Na **Figura 23** é possível observar que o tratamento com pristane induz aumento do timo dos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} (com *score* 0 ou com *score* 12). Além disso, observa-se ainda que, o grau de severidade da artrite induzida por pristane causa alterações significativas nas duas sublinhagens, ou seja, quando os camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} apresentam *score* máximo de artrite (12, sendo 3 por pata), o tamanho do timo aumenta significativamente em relação aos respectivos controles. Nos AIRmax^{SS} com *score* 12, o timo é ainda maior que o dos AIRmax^{RR}.

A região do córtex do timo contém uma coleção densa de linfócitos T, e a da medula, de coloração mais clara, apresenta uma população de linfócitos mais dispersa. Os macrófagos derivados da medula óssea e as células dendríticas são quase que exclusivamente encontrados na região medular tímica. Já as células epiteliais, as quais contêm citoplasma abundante, estão espalhadas pelo timo (KRINKE, 2004). Além da análise macroscópica do timo dos camundongos submetidos a PIA também foi realizada a análise histopatológica deste órgão (**Figura 24**).

Na **Figura 24**, as alterações histológicas observadas no timo foram caracterizadas como hiperplasia tímica, ou seja, há um aumento deste órgão linfóide que está frequentemente associado à expansão dos folículos linfóides ou centros germinativos na região medular do timo. Esses centros germinativos estão presentes apenas em pequeno número no timo normal. O aparecimento de folículos linfóides localizados predominantemente na medula e associado à compressão e atrofia do córtex caracteriza a Hiperplasia Tímica Folicular. Esta alteração também é observada na maioria dos pacientes com Miastenia grave, e em alguns casos ocorrem em outras doenças autoimunes, como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e a Artrite Reumatoide (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1986). Sinais de edema e hemorragia também foram observados no timo dos animais artríticos (apenas os que apresentaram *score* 12) (**Figura 24**).

Figura 23. Análise morfológica dos órgãos dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} na fase crônica da PIA. Órgãos dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} foram coletados 180 dias após injeção de pristane (PIA) ou PBS (Controle). O *score* das patas também foi realizado, sendo 12 o grau máximo de artrite por animal.

Figura 24. Histologia do timo de camundongos AIRmax^{SS} submetidos a PIA. Figura representativa do timo de camundongos AIRmax^{SS} foram inoculados duas vezes, via intraperitoneal, com 0,5 mL de PBS (Controle, *score* 0) ou pristane (PIA, *score* 12). Em {A,B,C} observa-se no timo controle a área do córtex (C) (densidade maior de linfócitos) e medula (M) (presença de linfócitos mais dispersos) bem preservadas. Em {D,E,F,G} observa-se o timo de camundongo com artrite induzida por pristane com diminuição das áreas de córtex e expansão da área medular caracterizando Hiperplasia Tímica Folicular. Em {G} observa-se a presença de edema e hemorragia no timo após PIA (aum. 400x). Aumento do original de 40x, 100x e 400x, respectivamente. Coloração H/E

4.7.4 *Análise do pulmão*

Os pulmões dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} submetidos à PIA por 180 dias, receberam 4,5 mL de PBS pelo ventrículo esquerdo. Em seguida, os pulmões foram retirados da cavidade torácica e acondicionados em frascos contendo formol tamponado a 10%. As amostras foram fixadas por 24 horas e, em seguida, foram processadas para histologia.

Os pulmões dos camundongos artríticos apresentaram tonalidade mais escura com a presença de pontos hemorrágicos quando comparados aos pulmões dos animais controle (injetado i.p com PBS). (**Figura 23**).

A histopatologia do pulmão dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} artríticos (180 dias após PIA) mostrou áreas com focos de hemorragia no parênquima. Havia presença de infiltrado inflamatório mononuclear perivascular (**Figura 25**).

Entretanto, cabe ressaltar que a injeção de pristane i.p. causou alterações no parênquima pulmonar de animais das sublinhagens que não apresentaram inchaço na pata, ou seja, com *score* de artrite nulo (*score* 0) evidenciando que essas alterações no pulmão em parte são desencadeadas pelo óleo mineral (**Figura 25 D-E; 25 I-J**) e que pode contribuir para a gravidade da artrite induzida por pristane.

Alelos RR

Alelos SS

Figura 25. Histopatologia do pulmão de camundongos injetados com pristane. Camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} foram inoculados duas vezes, via intraperitoneal, com 0,5mL de pristane (PIA). Nos pulmões dos AIRmax^{RR} {A,B,C} e AIRmax^{SS} {F,G,H} ambos com *score* da artrite= 12, observam-se focos hemorrágicos e infiltrado inflamatório perivascular, predominantemente mononuclear. Aumento do original de 40x, 100x e 400x, respectivamente. Em {D,E} e {I,J} observam-se os pulmões dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} respectivamente, ambos com *score* = 0, com áreas de foco hemorrágico e infiltrado inflamatório mononuclear perivascular. Aumento do original de 40x e 100x. Coloração H/E.

5 DISCUSSÃO

A artrite reumatoide (RA) é uma desordem crônica que afeta as articulações e leva a destruição da cartilagem e dos ossos. Vários estudos têm avaliado os mecanismos envolvidos na RA, porém os responsáveis por esta injúria não foram totalmente esclarecidos. Esta doença autoimune afeta mais mulheres do que homens na proporção de 3:1 respectivamente; pacientes com a idade mais avançada podem apresentar maior comprometimento das articulações (LAURINDO et al., 2002).

Inicialmente, o gene *Slc11a1* foi descrito como *Ity/Lsh/Bcg* e posteriormente como *Nramp1*. Este gene possui alelos que estão relacionados com a resistência (*Slc11a1^R*) ou suscetibilidade (*Slc11a1^S*) à infecção por *Salmonella* Typhimurium, *Leishmania donovani*, *Mycobacterium bovis* (BCG) e *Mycobacterium lepraemurium* (BLACKWELL et al., 2000). A proteína SLC11a1 está localizada no compartimento endossomal/lisossomal de macrófagos (GRUENHEID et al., 1997; SEARLE et al., 1998), de células dendríticas mielóides (STOBER et al., 2007) e também nos grânulos terciários de neutrófilos (CANONNE-HERGAUX et al., 2002; CELLIER et al., 1997), transportando ferro e outros cátions divalentes (BLACKWELL et al., 2000; KHUN et al., 1999). Diferentes interações celulares podem ser desencadeadas pelos fagócitos durante a artrite. Entretanto, não se sabe quais consequências a presença do alelo *S* do gene *Slc11a1*, responsável pela síntese de uma proteína não funcional, pode interferir, com relação ao padrão de ativação dos macrófagos bem como de outros tipos celulares no fenótipo da artrite. Com o intuito de esclarecer a interação do gene *Slc11a1* com o padrão de resistência/suscetibilidade à artrite, analisamos os animais da sublinhagem AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} submetidos ao protocolo de indução de artrite por pristane (PIA) em diferentes períodos (2, 7 e 14 e 180 dias).

O pristane não é tóxico para os camundongos visto que o percentual de sobrevivência (73% em AIRmax^{RR} e 86% AIRmax^{SS}) foi semelhante e o peso dos animais não se alterou ao longo dos 180 dias de tratamento em relação a animais não tratados.

O número total de células presente no compartimento peritoneal dessas sublinhagens foi avaliado durante a cinética da PIA. Nessa análise observamos que há aumento de células 2 dias após PIA nos AIRmax^{SS} seguido de queda aos 7 e 14 dias após o tratamento com pristane nos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. A nossa hipótese é que essa diminuição de células pode estar relacionada com a formação de granulomas de óleo, e estes podem estar recrutando células ao peritônio. Potter e Maccardle (1964) verificaram que após alguns dias da injeção de pristane, volumes pequenos de pristane são fagocitados por macrófagos enquanto a maior parte deste

óleo é circundada por leucócitos inflamatórios que formam agregados de células que aderem à superfície do peritônio, especialmente ao mesentério. Eventualmente, o mesotélio cresce sobre o agregado óleo-célula formando um granuloma de óleo que se deposita na superfície mesentérica e permanece enquanto existir óleo disponível. Estes granulomas consistem de linfócitos, neutrófilos e células B (CHEN et al., 2010; POTTER; MACCARDLE, 1964)

Ghosn et al. (2010) observaram em camundongos BALB/c adultos, que 40% das células presentes na cavidade peritoneal correspondem a linfócitos B. As células remanescentes no peritônio (não linfócitos B) em sua maioria coexpressam CD11b e F4/80 portanto são apropriadamente caracterizadas como macrófagos. Entre as células não B estão populações minoritárias como células dendríticas (CD11c⁺), granulócitos (eosinófilos e mastócitos) e linfócitos T, NK e NKT. Ainda neste estudo, os autores sugerem que duas subpopulações de macrófagos podem ser caracterizadas pelo seu tamanho e complexidade sendo denominadas *Large peritoneal macrophage* (F4/80^{high}) e *Small peritoneal macrophage* (F4/80^{low}) e apresentam funções diferentes. Essas subpopulações de macrófagos (LPM e SPM) foram encontradas em outras linhagens analisadas: BALB/c, C57BL/6, 129/S6, FVB/N, SJL/J e RAG^{-/-} (GHOSN et al., 2010).

No intuito de caracterizar os tipos celulares presentes no peritônio dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} antes e após o estímulo por pristane, realizamos a contagem total e diferencial das células. A injeção de pristane alterou o perfil de células peritoneais resultando na redução no número de macrófagos ao longo da cinética e infiltração de neutrófilos e linfócitos 180 dias após o tratamento na linhagem AIRmax^{SS}. Para uma caracterização mais detalhada do fenótipo das populações celulares presentes desde a fase inicial até a tardia da PIA realizou-se o ensaio de citometria de fluxo. Nas sublinhagens foi observada a presença de monócitos residentes (Gr1^{neg}CD11b⁺). Esta população diminuiu significativamente nos AIRmax^{SS} aos 2, 7 e 180 dias após PIA. Entretanto, houve aumento de neutrófilos (Gr1^{high}CD11b⁺) que infiltraram nos AIRmax^{SS} 180 dias após PIA. Nas articulações de pacientes com artrite reumatoide, a presença de infiltrado neutrofílico contribui para o agravamento da doença por causar dano ao tecido devido à liberação citocinas pró-inflamatórias, ânions O₂⁻ e H₂O₂ (KASAMA et al., 2005; KITSIS; WEISSMANN, 1991; NURCOMBE; BUCKNALL; EDWARDS, 1991a, 1991b).

Com relação ao perfil de macrófagos peritoneais encontramos 4 subpopulações em estágios diferentes de ativação, com os seguintes fenótipos: F4/80^{high}CD11b^{high}, F4/80^{int}CD11b^{int}, F4/80^{low}CD11b^{int} e F4/80^{low}CD11b^{low}. Constitutivamente, essas subpopulações estão presentes em maior número na linhagem AIRmax^{SS} e diminuem ao longo

da cinética da PIA. Entretanto, há aumento significativo de células $F4/80^{\text{low}}CD11b^{\text{int}}$ na fase crônica da artrite. Ghosn et al. (2010) também observaram em camundongos BALB/c essa mudança de fenótipo $F4/80CD11b$, de *high* para *low* nas moléculas de superfície, após injetar LPS ou tioglicolato na cavidade peritoneal indicando as fases de ativação dos macrófagos frente ao estímulo.

Stasiuk et al. (1997) observaram em camundongos CBA/Ig^b um influxo de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e linfócitos B na cavidade peritoneal durante a evolução da PIA. Demonstraram ainda, que o desenvolvimento da artrite é dependente de células TCD4 em seu modelo. Em nosso modelo as células TCD4 diminuíram significativamente nos AIRmax^{SS} nos períodos iniciais da PIA. Entretanto, aos 180 dias após tratamento com pristane foi identificado aumento de linfócitos TCD4 e TCD8 que infiltraram no microambiente peritoneal contribuindo para o fenótipo da suscetibilidade desses camundongos e ainda, corroborando o papel dos linfócitos T na artrite.

Existem dois tipos de linfócitos B, que são denominados B1 e B2. As células B1 constituem uma fração pequena da população de linfócitos B no baço e não são detectados nos linfonodos. Entretanto, estas células são encontradas principalmente na cavidade peritoneal, na pleural e estão associadas ao processo de reparo tecidual (OLIVEIRA et al., 2010). Os linfócitos B1 expressam níveis altos de IgM e níveis baixos de B220 e IgD e ainda, não expressam CD23 (HERZENBERG et al., 1986). Segundo os estudos de Kantor et al. (1992, 1993), as células B1 podem ser subdivididas em B1a ($CD5^+$) e B1b ($CD5^-$). Já as células B2 expressam CD23, $B220^{\text{high}}$, IgD e IgM^{low} (Herzenberg et al., 1986). Alguns trabalhos relacionam a participação de subpopulações de células B no desenvolvimento da artrite reumatoide devido a autorreatividade dos anticorpos da classe IgM (HSU et al., 2008; TOMINAGA et al., 1991). Na cavidade peritoneal de camundongos AIRmax^{RR} foi observado aumento significativo de células B aos 14 e 180 dias após PIA em relação controle, com predomínio de células B1($CD19^+CD23^-$) infiltradas. Almeida et al. (2001) mostraram que células B1b são capazes de migrar da cavidade peritoneal para sítios inflamatórios distantes e que essas células são capazes de se diferenciar *in vitro* e *in vivo* (POPI et al., 2009) em fagócitos mononucleares.

A análise das citocinas pró e anti-inflamatórias no soro bem como no sobrenadante da cultura de macrófagos de camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} por meio da técnica do Multiplex mostrou que mediante ao estímulo do pristane há grande variação na produção, sendo esta significativa para a maioria das citocinas analisadas quando comparadas aos

animais controle. Diferenças entre as sublinhagens também foram encontradas com relação à produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17 e TGF- β .

As citocinas inflamatórias, TNF α (*Tumor necrosis factor alpha*), IL-1 β e IL-6 são produzidas por vários tipos celulares, principalmente por macrófagos e mastócitos teciduais. Tais citocinas atuam na resposta inflamatória local assim como na ativação de células endoteliais, leucócitos e também na resposta sistêmica com a indução de proteínas de fase aguda (fígado) e de febre via sistema nervoso central (FILIPPIS et al., 2008; MEDZHITOV, 2008). Níveis séricos altos de TNF- α e IL-6 foram encontrados em camundongos AIRmax^{SS} na fase crônica da artrite (período 180 dias). Não foi detectada diferença significativa da citocina IL-1 β sérica entre as linhagens nos períodos avaliados.

A IL-10 é uma citocina imunorregulatória, pois uma de suas principais funções é inibir a produção de IFN- γ (por macrófagos, monócitos e NK) e IL-12, assim inibindo a resposta Th1. Além disso, IL-10 limita a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IL-18, IL-1 α e β , e quimiocinas como MCP-1 e MIP-2 (TAYLOR et al., 1997). Segundo Wong et al. (2010), células B-1 presentes na cavidade peritoneal são grandes produtoras de IL-10 (GARY-GOUY et al., 2002) que por sua vez, podem influenciar a expressão gênica de *Tnf*, *Il1* e *Ccl3* nos macrófagos. O aumento de células B1 infiltradas na cavidade peritoneal dos AIRmax^{RR} 180d após PIA pode sugerir que estas células seriam as responsáveis por secretar IL-10 e limitar a produção sérica de TNF- α , IL-6 e IL-1 β nos AIRmax^{RR} na fase crônica da artrite quando comparada aos AIRmax^{SS}. Por outro lado, alguns estudos enfatizam que a IL-10 não deve ser considerada como anti-inflamatória na artrite reumatoide, pois o macrófago em resposta a esta citocina imunorregulatória pode induzir a expressão/ativação exacerbada de IFN- γ (ARUMUGAM et al., 2004; CECKA, et al., 1998). Isto explicaria a ineficácia da terapia de IL-10 na artrite (ANTONIV; IVASHKIV, 2006).

Existem subpopulações de linfócitos TCD4⁺ caracterizadas pelo perfil de citocinas que secretam no microambiente sendo denominadas: Th1, Th2 ou Th17. Este padrão de diferenciação é determinado no início da resposta imune após o estímulo. As células Th17 são produtoras de IL-17 e têm sido associadas ao desenvolvimento da artrite reumatoide e lúpus (AGGARWAL; GURNEY, 2002). Segundo Nakae e colaboradores (2003), camundongos deficientes de IL-17R mostraram-se resistentes à artrite induzida por colágeno. Embora tenha sido detectado níveis elevados de IL-6 e TGF- β nos AIRmax^{SS}, o que poderia favorecer a polarização de células Th0 para Th17, a produção de IL-17 por estes animais não foi significativa. Entretanto, os camundongos AIRmax^{RR} 7 dias após a PIA produziram níveis elevados no soro de IL-17 que foram controlados ao longo da cinética.

Os macrófagos têm grande participação nas fases aguda e crônica da artrite. Para elucidar o perfil de ativação dos macrófagos na artrite induzida por pristane coletamos os sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais de AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} em diferentes períodos após a injeção de pristane. Este ensaio mostrou que os macrófagos AIRmax^{SS} constitutivamente secretam mais IL-1 β , TNF- α , IL-6 que os macrófagos AIRmax^{RR}. Essa diferença interlinhagens também é observada no período de 180 dias para estas citocinas. Nos AIRmax^{SS} 2 dias após PIA há um aumento significativo nos níveis de IL-1 β , IL-10 secretadas pelos fagócitos peritoneais.

A produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 em cultura/soro foi menor nos animais AIRmax^{RR} quando comparados com os animais mais suscetíveis a artrite. Isso pode sugerir que esses animais são capazes de controlar melhor a produção de citocinas pró-inflamatórias e assim não há necessidade de produzir quantidades excessivas de TGF- β . Esse controle pode estar relacionado com a presença do alelo *R* do gene *Slc11a1* que codifica uma proteína funcional presente nos macrófagos e neutrófilos.

Por outro lado, não podemos descartar a participação de células T reguladoras neste modelo visto que citocinas (TGF- β e IL-10) relacionadas com essa população foram identificadas no soro em AIRmax^{SS} em quantidade significativa. Entretanto, novos ensaios específicos devem ser efetuados para determinar a participação dessa população em nosso modelo.

O óxido nítrico é produzido pela ação da iNOS por células como os macrófagos, fibroblastos sinoviais, osteoblastos e condrócitos, sobre a influência de endotoxinas (LPS) e citocinas pró-inflamatórias tais como a IL-1 e TNF- α durante a inflamação das articulações (GRABOWSKI; MACPHERSON; RALSTON, 1996; SAKURAI et al., 1995; STEFANOVIC et al., 1994). As células peritoneais das duas sublinhagens produziram pouco NO espontaneamente. Na presença de LPS, a produção de NO aumentou em AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} nos diferentes períodos analisados. Cabe ressaltar que aos 7 e 180 dias, os macrófagos estimulados com LPS dos animais AIRmax^{SS} produziram mais óxido nítrico que os dos AIRmax^{RR}.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são liberadas durante a resposta inflamatória e podem regular a sobrevivência das células (WON et al., 2010). Em condições de estresse oxidativo, a superóxido dismutase (SOD) atua endogenamente no sistema de defesa da célula que degrada o íon O₂⁻ em oxigênio e H₂O₂. A presença de H₂O₂ é importante para a resolução da inflamação neutrofílica durante a artrite induzida por antígeno (LOPES et al., 2011). Em nosso modelo de PIA, níveis significativos de H₂O₂ aos 14 e 180 dias após PIA foram

liberados espontaneamente pelos macrófagos de AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. Quando estimulados com PMA, a liberação de H₂O₂ aumentou em AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} nos diferentes períodos analisados. Cabe ressaltar que aos 7, 14 e 180 dias, os AIRmax^{SS} liberaram mais peróxido de hidrogênio que os AIRmax^{RR}. Estes dados sugerem que a produção baixa de NO e também a menor liberação de H₂O₂ pelos AIRmax^{RR} durante todo o protocolo de PIA pode contribuir com fenótipo de maior resistência à artrite observado nestes animais, em que apenas 29,4% dos animais AIRmax^{RR} desenvolveram artrite aos 150 dias, com *score* médio de gravidade de artrite duas vezes menor que os AIRmax^{SS} (PETER et al., 2007).

Ainda com o intuito de investigar a influência dos alelos do gene *Slc11a1* na ativação dos macrófagos durante a PIA, realizamos o ensaio de *PCR Array*. Esta técnica possibilitou avaliar o perfil de expressão dos genes que codificam fatores quimiotáticos nos macrófagos de animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. Na análise comparativa de AIRmax^{RR} com PIA *versus* controle, observou-se modulação significativa de 35 genes sendo 31 reprimidos e 4 genes ativados. Dentre eles destacam-se: aumento de expressão de *Cxcr2* (42,6 vezes) e diminuição de *Cxcl1* (-179,37 vezes), *Cxcl3* (-68,35 vezes) e *Il6* (-186,47 vezes), os quais estão relacionados com a resposta inflamatória, regulação da produção de O₂⁻ e H₂O₂ e também com a quimiotaxia de neutrófilos. Na análise de macrófagos de AIRmax^{SS} com PIA *versus* controle, observamos aumento significativo da expressão de 18 genes e somente 3 genes foram reprimidos. Dentre os vários genes ativados estão: *Ccl12* (142,21 vezes), *Ccl8* (53,7 vezes), *Fpr1* (245,05 vezes) e *Cxcr1* (17,35 vezes) os quais estão relacionados com a quimiotaxia de monócitos/macrófagos e resposta inflamatória. O perfil de ativação dos genes demonstrado pelos AIRmax^{SS} pode contribuir para a maior suscetibilidade a artrite enquanto os AIRmax^{RR} regulam negativamente a quimiotaxia dificultando a instalação da artrite, mesmo em camundongos com fundo genético selecionado para a alta inflamação.

As regiões cromossômicas associadas a caracteres quantitativos são denominadas QTL, provenientes do inglês *Quantitative Trait Loci*. Estas regiões podem ser detectadas por marcadores genéticos dispersos pelo genoma e a sua associação com fenótipos estudados pode ser analisada por programas de mapeamento de QTL. O mapeamento destes QTL possibilita estimar a localização de genes que controlam a variação fenotípica de um caráter, a magnitude de seus efeitos e as interações com os outros QTLs (PATERSON et al., 1996). Dois novos QTL da PIA (*Prtia2* e *Prtia3*) foram encontrados pelo nosso grupo no modelo de camundongos AIRmax e AIRmin, nos cromossomos 5 e 8, respectivamente. Outros três QTL sugestivos foram detectados nos cromossomos 7, 17 e 19 (DE FRANCO et al., 2014). O primeiro *locus* da PIA detectado em camundongos foi *Prtia1* (pelo nosso grupo) no

cromossomo 3 usando animais selecionados para alta ou baixa produção de anticorpos (JENSEN et al., 2006). QTL nos cromossomos 5 e 8 também foram detectados em dois outros modelos de artrite (artrite induzida por colágeno ou por proteoglicano) (GLANT et al., 2004), sugerindo a importância desse bloco de genes relacionados com a suscetibilidade a artrite. De Franco et al. (2014) ainda observaram que camundongos AIRmax^{SS} apresentam expressão elevada dos genes *Hmox1*, *Msr1*, *Cxcl1*, *Cxcl9*, *Cxcl5* e *Cxcl13* nas patas afetadas pela PIA em relação aos AIRmax^{RR}, sugerindo a interação destes genes com o *Slc11a1*. Os resultados obtidos no ensaio *PCR Array* reforçam o papel das quimiocinas que são altamente expressas nos AIRmax^{SS} regulando o recrutamento de monócitos/macrófagos e neutrófilos adicionais à cavidade peritoneal, caracterizando como expressão gênica específica desta linhagem que favorece a artrite. Interessante destacar ainda que nestes ensaios houve uma concentração de genes de quimiocinas do tipo CXCL, quimiotáticas para granulócitos, que foram reprimidos nos AIRmax^{RR} em decorrência do tratamento com pristane. Estes genes mapeiam na região de um dos QTL de artrite localizado na região distal do cromossomo 5. A expressão diferencial e agrupamento de genes localizados no QTL, que havia sido mapeado anteriormente por marcadores de polimorfismo de DNA, reforça a importância dos fatores genéticos situados nesta região cromossômica, na modulação da PIA.

Para caracterizar os possíveis danos teciduais desencadeados durante fase crônica da artrite induzida por pristane foram realizadas as análises histopatológicas da pata, rim, pulmão, timo, baço e linfonodos poplíteos dos animais submetidos à PIA. A linhagem mais acometida pela artrite foi a dos AIRmax^{SS} caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório na pata, com predomínio de células mononucleares, perda da organização estrutural da articulação, invasão da cavidade articular e destruição da cartilagem adjacente. Dentre as células infiltradas alguns eosinófilos estavam presentes. O acúmulo de eosinófilos pode levar a destruição do tecido devido à liberação de vários mediadores inflamatórios. Bockermann e Holmdahl (2007) demonstraram no modelo de indução de artrite por colágeno sem adjuvante que os eosinófilos induzem artrite, via dependente de IL-5 e ainda, que estas células estão relacionadas com a severidade desta autoimunidade. A baixa incidência/severidade de artrite observada em animais AIRmax que carregam o alelo *R* em homozigose pode ser ainda influenciada pela ausência do componente C5 do sistema complemento nestes animais (AMANO et al., 2009).

Segundo Montenegro e Rocha (2009), a artrite reumatoide é uma doença inflamatória sistêmica que, além do característico acometimento poliarticular, pode envolver, direta ou indiretamente, outros órgãos e tecidos. Dentre as características “não articulares” da artrite,

podemos distinguir as clássicas manifestações extra-articulares secundárias ao seu processo imunopatológico, como por exemplo: nódulos reumatoides; manifestações hematológicas (anemia); envolvimento cardíaco (pericardite presente em 50% dos pacientes com artrite reumatoide) e também o comprometimento renal. A presença destas manifestações sistêmicas constitui um indicador de mau prognóstico, conferindo mortalidade cinco vezes maior em relação aos pacientes sem alterações extra-articulares (TURESSON; MATTESON, 2008). Em nosso modelo de PIA, identificamos alterações significativas nos rins, pulmões e timo das duas sublinhagens.

Com relação ao comprometimento renal observou-se a presença de infiltrado intersticial focal mononuclear, cilindros hialinos no lúmen tubular e também um espessamento discreto na membrana basal dos capilares glomerulares. Os cilindros hialinos correspondem às proteínas do plasma filtradas no glomérulo e condensadas na luz tubular. Estas estruturas são comuns a várias doenças renais e a sua presença indica que o glomérulo está mais permeável que o habitual. Níveis elevados de creatinina estavam presentes nos soros dos camundongos AIRmax^{SS} com PIA. Estudos relatam que pacientes com artrite reumatoide podem apresentar glomerulonefrite, nefrite aguda, lúpus eritematoso sistêmico, nefropatia diabética ou doença renal crônica como manifestações secundárias à artrite descritas pelos reumatologistas (MONTENEGRO et al., 2009; TURESSON; MATTESON, 2008). Segundo Karras et al. (2005) a incidência de glomerulopatias no indivíduo pode estar associada com a presença de timoma ou hiperplasia tímica e ainda, lesões glomerulares podem ocorrer mesmo alguns anos após timectomia.

O microambiente especializado gerado pelo timo promove a proliferação, diferenciação, rearranjo gênico do receptor de TCR e a seleção do repertório de células T (ANDERSON; TAKAHAMA, 2012). Ao todo, 95% dos precursores de células T são deletados no timo (AKIRAV; RUDDLE; HEROLD, 2010; SCOLLAY; BUTCHER; WEISSMAN, 1980). Vários métodos para prevenir a ativação de células T autorreativas na periferia do timo são promovidos pelo sistema imune, tais como: inibição da expressão de receptores (ex: CTLA-4); limite de disponibilidade de fatores de crescimento (ex: IL-2); restrição de moléculas coestimulatórias para ativação (ex: CD80); produção de citocinas inibitórias (ex: TGF- β); ou ainda inibição de células T reguladoras (AKIRAV; RUDDLE; HEROLD, 2010). A falha na tolerância ao próprio leva a doenças autoimunes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012), como diabetes, artrite reumatoide e o lúpus eritematoso sistêmico que destacam as múltiplas interações genéticas e ambientais (GREGERSEN; BEHRENS, 2006).

De acordo com a literatura, o timo mantém o seu tamanho até a idade jovem adulta e posteriormente, regride por atrofia (KRINKE, 2004). Entretanto, o timo dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} (com *score* 0 ou 12) aumentaram significativamente após 180 dias após tratamento com pristane, caracterizando hiperplasia tímica folicular. Nos AIRmax^{SS} com *score* 12, o timo era ainda maior que dos AIRmax^{RR} após o tratamento com pristane inferindo a participação do gene *Slc11a1* nesse processo. A Hiperplasia Tímica Folicular é ocasionada quando há compressão e atrofia do córtex provocado pela expansão dos folículos linfóides. A nossa hipótese é que o *background* inflamatório associado ao tratamento com pristane nesses camundongos promova a indução de clones de células T autorreativas em tecido tímico anormal ou a supressão de células T reguladoras gerando a perda de controle sobre a resposta imune nesse microambiente, principalmente nos AIRmax^{SS}. Esta alteração também é observada na maioria dos pacientes com Miastenia grave, e em alguns casos ocorrem em outras doenças autoimunes, como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e a Artrite Reumatoide (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1986).

As manifestações extra-articulares são comuns em 40% dos indivíduos com artrite reumatoide (TURESSON et al., 2003), conferindo maior severidade à doença e mortalidade excessiva dos pacientes com RA. A doença pulmonar intersticial (DPI) está entre as manifestações secundárias a RA e responsáveis pelo aumento da mortalidade (BONGARTZ et al., 2010; BROWN et al., 2007; OLSON et al., 2011; OSTOR et al., 2006; WOLFE; CAPLAN; MICHAUD, 2007). Assim, indivíduos com evidência clínica de DPI apresentam risco de morte três vezes maior que pacientes com RA sem esta manifestação extra-articular. O soro destes pacientes apresenta níveis elevados de MMP-7 e IP/CXCL10 que podem funcionar como biomarcadores (CHEN et al., 2014). De acordo com a literatura, aproximadamente 30-55% dos indivíduos assintomáticos para RA têm evidências de anormalidades no interstício pulmonar (CHEN et al., 2013, 2014).

Os pulmões dos camundongos artríticos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} apresentaram tonalidade mais escura com a presença de pontos hemorrágicos quando comparados ao animais controle. A análise histopatológica do pulmão desses animais mostrou áreas com focos de hemorragia no parênquima e presença de infiltrado inflamatório mononuclear perivascular. A injeção de pristane i.p. causou alterações no parênquima pulmonar de animais das sublinhagens independente do *score* da artrite evidenciando que essas alterações no pulmão em parte são desencadeadas pelo óleo mineral e contribuem para o desenvolvimento da artrite. A habilidade do pristane em induzir hemorragia alveolar difusa também foi observada em camundongos C57BL/6 (B6) e B10 com Lupus Eritematoso Sistêmico e é

dependente do fundo genético da linhagem (BARKER et al., 2011). Todos os animais C57BL/10 após tratamento com pristane desenvolveram lesão pulmonar com infiltrado perivascular de macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos e não houve deposição de imunocomplexo (CHOWDHARY et al., 2007).

A hemorragia observada no pulmão (focos hemorrágicos) e no timo (hemorragia difusa) das sublinhagens após PIA é órgão específica e não devido a alguma alteração na permeabilidade vascular *in vivo*. Outros órgãos amplamente irrigados foram examinados como o baço, os rins e os linfonodos. Estes órgãos não apresentaram hemorragia comprovando que o pristane não provoca alteração generalizada de células endoteliais.

Neste contexto, os dados obtidos mostram que o infiltrado inflamatório induzido pelo pristane na cavidade peritoneal na linhagem suscetível AIRmax^{SS} é mais intenso do que na linhagem AIRmax^{RR}, com maior número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos na fase crônica. Há ativação dos macrófagos AIRmax^{SS} que expressam/secretam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas propiciando um ambiente peritoneal constantemente ativado contribuindo com a incidência/severidade da artrite (degradação da cartilagem). Por outro lado, níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e creatinina estão reduzidos nos AIRmax^{RR}, sendo estes animais capazes de regular a intensidade de ativação do macrófago de forma mais eficiente do que os com genótipo SS e controlar o desenvolvimento da artrite. Entretanto, há acometimento do rim, pulmão e timo nas duas linhagens injetadas com pristane, porém em menor intensidade nos AIRmax^{RR}. Nossos dados sugerem que o gene *Slc11a1* modula a ativação do macrófago nas linhagens com consequências na evolução da artrite reumatoide. Este modelo murino demonstra a importância do polimorfismo deste gene no estudo da PIA.

6 CONCLUSÃO

Com base nas observações obtidas até o momento concluímos que há participação do gene *Slc11a1* na modulação da expressão/ativação dos macrófagos peritoneais na suscetibilidade a autoimunidade. Os macrófagos AIRmax^{SS} apresentam perfis de ativação gênica e celular exacerbados, como a produção de NO, H₂O₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α , MIP-2 e várias quimiocinas, que favorecem a resposta inflamatória crônica. Entretanto, na presença do alelo *R* a ativação celular bem como a produção desses metabólitos é menor, com predomínio de uma resposta aguda. Além disso, há acometimento dos rins, pulmões e timo durante a PIA. Este modelo reproduz as alterações celulares, moleculares e histológicas da artrite reumatoide. Portanto, pode servir como ferramenta para melhorar a compreensão dos mecanismos de interação gênica e auxiliar na busca de biomarcadores interessantes para o direcionamento das pesquisas clínicas e futuras terapias para a artrite reumatoide.

REFERÊNCIAS¹

- ABBAS, A. K.; LITCHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 283-318, 1984.
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 593-623, 1999.
- AGGARWAL, S.; GURNEY, A. L. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. **J. Leukoc. Biol.**, v. 71, p. 1-8, 2002.
- AHARON MAOR, A.; SHOENFELD, Y. The role of ultraviolet light, sun and fluorescent light in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Harefuah**, v. 135, p. 295-299, 1998.
- AKIRAV, E. M.; RUDDLE, N. H.; HEROLD, K. C. The role of AIRE in human autoimmune disease. **Nat Rev. Endocrinol.**, v. 7, p. 25-33, 2010.
- ALBINA, J. E.; ABATE, J. A.; MASTROFRANCESCO, B. Role of ornithine as a proline precursor in healing wounds. **J. Surg. Res.**, v. 1, p. 55-97, 1993.
- ALMEIDA, S. R.; AROEIRA, L. S.; FRYMULLER, E.; DIAS, M. A.; BOGSAN, C. S.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. **Int. Immunol.**, v. 13, p. 1193-1201, 2001.
- ALONZI, T.; FATTORI, E.; LAZZARO, D.; COSTA, P.; PROBERT, L.; KOLLIAS, G.; DE BENEDETTI, F.; POLI, V.; CILIBERTO, G. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. **J. Exp. Med.**, v. 187, n. 4, p. 461-468, 1998.
- AMANO, M. T.; CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; DE FRANCO, M.; IBÁÑEZ, O. M.; ISAAC, L.; STAROBINAS, N. A new model of outbred genetically selected mice which present a strong acute inflammatory response in the absence of complement component C5. **Inflamm. Res.**, v. 58, p. 204-209, 2009.
- AMITAL, H.; GERSHWIN, M. E.; SHOENFELD, Y. Reshaping the mosaic of autoimmunity. **Editorial. Semin. Arthritis Rheum.**, v. 35, p. 341-343, 2006.
- ANDERSON, G.; TAKAHAMA, Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. **Trends Immunol.**, v. 33, p. 256-263, 2012.

¹ De acordo com:

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

ANTONIV, T. T.; IVASHKIV, L. B. Dysregulation of interleukin-10 dependent gene expression in rheumatoid arthritis synovial macrophages. **Arthritis Rheum.**, n. 54, p. 2711–2721, 2006.

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

ARUMUGAM, T. V.; SHIELS, I. A.; WOODRUFF, T. M.; GRANGER, D. N. TAYLOR, S. M. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. **Shock**, v. 21, n. 5, p. 401-409, 2004.

ATKINSON, P. G.; BARTON, C. H. High level expression of Nramp1G169 in RAW264.7 cell transfectants: analysis of intracellular iron transport. **Immunology**, v. 96, p. 656-662, 1999.

BARKER, R. N.; WELLS, A. D.; GHORAISHIAN, M. Expression of mammalian 60 kD heat shock protein in the joints of mice with pristane-induced arthritis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 103, p. 83-88, 1996.

BARKER, T. T.; LEE, P. Y.; KELLY-SCUMPIA, K. M.; WEINSTEIN, J. S.; NACIONALES, D. C.; KUMAGAI, Y.; AKIRA, S.; CROKER, B. P.; SOBEL, E. S.; REEVES, W. H.; SATOH, M. Pathogenic role of B cells in the development of diffuse alveolar hemorrhage induced by pristane. **Lab. Invest.**, v. 91, n. 10, p. 1540-1545, 2011.

BEDWELL, A. E.; ELSON, C. J.; HINTON, C. E. Immunological involvement in the pathogenesis of pristane-induced arthritis. **Scand. J. Immunol.**, v. 25, p. 393–398, 1987.

BEZERRA, M. M.; BRAIN, S. D.; GREENACRE, S.; JERÔNIMO, S. M. B.; MELO, L. B.; KEEBLE, J.; ROCHA, F. A. C. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, n. 1, p. 172-182, 2004.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAUJO, M. L.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. K.; SANT'ANNA, O. A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 337–346, 1998.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 10, p. 889-896, 2010.

BOCKERMANN, R.; HOLMDAHL, R. Type II collagen without adjuvant induces eosinophilic arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 540-548, 2007.

BORREGO, A.; PETERS, L. C.; JENSEN, J. R.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H. K.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate Slc11a1 gene (formerly

Nramp1) effects in selected mouse lines. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 12-13, p. 2766-2771, 2006.

BLACKWELL, J. M.; SEARLE, S.; GOSWAMI, T.; MILLER, E. N. Understanding the multiple functions of Nramp1. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 317-321, 2000.

BLOBEL, C. P. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. **Cell**, v. 90, p. 589-592, 1997.

BRESNIHAN, B. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 26, p. 717-719, 1999.

BURMESTER, G. R.; STUHLMÜLLER, B.; KEYSZER, G.; KINNE, R. W. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? **Arthritis Rheum.**, v. 40, p. 5-18, 1997.

CANHAMERO, T.; REINES, B.; PETERS, L. C.; PETERS, L. C.; BORREGO, A.; CARNEIRO, P. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; CABRERA, W. H.; RIBEIRO, O. G.; JENSEN, J. R.; STAROBINAS, N.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Distinct Early Inflammatory Events during Ear Tissue Regeneration in Mice Selected for High Inflammation Bearing Slc11a1 R and S Alleles. **Inflammation**, v. 34, n. 5, p. 303-313, 2011.

CANONNE-HERGAUX, F.; CALAFAT, J.; RICHER, E.; CELLIER, M.; GRINSTEIN, S.; BORREGAARD, N.; GROS, P. Expression and subcellular localization of NRAMP1 in human neutrophil granules. **Blood**, v. 100, p. 268-275, 2002

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M.; STAROBINAS, N. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, v. 40, p. 1571-1579, 2002.

CARVALHO, J. F.; PEREIRA, R. M. R.; SHOENFELD, Y. The mosaic of autoimmunity: the role of environmental factors. **Front. Biosci.**, v. 1, p. 501-509, 2009

CECKA, M. Clinical outcome of renal transplantation. Factors influencing patient and graft survival. **Surg. Clin. North Am.**, v. 78, n. 1, p. 133-148, 1998.

CELLIER, M.; PRIVÉ, G.; BELOUCHI, A.; KWAN, T.; RODRIGUES, V.; CHIA, W.; GROS, P. Nramp defines a family of membrane proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, n. 22, p. 10089-10093, 1995.

CELLIER M.; BELOUCHI, A.; GROS, P. Resistance to intracellular infections: Comparative genome analysis of NRAMP. **Trends Genet.**, v. 12, p. 201-204, 1996.

CELLIER, M.; SHUSTIK, C.; DALTON, W.; RICH, E.; HU, J.; MALO, D.; SCHURR, E.; GROS, P. Expression of the human *Nramp1* gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia. **J. Leukoc. Biol.**, v. 61, p. 96 -105, 1997.

CHEN, H.; LIAO, D.; CAIN, D.; MCLEOD, I.; UEDA, Y.; GUAN, Z.; RAETZ, C.; KELSOE, G. Distinct granuloma responses in C57BL/6J and BALB/cByJ mice in response to pristane. **Int. J. Exp. Path.**, v. 91, p. 460-471, 2010.

CHEN, J.; SHI, Y.; WANG, X.; HUANG, H.; ASCHERMAN, D. Asymptomatic preclinical rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. **Clin. Dev. Immunol.**, 2013, p. 406927, 2013.

CHEN, J.; DOYLE, T. J.; LIU, Y.; AGGARWAL, R.; WANG, X.; SHI, Y.; GE, S. X.; HUANG, H.; LIN, Q.; LIU, W.; CAI, Y.; KOONTZ, D.; FUHRMAN, C.; GOLZARRI, M. F.; LIU, Y.; HATABU, H.; NISHINO, M.; ARAKI, T.; DELLARIPA, P. F.; ODDIS, C. V.; ROSAS, I. O.; ASCHERMAN, D. P. Biomarkers of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. **Arthritis Rheum.**, 2014. doi: 10.1002/art.38904. [Epub ahead of print].

CHOWDHARY, V. R.; GRANDE, J. P.; LUTHRA, H. S.; DAVID, C. S. Characterization of haemorrhagic pulmonary capillaritis: another manifestation of Pristane-induced lupus. **Rheumatology (Oxford)**, v. 46, p. 1405–1410, 2007.

CHOY, E. H. S.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 12, p. 907-916, 2001.

COHEN, A. D.; SHOENFELD, Y. Vaccine-induced autoimmunity. **J. Autoimmun.**, v. 9, p. 699-703, 1996.

CONNOR, J. R.; MANNING, P. T.; SETTLE, S. L.; MOORE, W. M.; JEROME, G. M.; WEBBER, R. K.; TJOENG, F. S.; CURRIE, M. G. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 273, p. 15-24, 1995.

COSTENBADER, K. H.; FESKANICH, D.; MANDL, L. A.; KARLSON, E. W. Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. **Am. J. Med.**, v. 119, p. 503-511, 2006.

CROSA, J. H. Signal transduction and transcriptional and post-transcriptional control of iron regulated genes in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, p. 319-336, 1997.

CUZZOCREA, S.; CHATTERJEE, P. K.; MAZZON, E.; MCDONALD, M. C.; DUGO, L.; DI PAOLA, R.; SERRAINO, I.; BRITTI, D.; CAPUTI, A. P.; THIERMERMANN, C. Beneficial effects of GW274150, a novel, potent and selective inhibitor of iNOS activity, in a rodent model of collagen-induced arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 453, p. 119-129, 2002.

DAHLGREN, J.; TAKHAR, H.; ANDERSON-MAHONEY, P.; KOTLERMAN, J.; TARR, J.; WARSHAW, R. Cluster of systemic lupus erythematosus (SLE) associated with an oil field waste site: a cross sectional study. **Environ. Health**, v. 6, n. 8, 2007.

DAWSON, J. K.; FEWINS, H. E.; DESMOND, J.; LYNCH, M. P.; GRAHAM, D. R. Fibrosing alveolitis in patients with rheumatoid arthritis as assessed by high resolution computed tomography, chest radiography, and pulmonary function tests. **Thorax**, v. 56, p. 622-627, 2001

DE FRANCO, M.; CARNEIRO PDOS, S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; CABRERA, W. K.; IBAÑEZ, O. M. *Slc11a1* (Nramp1) alleles interact with acute inflammation loci to modulate wound-healing traits in mice. **Mamm. Genome**, v. 18, p. 263–269, 2007.

DE FRANCO, M.; COLOMBO, F.; GALVAN, A.; CECCO, L.; SPADA, E.; MILANI, S.; IBAÑEZ, O. M.; DRAGANI, T. A. Transcriptome of normal distinguishes mouse lines with different susceptibility to inflammation and to lung tumorigenesis. **Cancer Letters**, v. 294, p. 187-194, 2010.

DE FRANCO, M.; PETERS, L.C.; CORREA, M.A.; GALVAN, A.; CANHAMERO, T.; BORREGO, A.; JENSEN, J.R.; GONÇALVES, J.; CABRERA, W. H. K.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO, O. G.; DRAGANI, T.; IBAÑEZ, O. M. Pristane-induced arthritis loci interact with the *Slc11a1* gene to determine susceptibility in mice selected for high inflammation. **Plos One**, v. 9, p. 1-10, 2014.

DEIGHTON, C. M.; WALKER, D. J. The familial nature of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 50, n. 1, p. 62-65, 1991.

DE SOUZA, V. R. C.; CABRERA, W. K.; GALVAN, A.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; VORRARO, F.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; DRAGANI, T. A.; IBAÑEZ, O. M. Aryl receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. **Int. J. Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1478-1482, 2008.

DINCISOY, H. P.; WEESNER, R. E.; MACGEE, J. Lipogranulomas in non-fatty human livers: a mineral oil induced environmental disease. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 78, p. 35–41, 1982.

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

EHRICH, W. E.; HALBERT, S. P.; MERTENS, E.; MUDD, S. Mechanism of the augmenting action of mineral oil on antibody production: Tissue Reactions and Antibody Response to Dysentery Vaccine in Saline, and in Saline-Lanolin- Mineral Oil Emulsion. **J. Exp. Med.**, v. 82, p. 343–360, 1945.

FARREL, A. J.; BLAKE, D. R.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 51, p. 1219-1222, 1992.

FERRACIOLI, G.; BRACCI-LAUDIERO, L.; ALIVERNINI, S.; GREMESE, E.; TOLUSSO, B.; DE BENEDETTI, F. Interleukin-1 β and Interleukin-6 in Arthritis Animal Models: Roles in the early phase of transition from acute to Chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. **Mol. Med.**, v. 16, n. 11-12, p. 552-557, 2010.

FIRESTEIN, G. S.; PAINE, M. M.; LITTMAN, B. H. Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metaloproteinases, complement and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and

osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. **Arthritis Rheum.**, v. 34, p. 1094-1105, 1991.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Review. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 356-361, 2003.

FISCHER, O. M.; HART, S.; GSCHWIND, A.; PRENZEL, N.; ULLRICH, A. Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor. **Mol. Cell. Biol.**, v. 24, n. 12, p. 5172–5183, 2004.

FRANZ, J. K.; KOLB, S.; HUMMEL, K. M.; LAHRTZ, F.; NEIDHART, M.; AICHER, W. K.; PAP, T.; GAY, R. E.; FONTANA, A.; GAY, S. Interleukin-16 produced by synovial fibroblasts mediates chemoattraction to CD4⁺ T-cells in rheumatoid arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 2661–2671, 1998.

FU, X.; KASSIM, S. Y.; PARKS, W. C.; HEINECKE, J. W. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 41279–41287, 2001.

GALVAN A.; VORRARO, F.; CABRERA, W.; RIBEIRO, O. G.; PAZZAGLIA, S.; MANCUSO, M.; ZOLIN, A.; MILANI, S.; SARAN, A.; IBÁÑEZ, O. C.; DRAGANI, T. A. Genetic heterogeneity of inflammatory response and skin tumorigenesis in phenotypically selected mouse lines. **Cancer Letters**, v. 295, p. 54-58, 2010.

GARY-GOUY, H.; HARRIAQUE, J.; BISMUTH, G.; PLATZER, C.; SCHIMITT, C.; DALLOUL, A. H. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL10 production. **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4537-4543, 2002.

GHOSN, E. E. B.; CASSADO, A. A.; GOVONI, G. R.; FUKUHARA, T.; YANG, Y.; MONACK, D. M.; BORTOLUCI, K. R.; ALMEIDA, S. R.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **PNA**, v. 107, n. 6, p. 2568-2573, 2010.

GLANT, T. T.; ADARICHEV, V. A.; NESTEROVITCH, A. B.; SZANTO, S.; OSWALD, J. P.; et al. Disease-associated qualitative and quantitative trait loci in proteoglycan-induced arthritis and collagen-induced arthritis. **Am. J. Med. Sci.**, v. 327, p. 188–195, 2004.

GOCHUICO, B. R.; AVILA, N. A.; CHOW, C. K.; NOVERO, L. J.; WU, H. P.; REN, P.; MACDONALD, S. D.; TRAVIS, W. D.; STYLIANOU, M. P.; ROSAS, I. O. Progressive preclinical interstitial lung disease in rheumatoid arthritis. **Arch. Intern. Med.**, v. 168, p. 159-166, 2008.

GOMES, S. M.; APPELBERG, R. Evidence for a link between iron metabolism and Nramp1 gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. **Immunology**, v. 95, p. 165-168, 1998.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.**, vol. 5, n. 12, p. 953-964, 2005.

GOVONI, G.; GAUTHIER, S.; BILLIA, F.; ISCOVE, N. N.; GROS, P. Cell-specific and inducible *Nramp1* gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo. **J. Leukoc. Biol.**, v. 62, p. 277-286, 1997.

GRABOWSKI, P. S.; MACPHERSON, H.; RALSTON, S. H. Nitric oxide production in cells derived from the human joint. **Br. J. Rheumatol.**, v. 35, p. 207-212, 1996.

GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 30, n. 11, p. 1205-1213, 1987.

GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Genetics of autoimmune diseases – disorders of immune homeostasis. **Nat. Rev. Genet.**, v. 7, p. 917-928, 2006.

GRUENHEID, S.; PINNER, E.; DESJARDINS, M.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 717-730, 1997.

HAKKARAINEN, K.; TURUNEN, H.; MIETTINEN, A.; KARPPILIN, M.; KAITILA, K.; JANSOON, E. Mycoplasmas and arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 51, n. 10, p. 1170-1172, 1992.

HAVILAND, D. L.; HAVILAND, J. C.; FLEISCHER, D. T.; WETSEL, R. A. Structure of the murine fifth complement component (C5) gene. A large, highly interrupted gene with a variant donor splice site and organizational homology with the third and fourth complement component genes. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 11818-11825, 1991.

HESSE, M.; BAYRAK, S.; MITCHISON, A. Protective major histocompatibility complex genes and the role of interleukin-4 in collagen-induced arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 3234-3237, 1996.

HERZENBERG, L. A.; STALL, A. M.; LALOR, P. A.; SIDMAN, C.; MOORE, W. A.; PARKS, D. R.; HERZENBERG, L. A. The Ly-1 B cell lineage. **Immunol. Rev.**, v. 93, p. 81-102, 1986.

HOPKINS, S. J.; FREEMONT, A. J.; JAYSON, M. I. V. Pristane-induced arthritis in Balb/c mice. I. Clinical and histological features of the arthropathy. **Rheumatol. Int.**, v. 5, p. 21-28, 1984.

HSU, H. C.; YANG, P.; WANG, J.; WU, Q.; MYERS, R.; CHEN, J.; YI, J.; GUENTERT, T.; TOUSSON, A.; STANUS, A. L.; LE, T. V.; LORENZ, R. G.; XU, H.; KOLLS, J. K.; CARTER, R. H.; CHAPLIN, D. D.; WILLIAMS, R. W.; MOUNTZ, J. D. Interleukin 17 producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 166-175, 2008.

IBAÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; SANT'ANNA, O. A.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M. Genetics of nonspecific immunity. I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 2555-2563, 1992.

JENSEN, J. R.; PETERS, L. C.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H. et al. Involvement of antibody production quantitative trait loci in the susceptibility to pristane-induced arthritis in the mouse. **Genes Immun.**, v. 7, p. 44-50, 2006.

JENSEN, J. R.; GALVAN, A.; BORREGO, A.; CABRERA, W. H.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; DE FRANCO, M.; COLECCHIA, M.; BERTOLOTTI, A.; DRAGANI, T. A.; IBÁÑEZ, O. C. Genetic control of renal tumorigenesis by the mouse Rtm1 locus. **BMC Genomics**, 2013. doi: 10.1186/1471-2164-14-724.

JEONG, H. G.; POKHAREL, Y. R.; LIM, S. C.; HWANG, Y. P.; HAN, E. H.; YOON, J. H.; AHN, S. G.; LEE, K. Y.; KANG, K. W. Novel role of Pin1 induction in type II collagen-mediated rheumatoid arthritis. **J. Immunol.**, v. 183, n. 10, p. 6689-6697, 2009.

JORDAN, F. T. Mycoplasma-induced arthritis in poultry. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 17, n. 7, p. 622-625, 1981.

KANTOR, A. B.; STALL, A. M.; ADAMS, S.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 3320-3324, 1992.

KANTOR, A. B.; HERZENBERG, L. A. Origin of murine B cell lineages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 501-538, 1993.

KAPITÁNY, A.; SZABÓ, Z.; LAKOS, G.; ALEKSZA, M.; VÉGVÁRI, A.; SOÓS, L.; KARÁNYI, Z.; SIPKA, S.; SZEGEDI, G.; SZEKANECZ, Z. Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheumatoid arthritis. **Isr. Med. Assoc. J.**, v. 10, p. 32-36, 2008.

KARRAS, A.; DE MONTPREVILLE, V.; FAKHOURI, F.; GRÜNFELD, J. P.; LESAVRE, O.; GROUPE D'ETUDES DES NÉPHROPATHIES ASSOCIÉES AUX THYMONES. Renal and thymic pathology in thymoma-associated nephropathy: report of 21 cases and review of the literature. **Nephrol. Dial. Transplant**, v. 20, n. 6, p. 1075-1082, 2005.

KASAMA, T.; MIWA, Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M.; KUNKEL, S.L. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 4, n. 3, p. 273-279, 2005.

KATZ, I. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; SUPPA, A. P.; DE SIQUEIRA, D. M.; ROSSATO, C.; DA SILVA, G. B.; JENSEN, J. R.; STAROBINAS, N.; CABRERA, W. H.; DE FRANCO, M.; BORELLI, P.; IBÁÑEZ, O.M.; RIBEIRO, O. G. 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced myelotoxicity differs in mice selected for high or low acute inflammatory response: relationship with aryl hydrocarbon receptor polymorphism. **Int. J. Toxicol.**, v. 33, n. 2, p. 130-42, 2014.

KEYSTONE, E. C.; SCHORLEMMER, H. U.; POPE, C.; ALLISON, A. C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheum.**, v. 20, p. 1397-1401, 1977.

KITSIS, E.; WEISSMANN, G. The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 265, p. 63-72, 1991.

KOBEZDA, T.; GHASSEMI-NEJAD, S.; MIKECZ, K.; GLANT, T. T.; SZEKANECZ, Z. Of mice and men: how animal models advance our understanding of T-cell function in RA. **Nature**, v. 10, p. 160-170, 2014.

KLARESKOG, L.; STOLT, P.; LUNDBERG, K.; KÄLLBERG, H.; BENGTSSON, C.; GRUNEWALD, J.; RÖNNELID, J.; HARRIS, H. E.; ULFGREN, A. K.; RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S.; EKLUND, A.; PADYUKOV, L.; ALFREDSSON, L. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. **Arthritis Rheum.**, v. 54, p. 38-46, 2006.

KRINKE, G. J. Normative histology of organs. In: HEDRICH, H. (Ed.). **The laboratory mouse**. Elsevier, 2004. p. 159-160.

LAGASSE, E.; WEISSMAN, I. L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocyte. **J. Immunol. Methods**, v. 197, p. 139-150, 1996.

LAURINDO, I. M. M. Artrite reumatoide: diagnostico e tratamento. **Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, Porto Alegre, RS, p. 1-14, ago. 2002.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **Am. J. Pathol.**, v. 78, p. 71-100, 1975.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LIU, Y. L.; LIN, H. M.; ZOU, R.; WU, J. C.; HAN, R.; RAYMOND, L. N.; REID, P. F.; QIN, Z. H. Suppression of complete Freund's adjuvant-induced adjuvant arthritis by cobra toxin. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 2, p. 219-227, 2009.

LO, S. K.; EVERITT, J.; GU, J.; MALIK, A. B. Tumor necrosis factor mediates experimental pulmonary edema by ICAM-1 and CD18-dependent mechanisms. **J. Clin. Invest.**, v. 89, p. 981-988, 1992.

LOPES, F.; COELHO, F.M.; COSTA, V. V.; VIEIRA, E. L. M.; SOUSA, L. P.; SILVA, T. A.; VIEIRA, L. Q.; TEIXEIRA, M. M.; PINHO, V. Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis. **Arthritis Rheum.**, vol. 63, n. 9, p. 2651-2660, 2011.

MALO, D.; SKAMENE, E. Genetic control of resistance to infection. **Trends Genet.**, v. 10, p. 365-371, 1994.

MANGIALAIO, S.; STAUB, A.; BENOIST, C.; MATHIS, D. The arthritogenic T cell receptor and its ligand in a spontaneous model of arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 42, p. 2517-2523, 1999.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M., The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.**, v. 25, p. 677–686, 2004.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 14–16, 2007.

MARIA, D. A.; MANENTI, G.; GALBIATI, F.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; GIANNI, B. R.; PETTINICCHIO, A.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA, M.; DRAGANI, T. A.; IBÁÑEZ, O. M. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. **Oncogene**, v. 22, p. 426–432, 2003.

MARTEL-PELLETIER, J.; WELSCH, D. J.; PELLETIER, J. P. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, v. 15, n. 5, p. 805-829, 2001.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 24, p. 428-435, 2008.

MCCACHREN, S. S. Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium. **Arthritis Rheum.**, v. 34, p. 1085-1093, 1991.

MCINNES, I. R.; LEUNG, B. P.; FIELD, M.; WEI, X. Q.; HUANG, F. P.; STURROCK, R. D.; KINNINMONTH, A.; WEIDNER, J.; MUMFORD, R.; LIEW, F. Y. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 1519-1524, 1996.

MIESEL, R.; MURPHY, M. P.; KRÖGER, H. Enhanced mitochondrial radical production in patients with rheumatoid arthritis correlates with elevated levels of tumor necrosis factor alpha in plasma. **Free Radic. Res.**, v. 25, p. 161–169, 1996.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J.; HILL, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J. Immunol.**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000.

MONTENEGRO, R.; ROCHA, A. Manifestações extra-articulares da artrite reumatoide. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 10, n. 3, 2009.

MORGAN, R.; WU, B.; SONG, Z.; WOOLEY, P. H. Immune reactivity to connective tissue antigens in pristane induced arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 31, n. 8, p. 1497-1505, 2004.

MORITA, Y.; GUPTA, R.; SEIDL, K. M.; MCDONAGH, K. T.; FOX, D. A. Cytokine production by dendritic cells genetically engineered to express IL-4: induction of Th2 responses and differential regulation of IL-12 and IL-23 synthesis. **J. Gene Med.**, v. 7, p. 869–877, 2005.

MORT, J. S.; BILLINGTON, C. J. Articular cartilage and changes in arthritis matrix degradation. **Arthritis Res.**, v. 3, p. 337-341, 2001.

MOSS, M. L.; JIN, S. L.; MILLA, M. E.; BICKETT, D. M.; BURKHART, W.; CARTER, H. L.; CHEN, W. J.; CLAY, W. C.; DIDSBURY, J. R.; HASSLER, D.; HOFFMAN, C. R.;

KOST, T. A.; LAMBERT, M. H.; LEESNITZER, M. A.; MCCAULEY, P.; MCGEEHAN, G.; MITCHELL, J.; MOYER, M.; PAHEL, G.; ROCQUE, W.; OVERTON, L. K.; SCHOENEN, F.; SEATON, T.; SU, J. L.; BECHERER, J. D. et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . **Nature**, v. 385, p. 733-736, 1997.

NAGASE, H.; KASHIWAGI, M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. **Arthritis Res. Ther.**, v. 5, p. 94-103, 2003.

NAKAE, S.; NAMBU, A.; SUDO, K.; IWAKURA, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. **J. Immunol.**, v. 171, n. 11, p. 6173-6177, 2003.

NATHAN, C. F.; HIBBS Jr, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 3, p. 65-70, 1991.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, v. 6, p. 3051-3064, 1992.

NAWROCKI, B.; POLETTE, M.; CLAVEL, C.; MORRONE, A.; ESCHARD, J. P.; ETIENNE, J. C.; BIREMBAUT, P. Expression of stromelysin 3 and tissue inhibitors of matrix metallo- proteinases, TIMP-1 and TIMP-2, in rheumatoid arthritis. **Pathol. Res. Pract.**, v. 190, p. 690–696, 1994.

NOEL, W.; RAES, G.; HASSANZADEH GHASSABEH, G.; DE BAETSELIER, P.; BESCHIN, A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. **Trends Parasitol.**, v. 20, p. 126–133, 2004.

NURCOMBE, H. L.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. Neutrophils isolated from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: priming and activation in vivo. **Ann Rheum Dis.**, v. 50, p. 147-153, 1991.

NURCOMBE, H. L.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. Activation of the neutrophil myeloperoxidase-H₂O₂ system by synovial fluid isolated from patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 50, p. 237-242, 1991.

OLIVEIRA, H. C.; POPI, A. F.; BACHI, A. L. L.; NONOGAKI, S.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. B-1 cells modulate kinetics of wound-healing process in mice. **Immunobiology**, v. 215, p. 215-222, 2010.

O'STOR, A. J. K.; CHILVERS, E. R.; SOMMERVILLE, M. F.; ROVERY, S. A. Pulmonary complications of Infliximab therapy patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 33, p. 622-628, 2006.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Healthy and Disease. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 315-424, 2007.

PAP, T.; SHIGEYAMA, Y.; KUCHEN, S.; FERNIHOUGH, J. K.; SIMMEN, B.; GAY, R. E.; BILLINGHAM, M.; GAY, S. Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 43, p. 1226–1232, 2000.

PARKS, W. C.; LÓPEZ-BOADO, Y. S.; WILSON, C. L. Matrilysin in epithelial repair and defense. **Chest**, v. 120, p. 36S – 41S, 2001.

PARTRIDGE, C. A.; JEFFREY, J. J.; MALIK, A. B. A 96-kDa gelatinase induced by TNF- α contributes to increased microvascular endothelial permeability. **Am. J. Physiol. Lung**, v. 265, p. 438-447, 1993.

PATTEN, C.; BUSH, K.; RIOJA, I.; MORGAN, R.; WOOLEY, P.; TRILL, J.; LIFE, P. Characterization of pristane-induced arthritis, a murine model of chronic disease. Response to antirheumatic agents, expression of joint cytokines, and immunopathology. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n. 10, p. 3334-3345, 2004.

PENNICA, D.; NEDWIN, G. E.; HAYFLICK, J. S.; SEEBURG, P. H.; DERYNCK, R.; PALLADINO, M. A.; KOHR, W. J.; AGGARWAL, B. B.; GOEDDEL, D. V. Human Tumor Necrosis Factor: Precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**, v. 312, p. 724-729, 1984.

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

PETER, L. C. **Identificação dos loci reguladores da resposta inflamatória aguda envolvidos no desenvolvimento da artrite induzida por pristane em camundongos selecionados geneticamente.** 2009. 127 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of a superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, v. 46, n. 2, p. 211-226, 1981.

POHLERS, D.; SIEGLING, A.; BUCHNER, E.; SCHMIDT-WEBER, C. B.; PALOMBO-KINNE, E.; EMMRICH, F.; BRÄUER, R.; KINNE, R. W. Expression of cytokine mRNA and protein in joints and lymphoid organs during the course of rat antigen-induced arthritis. **Arthritis Res. Ther.**, v. 7, p. 445-447, 2005.

POLVERINI, P. J.; COTRAN, P. S.; GIMBRONE, M. A.; UNANUE, E. R. Activated macrophages induce vascular proliferation. **Nature**, v. 269, p. 804-806, 1977.

POPI, A. F.; MOTTA, F. L.; MORTARA, R. A.; SCHENKMAN, S.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. Co-ordinated expression of lymphoid and myeloid specific transcription factors during B-1b cell differentiation into mononuclear phagocytes in vitro. **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 114-122, 2009.

PROAL, A. M.; ALBERT, P. J.; MARSHALL, T. G. The human microbiome and autoimmunity. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 2, p. 234-240, 2013.

MURALI-KRISHNA, K.; ALTMAN, A. D.; SURESH, M.; SOURDIVE, D. J.; ZAJAC, A. J.; MILLER, J. D.; SLANSKY, J.; AHMED, R. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. **Immunity**, v. 8, p. 177-187, 1998.

POTTER, M.; MACCARDLE, R. C. Histology of developing plasma cell neoplasia induced by mineral oil in Balb/C mice. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 33, p. 497-515, 1964.

POTTER, M.; WAX, J. S. Genetics of susceptibility to pristane-induced plasmacytomas in BALB/cAn: reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristane-induced arthritis. **J. Immunol.**, v. 127, n. 4, p. 1591-1595, 1981.

RIBEIRO, O. G. **Controle genético da inflamação**. 1994. 85 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia) – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1994.

RIBEIRO, O. G.; MARIA, D. A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W. H.; MORISSET, J.; IBAÑEZ, O. M.; SEMAN, M. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, p. 497-506, 2003.

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

ROBBINS, M. D.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. Sistema endócrino – timo. *In*: Robbins MD, Cotran RS, Kumar V. **Patologia estrutural e funcional**. 3ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, p.1199-203, 1986.

ROSE, N. R.; MACKAY, I. R. Molecular mimicry: a critical look at exemplary instances in human diseases. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 57, p. 542-551, 2000.

ROVENSKÝ, J.; STANCÍKOVÁ, M.; ROVENSKÁ, E.; STVRTINA, S.; STVRTINOVÁ, V.; SVÍK, K. Treatment of rat adjuvant arthritis with flavonoid (Detralex), methotrexate, and their combination. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1173, p. 798-804, 2009.

SAARI, H.; SUOMALAINEN, K.; LINDY, O.; KONTTINEN, Y.; SORSA, T. Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 171, n. 3, p. 979-987, 1990.

SAKAGUCHI, N.; TAKAHASHI, T.; HATA, H.; NOMURA, T.; TAGAMI, T.; YAMAZAKI, S.; SAKIHAMA, T.; MATSUTANI, T.; NEGISHI, I.; NAKATSURU, S.; SAKAGUCHI, S. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. **Nature**, v. 426, n. 6965, p. 454-460, 2003.

SAKURAI, H.; KOHSAKA, H.; LIU, M. F.; HIGASHIYAMA, H.; HIRATA, Y.; KANNO, K.; SAITO, I.; MIYASAKA, N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 2357-2363, 1995.

SANTOS-JÚNIOR, R. R.; SARTORI, A.; DE FRANCO, M.; FILHO, O. G.; COELHO-CASTELO, A. A.; BONATO, V. L.; CABRERA, W. H.; IBAÑEZ, O. M.; SILVA, C. L.

Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in animal model of arthritis. **Human Gene Ther.**, v. 16, n. 11, p. 155-163, 2005.

SARAUX, A.; JOUQUAN, J.; LE GOFF, P.; YOUINOU, P.; LEVY, Y.; PIETTE, J. C.; GUILLEVIN, L.; SEMANA, G.; SALMON, D.; VIARD, J. P.; BACH, J.F.; SHOENFELD, Y. Environmental factors may modulate antiphospholipid antibody production in family members of patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 42, p. 1062-1064, 1999.

SEARLE, S.; BRIGHT, N. A.; ROACH, T. I.; ATKINSON, P. G.; BARTON, C. H.; MELOEN, R. H.; BLACKWELL, J. M. Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. **J. Cell Sci.**, v. 111, p. 2855-2866, 1998.

SCOLLAY, R. G.; BUTCHER, E. C.; WEISSMAN, I. L. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 10, p. 210-218, 1980.

SIMON, J.; SURBER, R.; KLEINSTÄUBER, G.; PETROW, P. K.; HENZGEN, S.; KINNE, R. W.; BRÄUER, R. Systemic macrophage activation in locally-induced experimental arthritis. **J. Autoimmun.**, v. 17, p. 127-136, 2001.

SHOENFELD, Y.; ROSE, N. R. **Infection and autoimmunity book**. Amsterdam-The Netherlands: Elsevier, 2004.

SHOENFELD, Y.; ZANDMAN-GODDARD, G.; STOJANOVICH, L.; CUTOLO, M.; AMITAL, H.; LEVY, Y.; ABU-SHAKRA, M.; BARZILAI, O.; BERKUN, Y.; BLANK, M.; DE CARVALHO, J. F.; DORIA, A.; GILBURD, B.; KATZ, U.; KRAUSE, I.; LANGEVITZ, P.; ORBACH, H.; PORDEUS, V.; RAM, M.; TOUBI, E.; SHERER, Y. The mosaic of autoimmunity: hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases. **Isr. Med. Assoc. J.**, v. 10, p. 8-12, 2008.

SPICKARD, A. Exogenous lipid pneumonia. **Arch. Intern. Med.**, v. 154, p. 686-692, 1994.

STASIUK, L. M.; GHORAISHIAN, M.; ELSON, C. J.; THOMPSON, S. J. Pristane-induced arthritis is CD4⁺ T-cell dependent. **Immunology**, v. 90, p. 81-86, 1997.

STEFANOVIC-RACIC, M.; STADLER, J.; GEORGESCU, H. I.; EVANS, C. H. Nitric oxide synthesis and its regulation by rabbit synoviocytes. **J. Rheumatol.**, v. 21, p. 1892-1998, 1994.

STIFFEL, C.; IBANEZ, O. M.; RIBEIRO, O. G.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetic of acute inflammation reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. **Exp. Clin. Immunogenet.**, v. 7, p. 221-223, 1990.

STOBER, C. B.; BRODE, S.; WHITE, J. K.; POPOFF, J. F.; BLACKWELL, J. M. *Slc11a1*, formerly, Nramp1, is expressed in dendritic cells and influences major compatibility complex class II expression and antigen-presenting cell function. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 10, p. 5059-5067, 2007.

STOLT, P.; BENGTSSON, C.; NORDMARK, B.; LINDBLAD, S.; LUNDBERG, I.; KLARESKOG, L.; ALFREDSSON, L. EIRA study group. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 62, p. 835-841, 2003.

SVERDRUP, B.; KÄLLBERG, H.; BENGTSSON, C.; LUNBERG, I.; PADYUKOV, L.; ALFREDSSON, L.; KLARESKOG, L.; EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION OF RHEUMATOID ARTHRITIS STUDY GROUP. Association between occupational exposure to mineral oil and rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study. **Arthritis Res. Ther.**, v. 7, n. 6, p. 1296-1303, 2005.

SZEKANECZ, Z.; HALLORAN, M. M.; VOLIN, M. V.; WOODS, J. M.; STRIETER, R. M.; KENNETH HAINES, G3rd.; KUNKEL, S. L.; BURDICK, M. D.; KOCH, A. E. Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 43, p. 1266-1277, 2000.

TAKIZAWA, M.; OHUCHI, E.; YAMANAKA, H.; NAKAMURA, H.; IKEDA, E.; GHOSH, P.; OKADA, Y. Production of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 is selectively enhanced by calcium pentosan polysulfate in human rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum.**, v. 43, p. 812-820, 2000.

TAYLOR, S. C.; SHACKS, S. J.; QU, Z. W.; WILEY, P. Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 89, n.11, p. 753-757, 1997.

TAYLOR, P. R.; BROWN, G. D.; GELDHOF, A. B.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S. Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity ex vivo. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 8, p. 2090-2097, 2003.

THOMPSON, S. J.; ROOK, G. A.; BREALEY, R. J.; VAN DER ZEE, R.; ELSON, C. J. Autoimmune reactions to heat-shock proteins in pristane-induced arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, p. 2479-2484, 1990.

THOMPSON, S. J.; ELSON, C. J. Susceptibility to pristane-induced arthritis is altered with changes in bowel flora. **Immunol. Lett.**, v. 36, n. 2, p. 227-231, 1993.

TOMINAGA, A.; TAKAKI, S.; KOYAMA, N.; KATOH, S.; MATSUMOTO, R.; MIGITA, M.; HITOSHI, Y.; HOSOYA, Y.; YAMAUCHI, S.; KANAI, Y.; MIYAZAKI, J-I.; USUKU, G.; YAMAMURA, K-I.; TAKATSU, K. Transgenic mice expressing a B cell growth and differentiation factor gene (interleukin 5) develop eosinophilia and autoantibody production. **J. Exp. Med.**, v. 173, p.429, 1991

TURESSON, C.; O'FALLON, W. M.; CROWSON, C. S.; GABRIEL, S. E.; MATTESON, E. L. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: Incidence trends and risk factors over 46 years. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 62, p. 722-727, 2003.

TURESSON, C.; MATTESON, E. Extra-articular features of rheumatoid arthritis and systemic involvement. In: **Rheumatology**. HOCHBER, MARC, C.; SILMAN, A. J.; SMOLEN, J. S.; WEINBLATT, M. E.; WEISSMAN, M. H. Fourth edition, cap 73, p. 773-783, 2008.

VALENTINO, M.; RAPISARDA, V.; FENGA, C. Hand injuries due to high-pressure injection devices for painting in shipyards: circumstances, management, and outcome in twelve patients. **Am. J. Ind. Med.**, v. 43, p. 539–542, 2003.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**, v. 18, n. 3(7), 2002.

VAN DER LAAN, W. H.; PAP, T.; RONDAY, H. K.; GRIMBERGEN, J. M.; HUISMAN, L. G.; TEKOPPELE, J. M.; BREEDVELD, F. C.; GAY, R. E.; GAY, S.; HUIZINGA, T. W.; VERHEIJEN, J. H.; QUAX, P. H. Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of a cell surface-targeted plasmin inhibitor. **Arthritis Rheum.**, v. 43, p. 1710–1718, 2000.

VARGHESE, S. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in bone: an overview of regulation and functions. **Front. Biosci.**, v. 1, n. 11, p. 2949-2966, 2006.

VASQUEZ-BRAVO, Y. L. A. R. **Aspectos da resposta inflamatória aguda em linhagens de camundongos com reatividade máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) obtidas por seleção genética bidirecional.** 1996. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

VIDAL, S. M.; MALO, D.; VOGAN, K.; SKAMENE, E.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. **Cell**, v. 73, p. 469-485, 1993.

VIDAL, S.; TREMBLAY, M. L.; GOVONI G.; GAUTHIER, S.; SEBASTIANI, G.; MALO, D.; SKAMENE, E.; OLIVIER, M.; JOTHY, S.; GROS, P. The Ity/Lsh/Bcg locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp 1 gene. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 655-666, 1995.

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

VILLACRES-ERIKSSON, M. Antigen presentation by naïve macrophages, dendritic cells and B cells to primed T lymphocytes and their cytokine production following exposure to immunostimulating complexes. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 102, p. 46-52, 1995.

WEINBLATT, M. E.; KAPLAN, H.; GERMAIN, B. F.; BLOCK, S.; SOLOMON, S. D.; MERRIMAN, R. C, et al. Methotrexate in rheumatoid arthritis: a five-year prospective multicenter study. **Arthritis Rheum.**, v. 37, p. 1492–1498, 1994.

WERB, Z.; GORDON, S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 142, p. 346-360, 1975.

WETSEL, R. A.; FLEISCHER, D. T.; HAVILAND, D. L. Deficiency of the murine fifth complement component (C5). A 2-base pair gene deletion in a 5'-exon. **J. Biol. Chem.**, 1990; v. 265, p. 2435–2440, 1990.

WILLIAMS-ASHMAN, H. G.; CANELLARIS, Z. N. Polyamines in mammalian biology and medicine. **Perspect Biol. Med.**, v. 22, p. 421-453, 1979.

WILNER, B. I.; EVERS, M. A.; TROUTMAN, H. D.; TRADER, F. W.; MCLEAN, I. W. Vaccine Potentiation by Emulsification with Pure Hydrocarbon Compounds. **J. Immunol.**, v. 91, p. 210–229, 1963.

WON, H.Y.; SOHN, J. H.; MIN, H. J.; LEE, K.; WOO, H. A.; HO, Y.S.; et al. Glutathione peroxidase 1 deficiency attenuates allergen-induced airway inflammation by suppressing Th2 and Th17 cell development. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, p. 575-587, 2010.

WOLFE, F.; CAPLAN, L.; MICHAUD, K. Rheumatoid arthritis treatment and the risk of severe interstitial lung disease. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 36, p. 172-178, 2007.

WONG, S. C.; PUAUX, A. L.; CHITTEZHATH, M.; SHALOVA, I.; KAJIJI, T. S.; WANG, X.; ABASTADO, J. P.; LAM, K. P.; BISWAS, S. K. Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 40, n. 8, p. 2296-2307, 2010.

WOOLEY, P. H.; SEIBOLD, J. R.; WHALEN, J. D.; CHAPDELAINE, J. M. Pristane-induced arthritis: the immunologic and genetic features of experimental murine model of autoimmune disease. **Arthritis Rheum.**, v. 32, p. 1022-1030, 1989.

WOOLEY, P. H. Animal models of rheumatoid arthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 3, n. 3, p. 407-420, 1991.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemistry International**, v. 336, p. 1-17, 1998.

WUCHERPFENNIG, K. W. Structural basis of molecular mimicry. **J. Autoimmun.**, v. 16, p. 293-302, 2001.

WYNN, T. A. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 583–594, 2004.

YAMAKI, K.; LI, X.; HOSSAIN, M. A.; ALAM, A. H.; TANEDA, S.; YANAGISAWA, R.; TAKANO, H.; YOSHINO, S. Difference in preventive effects between the phosphodiesterase iv inhibitor rolipram and anti-arthritic drugs on antigen-induced arthritis in mice. **Immunol. Invest.**, v. 36, n. 2, p. 131-145, 2007.

YIN, G.; LIU, W.; AN, P.; LI, P.; DING, I.; PLANELLES, V.; SCHWARZ, E. M.; MIN, W. Endostatin Gene Transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. **Mol. Ther.**, v. 5, p. 547-554, 2002.

APÊNDICE A – Pristane-induced arthritis loci interact with the *Slc11a1* gene to determine susceptibility in mice selected for high inflammation

Pristane-Induced Arthritis Loci Interact with the *Slc11a1* Gene to Determine Susceptibility in Mice Selected for High Inflammation

Marcelo De Franco^{1*}, Luciana C. Peters¹, Mara A. Correa¹, Antonella Galvan², Tatiane Canhamero¹, Andrea Borrego¹, José R. Jensen¹, Jussara Gonçalves¹, Wafa H. K. Cabrera¹, Nancy Starobinas¹, Orlando G. Ribeiro¹, Tommaso Dragani², Olga M. Ibañez¹

¹ Laboratório de Imunogenética, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, ² Department of Experimental Oncology, Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy

Abstract

AIRmax (maximal inflammation) and AIRmin (minimal inflammation) mice show distinct susceptibilities to pristane-induced arthritis (PIA). The *Slc11a1* gene, which regulates macrophage and neutrophil activity, is involved in this infirmity. AIRmax^{SS} mice homozygous for the non-functional *Slc11a1* S (gly169asp) allele obtained by genotype-assisted crosses from AIRmax and AIRmin mice are more susceptible than mice homozygous for the *Slc11a1* resistant (R) allele. The present work sought to identify the quantitative trait loci (QTL) regulating PIA and to examine the interactions of these QTL with *Slc11a1* alleles in modulating PIA. Mice were given two ip injections of 0.5 mL pristane at 60 day intervals, and the incidence and severity of PIA was scored up to 160 days. Genome-wide linkage studies were performed to search for arthritis QTL in an F2 (AIRmax × AIRmin, n = 290) population. Significant arthritis QTL (LODscore > 4) were detected on chromosomes 5 and 8, and suggestive QTL on chromosomes 7, 17 and 19. Global gene expression analyses performed on Affymetrix mouse 1.0 ST bioarrays (27k genes) using RNA from arthritic or control mice paws showed 419 differentially expressed genes between AIRmax and AIRmin mice and demonstrated significantly ($P < 0.001$) over-represented genes related to inflammatory responses and chemotaxis. Up-regulation of the chemokine genes *Cxcl1*, *Cxcl9*, *Cxcl5*, *Cxcl13* on chromosome 5 was higher in AIRmax^{SS} than in the other lines. *Macrophage scavenger receptor 1* and *hemeoxygenase (decycling) 1* genes on chromosome 8 were also expressed at higher levels in AIRmax^{SS} mice. Our results show that the gene expression profiles of the two arthritis QTL (on chromosomes 5 and 8) correlate with *Slc11a1* alleles, resulting in enhanced AIRmax^{SS} mice susceptibility to PIA.

Citation: De Franco M, Peters LC, Correa MA, Galvan A, Canhamero T, et al. (2014) Pristane-induced Arthritis Loci Interact with the *Slc11a1* Gene to Determine Susceptibility in Mice Selected for High Inflammation. PLoS ONE 9(2): e88302. doi:10.1371/journal.pone.0088302

Editor: Christine A. Kozak, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, United States of America

Received: August 18, 2013; **Accepted:** January 6, 2014; **Published:** February 5, 2014

Copyright: © 2014 De Franco et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: marcelo.franco@butantan.gov.br

Introduction

Mouse lines phenotype-selected for the maximum (AIRmax) or minimum (AIRmin) acute inflammatory reactivity (AIR) were used to study the impact of the genetic control of nonspecific immunity on susceptibility to autoimmune [1], neoplastic [2], and infectious diseases [3]. AIRmax and AIRmin mice were developed through bidirectional selection, starting from a highly polymorphic population (F0) derived from the intercrossing of eight inbred mouse strains (A, DBA2, P, SWR, CBA, SJL, BALB/c and C57BL/6). The selection phenotypes chosen were localized leukocyte influx and exudated plasma proteins 24 hr after the subcutaneous injection of polyacrylamide beads (Biogel), a non-antigenic, insoluble, and chemically inert substance [4]. The progressive divergence of the AIRmax and AIRmin lines during successive generations of selective breeding reached 20- and 2.5-fold differences in leukocyte infiltration and exudated protein concentrations respectively. These differences resulted from the accumulation of alleles in quantitative trait loci (QTL) endowed with opposite and additive effects on the inflammatory response. We can consider AIRmax and AIRmin as outbred stock mice

derived from eight inbred lines and submitted to extensive bidirectional selective process for strong and weak acute inflammation phenotypes. Inbreeding was avoided for the selective breeding, as such AIRmax and AIRmin mice maintain a heterogeneous genetic background but are homozygous in acute inflammation modifier loci. Analysis of the selective processes indicated that the AIR phenotype is regulated by at least 11 QTL [2].

The acute inflammation response to Biogel, as well as susceptibility to pristane induced-arthritis [5], to *S. enterica* serotype Typhimurium infection, and to the LPS of the bacteria were all modified in these mice; and linkage analysis with microsatellite markers mapped QTL in chromosomes 1, 6, and 11 which are relevant to these phenotypes [6].

Alterations in bone marrow granulopoiesis in response to hematopoietic factors and the production of chemotactic factors by infiltrated or local resident cells both contribute to phenotypic differences between the two lines. Convergent phenotypes in AIRmax mice were observed that were characterized by high neutrophil production in bone marrow, a high number of neutrophils in the blood, high concentrations of chemotactic

agents, and increased resistance of infiltrating neutrophils to spontaneous apoptosis [7].

Tissue repair was also investigated in these two lines, revealing that AIRmax mice present a high regeneration capacity in comparison to AIRmin mice. Inflammatory QTL on chromosomes 1 (*Skil1a1* gene region) and 14 were found to regulate tissue regrowth in this model [8]. Additionally, the same chromosome 1 QTL seems to regulate leukocyte and protein influx during acute inflammation, as well as arthritis incidence and severity [5].

Rheumatoid arthritis (RA) affects approximately 0.5 to 1% of the world population [9] and is modulated by immune and inflammatory processes, as well as by class II MHC (in particular the locus *HLA-DRB1*) [10], non-MHC genes [11] and environmental factors. Among RA mouse models, pristane-induced arthritis (PIA) [12] resembles the human condition by its chronic inflammatory nature, similar histopathology and dependency of specific immunity, in particular CD4⁺ T cells [13]. Another feature of PIA in the mouse is the requirement of microbiota stimulation [14].

Previous studies have shown that AIRmax mice are extremely susceptible to PIA, whereas AIRmin mice are resistant [1]. The incidence and severity of PIA in AIRmax mice is similar to that of inbred DBA/1 mice [15], but is more intense than those seen in BALB/c [12] or CBA Igh^b [16] mice. Fifteen to 25% of the susceptible inbred individuals in lines such as BALB/c [12] and CBA Igh^b [17] developed arthritis 200 days after pristane injection. Specific pathogen-free CBA Igh^b mice do not develop this disease, but will develop arthritis upon transfer to a conventional environment in the same way as CBA Igh^b mice raised conventionally since birth – indicating the involvement of environmental factors in PIA [14]. Susceptibility to PIA is CD4⁺ T cell (Th) dependent [13] and has been associated with increased agalactosyl IgG levels mediated by IL6 production [18], while protection against PIA is mediated by Th2-associated cytokines produced after hsp65 pre-immunization [19].

In contrast to the immune response profile observed in inbred mice, Th2-type response high IgG1 anti-hsp65 levels and high numbers of IL4, IL6, and TNF α secreting splenic cells were observed in susceptible AIRmax mice, following pristane treatment. On the other side, Th1-dependent IgG2a was the predominant isotype in resistant AIRmin mice and increased IFN γ producing cells in spleen was evident in these mice only [1].

SOLUTE CARRIER FACTOR 11 A 1 (*SLC11A1*) gene polymorphism has been implicated in human RA susceptibility [20]. In the mouse, *Skil1a1* codes for a transport protein expressed at the membrane of macrophage phagosomes [21] and it is associated with the transport of essential ions. This gene has been described in mice as a major modulator of susceptibility to infectious diseases (first named *Natural resistance associated macrophage protein 1* (*Nram1*) gene) [22], and is expressed in macrophages and neutrophils [23]. *Skil1a1* is pleiotropic, interfering with macrophage activation, oxidative and nitrosamine bursts [24], TNF α , IFN γ , and IL-1 production [25], and the expression of MHC class II molecules [26]. The mutation corresponding to the *Skil1a1* S (susceptibility) allele determines a gly169asp substitution resulting in a non-functional protein [27] that promotes ion accumulations inside the phagosome that favor pathogen replication [28].

In the selection process for AIRmax and AIRmin mouse lines, the *Skil1a1* S allele frequency was 25% in the founder population (F0), but shifted to 60% in AIRmin and to 9% in AIRmax after 30 generations of selective breeding for inflammatory response, suggesting that these frequency changes were, in fact, the result of genetic selection [3]. In order to determine if the accumulation of *Skil1a1* alleles in the AIR lines was due to selection of

inflammation QTL and not a chance event, *Skil1a1* homozygous mice for the susceptibility (S) or resistant (R) alleles with either AIRmax or AIRmin genetic backgrounds were produced through genotype-assisted mating. The resulting sublines were designated AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR}, and AIRmin^{SS}. The interaction of the *Skil1a1* S allele with high inflammatory background QTL in AIRmax mice was evident through the down-modulation of Biogel-induced early acute inflammation and resistance to *Salmonella* Typhimurium infection [6], as well as by the aggravation of pristane-induced arthritis [5].

We recently identified several acute inflammatory QTL modulating neutrophil migration, interleukin 1 beta production, and protein concentration in the exudate using the F2 intercross of AIRmax and AIRmin mice [29,30]. Additionally, our group detected the first QTL modulating PIA in mice, the *Ptial* locus, located on chromosome 3, using mice selected for high and low antibody production [31]. The goal of the present work was therefore to discover new PIA QTL using the AIRmax and AIRmin mouse models, and to study the molecular basis underlying *Skil1a1* R and S alleles effect in arthritis development through gene expression profiling within these QTL.

Materials and Methods

Mice

AIRmax and AIRmin lines (Ibut:AIRH and Ibut:AIRL formal stock designations at ILAR, Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council, AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR}, and AIRmin^{SS} sublines, and F2 intercrosses were developed and maintained at the animal facilities of the Laboratory of Immunogenetics of the Butantan Institute. Male and female 8 to 12-week-old mice were used in the experiments. The F2 population was obtained by intercrossing AIRmax with AIRmin mice as described [29]. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Butantan Institute.

Pristane-induced Arthritis (PIA)

Mice received two intraperitoneal injections with 0.5 ml of the non-immunogenic mineral oil pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane, Sigma Chemical Co., San Diego, USA) at 60-day intervals. Arthritis development was examined twice weekly for 160 days, by recording arthritis incidence and maximum severity scores for each paw. The severity scores, evaluated for each paw, were: 0–no signs of arthritis; 1–mild swelling of the toes or ankle joint; 2–moderate swelling; 3–severe swelling and/or ankylosis. The maximum score possible for any animal was 12. Phenotypes were assessed twice weekly by two independent observers and the animals were considered arthritic when the mean score assigned by the two observers was ≥ 2 [31].

Genome-wide SNP Genotyping

Genomic DNA was extracted from tail tips using the E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) and quantified using the Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). SNPs were genotyped in F2 intercross mice utilizing the Bead-Array Platform (Illumina Inc. San Diego, CA), using the 1449-SNP loci mouse linkage panel as described [29]. Searches for QTL affecting the arthritis severity phenotype under study were carried out through genome-wide linkage analyses between genotypes and phenotypes by interval mapping using GridQTL version 3.1.0 [32] that uses a linear model to fit phenotype data according to genotypes. Additive and dominant effects at the QTL were included along with other explanatory variables of sex and

family. The significance thresholds of phenotype-genotype associations were estimated by genome-wide permutation analysis.

Affymetrix Microarray Analysis

Total RNA from the footpads of mice on days 0 and 160 after the second pristane injections were isolated using the RNeasy mini kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The concentrations of the extracted RNA were checked using Nano-Drop (Thermo scientific), and their integrity was tested using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The Affymetrix (Santa Clara, CA) Mouse Gene 1.0 ST Array was used, which is a whole transcript-based array that interrogates 28,853 well-annotated genes. Staining, hybridization, washing, and scanning of the array were performed following the manufacturers' protocols at the AFIP-UNIFESP Molecular Facility, Federal University of São Paulo. Four experimental samples were run independently, providing replicates for each experimental group. Gene expression data was stored in a.cel format and subsequently exported to.txt files to be analyzed by Multi-viewer array software [33]. The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus [34] and are accessible through GEO Series accession number GSE51516 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE51516>).

Real-time Quantitative PCR

Microarray results were validated by quantitative real-time PCR using gene-specific primers. Real-time PCR amplification mixtures contained 0.5 µl template cDNA, 12.5 µl SYBRGreen PCR Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 0.3 µM specific PCR primers. Reactions were carried out in a Chromo 4 thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA). Targets and housekeeping genes were amplified with the primers described in Table 1. Relative differences were calculated according to the delta-delta Ct method [35]. Microarray data was correlated with qPCR results using Pearson's analyses.

Statistical Analyses

The gene expression observed in each array was log-transformed to approximate a Gaussian distribution and then standardized over the array to adjust for systematic differences in their expressions. Differentially expressed genes were detected using Significance of Analysis of Microarray (SAM) software (Two class unpaired, FDR ≤5%) that examined the data from four

biological replicates on each line [36]. We analyzed all of the significant differentially-expressed genes for the over-represented biological themes using Expression Analysis Systemic Explorer (EASE) software [37]. This program automates the process of biological theme determination using Gene Ontology (GO) classification. EASE calculates over-representation with respect to the total number of genes assayed and annotated within each system, allowing for side-by-side comparisons of categories from categorization systems with varying levels of annotation. EASE will thus rapidly convert lists of genes into an ordered table of robust biological themes. Calculating statistics on thousands of gene categories can, however, lead to a few seemingly significant probabilities simply due to chance. To address this multiple comparison issue, we used a Bonferroni-type probability correction.

Results

QTL Detection

Genome-wide scanning was performed in 290 F2 intercross mice with the PIA severity scores phenotype. Figure 1 shows PIA severity quantitative trait loci (arthritis QTL) presenting high linkage significance (LODscore>4) on chromosomes 5 and 8, and several suggestive QTL on chromosomes 7, 17 and 19. The 1 LOD score confidence interval (CI) on Chromosome 5 maps from 95 to 125 Mb while on chromosome 8 the CI ranges from 40 to 85 Mb, considering LOD scores of 4.177 and 3.865 respectively. The three other suggestive QTL showed wide CI, with LOD scores around 3.

Global Gene Expression and qPCR Analysis

The total numbers of the up- and down-modulated inflammatory response genes are distinct in each line, being higher in AIRmax than in AIRmin mice (Figure 2). These genes are expressed in the swelled footpad of the mice, where there is a large infiltrate of inflammatory neutrophils and macrophages. Global gene expression analysis indicated 419 differentially expressed genes between AIRmax and AIRmin mice. EASE analysis demonstrated significantly over-represented genes (P<0.001) related to inflammatory responses and chemotaxis (Figure 3). Figures 4 and 5 show genes differentially expressed on the confidence intervals of the PIA QTLs at chromosomes 5 and 8 respectively. Several genes related to inflammation, cell adhesion,

Table 1. qPCR versus Microarray results correlations and primers used.

Genes	Pearson (r)	Statistics	Forward	Reverse
<i>Il6</i>	0.91	p=0.001	5'-GTTCTCTGGGAATCGTGA-3'	5'-TGACTCCAGTAGCTATGG-3'
<i>Il12a</i>	0.89	p=0.001	5'-GATCATGAAGACATCACACGG-3'	5'-AGAATGATCTGCTGATGGTGG-3'
<i>Il10</i>	0.84	p=0.01	5'-TCAACAAAGGACACAGCTGGACAACACTG-3'	5'-CTGTCTAGGTCCTGGAGTCCAGCAGACTCAA-3'
<i>Il1b</i>	0.81	p=0.01	5'-CAGTCTCTGCCATTGACCATC-3'	5'-TCTCACTGAACTCAGCCGT-3'
<i>Tnfα</i>	0.82	p=0.01	5'-TCTCATCAGTCTTATGGCCG-3'	5'-GGGAGTAGACAGGATACAC-3'
<i>Ccl2</i>	0.80	p=0.01	5'-TGAACTCTCCGGATGACATG-3'	5'-GTGTTTCACAGTCCGTTCC-3'
<i>Cxcl1</i>	0.89	p=0.001	5'-TGAAGCTCCCTTGGTTCAGA-3'	5'-AGGTGCCATCAGAGCAGTCT-3'
<i>Mx1</i>	0.91	p=0.001	5'-GGGAGGTGAGGCGGATCAACCCG-3'	5'-CGGCCCTCATGGGCTCCACTA-3'
<i>Hmox1</i>	0.87	p=0.001	5'-ACCAGAGTCCCTCACAGATGGCG-3'	5'-GCAGGGGCGATCTTGCACCA-3'
<i>β2microglobulin</i>	0.97	p=0.001	5'TGACCGGCTGTATGCTATC-3'	5'-CAGTGTGAGCCAGGATATAG-3'

Relative differences were calculated according to the delta-delta Ct method. Microarray data was correlated with qPCR results using Pearson's analyses and the same four samples on each line.
doi:10.1371/journal.pone.0088302.t001

Figure 1. Mapping of the QTL regulating PIA severity phenotype in mice selected for acute inflammation. SNPs were genotyped in F2 intercrosses employing the Bead-Array Platform (Illumina Inc. San Diego, CA) and using the 1449-SNP loci mouse linkage panel as described. Searches for QTL affecting the arthritis severity phenotype under study were carried out using genome-wide linkage analysis between genotypes and phenotypes by interval mapping, using GridQTL version 3.1.0. doi:10.1371/journal.pone.0088302.g001

and chemotaxis could be observed on chromosome 5, while tissue antigens, cell differentiation, hemeoxygenase and scavenger receptor genes were observed on chromosome 8. AIRmax and AIRmin *Sk11a1* sublines showed distinct gene expression profiles, reinforcing these results. Higher up-regulation of the chemokine genes *Cxcl1*, *Cxcl9*, *Cxcl5*, *Cxcl13* on chromosome 5 were observed in AIRmax^{SS} than in the other lines. The *macrophage scavenger receptor 1* (*Msr1*) and *hemeoxygenase (decycling) 1* (*Hmx1*) genes on chromosome 8, were also more actively expressed in AIRmax^{SS} mice (Figure 6). High correlations among qPCR and Microarray results can be seen in Table 1, indicating the validity of these experiments. These results revealed two significant arthritis QTL (on chromosomes 5 and 8) interacting with the *Sk11a1* gene to create a gene expression profile that contributes to the enhanced susceptibility of AIRmax^{SS} mice to PIA.

Discussion

The present work mapped two new PIA QTL (*Ptia* 2 and *Ptia* 3), on chromosomes 5 and 8, respectively. Three suggestive QTL were detected on chromosomes 7, 17 and 19. The first PIA loci detected in mice was *Ptia* 1 (by our group) on chromosome 3 using animals selected for high and low antibody production [31]. We also described the involvement of *Sk11a1* alleles in PIA using the present AIRmax and AIRmin mouse model [5].

We have recently mapped loci that regulate the intensity of the acute inflammatory response on chromosomes 5, 7, 8 and 17, which overlap the newly detected PIA QTL, suggesting common regulations [29,30]. Co-located chromosome 5 QTL controlling arthritis severity and humoral responses during *B. burgdorferi* infection were identified in the F2 intercross of C3H/HeNCR and

Figure 2. Up- and down-modulated inflammatory and chemokine genes in AIRmax and AIRmin mice. Mouse Gene 1.0 ST Array was used. Differentially expressed genes were detected using Significance of Analysis of Microarray (SAM) software (Two class unpaired, FDR $\leq 5\%$) that examined the data from four biological replicates on each line.
doi:10.1371/journal.pone.0088302.g002

Figure 3. Differentially expressed inflammatory and chemokine genes in AIRmax and AIRmin mice. Mouse Gene 1.0 ST Array was used. Differentially expressed genes were detected using Significance of Analysis of Microarray (SAM) software (Two class unpaired, FDR $\leq 5\%$) that examined the data from four biological replicates on each line.
doi:10.1371/journal.pone.0088302.g003

Figure 4. Differentially expressed genes on chromosome 5 between AIRmax and AIRmin mice. Mouse Gene 1.0 ST Array was used. Differentially expressed genes were detected using Significance of Analysis of Microarray (SAM) software (Two class unpaired, FDR $\leq 5\%$) that examined the data from four biological replicates on each line.
doi:10.1371/journal.pone.0088302.g004

Figure 5. Differentially expressed genes on chromosome 8 in AIRmax and AIRmin mice. Mouse Gene 1.0 ST Array was used. Differentially expressed genes were detected using Significance of Analysis of Microarray (SAM) software (Two class unpaired, FDR $\leq 5\%$) that examined the data from four biological replicates on each line.
doi:10.1371/journal.pone.0088302.g005

C57BL/6Ncr mice [38], confirming the involvement of the chemokine *Cxcl9* gene in this model [39]. QTL on chromosomes 5 and 8 were also detected in two other arthritis models (collagen and proteoglycan induced arthritis) [40], suggesting the importance of these related gene clusters to arthritis susceptibility.

Regarding the suggestive QTL detected in this work, the loci on chromosomes 7, 17 and 19 overlap regions detected for acute inflammation where map inflammasome/integrins, MHC and ion transport related genes, respectively (Table 2) [30]. AIRmax and AIRmin mice present distinct MHC haplotypes: AIRmax H2b and AIRmin H2kl [1]. *H2Ea* gene expression was low in AIRmax mice (Figure 3), in agreement with a report describing a correlation of the H2b haplotype with low *H2Ea* gene expression [41].

The total number of up- and down-regulated genes in each line was distinct, as can be seen in Figure 2. More genes were modulated in AIRmax than in AIRmin mice, although we observed an over-representation of genes related to inflammatory reactions and chemotaxis (gene ontology) biological themes in both lines. This same gene expression profile was observed in bone marrow cells from these lines after Biogel stimulus [42], indicating the generalized action of selective pressure during the phenotype selection process.

Ibrahim and collaborators investigated the gene expression profiles of inflamed paws in DBA1 inbred mice using a similar approach for collagen-induced arthritis [43]. In that work, inflammation resulted in increased gene expression of matrix metalloproteinases, and immune-related extra-cellular matrix and cell-adhesion molecules, as well as molecules involved in cell division and transcription, in a manner very similar to our model. However, the total number of differentially-expressed genes involved in the inbred mouse model (223) was lower than in our model (419), suggesting that the heterogeneous background of

AIRmax and AIRmin mice permitted a larger genome involvement in this phenotype.

The high acute inflammation observed in AIRmax mice appears to result from the accumulation of three convergent elements during their selection: 1) higher numbers of neutrophils in their bone marrow, as a consequence of an elevated response to granulopoietic cytokines; 2) high concentrations of chemotactic factors in their exudates; and, 3) strong resistance of their neutrophils to spontaneous apoptosis [7]. Consistent with these alterations, AIRmax mice are more susceptible to arthritis [1], LPS shock [6], and colon carcinogenesis [44]. However, this high-responder line demonstrated extreme resistance to bacterial infections [3] as well as to lung [45] and skin carcinogenesis [2]. Neutrophils are the first cells to be recruited to a damaged site [46], and CXC chemokines (including CXCL2 and CXCL1) are the most critical inflammatory mediators for this recruitment [47]. Among the differentially-expressed genes observed in the present work, inflammatory and chemokine genes on chromosome 5 and *macrophage scavenger receptor 1* (*Msr1*) and *hemeoxygenase 1* (*Hmox1*) genes on chromosome 8 appear to be the major candidates.

Chemokines are involved in leukocyte recruitment to inflammatory sites, such as to synovial tissue in rheumatoid arthritis (RA). However, they may also be homeostatic as these functions often overlap [48]. Chemokines have essential roles in the recruitment and activation of leukocyte subsets within tissue microenvironments, and stromal cells actively contribute to these networks. It has been demonstrated that inappropriate constitutive chemokine expression contributes to the persistence of inflammation by actively blocking its resolution [49]. This was likewise observed in lung carcinogenesis in our model, as transcriptome analysis revealed that the genes involved in transendothelial migration and chemokine-cell adhesion were differentially-expressed in normal lungs of susceptible AIRmin and resistant AIRmax mice

Figure 6. Signal intensities of differentially-expressed genes from AIRmax and AIRmin mouse sublines. Mouse Gene 1.0 ST Array was used. Differentially expressed genes were detected using Significance of Analysis of Microarray (SAM) software (Two class unpaired, FDR $\leq 5\%$) that examined the data from four biological replicates on each line.
doi:10.1371/journal.pone.0088302.g006

[50], suggesting important roles for these phenotypes in chronic diseases.

Macrophages play a central role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA), which is marked by an imbalance of inflammatory and anti-inflammatory macrophages in RA synovium. Although the polarization and heterogeneity of macrophages in RA have not been fully elucidated, the identities of macrophages in RA can potentially be defined by their products, including co-stimulatory molecules, scavenger receptors, different cytokines/chemokines and receptors, and transcription factors. Efforts have been made to understand polarization, apoptosis regulation, and the novel signaling pathways in macrophages [51]. Serum from rheumatoid arthritis patients (but not from healthy subjects) increased mRNA expression of the *Msr1* gene in macrophages. Human arterial endothelial cells are inhibited by both anti-IL-6 receptor antibodies (α -IL-6R Ab) and TNF- α receptors (p75)-Fc (TNFR-Fc), suggesting an important role for this receptor in chronic inflammatory disease [52].

Heme oxygenase-1 has potent antioxidant and anti-inflammatory functions, although the underlying mechanisms are not yet well understood [53]. The disruption of *Hmox1* in macrophages *in vivo* and the release of nonmetabolized heme cause tissue inflammation [54]. Additionally, expression of the *Stella1* gene has been associated with a twofold increase in *Hmox1* transcriptional levels in macrophages undergoing erythrophagocytosis [55]. Although *Hmox1* seems to alter macrophage activity, no involvement with arthritis is described in the literature. In the present work, AIRmax^{SS} mice homozygous for the *Stella1* S allele showed higher *Hmox1* and *Msr1* gene expression than AIRmax^{RR} mice, suggesting that *Stella1* interacts with these two genes (figure 4). Similarly, chemokine genes are also up-regulated in AIRmax^{SS} mice, evidencing a specific gene expression profile of this line that favors chronic inflammation and consequent susceptibility to arthritis. In this way, *Stella1* S allele should alter the macrophage activity, promoting modulation of chemokines, heme oxygenase,

Table 2. Differentially-expressed major candidate genes detected in microarray related to PIA QTL.

Genes	Chromosomes	AIRmax/ AIRmin ratio	GO Biological process
<i>Slc11a1</i>	1	2.98	Transport
<i>Cxcl1</i>	5	3.78	Chemokine
<i>Cxcl9</i>	5	2.67	Chemokine
<i>Cxcl5</i>	5	12.11	Chemokine
<i>Cxcl13</i>	5	27.50	Chemokine
<i>Saa3</i>	7	21.39	Inflammation
<i>Il21r</i>	7	2.82	Inflammation
<i>Bcl2</i>	7	2.03	Apoptosis
<i>Msr1</i>	8	5.02	Scavenger
<i>Hmax1</i>	8	2.05	Angiogenesis/ apoptosis
<i>H2ea</i>	17	0.03	Antigen Presentation
<i>Slc15a3</i>	19	2.55	Transport

Differentially expressed genes in AIRmax and AIRmin mice. Mouse Gene 1.0 ST Array was used. Differentially expressed genes were detected using Significance of Analysis of Microarray (SAM) software (Two class unpaired, FDR $\leq 5\%$) that examined the data from four biological replicates on each line.
doi:10.1371/journal.pone.0088302.t002

apoptosis, transport, scavenger receptor and inflammatory genes expressed by these cells (Table 2).

References

- Viguer ND, Cabrera WH, Araujo LM, Ribeiro OG, Ogata TR, et al. (2000) Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. *Eur J Immunol* 30: 431–437.
- Biozzi G, Ribeiro OG, Sasan A, Araujo ML, Maria DA, et al. (1998) Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis* 19: 337–346.
- Araujo LM, Ribeiro OG, Siqueira M, De Franco M, Sarobinas N, et al. (1998) Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. *Eur J Immunol* 28: 2913–2920.
- Itanes OM, Süffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, et al. (1992) Genetics of non-specific immunity I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *Eur J Immunol* 22: 2555–2563.
- Peters LC, Jensen JR, Borrego A, Cabrera WH, Baker N, et al. (2007) *Slc11a1* (formerly *NRAMP1*) gene modulates both acute inflammatory reactions and pristane-induced arthritis in mice. *Genes Immun* 8: 51–56.
- Borrego A, Peters LC, Jensen JR, Ribeiro OG, Koury Cabrera WH, et al. (2006) Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate *Slc11a1* gene (formerly *Nramp1*) effects in selected mouse lines. *Microbes Infect* 8: 2766–2771.
- Ribeiro OG, Maria DA, Adriaens S, Pechter S, Cabrera WH, et al. (2003) Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. *J Leukoc Biol* 74: 497–506.
- De Franco M, Cameiro PS, Peters LC, Vorraro F, Borrego A, et al. (2007) *Slc11a1* (*Nramp1*) alleles interact with acute inflammation loci to modulate wound-healing traits in mice. *Mamm Genome* 18: 263–269.
- Cooper GS, Stroehla BC (2003) The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2: 119–125.
- Jawaheer D, Thomson W, MacGregor AJ, Carthy D, Davidson J, et al. (1994) "Homozygosity" for the HLA-DR shared epitope contributes the highest risk for rheumatoid arthritis concordance in identical twins. *Arthritis Rheum* 37: 681–686.
- John S, Marlow A, Hajeer A, Ollier W, Silman A, et al. (1997) Linkage and association studies of the natural resistance associated macrophage protein 1 (*NRAMP1*) locus in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24: 452–457.
- Poser M, Wax JS (1981) Genetics of susceptibility to pristane-induced plasmacytomas in BALB/cAn: reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristane-induced arthritis. *J Immunol* 127: 1591–1595.
- Stasiuk LM, Ghorraishian M, Elson CJ, Thompson SJ (1997) Pristane-induced arthritis is CD4+ T-cell dependent. *Immunology* 90: 81–86.
- Thompson SJ, Elson CJ (1993) Susceptibility to pristane-induced arthritis is altered with changes in bowel flora. *Immunol Lett* 36: 227–231.
- Wooley PH, Sud S, Whalen JD, Nasser S (1998) Pristane-induced arthritis in mice. V. Susceptibility to pristane-induced arthritis is determined by the genetic regulation of the T cell repertoire. *Arthritis Rheum* 41: 2022–2031.
- Thompson SJ, Rook GA, Brealey RJ, van der ZR, Elson CJ (1990) Autoimmune reactions to heat-shock proteins in pristane-induced arthritis. *Eur J Immunol* 20: 2479–2484.
- Thompson SJ, Thompson HS, Harper N, Day MJ, Coad AJ, et al. (1993) Prevention of pristane-induced arthritis by the oral administration of type II collagen. *Immunology* 79: 152–157.
- Thompson SJ, Hitamoto Y, Zhang YW, Rook GA, Elson CJ (1992) Agalactosyl IgG in pristane-induced arthritis. Pregnancy affects the incidence and severity of arthritis and the glycosylation status of IgG. *Clin Exp Immunol* 89: 434–438.
- Thompson SJ, Francis JN, Siew LK, Webb GR, Jenner PJ, et al. (1998) An immunodominant epitope from mycobacterial 65-kDa heat shock protein protects against pristane-induced arthritis. *J Immunol* 160: 4628–4634.
- Shaw MA, Clayton D, Blackwell JM (1997) Analysis of the candidate gene *NRAMP1* in the first 61 ARC National Repository families for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24: 212–214.
- Vidal SM, Epstein DJ, Malo D, Weith A, Velemans M, et al. (1992) Identification and mapping of six microdissected genomic DNA probes to the proximal region of mouse chromosome 1. *Genomics* 14: 32–37.
- Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell* 73: 469–485. 0092-8674(93)90135-D [pii].
- Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Govoni G, Gros P (1999) The *Nramp1* protein and its role in resistance to infection and macrophage function. *Proc Assoc Am Physicians* 111: 283–289.
- Frutkin G, Diakia M, Barton H, Theis I, Garimorth K, et al. (2003) *Nramp1* functionality increases inducible nitric oxide synthase transcription via stimulation of IFN regulatory factor 1 expression. *J Immunol* 171: 1994–1998.
- Lalmanach AC, Montagne A, Menemay P, Lantier F (2001) Effect of the mouse *Nramp1* genotype on the expression of IFN- γ gene in early response to *Salmonella* infection. *Microbes Infect* 3: 639–644.
- Wojciechowski W, DeSanctis J, Skamene E, Radzioch D (1999) Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin involves class II transactivator and depends on the *Nramp1* gene. *J Immunol* 163: 2688–2696.

27. Govoni G, Vidal S, Gauthier S, Skamene E, Malo D, et al. (1996) The *Bcg/Ity/Lsh* locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the *Nramp1* Gly169 allele. *Infect Immun* 64: 2923–2929.
28. Zaharik ML, Cullen VI, Fung AM, Libby SJ, Kujat Choy SL, et al. (2004) The *Salmonella enterica* serovar typhimurium divalent cation transport systems *MntH* and *StiABCD* are essential for virulence in an *Nramp1*G169 murine typhoid model. *Infect Immun* 72: 5522–5529.
29. Vorraro F, Galvan A, Cabrera WH, Cameiro PS, Ribeiro OG, et al. (2010) Genetic control of IL-1 beta production and inflammatory response by the mouse *Irm1* locus. *J Immunol* 185: 1616–1621.
30. Galvan A, Vorraro F, Cabrera W, Ribeiro OG, Stambinas N, et al. (2011) Association study by genetic clustering detects multiple inflammatory response loci in non-inbred mice. *Genes Immun* 12: 390–394.
31. Jensen JR, Peters LC, Borrego A, Ribeiro OG, Cabrera WH, et al. (2006) Involvement of antibody production quantitative trait loci in the susceptibility to pristane-induced arthritis in the mouse. *Genes Immun* 7: 44–50.
32. Hernandez-Sanchez J, Grunche JA, Knott S (2009) A web application to perform linkage disequilibrium and linkage analyses on a computational grid. *Bioinformatics* 25: 1577–1583.
33. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, et al. (2006) TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* 411: 134–193.
34. Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002) Gene Expression Omnibus NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30: 207–210.
35. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
36. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116–5121.
37. Hosack DA, Dennis G, Jr., Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA (2003) Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 4: R70.
38. Weis JJ, McCracken BA, Ma Y, Fairbairn D, Roper RJ, et al. (1999) Identification of quantitative trait loci governing arthritis severity and humoral responses in the murine model of Lyme disease. *J Immunol* 162: 948–956.
39. Ma Y, Miller JC, Crandall H, Larsen ET, Dunn DM, et al. (2009) Interval-specific congenic lines reveal quantitative trait loci with penetrant Lyme arthritis phenotypes on chromosomes 5, 11, and 12. *Infect Immun* 77: 3302–3311.
40. Glanz TT, Adarichev VA, Nestorovich AB, Szanto S, Oswald JP, et al. (2004) Disease-associated qualitative and quantitative trait loci in proteoglycan-induced arthritis and collagen-induced arthritis. *Am J Med Sci* 327: 188–195.
41. Liao G, Wang J, Guo J, Allard J, Cheng J, et al. (2004) In silico genetics: identification of a functional element regulating H2-Ealpha gene expression. *Science* 306: 690–695.
42. Carneiro PS, Peters LC, Vorraro F, Borrego A, Ribeiro OG, et al. (2009) Gene expression profiles of bone marrow cells from mice phenotype-selected for maximal or minimal acute inflammation: searching for genes in acute inflammation modifier loci. *Immunology* 128: e562–e571.
43. Ibrahim SM, Koczan D, Thiesen HJ (2002) Gene-expression profile of collagen-induced arthritis. *J Autoimmun* 15: 159–167.
44. Di Pace RF, Massa S, Ribeiro OG, Cabrera WH, De Franco M, et al. (2006) Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory responsiveness. *Carcinogenesis* 27: 1517–1525.
45. Mañá DA, Manenti G, Galbati F, Ribeiro OG, Cabrera WH, et al. (2003) Pulmonary adenoma susceptibility 1 (*Pa1*) locus affects inflammatory response. *Oncogene* 22: 426–432.
46. Kobayashi Y (2006) Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit Rev Immunol* 26: 307–316.
47. Kobayashi Y (2008) The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 13: 2400–2407.
48. Ibrahim SM, Mix E, Boncher T, Koczan D, Gold R, et al. (2001) Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 124: 1927–1938.
49. Filer A, Raza K, Salmon M, Buckley CD (2008) The role of chemokines in leucocyte-stromal interactions in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 13: 2674–2685.
50. De Franco M, Colombo F, Galvan A, Cecco LD, Spada E, et al. (2010) Transcriptome of normal lung distinguishes mouse lines with different susceptibility to inflammation and to lung tumorigenesis. *Cancer Lett* 294: 187–194. S.
51. Li J, Hsu HC, Mountz JD (2012) Managing macrophages in rheumatoid arthritis by reform or removal. *Curr Rheumatol Rep* 14: 445–454.
52. Hashizume M, Mihara M (2012) Blockade of IL-6 and TNF-alpha inhibited oxLDL-induced production of MCP-1 via scavenger receptor induction. *Eur J Pharmacol* 689: 249–254.
53. Immenschuh S, Baumgart-Vogt E, Mueller S (2010) Heme oxygenase-1 and iron in liver inflammation: a complex alliance. *Curr Drug Targets* 11: 1541–1550.
54. Kostunovich G, Eckhaus MA, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Rouault TA (2010) Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood* 116: 6054–6062.
55. Soe-Lin S, Sheffeld AD, Wasyluk B, Ponka P (2008) *Nramp1* equips macrophages for efficient iron recycling. *Exp Hematol* 36: 929–937.

APÊNDICE B – The effect of phosphoethanolamine intake on mortality and macrophage activity in mice with Solid Ehrlich Tumors

The Effect of Phosphoethanolamine Intake on Mortality and Macrophage Activity in Mice with Solid Ehrlich Tumors

Maria Sueli Parreira de Arruda^{1*}, Mara Adriana Correa¹, James Venturini¹, Maira Camila Félix¹, Ana Maria Bormio De Rosis¹, Mário Sérgio Galhiane², Gilberto Orivaldo Chierice³ and Maria Renata Sales Nogueira Costa⁴

¹Departamento de Ciências Biológicas; Faculdade de Ciências; Universidade Estadual Paulista; Av. Eng. Luiz Edmundo Coube, 14-01; 17033-360; Bauru - SP - Brasil. ²Departamento de Química; Faculdade de Ciências; Universidade Estadual Paulista; Bauru - SP - Brasil. ³Departamento de Química e Física Molecular; Universidade de São Paulo; Av. Trabalhador São Carlense, 400; 13566-590; São Carlos - SP - Brasil. ⁴Instituto Lauro de Sousa Lima; Rod. Com. João Ribeiro de Barros; Km 225/226; 17034-971; Bauru - SP - Brasil

ABSTRACT

The aim of the present study was to examine the effect of a diet rich in synthetic PETn on the metabolism macrophages of tumor-bearing mice. The results demonstrated that PETn increased the animals' survival time. In addition, the treated animals released smaller amounts of hydrogen peroxide (H₂O₂) and nitric oxide (NO) than the non-treated animals, particularly after day 14. From the results it could be concluded that H₂O₂ and NO were important in the modulation of neoplastic growth, and pointed to a promising role of PETn in the control of human neoplasms.

Key words: Phosphoethanolamine, Ehrlich tumor, nitric oxide, hydrogen peroxide, lipids

INTRODUCTION

The genesis and progression of neoplasms of the breast, colon and prostate are influenced by multiple factors, one of which may be lipid ingestion and the resulting changes in the immune response (Erickson and Hubbard, 1996). Despite multiple studies in this area, the mechanisms involved in the process of tumor formation are not clear. The monoester phosphoethanolamine (PETn) has been a target for many studies aiming to understand the tumorigenesis and the relationship between the phospholipids and tumor progression. Some authors believe that phospholipids lead to a decrease in tumor growth (Morvan et al., 2002 and

Aiken and Gillies, 1996), while other authors have asserted that an elevated level of these monoesters is related to the increased tumor growth (Campbell et al., 1990). The literature also shows that the diets with high lipid contents (especially polyunsaturated fatty acids, or PUFAs) may result in increased synthesis of surface membrane molecules (Sherrington et al., 1995), reduced lymphocyte proliferation, cytokine synthesis, and natural killer (NK) cell activation (Yaqoob et al., 1994). Thus, the depressed immune response that results from the increased lipid availability in the body may modulate neoplastic development.

The solid Ehrlich tumor is a spontaneous murine mammary tumor that does not resolve spontaneously. It has previously been employed to

*Author for correspondence: sueli@fc.unesp.br

study the effects of herbal medicines and drugs on macrophage activity (Matsuzaki et al., 2003; Sakai et al., 2006). The choice to use the peritoneal macrophages was based on previous studies employing subcutaneous transplantation of AK-5 tumor cells (Mittra et al., 2004; Bhaumik et al., 1988, 2001). Those studies showed that the transplantation of AK-5 tumor cells into the subcutaneous tissue led to hyperactivation of the peritoneal macrophages. Later, there was depletion of the activated macrophages from the peritoneal cavity associated with the onset of AK-5 tumor regression. Direct labeling of hyperactivated macrophages in the peritoneum by the tracking dye PKH26 showed their migration to the tumor site. These findings provided functional evidence that peritoneal macrophages played a role in tumor progression and were thus critical cells to study the therapeutic approaches.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Forty male Swiss two-month-old mice were purchased from the Animal House of the Central Laboratory of UNESP - Univ Estadual Paulista, Brazil. The mice were divided into two groups. The control (non-treated) group (n=20) was fed a normal commercial diet (Labina Purina®, Paulínia, SP, Brazil), and the experimental (PETn-treated) group (n=20) was fed a commercial diet (Labina Purina®) containing PETn. The experimental protocol was designed in accordance with the ethical rules for animal research of the Brazilian College for Animal Experimentation.

PETn administration

PETn was purchased from the Chemistry Institute of São Carlos (USP - Universidade de São Paulo, Brazil) and added to a concentration of 800 mg/kg of animal food. Treatment began one week prior to tumor inoculation.

Tumor model and histopathology

The Ehrlich carcinoma strain used was purchased from the Department of Pathology of Botucatu Medical School, UNESP. Ehrlich ascites tumor cell (EATC) extraction followed a previously described technique (Silva et al., 2002). EATCs were inoculated subcutaneously (10^7 cells/mouse) to generate the solid tumors in both the control and experimental groups. Five animals from each

group were killed by CO₂ asphyxiation at days 7, 14, 21, and 28 after tumor cell inoculation. Tumor samples were dissected from the skin and subcutaneous fat from the dorsum of each animal. The resulting specimens were fixed in buffered formalin for 48 h prior to preparation for the paraffin embedding. Tissue sections were stained with hematoxylin-eosin and evaluated under light optical microscopy.

Preparation and stimulation of peritoneal macrophages

Abdominal cavity washing to extract the peritoneal macrophages was carried out with 10 ml of sterile ice-cold phosphate-buffered solution (PBS). The peritoneal lavage suspension was then centrifuged, and the cells were resuspended in RPMI 1640 medium (Nutricell, Campinas, SP, Brazil), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). The cell number was adjusted to 2×10^6 cell/ml. Macrophage activation was demonstrated using the spreading test (Rabinovitch et al., 1977), and H₂O₂/NO production was also measured.

Peritoneal macrophages extracted for the spreading test were incubated in 199 culture medium (Sigma, St Louis, MO, USA) at 37°C for 60 min. Glass-attached macrophages were fixed in 2.5% glutaraldehyde (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil), stained with hematoxylin-eosin, and then analyzed under light microscopy. The spreading test was based on the ability of macrophages, when activated, to adhere to glass and to spread; the percent of spreading macrophages was determined from 100 cells.

The production of H₂O₂ was evaluated in 10^6 cells/ml of peritoneal macrophages in supplemented phenol red solution, and cell absorbance was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Russo et al., 1989). NO concentration was measured with a nitrite production method in the culture supernatant (Ding et al., 1988). Briefly, macrophages (10^6 cells/ml) were incubated with RPMI 1640 culture medium in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 48 h. Subsequently, supernatant was added to Griess reagent supplemented with 1% sulfanilamide (Synth, Diadema, SP, Brazil), 0.1% naphthylene diamine dihydrochloride (Sigma, St Louis, MO, USA) and 2.5% H₃PO₄ at room temperature for 10 min. Absorbance of nitrite was quantified by ELISA (ELx 800, Bio-tek Instruments Inc, USA).

Statistical analysis

All the statistical tests were conducted using GraphPad InStat version 3.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA), and $p < 0.05$ was considered statistically significant. When two averages were obtained, Student's t test was used for their comparison. When more than two averages were obtained, ANOVA and the Tukey-Kramer post-test were used for comparison (Norman and Streiner, 1994).

RESULTS

Tumor progression

Animals in the non-treated group survived until 21 days after Ehrlich carcinoma inoculation, but did not survive past 28 days. The animals treated with the PETn lived to the end of the experimentation period (28 days).

Histopathology

Altogether, microscopic analysis revealed only slight changes between the control and experimental groups. The tumor architecture in the treated and non-treated groups on day seven showed similar characteristics (Fig. 1A and Fig. 1B). The specimens showed central necrosis and stromal microabscesses, with atypical proliferative cells intermingled with mononuclear inflammatory infiltrates and early granulation tissue beneath. At day 14, histopathology of the PETn-treated (Fig.

1C) specimens demonstrated a multilobulated tumor-growth pattern, with plasmolymphocytic inflammatory cells and partial delimitation by granulation tissue. The neoplastic invasion was discreetly diminished, with an organization of the peripheric granulation tissue, suggestive of a fibrous capsule. At day 14, in the treated group, the observed pattern of cohesion of the tumor cells increased, whereas the non-treated group (Fig. 1E) showed blood vessel destruction by the tumor cells and less cohesion of neoplastic cells (Fig. 1F). At 21 days (Fig. 1G and Fig. 1H), the non-treated animals demonstrated extensive necrosis of both the stroma and neoplastic cells as well as ulceration of the epidermis. There was extensive tumor invasion and disruption of the granulation tissue. These aspects were similar in the PETn-treated animals. No non-treated mice survived to day 28.

Effects of PETn on macrophage activity

Tumor-bearing mice from both the non-treated and PETn-treated groups demonstrated significant decreases in the macrophage-spreading capacity (Fig. 2A). However, only the macrophages from the PETn-treated group demonstrated a significant decrease in H_2O_2 release at both 14 and 21 days (Fig. 2B). At day 14, both the groups showed reduced levels of NO, followed by an increase at day 21 (Fig. 2C). At day 28, NO levels rose significantly in the PETn-treated mice, but no control mice survived for the comparison.

Figure 1 - At day 7, similar architectural morphology in the PEtn (A) and non-treated groups (B), revealing low degree of cell differentiation, large nuclei with a high number of vacuoles and prominent nucleoli (HE, objective 40X). At day 14, the neoplastic lesion in the PEtn group (C) showed better organization of the peripheral granulation tissue, suggesting a fibrous capsule, in contrast to non-treated group (D) (HE, objective 4X). At day 14, the treated group (E) also showed an increased pattern of cohesion of the tumor cells, whereas the non-treated group (F) showed blood vessel destruction by less cohesive tumor cells (HE, objective 40X and 10X, respectively). At day 21, in the PEtn (G) and non-treated (H) groups, microscopic findings of the lesion were similar, with both groups showing extensive tumor invasion and necrosis (HE, objective 4X). n = necrosis; tc = tumoral cells; ct = connective tissue; ep = epithelium.

Figure 2 - Evaluation of the functional status of peritoneal macrophages from PEtn-treated (filled columns) and control (open columns) mice using the cell spreading technique. (A) Released H₂O₂, and (B) NO production (C). Data are reported as the mean $\pm$ standard deviation. *p < 0.05, compared to the control group. †p < 0.05, compared to an earlier period.

DISCUSSION

Phosphomonoesters are metabolites of phospholipids. They are produced by the action of phospholipases on phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, and the levels of these compounds may be higher in situations of increased cellular growth and/or degradation. Thus, in the cases of tissue proliferation such as tumor growth, there are increased levels of phosphomonoesters relative to the levels in normal tissues during the stationary growth phase (Aiken and Gillies, 1996). Although these data are well known, the role of these lipids in tumor growth is still unclear.

In the present study, administration of the PETn to Ehrlich tumors bearing mice resulted in increased survival time. Most of those in the non-treated group succumbed at 21 days, whereas those treated with the drug survived the 28-day experimental period. The mechanisms involved in this process are poorly understood. The data obtained from the animal and human experiments of diets with high levels of lipids suggest an involvement of polyunsaturated fatty acids in the development of immune responses (Yaqoob et al., 1994). It is known that the macrophages play a central role in both innate and acquired immunity. In the cancer environment, macrophages exhibit complex and multifaceted activities. They can be directly tumoricidal but may simultaneously support the tumor growth and dissemination. The expression of the macrophage tumouricidal capacity is dependent on their activation status.

Various agents, including the interferon- γ (IFN- γ), lipopolysaccharide (LPS) and lectins are known to activate the macrophages (Suzuki et al., 2003; Schorey and Lawrence, 2008). Once activated, macrophages can inhibit the growth of tumor cells and microorganisms (Nascimento et al., 2002), mainly due to the increases in the production of NO, H₂O₂ and cytokines.

To the best of our knowledge, there have been no studies on the effects of the PETn on peritoneal macrophages in the animals bearing an Ehrlich solid tumor. Similarly, studies on the role of phospholipids in the macrophage respiratory burst are rare. According to Gordon et al. (1991), there is a direct correlation between the presence of PETn and a decrease in the available superoxide anion (O₂⁻). These authors observed that such events occurred due to phospholipid hydrolysis. Studying the neutrophils, the researchers showed

that the decrease in the measured superoxide anions caused by the phosphorylethanolamine was not due to an inhibition of cellular superoxide generation but rather due to the scavenging of the generated (O₂⁻).

Because superoxide anion (O₂⁻) is converted to H₂O₂ in the cell, any element that affects the anion availability would consequently interfere with the production of the peroxide. Such phenomena may have occurred in the present study as macrophages from the mice treated with the PETn released smaller amounts of hydrogen peroxide than those from the non-treated animals, especially after day 14. Because H₂O₂ production is involved in one of the mechanisms of macrophage cytotoxicity, these results may indicate an inhibitory action of the PETn on the macrophage lysis activity. The data on the macrophage spreading also supported this premise, as animals treated with PETn had decreased macrophage spreading compared to untreated animals. Finally, the lower levels of H₂O₂ may have contributed to the mechanisms that led to the increased survival time of the PETn-treated animals. That is, there is a direct correlation between H₂O₂ levels and angiogenesis (Monte et al., 2003), and solid tumor growth depends on local increases in blood vessel growth. NO is another important metabolite released by the macrophages. This free radical is produced by a group of enzymes called nitric oxide synthases (NOS). The inducible nitric oxide synthase (iNOS) is one of the three key enzymes that produce NO from the amino acid L-arginine. NO and iNOS are common in malignant tumors and are known to have both pro- and anti-tumor effects (Fukumura et al., 2006). Although the roles of NO and its metabolites in the carcinogenesis are not completely elucidated (Ellies et al., 2003), their effect have been described to be dose-dependent. The generation of high levels of NO by the activated macrophages may be cytostatic or cytotoxic for tumor cells, whereas modest NO production may have the opposite effect, promoting tumor growth (Xu, 2002). Tapieiro et al. (2002) showed that excessive levels of NO produced in inflamed tissues could lead to the nitration of tumor-suppressing proteins, contributing to carcinogenesis and tumor progression. The present data supported this premise, since the animals treated with the PETn had decreased levels of NO at 14 days, when a delay in tumor growth was observed. After this period, the increasing levels of NO were noticed

concomitantly with tumor progression. These results, in addition to reinforcing the importance of NO in the control of neoplastic development, indicated the important role of the PEtn in this process.

Taken together, these results confirmed the role of NO and H₂O₂ in the modulation of tumor growth and also showed the antineoplastic effects of oral administration of the PEtn on the survival time of Ehrlich tumor bearing-mice. Considering that the Ehrlich tumor is a mammary tumor of mice, the present data also indicate the promising role of the PEtn in the control of human neoplasia.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by CNPq/Pibic and FUNDUNESP.

REFERENCES

- Aiken NR, Gillies RJ. (1996). Phosphomonoester metabolism as a function of cell proliferative status and exogenous precursors. *Anticancer Res.* **16** (3B):1393-7.
- Bhaumik S, Khar A. (1998). Cytokine-induced production of NO by macrophages induces apoptosis and immunological rejection of ak-5 histiocytic tumor. *Apoptosis*; **3**, 361-8.
- Bhaumik S, Mitra R, Varalakshmi C, Khar A. (2001). Activated macrophages migrate to the subcutaneous tumor site via the peritoneum: a novel route of cell trafficking. *Exp Cell Res.* **266** (1), 44-52.
- Campbell KA, Wu YP, Chacko VP, Sitzmann JV. (1990). In vivo ³¹P NMR spectroscopic changes during liver regeneration. *J Surg Res.* **49** (3), 244-7.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* **141** (7):2407-12.
- Ellies LG, Fishman M, Hardison J, Kleeman J, Maglione JE, Manner CK, et al. (2003). Mammary tumor latency is increased in mice lacking the inducible nitric oxide synthase. *Int J Cancer.* **106** (1):1-7.
- Erickson KL, Hubbard NE. (1996). Dietary fish oil modulation of macrophage tumoricidal activity. *Nutrition.* **12** (1 Suppl):S34-8.
- Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. (2006). The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* **6** (7), 521-34.
- Gordon LI, Weiss D, Prachand S, Weitzman SA. (1991). Scavenging of superoxide anion by phosphorylethanolamine: studies in human neutrophils and in a cell free system. *Free Radic Res Commun.* **15** (1):65-71.
- Kleeb SR, Xavier JG, Frussa-Filho R, Dagli ML. (1997). Effect of haloperidol on the solid Ehrlich tumor in mice. *Life Sci.*, **60** (4-5):PL69-74.
- Matsuzaki P, Akisue G, Salgado Oloris SC, Górniak SL, Zaidan Dagli ML. (2003). Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. *Life Sci.* **74** (5), 573-9.
- Mitra R, Dharajiy N, Kumari L, Varalakshmi C, Khar (2004). A. Migration of antigen presenting cells from periphery to the peritoneum during an inflammatory response: role of chemokines and cytokines. *FASEB J.* **18** (14), 1764-6.
- Monte M., Davel L.E., Sacerdote D.E., Lusting E. (1997). Hydrogen peroxide is involved in lymphocyte activation mechanisms to induce angiogenesis. *Eur J Cancer.* **33** (4), 676-82.
- Morvan D, Demidem A, Papon J, De Latour M, Madelmont JC. (2002). Melanoma tumors acquire a new phospholipid metabolism phenotype under cysteamine as revealed by high resolution magic angle spinning proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of intact tumor samples. *Cancer Res.* **62** (6), 1890-7.
- Nascimento FR, Silva BT, Viana JO, Cruz GB, Arruda K, Guerra RN. The anti-tumoral activity of vegetal species found in Amazonian region. *Proceedings of the IV Congreso Latinoamericano de Immunología*; 2002 Dez 9-13; Havana, Cuba.
- Norman GR, Streiner DL. (1994). *Biostatistics – The Base Essentials*. St. Louis (MO): Mosby Year Book; 260 p.
- Pinello KC, Fonseca Ede S, Akisue G, Silva AP, Salgado Oloris SC, Sakai M, et al. (2006) Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) extract on macrophage activity. *Life Sci.* **78** (12), 1287-92.
- Rabinovitch M, Manéjas RE, Russo M, (1971). Abbey EE. Increased spreading of macrophages from mice treated with interferon inducers. *Cell Immunol.* **29** (1), 86-95.
- Russo M, Teixeira HC, Marcondes MC, Barbutto JA. (1989). Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. *Braz J Med Biol Res.* **22** (10), 1271-3.
- Sakai M, Fonseca ES, Dagli ML, Palermo-Neto J. (2006). Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. *Life Sci.* **78** (16), 1777-83.
- Schorey JS, Lawrence C. The pattern recognition receptor Dectin-1(2008), from fungi to mycobacteria. *Curr Drug Targets.* **9** (2), 123-9.

- Sherrington EJ, Sanderson P, Calder PC. (1995). The effect of dietary lipid manipulation on macrophage cell surface molecule expression. *Biochem Soc Trans.* **23** (2), 272S.
- Silva RJ, da Silva MG, Vilela LC, Fecchio D. (2002). Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with Bothrops jararaca venom. *Mediators Inflamm.* **11** (4), 197-201.
- Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma (2003). Interferon Augments the Intracellular Pathway for Lipopolysaccharide (LPS) Recognition in Human Intestinal Epithelial Cells through Coordinated Up-Regulation of LPS Uptake and Expression of the Intracellular Toll-Like Receptor 4-MD-2 Complex. *Infect Immun.* **71** (6), 3503-11.
- Tapiero H, Mathé G, Couvreur P, Tew KD. Arginine. (2002), *Biomed Pharmacother.* **56** (9), 439-45.
- Wallace FA, Neely SJ, Miles EA, Calder PC. (2000). Dietary fats affect macrophage-mediated cytotoxicity towards tumour cells. *Immunol. Immunol Cell Biol.* **78** (1), 40-8.
- Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG. (2002). The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res.* **12** (5-6), 311-20
- Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC (2002). The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology.* 1994; **82** (4), 603-10.

Received: March 04, 2010;
Revised: October 07, 2010;
Accepted: September 12, 2011.