TATIANE APARECIDA CANHAMERO GASPARELO

**INFLUÊNCIA DE *LOC*/REGULADORES DE INFLAMAÇÃO AGUDA
NA DETERMINAÇÃO DE CICATRIZAÇÃO OU REGENERAÇÃO
TISSULAR EM CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADOS
PARA MÁXIMA OU MÍNIMA 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

TATIANE APARECIDA CANHAMERO GASPARELO

**INFLUÊNCIA DE *LOC*/REGULADORES DE INFLAMAÇÃO AGUDA
NA DETERMINAÇÃO DE CICATRIZAÇÃO OU REGENERAÇÃO
TISSULAR EM CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADOS
PARA MÁXIMA OU MÍNIMA 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: Prof. 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 total

Gasparelo, Tatiane Aparecida Canhamero.

Influência de loci de inflamação aguda na determinação de cicatrização ou regeneração tissular em camundongos geneticamente selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda / Tatiane Aparecida Canhamero Gasparelo. -- 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: Imunogenética.

Versão do título para o inglês: Influence of acute inflammation loci on determination of wound healing or regeneration in genetically selected mice for maximal or minimal acute inflammatory response.

1. Reparo tecidual 2. Regeneração 3. Cicatrização 4. Inflamação
5. Camundongos geneticamente selecionados 6. Gene Slc11a1 I.
Franco, Prof. Dr. Marcelo II. Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III.
Título.

ICB/SBIB0207/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tatiane Aparecida Canhamero Gasparelo.

Título da Tese: Influência de loci de inflamação aguda na determinação de cicatrização ou regeneração tissular em camundongos geneticamente selecionados para máxima ou mínima 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 **23** 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 **Influência de loci reguladores de inflamação aguda na determinação de reparo ou regeneração tissular em camundongos geneticamente selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda** do qual participou(ar)am o(s) **Tatiane Aparecida Canhamero Gasparedo, Jussara Gonçalves Fernandes, Mariana Perlati dos Santos, Mara Adriana Correa** os pesquisadores **Olga Célia Martinez Ibañez, Orlando Garcia Ribeiro Filho, Nancy Starobinas, Wafa Hanna 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 **12.04.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 13 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.017.13

São Paulo, 05 de abril de 2013.

REF.: Protocolo nº 23/10.

"Influência de loci reguladores de inflamação aguda na determinação de reparo ou regeneração tissular em camundongos geneticamente selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 12.04.2016.**

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 Anatomia

Instituto de Ciências Biomédicas - USP

À Deus...

Dedico esta tese aos meus amores,

Marcos e Raul,

Vocês são a razão de minha existência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Marcelo De Franco, por ser o maior incentivador na superação de meus limites. Obrigada Boss pela paciência, confiança e oportunidade. Sou uma grande admiradora de seu trabalho.

À Dra. Andrea Borrego e a Dra. Nancy Starobinas pela amizade e infinita disponibilidade e colaboração nos experimentos. Muito obrigada.

Aos pesquisadores do laboratório de Imunogenética, a Dra. Olga Ibañez, Dra. Wafa Cabrera, Dr. Orlando Ribeiro, Dr. José Ricardo Jensen, Dra. Solange Massa, Dra. Mônica Spadafora, Dra. Milene Tino De Franco, Dra. Solange Carbonare e Dra. Aryene Trezena pelo apoio e contribuição intelectual durante todo o meu doutorado.

Aos queridos amigos do laboratório de imunogenética, À Jussara, Layra, Iana, Aline, Lilian, Alessandra, Marcela, Mara Corrêa, Mara Irineu, Andressa, Mariana, Fernanda Ampessam, Cristiano, Renata, Francisca, Débora, Ludmila, Thalita, Thaís Narcizo, Priscila, Priscilia, Camila, Miriam, Juliana, Karen, Felipe, Flávia, Tamires, Nathália, Thaís, Fernanda e Verena pelo incentivo, carinho, risadas e convivência maravilhosa. A pós-graduação permitiu-me conhecer amigos que levarei comigo eternamente.

Aos funcionários do laboratório de Imunogenética, Mara Irineu, Andressa Rogge, Neusa Miranda, Tânia Braga, Sandra Ottoboni, Ronaldo, Rosa, Marinalva Lima, Aline Dias, Cristiane Garamoni, Gustavo, Manuel e Celso pelo carinho na preparação dos materiais e dedicação aos animais.

Aos membros da minha banca de qualificação, Dr. Niels Camara, Dra. Sônia Jancar e Dr. Vilmar Dias pelas sugestões e ricos ensinamentos.

À Cristhiane Aguiar e ao Matheus Costa pela colaboração nos experimentos de imunohistoquímica, o meu muito obrigado, não só a vocês como a todos do laboratório do Dr. Niels Camara.

Ao Dr. Rodolfo Favaro pelo auxílio nos experimentos de histologia.

Aos meus pais pela minha vida. Sem eles esse sonho nunca se tornaria possível. Vocês são minha base e tudo que sou devo a vocês. Meus exemplos. Agradeço por me ampararem em todos os momentos, me incentivarem sempre a ser positiva e a lutar pelos meus objetivos. Amo vocês.

Ao meu irmão Everton pelo carinho e imenso apoio sempre que precisei. É muito bom saber que tenho você comigo!

Ao meu amado filho Raul, por me ensinar o que é o puro e verdadeiro amor. Você é o que gerei de melhor. Com você os meus dias sempre são maravilhosos.

Ao meu esposo Marcos pela força que nos une e que faz o nosso amor o mais intenso e o maior. Agradeço toda a sua dedicação, companheirismo, paciência e confiança em mim. Essa conquista é nossa!

À minha cunhada Valeska pelo incentivo durante todo o doutorado.

Ao meu sogro Antônio, minha sogra Néia, minha cunhada Viviane e minha amadas sobrinhas Nathália e Alice por me acolherem no lar de vocês. Obrigada pelo apoio durante todos esses anos de estudo.

Às minhas amigas Lidiane Grund e Karina Scaramuzzi pela amizade e convivência maravilhosa desde a minha chegada ao Instituto Butantan. Vocês são pessoas especiais.

À Fapesp pelo apoio financeiro, imprescindível para que eu pudesse me dedicar exclusivamente a tese.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan com apoio financeiro da FAPESP sob o processo nº 2009/14452-5.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas o
mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

CANHAMERO, T. **Influência de *loci* reguladores de inflamação aguda na determinação de cicatrização ou regeneração tissular em camundongos geneticamente selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda.** 2014. 181 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Sublinhagens de camundongos AIRmax e AIRmin homozigotas para os alelos S do gene *Slc11a1* diferem na capacidade de reparar um orifício na orelha. Os animais AIRmax^{SS} regeneraram o tecido da orelha 30 dias após a perfuração, enquanto que os animais AIRmin^{SS} apenas cicatrizaram a ferida mas nunca a restauraram completamente. A regeneração da orelha observada nos animais AIRmax^{SS} deve-se a inflamação menos intensa da área ferida no início do processo de reparação, culminando em baixa deposição de colágeno e expressão da proteína α -SMA na orelha desses animais e a repressão de genes participantes em funções relacionadas à contração muscular. Além disso, detectamos alguns genes candidatos no cromossomo 11 regulando o fenótipo de cicatrização tissular da orelha de camundongos AIRmin^{SS}. Os resultados obtidos sugerem que o grau da resposta inflamatória, assim como a ativação ou repressão de genes participantes durante os eventos de reparação tissular podem modular a qualidade da resolução da injúria, culminando em um processo regenerativo ou de cicatrização.

Palavras-chave: Reparo Tecidual. Regeneração. Cicatrização. Inflamação. Camundongos geneticamente selecionados. Gene *Slc11a1*.

ABSTRACT

CANHAMERO, T. **Influence of regulatory loci of acute inflammation in determination of wound healing or regeneration in mice genetically selected for maximal or minimal acute inflammatory response.** 2014. 181 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Homozygous AIRmax and AIRmin sublines for *Slc11a1* R and S alleles differ in the ability to repair to the ear hole. AIRmax^{SS} mice exhibited regeneration 30 days after ear punch while AIRmin^{SS} animals did not show regeneration. The regeneration observed in AIRmax^{SS} mice was due to lower inflammation at the beginning of repair process resulting in less deposition of collagen and expression of α -SMA protein in the ears of these animals. Down regulated genes related with muscle contraction was observed in AIRmax^{SS} mice. In addition, AIRmin^{SS} mice presented gene cluster on chromosome 11 with expression profile that predispose them to wound healing with scar. These results suggest that the importance of regulating inflammation in the initial events and the activation and repression of some genes related to the wound healing phenotype can drives tissue regeneration or wound healing after ear punch.

Keywords: Tissue repair. Regeneration. Wound healing. Inflammation. Genetically selected mice. *Slc11a1* gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Estágios clássicos durante o processo de reparo tecidual.....	27
Figura 2:	Processo de geração das linhagem AIR	29
Figura 3:	Gráfico representativo da divergência entre as linhagens AIR	30
Figura 4:	Figura representativa da proteína de membrana codificada pelo gene <i>Slc11a1</i>	32
Figura 5:	Representação do processo de reparação tissular em camundongos AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS}	40
Figura 6:	Controles internos presentes nos chips de microarray.	44
Figura 7:	Quantificação do gene ciclofilina em qPCR utilizando RNA de orelha de animais das sublinhagens AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} controles e experimentais.....	46
Figura 8:	Número de genes diferencialmente expressos ($\geq 2X$) nos animais AIRmax ^{SS} em comparação aos animais AIRmin ^{SS} nos períodos 0, 24 h, 10 d e 30 d.	52
Figura 9:	Número de genes ativados nas orelhas dos animais AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} experimentais em comparação aos camundongos controles	53
Figura 10:	Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} experimentais em comparação aos camundongos controles	54
Figura 11:	Categorias funcionais de genes com expressão ≥ 2 vezes nos animais AIRmax ^{SS} comparados aos animais AIRmin ^{SS} controles...	55
Figura 12:	Categorias funcionais de pelos genes com expressão ≥ 2 vezes nos animais AIRmax ^{SS} comparados aos animais AIRmin ^{SS} . 24 horas após perfuração das orelhas.....	57
Figura 13:	Genes ativados agrupados em categorias funcionais nos animais AIRmax ^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$).....	59
Figura 14:	Genes reprimidos agrupados em categorias funcionais nos animais AIRmax ^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$).....	60

Figura 15:	Categorias funcionais de genes com expressão ≥ 2 vezes nos animais AIRmax ^{SS} comparados aos animais AIRmin ^{SS} . 10 dias após perfuração das orelhas	62
Figura 16:	Genes ativados agrupados em categorias funcionais nos animais AIRmax ^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$).	64
Figura 17:	Genes reprimidos agrupados em categorias funcionais nos animais AIRmax ^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$)	66
Figura 18:	Categorias funcionais de genes com expressão ≥ 2 vezes nos animais AIRmax ^{SS} comparados aos animais AIRmin ^{SS} 30 dias após perfuração das orelhas	68
Figura 19:	Genes ativados agrupados em categorias funcionais nos animais AIRmax ^{SS} 30 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$).	72
Figura 20:	Genes reprimidos agrupados em categorias funcionais nos animais AIRmax ^{SS} 30 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$).	73
Figura 21:	Genes ativados agrupados em cromossomos nos animais AIRmax ^{SS} 24 horas, 10 e 30 dias após perfuração das orelhas ($\geq 2X$).....	77
Figura 22:	Genes reprimidos agrupados em cromossomos nos animais AIRmax ^{SS} 24 horas, 10 e 30 dias após perfuração das orelhas ($\geq 2X$)	79
Figura 23:	Expressão relativa dos genes <i>Il1b</i> e <i>Cxcl2</i>	81
Figura 24:	Expressão relativa dos genes <i>Col1a1</i> , <i>Col3a1</i> e <i>Mmp9</i>	82
Figura 25:	Expressão relativa dos genes <i>Fn1</i> , <i>Tnc</i> , <i>Krt6a</i> e <i>Actn3</i>	84
Figura 26:	Expressão relativa do gene <i>Tgfb</i>	85
Figura 27:	Quantificação de citocinas e quimiocina no soro 24 e 48 horas após perfuração de orelha	87
Figura 28:	Fotomicrografia das orelhas de camundongos AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} marcadas com H.E em diferentes fases do processo de reparo tecidual.....	89
Figura 29:	Fotomicrografia das orelhas de camundongos AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} marcadas com Tricrômico de Masson em diferentes fases do processo de reparo tecidual.....	91

Figura 30:	Fotomicrografia das orelhas de camundongos AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} marcadas com Picrosirius Red em diferentes fases do processo de reparo tecidual.	93
Figura 31:	Quantificação do conteúdo de colágeno marcado com Picrosirius Red presente nas orelhas de camundongos AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS}	94
Figura 32:	Fotomicrografia das orelhas de camundongos AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} com positividade para α -SMA em diferentes fases do processo de reparo tecidual	96
Figura 33:	Quantificação da proteína α -SMA expressa nas orelhas de camundongos AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS}	97
Figura 34:	Fotomicrografia das orelhas de camundongos AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} com positividade para FSP-1 em diferentes fases do processo de reparo tecidual.	98
Figura 35:	Quantificação da proteína FSP-1 expressa nas orelhas de camundongos AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS}	99

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1	Sequência de <i>primers</i> utilizados na síntese do cDNA.	42
-----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIR	Resposta Inflamatória Aguda
AIRmax	Resposta Inflamatória Aguda Máxima
AIRmin	Resposta Inflamatória Aguda Mínima
cDNA	DNA complementar
Ct	Cycle Threshold
D.O	Densidade óptica
EASE	Expression analysis systematics explorer
ECM	Matriz extracelular
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
FSP	Proteína específica de fibroblasto
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
IFNγ	Interferon - γ
IL	Interleucina
KGF	keratinocyte growth factor
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matriz Metaloproteinase
NO	Óxido nítrico
Nramp1	Natural resistance-associated macrophage protein-1
PAF	Platelet-activating factor
PCR	Polimerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factors
PG	Prostaglandinas
PIA	Artrite induzida por Pristane
PMN	Polimorfonucleares
QTL	Quantitative trait loci
RNA_m	RNA mensageiro
SAM	Significance Analysis of Microarray
Slc11a1	Solute carrier family 11a member 1
SMA	Actina de músculo liso
TGFβ	Transforming growth factor- β

TLR	Toll like receptors
TNFα	Tumor necrosis factor- α
TPA	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Reparação tissular	24
1.2 Cicatrização	24
1.3 Regeneração	27
1.4 Linhagens de camundongo AIR	28
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Animais	39
3.2 Modelo Experimental	39
3.3 Extração de RNA de orelha	40
3.4 Síntese de cDNA	42
3.5 Expressão gênica global	43
3.6 Expressão gênica relativa	45
3.7 Milliplex (Luminex)	47
3.8 Preparação histológica e método imunohistoquímico	48
3.9 Análise estatística	49
4 RESULTADOS	50
4.1 Análise da expressão gênica global	51
4.1.1 <i>Categorias biológicas verificadas em animais controles</i>	54
4.1.2 <i>Categorias biológicas verificadas 24 horas após a perfuração da orelha</i>	55
4.1.3 <i>Categorias biológicas verificadas 10 dias após a perfuração da orelha</i>	56
4.1.4 <i>Categorias biológicas verificadas 30 dias após a perfuração da orelha</i>	66
4.1.5 <i>Agrupamento gênico por cromossomos</i>	74
4.2 Análise de expressão gênica relativa	80
4.2.1 <i>Níveis de expressão gênica para Il1b e Cxcl2</i>	80
4.2.2 <i>Níveis de expressão gênica para Col1a1, Col3a1 e Mmp9</i>	81
4.2.3 <i>Níveis de expressão gênica para Fn1, Tnc, Krt6a e Actn3</i>	82
4.2.4 <i>Níveis de expressão gênica para Tgfb</i>	84
4.3 Dosagem de mediadores inflamatórios no soro	85
4.4 Identificação das alterações histológicas da orelha	87
4.4.1 <i>Hematoxilina e eosina (HE)</i>	88
4.4.2 <i>Tricrômico de Masson</i>	91

4.4.3 Picrosirius Red	92
4.4.4 Anticorpo α-SMA	94
4.4.5 Anticorpo FSP-1	97
5 DISCUSSÃO	100
6 CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS	111
APÊNDICE A - Número de genes diferencialmente expressos ($\geq 2X$) nos animais AIRmax ^{SS} em comparação aos animais AIRmin ^{SS} controles	127
APÊNDICE B - Número de genes diferencialmente expressos ($\geq 2X$) nos animais AIRmax ^{SS} em comparação aos animais AIRmin ^{SS} após 24 horas de perfuração da orelha	129
APÊNDICE C - Número de genes ativados nas orelhas dos animais AIRmax ^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$)	131
APÊNDICE D - Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax ^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$)	134
APÊNDICE E - Número de genes diferencialmente expressos ($\geq 2X$) nos animais AIRmax ^{SS} em comparação aos animais AIRmin ^{SS} após 10 dias de perfuração da orelha	136
APÊNDICE F - Número de Número de genes ativados nas orelhas dos animais AIRmax ^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$)	138
APÊNDICE G - Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax ^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$) ...	141
APÊNDICE H - Número de genes diferencialmente expressos ($\geq 2X$) nos animais AIRmax ^{SS} em comparação aos animais AIRmin ^{SS} após 30 dias de perfuração da orelha	143
APÊNDICE I - Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax ^{SS} 30 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$) ..	145
APÊNDICE J - CANHAMERO, T.; REINES, B.; 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. <i>Inflammation</i> , v. 34, n. 5, p. 303-313, 2014.....	147

APÊNDICE K - DE FRANCO, M.; PETERS, L. C.; CORREA, M. A.; GALVAN A, CANHAMERO, T.; BORREGO, A.; JENSEN, J. R.; GONÇALVES, J.; CABRERA, W. H.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO, O. G.; DRAGANI, T. A.; 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, n. 3, p. e88302, 2014	159
APÊNDICE L - CANHAMERO, T.; GARCIA, L. V.; DE FRANCO, M. Acute Inflammation Loci Are Involved in Wound Healing in the Mouse Ear Punch Model. [Review] Adv. Wound Care (New Rochelle) , v. 3, n. 9, p. 582-591, 2014	170

1 INTRODUÇÃO

1.1 Reparação Tissular

A pele é uma importante barreira contra danos tissulares de qualquer natureza, sejam eles físicos, químicos ou biológicos (BOTTCHE-HABERZETH et al., 2010).

Com o rompimento tecidual, o processo de reparação é iniciado e pode ser caracterizado por duas categorias distintas: cicatrização e regeneração do órgão afetado (CLARK et al., 1998; CLARK, 1985).

1.2 Cicatrização

O processo cicatricial é complexo e dividido em três fases: inflamatória (0-2 dias), proliferativa (5-20 dias) e remodelagem (>30 dias), envolvendo a participação de muitos genes (CLARK, 1996).

Após a ocorrência de uma lesão, frequentemente ocorre o rompimento de vasos sanguíneos e o acesso de constituintes do sangue para o interior da lesão. Além disso, iniciam-se mecanismos de vasoconstrição que corroboram para a homeostase do tecido e início da fase inflamatória em resposta a injúria.

A injúria endotelial promove a ativação de plaquetas e início da cascata de coagulação. Esta ativação resulta na formação de uma matriz de fibrina que permite provisoriamente a migração celular (TSIROGIANI et al., 2006).

A ativação plaquetária induz a liberação de grânulos alfa, responsáveis por secretarem fatores de crescimento como o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator β transformante do crescimento (TGF- β) (BARRIENTOS et al., 2008). O PDGF, juntamente com citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), são importantes na quimiotaxia de neutrófilos para o local da lesão (HANTASH et al., 2008).

Os neutrófilos estão entre as primeiras células a migrarem dos vasos para a lesão. Estas células iniciam a descontaminação da região afetada destruindo os microrganismos invasores, quando houver, minimizando a possibilidade de uma infecção. Além disso, produzem substâncias bioativas e proteases, que podem converter citocinas que atuam na injúria em uma forma ativa ou inativa, podendo desta forma interferir no reparo tecidual (DOVI et al., 2004).

Os macrófagos também participam efetivamente do processo de resolução tissular. Pouco tempo após o ferimento, os monócitos conduzidos pelo sangue migram para os tecidos, se ativam e diferenciam-se em macrófagos. Estas células participarão durante todas as fases da cicatrização, mas tanto o papel dos macrófagos quanto o de neutrófilos neste processo ainda deve ser investigado (GURTNER et al., 2008).

Vários estudos demonstram que os macrófagos produzem fatores de crescimento, citocinas e proteinases que estimulam a angiogênese e a fibrinogênese (DANON et al., 1989; LEIBOVICH; ROSS, 1975), além de desempenharem grande importância na remoção de neutrófilos apoptóticos (DOVI et al., 2004). Estão presentes na maioria dos tecidos, onde são responsáveis por numerosos processos inflamatórios, imunológicos e metabólicos (PLOWDEN et al., 2004).

A influência da resposta inflamatória e a participação de macrófagos ou granulócitos promovendo ou impedindo o reparo tecidual são assuntos de grande interesse dos pesquisadores (EMING et al., 2007; GOUREVITCH et al., 2014).

Estudos sugerem que os neutrófilos podem inibir o processo de reparo tecidual. Embora forneçam proteção contra infecções, produzem uma variedade de fatores de crescimento, como IL-8 e VEGF, que podem promover a revascularização e reparo do tecido lesado. Por outro lado, outros estudos sugerem que a re-epitelização da lesão é favorecida após a depleção de neutrófilos. Os mediadores liberados por estas e outras células inflamatórias, podem interferir na migração de queratinócitos e fibroblastos resultando em um reparo tissular desfavorável e fibrose (BORDER; NOBLE, 1994; DOVI et al., 2004; DOVI et al., 2003; LINARES, 1996; MCCOURT et al., 1999; MURATA et al., 1997; RENNEKAMPFF et al., 2000).

Os mediadores produzidos e secretados por estas células inflamatórias são também necessários na próxima fase do processo de cicatrização, a fase proliferativa ou de formação de novos tecidos (SCHÄFER; WERNER, 2008).

Esta etapa ocorre no período de dois até dez dias após a injúria, e é caracterizada por proliferação celular e migração de diferentes tipos celulares, envolvendo a migração e hiperproliferação de queratinócitos na margem da injúria. O processo de cobertura da lesão originando a formação de uma nova epiderme é denominado re-epitelização. Concomitantemente a este processo, o reparo da derme também é iniciado (GURTNER et al., 2008; SCHÄFER; WERNER, 2008).

Durante a fase proliferativa os vasos sanguíneos são constituídos na extremidade da lesão, a partir de vasos preexistentes, propiciando o desenvolvimento de uma nova vasculatura. Os principais reguladores positivos da angiogênese são: o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFA) e o fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF2) (GURTNER et al., 2008; WERNER; GROSE, 2003).

Os fibroblastos tornam-se o tipo celular predominante do 7º ao 14º dia do processo de cicatrização. Estas células migram para o interior da lesão, proliferam e, produzem grandes quantidades de matriz extracelular (ECM), além de iniciarem a produção de fatores de crescimento como o fator fibroblástico básico (bFGF), TGF β , PDGF, bem como de fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), facilitando a síntese da matriz (TSIROGIANI et al., 2006).

Alguns fibroblastos presentes nas regiões marginais da lesão exibem características funcionais similares às células de músculo liso, estas células são denominadas miofibroblastos (GABBIANI et al., 1970). São responsáveis pela diminuição da ferida e pela deposição adicional de matriz, formando o tecido de granulação (OPALENIK; DAVIDSON, 2005; SCHÄFER; WERNER, 2008).

O tecido de granulação é composto por células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e uma nova matriz extracelular. Os macrófagos ativados liberam PDGF, TGF β , e FGF que estimulam os fibroblastos a sintetizarem glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno para a constituição da nova matriz extracelular (GREILING; CLARK, 1997).

A última etapa do processo de reparação, a fase de remodelagem, inicia-se a partir da segunda semana após a injúria e permanece por mais de um ano. Neste período, ocorre uma transição do tecido de granulação em tecidos maduros com cicatriz (GURTNER et al., 2008; SCHÄFER; WERNER, 2008).

Todos os eventos que foram ativados anteriormente por conta da lesão entram em declínio e cessam-se; a maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos presentes na ferida sofrem apoptose ou saem da lesão deixando uma massa contendo poucas células, que consiste principalmente de colágeno e outras proteínas de matriz extracelular (GURTNER et al., 2008).

A degradação de colágeno é dependente de enzimas proteolíticas específicas conhecidas como metaloproteinases de matriz (MMP). Estas enzimas são

produzidas por algumas células como macrófagos, queratinócitos e fibroblastos (ANGELOV et al., 2004; TSIROGIANI et al., 2006; WU et al., 2000). Embora o remodelamento continue por mais de 12 meses, a região contendo a cicatriz nunca recupera a resistência e a função de uma derme normal (MONACO; LAWRENCE, 2003).

Schäfer e Werner., *Nature*; 2008.

Figura 1: Estágios clássicos durante o processo de reparo tecidual.

1.3 Regeneração

O mecanismo de reparação comumente observado em tecidos de mamíferos após uma lesão é a cicatrização, pois a capacidade de regeneração nestes é limitada e muitas vezes não existente (HEBER-KATZ et al., 2004; STOCUM, 1996). Contudo, existem alguns modelos de regeneração epimórfica em mamíferos, regeneração esta anteriormente observada apenas em anfíbios (GOSS; GRIMES, 1975STOCUM, 1984).

O processo de regeneração, diferente da cicatrização, envolve uma completa restauração e substituição dos tecidos prejudicados, dando origem a um novo tecido com estrutura e funções normais, incluindo condrogênese (RAJNOCH et al., 2003).

As primeiras indicações em mamíferos da ocorrência de regeneração epimórfica foram observadas em coelhos. Estes animais regeneraram pequenas perfurações induzidas experimentalmente em suas orelhas exibindo regeneração semelhante à observada em anfíbios (GOSS; GRIMES, 1975).

No ano de 1998, Clark e colaboradores descobriram que a linhagem de camundongo isogênica MRL/Mpj era capaz de regenerar um orifício de 2mm de diâmetro em suas orelhas no período de 30 dias, apresentando todas as características regenerativas, ou seja, a formação de blastema (estrutura tecidual que contém células-tronco mesenquimais indiferenciadas, observada em lesões de anfíbios), a cobertura total da injúria, formação de nova cartilagem da orelha e função tecidual normal, quando comparados à outras linhagens de camundongos isogênicas como C57BL/6 (B6), CAST/Ei, e SJL/J (SJL) que apresentaram apenas reparo parcial de suas orelhas (CLARK et al., 1998; MCBREARTY et al., 1998; YU et al., 2005).

Sabe-se que a capacidade regenerativa observada nestes camundongos é um fenótipo quantitativo controlado geneticamente (MCBREARTY et al., 1998). Diversos estudos de mapeamento estão sendo desenvolvidos com o objetivo de identificar genes candidatos presentes nas regiões ou QTL (*quantitative trait loci*) que regulam esta característica quantitativa (CHO et al., 2006; KATZ et al., 2004; MASINDE et al., 2002; MASINDE et al., 2001).

Atualmente, essa linhagem de camundongo é alvo de vários estudos para uma melhor compreensão dos mecanismos que determinam a regeneração da orelha (BUCKLEY et al., 2012; CHEVERUD et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2011).

1.4 Linhagens de camundongos AIR

As linhagens de camundongos selecionadas geneticamente em nosso laboratório para a máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) resposta inflamatória aguda (AIR) (IBAÑEZ et al., 1992), apresentam-se como um modelo experimental interessante para o estudo dos mecanismos genéticos e celulares envolvidos na regeneração tecidual. Estes modelos foram obtidos através de seleção genética bidirecional, iniciada a partir de uma população fundadora e geneticamente heterogênea (F0), produzida por meio do intercruzamento de oito linhagens de

camundongos isogênicas de origem independente (STIFFEL et al., 1990), estas são: A/J, DBA/2J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/cJ e C57BL/6J.

Cada camundongo da F0 é caracterizado por uma recombinação distinta do *pool* de genes de todas as linhagens isogênicas originais (IBAÑEZ et al., 1992), conforme representado pela **figura 2** abaixo:

Ibañez et al., 1992.

Figura 2: Processo de geração das linhagens AIR.

A reação inflamatória aguda (AIR) foi produzida por meio da injeção subcutânea no dorso dos animais previamente depilados, de uma suspensão de microesferas de Biogel P-100 que possuem uma porosidade com limite de exclusão para moléculas acima de 100 Kilodaltons, sendo um polímero quimicamente inerte, não biodegradável e não imunogênico (FAUVE et al., 1983) .

Os acasalamentos seletivos foram realizados através de cruzamentos baseados no valor fenotípico individual dos dois parâmetros investigados, medidos vinte e quatro horas após a reação ao Biogel. Estes parâmetros são: quantidade de células infiltradas e concentração proteica no exsudato. O método quantitativo para avaliar a intensidade da reação inflamatória é baseado no modelo proposto por Robert Fauve e colaboradores (FAUVE et al., 1983).

As duas características estudadas são positivamente correlacionadas e possuem uma distribuição normal de frequências, o que permite a realização do processo de seleção (IBAÑEZ et al., 1992; RIBEIRO, 1994; STIFFEL et al., 1990).

Baseando-se na distribuição fenotípica da população F0 foram escolhidos os animais que apresentaram os valores fenotípicos situados nas extremidades da curva, ou seja, para a produção da linhagem de alta reatividade inflamatória aguda (AIRmax), os pais de cada geração foram selecionados entre os camundongos que apresentaram os valores de proteína e celularidade mais altos, enquanto que para a linhagem de baixa reatividade (AIRmin) a escolha foi feita entre os valores mais baixos. Para minimizar a consangüinidade foram evitados os acasalamentos entre irmãos e primos (IBAÑEZ et al., 1992).

Ao final do processo de seleção, a divergência interlinhagens atingida foi de 20 a 30 vezes para o infiltrado leucocitário e de 2,5 vezes para a concentração de proteína no exsudato. Este caráter é quantitativamente regulado por cerca de 7 a 11 loci gênicos, que segregaram independentemente e que são dotados de efeito aditivo (regulação poligênica) (**Figura 3**) (BIOZZI et al., 1998; IBAÑEZ et al., 1992).

Figura 3: Gráfico representativo da divergência progressiva entre as linhagens AIR quanto ao número médio de leucócitos infiltrantes e extravasamento protéico no sítio de injeção do Biogel (Modificado de BIOZZI et al., 1998, com permissão).

Em todas as gerações analisadas nas duas linhagens, os leucócitos polimorfonucleares constituem o tipo celular predominante no exsudato, as células mononucleares são essencialmente monócitos e pequenos linfócitos, estes últimos com contribuição desprezível (RIBEIRO et al., 2003).

Após 20 gerações de acasalamientos seletivos, admitiu-se que as linhagens atingiram o máximo de separação fenotípica, chamado de limite de seleção. No limite de seleção, teoricamente os alelos de “boa” resposta para o influxo celular e o exsudato protéico estão em homozigose na linhagem AIRmax, e os alelos de “má” resposta estão em homozigose na linhagem AIRmin (IBÁÑEZ et al., 1992).

Além da diferença na capacidade inflamatória aguda, estas linhagens divergem também em resposta a outros agentes inflamatórios não relacionados entre si ou não relacionados ao Biogel (agente selecionador), como a carragenina (VASQUEZ-BRAVO, 1996), o zimosan e o veneno de *Bothrops jararaca* (CARNEIRO et al., 2002).

Alterações genéticas decorrentes do processo seletivo interferiram também na resistência e suscetibilidade destas linhagens a doenças tumorais (BIOZZI et al., 1998; MARIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005), autoimunes (PETERS et al., 2007; VIGAR et al., 2000), e infecciosas (ARAÚJO et al., 1998; BORREGO et al., 2006).

Um dos fenótipos que diferencia amplamente as linhagens é a sensibilidade à infecção por *Salmonella Typhimurium*. Os animais AIRmax são mais resistentes enquanto os animais AIRmin são mais suscetíveis (ARAÚJO et al., 1998). Além disso, foi observado neste estudo um desequilíbrio de frequência do alelo que confere suscetibilidade (S) do gene “Natural resistance–associated macrophage protein-1” (*Nramp1*), estando presente em 60% nos animais AIRmin e em apenas 9% nos AIRmax, sugerindo que este desvio tenha ocorrido devido ao processo seletivo, e que o gene *Nramp1* ou algum outro gene muito próximo a ele no cromossomo 1, seria um dos QTL envolvidos na regulação da intensidade da reação inflamatória aguda (ARAÚJO et al., 1998).

Este desequilíbrio de frequência também interferiu na evolução de artrite induzida por pristane (PIA) em animais AIRmax e AIRmin (PETERS et al., 2007).

Há alguns anos, o gene *Nramp1* foi renomeado como “*solute carrier family 11 - proton-coupled divalent metal ion transporter member 1*” (*Slc11a1*) (FORBES et al., 2001).

A proteína codificada pelo gene *Slc11a1* localiza-se nos compartimentos endossomal/lisossomal de células fagocitárias, como monócitos/macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (CELLIER et al., 1997; VIDAL et al., 1993).

Em camundongos, a expressão do gene *Slc11a1* é encontrada no baço, fígado e peritônio (GOVONI; GROS, 1998), porém em humanos, ocorre no pulmão,

baço, fígado, e altamente expresso em leucócitos do sangue periférico. Além disso, a expressão do gene *Slc11a1* pode ser estimulada pelo lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas (LPS) e interferon- γ (IFN- γ), ou pelo estímulo inflamatório *in vivo* (CELLIER et al., 1997; GOVONI et al., 1997; VIDAL et al., 1993).

A análise da sequência da proteína do gene *Slc11a1* entre as duas formas alélicas de resistência (R) e de suscetibilidade (S) revelou que uma única mutação, não conservadora do alelo S causa uma substituição do aminoácido glicina por ácido aspártico na posição 169 do códon, dentro do quarto domínio transmembrânico da proteína, que resulta na sua completa falta de função (VIDAL et al., 1996). Esta deficiência de funcionalidade nos camundongos suscetíveis causa um acúmulo de íons no interior do fagossomo, favorecendo a replicação de patógenos (HACKAM et al., 1998).

O gene *Slc11a1* codifica uma proteína de membrana altamente hidrofóbica de aproximadamente 60 kDa, com características de uma proteína integral de membrana, que possui 12 domínios transmembrânicos, uma alça extracitoplasmática glicosilada, com vários sítios de fosforilação (BLACKWELL et al., 1995; CELLIER et al., 1995; VIDAL et al., 1993), além de uma sequência de transporte (Consensus Transport Motif- CTM) estruturalmente homóloga às proteínas de transporte de membrana encontradas em bactérias e eucariotos, indicando o envolvimento desta proteína no transporte de íons (**Figura 4**) (CELLIER et al., 1995).

Vidal et al., *J Leukoc Biol*; 1995.

Figura 4: Figura representativa da proteína de membrana codificada pelo gene *Slc11a1*.

Quanto à função bioquímica da proteína, existem algumas controvérsias, porém duas teorias são sugeridas: uma seria que o animal portador do alelo *R*, ou seja, que codifica a proteína funcional do gene *Slc11a1*, favoreceria a reação Fenton/Harber-Weiss por meio do transporte de ferro para o interior do fagolisossomo, gerando radicais hidroxilas altamente tóxicos para a bactéria (KUHN et al., 2001).

A segunda teoria propõe que o macrófago do animal que não apresenta a mutação do gene realizaria o transporte de íons eficientemente para fora do fagolisossomo indisponibilizando Fe^{+2} e cátions divalentes como Zn^{+2} e Mn^{+2} essenciais para o crescimento bacteriano (WYLLIE et al., 2002).

O gene *Slc11a1* possui efeitos pleiotrópicos e sua expressão defeituosa interfere na ativação macrofágica, refletindo na explosão respiratória, na produção de óxido nítrico (NO) e TNF- α (BARTON et al., 1995). Além disso, interage na produção de IFN- γ e IL-1 (KITA et al., 1992; RAMARATHINAM et al., 1993), e na expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (LANG et al., 1997; WOJCIECHOWSKI et al., 1999).

Estudos com o objetivo de verificar a relação de *loci* que regulam a reação inflamatória com o fenótipo de regeneração tecidual após a perfuração da orelha foram realizados nas linhagens AIRmax e AIRmin, indicando que a variabilidade deste fenótipo é altamente influenciada pela interação de QTL de inflamação aguda, localizados no cromossomo 1 a 45 Mb e no 14 a 93 Mb, indicando a existência de mecanismos genéticos comuns entre inflamação e regeneração (CANHAMERO et al., 2014; DE FRANCO et al., 2007).

Os animais AIRmax apresentaram regeneração parcial de um orifício de 2mm de diâmetro efetuado em suas orelhas em um período de 30 dias, mas não exibiram regeneração total. Nos animais AIRmin ocorreu cicatrização da borda, sem alteração visível no diâmetro do orifício inicial (DE FRANCO et al., 2007).

Entretanto, em um estudo realizado utilizando as sublinhagens homozigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* observamos que camundongos da sublinhagem AIRmax^{SS} apresentaram potente regeneração de suas orelhas 30 dias após a perfuração, sendo esta regeneração comparável a linhagem de camundongos isogênicos MRL. Diferente dos animais AIRmax^{SS}, camundongos da sublinhagem AIRmax^{RR} exibiram regeneração tardia, ou seja, somente após 60 dias de perfuração, sugerindo o envolvimento do gene *Slc11a1*, ou algum outro gene

próximo a ele, no controle genético do fenótipo de regeneração. Animais das sublinhagens AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} apresentaram apenas cicatrização do tecido (DE FRANCO et al., 2007).

Outro estudo utilizando as sublinhagens foi desenvolvido e desta vez foram utilizadas apenas as potencialmente regeneradoras frente o modelo de perfuração da orelha, sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}, durante o período inflamatório do processo de regeneração tissular.

Neste estudo, observou-se que a resposta inflamatória local foi mais intensa e tardia nos animais AIRmax^{SS}, por meio de elevados níveis da enzima mieloperoxidase, edema local e predominância de neutrófilos (CANHAMERO et al., 2011).

Ensaios de expressão gênica global em RNAm extraído da orelha demonstraram genes diferencialmente expressos entre as sublinhagens, indicando uma diferença de aproximadamente três vezes mais genes reprimidos em razão do estímulo nos animais AIRmax portadores do alelo S. Contudo, ambas sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} demonstraram genes ativados sobre-representados em temas biológicos relacionados a proliferação celular, e somente os animais AIRmax^{SS} apresentaram genes ativados relacionados a resposta inflamatória (CANHAMERO et al., 2011).

Além disso, demonstramos que os animais AIRmax^{SS} exibiram genes reprimidos agrupados em uma categoria funcional relacionada a contração muscular após 48 horas de injúria (CANHAMERO et al., 2011). O interessante dessa resposta é que a contração muscular está relacionada com o processo de cicatrização e não com regeneração (MONACO; LAWRENCE, 2003). A repressão de genes relacionadas à contração muscular não foi observada nos animais AIRmax^{RR} (CANHAMERO et al., 2011).

Ressaltamos nos estudos anteriores algumas evidências entre os mecanismos de inflamação e regeneração (CANHAMERO et al., 2014; CANHAMERO et al., 2011; DE FRANCO et al., 2007), mas nenhum estudo foi desenvolvido no intuito de avaliar quais seriam os mecanismos distintos envolvidos na regeneração dos animais AIRmax e na cicatrização observada nas orelhas dos animais AIRmin.

Nossa hipótese é que a competência dos animais regenerarem ou não um orifício na orelha pode estar relacionada, ao menos em parte, à intensidade da resposta inflamatória no início do processo de resolução tecidual.

Neste estudo, nos propomos investigar o envolvimento de genes reguladores da intensidade de resposta inflamatória aguda na determinação de fenótipos distintos, regenerativo e de cicatrização, avaliando principalmente os mecanismos genéticos durante estes processos nas sublinhagens AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}. Essas duas sublinhagens foram escolhidas para que possamos estudar este fenótipo em um fundo genético de máxima e mínima inflamação sem a influência do polimorfismo do gene *Slc11a1*.

Esta investigação nos permitirá contribuir em estudos futuros dirigidos a tratamentos clínicos relacionados ao percentual e qualidade de reparo tecidual em populações humanas, pois as linhagens selecionadas geneticamente em nosso laboratório simulam adequadamente populações naturais.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo estudar o envolvimento de genes reguladores da intensidade de resposta inflamatória aguda na determinação de fenótipos distintos, regenerativo e de cicatrização tissular. Para isso, avaliamos comparativamente em animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} o processo de reparação dos tecidos após a perfuração da orelha por meio de:

- Investigação dos genes diferencialmente expressos por análise de expressão gênica global;
- Validação dos dados de expressão gênica global por reações de polimerização em cadeias quantitativas;
- Quantificação de mediadores inflamatórios no soro;
- Avaliação histológica das orelhas perfuradas durante as diferentes fases do processo de resolução;
- Investigação do conteúdo de colágeno presente nas orelhas dos camundongos após a injúria;
- Determinação da expressão das proteínas α -SMA e FSP-1 na orelha dos animais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos das sublinhagens homozigotas para os alelos S do gene *Slc11a1* selecionados para a máxima ou mínima resposta inflamatória aguda: AIRmax *Slc11a1*^{SS} (AIRmax^{SS}) e AIRmin *Slc11a1*^{SS} (AIRmin^{SS}) produzidos por meio de cruzamentos assistidos por genotipagem. Fêmeas de aproximadamente 2 a 4 meses foram utilizadas nos experimentos. Estes animais são criados e mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Este projeto está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEEa).

3.2 Modelo experimental

A indução do processo de reparação tecidual foi desenvolvida baseada em um modelo proposto pelo laboratório Jackson. Uma perfuração de aproximadamente 2 mm de diâmetro foi executada na orelha dos camundongos por meio de um perfurador (Fisher) e o processo de reparação da pele foi acompanhado durante 30 dias (**Figura 5**). Este procedimento consiste numa técnica microcirúrgica aceita em relação à saúde do animal, além disso, é uma técnica minimamente invasiva, e aparentemente indolor.

Figura 5: Representação do processo de reparação tissular em camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}. As figuras A e B representam as orelhas de animais AIRmin^{SS} e AIRmax^{SS} após um dia de perfuração e as figuras C e D representam as orelhas de animais AIRmin^{SS} e AIRmax^{SS} após 30 dias de perfuração, respectivamente.

3.3 Extração de RNA de orelha

A extração do RNA total de orelha foi realizado por meio do uso do *RNAspin Mini Kit da GE Healthcare*. As orelhas inteiras foram excisadas, limpas com álcool 70% e colocadas em nitrogênio líquido. Para que ocorresse lise celular, 350 µl de tampão RA1 e 3,5 µl de β-mercaptoetanol foram adicionados às orelhas. As amostras foram posteriormente submetidas o vórtex vigorosamente. Após a lise, as amostras foram filtradas por um mini filtro *RNAspin* e centrifugadas durante 1 minuto a uma velocidade de 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 foi colocado junto ao filtrado 350 µl de etanol 70% e cada amostra foi submetida ao vórtex de 2 a 5 segundos. Na etapa posterior, a de ligação do RNA, as amostras foram homogeneizadas de 2 a 3 vezes e colocadas em uma nova coluna de *RNAspin* localizadas dentro de um tubo coletor de microcentrífuga de 2 ml. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 30 segundos a uma velocidade de 8.000 g e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor.

Para a obtenção da dessalinização da membrana de sílica, foram adicionados às amostras 350 µl de tampão MDB (*membrane desalting buffer*). Após aplicação do tampão, as amostras foram centrifugadas a 11.000 g durante 1 minuto para a secagem da membrana. A remoção do sal promove uma melhor digestão pela DNaseI.

Na fase de digestão do DNA foram aplicados 95 µl de reação da DNase (10 µl de *DNaseI 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 três etapas foram requeridas. Na primeira lavagem, 200 µl de tampão RA2 (tampão que inativa a DNaseI) foram adicionados à coluna *RNAspin*, e as

colunas foram centrifugadas durante 1 minuto a 11.000 g. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor.

Para a segunda lavagem foram adicionados à coluna *RNAspin* 600 µl de tampão RA3, e novamente as colunas foram centrifugadas durante 1 minuto na velocidade de 11.000 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a coluna colocada de volta no interior do tubo coletor.

Na terceira e última lavagem, foram adicionados 250 µl de tampão RA3 na coluna *RNAspin*. Para garantir que a membrana ficasse completamente seca, mais uma centrifugação foi necessária, dessa vez durante 2 minutos a uma velocidade de 11.000 g. Ao término deste procedimento, a coluna foi colocada no interior 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 *RNAse* diretamente sobre a membrana, que foi centrifugada por 1 minuto a 11.000 g.

A concentração de RNA das amostras foi avaliada por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 nm (*GE NanoVue Spectrophotometer*) 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) e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris-base 1M, ácido bórico 1M e EDTA 20 nM) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BET) (Pharmacia). O gel contendo as amostras foi colocado em cuba eletroforética, recoberto com tampão TBE e foi submetido a uma corrente elétrica de 80 V por cerca de 30 minutos. Após este período o gel foi analisado no “Pharmacia Biotech – Image Master VDS” para a avaliação da presença das bandas de integridade do RNA.

3.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada por meio de uma reação de transcrição reversa a partir do RNA de orelha total purificado. Ao volume de 10 µl contendo 0,5 µg de RNA foram adicionados 1 µl de Oligo(dT)₁₂₋₁₈, (50 mM) 2 µl de água livre de *RNAse* e 1 µl de oligonucleotídeos dNTP (10 mM). A combinação dos reagentes foi homogeneizada e submetida à temperatura de 65 °C por 5 minutos. Após este período as amostras permaneceram no gelo por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 4 µl de tampão 5X concentrado (250 mM Tris-HCL pH 8,3, 375 mM KCL

e 15 mM MgCl₂), 1 µl de DTT (0,1M) e 1 µl da enzima *SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase* – Invitrogen (200 U/ml). As amostras foram aquecidas a 50 °C por 50 minutos e inativadas a 70 °C por 15 minutos. As reações foram incubadas em aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200.

Para a amplificação dos cDNAs específicos foram utilizadas sequências sintéticas (*primers*). Estes *primers* foram desenhados para éxons que flanqueiam íntrons de grande tamanho (1000 pb) evitando assim a amplificação do DNA genômico (**Tabela 1**).

TABELA 1- Sequência de *primers* utilizados nas reações de amplificação.

<i>Primers</i>	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
<i>Ciclofilina</i>	5'- AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT-3'	5'- AAATGCCCGCAAGTCAAAAG-3'
<i>Il1b</i>	5'- TTGACGGACCCCAAAAGATG-3'	5'- AGAAGGTGCTCATGTCCTGA-3'
<i>Cxcl2</i>	5'-CCTGGTTCAGAAAATCATCCA-3'	5'-CTTTGGTTCTCCGTTGAGG-3'
<i>Col1a1</i>	5'-CGGCTCCTGCTCCTCTTAG-3'	5'-GGTTTCCACGTCTCACCATT-3'
<i>Col3a1</i>	5'-CACCTTCTTCATCCCACTC-3'	5'-TGTTTCTGGCTTCCAGACAT-3'
<i>Mmp9</i>	5'-CGCTCATGTACCCGCTGTAT-3'	5'-TGGGACACATAGTGGGAGGT-3'
<i>Fn1</i>	5'-GGAGTGGCACTGTCAACCTC-3'	5'-CTGGGGGTCTCCGTGATAAT-3'
<i>Tnc</i>	5'-CCGGCTTGAAGAAAGTAACC-3'	5'-AGGTGATCAGTGCTGTGGTG-3'
<i>Krt6a</i>	5'-GACTGAGGAGAGGGAGCAGA-3'	5'-CTTGGTGTCCAGGACCTTGT-3'
<i>Actn3</i>	5'- GACCCAATTGGAAACCTGAA-3'	5'-GGCTTTCTCATCTGTTTGG-3'
<i>Tgfb</i>	5'-ACCGCAACAACGCCATCTAT-3'	5'-GTAACGCCAGGAATTGTTGC-3'

3.5 Expressão gênica global

A preparação e análise dos *microarrays* foram desenvolvidas por meio da utilização da plataforma “*GeneChip*” (*Affymetrix mouse 1.0 ST bioarrays* - 27k genes, *Affymetrix*, Inc, Santa Clara, CA, Estados Unidos) e divididas nas principais etapas descritas abaixo: Preparação do alvo; hibridização do alvo; lavagem e marcação dos *arrays*; escaneamento do *array* e análise dos dados.

Uma solução de mRNAs bacterianos foi utilizada como controle interno do *chip*, a qual possui sequências que se hibridizaram a esses controles. A partir de

1µg do RNA total de orelha de alta qualidade foram transcritos cDNA, ou seja, cópias do RNA presente no tecido da orelha, porém mais estável. O cDNA dupla fita foi purificado e serviu como um molde na subsequente transcrição *in vitro* (reação IVT). A reação de IVT foi desenvolvida na presença de T7 RNA polimerase e esses RNA amplificados *in vitro* foram marcados com compostos fluorescentes como a biotina. A reação foi protegida da luz e incubada por 18 horas em estufa de 37 °C.

Em seguida, as moléculas de cRNA biotiniladas foram purificadas, fragmentadas e hibridizadas. O sinal foi desenvolvido por meio da incubação de estreptavidina-Cy5 às amostras por 30 minutos. O excesso de compostos fluorescentes foi removido pelas lavagens dos *chips* e secagem por centrifugação. Os *chips* foram analisados com o “GeneArray Scanner-Affymetrix”.

Esta plataforma utiliza um sistema de detecção de cor única, baseado na incorporação indireta de apenas um fluorocromo para a marcação das amostras. Este sistema elimina resultados falsos decorrentes de parâmetros enzimáticos que afetam a frequência de incorporação de fluorocromos distintos, ou relativos à sobreposição espectral de duas fluorescências. Os dados de expressão extraídos de cada *microarray* foram normalizados de acordo com os valores de fluorescência dos genes de expressão constitutiva, presentes nos *chips* como controles internos (**Figura 6 A e B**).

Critérios para definição de valores de *cut-off* para identificar genes diferencialmente expressos foram baseados em parâmetros estatísticos pela análise de significância de *microarray* – SAM, e foram considerados diferencialmente expressos os genes com $\geq$ duas vezes de diferença de expressão. Para as análises de agrupamentos funcionais foi utilizado o programa EASE (*Expression Analysis Systematic Explorer*). Esse programa permite que os genes diferencialmente expressos possam ser agrupados em “temas biológicos” de acordo com sua categoria funcional, sua localização cromossômica e sua representação em relação ao genoma total. O EASE calcula a sobrerepresentação dos genes em relação ao total de genes utilizados no ensaio e anotados dentro de cada sistema, tendo o “Gene Ontology” como referência. Utilizamos a conversão da identificação dos genes para números do “LocusLink” para assegurar que cada gene fosse classificado apenas uma vez em cada categoria, já que em alguns sistemas (por exemplo, o *GenBank*) um único gene pode ter mais de uma identificação. Para

calcular a significância das categorias, o programa utiliza um teste estatístico chamado “EASE score”.

Esse teste nada mais é do que um teste exato de Fisher modificado, onde é penalizada a categoria composta por poucos genes (chamadas “instáveis”) em favor de categorias representadas por um maior número de genes, levando em consideração a perspectiva dos temas globais biológicos, minimizando a possibilidade de falsos-positivos. É, portanto, um teste mais restritivo (HOSACK et al., 2003). Estas ferramentas estão disponíveis no programa “Multi Experiment Viewer” (Mev).

Figura 6: Controles internos presentes nos *chips* de *microarray*. **A** Expressão do sinal de fluorescência dos *chips*. **B** Correlação da expressão do sinal de fluorescência dos genes de controle interno do *chip* comparada às amostras alvo.

3.6 Expressão gênica relativa

Os cDNAs obtidos das orelhas de animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} foram quantificados por meio de reações de PCR em tempo real (qPCR) para validação de alguns genes diferencialmente expressos detectados nos experimentos de expressão gênica global. Utilizamos os mesmos cDNAs tanto nos experimentos de *microarray* quanto nos de qPCR.

Cada amostra de cDNA foi adicionada a uma reação contendo as sequências específicas de primers (5 µM); 6,25 µl do Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen), e água para ajustar o volume final de reação em 12,5 µl por tubo.

As reações foram incubadas no aparelho Chromo 4 (MJ Research) e submetidas a uma fase inicial de incubação a 50 °C por 2 minutos, seguida da fase de ativação da enzima (*hot start*) 95 °C a 5 minutos. As sequências alvo foram amplificadas durante 40 ciclos constituídos de etapas sucessivas de desnaturação (95 °C por 20 segundos) e de anelamento (60 °C por 35 segundos). A aquisição da fluorescência foi incorporada ao material dupla fita amplificada a cada ciclo e efetuada na etapa final.

A cada amostra foi atribuído um valor de Ct (*Cycle Threshold*) referente ao número de ciclos necessários para que a fluorescência incorporada às duplas fitas amplificadas ultrapassasse a fluorescência de fundo, ou seja, no início da fase logarítmica de amplificação, da qual depende diretamente de quantas cópias das sequências alvo havia inicialmente em cada amostra.

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase *Melting* onde a temperatura variou de 55 °C a 90 °C e a fluorescência foi adquirida a cada 1°C, registrando-se a temperatura de dissociação, ou desnaturação da dupla fita do material amplificado, o que indica o tamanho e, portanto, a especificidade do produto amplificado em cada reação (**Figura 7 A e B**).

Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa “*Opticon Monitor Analysis Software 2.03*”, conforme indicado.

Para quantificar os resultados obtidos pelo qPCR foi utilizado o Método de *Threshold* Comparativo (GIULIETT et al., 2001; LIVAK et al., 2001). Neste método, fórmulas aritméticas são utilizadas para calcular níveis de expressão relativos a um calibrador, que pode ser uma amostra controle (ou amostra não tratada), utilizamos neste trabalho como calibrador o animal AIRmin^{SS} controle. Os resultados baseados nos valores de ΔCt representam o valor de Ct do gene alvo (experimental ou controle) subtraído do valor de Ct do gene constitutivo (*ciclofilina*). Os valores de ΔCt , obtidos individualmente para as amostras de animais controle e experimentais, foram submetidos ao método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak e colaboradores (2001), que permite avaliar o efeito do tratamento experimental em relação a um controle interno.

Na utilização deste método, torna-se importante a avaliação da eficiência dos *primers*, eficiência na qual deve estar próxima de 100%. Isto é possível através do cálculo da regressão linear entre diluições seriadas das amostras de RNA e o valor individual de Ct.

Para as amostras tratadas e demais controles, a avaliação de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ indica a mudança em vezes na expressão gênica relativa ao calibrador, permitindo a comparação entre todos os grupos experimentais e controle.

Portanto, aos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ das amostras individuais foram então realizadas as médias e desvio padrão para cada sublinhagem analisada e aos seus respectivos grupos controle. Os gráficos apresentados nos resultados demonstram as quantidades iniciais de RNA mensageiro entre os animais experimentais e controle, lembrando que destas amostras foi subtraído o valor do gene constitutivo *ciclofilina*. A *ciclofilina* foi utilizada como gene endógeno neste trabalho por ser uma proteína expressa na maioria dos tecidos (HASEL; SUTCLIFFE, 1990).

Figura 7: Quantificação do gene *ciclofilina* em qPCR utilizando RNA de orelha de animais das sublinhagens AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} controles e experimentais. **A** representa o “Cycle Threshold” (Ct) e **B** a curva de *Melting*. Ensaio realizado no Chromo 4 (MJ Research) utilizando *Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG* (Invitrogen).

3.7 Milliplex (Luminex)

Nos ensaios utilizando o sistema Luminex, as orelhas dos animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} foram perfuradas e após 24 e 48 horas de perfuração o sangue destes animais foi coletado e o soro armazenado a -80 °C antes do uso.

A tecnologia Luminex permite a quantificação de múltiplos analitos simultaneamente em um único poço de reação em microplacas.

O painel utilizado nestas análises foi o *MilliplexTM map* (Merck Millipore, Billerica, MA) constituído por 7 citocinas envolvidas no processo inflamatório, sendo elas IL-1 β , IL-6, MIP-2, IL-10, TNF- α , IL-17 e GM-CSF. O ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo do fabricante. Em resumo, o filtro da placa de 96 poços foi

lavado com *Milliplex Wash Buffer*. Em seguida, foram adicionadas as *beads* conjugadas com anticorpos anti-citocinas e posteriormente foram adicionadas as amostras de soro.

Seguida de uma incubação *overnight*, a placa foi lavada duas vezes com *Milliplex Wash Buffer*, sendo adicionado a cada poço o anticorpo de detecção biotilado para um epítipo diferente da citocina, incubado por 1 hora. Após esse período, novas lavagens com o *Milliplex Wash Buffer* foram realizadas, sendo em seguida adicionada estreptavidina conjugada com ficoeritrina, que se liga ao anticorpo biotilado, por 30 minutos.

Novas lavagens foram realizadas e as *beads* foram ressuspensas com *Milliplex Assay Buffer* e analisadas no Bioplex 200 *Suspension Array System*/Luminex (Bio Rad, Hercules, CA) por meio do *Software Bio-Plex Manager*, versão 4.1 (Bio Rad, Hercules, CA). Os limites de detecção para as seguintes citocinas analisadas foram: IL-1 β (2,49 pg/ml); IL-6 (3,15 pg/ml); IL-10 (2,70 pg/ml); MIP-2 (3,23 pg/ml); TNF- α (3,25 pg/ml); GM-CSF (3,20 pg/ml) e IL-17 (3,16 pg/ml).

A presença do fator de crescimento TGF- β no soro dos animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} também foi avaliada. Utilizamos o *MilliplexTM map TGF- β 1 Single Plex Kit* (Merck Millipore, Billerica, MA). A única diferença existente neste protocolo, em relação ao anterior, é que para avaliar o TGF- β no soro as amostras precisaram passar por um tratamento de acidificação (1.0 N HCL) seguida de neutralização (1.0 N Na OH). Após o tratamento, prosseguimos com o mesmo protocolo descrito anteriormente. O limite de detecção para o TGF- β analisado foi 7,88 pg/ml.

3.8 Preparação Histológica e Método Imunohistoquímico

As orelhas dos camundongos foram perfuradas e coletadas nos dias 2, 10 e 30 após perfuração e, as mesmas, foram acondicionadas em frascos com formol tamponado 10% por 24 horas, sendo posteriormente processadas. Iniciou-se com o processo de inclusão do material em uma série crescente de alcoóis para desidratação, xilol para clarificação e finalmente inclusão em parafina. Os cortes realizados com 5 μ m de espessura foram colocados em estufa a 56 °C para completa fixação dos mesmos e início da desparafinização. O processo foi finalizado com a imersão das lâminas em xilol e a série de alcoóis decrescente para a reidratação dos cortes. As lâminas foram finalmente coradas por Hematoxilina-

Eosina (HE), Tricrômico de Masson e Picrosírius-Red para observação em microscópio de luz.

Em lâminas coradas com HE observamos a inflamação promovida pela lesão e células inflamatórias. A coloração pelo tricômico de Masson nos permite visualizar o colágeno presente na lesão enquanto o corante Picrosírius-Red indica também a disposição das fibras colágenas e muitas vezes pode-se diferenciar os tipos de colágeno presentes no órgão estudado.

Posteriormente, verificamos a presença de duas proteínas envolvidas durante o processo de reparo tecidual, a alfa actina de músculo liso (α -SMA) e a proteína específica de fibroblasto (FSP-1), em amostras de orelha nos períodos descritos acima pela técnica de imunohistoquímica.

Foram obtidos quatro cortes histológicos de cada bloco com 4 μ m de espessura. Os cortes processados foram colocados em lâminas de vidro previamente silanizadas. As lâminas referentes a cada amostra foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em álcoois decrescentes até a lavagem em água destilada.

Para a recuperação antigênica utilizamos o tampão citrato (Dako) pH 6,0 por 30 minutos a 96 °C. Após a recuperação, as lâminas foram colocadas em temperatura ambiente por 20 minutos para resfriamento.

Posteriormente, com o intuito de impedir as ligações inespecíficas, as lâminas foram tratadas com o tampão TBS+BSA 3% e incubadas durante 20 minutos em temperatura ambiente.

Passado o tempo de incubação, os anticorpos primários de rato para o α -SMA e de coelho para FSP-1 (Dako) foram diluídos em solução comercial nas concentrações de 1:50 e 1:500 respectivamente, e aplicados sobre os cortes na lâmina. As lâminas incubadas com o anticorpo anti- α -SMA permaneceram em câmara úmida a 4 °C por 16 horas enquanto as lâminas incubadas com o anticorpo anti-FSP-1 passaram apenas 4 horas.

Após o período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram imersas em tampão de lavagem TBS (Dako) e dois banhos com duração de cinco minutos foram realizados. Em seguida, o anticorpo secundário Envision (polímero que contém anticorpos secundários pra mouse e coelho na mesma molécula) foi aplicado na lâmina por 1 minuto.

A etapa de revelação da reação realizou-se pela incubação do substrato cromógeno (Liquid DAB+Dako) na lâmina por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada para retirada do excesso de cromógeno presente.

A contra coloração foi realizada com o uso de Hematoxilina de Harris por aproximadamente 30 segundos e, em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente. O azulamento das lâminas foi efetuado pela utilização da água amoniacal, seguida de lavagem, desidratação em álcoois e diafanização em xilol.

As lâminas foram montadas por meio de substâncias selantes para fixação das lamínulas e posterior observação ao microscópio óptico.

3.9 Análise Estatística

As significâncias entre as médias foram estabelecidas pelo teste ANOVA *one-way*, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey, para $p < 0,05$.

Nos experimentos de *microarray* foi utilizado o programa SAM. O SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) é um programa estatístico utilizado para detectar genes diferencialmente expressos significativamente em réplicas de experimentos de *microarrays*, e tem como finalidade comparar as expressões gênicas de cada experimento, assim como suas respostas variáveis. Ele usa permutações repetidas dos dados para determinar se a expressão de alguns genes está significativamente relacionada com a resposta.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da expressão gênica global

A técnica de análise em larga escala nos permite identificar e estudar simultaneamente um grande número de genes envolvidos em diversos processos biológicos, em um determinado ponto que se queira analisar. Nosso intuito foi observar quais os genes envolvidos no fenótipo de reparação tissular após a perfuração de orelha, verificar as diferenças existentes quanto à expressão entre as sublinhagens estudadas e validar os dados obtidos por meio da análise de expressão gênica relativa – qPCR.

Esses ensaios foram realizados nos períodos de 24 horas, 10 e 30 dias após a indução da injúria na orelha dos camundongos. Para a realização do procedimento, utilizamos a plataforma “*GeneChip*” da *Affymetrix* (descrita nos Materiais e Métodos).

Iniciamos as análises com a verificação dos genes diferencialmente expressos antes do procedimento de perfuração e em fases distintas do processo de reparação.

No total, 159 genes se expressaram diferencialmente nos animais controles, sendo que 60 foram expressos em maior nível ($\geq 2X$) nos animais AIRmax^{SS} e 99 nos animais AIRmin^{SS} (**Figura 8**).

Quando os animais foram submetidos ao protocolo de perfuração tecidual, eles passaram a expressar diferencialmente 99 genes após 24 horas de injúria, ou seja, uma redução no total de genes em comparação às diferenças encontradas entre os animais controles. Deste total, 53 estavam mais expressos nos animais AIRmax^{SS} e 46 nos animais AIRmin^{SS} (**Figura 8**).

Posteriormente, avaliamos os genes diferencialmente expressos entre as sublinhagens após 10 dias de lesão. Este período é caracterizado por proliferação celular e migração de diferentes tipos celulares, dando início o processo de re-epitelização.

Foram identificados 79 genes no total, destes, 44 genes foram mais expressos nos animais AIRmax^{SS} e 35 mais expressos nas orelhas dos animais AIRmin^{SS} (**Figura 8**).

Aos 30 dias de resposta à injúria, de um total de 160 genes diferencialmente expressos, observamos 115 genes expressos em maiores níveis nos animais

AIRmax^{SS} e apenas 45 genes mais expressos nos camundongos AIRmin^{SS} (**Figura 8**).

Figura 8: Análise da expressão gênica global. Número de genes diferencialmente expressos ($\geq 2X$) nos animais AIRmax^{SS} em comparação aos animais AIRmin^{SS} nos períodos 0, 24h, 10d e 30d. Os genes mais expressos nos animais AIRmax^{SS} estão representados como AIRmax^{SS}/AIRmin^{SS} $>2X$ (em azul) enquanto os genes mais expressos na linhagem AIRmin^{SS} estão expressos como AIRmax^{SS}/AIRmin^{SS} $<0,5X$ (em vermelho). Nestes experimentos foram avaliados animais controles e experimentais (n=4).

Realizamos outras análises com a finalidade de se avaliar quantos genes estariam modulando o fenótipo de reparação tecidual após 24 horas de injúria na orelha dos camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}. Avaliamos quantos genes foram expressos em níveis ≥ 2 vezes, ou seja, foram ativados nos animais experimentais em relação aos seus respectivos controles.

Os animais AIRmax^{SS} exibiram 150 genes ativados, enquanto os animais AIRmin^{SS} 189 genes após lesão (**Figura 9**).

Durante a fase de formação de novos tecidos, em torno de 10 dias após a perfuração da orelha, identificamos 64 genes ativados nos camundongos AIRmax^{SS} e 169 nos animais AIRmin^{SS} em comparação aos seus controles (**Figura 9**).

Posteriormente, avaliamos o número de genes ativados durante a última fase do processo de reparação tissular em camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}. Nesta análise, detectamos 606 genes ativados nos animais AIRmax^{SS} enquanto os animais AIRmin^{SS} exibiram 1080 genes ativados após 30 dias de lesão (**Figura 9**).

Figura 9: Análise da expressão gênica global. Número de genes ativados nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} experimentais em comparação aos camundongos controles. Os animais experimentais foram submetidos ao protocolo de perfuração tecidual e analisados após os períodos de 24 horas, 10 dias e 30 dias, enquanto os animais controles não receberam estímulo. Nestes experimentos foram avaliados 4 animais por grupo.

A **figura 10** reporta os genes reprimidos por conta do estímulo após 24 horas nos animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} em comparação aos seus controles. Os animais AIRmax^{SS} exibiram 20 genes reprimidos após perfuração da orelha, enquanto os animais AIRmin^{SS} 63 genes (**Figura 10**).

Ao avaliarmos os genes reprimidos após 10 dias de injúria observamos um número de apenas 10 genes nos animais AIRmax^{SS} enquanto 74 genes foram identificados nos animais AIRmin^{SS} (**Figura 10**).

Após 30 dias de lesão, os animais AIRmax^{SS} exibiram 16 genes reprimidos enquanto os animais AIRmin^{SS} apresentaram 69 genes (**Figura 10**).

A relação completa dos genes diferencialmente expressos, dos genes ativados e dos genes reprimidos pode ser conferida no final da tese nos anexos.

Figura 10: Análise da expressão gênica global. Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} experimentais em comparação aos camundongos controles. Os animais experimentais foram submetidos ao protocolo de perfuração tecidual após os períodos de 24 horas, 10 dias e 30 dias, enquanto os animais controles não receberam estímulo. Nestes experimentos foram avaliados 4 animais por grupo.

4.1.1 Categorias biológicas verificadas em animais controles

Os genes diferencialmente expressos detectados foram analisados pelo programa EASE, o qual permite que os mesmos possam ser agrupados em temas biológicos, de acordo com sua categoria funcional, sua localização cromossômica e sua representação em relação ao genoma total.

Na **figura 11** estão listadas as categorias funcionais sobrerrepresentadas pelos genes diferencialmente expressos entre os animais controle. Nos animais AIRmax^{SS} controle detectou-se maior expressão de genes envolvidos na contração muscular, na regulação da contração muscular e transdução de sinal, como demonstrado nas **figuras 11 A, B e C**, respectivamente. Entretanto, as categorias funcionais com genes expressos em maior nível pelos animais AIRmin^{SS} controle foram: resposta inflamatória, resposta imune e queratinização (**Figura 11 D, E e F**).

Figura 11: Análise da expressão gênica global. A, B e C- Categorias funcionais de genes com expressão ≥ 2 vezes nos animais AIRmax^{SS} comparados aos animais AIRmin^{SS}. D, E e F- Categorias funcionais de genes com expressão ≥ 2 vezes nos animais AIRmin^{SS} comparados aos animais AIRmax^{SS}. Nestes experimentos foram avaliados somente animais controles (n=4).

4.1.2 Categorias biológicas verificadas 24 horas após a perfuração da orelha

Posteriormente, verificamos as categorias biológicas representadas pelos genes expressos em níveis diferentes (2≥) nas orelhas das sublinhagens no período de 24 horas após a lesão.

Observamos genes participantes na transdução de sinal, adesão celular e transporte de elétrons expressos em maior nível em camundongos AIRmax^{SS} (Figura 12 A, B e C), e genes envolvidos na resposta imune, processos metabólicos e transdução de sinal nos animais AIRmin^{SS} (Figura 12 D, E e F).

Diferentes genes, embora envolvidos na mesma categoria de transdução de sinal, apresentaram maior ou menor expressão nos AIRmax^{SS} em relação aos AIRmin^{SS} (Figura 12 A e F).

Figura 12: Análise da expressão gênica global. A, B e C- Categorias funcionais de genes com expressão ≥ 2 vezes nos animais AIRmax^{SS} comparados aos animais AIRmin^{SS}. D, E e F- Categorias funcionais de genes com expressão ≥ 2 vezes nos animais AIRmin^{SS} comparados aos animais AIRmax^{SS}. Nestes experimentos foram avaliados somente animais submetidos ao protocolo de perfuração tissular durante um período de 24 horas (n=4).

Na **figura 13**, estão representadas as categorias funcionais contendo genes ativados por conta do estímulo em camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} em relação aos seus respectivos controles.

Nos animais AIRmax^{SS} categorias envolvendo genes de queratinização, resposta imune, quimiotaxia e resposta inflamatória foram conferidas (**Figura 13 A, B, C e D**). Os genes moduladores participantes do fenótipo cicatricial observado nos animais AIRmin^{SS} foram classificados em temas como: desenvolvimento epidermal, diferenciação de queratinócitos, resposta inflamatória, processo catabólico de colágeno, transdução de sinal e quimiotaxia (**Figura 13 E, F, G, H, I e J**).

Figura 13: Análise de expressão gênica global. A, B, C e D-Genes ativados em categorias funcionais sobrerrepresentadas nos animais AIRmax^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). E, F, G, H, I e J-Genes ativados em categorias funcionais sobrerrepresentadas nos animais AIRmin^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2 X$). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

Os temas biológicos envolvendo genes reprimidos nos animais AIRmax^{SS} foram: regulação da contração muscular, contração do músculo estriado, organização do sarcômero e processos metabólicos do carboidrato (**Figura 14 A, B, C e D**). Nos animais AIRmin^{SS} observamos algumas categorias biológicas tais como transporte de elétrons, processos biológicos, organização do citoesqueleto e biogênese, e processos metabólicos (**Figura 14 E, F, G e H**).

Figura 14: Análise de expressão gênica global. A, B, C e D-Genes reprimidos em categorias funcionais sobrerrepresentadas nos animais AIRmax^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). E, F, G e H-Genes reprimidos em categorias funcionais sobrerrepresentadas nos animais AIRmin^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

4.1.3 Categorias biológicas verificadas 10 dias após a perfuração da orelha

Aos dez dias de lesão, identificamos em quais funções biológicas os genes diferencialmente expressos entre as duas sublinhagens estavam agrupados. As categorias observadas com maior expressão de genes nos animais AIRmax^{SS} foram: fosforilação de proteína, transdução de sinal, processos metabólicos e adesão celular (**Figura 15 A, B, C e D**).

Processos metabólicos, transdução de sinal, via de sinalização de neuropeptídeos e organização do citoesqueleto e biogênese foram as categorias observadas com expressão gênica mais elevada nos animais AIRmin^{SS} (**Figura 15 E, F, G e H**).

Figura 15: Análise de expressão gênica global. A, B, C e D- Categorias funcionais de genes com expressão ≥ 2 vezes nos animais AIRmax^{SS} comparados aos animais AIRmin^{SS}. E, F, G e H- Categorias funcionais de genes com expressão ≥ 2 vezes nos animais AIRmin^{SS} comparados aos animais AIRmax^{SS}. Nestes experimentos foram avaliados somente animais submetidos ao protocolo de perfuração tissular durante um período de 10 dias (n=4).

Na lista de genes ativados pela lesão no grupo de animais AIRmax^{SS}, identificamos as categorias biológicas relacionadas à adesão celular, queratinização, transporte de fosfato, organização do citoesqueleto e biogênese, proteólise, regulação do ciclo celular, adesão a matriz extracelular e desenvolvimento de vasos sanguíneos (**Figura 16 A, B, C, D, E, F, G e H**). Nos animais AIRmin^{SS}, as

categorias funcionais envolvidas no processo de reparação tissular aos 10 dias foram: adesão celular, transporte de fosfato, contração muscular, organização do citoesqueleto e biogênese, regulação da contração muscular e proteólise (**Figura 16 I, J, K, L, M e N**) .

Figura 16: Análise de expressão gênica global. A, B, C, D, E, F, G e H-Genes ativados em categorias funcionais sobrerepresentadas nos animais AIRmax^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). I, J, K, L, M e N-Genes ativados em categorias funcionais sobrerepresentadas nos animais AIRmin^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2 X$). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

A **figura 17** ilustra as categorias funcionais contendo genes reprimidos em animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} após 10 dias de perfuração das orelhas.

Verificamos genes nas categorias de processos metabólicos do radical superóxido, processos metabólicos, processos metabólicos do leucotrieno, transcrição e modificação da cromatina nos animais AIRmax^{SS} (**Figura 17 A, B, C, D e E**) e observamos as categorias relacionadas a resposta imune, processos metabólicos, quimiotaxia, proliferação celular e diferenciação de queratinócitos nos animais AIRmin^{SS} (**Figura 17 F, G, H, I e J**)

Figura 17: Análise de expressão gênica global. A, B, C, D e E-Genes reprimidos em categorias funcionais sobre-representadas nos animais AIRmax^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). F, G, H, I e J-Genes reprimidos em categorias funcionais sobre-representadas nos animais AIRmin^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

4.1.4 Categorias biológicas verificadas 30 dias após a perfuração da orelha

A última fase do processo de reparação tecidual, o período de remodelação, inicia-se a partir da segunda semana após a injúria e permanece por um ano ou mais. Nesta fase, todos os processos que foram ativados por conta de uma injúria entram em declínio e cessam, resultando em cicatrização do tecido afetado ou, em casos raros, a regeneração tecidual.

Na **figura 18** estão listadas algumas categorias biológicas contendo genes diferencialmente expressos entre as sublinhagens após 30 dias de lesão.

Verificamos as funções de queratinização, resposta imune, proteólise, quimiotaxia e processos metabólicos nos animais AIRmax^{SS} (**Figura 18 A, B, C, D e E**).

Processos metabólicos, transporte de elétrons, transdução de sinal, processos metabólicos do ácido retinóico, processos biológicos, resposta imune e organização do sarcômero foram algumas das categorias evidentes nos animais AIRmin^{SS} (**Figura 18 F, G, H, I, J, K e L**).

Figura 18: Análise de expressão gênica global. A, B, C, D e E- Categorias funcionais de genes com expressão ≥ 2 vezes nos animais AIRmax^{SS} comparados aos animais AIRmin^{SS}. F, G, H, I, J, K e L- Categorias funcionais de genes com expressão ≥ 2 vezes nos animais AIRmin^{SS} comparados aos animais AIRmax^{SS}. Nestes experimentos foram avaliados somente animais submetidos ao protocolo de regeneração tissular durante um período de 30 dias (n=4).

Por conta do alto número de genes ativados detectados em ambas as sublinhagens, tornou-se inviável a apresentação destes resultados. Os genes ativados após 30 dias de injúria poderão ser conferidos no próximo item dos resultados, ao serem agrupados em temas funcionais (**Figura 19**).

Após o fechamento das orelhas, os animais AIRmax^{SS}, ativaram genes envolvidos em categorias relacionadas a transdução de sinal, resposta imune, regulação da transcrição, adesão celular, transporte, processos biológicos, processos metabólicos e proliferação celular (**Figura 19 A, B, C, D, E, F, G e H**). Os genes moduladores participantes do fenótipo de cicatrização observados nos

animais AIRmin^{SS} foram agrupados em temas como: transdução de sinal, transporte, processos biológicos, adesão celular, diferenciação celular, contração muscular e regulação da contração muscular (**Figura 19 I, J, K, L, M, N e O**).

K Processos biológicos

L Adesão celular

M Diferenciação celular

N Contração muscular

Figura 19: Análise de expressão gênica global. A, B, C, D, E, F, G e H-Genes ativados em categorias funcionais sobrerrepresentadas nos animais AIRmax^{SS} 30 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). I, J, K, L, M, N e O- Genes ativados em categorias funcionais sobrerrepresentadas nos animais AIRmin^{SS} 30 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2 X$). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

Quanto à análise dos genes reprimidos no final do processo de reparação tecidual, verificamos a participação de genes envolvidos em categorias funcionais relacionadas a processos biosintéticos de lipídeos, transporte, resposta imune, processos biológicos e transcrição nos animais AIRmax^{SS} (**Figura 20 A, B, C, D e E**) e categorias envolvidas com queratinização, diferenciação de queratinócitos, desenvolvimento epidermal, resposta imune, quimiotaxia, processos biológicos, processos metabólicos e desenvolvimento da pele nos animais AIRmin^{SS} (**Figura 20 F, G, H, I, J, K, L e M**).

Figura 20: Análise de expressão gênica global. A, B, C, D e E-Genes reprimidos em categorias funcionais sobrerepresentadas nos animais AIRmax^{SS} 30 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). F, G, H, I, J, K, L e M-Genes reprimidos em categorias funcionais sobrerepresentadas nos animais AIRmin^{SS} 30 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

4.1.5 Agrupamento gênico por cromossomos

Esta análise foi realizada com o intuito de agruparmos os genes diferencialmente expressos por cromossomos, na tentativa de candidatar genes que mapeiam nos QTL que regulam o fenótipo de reparação tecidual, detectados anteriormente nestes animais.

Considerando apenas os genes ativados por conta do processo de reparação, observamos nos três períodos avaliados um agrupamento significativo de genes relacionados com queratinização no cromossomo 3 de animais AIRmax^{SS} (**Figuras 21 A, B e D**). Nos cromossomos 1 e 16 verificamos genes envolvidos com queratinização celular e adesão celular aos 10 e 30 dias, respectivamente (**Figuras 21 C e E**).

Nas orelhas dos animais AIRmin^{SS} observamos alguns genes envolvidos com desenvolvimento epidermal no cromossomo 3 após 24 horas de perfuração, além de vários outros genes participantes regulando o fenótipo (**Figura 21 D**). Verificamos que o cromossomo 11 possui genes que estão altamente envolvidos no processo de cicatrização destes animais, entretanto, os genes moduladores agrupados neste cromossomo nos três períodos avaliados foram diferentes (**Figuras 21 D, E e F**).

Após 24 horas de perfuração, um agrupamento de genes envolvidos com quimiotaxia foi visualizado (**Figura 21 G**). Durante a fase de formação de novos tecidos, genes relacionados à regulação da contração muscular foram os de maior evidência no cromossomo 11 e também nos cromossomos 7 e 1 (**Figuras 21 H, I e J**). Aos 30 dias, muitos genes ativados presentes no cromossomo 11 exibiram funções diferenciadas, porém os genes envolvidos com contração muscular e desenvolvimento epidermal foram os genes com maior participação neste período (**Figura 21 K**).

Figura 21: Análise de agrupamento gênico por cromossomos. Genes ativados agrupados em cromossomos nos animais AIRmax^{SS} 24 horas (A), 10 (B e C) e 30 (D e E) dias após perfuração das orelhas ($\geq 2X$), respectivamente. Genes ativados agrupados em cromossomos nos animais AIRmin^{SS} 24 horas (F e G), 10 (H, I e J) e 30 (K) dias após perfuração das orelhas ($\geq 2X$). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

Quanto aos genes reprimidos pela lesão, notamos um agrupamento de genes nos cromossomos 7 e 11 na orelha dos animais AIRmax^{SS}. Tanto os genes do cromossomo 7, quanto os genes do cromossomo 11 estão relacionados à função de contração muscular (**Figuras 22 A e B**).

Nos animais AIRmin^{SS} observamos um agrupamento de genes reprimidos no cromossomo 16 após 24 horas e aos 10 dias de perfuração da orelha (**Figuras 22 F**

e H), e no cromossomo 3 após 30 dias de perfuração, todos eles com funções relacionadas à queratinização (**Figura 22 J**).

Genes com funções de modificação de cromatina e transcrição presentes no cromossomo Y foram reprimidos nos animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}, em todos os períodos avaliados (**Figuras 22 C, D, E, G, I e K**).

Não houve agrupamento significativo por cromossomos de genes diferencialmente expressos em animais controles das sublinhagens estudadas.

Figura 22: Análise de agrupamento gênico por cromossomos. Genes reprimidos agrupados em cromossomos nos animais AIRmax^{SS} 24 horas (A,B e C), 10 (D) e 30 dias (E) após perfuração das orelhas ($\geq 2X$), respectivamente. Genes reprimidos agrupados em cromossomos nos animais AIRmin^{SS} 24 horas (F e G), 10 (H e I) e 30 dias (J e K) após perfuração das orelhas ($\geq 2X$). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

4.2 Análise de expressão gênica relativa

Os experimentos de PCR em tempo real foram desenvolvidos com o intuito de validarmos os resultados obtidos no estudo da expressão gênica global durante o processo de reparação tissular.

Para o desenvolvimento destes experimentos, perfurações de 2mm foram desenvolvidas nas orelhas dos camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}. Nos períodos de 24 horas, 10 e 30 dias após a perfuração, as orelhas foram coletadas para a obtenção do RNA mensageiro e a síntese do cDNA, o qual foi utilizado nas reações de qPCR.

Para isso, selecionamos alguns genes representativos, com funções importantes na determinação dos fenótipos, regenerativo e de cicatrização, e que foram diferencialmente expressos entre as linhagens. Os genes estudados foram: *Il1b*, *Cxcl2*, *Col1a1*, *Col3a1*, *Mmp9*, *Fn1*, *Tnc*, *Krt6a*, *Actn3* e *Tgfb*. É importante salientar que os *primers* escolhidos para os decorrentes experimentos apresentaram uma eficiência próxima de 100%.

Nestas análises, as amostras foram normalizadas por meio da subtração do valor do gene constitutivo *ciclofilina* (chamado de ΔCt) e calibradas por meio da subtração do valor de ΔCt dos animais AIRmin^{SS} controle, também chamado de calibrador comum, e os resultados abaixo estão expressos por meio da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (como descrito nos Materiais e Métodos).

4.2.1 Níveis de expressão dos genes *Il1b* e *Cxcl2*

No período de 24 horas após a perfuração das orelhas, observamos aumento na expressão dos genes *Il6* e *Cxcl2*, seguida de uma diminuição nos níveis destes transcritos após 10 e 30 dias de experimentação que pode ser comparada aos níveis basais dos animais controle (**figura 23 A e B**).

Figura 23: Expressão relativa dos genes *Il1b* (A) e *Cxcl2* (B), a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de perfuração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (24h, 10d e 30d) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ – entre AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}.

4.2.2 Níveis de expressão dos genes *Col1a1*, *Col3a1* e *Mmp9*

Os genes *Col1a1*, *Col3a1* e *Mmp9* envolvidos na reparação tissular após a lesão na orelha foram estudados. O colágeno é conhecido por ser uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular, em contrapartida, as metaloproteinases são enzimas proteolíticas importantes na degradação da matriz extracelular e no remodelamento tecidual, e participam durante todas as fases da reparação dos tecidos.

Na **figura 24 A e B** podemos observar alta expressão dos genes *Col1a1* e *Col3a1* nos períodos de 10 dias e 30 dias após a injúria. Aos 10 dias após a lesão, os animais AIRmax^{SS} expressaram níveis maiores do gene *Col1a1*, enquanto que para o gene *Col3a1* não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão entre as sublinhagens em todos os períodos avaliados.

Considerando a expressão do gene *Mmp9*, observamos que não houve alterações nos animais AIRmax^{SS} durante toda a cinética, embora a expressão desse gene nesses animais tenha sido superior à dos animais AIRmin^{SS} em situação basal, aos 10 dias e 30 dias após a injúria.

Os animais AIRmin^{SS} apresentaram alta e relevante expressão do gene *Mmp9* apenas após 24 horas de lesão. Esta expressão foi significativamente maior do que a observada nos animais AIRmax^{SS} neste período (**Figura 24 C**).

Figura 24: Expressão relativa dos genes *Col1a1* (A), *Col3a1* (B) e *Mmp9* (C) a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de perfuração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (24h, 10d e 30d) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ – entre AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}.

4.2.3 Níveis de expressão dos genes *Fn1*, *Tnc*, *Krt6a* e *Actn3*

Alguns genes que codificam proteínas de matriz extracelular também foram diferencialmente expressos no estudo da expressão gênica global e foram validados pelo PCR em tempo real. As proteínas de matriz testadas foram: a fibronectina 1 e a tenascina C. No período de 24 horas após a injúria, os animais AIRmin^{SS} apresentaram maior expressão dos genes *Fn1* e *Tnc* em comparação aos animais AIRmax^{SS}. Aos 10 dias de lesão, os animais AIRmin^{SS} continuaram a expressar maiores níveis de transcritos do gene *Fn1* em comparação aos camundongos AIRmax^{SS}, mas não do gene *Tnc*, que foi mais expresso na orelha dos animais AIRmax^{SS} neste período. Posteriormente, aos 30 dias de lesão, não observamos

diferenças significativas quanto à expressão dos genes *Fn1* e *Tnc* entre as sublinhagens (**Figura 25 A e C**).

O gene *Krt6a*, envolvido na síntese de queratina e na formação de um novo tecido após a injúria, apresentou baixos níveis de expressão, mas ainda exibiram níveis significativamente maiores na orelha dos animais AIRmin^{SS}, nos períodos de 24 horas e 30 dias após a injúria, em comparação aos animais AIRmax^{SS} (**Figura 25 B**).

Posteriormente, conferimos a expressão do gene alfa actina 3 (*Actn3*), um gene expresso principalmente por miofibroblastos e altamente envolvido na contração da injúria e na formação da cicatriz durante a reparação de uma lesão. Embora tenha ocorrido um aumento na expressão de *Actn3* no período de 10 dias após a lesão na orelha, esse aumento não se mostrou expressivo entre as sublinhagens. Por outro lado, aos 30 dias houve uma expressão altamente significativa deste gene na orelha dos animais AIRmin^{SS} em comparação à orelha dos animais AIRmax^{SS} (**Figura 25 D**). Neste experimento, os animais AIRmax^{SS} controles exibiram expressão aumentada de *Actn3* nas orelhas sem perfuração comparada aos animais AIRmin^{SS} controles (**Figura 25 D**).

Figura 25: Expressão relativa dos genes *Fn1*(A), *Krt6a* (B), *Tnc* (C) e *Actn3*(D), a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de perfuração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (24h, 10d e 30d) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ – entre AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}.

4.2.4 Níveis de expressão gênica do gene *Tgfb*

Embora o gene *Tgfb* seja participante durante todas as fases do processo de resolução tissular, em nosso estudo, houve uma alteração na expressão de *Tgfb* apenas 24 horas após a injúria a favor dos animais AIRmin^{SS}. Aos 30 dias, a expressão do gene foi a mesma observada nos animais controles (**Figura 26**).

Figura 26: Expressão relativa do gene *Tgfb* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de perfuração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (24h, 10d e 30d) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ – entre AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}.

Ao final dos experimentos de expressão gênica, avaliamos a existência de correlação significativa, por meio da análise do coeficiente de correlação de Pearson, entre os ensaios de *microarray* e os de reações de polimerização em cadeias quantitativos. Verificamos que houve correlação entre os experimentos, com valor de $r=0,70$.

4.3 Dosagem de mediadores inflamatórios no soro

Quantificamos algumas citocinas pró e anti-inflamatórias e quimiocina no soro após perfuração das orelhas de camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} para avaliarmos se o estímulo seria capaz de ocasionar alterações sistêmicas nos períodos avaliados. Observamos que os níveis séricos desses mediadores inflamatórios apresentaram-se baixos, porém detectáveis. Considerando as citocinas IL-1 β e IL-6, podemos notar um aumento destas citocinas no soro de animais AIRmin^{SS} após 24 horas de injúria sendo esse aumento acentuado no período de 48 horas, em comparação ao soro dos animais AIRmax^{SS} (**Figura 27 A e B**).

Também se observou um aumento da quimiocina MIP-2 ou CXCL-2 no soro dos animais AIRmin^{SS}, em relação ao soro de animais AIRmax^{SS}, nas primeiras 24 horas de injúria (**Figura 27 C**). Níveis séricos da citocina TNF- α foram detectados

em ambas as sublinhagens em estado basal e os mesmos níveis foram mantidos após estímulo (**Figura 27 E**). .

No entanto, a perfuração das orelhas em ambas as sublinhagens induziu uma redução nos níveis das citocinas IL-17 e IL10 no soro. Como ilustrado na **figura 27 F e D**, o fator de crescimento TGF- β também se apresentou aumentado após estímulo, mas desta vez, no soro dos animais AIRmax^{SS}, comparado aos animais AIRmin^{SS} no período de 24 horas, porém essa diferença se mostrou significativa somente 48 horas após a injúria (**Figura 27 G**). Não observamos níveis detectáveis da citocina GM-CSF nos períodos avaliados.

Figura 27: Quantificação de citocinas e quimiocina no soro 24 e 48 horas após perfuração de orelha. O sangue foi coletado, centrifugado e o soro foi utilizado para dosagem de citocinas e quimiocina por meio da técnica de Milliplex. As citocinas testadas foram: IL-1 β (A), IL-6 (B), MIP-2 (C), IL-10 (D), TNF- α (E), IL-17 (F) e TGF- β (G). Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão (n=4). * p<0,05 – entre AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}.

4.4 Identificação das alterações histológicas da orelha

As alterações histológicas foram identificadas a partir de cortes longitudinais das orelhas de camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} em diferentes períodos após a

perfuração. Para tanto, utilizamos nestes experimentos alguns corantes e marcadores diferenciados para lâminas histológicas como: hematoxilina e eosina (HE), tricrômico de Masson, picrosirius red e os anticorpos α -SMA e FSP-1.

4.4.1 Hematoxilina e eosina (HE)

O corante HE foi utilizado para que pudéssemos distinguir e identificar as estruturas e células presentes na orelha dos animais.

As **figuras 28 A e B** representam os cortes das orelhas dos camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} controles. Antes da perfuração, nenhuma diferença foi observada entre as sublinhagens.

Após 48 horas de perfuração, o tecido ao redor do orifício apresentou inflamação em ambas as sublinhagens com edema e infiltrado inflamatório difuso de neutrófilos na derme. Uma crosta neutrofílica extensa foi visualizada apenas na orelha de animais AIRmax^{SS} (**Figuras 28 C**).

Aos 10 dias de reparação tecidual, notamos ao redor da lesão na orelha dos animais AIRmax^{SS} uma hiperplasia epitelial significativa comparada a observada na orelha de camundongos AIRmin^{SS} (**Figuras 28 E e F**). As setas amarelas, na **figura 28 E**, identificam a presença expressiva de fibroblastos na derme da orelha de animais AIRmax^{SS}. As quatro setas amarelas presentes na **figura 28 F** representam os vasos neoformados por conta da injúria. Esses novos vasos foram visualizados apenas na linhagem AIRmin^{SS} neste período avaliado.

No final da fase de reparação tissular, aos 30 dias, a primeira, terceira e quarta setas da **figura 28 G** identificam alguns vasos sanguíneos presentes na orelha de camundongos AIRmax^{SS}. A segunda seta mostra a formação de uma nova cartilagem no local onde ocorreu a perfuração, demonstrando que os animais AIRmax^{SS} foram capazes de regenerar o tecido lesado. Nesta fase, a pele da orelha regenerada é praticamente igual à pele da orelha que não foi perfurada (**Figuras 28 A e G**).

A primeira seta apresentada na **figura 28 H** identifica um epitélio espesso formado no local onde houve a perfuração na orelha de camundongos AIRmin^{SS}, exibindo características de tecido cicatricial. A segunda seta representa a presença de fibras colágenas imaturas neste estágio tardio do processo de reparação (**Figura 28 H**).

Figura 28: Fotomicrografia das orelhas de camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} em diferentes fases do processo de reparo tecidual. **A** e **B** representam as orelhas de animais controles, **C** e **D** representam as orelhas após 48 horas de injúria, **E** e **F** após 10 dias de lesão e **G** e **H** representam as orelhas após 30 dias de perfuração. Hematoxilina e Eosina, aumento de 200X. → identificação de tipos celulares ou estruturas.

4.4.2 Tricrômico de Masson

Uma das proteínas de matriz extracelular mais importante durante a fase de reparação tecidual é o colágeno. A forma de deposição de suas fibras pode interferir no processo de reparo culminando em cicatrização do tecido afetado. Para tanto, utilizamos dois corantes capazes de identificar colágeno em cortes histológicos de orelha dos camundongos estudados, o Tricrômico de Masson e o Picrosirius Red.

Primeiramente, avaliamos o colágeno por coloração com tricrômico de Masson. Este corante tem a virtude de diferenciar as fibras colágenas, coradas em azul, das fibras musculares, coradas em vermelho.

As **figuras 29 A e B** representam os cortes de orelha dos animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} sem perfuração, respectivamente. Nenhuma diferença basal foi observada entre as linhagens.

Após 48 horas de perfuração, constatamos a presença de maior quantidade de fibras colágenas na orelha dos animais AIRmax^{SS} comparada à dos animais AIRmin^{SS} (**Figura 29 C e D**).

Podemos verificar aos 10 dias nos camundongos AIRmax^{SS} proliferação fibroblástica e deposição de fibras colágenas de forma organizada (**Figura 29 E**). Em contrapartida, a maior deposição de fibras colágenas foi conferida em animais AIRmin^{SS} e iniciou-se a formação de tecido de granulação na orelha destes animais (**Figura 29 F**).

Com 30 dias de reparação, os cortes de animais AIRmax^{SS} exibiram estruturas que podem ser observadas em orelhas nunca perfuradas anteriormente e que não podem ser recuperadas em tecidos cicatrizados. A primeira seta identifica a deposição do colágeno paralelamente à epiderme e, a segunda seta, representa a formação de folículo piloso, comprovando ainda mais a regeneração da orelha nestes animais (**Figura 29 G**). A **figura 29 H** mostra as fibras colágenas dispostas desorganizadamente na orelha dos animais AIRmin^{SS} e o tecido de granulação já estabelecido, resultando em tecido cicatricial (**Figura 29 H**).

Figura 29: Fotomicrografia das orelhas de camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} em diferentes fases do processo de reparo tecidual. **A** e **B** representam as orelhas de animais controles, **C** e **D** representam as orelhas após 48 horas de injúria, **E** e **F** após 10 dias de lesão e **G** e **H** representam as orelhas após 30 dias de perfuração. Tricômico de Masson, aumento de 200X. → identificação do tipo celular ou estruturas.

4.4.3 Picrosirius Red

Para validar os dados obtidos pela marcação das lâminas com o corante Tricrômico de Masson utilizamos o corante Picrosirius Red. A utilização deste corante permite uma análise qualitativa das fibras colágenas por meio da diferente interferência de cores, diferenciando principalmente as fibras tipo I e tipo III presentes na pele. As fibras tipo I se apresentam em feixes largos na cor vermelha e a tipo III em feixes mais finos e na cor amarelo-esverdeado. Os dois testes são sensíveis e podem ser utilizados para correlacionar as características morfológicas e histoquímicas do processo de reparo tecidual.

Os dados obtidos por esta técnica se assemelharam muito aos resultados apresentados anteriormente utilizando o corante Tricrômico de Masson.

Neste experimento, conferimos novamente a formação de tecido de granulação na orelha dos animais AIRmin^{SS} aos 10 dias após a perfuração (indicada pela seta amarela). Houve maior deposição de colágeno na orelha desses animais, aparentemente do tipo III. Aos 30 dias, o tecido de granulação tornou-se maduro, diferente do observado aos 10 dias de perfuração (**Figuras 30 F e H**), representado na figura pela seta amarela. As **figuras 30 E e G** evidenciam que a deposição de colágeno na orelha dos animais AIRmax^{SS} foram basicamente dos dois tipos, I e III, em todos os períodos avaliados e em menor quantidade quando comparada aos camundongos AIRmin^{SS}. Além disso, as fibras colágenas foram depositadas de forma organizada tornando o microambiente da orelha favorável ao processo regenerativo (**Figuras 30 E e G**).

Figura 30: Fotomicrografia das orelhas de camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} em diferentes fases do processo de reparo tecidual. **A** e **B** representam as orelhas de animais controles, **C** e **D** representam as orelhas após 48 horas de injúria, **E** e **F** após 10 dias de lesão e **G** e **H** representam as orelhas após 30 dias de perfuração. Picrosirius Red, aumento de 200X em luz polarizada. → identificação do tipo celular ou estruturas.

Posteriormente às análises histológicas, realizamos a quantificação do conteúdo de colágeno para confirmar e validar os resultados conferidos acima (**Figura 31**).

A **figura 31** demonstra que os animais AIRmin^{SS} aos 10 dias e 30 dias exibiram maiores quantidades de fibras colágenas na orelha em reparação,

comparado as orelhas dos animais AIRmax^{SS}, validando os resultados previamente avaliados (**Figura 31**).

Figura 31: Quantificação do conteúdo de colágeno marcado com Picrosirius Red presente nas orelhas de camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} em diferentes fases do processo de reparo tecidual (48h, 10d e 30d). Os valores estão expressos em porcentagem de colágeno identificado pela área analisada- 100µm (n=3).

4.4.4 Anticorpo α -SMA

A imunohistoquímica é um método de análise dos tecidos, que permite identificar características moleculares das doenças, com aplicações no diagnóstico de doenças inflamatórias, infecciosas e neoplasias.

Neste trabalho, propomo-nos analisar duas proteínas importantes durante o processo de reparação dos tecidos, a alfa actina de músculo liso (α -SMA) e a proteína específica de fibroblastos (FSP-1).

Inicialmente verificamos a presença da proteína α -SMA no tecido das orelhas antes e após perfuração.

Esta proteína, altamente envolvida no processo cicatricial, pode ser encontrada principalmente nas paredes vasculares, nos miofibroblastos e nas células mioepiteliais, e no estroma de vários tecidos.

Nos três períodos avaliados, observamos maior expressão da proteína α -SMA nas orelhas dos animais AIRmin^{SS} comparada as orelhas dos animais AIRmax^{SS}. As áreas imunomarcadas estão representadas pela cor marrom.

Após 48 horas de lesão, níveis consideráveis da proteína foram observados nas orelhas dos animais AIRmin^{SS}, mas a maior expressão foi verificada aos 10 dias após a perfuração. No período de 30 dias a expressão manteve-se alta, demonstrando que as orelhas desses animais permanecem em processo de cicatrização (**Figura 32**).

Níveis detectáveis da proteína α -SMA foram observados nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} apenas em 48 horas e 10 dias após a perfuração, contudo os níveis apresentaram-se muito baixos (**Figura 32**).

Figura 32: Fotomicrografia das orelhas de camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} em diferentes fases do processo de reparo tecidual. As áreas imunomarcadas, com positividade para α -SMA, estão representadas pela coloração marrom. **A** e **B** representam as orelhas de animais controles, **C** e **D** representam as orelhas após 48 horas de injúria, **E** e **F** após 10 dias de lesão e **G** e **H** representam as orelhas após 30 dias de perfuração. Aumento de 200X.

As áreas imunomarcadas que apresentaram positividade para α -SMA foram quantificadas, e o resultado conferido foi semelhante ao anteriormente descrito (**Figura 33**).

Figura 33: Quantificação da proteína α -SMA expressa nas orelhas de camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} em diferentes fases do processo de reparo tecidual (48h, 10d e 30d). Os valores estão expressos em porcentagem da proteína identificada pela área analisada- 100 μ m (n=3).

4.4.5 Anticorpo FSP-1

O próximo passo foi analisar a proteína FSP-1, uma proteína específica de fibroblastos. Os fibroblastos são células sabidamente importantes durante o processo de reparação tissular, tanto no processo regenerativo quanto no cicatricial.

Observamos, inicialmente nos animais controles, uma maior expressão da proteína FSP-1 nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} em comparação as orelhas dos animais AIRmin^{SS}. Essa diferença, a favor dos animais AIRmax^{SS}, manteve-se por toda a cinética, e a maior expressão dessa proteína foi conferida após 10 dias de perfuração das orelhas (**Figura 34**).

Os animais AIRmin^{SS} apresentaram níveis basais da proteína FSP-1 praticamente durante toda a cinética (**Figura 34**).

Figura 34: Fotomicrografia das orelhas de camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} em diferentes fases do processo de reparo tecidual. As áreas imunomarcadas, com positividade para FSP-1, estão representadas pela coloração marrom. **A** e **B** representam as orelhas de animais controles, **C** e **D** representam as orelhas após 48 horas de injúria, **E** e **F** após 10 dias de lesão e **G** e **H** representam as orelhas após 30 dias de perfuração. Aumento de 200X.

As áreas imunomarcadas que apresentaram positividade para FSP-1 foram quantificadas, e o resultado conferido foi semelhante ao anteriormente descrito (Figura 35).

Figura 35: Quantificação da proteína FSP-1 expressa nas orelhas de camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} em diferentes fases do processo de reparo tecidual (48h, 10d e 30d). Os valores estão expressos em porcentagem da proteína identificada pela área analisada-100µm (n=3).

5 DISCUSSÃO

A reparação dos tecidos é um processo biológico complexo que engloba uma série de eventos sequenciais do sistema imune inato e adaptativo com o objetivo de restaurar uma lesão (TSIROGIANNI et al., 2006). A resposta a uma injúria de pele abrange dois processos distintos, a cicatrização e a regeneração (CLARK et al., 1998).

A cicatrização envolve a migração de fibroblastos para o local da lesão, onde colágeno e outras moléculas da matriz extracelular serão projetadas de maneira desorganizada. Este processo resulta na formação de cicatrizes e na migração e proliferação do epitélio para a cobertura do local lesionado, porém, será desprovido de estruturas diferenciadas como folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Por outro lado, a regeneração tecidual envolve uma completa substituição e restauração do tecido afetado, exibindo estrutura e funções normais (RAJNOCH et al., 2003).

Muitos mamíferos são inaptos para regenerar alguns tecidos, porém, alguns deles apresentam características de regeneração epimórfica. Em modelo murino, camundongos da linhagem MRL/Mpj exibiram regeneração epimórfica, semelhante a que ocorre naturalmente nos anfíbios e tornaram-se o modelo mais estudado (CLARK et al., 1998; HEBER-KATZ et al., 2006; HEBER-KATZ et al., 2004; STOCUM, 1995). Contudo, outros estudos foram e estão sendo desenvolvidos demonstrando que esta capacidade regenerativa não é restrita apenas aos camundongos MRL (CANHAMERO et al., 2014; CANHAMERO et al., 2011; DE FRANCO et al., 2007; REINES et al., 2009).

De Franco e colaboradores demonstraram que camundongos da sublinhagem AIRmax^{SS} possuem capacidade regenerativa comparada a dos camundongos MRL em resposta a um orifício de 2 mm na orelha, enquanto os camundongos da sublinhagem AIRmin^{SS} nunca regeneraram o orifício (DE FRANCO et al., 2007).

A diferença fenotípica observada entre as sublinhagens durante o processo de resolução tecidual sugere fortemente que os genes que modulam a alta e baixa resposta inflamatória aguda também influenciaram a capacidade de regeneração de um orifício na orelha.

Atualmente vários estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de identificar o envolvimento de uma variedade de genes e seus produtos na reparação tecidual, já que este processo é sabidamente complexo e regulado geneticamente (CLARK, 1998; MASINDE et al., 2001; MCBREARTY et al., 1998).

Iniciamos a nossa investigação por estudos de expressão gênica global, buscando evidenciar os genes diferencialmente expressos entre as sublinhagens AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}. Os genes diferencialmente expressos foram agrupados em temas biológicos de acordo com sua categoria funcional, localização cromossômica e sua representação em relação ao genoma total por meio do programa EASE.

Primeiramente, avaliamos a modulação dos genes no fenótipo estudado entre os animais AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} controles e experimentais. Na comparação de animais controles, os animais AIRmax^{SS} exibiram maior expressão de genes relacionados a contração muscular e transdução de sinal (**Figura 11 A e C**) do que os animais AIRmin^{SS}. Entretanto, genes relacionados às categorias funcionais de resposta inflamatória, resposta imune e queratinização foram expressos em níveis mais altos nos animais AIRmin^{SS} (**Figura 11 D, E e F**).

Comparando as duas sublinhagens 24 horas após a perfuração das orelhas, durante o início do processo de reparação da lesão, observamos que os animais AIRmax^{SS} passaram a expressar maiores níveis de genes envolvidos em temas biológicos como adesão celular e transporte de elétrons (**Figura 12 B e C**) enquanto os animais AIRmin^{SS} experimentais exibiram maior expressão de genes participantes em processos metabólicos e resposta imune (**Figura 12 D e E**).

Tanto as categorias observadas nos animais AIRmax^{SS} quanto as verificadas nos animais AIRmin^{SS} envolveram genes participantes do processo inflamatório.

No tema biológico transdução de sinal, um dos genes expressos em níveis mais altos nos camundongos AIRmax em relação aos AIRmin^{SS} foi o *Emr4* ou *Fire*. A ativação deste gene propicia a migração de queratinócitos para o local da lesão (JAAKKOLA et al., 1998). Por outro lado, os animais AIRmin^{SS} expressaram o gene *Baiap2l1*, envolvido em processos de reorganização de actina. A expressão elevada do gene *Baiap2l1* no início do processo de resolução da lesão pode ter favorecido o início do processo cicatricial nestes animais e impedido um fenótipo regenerativo.

Demos continuidade ao estudo verificando o grupo de genes que estariam ativados ou reprimidos nos animais experimentais em relação aos seus respectivos controles em ambas as sublinhagens.

No grupo dos genes ativados após um dia de lesão, notamos que genes de resposta inflamatória (**Figura 13 D e G**) e quimiotaxia (**Figura 13 C e J**) modularam a resposta inicial de reparação tissular tanto nos animais AIRmax^{SS} quanto nos

animais AIRmin^{SS}. Esta resposta confirma os resultados prévios observados nos experimentos para observação dos mecanismos celulares envolvidos no fenótipo de reparação de lesão tecidual. Embora ambas as sublinhagens tenham apresentado reatividade inflamatória significativa durante todo o estudo, até o momento, verificamos maior intensidade de eventos inflamatórios nos animais AIRmin^{SS} comparada aos animais AIRmax^{SS}.

O envolvimento de genes ativados classificados em tema de resposta inflamatória na sublinhagem AIRmax^{SS}, no início do processo, contradiz alguns trabalhos que relatam a influência negativa de eventos inflamatórios intensos para a ocorrência de regeneração, pois a inflamação prolongada induz fibrose tissular, mas a reação intensa resolvida rapidamente, como é o caso dos animais AIRmax, favorece o microambiente da lesão (CANHAMERO et al., 2011; DE FRANCO et al., 2007; HARTY et al., 2003; LI et al., 2001; REINES et al., 2008).

Além da importância de se regular a inflamação nos eventos iniciais, a ativação e repressão de alguns genes relacionados com o fenótipo de cicatrização podem modular a reparação tecidual.

Observamos um agrupamento de genes ativados envolvidos na resposta de cicatrização nas orelhas dos animais AIRmin^{SS}. Entre eles os genes *Sprr2i*, *Sprr2h*, *Sprr2g*, *Sprr2f* e *Sprr2e*, envolvidos no desenvolvimento da epiderme, o gene *Ptgs2*, modulador da angiogênese, e alguns genes participantes no processo catabólico de colágeno como: *Mmp9*, *Mmp8*, *Mmp3*, *Mmp13* e *Mmp1b*.

O envolvimento desses genes durante o processo de reparação da lesão nos animais AIRmin^{SS} sugere que se iniciou a segunda fase do processo de cicatrização, a fase de formação de novos tecidos (SINGER; CLARK, 1999). A formação de uma nova epiderme após 48 horas de lesão foi demonstrada na análise histológica da orelha desses animais (**Figuras 28 D e F**), corroborando com os resultados obtidos nos estudos de expressão gênica global.

A expressão significativa de genes que codificam as proteases MMPs nos animais AIRmin^{SS} também sugere uma maior degradação do tecido afetado, possibilitando uma maior migração de células inflamatórias para o local inflamado e agravamento da injúria (SOROKIN, 2010). Além disso, a degradação tecidual favorece a síntese de novos componentes de matriz extracelular, que produzidos em excesso, iniciam o processo de cicatrização (GURTNER et al., 2008; SCHÄFER; WERNER, 2008).

Esta ativação de genes que sintetizam MMPs nos animais AIRmin^{SS}, realmente favoreceu a síntese de novos componentes de matriz extracelular. Aos 10 dias após a lesão, durante a fase de re-epitelização, verificamos a participação de duas categorias funcionais: adesão celular e transporte de fosfato, contendo genes relacionados com a síntese de colágeno, dentre eles *Col1a1*, *Col1a2*, *Col3a1*, *Col6a1*, *Col6a2*, entre outros (**Figura 16 I e J**). Esses resultados foram comprovados por experimentos de histologia, onde demonstramos que ocorreu maior deposição desorganizada de fibras colágenas na orelha de animais AIRmin^{SS}, resultando na formação de tecido de granulação no local lesionado e posteriormente estabelecendo-se a cicatriz (**Figuras 29 e 30 F e H**).

Categorias biológicas como contração muscular e regulação da contração muscular foram também identificadas nos animais AIRmin^{SS} (**Figura 16 K e M**). O interessante dessa resposta é que a contração muscular está mais relacionada com o processo de cicatrização e não com a regeneração, e neste fenótipo há predominância de miofibroblastos na periferia da lesão, os quais são responsáveis pela diminuição da injúria e deposição adicional de matriz, corroborando desta forma com o reparo da lesão e formação de cicatriz (MONACO; LAWRENCE, 2003). A ativação de genes envolvidos nessas categorias foi conferida também aos 30 dias após a injúria nos animais AIRmin^{SS} (**Figura 19 N e O**).

Por outro lado, durante a fase de re-epitelização, aos 10 dias após a injúria, os animais AIRmax^{SS} expressaram genes participantes dos processos envolvidos em queratinização, adesão celular, regulação do ciclo celular e desenvolvimento de vasos sanguíneos (**Figura 16 A a H**). Esses resultados são coerentes com os dados da literatura, indicando que esses animais possuem um controle do processo de reparação tissular, expressando genes envolvidos na diferenciação de queratinócitos, como *Krt6b* e *Spr1b*, bem como genes participantes do processo de angiogênese, como o *Lox* (GURTNER et al., 2008; SCHÄFER; WERNER, 2008).

Finalizamos as análises de expressão gênica global com a verificação de genes reprimidos por conta do estímulo nas sublinhagens. Destaca-se nesta análise que todas as categorias biológicas sobre-representadas envolvendo genes reprimidos nos animais AIRmax^{SS} estavam relacionadas a contração muscular após 24 horas de perfuração das orelhas (**Figura 14 A, B, C e D**).

A repressão de genes relacionados à contração muscular foi observada recentemente em outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo. Canhamero e

colaboradores (2011), verificaram anteriormente a expressão de genes também categorizados neste tema na orelha dos camundongos AIRmax^{SS} após 48 horas de perfuração (CANHAMERO et al., 2011). Este conjunto de dados confirma o efeito negativo que esses genes exercem para o fechamento da perfuração na orelha, modulando o início do processo de reparação.

De todas as categorias sobrerrepresentadas observadas nos animais AIRmin^{SS} envolvendo genes reprimidos, verificamos a repressão de apenas dois genes envolvidos na contração muscular no período de 24 horas após injúria. Nos outros dois períodos avaliados, aos 10 e 30 dias após lesão (**Figura 17 J e figura 20 F, G, H e M, respectivamente**), conferimos repressão de genes envolvidos com diferenciação de queratinócitos, queratinização, desenvolvimento epidermal e desenvolvimento de pele nestes animais. A repressão de genes associados a funções de desenvolvimento de pele e queratinização pode ter contribuído significativamente na incapacidade desses animais de reparar completamente o orifício na orelha.

Posteriormente, agrupamos os genes diferencialmente expressos por cromossomos, na tentativa de candidatar genes e correlacioná-los com os QTL detectados anteriormente. Durante a nossa pesquisa, identificamos concentração de genes em algumas regiões cromossômicas que poderiam ser candidatas a regular o fenótipo de reparo tecidual: a região a cerca de 90 Mb do cromossomo 3, que contem os genes que codificam as pequenas proteínas ricas em prolina (*Spr*) que controlam a morfogênese epidérmica e os genes *S100a9* e *S100a8* que atuam na organização do citoesqueleto, e a região distal do cromossomo 11. Em todos os períodos avaliados, genes ativados envolvidos com resposta de queratinização favoreceram o processo regenerativo nas linhagens AIRmax^{SS} enquanto genes de regulação de contração muscular impediram que as linhagens AIRmin^{SS} pudessem fechar o orifício completamente confirmando os dados apresentados anteriormente (**Figuras 21 A, B, D, G, H e K**).

Verificamos que enquanto os animais AIRmin^{SS} apresentaram ativação de genes presentes no cromossomo 11, animais AIRmax^{SS} reprimiram a atuação destes genes e o mesmo aconteceu em relação aos genes reprimidos na linhagem AIRmin^{SS}. Esses animais reprimiram os genes envolvidos com queratinização localizados nos cromossomos 3 e 16 que encontraram-se ativados na orelha dos camundongos AIRmax^{SS} durante o processo de reparação (**Figuras 22 B, F, H e J**).

Estudos com o intuito de se avaliar a sensibilidade ou resistência ao choque endotóxico induzido pelo LPS, proveniente da bactéria entérica *Salmonella* Typhimurium, foram desenvolvidos pelo nosso grupo utilizando os camundongos AIRmax e AIRmin. Verificaram-se três QTLs significantes relacionados a esse fenótipo, localizados no cromossomo 4, 7 e 11 (dados não publicados).

Por meio de estudos de transcriptoma de fígado, observou-se um agrupamento de genes localizados na porção distal no cromossomo 11 (82 a 83 Mb) com expressão diferencial entre animais AIRmax e AIRmin que modulam a sensibilidade desses animais ao lipopolissacarídeo. Interessantemente, alguns destes genes detectados parecem modular o fenótipo cicatricial nos animais AIRmin^{SS} no início do processo de reparação, após um dia de lesão. Entre eles estão os genes *Ccl7*, *Slfn1* e *Slfn4*, envolvidos em quimiotaxia, processos biológicos e ciclo celular (<http://www.informatics.jax.org/>), respectivamente (**Figura 21 G**). Esses genes tornaram-se fortes candidatos a regularem não só a inflamação, mas também outros fenótipos não associados ao fenótipo de seleção, como a sensibilidade ao choque endotóxico ao LPS e a cicatrização tecidual. Esse resultado é inédito e extremamente relevante na busca de biomarcadores comuns nos processos investigados. O cromossomo 1.

Posteriormente as análises de expressão gênica, quantificamos algumas citocinas pró e anti-inflamatórias e quimiocina no soro após perfuração das orelhas de camundongos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} para avaliarmos se o estímulo provocado seria capaz de ocasionar alterações sistêmicas nos períodos avaliados. Observamos que os níveis séricos de IL-1 β , IL-6 e MIP-2 apresentaram-se superiores nos animais AIRmin^{SS} em comparação aos animais AIRmax^{SS} durante toda a cinética.

Entretanto, as citocinas TNF- α , IL-17 e IL-10 não foram detectadas no soro durante os dois primeiros dias de injúria em comparação aos seus respectivos controles (**Figura 27**).

Esses resultados corroboram com os dados obtidos nas análises de expressão gênica, onde novamente, animais AIRmin^{SS} exibiram uma maior modulação de mediadores inflamatórios na reparação a perfuração das orelhas comparado aos animais AIRmax^{SS}. Somente a citocina TGF- β foi secretada em maiores quantidades nos animais AIRmax^{SS} quando comparada aos animais AIRmin^{SS} (**Figura 27**).

Embora esta citocina esteja relacionada à formação de tecidos de granulação em processos de cicatrização (OPALENIK; DAVIDSON, 2005; SCHÄFER; WERNER, 2008), ela também age na regulação da inflamação após lesão (IPAKTCHI et al., 2006), regulação esta observada nos animais AIRmax^{SS} praticamente para todas as citocinas testadas. No início da cinética avaliada, 24 horas após injúria, estes animais apresentaram intensa reação inflamatória, e no período de 48 horas houve um declínio nos níveis desses mediadores.

Em resumo, esse conjunto de resultados forneceu informações sobre as possíveis bases moleculares que atuam na diferença existente entre os animais selecionados em regenerar ou não a perfuração em suas orelhas.

Abbott e colaboradores descreveram que a qualidade do reparo tecidual está correlacionada ao grau da resposta inflamatória (ABBOTT et al., 1998).

Os camundongos AIRmax^{SS} exibiram resposta moderada frente a lesão, expressando genes correspondentes a cada fase do processo de reparo tecidual. Além disso, apresentaram expressão significativa da proteína específica de fibroblasto, a FSP-1 (**Figura 35**) e pouca expressão da proteína α -SMA (**Figura 34**), marcador de miofibroblastos na lesão. Expressaram poucos genes codificadores de colágeno e reprimiram genes envolvidos em funções relacionadas à contração muscular (**Figura 14 A, B e C**), genes esses sabidamente envolvidos com a formação de cicatriz.

Antagonicamente à resposta dos animais AIRmax^{SS}, camundongos da sublinhagem AIRmin^{SS} não regeneraram o orifício na orelha e apresentaram intensa reação inflamatória em resposta a perfuração. Essa resposta manteve-se intensa praticamente durante os dois primeiros dias de avaliação após a injúria, sugerindo que o alto grau de inflamação desfavoreceu o ambiente a regenerar.

As células inflamatórias ainda presentes na lesão poderiam ter secretado várias substâncias bioativas e metaloproteínases que resultaram em uma lesão agravada, observada pelo alto número de genes ativados. Esses mediadores em excesso impediram a formação do blastema, favoreceram o início da deposição desorganizada de colágeno (**Figuras 29 F e 30 F**) e de outras proteínas de matriz extracelular, assim como a alta expressão da proteína α -SMA na orelha desses animais (**Figura 34**). O tecido de granulação constituído não conseguiu ser totalmente remodelado pelas MMPs, dando origem a cicatriz (Figura). Uma vez que

o processo de cicatrização é iniciado, o tecido não pode ser regenerado, ou seja, o processo é irreversível (MONACO; LAWRENCE, 2003).

Estes estudos poderão contribuir em estudos dirigidos a tratamentos clínicos relacionados ao percentual e qualidade de reparo em humanos. A população humana é geneticamente heterogênea e ocorre uma variação importante nestes processos de reparação de tecidos entre indivíduos, decorrente de fatores ambientais e genéticos. As linhagens empregadas neste trabalho foram fenotipicamente selecionadas com base na reatividade inflamatória, mas a constituição genética dos animais é heterogênea, simulando adequadamente populações naturais.

Estudos complementares deverão ser desenvolvidos para uma completa elucidação da influência da resposta inflamatória na determinação de fenótipos distintos durante o processo de reparação tecidual da orelha.

6 CONCLUSÕES

- A diferença fenotípica observada entre as sublinhagens durante o processo de resolução tecidual sugere fortemente que os genes que modulam a alta e baixa resposta inflamatória aguda também influenciaram a capacidade de regeneração de um orifício na orelha;
- A ativação de genes regulando os processos de resposta inflamatória, contração muscular, regulação da contração muscular e processo catabólico do colágeno e, o agrupamento significativo de genes reprimidos envolvidos em resposta de queratinização, diferenciação de queratinócitos, desenvolvimento epidermal e desenvolvimento de pele foram observados na orelha dos animais AIRmin^{SS}. A ativação de todos esses fatores contribuiu para uma maior deposição de colágeno e da proteína α -SMA na orelha destes animais promovendo a formação do tecido de granulação e posteriormente a cicatriz no final do processo de reparação nestas linhagens;
- Os camundongos AIRmax^{SS} exibiram resposta moderada frente a lesão, expressando genes correspondentes a cada fase do processo de reparo tecidual. Além disso, apresentaram reduzida deposição de colágeno e reprimiram genes participantes em funções relacionadas à contração muscular, propiciando a regeneração da cartilagem da orelha e formação de estruturas dérmicas como o folículo piloso, resultando em completa restauração do tecido prejudicado;
- Confirmamos a participação efetiva de genes envolvidos com queratinização localizados no cromossomo 3 favorecendo o fenótipo regenerativo nas linhagens AIRmax^{SS} e a modulação de genes reguladores de contração muscular nas linhagens AIRmin^{SS} situados no cromossomo 11.
- Detectamos possíveis genes candidatos que regulam não só a inflamação, mas também outros fenótipos não associados ao fenótipo de seleção, como a sensibilidade ao choque endotóxico pelo LPS e a cicatrização tecidual observada na orelha dos animais AIRmin^{SS}. Esse resultado é inédito e extremamente relevante na busca de biomarcadores comuns nos processos investigados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

ACOSTA, J. C.; O'LOGHLEN, A.; BANITO, A.; GUIJARRO, M. V.; AUGERT, A.; RAGUZ, S.; FUMAGALLI, M.; DA COSTA, M.; BROWN, C.; POPOV, N.; TAKATSU, Y.; MELAMED, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F.; BERNARD, D.; HERNANDO, E.; GIL, J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 1006-1018, 2008.

AIMES, R. T.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 11, p. 5872-6, 1995.

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, n. 4, p. 204-209, 2009.

ANGELOV, N.; MOUTSOPOULOS, N.; JEONG, M. J.; NARES, S.; ASHCROFT, G.; WAHL, S. M. Aberrant mucosal wound repair in the absence of secretory leukocyte protease inhibitor. **Thromb. Haemost.**, v. 92, n. 2, p. 288-297, 2004.

ANTRUM, R. M.; SOLOMKIN, J. S. Monocyte dysfunction in severe trauma: evidence for the role of C5a in deactivation. **Surgery**, v. 100, n. 1, p. 29-37, 1986.

ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W. H.; MOUTON, D.; SEMAN, M.; IBÁÑEZ, O. M. Innate resistance to infections by intracellular bacteria differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 9, p. 2913- 2920, 1998.

ASAGOE, K.; YAMAMOTO, K.; TAKAHASHI, A.; SUZUKI, K.; MAEDA, A.; NOHGAWA, M.; HAKAKAWA, N.; TAKANO, K.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; OKUMA, M.; SASADA, M. Down-regulation of CXCR2 expression on human polymorphonuclear leukocytes by TNF-alpha. **J. Immunol.**, v. 160, n. 9, p. 4518-4525, 1998.

BAKER, E. A.; LEAPER, D. J. Proteinases, their inhibitors, and cytokine profiles in acute wound fluid. **Wound Repair Regen.**, v. 8, p. 392-398, 2000.

BARTON, C. H.; WHITEHEAD, S. H.; BLACKWELL, J. M. Nramp transfection transfers lty/Lsh/Bcg- related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. **Mol. Med.**, v. 1, p. 267- 279, 1995.

¹De acordo com:

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

BEN MOSHE, T.; BARASH, H.; KANG, TB.; KIM, JC.; KOVALENKO, A.; GROSS, E.; SCHUCHMANN, M.; ABRAMOVITCH, R.; GALUN, E.; WALLACH, D. Role of caspase-8 in hepatocyte response to infection and injury in mice. **Hepatology**, v. 45, n. 4, p. 1014-24, 2007.

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.; IBANEZ, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 337-346, 1998.

BJARNSHOLT, T.; KIRKETERP-MØLLER, K.; JENSEN, PØ.; MADSEN, KG.; PHIPPS, R.; KROFELT, K.; HØIBY, N.; GIVSKOV, M. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. **Wound Repair Regen.**, v. 16, n. 1, p. 2-10, 2008.

BLACKWELL, J. M.; BARTON, C. H.; WHITE, J. K.; SEARLE, S.; BAKER, A. M.; WILLIAMS, H.; *et al.* Genomic organization and sequence of the human nramp1 gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. **Mol. Med.**, v. 1, p. 194- 205, 1995.

BLANKENHORN, E. P.; TROUTMAN, S.; CLARK, L. D.; ZHANG, X.; CHEN, P.; HEBER- KATZ, E. Sexually dimorphic genes regulate healing and regeneration in mrl mice. **Mamm. Genome**, v. 14, p. 250- 260, 2003.

BLEHARSKI, J. R.; KIESSLER, V.; BUONSANTI, C.; SIELING, PA.; STENGER, S.; COLONNA, M.; MODLIN, R. L. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. **J. Immunol.**, v. 170, n. 7, p. 3812-3818, 2003.

BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, p. 1286–92, 1994.

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, p. 2766- 2771, 2006.

BÖTTCHER-HABERZETH.; BIEDERMANN, T.; REICHMANN, E. Tissue engineering of skin. **Burns**, v. 36, n. 4, p. 450-460, 2010.

BOUCHON, A.; DIETRICH, J.; COLONNA, M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. **J. Immunol.**, v. 164, n. 10, p. 4991-4995, 2000.

BOUCHON, A.; HERNÁNDEZ-MUNAIN, C.; CELLA, M.; COLONNA, M. A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 8, p. 1111-1122, 2001.

BOUKHALFA, G.; DESMOULIÈRE, A.; RONDEAU, E.; GABBIANI, G.; SRAER, J. D. Relationship between alpha-smooth muscle actin expression and fibrotic changes in human kidney. **Exp. Nephrol.**, v. 4, n. 4, p. 241-247, 1996.

BUCKLEY, G.; WONG, J.; METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. Denervation affects regenerative responses in MRL/MpJ and repair in C57BL/6 ear wounds. **J. Anat.**, v. 220, n. 1, p. 3-12, 2012.

CANHAMERO, T.; REINES, B.; PETERS, L. C.; BORREGO, A.; CARNEIRO, P. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; CABRERA, W. H.; RIBEIRO, O. G.; JENSEN, J. R.; STAROBINAS, N.; IBÁÑEZ, 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.

CANHAMERO, T.; GARCIA, L. V.; DE FRANCO, M. Acute inflammation loci are involved in wound healing in the mouse ear punch model. [Review] **Adv. Wound Care (New Rochelle)**, v. 3, n. 9, p. 582-591, 2014.

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

CARNEIRO, P. S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; JENSEN, J. R.; CABRERA, W. H. K.; IBÁÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Gene expression profiles of bone marrow cells from mice phenotype-selected for maximal or minimal acute inflammations: searching for genes in acute Inflammation modifier loci. **Immunology**, v. 128, p. 562-571, 2009.

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

CELLIER, M.; SHUSTIK, C.; DALTON, W.; RICH, E.; HU, J.; MALO, D.; *et al.* The human NRAMP1 gene as a marker of professional primary phagocytes: studies in blood cells and in induced hl- 60 promyelocytic leukemia. **J. Leuk. Biol.**, v. 61, p. 96-105, 1997.

CHAKRABARTI, S.; PATEL, K. D. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. **Exp. Lung Res.**, v. 31, n. 6, p. 599-621, 2005.

CHEVERUD, J. M.; LAWSON, H. A.; FUNK, R.; ZHOU, J.; BLANKENHORN, E. P.; HEBER-KATZ E. Healing quantitative trait loci in a combined cross analysis using related mouse strain crosses. **Heredity**, v. 108, n. 4, p. 441-446, 2012.

CHO, C. H.; SUNG, H. K.; KIM, K. T.; CHEON, H. G.; OH, G. T.; HONG, H. J.; YOO, O. J.; KOH, G. Y. COMP-pangipoin-1 promotes wound healing through enhanced angiogenesis, lymphangiogenesis, and blood flow in a diabetic mouse model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 13, p. 4946–4951, 2006.

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

CLARK, L. D; CLARK, R. K; HEBER-KATZ, E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 88, n. 1, p. 35-45, 1998.

CLARK, R. A. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 13, p. 701-725, 1985.

CLARK, R. A. The molecular and cellular biology wound repair. **New York: Plenum Press**, 2nd edição, 1996.

COLONNA, M. DAP12 signaling: from immune cells to bone modeling and brain myelination. **J. Clin. Invest.**, v. 111, n. 3, p. 313-314, 2003.

COLONNA, M. TREMs in the immune system and beyond. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 6, p. 445-453, 2003.

DANON, D.; KOWATCH, M. A.; ROTH, G. S. Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 2018-20, 1989.

DEOLIVEIRA, D.; JIAO, Y.; ROSS, J. R.; CORBIN, K.; XIAO, Q.; TONCHEVA, G.; ANDERSON-EVANS, C.; YOSHIZUMI, T. T.; CHEN, B. J.; CHAO, N. J. An ear punch model for studying the effect of radiation on wound healing. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 87, n. 8, p. 869-877, 2011.

DE BENTZMANN. S.; POLETTE, M.; ZAHM, J. M.; HINNRASKY, J.; KILEZTKY, C.; BAJOLET, O.; KLOSSEK, J. M.; FILLOUX, A.; LAZDUNSKI, A.; PUCHELLE E. *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing overactivation of epithelial matrix metalloproteinase- 2. **Lab. Invest.**, v. 80, p. 209–219, 2000.

DE FRANCO, M.; CARNEIRO, P. 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, n. 4, p. 263-269, 2007.

DEVALARAJA, R. M.; NANNEY, L. B.; DU, J.; QIAN, Q.; YU, Y.; DEVALARAJA, M. N.; RICHMOND, A. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. **J. Invest. Dermatol.**, v. 115, n. 5, p. 931, 2000.

DOVI, J. V.; HE, L. K.; DIPIETRO, L. A. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 73, n. 4, p. 448-455, 2003.

DOVI, J. V.; SZPADERSKA, A. M.; DIPIETRO, L. A. Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? [Review] **Thromb. Haemost.**, v. 92, n. 2, p. 275-280, 2004.

EMING, S. A.; WERNER, S.; BUGNON, P.; WICKENHAUSER, C.; SIEWE, L.; UTERMÖHLEN, O.; DAVIDSON, J. M.; KRIEG, T.; ROERS, A. Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10. **Am. J. Pathol.**, v. 170, n. 1, p. 188- 202, 2007.

FAUVE, R. M.; JUSFORGUES, H.; HEVIN, B. Maintenance of granuloma macrophages in serum-free medium. **J. Immunol. Methods**, v. 64, p. 345, 1983.

FERGUSON, K. L.; TAHERI, P.; RODRIGUEZ, J.; TONAPI, V.; CARDELLIO, A.; DECHERT, R. Tumor necrosis factor activity increases in the early response to trauma. **Acad. Emerg. Med.**, v. 4, p. 1035–1040, 1997.

FORBES, J. R.; GROS, P. Divalent- metal transport by NRAMP proteins at the interface of host- pathogen interactions. **Trends Microbiol.**, v. 9, p. 397- 403, 2001.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Res. Ther.**, v. 8 (Suppl 2):S3, p. 1-6, 2006.

GABBIANI, G.; RAYAN, G. B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and possible role in wound contraction. **Experientia**, v. 27, n. , p. 549-550, 1970.

GERARD, C.; GERARD, N. P. C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 775–808, 1994.

GIBOT, S.; MASSIN, F.; MARCOU, M.; TAYLOR, V.; STIDWILL, R.; WILSON, P.; SINGER, M.; BELLINGAN, G. TREM-1 promotes survival during septic shock in mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 456–466, 2007.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. [Review] **J. Leukoc. Biol.**, v. 69, n. 4, p. 513-521, 2001.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.

GOSS, R. J.; GRIMES, L. N. Epidermal downgrowths in regenerating rabbit ear holes. **J. Morphol.**, v. 146, n. 4, p. 533-542, 1975.

GOUREVITCH, D.; CLARK, L.; CHEN, P.; SEITZ, A.; SAMULEWICZ, S. J.; HEBER-KATZ, E. Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model. **Dev. Dyn.**, v. 226, n. 2, p. 377-387, 2003.

GOUREVITCH, D.; KOSSENKOV, A. V.; ZHANG, Y.; CLARK, L.; CHANG, C.; SHOWE, L. C.; HEBER-KATZ E. Inflammation and its correlates in regenerative wound healing: an alternate perspective. [Review] **Adv. Wound Care (New Rochelle)**, v. 3, n. 9, p. 592-603, 2014.

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

GOVONI, G.; GROS, P. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. **Inflamm. Res.**, v. 47, p. 277- 284, 1998.

GUERNE, P. A.; DESGEORGES, A.; JASPAR, J. M.; RELIC, B.; PETER, R.; HOFFMEYER, P.; DAYER, J. M. Effects of IL-6 and its soluble receptor on proteoglycan synthesis and NO release by human articular chondrocytes: comparison with IL-1. Modulation by dexamethasone. **Matrix. Biol.**, v. 18, n. 3, p. 253-260, 1999.

GUO, R. F.; WARD, P. A. Role of C5a in inflammatory responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 821-852, 2005.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. [Review] **Nature**, v. 453, p. 314-321, 2008.

HACKAM, D. J.; ROTSTEIN, O. D.; ZHANG, W.; GRUENHEID, S.; GROS, P.; GRINSTEIN, S. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance- associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 351- 364, 1998.

HAMERMAN, J. A.; JARJOURA, J. R.; HUMPHREY, M. B.; NAKAMURA, M. C.; SEAMAN, W. E.; LANIER, L. L. Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12. **J. Immunol.**, v. 177, n. 4, p. 2051-2055, 2006.

HASEL, K. W.; SUTCLIFFE, J. G. Nucleotide sequence of a cDNA coding for mouse Cyclophilin. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 13, p. 4019, 1990.

HAYAKAWA, K., HARDY, R. R. Normal, autoimmune, and malignant CD5 + B cells: the Ly-1 B lineage? **Annu. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 197-218, 1988.

HEBER-KATZ, E. The regenerating mouse ear. **Semin. Cell Develop. Biol.**, v. 10, p. 415–419, 1999.

HEBER-KATZ, E.; CHEN, P.; CLARK, L.; ZHANG, X. M.; TROUTMAN, S.; BLANKENHORN, E. P. Regeneration in MRL mice: further genetic loci controlling the ear hole closure trait using MRL and M.m. Castaneus mice. **Wound Repair Regen.**, v. 12, n. 3, p. 384-392, 2004.

HERZENBERG, L. A; KANTOR, A. B. B-cell lineages exist in the mouse. [Review] **Immunol. Today**, v. 14, n. 2, p. 79-83, 1993.

HÜBNER, G.; BRAUCHLE, M.; SMOLA, H.; MADLENER, M.; FÄSSLER, R.; WERNER, S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. **Cytokine**, v. 8, p. 548–556, 1996.

IBÁÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; *et al.* 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.

IKEMA, K.; MATSUMOTO, K.; INOMATA, Y.; KOMOHARA, Y.; MIYAJIMA, S.; TAKEYA, M.; TANIHARA, H. Induction of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs correlates with outcome of acute experimental pseudomonal keratitis. **Exp. Eye Res.**, v. 83, p. 1396-404, 2006.

IPAKTCHI, K.; MATTAR, A.; NIEDERBICHLER, A. D.; HOESEL, L. M.; VOLLMANNSHAUSER, S.; HEMMILA, M. R.; SU, G. L.; REMICK, D. G.; WANG, S. C.; ARBABI, S. Attenuating burn wound inflammatory signaling reduces systemic inflammation and acute lung injury. **J. Immunol.**, v. 177, p. 8065-8071, 2006.

ISHIDA, Y.; KONDO, T.; KIMURA, A.; MATSUSHIMA, K.; MUKAIDA, N. Absence of IL-1 receptor antagonist impaired wound healing along with aberrant NF-kappaB activation and a reciprocal suppression of TGF-beta signal pathway. **J. Immunol.**, v. 176, p. 5598-5606, 2006.

ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. [Review] **Cytokine Growth Factor**, v. 13, p. 357-68, 2002.

JAAKKOLA, P.; KONTUSAARI, S.; KAUPPI, T.; MÄÄTÄ, A.; JALKANEN, M. Wound re-epithelialization activates a growth factor-responsive enhancer in migrating keratinocytes. **FASEB J.**, v. 12, p. 959-969, 1998.

JOHANSSON, M. W.; PATARROYO, M.; OBERG, F.; SIEGBAHN, A.; NILSON, K. Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alphaMb2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18). **J. Cell Sci.**, v. 110, p. 1133-1139, 1997.

JOHNSTON, R. A.; MIZGERD, J. P.; SHORE, S. A. CXCR2 is essential for maximal neutrophil recruitment and methacholine responsiveness after ozone exposure. **Am J Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 288, n. 1, p. 61-67, 2005.

KITA, E.; EMOTO, M.; OKU, D.; NISHIKAWA, F.; HAMURU, A.; KAMIKAIDOU, N.; KASHIBA, S. Contribution of interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of ity r mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 51, p. 244-250, 1992.

KLESNEY-TAIT, J.; TURNBULL, I. R.; COLONNA, M. The TREM receptor family and signal integration. **Nat. Immunol.**, v. 7, p. 1266-1273, 2006.

KRUIDERING, M.; EVAN, G. I. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? **IUBMB Life**, v. 50, n. 2, p. 85-90, 2000.

KUHN, D. E.; LAFUSE, W. P.; ZWILLING, B. S. Iron transport into mycobacterium avium-containing phagosomes from an Nramp1(Gly 169)-transfected RAW264.7 macrophage cell line. **J. Leukoc. Biol.**, v.69, p. 43-49, 2001.

LANG, T.; PRINA, E.; SIBTHORPE, D.; BLACKWELL, J. M. Nramp1 transfection transfer *ity/lsh/bcg* – related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 380- 386, 1997.

LANIER, L. L.; WARNER, N. L.; LEDBETTER, J. A.; HERZENBERG, L. A. Expression of Lyt-1 antigen on certain murine B cell lymphomas. **J. Exp. Med.**, v. 153, n. 4, p. 998-1003, 1981.

LANIER, L. L.; BAKKER, A. B. The ITAM bearing transmembrane adaptor DAP12 in lymphoid and myeloid cell function. **Immunol. Today**, v. 21, p. 611–614, 2000.

LAU, D.; MOLLNAU, H.; EISERICH, J. P.; FREEMAN, B. A.; DAIBER, A.; GEHLING, U. M.; BRÜMMER, J.; RUDOLPH, V.; MÜNDEL, T.; HEITZER, T.; MEINERTZ, T.; BALDUS, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.102, p. 431-436, 2005.

LEASK, A.; ABRAHAM, D. J. TGF-beta signaling and the fibrotic response. **Faseb J.**, v. 18, n. 7, p. 816-27, 2004.

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

LI, X.; GU, W.; MASINDE, G.; HAMILTON-ULLAND, M.; XU, S.; MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Genetic control of the rate of wound healing in mice. **Heredity**, v. 86, p. 668-674, 2001.

LIAN, X.; YANG, L.; GAO, Q.; YANG, T. IL-1alpha is a potent stimulator of keratinocyte tissue plasminogen activator expression and regulated by TGF-beta1. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 300, n. 4, p. 185-193, 2008.

LIECHTY, K. W.; ADZICK, N. S.; CROMBLEHOLME, T. M. Diminished interleukin 6 (IL-6) production during scarless human fetal wound repair. **Cytokine**, v. 12, p. 671-676, 2000.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. [Review] **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-126, 2000.

LINARES, H. A. From wound to scar. **Burns**, v. 22, p. 339–52, 1996.

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.

LOBMANN, R.; SCHULTZ, G.; LEHNERT, H. Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications. **Diabetes Care**, v. 28, p. 461–471, 2005.

MARIA, D. A.; MANETTI, G.; GALBIATI, F.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA, M.; DRAGANI, T. A.; IBAÑEZ, O. M. Pulmonary

adenoma susceptibility 1 (*Pas1*) locus affects inflammatory response. **Oncogene**, v. 22, p. 426-432, 2003.

MARTIN, P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75–81, 1997.

MASINDE, G. L.; LI, X.; GU, W.; DAVIDSON, H.; MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Identification of wound healing/regeneration quantitative trait loci (qtl) at multiple time points that explain seventy percent of variance in (MRL/Mpj And SJL/J) mice F2 population. **Genome Res.**, v. 12, p. 2027-2033, 2001.

MASINDE, G. L.; LI, X.; GU, W.; HAMILTON-ULLAND, M.; MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Quantitative trait loci that harbor genes regulating muscle size in (MRL/MPJ x SJL/J) F(2) mice. **Funct. Integr. Genomics**, v. 2, n. 3, p. 120-125, 2002.

MASSAGUE, J. TGF-beta signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 753–791, 1998.

MASTELLOS, D.; PAPADIMITRIOU, J. C.; FRANCHINI, S.; TSONIS, P. A.; LAMBRIS, J. D. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. **J. Immunol.**, v. 166, p. 2479–2486, 2001.

MATSUMOTO, T.; MUGISHIMA, H. Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. **J. Atheroscler. Thromb.**, v. 13, n. 3, p. 130-5, 2006.

MCBREARTY, B. A.; CLARK, L. D.; ZHANG, X. M.; BLANKENHORN, E. P.; HEBER-KATZ, E. Genetic analysis of a mammalian wound-healing trait. **Genetics**, v. 95, p. 11792-11797, 1998.

MCCARTNEY-FRANCIS, N. L.; FRAZIER-JESSEN, M.; WAHL, S. M. TGF-beta: a balancing act. **Int. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 553–580, 1998.

MCCOURT, M.; WANG, J. H.; SOOKHAI, S.; REDMOND, H. P. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. **Arch. Surg.**, v. 134, p. 1325-31; discussion 1331-2, 1999.

MONACO, J. L.; LAWRENCE, W. T. Acute wound healing an overview. **Clin. Plast. Surg.**, v. 30, n. 1, p. 1-12, 2003.

MUKHERJEE, T. K.; DINH, H.; CHAUDHURI, G.; NATHAN, L. Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: implications in atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 4055- 4060, 2002.

MURATA, H.; ZHOU, L.; OCHOA, S.; HASAN, A.; BADIYAS, E.; FALANGA, V. TGF-beta3 stimulates and regulates collagen synthesis through TGF-beta1-dependent and independent mechanisms. **J. Invest. Dermatol.**, v. 108, p. 258–62, 1997.

MURPHY, P. M. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. **Semin. Hematol.**, v. 3, p. 311–318, 1997.

O'DWYER, M. J.; MANKAN, A. K.; STORDEUR, P.; O'CONNELL, B.; DUGGAN, E.; WHITE, M.; KELLEHER, D. P.; MCMANUS, R.; RYAN, T. The occurrence of severe sepsis and septic shock are related to distinct patterns of cytokine gene expression. **Shock.**, v. 26, n. 6, p. 544-550, 2006.

OLIVEIRA, H. C.; POPI, A. F.; BACHI, A. L.; NONOGAKI, S.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. B-1 cells modulate the kinetics of wound-healing process in mice. **Immunobiology**, v. 215, n. 3, p. 215-222, 2010.

OPALENIK, S. R.; DAVIDSON, J. M. Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. **FASEB J.**, v. 19, p. 1561–1563, 2005.

OWEN, C. A.; HU, Z.; BARRICK, B.; SHAPIRO, S. D. Inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinases–resistant matrix metalloproteinase-9 on the cell surface of neutrophils. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 29, p. 283-294, 2003.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 8, p. 617-629, 2004.

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

PLOWDEN, J.; RENSHAW-HOEISCHER, M.; ENGLEMAN, C.; KATZ, J.; SAMBHARA, S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. [Review] **Aging Cell.**, v. 3, n. 4, p. 161-7, 2004.

RAJNOCH, C.; FERGUSON, S.; METCALFE, A. D.; HERRICK, S. E.; WILLIS, H. S.; FERGUSON, M. W. Regeneration of the ear after wounding in different mouse strains is dependent on the severity of wound trauma. **Dev. Dyn.**, v. 226, n. 2, p. 388-397, 2003.

RAKOFF-NAHOUM, S.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and cancer. [Review] **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, n. 1, p. 57-63, 2009.

RAMARATHINAM, L.; NIESEL, D. W.; KIMPEL, G. R. Ity Influences the production of ifn- gamma by murine splenocytes stimulated in vitro with salmonella typhimurium. **J. Immunol.**, v. 150, p. 3965- 3972, 1993.

RENNEKAMPFF, H. O.; HANSBROUGH, J. F.; KIESSIG, V.; *et al.* Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. **J. Surg. Res.**, v. 93, p. 41- 54, 2000.

RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; MASSA, S.; DI PACE, R. F.; DE SOUZA, V. R.; STAROBINAS, N.; SEMEN, 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.

RIBEIRO, O. G.; MARIA, D. A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W. H. K.; MORISSET, J.; IBAÑEZ, O. M.; SEMAN, M. Convergent Alteration of Granulopoieses, 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. **Controle Genético da Inflamação**. São Paulo, 1994. (Tese Mestrado) Escola Paulista de Medicina.

ROBERTSON, F. M.; PELLEGRINI, A. E.; ROSS, M. S.; OBERYSZYN, A. S.; BOROS, L. G.; BIJUR, G. N.; SABOURIN, C. L.; OBERYSZYN, T. M. Interleukin-1alpha gene expression during wound healing. **Wound Repair Regen.**, v. 3, p. 473–484, 1995.

ROTHE, M.; FALANGA, V. Growth factors and wound healing. **Clin. Dermatol.**, v. 9, p. 553–559, 1992.

SAKLATVALA, J. Inflammatory signaling in cartilage: MAPK and NF-kappa pathways in chondrocytes and the use of inhibitors for research into pathogenesis and therapy of osteoarthritis. **Curr. Drug Targets**, v. 8, n. 2, p. 305-313, 2007.

SATO, Y.; OHSHIMA, T. The expression of mRNA of proinflammatory cytokines during skin wound healing in mice: a preliminary study for forensic wound age estimation (II). **Int. J. Legal Med.**, v. 113, p. 140–145, 2000.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. [Review] **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 9, n. 8, p. 628-638, 2008.

SCHÄFFER, M.; BONGARTZ, M.; HOFFMANN, W.; VIEBAHN, R. MHC-class-II-deficiency impairs wound healing. **J. Surg. Res.**, v. XX, p. 1- 6, 2006.

SCHROEDER, T. Imaging stem-cell-driven regeneration in mammals. [Review] **Nature**, v. 453, p. 345-351, 2008.

SHI, Y.; PESTKA, J. J. Mechanisms for suppression of interleukin-6 expression in peritoneal macrophages from docosahexaenoic acid-fed mice. **J. Nutr. Biochem.**, v. 20, n. 5, p. 358-368, 2009.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 10, p. 738–746, 1999.

SOLOVJOV, D.; PLUSKOTA, E.; PLOW, E. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 2, p.1336-4, 2005.

SOROKIN, L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. [Review] **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 10, p. 712-723, 2010.

STIFFEL, C.; IBAÑEZ, O.M.; RIBEIRO, O.G.; DECREUSEFOUND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetic of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. **Exp. Clin. Immunogenetics**, v. 7, p. 221-233, 1990.

STOCUM, D. L. Tissue restoration: approaches and prospects. **Wound Repair Regen.**, v. 4, n. 1, p. 3-15, 1996.

SUE, R. D.; BELPERIO, J. A.; BURDICK, M. D.; MURRAY, L. A.; XUE, Y. Y.; DY, M. C.; KWON, J. J.; KEANE, M. P.; STRIETER, R. M. CXCR2 is critical to hyperoxia-induced lung injury. **J. Immunol.**, v. 172, p. 3860–3868, 2004.

SUOMELA, S.; KARINIEMI, A-L.; SNELLMAN, E.; SAARIALHO-KERE, U. Metalloelastase (MMP-12) and 92-kDa gelatinase (MMP-9) as well as their inhibitors, TIMP-1 and -3, are expressed in psoriatic lesions. **Exp. Dermatol.**, v. 10, p. 175–183, 2001.

TOMASELLO, E.; OLCESSE, L.; VÉLY, F.; GEORGEON, C.; BLÉRY, M.; MOQRICH, A.; GAUTHERET, D.; DJABALI, M.; MATTEI, M. G.; VIVIER, E. Gene structure, expression pattern, and biological activity of mouse killer cell activating receptor-associated protein (KARAP)/DAP-12. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 34115–34119, 1998.

TSAI, W. C.; STRIETER, R. M.; MEHRAD, B.; NEWSTEAD, M. W.; ZENG, X.; STANDIFORD, T. J. CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4289–4296, 2000.

TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N. M.; MOUTSOPOULOS, H. M. Wound healing: immunological aspects. [Review] **Injury**, v. 37, suppl1. S5-S12, 2006.

TURNBULL, I. R.; GILFILLAN, S.; CELLA, M.; AOSHI, T.; MILLER, M.; PICCIO, L.; HERNANDEZ, M.; COLONNA, M. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. **J. Immunol.**, v. 177, p. 3520–3524, 2006.

VAN BERGE HENEGOUWEN, M. I.; VAN DER POLL, T.; VAN DEVENTER, S. J. H.; GOUMA, D. J. Peritoneal cytokine release after elective gastrointestinal surgery and postoperative complications. [Review] **Am. J. Surg.**, v. 175, p. 311-316, 1998.

VAN DER POLL.; LOWRY, S. F. Tumor necrosis factor in sepsis: Mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? [Review] **Shock**, v. 3, p. 1-12, 1995.

VASQUEZ- BRAVO, Y. L. A. R. **Aspecto da Resposta Inflamatória Aguda em Linhagens de Camundongos com Reatividade Máxima (AIRmax) e Mínima (AIRmin) Obtidas por Seleção Genética Bidirecional.** São Paulo, 1996. (Tese Doutorado) Universidade de São Paulo.

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. M.; PINNER, E.; GAUTHIER, S.; LEPAGE, P.; GROS, P. Nramp1 is an integral membrane phosphoglycoprotein absent from macrophages of inbred mouse strains susceptible to infection with intracellular parasites. **J. Immunol.**, v. 157, p. 3559- 3568, 1996.

VIDAL, S. M.; PINNER, E.; LEPAGE, P.; GAUTHIER, S.; GROS, P. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse Strains. **J. Immunol.**, v. 157, p. 3559- 3568, 1996.

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

WALPORT, M. J. Complement. Second of two parts. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 1140-1144, 2001.

WATFORD, W. T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J. J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. [Review] **Cytokine Growth Factor**, v. 14, n. 5, p. 361-368, 2003.

WELLER, K.; FOITZIK, K.; PAUS, R.; SYSKA, W.; MAURER, M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. **FASEB J.**, v. 20, n. 13, p. 2366-2368, 2006.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 835–870, 2003.

WINDLE, J. J.; SHIN, H. S.; MORROW, J. F. Induction of interleukin 1 messenger RNA and translation in oocytes. **J. Immunol.**, v. 3, p. 263-287, 1984.

WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J.**, v. 5, p. 2145–2154, 1991.

WOJCIECHOWSKI, W.; DESANCTIS, J.; SKAMENE, E.; RADZIOCH, D. Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* bcg involves class II transactivator and depends on the Nramp1 gene. **J. Immunol.**, v. 163, p. 2688- 2696, 1999.

WU, L.; FAN, J.; MATSUMOTO, S.; WATANABE, T. Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 269, n. 3, p. 808-815, 2000.

WYLLIE, P. S.; GOSS, J. A. The natural resistance-associated macrophage protein 1 Slc11a1 (formely Nramp1) and iron metabolism in macrophages. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 351-359, 2002. Review.

YU, H.; MOHAN, S.; MASINDE, G. L.; BAYLINK, D. J. Mapping the dominant wound healing and soft tissue regeneration QTL in MRL X CAST. **Mamm. Genome**, v. 16, p. 918- 924, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Genes diferencialmente expressos entre AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} controles

Análise da expressão gênica global. A-Número de genes diferencialmente expressos ($\geq 2X$) nos animais AIRmax^{SS} em comparação aos animais AIRmin^{SS}. B-Número de genes diferencialmente expressos ($\geq 2X$) nos animais AIRmin^{SS} em comparação aos animais AIRmax^{SS}. Nestes experimentos foram avaliados somente animais controles (n=4).

APÊNDICE B - Genes diferencialmente expressos entre AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} 24 horas após a perfuração da orelha

APÊNDICE C - Número de genes ativados nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles (≥ 2 X).

B

Análise de expressão gênica global. A-Número de genes ativados nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2 X$). B- Número de genes ativados nas orelhas dos animais AIRmin^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2 X$). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

APÊNDICE D - Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles (≥ 2 X).

Análise de expressão gênica global. A-Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). B-Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmin^{SS} 24 horas após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

APÊNDICE E - Genes diferencialmente expressos entre AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} 10 dias após a perfuração da orelha

Análise de expressão gênica global. A-Número de genes diferencialmente expressos ($\geq 2X$) nos animais AIRmax^{SS} em comparação aos animais AIRmin^{SS}. B- Número de genes diferencialmente expressos ($\geq 2X$) nos animais AIRmin^{SS} em comparação aos animais AIRmax^{SS}. Nestes experimentos foram avaliados somente animais submetidos ao protocolo de reparação tissular durante um período de 10 dias (n=4).

APÊNDICE F - Número de genes ativados nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles (≥ 2 X).

Análise de expressão gênica global. A-Número de genes ativados nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles (≥ 2 X). B- Número de genes ativados nas orelhas dos animais AIRmin^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles (≥ 2 X). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

APÊNDICE G - Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles (≥ 2 X).

Análise de expressão gênica global. A-Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). B- Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmin^{SS} 10 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

APÊNDICE H - Genes diferencialmente expressos entre AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} 30 dias após a perfuração da orelha

Análise de expressão gênica global. A-Número de genes diferencialmente expressos ($\geq 2X$) nos animais AIRmax^{SS} em comparação aos animais AIRmin^{SS}. B- Número de genes diferencialmente expressos ($\geq 2X$) nos animais AIRmin^{SS} em comparação aos animais AIRmax^{SS}. Nestes experimentos foram avaliados somente animais submetidos ao protocolo de regeneração tissular durante um período de 30 dias (n=4).

APÊNDICE I - Número de genes ativados nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} 30 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles (≥ 2 X).

Análise de expressão gênica global. A-Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax^{SS} 30 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). B-Número de genes reprimidos nas orelhas dos animais AIRmin^{SS} 30 dias após perfuração das orelhas em comparação aos animais controles ($\geq 2X$). Nestes experimentos foram utilizados 4 animais de cada sublinhagem.

APÊNDICE J - CANHAMERO, T.; REINES, B.; 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, 2014.

Distinct Early Inflammatory Events during Ear Tissue Regeneration in Mice Selected for High Inflammation Bearing *Slc11a1* *R* and *S* Alleles

Tatiane Canhamero,¹ Brandon Reines,² Luciana C. Peters,¹ Andrea Borrego,¹ Patricia S. Carneiro,¹ Layra L. Albuquerque,¹ Wafa H. Cabrera,¹ Orlando G. Ribeiro,¹ Jose R. Jensen,¹ Nancy Starobinas,¹ Olga M. Ibañez,¹ and Marcelo De Franco^{1,3,4}

Abstract—High inflammatory AIRmax mice homozygous for *Slc11a1* *R* and *S* alleles were produced. AIRmax^{SS} mice showed faster ear tissue regeneration than AIRmax^{RR} mice, suggesting that the *S* allele favored tissue restoration. Here, we investigated the gene expression profiles and the inflammatory reactions of AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} mice during the initial phase of ear tissue regeneration. We observed superior levels of analysis of wound myeloperoxidase and edema in AIRmax^{SS} mice, although similar cell influx was verified in both lines. Of the genes, 794 were up- and 674 down-regulated in AIRmax^{RR}, while 735 genes were found to be up- and 1616 down-regulated in AIRmax^{SS} mice 48 h after punch. Both mouse lines showed significant over-represented genes related to cell proliferation; however AIRmax^{SS} displayed up-regulation of inflammatory response genes. Quantitative PCR experiments showed higher expressions of *Tgfb1*, *Dap12* and *Trem1* genes in AIRmax^{SS} mice. These results indicate that *Slc11a1* gene modulated the early inflammatory events of ear tissue regeneration.

KEY WORDS: acute inflammation; ear regeneration; *Slc11a1* gene; mouse.

INTRODUCTION

Clark *et al.* [1] reported that MLR mice are able to completely close ear hole wounds without scarring; while in other laboratory strains of mice, this was not observed. This epimorphic regeneration exhibits scarless healing, blastema formation, and several tissues regrowth.

The mouse ear hole healing rate is genetically determined and several quantitative trait loci (QTL) mapping studies have been conducted to identify wound healing genes [2–5]. These studies were carried out in crosses between fast-healer MRL and poor-healer strains

such as C57BL/6, CAST/Ei, and SJL. Recently, another cross was used between DBA/1 and 129X1/SvJ, where DBA/1 served as a fast healer [6]. Several QTL with different modes of heritance were identified, indicating that wound healing is a complex process regulated by multiple genes [1, 4, 5]. Different phenotypes are inherent to this process, starting with inflammation, followed by fast wound healing, and/or remodeling [7]. While several reports have dealt with healing and remodeling mechanisms [8, 9], the influence of inflammatory genes in the ear hole closure model remains poorly investigated, although recent evidences of a relationship between inflammation and tissue regeneration were reviewed [10].

Mouse lines phenotype-selected for maximum (AIRmax) or minimum (AIRmin) acute inflammatory reactivity (AIR) were used to study the impact of the genetic control of nonspecific immunity on tissue regeneration [11], as well as in the susceptibility to autoimmune [12], neoplastic [13], and infectious diseases [14]. AIRmax and AIRmin mice were developed

¹ Laboratório de Imunogenética, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

² Ghost Lab, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, NIAID, NIH, Bethesda, MD, USA

³ Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP, Brazil 05503900

⁴ To whom correspondence should be addressed at Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP, Brazil 05503900. E-mail: mdfranco@butantan.gov.br

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 phenotypes chosen for selection were the local leukocyte influx and exudated plasma proteins 24 h after the subcutaneous injection of polyacrylamide beads (Biogel), a non-antigenic, insoluble, and chemically inert substance [15]. The progressive divergence of the AIRmax and AIRmin lines in leukocyte infiltration and exudated protein concentrations after the selection process reached 30- and 2.5-fold, respectively. These differences resulted from the accumulation of alleles endowed with opposite and additive effects on the inflammatory response. We can consider AIRmax and AIRmin as outbred stock mice developed from eight inbred lines for strong and weak acute inflammation phenotypes after extensive selective processes, while avoiding inbreeding. As such, homozygosity in acute inflammation modifier loci was reached in each line but maintaining a heterogeneous genetic background. Analysis of the selective processes indicated that the AIR phenotype involves at least 11 QTL [13].

The acute inflammation response to Biogel, as well as susceptibility to pristane induced-arthritis [16], to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection, and to the LPS of the bacteria were all modified in these mice; and linkage analysis with microsatellite markers suggested the presence of QTL in chromosomes 1, 6, and 11 which are relevant to these phenotypes [17].

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 [18].

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 (*Slc11a1* gene region) and 14 were found to regulate tissue regrowth in this model [11]. Additionally, the same chromosome 1 QTL seems to regulate leukocyte and protein influx during acute inflammation, as well as arthritis incidence and severity [16].

Slc11a1 homozygous AIR sublines were produced by genotyping heterogeneous AIRmax and AIRmin

mice with specific PCR primers for the *Slc11a1* SNP functional mutation at the 169 codon. Mice were mated in each line in order to obtain AIRmax and AIRmin mice presenting *Slc11a1* *R* and *S* alleles in homozygosity while maintaining their heterogeneous genetic background. The *Slc11a1* gene maps to 39.2 cM in chromosome 1. After the production of AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR}, and AIRmin^{SS} lines by genotype-assisted breeding, several polymorphic microsatellites near this gene were analyzed in order to determine the haplotype of this chromosome 1 region. The microsatellite allele segregation patterns of the different lines were independent of the fixation of the *Slc11a1* *R* or *S* alleles, but were similar to those found in the parental AIRmax and AIRmin mice. [16, 17].

The interaction of the *Slc11a1* *S* allele with high inflammatory background QTL in AIRmax mice modulated the Biogel-induced early acute inflammation, infection resistance [17] and pristane induced-arthritis [16]. Moreover, AIRmax^{SS} showed faster ear-wound closure than AIRmax^{RR} mice, suggesting that the *Slc11a1* *S* allele favored ear tissue regeneration [11]. In view of these results, our aim in this work was to search for distinct early inflammatory events between AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} mice during the initial inflammatory phase of tissue regeneration.

MATERIALS AND METHODS

Animals

AIRmax *Slc11a1*^{RR} (AIRmax^{RR}) and AIRmax *Slc11a1*^{SS} (AIRmax^{SS}) high inflammatory sublines were used. Each experiment was carried out with equivalent numbers of 2–3-month-old male and female mice that were maintained under standard conditions in our animal facilities. All procedures involving animals were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Butantan Institute.

Wound Healing Determinations and Cell Count

Two millimeter diameter ear-punch holes were made using a metal ear punch [19] in the lower cartilaginous part of each ear of the animals tested, and hole diameters were measured during 40 days. Groups of mice were sacrificed during the first 96 h after punch to analyze the myeloperoxidase levels, edema and cell influx. Neutrophils and monocytes were counted as described in [20]. Briefly, the ears were handled and

processed as culture explants of the dorsal and ventral leaflets, their dermal sides being spread on a buffered medium. Within this medium neutrophils, monocytes and other cells emigrate/sediment with different kinetics.

Analysis of Wound Myeloperoxidase

The measurement of analysis of wound myeloperoxidase (MPO) levels in tissue has been shown to reflect neutrophil content. The wound ear tissue was homogenized for 40 s with a Brinkmann Tissue Homogenizer (PolytronR) in 50 mM phosphate buffer containing 0.5% of hexadecyl-trimethylammonium bromide and 5 mM EDTA (pH 6.0). The homogenized samples were centrifuged at 25,000 g for 10 min. and myeloperoxidase activity was measured in the supernatants. Briefly, ears homogenates were incubated with H₂O₂ and ortho-dianisidine. After 5 min, the reaction was stopped by the addition of NaNO₃ (1%) and the absorbance determined at 450 nm [21].

Ear Edema Measurement

Edema was expressed as the increase in ear thickness due to the inflammatory challenge. Ear thickness was measured before and after ear punching with a micrometer (Starret 1010). The micrometer was applied near the tip of the ear just distal to the cartilaginous ridges and the thickness was recorded [22].

RNA Preparation

Total RNA was individually isolated from the ears using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). RNA pools were prepared (from AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} control or experimental groups) by mixing equal amounts of their RNAs. Identical aliquots of each pool were used for microarray analysis after treatment with DNaseI Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and purification with RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Individual samples were reverse-transcribed using the Superscript III kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and used to validate the microarray data by quantitative PCR (qPCR).

Microarray Expression Analysis

Whole genome expression analysis was performed on CodeLink mouse Bioarrays 36 K genes obtained from GE Healthcare (formerly Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) according to the manufacturer's protocols. Briefly, 1 µg of high-quality pooled RNA was reverse

transcribed using T7 oligo (dT) primer and double-stranded complementary DNA (cDNA), *in vitro* transcription and biotin labeling of cRNA were carried out using the CodeLink mouse Bioarray reagents. The samples of fragmented biotinylated cRNA (10 µg cRNA each) were prepared for hybridization to the bioarrays using the Expression Assay Reagent Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Slides were incubated for 18 h at 37°C while shaking at 300 rpm (Innova 4080, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). After hybridization, each slide was incubated in TNT buffer at 42°C for 60 min and then washed. The signal was developed using streptavidin-Cy5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) for 30 min at room temperature. Excess dye was removed by washing four times with TNT buffer and slides were then dried under centrifugation. The processed slides were scanned on an Axon GenePix Scanner (Axon, Molecular Devices, Union City, CA, USA) at 635 nm with the photomultiplier tube at 600 V, and using a scan resolution of 5 nm. CodeLink Expression Analysis Software (version 4.1, Amersham Bioscience) was used to analyze the images of each slide. Signal intensities of the spots were normalized and their quality was evaluated using data flagging from CodeLink Expression Analysis Software. Spots with intensities below that of the negative control (absence of an oligonucleotide probe) were excluded, as were those spots having irregular shapes or near-background intensities. Biological replicates of the four groups were done for statistical analysis [23].

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 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) thermocycler. Targets and house-keeping genes were amplified with primers described in Table 1. Relative differences were calculated according to the delta-delta Ct method [24]. Microarray data was correlated with qPCR results using the Pearson analysis.

Statistical Analysis

The gene expression observed in each array was log-transformed to approximate 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 software (Two class unpaired,

Table 1. Sequence of the Oligonucleotide Primers Used in Real-time Quantitative PCR

Primers	Forward	Reverse
<i>β2-microglobulin</i>	5'-TGACCGCTTGATGCTATC-3'	5'-CAGTGTGAGCCAGGATATAG-3'
<i>Tnf</i>	5'-TCTCATCAGTTCTATGGCC-3'	5'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'
<i>Il6</i>	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGA-3'	5'-TGTACTCCAGGTAGCTATGG-3'
<i>Il1b</i>	5'-TTGACGGACCCCAAAAGATG-3'	5'-AGAAGGTGCTCATGCTCTCA-3'
<i>Tgfb1</i>	5'-ACCGCAACAACGCCATCTAT-3'	5'-GTAACGCCAGGAATTGTTGC-3'
<i>Il8rb</i>	5'-GACTGTTACCTAAACGGTG-3'	5'-CATACCAAGATGGAAGGGAGC-3'
<i>Dap12</i>	5'-CAGGATGGAAGAGCACACA-3'	5'-GGGAAGTTCACCTGAAACA-3'
<i>Trem1</i>	5'-CAGGATGGAAGAGCACACA-3'	5'-GGGAAGTTCACCTGAAACA-3'
<i>Trem2</i>	5'-AGAGTGTGGTGACGGGTCC-3'	5'-TATGACGCCTGAAGCACTG-3'

FDR $\leq 5\%$) that analyzed both biological replicate data [25]. We analyzed all of the significant differentially-expressed genes for the over-represented biological themes using Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) software [26]. 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. In this way, EASE rapidly converts a list of genes in an ordered table of robust biological themes. Calculating statistics on thousands of gene categories, however, can lead to a few seemingly significant probabilities due simply to chance. To address this multiple comparison issue, we used the Bonferroni-type probability correction.

RESULTS

Ear Hole Diameter, MPO, Edema, and Cell Influx Analysis

A distinct tissue regeneration capacity was observed between AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} mice (Fig. 1a). At 21 days after punch, significant differences were verified which became higher until day 40, when there was a complete ear hole closure in AIRmax^{SS} mice only. An increase in MPO levels in the ears, starting at 6 h after punch was observed in both mouse lines with peak values in 48 h where AIRmax^{SS} presented higher levels, which decreased to normal levels in 96 h (Fig. 1b). Edema, evaluated by ear thickness increase was also similar in both lines, except for day 3 after punch (Fig. 1c). This reaction was followed by the influx of neutrophils and of monocytes

Fig. 1. Ear hole closure, myeloperoxidase production and ear edema assay in AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} mice. Groups of mice ($n=8$) were sacrificed during the first 96 h after punch to analyze the myeloperoxidase levels, edema, and ear hole closure.

Distinct Early Inflammatory Events during Ear Tissue Regeneration

Fig. 2. Cell influx in punched ears of AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} mice. Groups of mice ($n=4$) were sacrificed during the first 72 h after punch to analyze cell influx. Total cells (a), neutrophils (b), and monocytes (c) were counted.

to the injury site with subtle differences in kinetics of cell influx observed between both lines (Fig. 2).

Overview of Differentially Expressed Genes in AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} Mice

Significance of analysis of microarray (FDR<0.5) analysis using twofold change minimal differences revealed distinct gene expression profiles of ear tissues

from AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} mice. Forty-eight hours after ear punch, 794 and 735 genes were up-regulated in AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} mice, respectively, while 1,616 genes were down-modulated in AIRmax^{SS} and 674 in AIRmax^{RR} as compared to control mice (Fig. 3).

Over-Represented Gene Ontology Categories in Differentially Expressed Genes Between the Lines

Over-represented biological process categories associated with differentially-expressed genes were identified using EASE analysis (Table 2). Cell proliferation, DNA replication, cytokinesis and DNA metabolism were the most significant functional categories among up-regulated AIRmax^{RR} genes, while morphogenesis and enzyme linked receptor protein signaling pathway genes were down-modulated in this line. Interestingly, there are many genes related to inflammatory reactions among them, such as *Il1b*, *Cxcl1*, *Cxcr4*, and *Tgfb1*. Inflammatory response and cell proliferation biological process categories were predominant in up-regulated genes in the AIRmax^{SS} line; while muscle development and contraction and morphogenesis were the most over-represented categories among down-modulated genes (Table 2).

RNA Expression

Figure 4 shows the significant higher pro-inflammatory *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, and *Il8rb* gene expressions in AIRmax^{RR} than AIRmax^{SS} mice 24 h after punch. In contrast, *Tgfb1*, *Dap12*, and *Trem1* genes were expressed

Fig. 3. Numbers of differentially-expressed genes in AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} mice. Significance of Analysis of Microarray method (FDR<5%) revealed distinct gene expression profile of ear tissue from control and experimental (48 h after punch) groups.

Table 2. Over-represented Gene Ontology Categories of Up- and Down-regulated Genes in AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} Mice 48hrs After Hole Punch

Groups	Biogel/control ratio	Gene Category GO Biological Process	Gene number	EASE score	Gene symbol
AIRmaxRR up-regulated	>2	Cell proliferation	81	6.97e-013	<i>Cdc20</i> , <i>Axl</i> , <i>Gab1</i> , <i>Ccnb1</i> , <i>Prim1</i> , <i>Gmmi</i> , <i>Prim2</i> , <i>Fosl1</i> , <i>Ppp1cb</i> , <i>Fosl1</i> , <i>Nop2</i> , <i>Cdc5l</i> , <i>Nuf2</i> , <i>Ptgi1</i> , <i>Pole</i> , <i>Fgf5</i> , <i>Dut</i> , <i>Rfc3</i> , <i>Fanca</i> , <i>Fscn1</i> , <i>Ebnalbp2</i> , <i>Ncapf</i> , <i>Il1b</i> , <i>Il11</i> , <i>Aurka</i> , <i>Stat1</i> , <i>Skap2</i> , <i>Sppl1</i> , <i>Orc2l</i> , <i>Orc1l</i> , <i>Ube2c</i> , <i>Cks2</i> , <i>Sln2</i> , <i>Uhrf1</i> , <i>Bap1</i> , <i>Tspan3</i> , <i>Fzr1</i> , <i>Rbm14</i> , <i>Hdac7</i> , <i>Mad2l1</i> , <i>Rrm2</i> , <i>Chaf1a</i> , <i>Dbl4</i> , <i>Vegfa</i> , <i>Cxcr4</i> , <i>Uba1</i> , <i>Rfc2</i> , <i>Cdk6</i> , <i>Cdk4</i> , <i>Cdc25b</i> , <i>Cenph</i> , <i>Trex1</i> , <i>Rela</i> , <i>Anapc1</i> , <i>Mcm7</i> , <i>Mcm6</i> , <i>Mcm5</i> , <i>Mcm4</i> , <i>Mcm3</i> , <i>Gif2h1</i> , <i>Gsp1l</i> , <i>Cxcl1</i> , <i>Conf</i> , <i>Cenel</i> , <i>Cend3</i> , <i>Ccn2</i> , <i>Ccn2</i> , <i>Chaf1b</i> , <i>Mapk6</i> , <i>Cnnb1</i> , <i>Mthp</i> , <i>Tgfb1</i> , <i>Lyn</i> , <i>Pard6g</i> , <i>Rfc5</i> , <i>Tjdp1</i> , <i>Tert</i> , <i>Rad54l</i> , <i>Rad21</i> , <i>Rac2</i> , <i>Cdk8</i> , <i>Dusp1</i> .
		DNA replication and chromosome cycle	29	7.76e-013	<i>Prim2</i> , <i>Prim1</i> , <i>Nuf2</i> , <i>Ptgi1</i> , <i>Pole</i> , <i>Dut</i> , <i>Rfc3</i> , <i>Ebnalbp2</i> , <i>Ncapf</i> , <i>Orc2l</i> , <i>Orc1l</i> , <i>Rbm14</i> , <i>Mad2l1</i> , <i>Rrm2</i> , <i>Chaf1a</i> , <i>Uba1</i> , <i>Rfc2</i> , <i>Cenph</i> , <i>Trex1</i> , <i>Mcm7</i> , <i>Mcm6</i> , <i>Mcm5</i> , <i>Mcm4</i> , <i>Mcm3</i> , <i>Ccnel</i> , <i>Chaf1b</i> , <i>Rfc5</i> , <i>Tert</i> , <i>Rad21</i> .
		Cytokinesis	18	3.68e-007	<i>Cdc20</i> , <i>Ccnb1</i> , <i>Ppp1cb</i> , <i>Cdc5l</i> , <i>Ube2c</i> , <i>Cks2</i> , <i>Fzr1</i> , <i>Cdk6</i> , <i>Cdk4</i> , <i>Cdc25b</i> , <i>Anapc1</i> , <i>Mcm5</i> , <i>Conf</i> , <i>Cenel</i> , <i>Cend3</i> , <i>Ccn2</i> , <i>Ccn2</i> , <i>Pard6g</i> .
AIRmaxRR down-regulated	<0.5	Morphogenesis	49	1.74e-005	<i>Ptgi1</i> , <i>Klf6</i> , <i>Rapgef1</i> , <i>Fgf18</i> , <i>Fbn1</i> , <i>Ank</i> , <i>Jarid2</i> , <i>Ext1</i> , <i>Cadml1</i> , <i>Trim44</i> , <i>Myl10</i> , <i>Pdgfra</i> , <i>Pafah1b1</i> , <i>Igf2</i> , <i>Igf1</i> , <i>Ephb3</i> , <i>Fhnb</i> , <i>Slt1</i> , <i>Slt2</i> , <i>Ski</i> , <i>Nfib</i> , <i>Sema5a</i> , <i>Serpupf1</i> , <i>Myoc</i> , <i>Mylpf</i> , <i>Axnl</i> , <i>Hoxd8</i> , <i>Cux1</i> , <i>Mx1</i> , <i>Msm</i> , <i>Creb1</i> , <i>Vegfc</i> , <i>Mais2</i> , <i>Utrn</i> , <i>Dpysl3</i> , <i>Myl9</i> , <i>Cd44</i> , <i>Fam174a</i> , <i>Asb1</i> , <i>Reln</i> , <i>Mef2a</i> , <i>Pp1a6</i> , <i>Tnni2</i> , <i>Tnni1</i> , <i>Lum</i> , <i>Gnaq</i> , <i>Sirt1</i> , <i>Ankrd17</i> , <i>Phl1r</i> .
		Enzyme linked receptor protein signaling pathway	16	1.32e-004	<i>Ptgi1</i> , <i>Rapgef1</i> , <i>Pdpk1</i> , <i>Pdgfra</i> , <i>Igf1</i> , <i>Ej4ebp2</i> , <i>Pdgfr1</i> , <i>Symb2</i> , <i>Frs2</i> , <i>Aig1</i> , <i>Nck2</i> , <i>Msm</i> , <i>Grb2</i> , <i>Piprm</i> , <i>Piprk</i> .
		Inflammatory response	17	2.01e-006	<i>Fcer1g</i> , <i>Igf2</i> , <i>Il1b</i> , <i>Mefv</i> , <i>Pf4</i> , <i>Sppl1</i> , <i>Cxcl2</i> , <i>Ccl20</i> , <i>Ccl2</i> , <i>S100a9</i> , <i>Dock2</i> , <i>Cxcl1</i> , <i>Cd14</i> , <i>Tnfisf1a</i> , <i>Tlr1</i> , <i>Rac2</i> , <i>Tlr2</i> .
AIRmaxSS up-regulated	>2	Cell proliferation	49	3.57e-005	<i>Cdc20</i> , <i>Axl</i> , <i>Gab1</i> , <i>Ccnb1</i> , <i>Prim2</i> , <i>Fosl1</i> , <i>Nop2</i> , <i>Nuf2</i> , <i>Fanca</i> , <i>Fscn1</i> , <i>Irf2</i> , <i>Ncapf</i> , <i>Mad2l1bp</i> , <i>Il1b</i> , <i>Il11</i> , <i>Il11</i> , <i>Elf5</i> , <i>Aurka</i> , <i>Aurkb</i> , <i>Sppl1</i> , <i>Orc1l</i> , <i>Oprml</i> , <i>Ube2c</i> , <i>Spa1a1</i> , <i>Cgref1</i> , <i>Uhrf1</i> , <i>Tspan3</i> , <i>Slit2d2a</i> , <i>Rrm2</i> , <i>Part3b</i> , <i>Dock2</i> , <i>Cdc25a</i> , <i>Trex1</i> , <i>Mcm6</i> , <i>Mcm5</i> , <i>Mcm3</i> , <i>Gif2h1</i> , <i>Cxcl1</i> , <i>Cen1</i> , <i>Cenel</i> , <i>Cend3</i> , <i>Ccn2</i> , <i>Sesn2</i> , <i>Chaf1b</i> , <i>Mapk6</i> , <i>Il31ra</i> , <i>Tjdp1</i> , <i>Rac2</i> , <i>Snc6</i> .
		Muscle development	22	1.50e-007	<i>Large</i> , <i>Tcf12</i> , <i>Gphn</i> , <i>Tcap</i> , <i>Acta1</i> , <i>Des</i> , <i>Mylpf</i> , <i>Myl3</i> , <i>Myh11</i> , <i>Mstn</i> , <i>Vamp5</i> , <i>Hdac5</i> , <i>Myl9</i> , <i>Pdlim3</i> , <i>Reln</i> , <i>Mef2a</i> , <i>Tnni3</i> , <i>Tnni3</i> , <i>Tnni2</i> , <i>Tnni1</i> , <i>Tnn2</i> , <i>Pvalb</i> .
		Muscle contraction	18	2.55e-006	<i>Cnn3</i> , <i>Tcap</i> , <i>Actn3</i> , <i>Acta1</i> , <i>Snn1l</i> , <i>Neb</i> , <i>Myh11</i> , <i>Nnu</i> , <i>Cbm</i> , <i>Myl9</i> , <i>Tm</i> , <i>Mybp2</i> , <i>Tnni3</i> , <i>Tnni2</i> , <i>Tnni1</i> , <i>Tnfisf1a</i> , <i>Tnn2</i> , <i>Lum</i> , <i>Gli3</i> , <i>Ankrd17</i> , <i>Med30</i> , <i>Lthp3</i> , <i>Bmp6</i> , <i>Mapk14</i> , <i>Sigirr</i> , <i>Pvalb</i> , <i>Phl1r</i> , <i>Gatr2</i> .
AIRmaxSS down-regulated	<0.5	Morphogenesis	89	3.45e-006	<i>Lcelal</i> , <i>Mad2l12</i> , <i>Ptgi1</i> , <i>Large</i> , <i>Tcf12</i> , <i>Prkar2b</i> , <i>Ppp3cb</i> , <i>Gphn</i> , <i>Cdk5rap1</i> , <i>Adam23</i> , <i>Tcap</i> , <i>Polb</i> , <i>Phox2b</i> , <i>Fgf11</i> , <i>Fbn1</i> , <i>Ank</i> , <i>Jarid2</i> , <i>Acta1</i> , <i>Lcelal2</i> , <i>Pdgfra</i> , <i>Pbx1</i> , <i>Il18</i> , <i>Slitk6</i> , <i>Igf2</i> , <i>Igf1</i> , <i>Spmb1</i> , <i>Irf8</i> , <i>Dvl2</i> , <i>Mkks</i> , <i>Spac</i> , <i>Dnase2a</i> , <i>Slit3</i> , <i>Slit2</i> , <i>Npr3</i> , <i>Des</i> , <i>Nrn1</i> , <i>Nfib</i> , <i>Nfjac4</i> , <i>Sema3e</i> , <i>Myoc</i> , <i>Mylpf</i> , <i>Dab1</i> , <i>Tspan5</i> , <i>Gd3st1</i> , <i>Myl3</i> , <i>Myh11</i> , <i>Cux1</i> , <i>Taf4a</i> , <i>S100a1</i> , <i>Mxsl</i> , <i>Msm</i> , <i>Cym</i> , <i>Cryab4</i> , <i>Creb1</i> , <i>Thce</i> , <i>Vamp5</i> , <i>Mixl1</i> , <i>Wnt2b</i> , <i>Coll1a1</i> , <i>Epb41</i> , <i>Ppap2b</i> , <i>Vldlr</i> , <i>Hdac5</i> , <i>Bcl11b</i> , <i>Rpgrr</i> , <i>Myl9</i> , <i>Pdlim3</i> , <i>Cd44</i> , <i>Cd3g</i> , <i>Reln</i> , <i>Mef2a</i> , <i>Gss2</i> , <i>Tnni3</i> , <i>Tnni3</i> , <i>Tnni2</i> , <i>Tnni1</i> , <i>Tnfisf1a</i> , <i>Tnn2</i> , <i>Lum</i> , <i>Gli3</i> , <i>Ankrd17</i> , <i>Med30</i> , <i>Lthp3</i> , <i>Bmp6</i> , <i>Mapk14</i> , <i>Sigirr</i> , <i>Pvalb</i> , <i>Phl1r</i> , <i>Gatr2</i> .

Genes are listed from the most to the least differentially-expressed
Biological process categories over-represented from differentially expressed genes were identified by EASE analysis at $p < 0.05$ significance level (after Bonferroni correction)
GO gene ontology, EASE expression analysis systematic explorer

Distinct Early Inflammatory Events during Ear Tissue Regeneration

Fig. 4. Pro-inflammatory gene expression measured by qPCR from control and experimental AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} mice. Targets and housekeeping genes were amplified with primers described in Table 1. Relative differences were calculated according to the delta-delta Ct method.

in elevated amounts in AIRmax^{SS}, whereas AIRmax^{RR} produced high transcript levels of *Trem2* gene (Fig. 5). We correlated the transcriptome signal intensities with qPCR experiments for several genes involved in acute inflammatory reactions. These results indicate significant correlations between the two methods (Pearson $r=0.87$, $P<0.001$).

DISCUSSION

Tissue repair is a complex biological process that includes a series of innate and adaptive immune sequential events in order to restore the injured tissue [27]. Many mammals have limited ability to regenerate tissue, however the MRL mice display complete epimorphic regeneration, becoming the most studied mouse model [1, 28, 29]. Recently, other studies have shown that the regenerative capacity of a 2-mm ear hole developed experimentally in the ear of mice is not restricted to the MRL strain. De Franco *et al.* [11] have demonstrated ear tissue regeneration in AIRmax mice,

phenotypically selected for high acute inflammatory response, with the involvement of two QTL in chromosomes 1 and 14. In the other study, Reines *et al.* [19] reported that C57BL/6 increase their regenerative capacity when they reach middle age.

In the present work, we showed for the first time evidence of the *Slc11a1* gene modulation of early molecular inflammatory events in the ear tissue regeneration, comparing two high inflammatory selected lines bearing distinct *Slc11a1* alleles. The *Slc11a1* gene is pleiotropic and interferes with macrophage activation, oxidative, and nitrosamine bursts [30], TNF α and IL1b production [31], as well as with the expression of MHC class II molecules [32]. AIRmax^{SS} mice showed delayed inflammatory reaction in the ear punch region when compared with the animals AIRmax^{RR} for MPO levels (Fig. 1b) and ear thickness edema (Fig. 1c), although similar leukocyte numbers were observed during 72 h after punch (Fig. 2), indicating that *Slc11a1* S allele modulates the early inflammatory response events in the wounded microenvironment. In contrast, AIRmax^{RR} animals exhibited significantly higher levels of MPO

Fig. 5. Gene expression measured by qPCR from control and experimental AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} mice. Targets and housekeeping genes were amplified with primers described in Table 1. Relative differences were calculated according to the delta-delta Ct method.

and neutrophil influx than AIRmax^{SS} mice 24 h after punch (Figs. 1b and 2). This early intense inflammation observed in AIRmax^{RR} animals corroborates previous results in these lines verified for the Biogel inflammatory stimulus, which was the selective agent [11, 16, 17]. These results demonstrated the involvement of chromosome 1 loci in the inflammatory response induced by Biogel and also in the ear punch stimulus during the first hours after injury.

The first ear wound healing global gene expression study in mice was limited to investigate the inflammatory events in MLR and B6 mice, however, it suggested that fast wound repair in MLR mice was mediated by a metabolic shift to a low inflammatory response [33]. Few genes related to cell proliferation were different between both lines at 2–3 weeks after ear punch, indicating an important role of the early inflammatory events. In contrast, our gene expression profile results developed 48 h after injury showed differentially expressed genes over-represented in the inflammatory response biological theme only in AIRmax^{SS} fast

regeneration subline (Table 2). Moreover, these mice also presented significant cluster of repressed genes related to muscle contraction phenotype. *Atcn3*, *Acta1*, *Smt11*, *Myh11*, *Myl9*, and *Mybpc2* were associated to fibroblast differentiation into contractile myofibroblasts, which play an important role in injury resolution and cell matrix deposition, contributing to scar formation in the repair process rather than to a regenerative process [34, 35]. As these genes are down-regulated in AIRmax^{SS}, scar formation can be decreased in these mice. The results obtained in microarray experiments were validated by qPCR, as seen in Figs. 4 and 5 ($r=0.89$, $P<0.01$).

qPCR results 24 h after injury showed higher RNA expression of pro-inflammatory genes *Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Il8rb*, and *Trem1* in AIRmax^{RR} than AIRmax^{SS} mice. The expression of anti-inflammatory genes such as *Tgfb1* and *Trem2* was also evaluated (Fig. 5). The high expression of *Tgfb1* found in AIRmax^{SS} animals correlated with the results using transgenic mice for this gene, in which high *Tgfb1* expression favored

keratinocyte migration and tissue restoration [36]. On the other hand, AIRmax^{RR} showed high *Trem2* expression 48 h after punch, which could be related to a delayed decrease of inflammation, as seen for *Il6* expression, as well as also observed in other studies [37, 38]. IL10 has been described to decrease the inflammatory response to injury, creating an environment conducive for regenerative adult wound healing [39], however, we have not observed differences in *Il10* gene expression between AIRmax sublines (data not shown).

The involvement of inflammatory cells in the wound healing has been widely investigated, and there is evidence for both positive and negative controls. Several reports described the deleterious influence of inflammatory events to a successful regeneration, showing that the quality of regeneration is correlated with the degree of early inflammatory response [33, 40]. However, our previous data [11] and the present results suggested the beneficial role of high inflammation to achieve regeneration. Inflammatory responses mediated by neutrophil and macrophages correlate with increased matrix metalloproteinase activity, blastema formation, and regeneration in the MRL mouse ear-hole model [41]. Nevertheless, some researchers believe that vigorous inflammation can delay wound closure. Many studies have suggested that neutrophils inhibit wound repair processes. Neutrophil-depleted mice showed epidermal healing that was significantly faster than that observed in control mice [42, 43]. AIRmax animals demonstrated faster healing than the AIRmin mice, which presents a low neutrophil influx to Biogel injection, corroborating recent results [10]. However, when the *Slc11a1*^{SS} gene is in homozygosis in high inflammatory genetic background AIRmax mice, neutrophil infiltration was mildly decreased [17] and wound healing was faster than that observed in AIRmax *Slc11a1*^{RR} mice [11]. It has been suggested that high concentrations of neutrophils and their products at wound sites could inhibit keratinocyte healing activity [43]. Therefore, the distinct neutrophils kinetics and *Tgfb1* gene high expression observed in AIRmax^{SS} mice could improve keratinocyte migration and proliferation during tissue repair, in contrast to the AIRmax^{RR} subline. Thus, the *Slc11a1* S allele effect in the inflamed ear tissue observed in AIRmax^{SS} mice could be facilitating epimorphic regeneration.

Taken together, the results of the present work provide an interesting evidence of cellular and molecular early inflammatory mechanisms involved in tissue restoration, which could also exert influence on other experimental diseases, such as infections [14, 17, 44],

arthritis [12, 16], envenoms [45, 46], and cancer susceptibility [47–49].

Further studies should be carried through to a deep understanding of the genetic and cellular mechanisms involved in the several phases of tissue regeneration, in which our lines of mice certainly will contribute to identify genes modulating the inflammatory phase of the epimorphic regeneration.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- Clark, L.D., R.K. Clark, and E. Heber-Katz. 1998. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. *Clinical Immunology and Immunopathology* 88: 35–45.
- Blankenhorn, E.P., S. Troutman, L.D. Clark, X.M. Zhang, P. Chen, and E. Heber-Katz. 2003. Sexually dimorphic genes regulate healing and regeneration in MRL mice. *Mammalian Genome* 14: 250–260.
- Heber-Katz, E., P. Chen, L. Clark, X.M. Zhang, S. Troutman, and E.P. Blankenhorn. 2004. Regeneration in MRL mice: further genetic loci controlling the ear hole closure trait using MRL and M.m. Castaneus mice. *Wound Repair and Regeneration* 12: 384–392.
- Masinde, G.L., X. Li, W. Gu, H. Davidson, S. Mohan, and D.J. Baylink. 2001. Identification of wound healing/regeneration quantitative trait loci (QTL) at multiple time points that explain seventy percent of variance in (MRL/MpJ and SJL/J) mice F2 population. *Genome Research* 11: 2027–2033.
- McBrearty, B.A., L.D. Clark, X.M. Zhang, E.P. Blankenhorn, and E. Heber-Katz. 1998. Genetic analysis of a mammalian wound-healing trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 11792–11797.
- Masinde, G.L., R. Li, B. Nguyen, H. Yu, A.K. Srivastava, B. Edderkaoui, J.E. Wergedal, D.J. Baylink, and S. Mohan. 2006. New quantitative trait loci that regulate wound healing in an intercross progeny from DBA/1J and 129 x 1/SvJ inbred strains of mice. *Functional & Integrative Genomics* 6: 157–163.
- Singer, A.J., and R.A. Clark. 1999. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine* 341: 738–746.
- Martin, P. 1997. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276: 75–81.
- Stocum, D.L. 2004. Tissue restoration through regenerative biology and medicine. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* 176: III–101. back.
- Heber-Katz, E., and D. Gourevitch. 2009. The relationship between inflammation and regeneration in the MRL mouse: potential relevance for putative human regenerative (scarless wound healing) capacities? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1172: 110–114.
- De Franco, M., P.S. Cameiro, L.C. Peters, F. Vórraro, A. Borrego, O.G. Ribeiro, N. Starobinas, W.K. Cabrera, and O.M. Ibanez.

2007. Slc11a1 (Nramp1) alleles interact with acute inflammation loci to modulate wound-healing traits in mice. *Mammalian Genome* 18: 263–269.
12. Vigar, N.D., W.H. Cabrera, L.M. Araujo, O.G. Ribeiro, T.R. Ogata, M. Siqueira, O.M. Ibanez, and M. De Franco. 2000. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. *European Journal of Immunology* 30: 431–437.
13. Biozzi, G., O.G. Ribeiro, A. Saran, M.L. Araujo, D.A. Maria, M. De Franco, W.K. Cabrera, O.A. Sant'Anna, S. Massa, V. Covelli, D. Mouton, T. Neveu, M. Siqueira, and O.M. Ibanez. 1998. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis* 19: 337–346.
14. Araujo, L.M., O.G. Ribeiro, M. Siqueira, M. De Franco, N. Starobinas, S. Massa, W.H. Cabrera, D. Mouton, M. Seman, and O.M. Ibanez. 1998. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. *European Journal of Immunology* 28: 2913–2920.
15. Ibanez, O.M., C. Stiffel, O.G. Ribeiro, W.K. Cabrera, S. Massa, M. De Franco, O.A. Sant'Anna, C. Decreusefond, D. Mouton, and M. Siqueira. 1992. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *European Journal of Immunology* 22: 2555–2563.
16. Peters, L.C., J.R. Jensen, A. Borrego, W.H. Cabrera, N. Baker, N. Starobinas, O.G. Ribeiro, O.M. Ibanez, and M. De Franco. 2007. Slc11a1 (formerly NRAMP1) gene modulates both acute inflammatory reactions and pristane-induced arthritis in mice. *Genes and Immunity* 8: 51–56.
17. Borrego, A., L.C. Peters, J.R. Jensen, O.G. Ribeiro, W.H. Koury Cabrera, N. Starobinas, M. Seman, O.M. Ibanez, and M. De Franco. 2006. Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate Slc11a1 gene (formerly Nramp1) effects in selected mouse lines. *Microbes and Infection* 8: 2766–2771.
18. Ribeiro, O.G., D.A. Maria, S. Adriouch, S. Pechberty, W.H. Cabrera, J. Morisset, O.M. Ibanez, and M. Seman. 2003. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. *Journal of Leukocyte Biology* 74: 497–506.
19. Reines, B., L.I. Cheng, and P. Matzinger. 2009. Unexpected regeneration in middle-aged mice. *Rejuvenation Research* 12: 45–52.
20. Belkaid, Y., H. Jouin, and G. Milon. 1996. A method to recover, enumerate and identify lymphomyeloid cells present in an inflammatory dermal site: a study in laboratory mice. *Journal of Immunological Methods* 199: 5–25.
21. Cavriani, G., R.M. Oliveira-Filho, A.G. Trezena, Z.L. da Silva, H. V. Domingos, M.J. de Arruda, S. Jancar, and L.W. Tavares de. 2004. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. *European Journal of Pharmacology* 494: 241–249.
22. Otuki, M.F., F. Vieira-Lima, A. Malheiros, R.A. Yunes, and J.B. Calixto. 2005. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology* 507: 253–259.
23. Carneiro, P.D., L.C. Peters, F. Vorraro, A. Borrego, O.G. Ribeiro, N. Starobinas, J.R. Jensen, W.H.K. Cabrera, O.M. Ibanez, and M. De Franco. 2009. Gene expression profiles of bone marrow cells from mice phenotype-selected for maximal or minimal acute inflammations: searching for genes in acute inflammation modifier loci. *Immunology* 128: e562–e571.
24. Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
25. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 5116–5121.
26. Hosack, D.A., G. Dennis Jr., B.T. Sherman, H.C. Lane, and R.A. Lempicki. 2003. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biology* 4: R70.
27. Tsirogianni, A.K., N.M. Moutsopoulos, and H.M. Moutsopoulos. 2006. Wound healing: immunological aspects. *Injury* 37(Suppl 1): S5–S12.
28. Heber-Katz, E., J. Leferovich, K. Bedelbaeva, D. Gourevitch, and L. Clark. 2004. The scarless heart and the MRL mouse. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359: 785–793.
29. Heber-Katz, E., J. Leferovich, K. Bedelbaeva, D. Gourevitch, and L. Clark. 2006. Conjecture: can continuous regeneration lead to immortality? Studies in the MRL mouse. *Rejuvenation Research* 9: 3–9.
30. Barton, C.H., S.H. Whitehead, and J.M. Blackwell. 1995. Nramp transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. *Molecular Medicine* 1: 267–279.
31. Kita, E., M. Emoto, D. Oku, F. Nishikawa, A. Hamuro, N. Kamikaidou, and S. Kashiba. 1992. Contribution of interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of Ityr mice. *Journal of Leukocyte Biology* 51: 244–250.
32. Wojciechowski, W., J. DeSanctis, E. Skamene, and D. Radzioch. 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. *Journal of Immunology* 163: 2688–2696.
33. Li, X., S. Mohan, W. Gu, and D.J. Baylink. 2001. Analysis of gene expression in the wound repair/regeneration process. *Mammalian Genome* 12: 52–59.
34. Nowak, D., A. Popow-Wozniak, L. Raznikiewicz, and M. Malicka-Blaszkiewicz. 2009. Actin in the wound healing process. *Postępy Biochemii* 55: 138–144.
35. Monaco, J.L., and W.T. Lawrence. 2003. Acute wound healing an overview. *Clinics in Plastic Surgery* 30: 1–12.
36. Tredget, E.B., J. Demare, G. Chandran, E.E. Tredget, L. Yang, and A. Ghahary. 2005. Transforming growth factor-beta and its effect on reepithelialization of partial-thickness ear wounds in transgenic mice. *Wound Repair and Regeneration* 13: 61–67.
37. Klesney-Tait, J., I.R. Turnbull, and M. Colonna. 2006. The TREM receptor family and signal integration. *Nature Immunology* 7: 1266–1273.
38. Werner, S., and R. Grose. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews* 83: 835–870.
39. Peranteau, W.H., L. Zhang, N. Muvarak, A.T. Badillo, A. Radu, P.W. Zoltick, and K.W. Liechty. 2008. IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. *The Journal of Investigative Dermatology* 128: 1852–1860.
40. Abbott, R.E., C.J. Corral, D.M. MacIvor, X. Lin, T.J. Ley, and T.A. Mustoe. 1998. Augmented inflammatory responses and altered wound healing in cathepsin G-deficient mice. *Archives of Surgery* 133: 1002–1006.
41. Gourevitch, D., L. Clark, P. Chen, A. Seitz, S.J. Samulewicz, and E. Heber-Katz. 2003. Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model. *Developmental Dynamics* 226: 377–387.
42. Dovi, J.V., A.M. Szpadarska, and L.A. DiPietro. 2004. Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thromb Haemostasis* 92: 275–280.

Distinct Early Inflammatory Events during Ear Tissue Regeneration

43. Dovi, J.V., L.K. He, and L.A. DiPietro. 2003. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *Journal of Leukocyte Biology* 73: 448–455.
44. Trombone, A.P., S.B. Ferreira, Jr., F.M. Raimundo, K.C. de Moura, M.J. vila-Campos, J.S. Silva, A.P. Campanelli, M. De Franco, and G.P. Garlet. 2009. Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. *Journal of Periodontal Research* 44: 443–451.
45. Cameiro, A.S., O.G. Ribeiro, M. De Franco, W.H. Cabrera, F. Vorraro, M. Siqueira, O.M. Ibanez, and N. Starobinas. 2002. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon* 40: 1571–1579.
46. Carneiro, A.S., O.G. Ribeiro, W.H. Cabrera, F. Vorraro, M. De Franco, O.M. Ibanez, and N. Starobinas. 2008. *Bothrops jararaca* venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. *Toxicon* 52: 619–627.
47. Di Pace, R.F., S. Massa, O.G. Ribeiro, W.H. Cabrera, M. De Franco, N. Starobinas, M. Seman, and O.C. Ibanez. 2006. Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory responsiveness. *Carcinogenesis* 27: 1517–1525.
48. Maria, D.A., G. Manenti, F. Galbiati, O.G. Ribeiro, W.H. Cabrera, R.G. Barrera, A. Pettinicchio, M. De Franco, N. Starobinas, M. Siqueira, T.A. Dragani, and O.M. Ibanez. 2003. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. *Oncogene* 22: 426–432.
49. de Souza, V., W.K. Cabrera, A. Galvan, O.G. Ribeiro, M. De Franco, F. Vorraro, N. Starobinas, S. Massa, T.A. Dragani, and O.M. Ibanez. 2009. Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. *International Journal of Cancer* 124: 1478–1482.

APÊNDICE K - DE FRANCO, M.; PETERS, L. C.; CORREA, M. A.; GALVAN A, CANHAMERO, T.; BORREGO, A.; JENSEN, J. R.; GONÇALVES, J.; CABRERA, W. H.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO, O. G.; DRAGANI, T. A.; 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, n. 3, p. e88302, 2014.

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 *hemoxygenase (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 (*Slc11a1* 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 agalactosylIgG 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, *Slc11a1* 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 associate macrophage protein 1 (Nramp1)* gene) [22], and is expressed in macrophages and neutrophils [23]. *Slc11a1* 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 *Slc11a1* 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 *Slc11a1* 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 *Slc11a1* alleles in the AIR lines was due to selection of

inflammation QTL and not a chance event, *Slc11a1* 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 *Slc11a1* 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 *Prna1* 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 *Slc11a1* 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 RNAspin 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 Sao 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 Systematic 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 ($LOD_{score} > 4$) 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	Foward	Reverse
<i>Il6</i>	0,91	p = 0,001	5'-GTTCTCTGGGAATCGTGGA-3'	5'-TGTAATCCAGGTAGCTATGG-3'
<i>Il12a</i>	0,89	p = 0,001	5'-GATCATGAAGACATCACACGG-3'	5'-AGAATGATCTGCTGATGGTGG-3'
<i>Il10</i>	0,84	p = 0,01	5'-TCAACAAAGGACAGCTGGACAACATACTG-3'	5'-CTGTCTAGGTCCTGGAGTCCAGCAGACTCAA-3'
<i>Il1b</i>	0,81	p = 0,01	5'-CAGTTCTGCCATTGACCATC-3'	5'-TCTCACTGAAACTCAGCCGT-3'
<i>Tnfa</i>	0,82	p = 0,01	5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3'	5'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'
<i>Csf2</i>	0,80	p = 0,01	5'-TGAACCTCCTGGATGACATG-3'	5'-GTGTTTCACAGTCCGTTTCC-3'
<i>Cxcl1</i>	0,89	p = 0,001	5'-TGAAGCTCCCTTGGTTCAGA-3'	5'-AGGTGCCATCAGAGCAGTCT-3'
<i>Msr1</i>	0,91	p = 0,001	5'-GGGAGTGTAGGCGGATCAACCCC-3'	5'-CGGCCCTCATGGGCTCCACTA-3'
<i>Hmox1</i>	0,87	p = 0,001	5'-ACCAGAGTCCCTCAGATGGCG-3'	5'-GCAGGGGAGTATCTTGCACCA-3'
<i>β2microglobulin</i>	0,97	p = 0,001	5'TGACCGGCTTGATGCTATC-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 *Slc11a1* 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 (*Hmox1*) 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 *Slc11a1* 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 (*Prtia* 2 and *Prtia*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 *Prtia* 1 (by our group) on chromosome 3 using animals selected for high and low antibody production [31]. We also described the involvement of *Slc11a1* 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 H2kd [1]. *H2Ea* gene expression was low in AIRmax mice (Figure 3), in agreement with a report describing a correlation of the H2^b 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 leucocyte 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 *Hmx1* in macrophages *in vivo* and the release of nonmetabolized heme cause tissue inflammation [54]. Additionally, expression of the *Slc11a1* gene has been associated with a twofold increase in *Hmx1* transcriptional levels in macrophages undergoing erythrophagocytosis [55]. Although *Hmx1* seems to alter macrophage activity, no involvement with arthritis is described in the literature. In the present work, AIRmax^{SS} mice homozygous for the *Slc11a1* S allele showed higher *Hmx1* and *Msr1* gene expression than AIRmax^{RR} mice, suggesting that *Slc11a1* 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, *Slc11a1* 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>Bcl3</i>	7	2.03	Apoptosis
<i>Msr1</i>	8	5.02	Scavenger
<i>Hmox1</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 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

- Vigar 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, Saran 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, Starobinas 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.
- Ibanez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, et al. (1992) Genetics of nonspecific 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, Adriouch S, Pechberty 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, Carneiro 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, Strochla 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.
- Potter 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, Ghorashian 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, Hissimoto 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, Vekemans 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.
- Fritsche G, Glaska M, Barton H, Theurl 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, Menanteau P, Lantier F (2001) Effect of the mouse *Nramp1* genotype on the expression of IFN-gamma 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-Guerin 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 VL, Fung AM, Libby SJ, Kujat Choy SL, et al. (2004) The *Salmonella enterica* serovar typhimurium divalent cation transport systems *MntH* and *SitABCD* are essential for virulence in an *Nramp1*G169 murine typhoid model. *Infect Immun* 72: 5522–5525.
29. Vorraro F, Galvan A, Cabrera WH, Carneiro PS, Ribeiro OG, et al. (2010) Genetic control of IL-1 beta production and inflammatory response by the mouse *Irrn1* locus. *J Immunol* 185: 1616–1621.
30. Galvan A, Vorraro F, Cabrera W, Ribeiro OG, Starobinas 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: 1377–1383.
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. Glant TT, Adarichev VA, Nesterovitch 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 inflammations: 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* 18: 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. Maria DA, Manenti G, Galbiati F, Ribeiro OG, Cabrera WH, et al. (2003) Pulmonary adenoma susceptibility 1 (*Pas1*) 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, Bottcher 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 α LDL-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. Kovtunovych 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, Sheftel AD, Wasyluk B, Ponka P (2008) *Nramp1* equips macrophages for efficient iron recycling. *Exp Hematol* 36: 929–937.

APÊNDICE L - CANHAMERO, T.; GARCIA, L. V.; DE FRANCO, M. Acute Inflammation Loci Are Involved in Wound Healing in the Mouse Ear Punch Model. [Review] **Adv. Wound Care (New Rochelle)**, v. 3, n. 9, p. 582-591, 2014.

CRITICAL REVIEW

Acute Inflammation Loci Are Involved in Wound Healing in the Mouse Ear Punch Model

Tatiane Canhamero, Ludmila Valino Garcia, and Marcelo De Franco*

Laboratory of Immunogenetics, Butantan Institute, Secretary of Health, Government of the State of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Significance: Molecular biology techniques are being used to aid in determining the mechanisms responsible for tissue repair without scar formation. Wound healing is genetically determined, but there have been few studies that examine the genes responsible for tissue regeneration in mammals. Research using genetic mapping is extremely important for understanding the molecular mechanisms involved in the different phases of tissue regeneration. This process is complex, but an early inflammatory phase appears to influence lesion closure, and the present study demonstrates that acute inflammation loci influence tissue regeneration in mice in a positive manner.

Recent Advances: Mapping studies of quantitative trait loci (QTL) have been undertaken in recent years to examine candidate genes that participate in the regeneration phenotype. Our laboratory has identified inflammation modifier QTL for wound healing. Mouse lines selected for the maximum (AIRmax) or minimum (AIRmin) acute inflammatory reactivity (AIR) have been used to study not only the tissue repair but also the impact of the genetic control of inflammation on susceptibility to autoimmune, neoplastic, and infectious diseases. Murphy Roths Large and AIRmax mice are exclusive in their complete epimorphic regeneration, although middle-aged inbred mice may also be capable of healing.

Critical Issues: Inflammatory reactions have traditionally been described in the literature as negative factors in the process of skin injury closure. Inflammation is exacerbated due to the early release of mediators or the intense release of factors that cause cell proliferation after injury. The initial release of these factors as well as the clean-up of the lesion microenvironment are both crucial for following events. In addition, the activation and repression of some genes related to the regeneration phenotype may modulate lesion closure, demonstrating the significance of genetic studies to better understand the mechanisms involved in the initiation of wound repair processes.

Future Directions: The pleiotropic effects of the QTL are important in the identification of the genes responsible for tissue repair processes, especially when combined with global gene expression research. Microarray analysis complements the biological information obtained in QTL mapping, making this tool essential for gene identification. This approach will allow the investigation of future targets for therapeutic wound healing treatments.

Marcelo De Franco, PhD

Submitted for publication August 17, 2013.
Accepted in revised form November 18, 2013.

*Correspondence: Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil 1500, São Paulo, SP 05503900, Brazil (e-mail: marcelo.franco@butantan.gov.br).

SCOPE AND SIGNIFICANCE

TISSUE REPAIR is a complex biological process that involves a series of sequential events within the immune system after injury.¹ Skin in-

jury responses involve two distinct processes: healing and regeneration.^{2,3} Regeneration is rarely observed in mammals, but this process is largely determined by an intense

but short-duration inflammatory event after injury. Maximum acute inflammatory reactivity (AIRmax) mice genetically selected for acute inflammation demonstrated fast ear hole closing, with regeneration comparable to that observed in both Murphy Roths Large (MRL) and LG/J mice,^{4,5} which are inbred mice lines that demonstrate epimorphic regeneration.⁶ Epimorphic regeneration (epimorphosis) is a type of regeneration that involves dedifferentiation of adult structures to form undifferentiated masses of cells. These cells proliferate rapidly and accumulate under the epidermis, which has already expanded. These dedifferentiated cells and their epidermal covering are called regeneration buds or regeneration blastema. The dedifferentiated cells continue to proliferate and finally redifferentiate to form a rudiment tissue that eventually transforms into a specific organ, such as limb regeneration in amphibians or mouse ear punch healing. The regeneration capacity of these mice is due, in part, to quantitative genetic control.⁷ Genetic studies were performed using the AIRmax and minimum acute inflammatory reactivity (AIRmin) mice to determine the relationship of inflammatory loci to the regenerative wound healing phenotype, and showed that the variability of this phenotype is highly influenced by the interaction of acute inflammation quantitative trait loci (QTL) located on chromosomes 1 and 14,⁴ as well as on chromosomes 7, 8, 12, and 16 (unpublished data*)—which suggests the existence of shared genetic mechanisms in inflammation and regeneration processes.

TRANSLATIONAL RELEVANCE

Uncovering the genetic interactions of inflammation and tissue repair in animal models will allow the establishment of experimental human protocols to safely investigate therapeutic agents and processes that can facilitate damaged tissue regeneration. Many studies using mice and rabbits are currently being undertaken to identify candidate genes and biochemical pathways that could be future sources of new medicines and treatments.

CLINICAL RELEVANCE

Researchers in different parts of the world are currently committed to investigating the mecha-

nisms responsible for the complete renewal of damaged tissues. As tissue repair processes are known to be genetically controlled,⁸ one of the most important lines of treatment for skin diseases, and even accidents such as burns, will be gene therapy—but how these processes can be manipulated for therapeutic intervention is still an important issue to be examined in mammalian tissue repair models.

EXPERIMENTAL MODEL OR MATERIALS: ADVANTAGES AND LIMITATIONS

Mice that were genetically selected for AIRmax or AIRmin in our laboratory have been used to study the genetic control of nonspecific immunity in autoimmune disease susceptibility,⁹ neoplasia,¹⁰ and infectious diseases.¹¹ These two strains were obtained through bidirectional genetic selection, starting with a genetically heterogeneous founder population (F0) produced by intercrossing eight isogenic strains of mice of independent origins (A/J, DBA/2J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/cJ, and C57BL/6J; Fig. 1). The phenotypes chosen for selection were the local leukocyte influx and exudated plasma proteins 24 h after the subcutaneous injection of polyacrylamide beads (Biogel), a nonantigenic, insoluble, and chemically inert substance.¹² The progressive divergence of the AIRmax and AIRmin lines in leukocyte infiltration and exudated protein concentrations after the selection process reached 20- and 2.5-fold, respectively. These differences resulted from the accumulation of alleles endowed with opposite and additive effects on the inflammatory response. AIRmax and AIRmin mice were therefore developed from eight inbred lines for strong and weak acute inflammation phenotypes, are homozygotic for acute inflammation modifier loci, but have heterogeneous backgrounds as inbreeding intercrosses were avoided during the selective process. Genetic studies during the selective processes indicated that the acute inflammation phenotype involves at least 11 QTL.¹⁰ The inflammatory response to Biogel, as well as susceptibility to pristane-induced arthritis,¹³ *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection,¹¹ and bacterial lipopolysaccharides (LPSs)¹⁴ were all modified in these mice. Additionally, linkage analyses using microsatellite markers suggested that the presence of QTL in chromosomes 1, 6, and 11 was relevant to these phenotypes.¹⁴ 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

*Garcia L, Canhamero T, Ibanez, OM, and De Franco M: Genome-wide scan of wound healing loci in mice selected for high and low acute inflammation: search of quantitative trait loci regulating ear tissue repair in mice presenting strong or weak acute inflammation capacity. Butantan Institute, São Paulo, Brazil, 2013 (unpublished data).

Figure 1. Scheme used for the production of the foundation population (F0) by the intercrossing of eight inbred strains of mice, containing the *Slc11a1* alleles of each strain. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/wound

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.¹⁵ Inflammation resolution seems to have been affected by the acute inflammation selective process, as observed during lung carcinogenesis induction using urethane. Persistent subacute inflammatory reactions in the lung parenchyma, with granulocyte and lympho-mononuclear cell infiltration, were observed 21 days after urethane treatment in AIRmin mice, while these responses were reduced in AIRmax mice, indicating that they had higher inflammation resolutions.¹⁶ The AIRmax and AIRmin mice produced in our laboratory show the genetic heterogeneity necessary for studies of natural populations and can therefore be used as experimental models in studies that examine human wound healing.

DISCUSSION OF FINDINGS AND RELEVANT LITERATURE

The development of experimental approaches appropriate to investigating multifactorial genetic characters, such as acute inflammatory reactions,

has been the main objective of our research. These models consist of accumulations of allelic variations through bidirectional genetic selection that are determinant of phenotypic expression in extreme strains of mice. An important result has recently been obtained in the detection of several loci that control the intensity of acute inflammation through analyses of single-nucleotide polymorphisms (SNPs). Six inflammatory QTL involved in the tissue regeneration phenotype in AIRmax and AIRmin mice were found to be located on chromosomes 1, 7, 8, 12, 14, and 16. These loci harbor several candidate genes involved in tissue regeneration and in determining sensitivity to experimentally induced diseases. The *solute carrier 11a1* gene (*Slc11a1*) on chromosome 1 is the most likely candidate, and its participation in the early events of inflammatory ear tissue regeneration was observed.⁵ The *Slc11a1* gene has been shown to be highly pleiotropic as it acts on the transport of iron, zinc, and manganese ions in phagocytic cells, interfering with macrophage activation; oxidative and nitrosamine bursts¹⁷; TNF- α , IFN- γ , and IL-1 production¹⁸; and the expression of MHC class II molecules.¹⁹ A functional mutation on codon 169 of the *Slc11a1* gene that determines susceptibility to several infectious diseases resulted in the Susceptible (SS) and Resistant-wild-type (RR) alleles. The frequency of the *Slc11a1* SS allele was 25% in

the initial population (F0) of the AIR selection experiment but shifted to 60% in AIRmin and 9% in AIRmax after 30 generations of selective breeding. This frequency change appears to be the result of selection processes involving this gene (or other closely linked genes) in the control of the acute inflammatory reaction intensity.¹¹ The *Slc11a1* gene maps to 38.54 cM in chromosome 1. *Slc11a1* homozygous AIR sublines were produced by genotyping heterogeneous AIRmax and AIRmin mice with specific PCR primers for the *Slc11a1* SNP functional mutation at the 169 codon. Homozygous or heterozygous mice were mated in each line to obtain AIRmax and AIRmin mice presenting *Slc11a1* *R* and *S* alleles in homozygosity while maintaining their heterogeneous genetic background. After the production of AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR}, and AIRmin^{SS} lines by genotype-assisted breeding, several polymorphic microsatellites near this gene were analyzed to determine the haplotype of this chromosome 1 region. The microsatellite allele segregation patterns of the different lines were independent of the fixation of the *Slc11a1* *R* or *S* allele but were similar to those found in the parental AIRmax and AIRmin mice. The minimal intervals that encompass the *Slc11a1* gene region were ~4 cM in all lines, and *Il8rb* is located in the same region. However, no microsatellite polymorphisms between the lines could be observed for the *Il8rb*

gene.¹³ Acute inflammation to Biogel, and susceptibility to *S. Typhimurium* infection and LPS were modified in these lines, and inflammatory QTL were found in chromosomes 1, 6, 11, and 13.¹⁴ Studies with these lines demonstrated that AIRmax^{SS} mice had potent ear hole regeneration capacities comparable to the isogenic MRL strain. AIRmax^{RR} mice demonstrated mild regeneration, suggesting the involvement of the *Slc11a1* gene in the genetic control of the regeneration phenotype. AIRmin^{RR} and AIRmin^{SS} mice did not regenerate ear holes (Fig. 2).⁴ These results suggest that fine tuning of inflammatory intensity is decisive for complete regeneration. The first global gene expression study using this ear punch wound healing mouse model investigated the inflammatory gene pathways in MRL and B6 mice and suggested that fast wound repair in MRL mice was mediated by a metabolic shift to a low inflammatory response.²⁰ Few genes related to cell proliferation were different between both lines at 2–3 weeks after ear punch, indicating an important role of the early inflammatory events. In contrast, our global gene expression analyses showed the early activation of genes involved in inflammatory responses (48 h after injury) and the suppression of genes related to muscle contraction in AIRmax^{SS} mice and complete regeneration. Low *Actn3*, *Acta1*, *Smtnl1*, *Myh11*, *Myl9*, and *Mybpc2* gene expression was observed and was associated with fibroblast dif-

Figure 2. Ear hole closure. A 2-mm through-and-through ear hole was made and the same wound was followed for 30 days. From top to bottom, the hole closure was photographed on days 1 and 30. AIRmax^{SS} mice showed fast ear tissue regeneration while AIRmin^{SS} mice did not show regeneration after ear punch. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/wound

ferentiation into contractile myofibroblasts that play an important role in injury resolution and cell matrix deposition, contributing to scar formation in the repair process rather than to a regenerative process.^{21,22} As these genes are downregulated in AIRmax^{SS}, scar formation can be decreased in these mice. The involvement of inflammatory cells in wound healing has been widely investigated,^{23,24} and there is evidence for both positive and negative controls. Many studies have suggested that neutrophils inhibit wound repair processes. Neutrophil-depleted mice showed epidermal healing that was significantly faster than that observed in control mice.^{25,26} Inflammatory responses mediated by neutrophil and macrophages correlate with increased matrix metalloproteinase activity, blastema formation, and regeneration in the MRL mouse ear-hole model,²⁷ although vigorous inflammation can delay wound closure. The involvement of activated inflammatory genes at the beginning of this process contradicted some studies that have reported a negative influence of intense inflammatory events on regeneration, with prolonged inflammation inducing tissue fibrosis. However, AIRmax^{SS} mice seem to quickly resolve acute inflammation, favoring repair processes.⁴ AIRmax and AIRmin mice differed 20-fold in the number of infiltrated leukocytes and 2.5-fold in protein concentration in the 24-h subcutaneous inflammatory exudate. These differences in cell infiltrate reflect alterations in bone marrow granulopoiesis in response to hematopoietic factors, as well as to the ability of AIRmax exudate granulocytes to resist apoptosis. The high local production of chemotactic factors by infiltrated or local resident AIRmax cells also contributes to the phenotypic difference between the lines. AIRmax mice also display high susceptibility to arthritis induction,⁹ as do MRL and DBA/1 inbred mice,^{28,29} which are also good wound healers.^{6,30} As in arthritis, acute-phase proteins and chronic inflammatory events seem to be involved in wound healing.^{31,32} We have also demonstrated that fast-regenerative AIRmax^{SS} mice are extremely susceptible to pristane-induced arthritis, showing the high levels of cytokines involved in chronic inflammation.¹³ Further, the different abilities of AIRmax and AIRmin mice to induce an initial polymorphonuclear cell influx and to repair damaged tissue might both in part explain their different susceptibility to lung tumor development after urethane treatment. Histological analyses showed that AIRmin mice do not control lung inflammatory process and developed cancer.¹⁶ Lung of untreated AIRmax or AIRmin mouse showed a

specific gene expression profile associated with modulation of inflammatory response.³³ The genes involved with the leukocyte transendothelial migration, cell adhesion molecules, and tight junction pathways were observed in AIRmax lung and might be relevant to explain the control of the inflammatory response in these animals.³³ In addition to the importance of regulating inflammation during initial healing events, activation and repression of some genes related to the wound healing phenotype can modulate tissue repair. There are many candidate genes in the loci detected (as shown in Fig. 3) in the AIRmax higher regenerative line in regards to inflammation (Fig. 3A), signal transduction molecules (Fig. 3B), and on chromosome 1 (Fig. 3C). Differentially expressed genes between AIRmax and AIRmin in the detected loci were presented in Figure 4. Interestingly, a cluster of keratin genes was observed on chromosome 16 and genes related to inflammation, leukocyte migration, and cell adhesion were verified on the other loci. Additional genetic studies will need to be undertaken to narrow the confidence intervals of these loci to better gene candidates. These results provide an interesting evidence of cellular and molecular early inflammatory mechanisms involved in tissue restoration, which could also exert influence on other experimental diseases, such as infections,^{11,14,34} arthritis,^{9,13} envenoms,^{35,36} and cancer susceptibility.^{37,38} Further studies should be carried through to a deep understanding of the genetic and cellular mechanisms involved in the several phases of tissue regeneration, in which our lines of mice certainly will contribute to identify genes that modulate the inflammatory phase of the epimorphic regeneration.

INNOVATION

Several genetic mapping studies are currently being developed using inbred mice. A number of crosses were made between "regenerative" and "nonregenerative" strains to identify potential candidate genes that show phenotypic effects. Most genetic mapping studies have used MRL and LG/J regenerating lines crossed with resistant strains, such as C57BL/6, DBA1, SM, and CAST. Approximately 20 loci were detected, some of which were found in the same regions of AIRmax and AIRmin mice, suggesting common genetic elements among those models. The combined cross analysis,³⁹ fine mapping, and production of congenic animals⁴⁰ are interesting approaches to the accurate identification of the genes responsible for regeneration capacity phenotypes at these loci. While the use of

ferentiation into contractile myofibroblasts that play an important role in injury resolution and cell matrix deposition, contributing to scar formation in the repair process rather than to a regenerative process.^{21,22} As these genes are downregulated in AIRmax^{SS}, scar formation can be decreased in these mice. The involvement of inflammatory cells in wound healing has been widely investigated,^{23,24} and there is evidence for both positive and negative controls. Many studies have suggested that neutrophils inhibit wound repair processes. Neutrophil-depleted mice showed epidermal healing that was significantly faster than that observed in control mice.^{25,26} Inflammatory responses mediated by neutrophil and macrophages correlate with increased matrix metalloproteinase activity, blastema formation, and regeneration in the MRL mouse ear-hole model,²⁷ although vigorous inflammation can delay wound closure. The involvement of activated inflammatory genes at the beginning of this process contradicted some studies that have reported a negative influence of intense inflammatory events on regeneration, with prolonged inflammation inducing tissue fibrosis. However, AIRmax^{SS} mice seem to quickly resolve acute inflammation, favoring repair processes.⁴ AIRmax and AIRmin mice differed 20-fold in the number of infiltrated leukocytes and 2.5-fold in protein concentration in the 24-h subcutaneous inflammatory exudate. These differences in cell infiltrate reflect alterations in bone marrow granulopoiesis in response to hematopoietic factors, as well as to the ability of AIRmax exudate granulocytes to resist apoptosis. The high local production of chemotactic factors by infiltrated or local resident AIRmax cells also contributes to the phenotypic difference between the lines. AIRmax mice also display high susceptibility to arthritis induction,⁹ as do MRL and DBA/1 inbred mice,^{28,29} which are also good wound healers.^{6,30} As in arthritis, acute-phase proteins and chronic inflammatory events seem to be involved in wound healing.^{31,32} We have also demonstrated that fast-regenerative AIRmax^{SS} mice are extremely susceptible to pristane-induced arthritis, showing the high levels of cytokines involved in chronic inflammation.¹³ Further, the different abilities of AIRmax and AIRmin mice to induce an initial polymorphonuclear cell influx and to repair damaged tissue might both in part explain their different susceptibility to lung tumor development after urethane treatment. Histological analyses showed that AIRmin mice do not control lung inflammatory process and developed cancer.¹⁶ Lung of untreated AIRmax or AIRmin mouse showed a

specific gene expression profile associated with modulation of inflammatory response.³³ The genes involved with the leukocyte transendothelial migration, cell adhesion molecules, and tight junction pathways were observed in AIRmax lung and might be relevant to explain the control of the inflammatory response in these animals.³³ In addition to the importance of regulating inflammation during initial healing events, activation and repression of some genes related to the wound healing phenotype can modulate tissue repair. There are many candidate genes in the loci detected (as shown in Fig. 3) in the AIRmax higher regenerative line in regards to inflammation (Fig. 3A), signal transduction molecules (Fig. 3B), and on chromosome 1 (Fig. 3C). Differentially expressed genes between AIRmax and AIRmin in the detected loci were presented in Figure 4. Interestingly, a cluster of keratin genes was observed on chromosome 16 and genes related to inflammation, leukocyte migration, and cell adhesion were verified on the other loci. Additional genetic studies will need to be undertaken to narrow the confidence intervals of these loci to better gene candidates. These results provide an interesting evidence of cellular and molecular early inflammatory mechanisms involved in tissue restoration, which could also exert influence on other experimental diseases, such as infections,^{11,14,34} arthritis,^{9,13} envenoms,^{35,36} and cancer susceptibility.^{37,38} Further studies should be carried through to a deep understanding of the genetic and cellular mechanisms involved in the several phases of tissue regeneration, in which our lines of mice certainly will contribute to identify genes that modulate the inflammatory phase of the epimorphic regeneration.

INNOVATION

Several genetic mapping studies are currently being developed using inbred mice. A number of crosses were made between "regenerative" and "nonregenerative" strains to identify potential candidate genes that show phenotypic effects. Most genetic mapping studies have used MRL and LG/J regenerating lines crossed with resistant strains, such as C57BL/6, DBA1, SM, and CAST. Approximately 20 loci were detected, some of which were found in the same regions of AIRmax and AIRmin mice, suggesting common genetic elements among those models. The combined cross analysis,³⁹ fine mapping, and production of congenic animals⁴⁰ are interesting approaches to the accurate identification of the genes responsible for regeneration capacity phenotypes at these loci. While the use of

Figure 3. Up- and downmodulated genes in AIRmax mice in relation to inflammation (A), signal transduction molecules (B), and on chromosome 1 (C). Total mRNA was isolated from mouse ear tissues in order to compare with control mice on Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix—28 kb genes) to identify sets of gene differentially expressed. Significance of Analysis of Microarray analysis using two class unpaired, FDR $\leq 5\%$ ($p < 0.001$), revealed distinct gene expression profile between AIRmax control and AIRmax submitted to wound healing. Global gene expression analyses were performed 24 h after hole punch that examined the data from four biological replicates on each line, FDR, false discovery rate; mRNA, messenger RNA. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/wound

Figure 3. Up- and downmodulated genes in AIRmax mice in relation to inflammation (A), signal transduction molecules (B), and on chromosome 1 (C). Total mRNA was isolated from mouse ear tissues in order to compare with control mice on Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix—28 kb genes) to identify sets of gene differentially expressed. Significance of Analysis of Microarray analysis using two class unpaired, FDR $\leq 5\%$ ($p < 0.001$), revealed distinct gene expression profile between AIRmax control and AIRmax submitted to wound healing. Global gene expression analyses were performed 24 h after hole punch that examined the data from four biological replicates on each line, FDR, false discovery rate; mRNA, messenger RNA. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/wound

these strains is important, the homogeneity of inbred mice lines restrains the biological significance of the results. The use of lines that have been genetically selected for high and low inflammatory responses from outbred mouse stocks is an innovative approach to analyzing the mechanisms involved in regeneration phenotypes as these strains have heterogeneous backgrounds representing extreme phenotypes similar to those found in natural populations. This study allowed us to demonstrate that when inflammation is genetically regulated during its early stages it has a fundamental role in the healing outcome.

CAUTION, CRITICAL REMARKS, AND RECOMMENDATIONS

The low numbers of known genes that control features of interest, the high costs of the initial stages of experiments, and the pleiotropic effects of other genes on candidate genes create difficulties in using genetic mapping. Although the variability to establish causal gene responsible for its quantitative effect, there is always the possibility that the focal gene is not actually the one causing the observed difference in a given characteristic, but that it is only linked to the QTL. This can lead to conflicting results depending on the population studied, because significant associations in a specific population may not be observed in others. Another constraint is that the genome region identified may be relatively large and contain many genes, making it difficult to identify the specific genes that explain the QTL.

FUTURE DEVELOPMENTS OF INTEREST

Combinations of various molecular biology techniques have allowed us to advance in our basic research of wound repair. Several studies have identified different regions in the mouse genome responsible for lesion closure.^{39–44} We intend to carry out a fine mapping of the QTL that regulate

TAKE-HOME MESSAGES

Basic science advances

Global tracking of the mouse genome and inserting or deleting genes of interest in studies of the mechanisms that modulate a particular phenotype are very promising techniques. Genomic studies with experimental models represent an important approach to identifying and developing biomarkers of healing.

Clinical science advances

The availability of techniques with high therapeutic potential, including studies using microRNAs. These noncoding regulatory RNAs are now widely used in treating patients with fibrosis or slow healing wounds.

Relevance to clinical care

Identification of candidate genes that participate in the healing phenotype may contribute to the regulation of gene expression related to the process, such as the inflammatory response in the early healing. The modulation of the initial inflammatory effects involves additional mechanisms, such as the deposition of an organized and controlled extracellular matrix, providing better quality healing.

the intensity of inflammatory responses to high-density SNPs in future research projects to reduce the confidence intervals and to address differences in global gene expression protocols and correlate them with the QTL in order to implicate fewer genes in these loci. Further experiments that investigate the involvement of microRNAs (which regulate the expression of many genes) as well as the loss of functions of these RNA sequences may focus additional emphasis on the wide range of potential clinical applications of this technology.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING SOURCES

This study was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP and Conselho Nacional de Pesquisa—CNPq.

AUTHOR DISCLOSURE AND GHOSTWRITING

The authors have no conflicts of interest to disclose. The listed authors were solely responsible for writing this article.

REFERENCES

1. Tsirogiani AK, Moutsopoulos NM, and Moutsopoulos HM: Wound healing: immunological aspects. *Injury* 2006; **37** Suppl 1: S5.
2. Clark LD, Clark RK, and Heber-Katz E: A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; **88**: 35.
3. Harty M, Neff AW, King MW, and Mescher AL: Regeneration or scarring: an immunologic perspective. *Dev Dyn* 2003; **226**: 268.
4. De Franco M, Carneiro PS, Peters LC, Vorraro F, Borrego A, Ribeiro OG, Starobinas N, Cabrera WK, and Ibañez OM: Slc11a1 (Nramp1) alleles interact with acute inflammation loci to modulate wound healing traits in mice. *Mamm Genome* 2007; **18**: 263.

5. Canhamero T, Reines B, Peters LC, Borrego A, Carneiro PS, Albuquerque LL, Cabrera WH, Ribeiro OG, Jensen JR, Starobinas N, Ibañez OM, and De Franco M: Distinct early inflammatory events during ear tissue regeneration in mice selected for high inflammation bearing Slc11a1 R and S alleles. *Inflammation* 2011; **34**: 303.
6. Heber-Katz E: The regenerating mouse ear. *Semin Cell Dev Biol* 1999; **10**: 415.
7. McBrearty BA, Clark LD, Zhang XM, Blankenhorn EP, and Heber-Katz E: Genetic analysis of a mammalian wound-healing trait. *Genetics* 1998; **95**: 11792.
8. Li X, Gu W, Masinde G, Hamilton-Ulland M, Xu S, Mohan S, and Baylink DJ: Genetic control of the rate of wound healing in mice. *Heredity* 2001; **86**: 668.
9. Vigar ND, Cabrera WK, Araujo LMM, Ribeiro OG, Ogata TRP, Siqueira M, *et al*: Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 431.
10. Bizio G, Ribeiro OG, Saran A, Araujo ML, Maria DA, De Franco M, Cabrera WK, Sant'anna OA, Massa S, Covelli V, Mouton D, Neveu T, Siqueira M, and Ibanez OM: Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis* 1998; **19**: 337.
11. Araujo LMM, Ribeiro OG, Siqueira M, De Franco M, Starobinas N, Massa S, Cabrera WH, Mouton D, Seman M, and Ibañez OM: Innate resistance to infections by intracellular bacteria differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 2913.
12. Ibañez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, De Franco M, *et al*: Genetics of non-specific immunity: i. bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 2555.
13. Peters LC, Jensen JR, Borrego A, Cabrera WH, Baker N, Starobinas N, Ribeiro OG, Ibañez OM, and De Franco M: Slc11a1 (formerly NRAMPI) gene modulates both acute inflammatory reactions and pristane-induced arthritis in mice. *Genes Immun* 2007; **8**: 56.
14. Borrego A, Peters LC, Jensen JR, Ribeiro OG, Koury Cabrera WH, Starobinas N, Seman M, Ibañez OM, and De Franco M: Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate Slc11a1 gene (formerly Nrampl) effects in selected mouse lines. *Microbes Infect* 2006; **8**: 2766.
15. Ribeiro OG, Maria DA, Adriouch S, Pechberty S, Cabrera WH, Morisset J, Ibanez OM, and Seman M: Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. *J Leukoc Biol* 2003; **74**: 497.
16. Maria DA, Manenti G, Galbiati F, Ribeiro OG, Cabrera WH, Barrera RG, Pettinichio A, De Franco M, Starobinas N, Siqueira M, Dragani TA, and Ibanez OM: Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. *Oncogene* 2003; **22**: 426.
17. Barton CH, Whitehead SH, and Blackwell JM: Nramp transfection transfers lty/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. *Mol Med* 1995; **1**: 267.
18. Kita E, Emoto M, Oku D, Nishikawa F, Hamuro A, Kamikaidou N, and Kashiba S: Contribution of interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of ltyr mice. *J Leukoc Biol* 1992; **51**: 244.
19. Wojciechowski W, DeSanctis J, Skamene E, and Radzioch D: 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* 1999; **163**: 2688.
20. Li X, Mohan S, Gu W, and Baylink DJ: Analysis of gene expression in the wound repair/regeneration process. *Mamm Genome* 2001; **12**: 52.
21. Nowak D, Popow-Woźniak A, Raźnikiewicz L, and Malicka-Błaszkiewicz M: Actin in the wound healing process. *Postepy Biochem* 2009; **55**: 138.
22. Monaco JL, and Lawrence WT: Acute wound healing an overview. *Clin Plast Surg* 2003; **30**: 1.
23. Reines B, Cheng L, and Matzinger P: Unexpected regeneration in middle aged mice. *Rejuvenation Res* 2009; **12**: 45.
24. Heber-Katz E, and Gourevitch D: The relationship between inflammation and regeneration in the MRL mouse: potential relevance for putative human regenerative (scarless wound healing) Capacities? *Ann NY Acad Sci* 2009; **1172**: 110.
25. Dovi JV, Szpaderska AM, and DiPietro LA: Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thromb Haemost* 2004; **92**: 275.
26. Dovi JV, He LK, and DiPietro LA: Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol* 2003; **73**: 448.
27. Gourevitch D, Clark L, Chen P, Seitz A, Samulewicz SJ, and Heber-Katz E: Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model. *Dev Dyn* 2003; **226**: 377.
28. Catchpole B, Ward FJ, Hamblin AS, and Staines NA: Autoreactivity in collagen-induced arthritis of rats: a potential role for T cell responses to self MHC peptides. *J Autoimmun* 2002; **18**: 271.
29. Morgan R, Wu B, Song Z, and Wooley PH: Immune reactivity to connective tissue antigens in pristane induced arthritis. *J Rheumatol* 2004; **31**: 1497.
30. Masinde GL, Li X, Gu W, Davidson H, Mohan S, and Baylink DJ: Identification of wound healing/regeneration quantitative trait loci (QTL) at multiple time points that explain seventy percent of variance in (MRL/MpJ And SJL/J) Mice F2 Population. *Genome Res* 2001; **12**: 2027.
31. Lefaucheur JP, Gjata B, Lafont H, and Sebille A: Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *J Neuroimmunol* 1996; **70**: 37.
32. Gordon AH: Acute-phase proteins in wound healing. *Ciba Found Symp* 1972; **9**: 73.
33. De Franco M, Colombo F, Galvan A, Cecco LD, Spada E, Milani S, Ibanez OM, and Dragani TA: Transcriptome of normal lung distinguishes mouse lines with different susceptibility to inflammation and to lung tumorigenesis. *Cancer Lett* 2010; **294**: 187.
34. Trombone AP, Ferreira SB JR, Raimundo FM, de Moura KC, Avila-Campos MJ, Silva JS, Campa-nelli AP, De Franco M, and Garlet GP: Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. *J Periodontol Res* 2009; **44**: 443.
35. Carneiro AS, Ribeiro OG, De Franco M, Cabrera WH, Vorraro F, Siqueira M, Ibañez OM, and Starobinas N: Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon* 2002; **40**: 1571.
36. Carneiro AS, Ribeiro OG, Cabrera WH, Vorraro F, De Franco M, Ibañez OM, and Starobinas N: *Bothrops jararaca* venom (BJV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. *Toxicon* 2008; **52**: 619.
37. Di Pace RF, Massa S, Ribeiro OG, Cabrera WH, De Franco M, Starobinas N, Seman M, and Ibañez OM: Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory responsiveness. *Carcinogenesis* 2006; **27**: 1517.
38. De Souza VR, Cabrera WK, Galvan A, Ribeiro OG, De Franco M, Vorraro F, Starobinas N, Massa S, Dragani TA, and Ibañez OM: Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. *Int J Cancer* 2009; **124**: 1478.
39. Cheverud JM, Lawson HA, Funk R, Zhou J, Blankenhorn EP, and Heber-Katz E: Healing quantitative trait loci in a combined cross analysis using related mouse strain crosses. *Heredity (Edinb)* 2012; **108**: 441.
40. Yu H, Baylink DJ, Masinde GL, Li R, Nguyen B, Davidson HM, *et al*: Mouse chromosome 9 quantitative trait loci for soft tissue regeneration: congenic analysis an fine mapping. *Wound Repair Regen* 2007; **15**: 922.

5. Canhamero T, Reines B, Peters LC, Borrego A, Carneiro PS, Albuquerque LL, Cabrera WH, Ribeiro OG, Jensen JR, Starobinas N, Ibañez OM, and De Franco M: Distinct early inflammatory events during ear tissue regeneration in mice selected for high inflammation bearing Slc11a1 R and S alleles. *Inflammation* 2011; **34**: 303.
6. Heber-Katz E: The regenerating mouse ear. *Semin Cell Dev Biol* 1999; **10**: 415.
7. McBrearty BA, Clark LD, Zhang XM, Blankenhorn EP, and Heber-Katz E: Genetic analysis of a mammalian wound-healing trait. *Genetics* 1998; **95**: 11792.
8. Li X, Gu W, Masinde G, Hamilton-Ulland M, Xu S, Mohan S, and Baylink DJ: Genetic control of the rate of wound healing in mice. *Heredity* 2001; **86**: 668.
9. Vigar ND, Cabrera WK, Araujo LMM, Ribeiro OG, Ogata TRP, Siqueira M, *et al*: Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 431.
10. Bizio G, Ribeiro OG, Saran A, Araujo ML, Maria DA, De Franco M, Cabrera WK, Sant'anna OA, Massa S, Covelli V, Mouton D, Neveu T, Siqueira M, and Ibanez OM: Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis* 1998; **19**: 337.
11. Araujo LMM, Ribeiro OG, Siqueira M, De Franco M, Starobinas N, Massa S, Cabrera WH, Mouton D, Seman M, and Ibañez OM: Innate resistance to infections by intracellular bacteria differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 2913.
12. Ibañez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, De Franco M, *et al*: Genetics of non-specific immunity: i. bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 2555.
13. Peters LC, Jensen JR, Borrego A, Cabrera WH, Baker N, Starobinas N, Ribeiro OG, Ibañez OM, and De Franco M: Slc11a1 (formerly NRAMPI) gene modulates both acute inflammatory reactions and pristane-induced arthritis in mice. *Genes Immun* 2007; **8**: 56.
14. Borrego A, Peters LC, Jensen JR, Ribeiro OG, Koury Cabrera WH, Starobinas N, Seman M, Ibañez OM, and De Franco M: Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate Slc11a1 gene (formerly Nrampl) effects in selected mouse lines. *Microbes Infect* 2006; **8**: 2766.
15. Ribeiro OG, Maria DA, Adriouch S, Pechberty S, Cabrera WH, Morisset J, Ibanez OM, and Seman M: Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. *J Leukoc Biol* 2003; **74**: 497.
16. Maria DA, Manenti G, Galbiati F, Ribeiro OG, Cabrera WH, Barrera RG, Pettinichio A, De Franco M, Starobinas N, Siqueira M, Dragani TA, and Ibanez OM: Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. *Oncogene* 2003; **22**: 426.
17. Barton CH, Whitehead SH, and Blackwell JM: Nramp transfection transfers lty/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. *Mol Med* 1995; **1**: 267.
18. Kita E, Emoto M, Oku D, Nishikawa F, Hamuro A, Kamikaidou N, and Kashiba S: Contribution of interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of ltyr mice. *J Leukoc Biol* 1992; **51**: 244.
19. Wojciechowski W, DeSanctis J, Skamene E, and Radzioch D: Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin involves class II transactivator and depends on the Nrampl gene. *J Immunol* 1999; **163**: 2688.
20. Li X, Mohan S, Gu W, and Baylink DJ: Analysis of gene expression in the wound repair/regeneration process. *Mamm Genome* 2001; **12**: 52.
21. Nowak D, Popow-Woźniak A, Raźnikiewicz L, and Malicka-Błaszkiewicz M: Actin in the wound healing process. *Postepy Biochem* 2009; **55**: 138.
22. Monaco JL, and Lawrence WT: Acute wound healing an overview. *Clin Plast Surg* 2003; **30**: 1.
23. Reines B, Cheng L, and Matzinger P: Unexpected regeneration in middle aged mice. *Rejuvenation Res* 2009; **12**: 45.
24. Heber-Katz E, and Gourevitch D: The relationship between inflammation and regeneration in the MRL mouse: potential relevance for putative human regenerative (scarless wound healing) Capacities? *Ann NY Acad Sci* 2009; **1172**: 110.
25. Dovi JV, Szpaderska AM, and DiPietro LA: Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thromb Haemost* 2004; **92**: 275.
26. Dovi JV, He LK, and DiPietro LA: Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol* 2003; **73**: 448.
27. Gourevitch D, Clark L, Chen P, Seitz A, Samulewicz SJ, and Heber-Katz E: Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model. *Dev Dyn* 2003; **226**: 377.
28. Catchpole B, Ward FJ, Hamblin AS, and Staines NA: Autoreactivity in collagen-induced arthritis of rats: a potential role for T cell responses to self MHC peptides. *J Autoimmun* 2002; **18**: 271.
29. Morgan R, Wu B, Song Z, and Wooley PH: Immune reactivity to connective tissue antigens in pristane induced arthritis. *J Rheumatol* 2004; **31**: 1497.
30. Masinde GL, Li X, Gu W, Davidson H, Mohan S, and Baylink DJ: Identification of wound healing/regeneration quantitative trait loci (QTL) at multiple time points that explain seventy percent of variance in (MRL/MpJ And SJL/J) Mice F2 Population. *Genome Res* 2001; **12**: 2027.
31. Lefaucheur JP, Gjata B, Lafont H, and Sebille A: Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *J Neuroimmunol* 1996; **70**: 37.
32. Gordon AH: Acute-phase proteins in wound healing. *Ciba Found Symp* 1972; **9**: 73.
33. De Franco M, Colombo F, Galvan A, Cecco LD, Spada E, Milani S, Ibanez OM, and Dragani TA: Transcriptome of normal lung distinguishes mouse lines with different susceptibility to inflammation and to lung tumorigenesis. *Cancer Lett* 2010; **294**: 187.
34. Trombone AP, Ferreira SB JR, Raimundo FM, de Moura KC, Avila-Campos MJ, Silva JS, Campagnelli AP, De Franco M, and Garlet GP: Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. *J Periodontol Res* 2009; **44**: 443.
35. Carneiro AS, Ribeiro OG, De Franco M, Cabrera WH, Vorraro F, Siqueira M, Ibañez OM, and Starobinas N: Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon* 2002; **40**: 1571.
36. Carneiro AS, Ribeiro OG, Cabrera WH, Vorraro F, De Franco M, Ibañez OM, and Starobinas N: *Bothrops jararaca* venom (BJV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. *Toxicon* 2008; **52**: 619.
37. Di Pace RF, Massa S, Ribeiro OG, Cabrera WH, De Franco M, Starobinas N, Seman M, and Ibañez OM: Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory responsiveness. *Carcinogenesis* 2006; **27**: 1517.
38. De Souza VR, Cabrera WK, Galvan A, Ribeiro OG, De Franco M, Vorraro F, Starobinas N, Massa S, Dragani TA, and Ibañez OM: Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. *Int J Cancer* 2009; **124**: 1478.
39. Cheverud JM, Lawson HA, Funk R, Zhou J, Blankenhorn EP, and Heber-Katz E: Healing quantitative trait loci in a combined cross analysis using related mouse strain crosses. *Heredity (Edinb)* 2012; **108**: 441.
40. Yu H, Baylink DJ, Masinde GL, Li R, Nguyen B, Davidson HM, *et al*: Mouse chromosome 9 quantitative trait loci for soft tissue regeneration: congenic analysis an fine mapping. *Wound Repair Regen* 2007; **15**: 922.