LUDMILA VALINO GARCIA

ESTUDO DE MECANISMOS REGULATÓRIOS ENVOLVIDOS NA REGENERAÇÃO TECIDUAL EM LINHAGENS DE CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADAS PARA MÁXIMA OU MÍNIMA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA

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

São Paulo
2010

LUDMILA VALINO GARCIA

ESTUDO DE MECANISMOS REGULATÓRIOS ENVOLVIDOS NA REGENERAÇÃOTECIDUAL EM LINHAGENS DE CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADAS PARA MÁXIMA OU MÍNIMA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Marcelo De Franco

São Paulo
2010

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 **121** nas fls. **63** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Marcelo De Franco, Coordenador(a) da Linha de pesquisa " *Estudos de mecanismos regulatórios envolvidos na cicatrização e reparo tecidual em linhagens de camundongos geneticamente modificado selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguada*" do qual participou(aram) o(s) alunos **Ludmila Valino Garcia e os pesquisadores Olga Célia Martinez Ibañez, Osvaldo Garcia Ribeiro Filho, Nancy Starobinas, Wafa Hanna Koury Cabrera,** 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 **26.11.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 26 de novembro de 2009.

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

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

Aos meus pais, por sempre me incentivarem, confiarem que eu poderia crescer mais e pelo apoio incondicional.

Aos meus avôs, que sempre me inspiraram.

Ao meu irmão, pelas lições de carinho, força e superação.

Aos meus familiares, que sempre acreditaram em mim.

Ao meu orientador, que não me deixou desistir.

Aos meus amigos, pela compreensão, fidelidade e lealdade, que me ergueram durante todo o caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e "Boss", Dr. Marcelo De Franco, pela paciência, perseverança e confiança de que eu conseguiria desenvolver o trabalho em tempo parcial. Pela oportunidade de aprender, dedicação e compreensão nas horas difíceis. Por não me deixar desistir, mostrando em nossas reuniões o quão belo e interessante era este estudo.

À Dra. Olga Ibañez pela atenção e a possibilidade de estudar no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan.

Aos pesquisadores(as) e doutores(as) do Laboratório de Imunogenética: Wafa Cabrera, Orlando Ribeiro, Nancy Starobinas, Solange Massa, Milene Tino De Franco, Solange Carbonare. Ao José Ricardo Jensen, que me ensina e incentiva desde a iniciação científica. À grande amiga Andrea Borrego, que sempre foi muito solícita e paciente, para explicar quantas vezes fossem necessárias.

Às amigas: Tatiane, fundamental durante todo o processo e que me ajudou inúmeras vezes para que eu pudesse terminar este mestrado; Luciana Carla (Lú) e Patrícia, que me ajudam desde a iniciação científica; Simone, Iana, Layra, Francisca, Débora, Andréia Arruda, Alessandra, Priscila, Amanda, Fernanda, Jussara, Robertinha e Adriana Carneiro, pela amizade que se iniciou no convívio do laboratório. Á minha querida amiga Thalita, por muito mais que uma amizade, mas sim pelo carinho de irmã que dedica desde a faculdade.

Ao amigo Vinícius, pela alegria em todos os momentos e ao Cristiano.

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética: Sandra Ottoboni, Neusa Miranda, Marinalva Lima, Marinalva Santos, Tânia Braga, Ronaldo Mateus, Sérgio Miranda, Celso dos Santos, Joel Faustino e Luis Hilário.

Aos amigos Lidiane, Marlos, Paulo, Karina, Mara, Eliseu, Mateus e Zé por toda ajuda e diversão nas aulas do mestrado.

Aos amigos que fiz nas desafiantes aulas da Faculdade de Filosofia, para que pudesse completar os créditos, quando não podia fazer aulas durante o dia. Obrigada por mostrarem e me ensinarem a pensar de forma mais humana.

Às minhas chefes no Serviço de Controle de Qualidade do Instituto Butantan: Márcia Suzuki, pela ajuda e à Carla Utesher, agradeço pelo apoio.

Aos amigos queridos da Seção de Controle Físico-Químico: Suzana, Gisele, Gean, Dona Nelci, Eliana, Fernanda, Rose, Francisca, Nilza, Youko, Tatiane, Fátima, Juliana, Denise, Roberta, Edson, Mário, Bruno, Renato, Wanderson, Fabrízio, Marcos, Fabiana e Regiane por me aguentarem de mau humor todas as manhãs, pela união, pelas comemorações e por me fazerem sorrir todos os dias.

Aos amigos da Seção de Controle Microbiológico: Adriano, Marco Piantola, Talita, Dimi, Luciana, Mary, Mara, Emileyde, Dirces, Sandra, Telma, Eliane Cocati, Carlos, Roni, Ronaldo, Ana Carla, Cris, Maria, Beth e Marcos Milhomen por me receberem de braços abertos na seção.

Às meninas da secretária do Serviço de Controle de Qualidade: Paloma, Luana e Denise Freitas.

Aos amigos da Seção de Controle Biológico: Osmair, Dani, Paulo e Josana e aos meninos do Setor de Estoque, que me ensinaram muito em tão pouco tempo.

Agradecimento especial às amigas Youko e Nilza, por realizarem o papel de mãe, quando a minha está longe. Fátima e Juliana, sempre companheiras, para "o que der e vier". Roberta pela sincera amizade e por trazer tantos novos bons amigos para meu convívio. Wanderson, Tati e Gisele, nem sei o que dizer para expressar o quanto amo vocês. Sandra Orozco, muito obrigada seria pouco para expressar a minha

gratidão pelos ensinamentos, conselhos, dias de revisão do exame de qualificação e da dissertação e toda sua dedicação e amizade.

Aos amigos que fiz no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas.

Às amigas de infância, sempre presentes de alguma forma, Juliana e Fabiane.

Às amigas de faculdade Débora, Jéssica e Natália.

À minha grande e divertida família, que levo sempre comigo... vocês são a parte mais preciosa do que sou, do que penso, da mulher que me tornei, do orgulho que tenho em ser uma Valino e uma Garcia.

À Cida, que me orienta para ter forças e superar os obstáculos que surgem.

A todos que contribuíram de alguma maneira para que este trabalho fosse realizado.

E, principalmente, a Deus.

"Ninguém pode voltar ao início e fazer um novo começo, mas qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim"

Chico Xavier

RESUMO

GARCIA, L. V. **Estudo de mecanismos regulatórios envolvidos na regeneração tecidual em linhagens de camundongos geneticamente selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda.** 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Camundongos foram selecionados geneticamente para alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) resposta inflamatória aguda, sendo utilizados em experimentos de regeneração tecidual. Foi observado que AIRmax apresentam uma regeneração rápida do tecido da orelha em relação aos AIRmin, sugerindo a existência de *loci* reguladores comuns para ambos fenótipos de inflamação e regeneração do tecido. Neste estudo investigamos o fenótipo inflamatório e o perfil de expressão gênica global em AIRmax e AIRmin durante a fase inicial da regeneração do tecido da orelha. As metodologias empregadas foram: análise histológica, edema e níveis de MPO. A análise de expressão gênica global foi realizada com *bioarrays CodeLink* em animais-controle e experimentais no período de 48 horas após injúria. Para validar esta pesquisa, foi utilizado o PCR em tempo real. Os resultados de análise histológica mostram que AIRmax não só apresentam uma regeneração completa (sem formação de cicatriz nas superfícies epiteliais), como também apresentam formação de ilhas de cartilagem e glândulas sebáceas no centro da área regenerada. Os AIRmin não apresentam regeneração, não ocorrendo fechamento do orifício. Os resultados obtidos sobre edema de orelha e os níveis de MPO foram maiores em AIRmax quando comparados com AIRmin ($P < 0,001$). A análise de expressão gênica global mostrou 794 genes ativados e 528 genes reprimidos em AIRmax, enquanto 1.086 genes ativados e 1.145 genes reprimidos foram observados nos AIRmin, 48 horas após a lesão. AIRmax e AIRmin apresentam uma alta modulação de genes sobrerrepresentados em temas biológicos para resposta inflamatória, adesão celular e quimiotaxia (*Gene Ontology*). No entanto, foi observado uma baixa modulação de genes sobrerrepresentados para o transporte em AIRmax e para taxia, contração muscular e ciclo de ubiquitina em AIRmin. Nas regiões próximas ao *QTL* anteriormente encontrado no cromossomo 1, foram observados genes diferencialmente expressos como *Stat1, Casp8, Hspe1* e *Il1r2*, enquanto *Lect1*, *Fndc3* e *Egr3* foram detectados no cromossomo 14. Os experimentos com qPCR mostram uma alta expressão de *Il1b*, *Il8rb* e *Mmp9* em AIRmax e *Cxcl2*, *Tnfa* e *Tgfb* em AIRmin. Concluímos que os animais AIRmax e AIRmin apresentam (nos cromossomos 1 e 14) genes inflamatórios diferencialmente expressos que podem estar envolvidos nos fenótipos de resposta inflamatória aguda e regeneração do tecido da orelha.

Palavras-chave: Resposta inflamatória aguda. Camundongos selecionados geneticamente. Regeneração tissular. *Loci* de traço Quantitativo. Expressão gênica.

ABSTRACT

GARCIA, L. V. **Study of regulatory mechanisms involved in tissue regeneration in mice selected for high or low acute inflammatory response.** 2010. 91 p. Master thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Mice selected for high (AIRmax) or low (AIRmin) acute inflammatory response were used in tissue regeneration experiments. It was observed that AIRmax present faster ear tissue regeneration than AIRmin mice, suggesting the involvement of common regulatory loci for both inflammation and ear tissue regeneration phenotypes. In the study we investigated some inflammatory phenotypes and global gene expression profiles in AIRmax and AIRmin mice during the initial phase of the ear tissue regeneration. Histology analysis, ear thickness oedema and MPO levels were investigated. Global gene expression analysis was performed with on CodeLink bioarrays in both control and experimental 48 hours ear punched mice and to validate this research real-time PCR was used.The histological analyses showed that AIRmax regeneration was not only complete (with no sign of the original opposing epithelial surfaces), but cartilage islands and sebaceous glands were formed in the middle of the regenerated area. AIRmin mice displayed some regeneration but never closure. Ear thickness oedema and MPO levels were higher in AIRmax than AIRmin mice ($P < 0.001$). Global expression analysis showed 794 activated and 528 repressed genes in AIRmax, while 1086 activated and 1145 repressed genes were observed in AIRmin mice 48 hours after injury. AIRmax and AIRmin mice presented up-regulated genes over-represented in inflammatory response, cell adhesion and chemotaxis biological themes (Gene ontology). However, down-modulated genes were significant over-represented for transportation in AIRmax and for taxis, muscle contraction and cycle ubiquitin in AIRmin mice. In the previously QTL regions detected on chromosome 1 differentially-expressed *Stat1, Casp8*, *Hspe1* and *Il1r2* genes were found, while *Lect1, Fndc3 and Egr3* were detected on chromosome 14. qPCR experiments showed high expression of *Il-1β*, *Il-8rb* and *Mmp9* in AIRmax and *Cxcl2*, *Tnfa*, and *Tgfb1* in AIRmin mice. We conclude that AIRmax and AIRmin mice presented several (some on chromosomes 1 and 14) differentially-expressed inflammatory genes which could be involved in the acute inflammatory response and ear tissue regeneration phenotypes.

Key words: Acute inflammatory response. Mice genetically selected, tissue regeneration, Quantitative Trait Loci, Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação dos acasalamentos para dar origem à população inicial de seleção.....23
Figura 2 - Diferentes tempos de cicatrização e reparo tecidual em camundongos AIRmax e AIRmin.....26
Figura 3 - Caracterização do modelo de regeneração tissular em camundongos AIRmax e AIRmin.....30
Figura 4 - Gel de integridade do mRNA de animais da seleção AIR.....34
Figura 5 - Controles negativos da lâmina de *microarray*. As sequências-alvo dos mRNAs bacterianos estão distribuídas aleatoriamente pela lâmina.....39
Figura 6 - Controles positivos da lâmina de *microarray*. As sequências-alvo dos mRNAs bacterianos estão distribuídas aleatoriamente pela lâmina.....39
Figura 7- qPCR exemplificando a quantificação da ciclofilina e da citocina na orelha de animais das linhagens AIRmax, AIRmin controles e experimentais.....43
Figura 8- Estudo Histológico das linhagens AIRmax e AIRmin controles e experimentais nos períodos de 2 dias e 45 dias.....47
Figura 9 Estudo do espessamento nas orelhas de camundongos AIRmax e AIRmin induzidos ao processo de regeneração tecidual.....48
Figura 10 - Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) na orelha de camundongos AIRmax e AIRmin após injúria.....49
Figura 11 - Número de genes ativados e reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax e AIRmin em relação aos animais controles.....50
Figura 12 - Número de genes diferencialmente expressos para a análise entre os animais AIRmax/ AIRmin experimentais e controles.....51
Figura 13 - Perfil de expressão dos genes ativados dos animais AIRmax e sobrerrepresentados para os temas biológicos de resposta inflamatória, resposta imune e quimiotaxia.....53
Figura 14 - Perfil de expressão dos genes reprimidos dos animais AIRmax e sobrerrepresentados para os temas biológicos transporte, crescimento celular e organogênese.....55
Figura 15 - Perfil de expressão dos genes ativados dos animais AIRmin e sobrerrepresentados para os temas biológicos de resposta inflamatória, e taxia.....57
Figura 16 - Perfil de expressão dos genes reprimidos dos animais AIRmin e sobrerrepresentados para os temas biológicos contração muscular, modificação de proteínas e mobilidade celular.....59

Figura 17 - Genes sobrerrepresentados nas linhagens AIRmax e AIRmin no cromossomo 01.....62
Figura 18 - Genes sobrerrepresentados nas linhagens AIRmax e AIRmin no cromossomo 14.....63
Figura 19 - Expressão relativa do gene *Cxcl2* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual e controle.....65
Figura 20 - Expressão relativa do gene *Tnf-α* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual e controle.....66
Figura 21 - Expressão relativa do gene *Tgf-β* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual e controle.....67
Figura 22 - Expressão relativa do gene *Il1-β* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual e controle.....68
Figura 23 - Expressão relativa do gene *Il8rb* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de reparo tecidual e controle.....69
Figura 24 - Expressão relativa do gene *Mmp9* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual e controle.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos *primers* utilizados nas reações de qPCR.....41
Tabela 2 - Categorias funcionais sobrerrepresentadas nos genes ativados dos animais AIRmax em relação aos controles.....52
Tabela 3 - Categorias funcionais sobrerrepresentadas nos genes reprimidos dos animais AIRmax em relação aos controles.....54
Tabela 4 - Categorias funcionais sobrerrepresentadas nos genes ativados dos animais AIRmin em relação aos controles.....56
Tabela 5 - Categorias funcionais sobrerrepresentadas nos genes reprimidos dos animais AIRmin em relação aos controles.....58
Tabela 6 - Correlações entre as expressões gênicas obtidas no qPCR e microarray de orelha induzida ao processo de regeneração tissular.....70

LISTA DE ABREVIATURAS

129X1/SvJ (129) - Linhagem de camundongos isogênica

A/J - Linhagem de camundongos isogênica

AIR – Resposta inflamatória aguda

AIRmax – Linhagem de camundongos selecionados para alta resposta inflamatória aguda

AIRmin – Linhagem de camundongos selecionados para baixa resposta inflamatória aguda

Ang1 - Gene Angiopoietin-1

BALB/cJ n- Linhagem de camundongos isogênica

BET - Brometo de etídio

Biogel P_{100} - Partículas de poliacrilamida

***C57Bl/6J* (B6)** - Linhagem de camundongos isogênica

CAST/Ei - Linhagem de camundongos isogênica

***CBA* -** Linhagem de camundongos isogênica

CEEA - Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

CEUAIB - Comitê de Ética no uso de experimentação com Animais no Instituto Butantan

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação com Animais

Ct -*Cycle Threshold*

CXC – Quimiocinas

D.O. Densidade óptica

DBA2/J - Linhagem de camundongos isogênica

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DNase - Enzima capaz de digerir o DNA

FGF2/ bFGF - Fator de crescimento fibroblástico 2

GM-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos

GRO - Oncogene relacionado ao crescimento

HTAB - Hexadecyltrimethylammonium bromide

IFN-γ - *Interferon* gama

IFN-α e β - *Interferon* alfa e beta

IL- Interleucina

***IP*-10** - Proteína-10 indutora de *interferon* gama

Loci - Regiões cromossômicas

M-CSF - Fator estimulador de colônia de monócitos

MDB - *Membrane desalting buffer*

MPO - Enzima Mieloperoxidade

MRL - Linhagem de camundongos isogênica

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

P*/*J - Linhagem de camundongos isogênica

PBS - Solução Salina em tampão fosfato

PG - Prostaglandina

PGE_2 - Prostaglandina E_2

qPCR - *Real-time polymerase chain reaction*

QTL - *Quantitative Trait Loci*

RNA - Ácido Ribonucléico

RNAm - Ácido Ribonucléico mensageiro

SJL- Linhagem de camundongos isogênica

Slc11a1/ Nramp1 - *Solute Carrier family 11 proton-coupled divalent metal íon transporter member 1*

SWR/J - Linhagem de camundongos isogênica

TGF-β - Fator de crescimento transformador beta

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

VEGFA/VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
2 OBJETIVOS 29
2.1 Objetivo geral 29
2.2 Objetivos específicos 29
3 MATERIAL E MÉTODOS 30
3.1 Modelo animal 30
3.2 Modelo de regeneração tissular em animais selecionados para *AIR* 30
3.3 Preparação Histológica 31
3.4 Indução de edema (Espessamento da Orelha) 31
3.5 Determinação da atividade de Mieloperoxidase (MPO) 31
3.6.Protocolo para extração de RNA através do kit RNAspin Mini (GE Healthcare) 32
3.7 Integridade do RNA por gel de agarose 1% 33
3. 8 Análise da expressão gênica global por *microarray* 34
***3.8.1 Preparação dos mRNAs bacterianos* 34**
***3.8.2 Síntese do cDNA de fita simples* 35**
***3.8.3 Síntese do cDNA de fita dupla* 35**
***3.8.4 Purificação do cDNA de dupla fita* 36**
***3.8.5 Síntese do cRNA por transcrição in vitro (IVT)* 36**
***3.8.6 Purificação do cRNA* 36**
***3.8.7 Fragmentação do cRNA* 37**
***3.8.8 Hibridação* 37**
***3.8.9 Detecção com Cy5-Streptavidina* 38**
***3.8.10 Análise dos dados obtidos* 38**
3.9 Obtenção do cDNA para PCR em tempo-real (qPCR) 40
3.10 PCR em tempo-real (qPCR) 41
3.11 Análise Estatística 44
4 RESULTADOS 45
4.1 Avaliação do modelo de regeneração tecidual nas linhagens AIRmax e AIRmin 45
4.2 Estudo histológico dos animais da seleção AIR 45
4.3 Avaliação do espessamento das orelhas nas linhagens AIR 46
4.4 Quantificação da enzima Mieloperoxidase entre as linhagens 48
4.5 Análise da expressão gênica global 49

4.6 Análise de expressão gênica por meio de reações de qPCR 64
4.6.1 Níveis de expressão gênica para Cxcl2 **..... 65**
4.6.2 Níveis de expressão gênica para Tnfa **..... 65**
4.6.3 Níveis de expressão gênica para Tgfb **..... 66**
4.6.4 Níveis de expressão gênica para Il1b **..... 67**
4.6.5 Níveis de expressão gênica para Il8rb **..... 68**
4.6.6 Níveis de expressão gênica para Mmp9 **..... 69**
5 DISCUSSÃO 71
6 CONCLUSÕES 82
REFERÊNCIAS 84

1 INTRODUÇÃO

A resposta a traumas em organismos complexos como mamíferos apresenta uma capacidade de reparo limitada (COSTA et al., 2009). Em mamíferos adultos, o processo de reparo ocorre pela substituição de células maduras, mas não de órgãos, e há formação de cicatriz, diferente do que é observado em invertebrados ou anfíbios (GOUREVITCH et al., 2003).

O reparo e a regeneração tissulares são processos complexos. O primeiro envolve vários tipos celulares e mediadores que regulam a cicatrização sendo dependente de uma série de fatores, como: homeostase hermeticamente regulada, inflamação, síntese de matriz, proliferação e contração da injúria. A regeneração tissular por sua vez, envolve a formação de blastema e o remodelamento de tecido, restaurando as funções e a integridade, sem formação de cicatriz (ZINS et al., 2010).

A resposta de mamíferos a lesões ocorre em três fases distintas, que se sobrepõem: inflamação, formação de um novo tecido e remodelamento.

A primeira fase - inflamação - ocorre imediatamente após a lesão tecidual. Nela componentes da cascata de coagulação, vias inflamatórias e sistema imunológico são necessários para impedir a vazão do sangue em curso e perdas de fluidos. Nesta etapa, há remoção de células mortas dos tecidos para prevenir uma infecção. A homeostasia é alcançada inicialmente pela agregação de plaquetas, seguida pela formação de uma matriz de fibrina, que se torna uma estrutura de base para infiltração de células. Os neutrófilos são então recrutados para o local da injúria, em resposta à ativação do complemento, à desgranulação de plaquetas e de produtos bacterianos. Depois de 1 a 3 dias, monócitos aparecem na injúria e se diferenciam em macrófagos. Os quais são cruciais para coordenar os eventos finais de resposta à lesão (GURTNER et al., 2008)

A segunda etapa - formação de novos tecidos - ocorre 3 a 10 dias após a lesão e é caracterizada por proliferação celular e a migração de diferentes tipos celulares. O primeiro evento consiste na migração de queratinócitos sobre a derme lesionada. Em seguida, há formação de vasos sanguíneos novos (um processo conhecido como angiogênese), e os novos capilares associados a fibroblastos e macrófagos substituem a matriz de fibrina com tecido de granulação, que forma um novo substrato para a migração de queratinócitos em fases posteriores do processo

de reparo. Os queratinócitos proliferam e quando maduros restabelecem a barreira do epitélio. Os reguladores positivos mais importantes da angiogênese são o fator de crescimento endotelial vascular (VEGFA) e o fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2, também conhecido como bFGF). A angiogênese pode também resultar no recrutamento de células progenitoras endoteliais da medula óssea. Na parte final desta fase, os fibroblastos (que são atraídos para próximo da injúria), se diferenciam em miofibroblastos. Esta última, são células contráteis e ao longo do tempo, aproximam as extremidades da injúria, fechando-a. Fibroblastos e miofibroblastos interagem e produzem matriz extracelular, principalmente na forma de colágeno, o que pode gerar a formação de cicatriz (GURTNER et al*.,* 2008).

A terceira fase - remodelamento - começa 1 a 3 semanas após a lesão e tem a duração de um ano ou mais. Durante esta fase, todos os processos ativados pós-lesão cessam. A maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos entram em apoptose ou saem do local da injúria, deixando uma massa que contém poucas células e que consiste principalmente de colágeno e outras proteínas de matriz extracelular. A interação mesênquima - epitélio mantém a integridade e homeostasia da pele, ocorrendo uma comunicação para manter outros tipos celulares na pele. Além disso, com 6 a 12 meses, a matriz é remodelada ativamente de um tipo principal de colágeno (tipo III da medula óssea) para predominantemente um composto de colágeno (tipo I). Este processo é realizado por metaloproteinases da matriz que são secretadas por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, e fortalece o tecido remodelado. No entanto, animais que não apresentam regeneração epimórfica do tecido (tipo de regeneração que ocorre em organismos menos complexos e anfíbios, nos quais um membro amputado pode ser totalmente regenerado, apresentando todas as funções e características apresentadas do membro perdido) não recuperam todas as propriedades presentes de antes da lesão (MARTIN, 1997; SINGER e CLARK, 1999; GURTNER et al., 2008; MONNACO e LAWRENCE, 2003)

No processo inflamatório há uma grande quantidade de neutrófilos no local da lesão, realizando as suas funções fagocíticas, enzimáticas e respiratórias. Curiosamente, embora a migração de neutrófilos para a injúria seja considerada importante para o início do processo inflamatório, no controle de patógenos e posterior reparo tecidual, estas células não são por si só, fundamentais para o

processo de reparo da injúria, pois a regeneração do tecido ocorre na ausência de neutrófilos em feridas estéreis (AYALA et al., 2003).

Assim, de acordo com Ayala et al. (2003), dois fatos têm chamado a atenção dos pesquisadores: a permanência prolongada de neutrófilos no foco inflamatório, a qual pode ser prejudicial ao processo de reparo tecidual (MOORE et al., 1999; WETZLER; KAMPFER; STALLMEYER, 2000), e a sua ausência ou diminuição, com possível repercussão benéfica na aceleração do reparo tecidual (DOVI; HE; DIPIETRO, 2004).

Um estudo empregando camundongos neutropênicos (deficientes em neutrófilos) resultou em um reparo significativamente acelerado. A diminuição de neutrófilos não teve nenhum efeito no índice de colágeno, bem como não influenciou o número de macrófagos no local da injúria. Em camundongos diabéticos, o reparo foi otimizado pela diminuição de neutrófilos (DOVI; SZPADERSKA; DIPIETRO, 2003).

Posteriormente, com o avanço do processo inflamatório para a fase de formação de tecidos novos, o número de neutrófilos começa a diminuir e são suplantados pelo aumento do número de macrófagos. Estas células têm a capacidade de coordenar a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa (AYALA et al., 2003).

Macrófagos apresentam uma importante função não somente nas fases iniciais da resposta inflamatória (por serem capazes de se comunicar diretamente com as células do sistema inato, como os neutrófilos), como também na fase proliferativa, pela secreção de fatores de crescimento angiogênicos e fibrinogênicos, que reparam os danos no tecido (PLOWDEN et al., 2004).

Os macrófagos, derivados de monócitos, secretam uma grande variedade de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas em resposta a patógenos ou “alertas” produzidos pelo sistema imune. Dentre as citocinas secretadas estão as interleucinas 1alfa e beta (IL-1α e β), IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interferon alfa e beta (IFN-α e β), fator β transformador de crescimento (TGF-β), fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF), fator estimulador de colônia de monócitos (M-CSF), e entre os fatores angiogênicos, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (PLOWDEN et al., 2004).

Os macrófagos secretam também: a quimiocina CXCL8 (IL-8), oncogene relacionado a crescimento (GRO) e proteína-10 indutora de interferon gama (IP-10). Como fatores de coagulação, prostaglandina E2 (PGE2), leucotrienos, componentes do complemento, bem como reativos intermediários de oxigênio e de nitrogênio (PLOWDEN et al., 2004). Possuem a capacidade de produzir matriz proteolítica ou inibidores, que também desempenham um papel importante na fase de formação de novos tecidos, embora estes aspectos sejam dominados principalmente por fibroblastos, queratinócitos e células epidérmicas (AYALA et al., 2003).

Uma linhagem de camundongos tem chamado muito a atenção dos pesquisadores, por evidenciar uma capacidade regenerativa tissular pouco observada em mamíferos. Diversos trabalhos de reparo e regeneração tecidual estão sendo realizados, nas quais a maioria utiliza a linhagem isogênica *MRL*/lpr (MRL), como boa regeneradora, por ser capaz de recuperar completamente o tecido em 30 dias (GOUREVITCH et al., 2003).

Um recente estudo realizado por Zins et al. (2010) com camundongos MRL verificou que a regeneração da orelha, sem formação de cicatriz, ocorre apenas quando uma única injúria (modelo de perfusão na orelha) é realizada. Ao serem submetidos a uma segunda injúria (queimadura na orelha na região que foi perfurada), os animais mostraram um atraso no reparo do tecido e no desenvolvimento de miofibroblastos, seguido de um trauma severo e propensão para o desenvolvimento e doenças autoimunes, como lupus eritematoso.

Os camundongos estudados frente às duas injúrias, não apresentaram regeneração tissular, mas deformações no local e alguns morreram devido à inflamação sistêmica. Exames patológicos mostraram um excessivo sequestro e infiltração de macrófagos e neutrófilos. Estudos histológicos apresentaram evidências de fibrose, formação de cicatriz ou inflamação crônica e necrótica. Acredita-se que estes eventos sejam as possíveis causas da ausência de regeneração. (ZINS et al., 2010).

Reines et al. (2009) verificaram que os camundongos C57Bl/6J quando envelhecem apresentam regeneração semelhante aos camundongos da linhagem MRL. Os animais jovens não possuem esta característica e não são capazes de regenerar o tecido.

Estudos de co-segregação de fenótipos e genótipos entre as linhagens MRL e C57Bl/6J (B6) na população de segregantes F2 detectaram regiões cromossômicas

(*loci*), também chamadas de *loci* de traços quantitativos (em inglês "*Quantitative trait loci* - QTL), envolvidas no controle da regeneração (MCBREARTY et al., 1998).

Vários trabalhos mostraram que a interação aditiva dos *loci* e a não existência de um gene principal com herança dominante caracteriza este fenótipo como uma herança poligênica (MASINDE et al., 2001; MCBREARTY et al., 1998).

Os estudos de Blankenhorn et al. (2003) para segregação demonstraram diferenças na capacidade de regeneração entre machos e fêmeas. Neste trabalho, estudo entre as linhagens MRL e CAST/Ei mostrou que o QTL no cromossomo 13 foi mais significante em machos, sugerindo que o controle gênico para regeneração pode ser dependente da presença de hormônios sexuais e receptores para estes hormônios, influenciado pela presença ou ausência do cromossomo Y. O efeito da castração atua de maneira positiva em machos MRL, pois apresentam uma regeneração lenta comparado às fêmeas, e a oforectomia não interfere neste processo (BLANKENHORN et al., 2003), propondo que níveis normais de testosterona poderiam inibir a regeneração (ARANEO et al., 1991). Herber-Katz et al. (2004) concluíram que regeneração é controlado por diferentes genes em camundongos machos e fêmeas.

Um cruzamento feito entre as linhagens de camundongos DBA/1J (DBA) e 129X1/SvJ (129), no qual a primeira foi utilizada como "regeneradora", mostrou que a herança era recessiva para os animais originados deste cruzamento, já que a maioria dos animais segregantes F2 apresentavam regeneração semelhantes à linhagem 129, enquanto a herança é aditiva em MRL X SJL. (MASINDE et al., 2006).

Em outro trabalho, Herber-Katz et al. (2009) relacionaram a inflamação e a regeneração em camundongos MRL. A característica regenerativa vista nesses animais, em relação aos outros mamíferos, fez com que os autores verificassem que o infiltrado celular tem papel importante nos dois fenômenos, pois para que haja a regeneração tissular, a migração de neutrófilos e de metaloproteinases é fundamental, tanto na fase inflamatória quanto na formação de novos tecidos, a fim de que ocorra uma deposição da matriz sem formação de cicatriz. Estes autores também citam a semelhança da regeneração tissular dos camundongos MRL com a linhagem AIRmax, o que torna a utilização da segunda linhagem interessante e apropriada para o estudo do fenótipo de regeneração tecidual.

Estudos envolvidos no processo de regeneração à perfuração de orelha em camundongos vêm sendo realizados no Laboratório de Imunogenética do Instituto

Butantan utilizando linhagens de camundongos selecionadas artificialmente segundo a capacidade máxima ou mínima de resposta inflamatória aguda.

O processo de formação da seleção *Acute Inflammation Response* (AIR) iniciou-se a partir de seleção genética bidirecional, que visa à obtenção de animais com fenótipos extremos e opostos para uma determinada característica quantitativa. O processo é baseado em acasalamentos seletivos, partindo de uma população inicial geneticamente heterogênea (STIFFEL et al., 1990). A obtenção de uma população inicial de seleção (F0) foi resultante de acasalamentos equilibrado de 8 linhagens isogênicas (A/J, DBA2/J, SWR/J, P/J, C57BL/6J, BALB/cJ, CBA e SJL), o que levou a uma recombinação distinta de 12,5% do *pool* de genes de todas as linhagens isogênicas originais**.** A figura 1 representa a formação da seleção AIR.

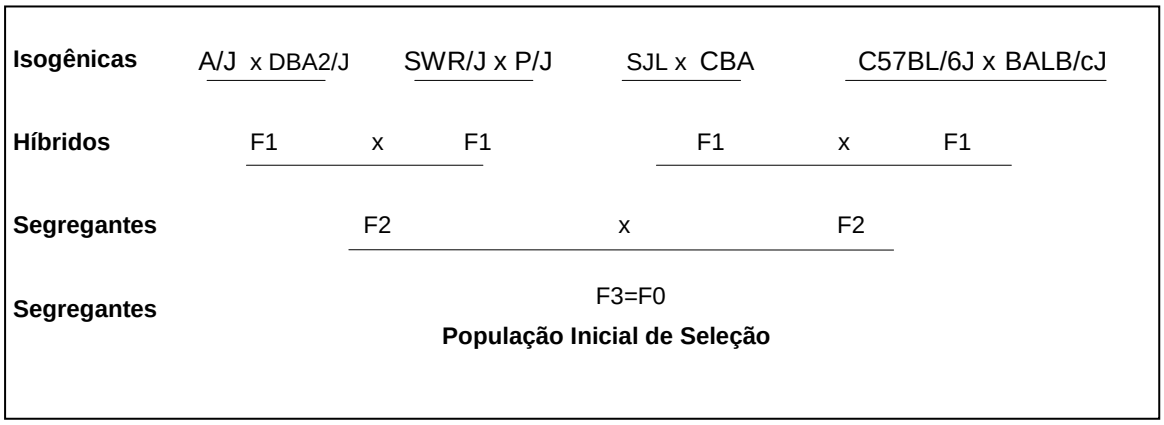


Figura 1 - Representação dos acasalamentos para origem da população inicial de seleção.

Esta população inicial recebeu uma injeção subcutânea no dorso previamente depilado de partículas de poliacrilamida (Biogel P_{100}) como agente flogístico. A poliacrilamida é uma substância insolúvel, não biodegradável e não imunogênica. A reação foi medida pelo infiltrado de leucócitos e pela concentração de proteínas presentes no exsudato inflamatório local, colhido vinte e quatro horas após a injeção das partículas. O método quantitativo utilizado para medir a intensidade da resposta inflamatória aguda (AIR) foi baseado no modelo proposto em 1983 por Fauve, Jusforgues e Hevin (IBAÑEZ et al., 1992; BIOZZI et al., 1998).

Os animais AIRmax e AIRmin surgiram do acasalamento de animais situados nos extremos da curva de distribuição normal, em função da quantificação da concentração protéica e do número de células infiltradas no exsudado resultante da reação à poliacrilamida. A progênie desses animais foi utilizada para os

acasalamentos consecutivos. Em cada geração, foram sempre escolhidos os animais com fenótipos extremos. Este procedimento foi repetido por vinte gerações, até ser atingido o máximo da separação fenotípica. Neste limite de seleção, considera-se que os alelos que apresentam efeitos opostos na resposta inflamatória estejam fixados em homozigose em cada linhagem (IBAÑEZ et al., 1992).

Os dois parâmetros - infiltrado de leucócitos e concentração de proteínas - estão positivamente correlacionados e possuem uma distribuição normal de freqüências. Esta diferença na resposta parece ser resultado da interação de 7 a 12 *loci* independentes com efeitos aditivos, sendo que 7 QTL controlam o extravasamento protéico e 11 QTL regulam o infiltrado celular (IBAÑEZ et al., 1992; BIOZZI et al., 1998).

Atualmente a seleção de inflamação se encontra na 51° geração com a divergência interlinhagens de 27,5 vezes para influxo celular e de 2,5 vezes para exsudato protéico para os animais AIRmax (RIBEIRO et al., 2003)**.**

Com relação ao tipo celular, predominante no exsudato inflamatório da população F0, foi de leucócitos polimorfonucleares (71%), sendo os neutrófilos as principais células deste infiltrado. As células mononucleares encontradas (29%) foram essencialmente macrófagos, enquanto o número de linfócitos foi insignificante (IBAÑEZ et al., 1992).

Os resultados mostraram que os animais AIRmax apresentam um infiltrado de neutrófilos muito superior ao apresentado pelos animais AIRmin. Apesar das diferenças quantitativas, os neutrófilos maduros das linhagens AIRmax e AIRmin possuem a mesma capacidade funcional, ou seja, expressam níveis semelhantes de moléculas de superfície, reguladoras tanto da diferenciação como da ativação e da migração destas células. Esta expressão foi considerada dentro de um padrão fisiológico normal, quando comparada com a linhagem - controle de camundongos isogênicos BALB/c (RIBEIRO et al., 2003).

Resumidamente, a produção quantitativa de neutrófilos na medula óssea de animais da linhagem AIRmax é maior, pois suas células precursoras são muito mais responsivas aos processos de proliferação e diferenciação em granulócitos quando comparadas à linhagem AIRmin. Quando analisado para atividade inflamatória o exsudato de vinte e quatro horas dos animais AIRmax induziu um efeito quimiotático intenso em neutrófilos oriundos da medula óssea de animais BALB/c, efeito este que não foi tão intenso quando o exsudato inflamatório utilizado pertencia aos animais

AIRmin. Estes resultados indicam que o exsudato dos animais AIRmax contém altas concentrações destes fatores quimiotáticos, os quais promovem uma intensa transmigração de neutrófilos para o sítio inflamatório (RIBEIRO et al., 2003).

A alta resposta inflamatória observada nos animais AIRmax é resultado da soma de elementos convergentes durante o processo de seleção genética, ou seja, da capacidade da medula óssea dos animais AIRmax de produzir um maior número de neutrófilos (em conseqüência de uma alta resposta às citocinas granulopoiéticas), da alta produção de fatores quimiotáticos no exsudato inflamatório destes animais (que determina um maior infiltrado celular no local da injeção de poliacrilamida) e da resistência à apoptose espontânea dos neutrófilos extravasados ao sítio inflamatório (RIBEIRO et al., 2003).

Portanto, o processo de seleção genética bidirecional para a intensidade da Resposta Inflamatória Aguda permitiu a produção de duas linhagens: AIRmax e AIRmin, que possuem um fundo genético heterogêneo, mas que são homozigotas para os *loci* reguladores deste fenótipo. Estas duas linhagens diferem em termos de sua resposta a outros agentes inflamatórios além da poliacrilamida (Biogel) como a carragenina (VASQUEZ-BRAVO, 1996), o zimosan e o veneno de *Bothrops jararaca* (CARNEIRO et al., 2002), bem como quanto à susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores (RIBEIRO et al., 2005; MARIA et al., 2003; BIOZZI et al., 1998). Estas linhagens também estão associadas a modificações de resistência a infecções (BORREGO et al., 2006; ARAÚJO et al., 1998) e à sensibilidade a doenças auto-imunes (PETERS et al., 2007; VIGAR et al., 2000).

Estes resultados demonstram que os QTL da seleção AIR acumulados durante o processo seletivo à poliacrilamida (Biogel) também atuam em relação a diferentes estímulos, sejam eles agudos, infecciosos, tumorais ou crônicos. Portanto, a identificação desses QTL é de extrema importância, não só para o fenótipo de intensidade de inflamação aguda, como também para identificação de quais *loci* estão associados a outros fenótipos (PETERS et al., 2009).

Ao entender a relação entre os *loci* reguladores da intensidade de inflamação aguda e os fenótipos de regeneração tecidual, o trabalho de De Franco et al. (2007) mostrou que os animais AIRmax são ótimos regeneradores, quando comparado com os animais AIRmin. Os resultados também indicaram que o influxo de neutrófilos apresentou uma correlação importante com a regeneração do tecido da orelha na população F2 de animais AIRmax e AIRmin. Diferenças na regeneração entre o

sexo também foi observada, sendo melhores nas fêmeas AIRmax em relação aos machos (Figura 2).

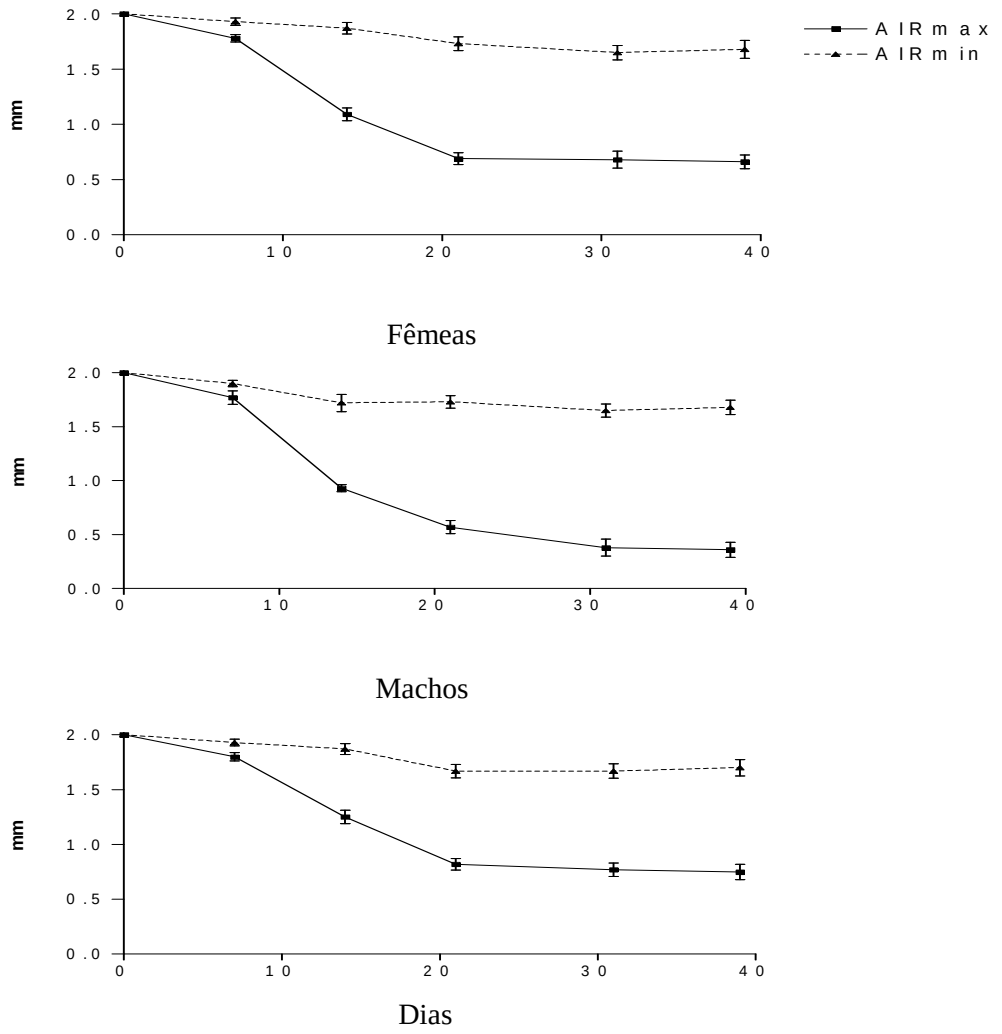


Figura 2 - Diferentes tempos de cicatrização e reparo tecidual em camundongos AIRmax e AIRmin. Os dados foram expressos em média aritmética e desvio padrão * P < 0,05.
FONTE: De Franco et al. (2007).

No rastreamento genômico realizado neste trabalho com os animais da seleção AIR foram identificado vários microssatélites com alelos polimórficos entre camundongos AIRmax e AIRmin com um significante desequilíbrio de freqüência, sugerindo QTL de inflamação aguda nos cromossomos 1, 6, 11, e 13 (BORREGO et al., 2006). As regiões no cromossomo 1 (a 25,7cM) e 14 (a 44,0 cM) marcadas pelos microssatélites *D1Mit 236* e *D14 Mit 194* também são segregadas com o fenótipo de regeneração, indicando que existem mecanismos genéticos que são comuns à inflamação aguda e a regeneração (DE FRANCO et al., 2007).

O gene *Solute Carrier family 11 proton-coupled divalent metal íon transporter member 1 (Slc11a1*) - anteriormente conhecido como *Natural resistance- associated macrophage protein-1* (Nramp1) (FORBES e GROS, 2001) - apresenta grande influência na resposta inflamatória no modelo animal empregado neste trabalho (AIR), devido à presença de seus alelos de resistência (R) e sensibilidade (S) (VIDAL et al., 1993) no período inflamatório, durante o processo de regeneração.

A expressão do alelo S do gene *Slc11a1* em macrófagos prejudica a capacidade do hospedeiro de controlar a replicação intracelular de patógenos presentes nos fagolissomos (VIDAL; TREMBLAY; GOVONI, 1995), interage dificultando a produção de IFN-γ e IL-1 (KITA et al., 1992; RAMARATHINAN; NIESEL; KLIMPEL, 1993) e influência na expressão de moléculas de classe II do MHC (LANG et al.,1997; WOJCIECHOWSKI et al., 1999).

O gene *Slc11a1* é expresso no fígado e no peritônio de camundongos (GOVONI e GROSS, 1998) e em humanos, no pulmão, fígado, baço e leucócitos do sangue periférico. Além disso, também implica em humanos na susceptibilidade à artrite reumatóide, doença autoimune devida a um processo inflamatório crônico. Em camundongos tem sido descrito como um importante modulador da suscetibilidade a doenças infecciosas, por ser expresso em macrófagos e neutrófilos (PETERS et al., 2007).

Em estudo realizado com as sub-linhagens da seleção AIR geradas por cruzamentos assistidos para os alelos *R* e *S* em homozigose, foi observado que a frequência do alelo *Slc11a1* S foi de 25% na população fundadora (F0), mas passou para 60% em AIRmin e para 9% em AIRmax após 30 gerações. Os resultados mostraram que o desvio de frequência resulta do processo de seleção e implica que este gene, ou outros genes, estão estreitamente ligados, no controle da reação inflamatória aguda. (PETERS et al., 2007; BORREGO et al., 2006).

No trabalho de De Franco et al., (2007) também foi observada a presença do gene *Angiopoietin-1* (*Ang1)* no cromossomo 14, o qual esta envolvido no processo de angiogênese. Estes dois genes - *Slc11a1* no cromossomo 01 e *Ang1* no cromossomo 14 - são importantes candidatos na modulação do fenótipo de reparo e regeneração tecidual em camundongos que apresentam um fundo genético heterogêneo selecionado para a resposta inflamatória aguda.

Nossa hipótese na presente dissertação é que os animais AIRmax e AIRmin apresentam diferenças importantes de expressão de genes envolvidos na fase

inflamatória inicial do processo de regeneração da orelha após injuria por perfuração. Assim, em continuidade ao estudo desenvolvido por De Franco et al. (2007) realizamos estudos para uma melhor caracterização da fase inflamatória, através de ensaios de edema (espessamento das orelhas), quantificação da enzima mieloperoxidase e estudo histológico das orelhas injuriadas. A partir dos resultados obtidos foi possível analisar a expressão gênica global na orelha destes animais para identificação de genes candidatos nos QTL dos cromossomos 1 e 14.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os mecanismos regulatórios genéticos e celulares durante a fase inflamatória do processo de regeneração tissular dos animais selecionados para alta resposta inflamatória (AIRmax) e baixa resposta inflamatória (AIRmin).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferenças histológicas durante o processo de regeneração da orelha nos animais da seleção AIR após a injúria.
- Avaliar o edema na orelha de camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin após perfuração de 2 mm;
- Quantificar a enzima Mieloperoxidase (MPO) nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas após realização da injúria na orelha dos animais AIRmax e AIRmin
- Analisar a expressão gênica global por meio da técnica de *microarray* nos animais experimentais e controles AIRmax e AIRmin.
- Validar os ensaios de *microarray* através de experimentos de PCR em tempo real.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo animal

Toda produção e forma de utilização dos animais envolvidos passaram pela aprovação do Comitê de Ética no Uso de Experimentação com Animais do Instituto Butantan (CEUAIB). Estão de acordo com os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação com Animais (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEEA).

Os animais foram produzidos e mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Sendo utilizados camundongos geneticamente selecionados para máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) resposta inflamatória aguda, com idade entre 2 e 4 meses, sendo machos e fêmeas em iguais proporções.

3.2 Modelo de regeneração tissular em animais selecionados para *AIR*

Uma perfusão de 2 mm de diâmetro nas orelhas dos animais foi realizada, utilizando um perfurador de orelhas de metal (Fisher Scientific), cujo diâmetro foi monitorado com o auxílio de um paquímetro durante 45 dias (DE FRANCO et al., 2007).

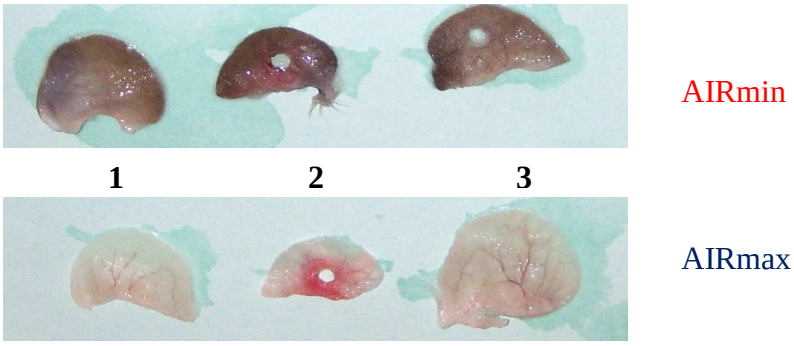


Figura 3 - Caracterização do modelo de regeneração tissular em camundongos AIRmax e AIRmin. 1 - Orelhas de animais controle; 2 - Orelhas com 2 dias de injúria; 3 - Orelha de AIRmin 40 dias após a injúria (não regenerada) e orelha de AIRmax 40 dias após injúria (totalmente regenerada).

3.3 Preparação Histológica

Após extração e coleta das orelhas dos camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin, as mesmas foram adicionadas em frasco com formol 10% por 24 horas, sendo em seguida processadas. O processo foi iniciado com a inclusão do material em uma série crescente de alcoóis para desidratação, xilol para clarificação e por último as amostras foram inclusas em parafina. Os cortes foram feitos com 5 µm de espessura e colocados em estufa 56ºC para completa fixação e início da desparanifização. O processo foi finalizado com a imersão das laminas em xilol e uma série de alcoóis decrescente para completa rehidratação dos cortes. As lâminas foram coradas com hematoxilina- eosina para avaliação.

3.4 Indução de edema (Espessamento da Orelha)

O processo de indução de edema foi realizado mediante cinética de 4 dias (0, 1, 2, 3 e 4). Os animais selecionados para resposta inflamatória aguda AIRmax e AIRmin tiveram uma de suas orelhas perfuradas por um furador específico de 2 mm. Para mensurar o aumento na espessura próxima à extremidade medial da orelha foi utilizado um micrômetro analógico (Starrett) e as medidas foram comparadas com controles. O resultado obtido foi expresso em média ± desvio padrão e utilizou o teste estatístico T-student. (GAD, 1994).

3.5 Determinação da atividade de Mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos na orelha dos camundongos foi mensurado indiretamente com o ensaio de quantificação de mieloperoxidase (MPO). Para este estudo as orelhas foram seccionadas e colocadas em um tubo plástico com 1 mL da solução detergente HTAB 0,5% pH 6,0 (250 mg brometo de hexadeciltrimetilamônio, 92,5 mg de EDTA e 50 mL de tampão fosfato). A homogeneização do tecido extraído foi realizada por meio do aparelho Polytron (Brinkmann Instruments). Logo

após as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.500 g a 4 ºC. Em uma placa contendo 96 poços de fundo redondo foram pipetados 10 μl da amostra em duplicata e em seguida 200 μl de tampão substrato (2 mL de orto-dianisidina, 200 μl de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,1% e 39 mL de tampão fosfato). O tampão reage com as amostras por 5 minutos e após este período foram adicionados 50 μl de solução de azida diluída (2 mL de azida e 6 mL de água destilada) para promover a parada da reação. O branco foi feito com 200 μl de tampão substrato e 50 μl de solução de azida diluída, e a leitura realizada em leitor de ELISA (μQuant – Bio-Tek Instruments) sob comprimento de onda a 450 nm (FENG et al., 2008).

3.6.Protocolo para extração de RNA através do kit RNAspin Mini (GE Healthcare)

O mRNA foi obtido em dois períodos: 24 e 48 horas. Neste procedimento as orelhas de animais-controle e experimentais foram seccionadas e passadas em nitrogênio líquido. Estas amostras foram colocadas em tubos *ependorffs* com 350 μl de tampão RA1 e 3,5 μl de β-mercaptoetanol (para que ocorresse lise celular) e posteriormente submetidas ao agitador. Após a lise, as amostras foram filtradas em um mini filtro RNAspin e centrifugadas durante 1 minuto a de 9.500 g. Em seguida, o filtrado foi transferido para um novo tubo coletor de 1,5 mL.

Neste segundo tubo foi adicionado, junto ao filtrado, 350 μl de etanol 70% e as amostras foram passadas pelo agitador durante 2 a 5 segundos para o ajuste das condições de ligação do RNA. Ainda nesta fase, as amostras foram homogeneizadas de 2 a 3 vezes, colocadas em uma nova coluna de RNAspin localizada dentro de um tubo coletor de microcentrífuga de 2 mL e logo após centrifugadas durante 30 segundos, a 8.000 g.

Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor, sendo então adicionados às amostras 350 μl de *membrane desalting buffer* (MDB) e submetidas a posterior centrifugação a 11.000 g durante 1 minuto para a secagem da membrana. Este processo é realizado para a dessalinização da membrana de sílica, visto que a remoção do sal promove uma melhor digestão pela DNAseI.

Para a digestão do DNA foram pipetados, em cada amostra, 95 µl de reação da DNAse (10 µl de DNAseI reconstituída + 100 µl do tampão de DNAse) no centro da membrana de sílica da coluna, tendo sido posteriormente incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Finalizado o período de incubação as membranas foram lavadas e secas.

Na etapa final da extração, são necessários três processos de lavagem. Na primeira, foram adicionados 200 µl de tampão RA2 (inativa a DNAse I) à coluna RNAspin, e em seguida, centrifugação por 1 minuto a 9.000 g. Após este processo, a coluna é transferida para dentro de um novo tubo coletor.

Para a segunda lavagem, foram adicionados à coluna RNAspin 600 µl de tampão RA3, seguida de centrifugação durante 1 minuto a 9.000 g. O sobrenadante foi descartado e a coluna colocada de volta dentro do tubo coletor.

Na terceira lavagem, são adicionados 250 µl de tampão RA3 na coluna RNAspin e uma nova centrifugação é feita para a secagem da membrana durante 2 minutos a 9.000 g.

Na finalização do processo, a coluna foi colocada dentro de um tubo *nuclease free* de 1,5 mL, sendo realizado então a eluição do RNA presente na membrana da coluna através da adição de 50 µl de água *RNAse free* diretamente sobre a membrana, que foi centrifugada por 1 minuto a 9.000 g.

A concentração de RNA nas amostras foi mensurada por espectrofotometria sob comprimento de onda de 260 nm e expressa em unidades de densidade óptica (D.O.). Nesta etapa de quantificação foi observada a relação em torno de 2,0 para a razão RNA/proteínas (260 nm/280 nm).

3.7 Integridade do RNA por gel de agarose 1%

Para verificar a integridade do RNA extraído foi feito um gel de agarose a 1% e analisado por eletroforese (Figura 4). O gel foi preparado com TBE (Tris-base 1 M, ácido bórico 1 M e EDTA 20 nM) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BET) (Pharmacia). Com as amostras já aplicadas o gel foi colocado em cuba eletroforética e recoberto com tampão TBE. Este gel foi submetido a uma corrente elétrica de 80

Volts por cerca de 30 minutos. Para a avaliação da presença de bandas o gel foi revelado em “Pharmacia Biotech – Image Master VDS” sob luz ultravioleta

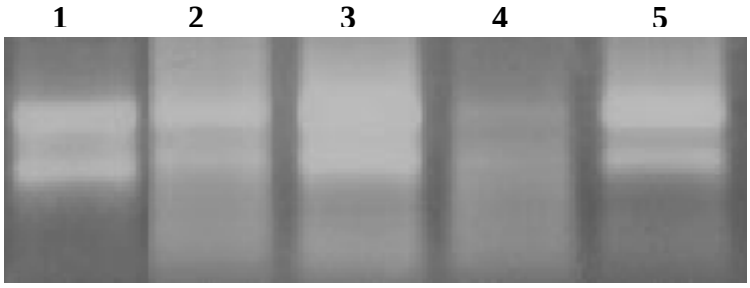


Figura 4 - Gel de integridade do mRNA de animais da seleção AIR. 1- RNA Hela controle positivo, 2-*Pool* de animais-controle AIRmax, 3-*Pool* de animais-experimentais AIRmax, 4-*Pool* de animais-controle AIRmin, 5-*Pool* de animais-experimentais AIRmin.

3. 8 Análise da expressão gênica global por *microarray*

Os reagentes utilizados na preparação dos *microarray*s fazem parte da plataforma do “CodeLink Gene Expression System” (GE Healthcare). As principais etapas desta análise foram definidas como: **1)** Preparação dos mRNAs bacterianos; **2)** Síntese do cDNA de fita simples; **3)** Síntese do cDNA de fita dupla; **4)** Purificação do cDNA de dupla fita **5)** Síntese do cRNA por transcrição in vitro (IVT). **6)** Purificação do cRNA**, 7)** Fragmentação do cRNA**, 8)** Hibridação**, 9)** Detecção com Cy5-Streptavidina**, 10)** Análise dos dados obtidos.

3.8.1 Preparação dos mRNAs bacterianos

Os mRNAs bacterianos em solução são utilizados como controle interno da lâmina, que possui sequências que se hibridizarão a esses controles. Para o preparo da solução-estoque 1 de mRNAs (16,7 ng/μl) foi combinada uma série de mRNAs bacterianos (*araB, entF, fixB, gnd, hisB* e leu*B*) na concentração de 0,1 μg/μl, sendo 2,5 μl de cada, totalizando um volume de 15 μl. Esta solução foi dividida em 5 tubos (3 μl em cada) e armazenada em freezer a -70 °C. Uma nova diluição foi realizada (solução-estoque 2) de concentração 50,2 pg/μl, através da adição de 3 μl da

solução-estoque 1 e 997 μl de água livre de nuclease. A partir desta solução foi, realizada a solução-trabalho, na qual 2 μl da solução-estoque 2 foram adicionados a 998 μl de água livre de nuclease.

3.8.2 Síntese do cDNA de fita simples

Para cada amostra de RNA total (2 μg de cDNA em 9 μl água) foi adicionado 1 μl (concentração de 0,1 pg/μl) da solução-trabalho de mRNAs bacterianos-controle (1μl para cada 1 μg de RNA total) e 1 μl de T7 oligo (dT). Essa solução foi incubada por 10 minutos a 70 °C em termociclador (Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200) e colocada imediatamente em contato com gelo durante 3 minutos. Em seguida, foram adicionados á solução anterior, 2 μl do tampão fita simples 10X concentrada, 4 μl de dNTP (5 mM), 1 μl de inibidor de RNAse e 1 μl de transcriptase reversa. Esta solução de volume final 20 μl foi incubada durante 2 horas a 42 °C em aparelho termociclador (Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200).

3.8.3 Síntese do cDNA de fita dupla

Os tubos da reação anterior foram mantidos em gelo, e receberam 63 μl de água livre de nuclease, 10 μl do tampão fita dupla 10X concentrado, 4 μl de dNTP (5 mM), 2 μl de DNA polimerase e 1 μl de RNAse H. Esta solução de volume final 80 μl foi incubada durante 2 horas a 16 °C em termociclador (Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200), porém, sem aquecimento da tampa.

3.8.4 Purificação do cDNA de dupla fita

A purificação do cDNA foi feita através da utilização do kit CodeLink™ iExpress iPurify cDNA/cRNA Purification (GE Healthcare). Foram adicionados 250 μl do tampão de ligação ao cDNA fita dupla da etapa anterior. A solução foi misturada cuidadosamente, colocada na coluna de purificação e centrifugada a 9.000 g por 1 minuto. Em seguida, a coluna foi lavada com adição de 500 μl de tampão de lavagem e centrifugada a 9.000 g por 1 minuto. Após este procedimento, a coluna foi seca com uma nova centrifugação a 9.000 g durante 1 minuto. Para a eluição do cDNA, foram adicionados 12 μl de água livre de nuclease pré-aquecida (58 ℃) diretamente sobre a membrana. Após o período de incubação de 2 minutos, a coluna foi centrifugada a 9.000 g por 1,5 minuto. Este passo foi repetido para gerar pelo menos 20 μl de eluato final.

3.8.5 Síntese do cRNA por transcrição in vitro (IVT)

Ao tubo da reação anterior foram adicionados 4 μl de tampão de reação T7 10X concentrado, 4 μl do mix de enzima T7 10X concentrado e 12 μl do mix NTP-Biotina. A reação foi protegida da luz e incubada por 18 horas em estufa a 37 °C.

3.8.6 Purificação do cRNA

A purificação do cRNA foi feita através da utilização do kit CodeLink™ iExpress iPurify cDNA/cRNA Purification (GE Healthcare). Os volumes dos tubos foram ajustados para 100 μl, através da adição de 60 μl de água livre de nuclease. Foram adicionados 350 μl de tampão de ligação para cRNA e em seguida, acrescidos 250 μl de etanol 100%.As amostras foram colocadas imediatamente na coluna e centrifugadas por 1 minuto a 8.000 g. Este passo foi repetido para completa secagem da membrana. Para a eluição do cRNA, foram adicionados diretamente

sobre a membrana 100 μl de água livre de nuclease pré-aquecida (50-60 ℃) . Após o período de incubação de 2 minutos, a coluna foi centrifugada a 9.000 g por 1,5 minuto.

O cRNA purificado foi submetido à análise de pureza e integridade. A concentração e pureza foram determinadas através de espectrofotômetro sob comprimento de onda de 260 nm e expresso em densidade óptica (D.O.). Nesta etapa de quantificação do RNA para a obtenção da pureza das amostras, foi observada a relação em torno de 2,0 para a razão RNA/proteínas (260 nm/280 nm). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TBE (Tris-base 1 M, ácido bórico 1 M e EDTA 20 nM) contendo 0,5 μg/ml de brometo de etídio (BET) (Pharmacia). O gel contendo as amostras foi colocado em uma cuba eletroforética e recoberto com TBE, sendo em seguida submetido a uma corrente elétrica de 80 Volts por 30 minutos. O gel foi então analisado no "Pharmacia Biotech – Image Master VDS" e a avaliação da integridade do cRNA foi verificada pela presença de um *smear* abaixo da banda 18 s do RNA íntegro (controle).

3.8.7 Fragmentação do cRNA

À alíquota de 10 μg de cRNA em 20 μl água foram adicionados 5 μl de tampão de fragmentação 5X concentrado e a amostra foi incubada em termociclador (Eppendorf, – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200) a 94 °C, durante 20 minutos, utilizando tampa aquecida. Em seguida os tubos foram colocados a 0 °C por 5 minutos.

3.8.8 Hibridação

Após transferir as amostras para um tubo de 1,5 ml, foram adicionados 78 μl de tampão de hibridazação A, 130 μl de tampão de hibridização B e 27 μl de água livre de nuclease. Em seguida, a solução foi incubada a 90 °C por 5 minutos para desnaturar o cRNA. Logo após, os tubos foram colocados no gelo e cada lâmina foi

preenchida com 250 μl da solução, sendo em seguida colocada no agitador a 300 g e a 37 °C, onde permaneceu por 18 horas.

3.8.9 Detecção com Cy5-Streptavidina

A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão TNT 0,75X concentrado (Tris-HCl pH 7,6, NaCl 5 M e Tween 20 - 0,05%) e colocadas em outro recipiente de tampão TNT 0,75X concentrado pré-aquecido a 46 °C por exatamente 1 hora. Depois, foram colocadas em um recipiente com Cy5-streptavidina (1:500) em tampão TNB (Tris-HCl pH 7,6, NaCl 5 M e 0,5% de NEN *blocking* – PerkinElmer) e incubadas, protegidas da luz, por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em tampão TNT 1X concentrada durante 5 minutos, por três vezes. Como última lavagem, as lâminas foram colocadas em um recipiente com tampão SSC 0,1X concentrado/0,05% Tween 20 e agitadas durante 30 segundos, sendo em seguida secas em centrífuga a 664 g por 3 minutos.

3.8.10 Análise dos dados obtidos

As lâminas foram analisadas com o *GenePix Array Scanner*. O estudo de expressão gênica foi realizado com a plataforma *CodeLink Gene Expression System* (GE Healthcare), que é composta por lâminas contendo oligonucleotídeos representando cerca de 36.000 genes distintos, com seqüências catalogadas em banco de dados (NCBI). 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. Os primeiros parâmetros avaliados foram os controles internos,

repetidos de maneira aleatória por toda a lâmina. Na figura 5, são vistos os controles bacterianos negativos que possuem a expressão gênica abaixo da fluorescência de fundo, ou seja, abaixo do *background* ou ruído da lâmina. Na figura 6 estão demonstrados os controles positivos, nos quais a expressão gênica está acima do valor da fluorescência de fundo, isto é, acima do *background* ou ruído da lâmina. Estes resultados asseguram a confiabilidade e a qualidade dos experimentos.

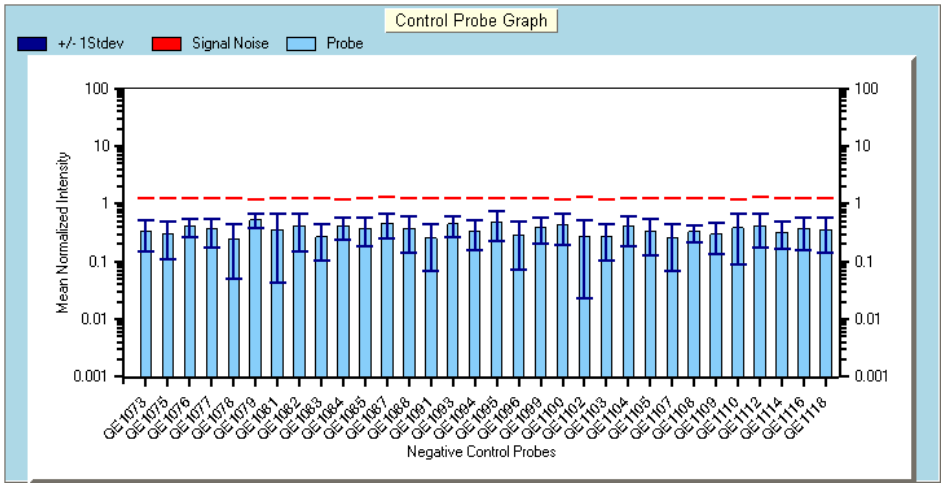


Figura 5 - Controles negativos da lâmina de *microarray*. As sequências-alvo dos mRNAs bacterianos estão distribuídas aleatoriamente pela lâmina. As expressões dos controles internos da lâmina estão abaixo da fluorescência de fundo.

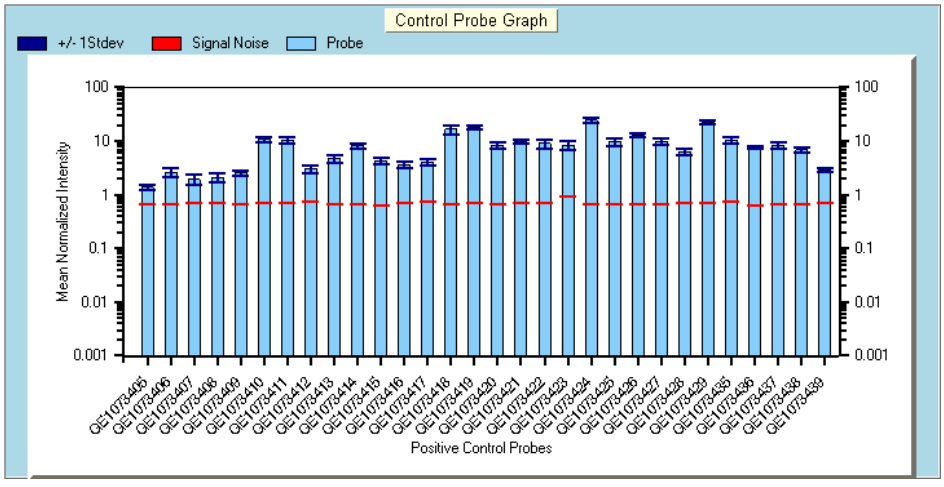


Figura 6 - Controles positivos da lâmina de *microarray*. As sequências-alvo dos mRNAs bacterianos estão distribuídas aleatoriamente pela lâmina. As expressões dos controles internos da lâmina estão acima da fluorescência de fundo.

Os genes expressos diferencialmente foram identificados pelas razões dos valores de intensidade da fluorescência obtidos a partir de amostras-controle e experimentais entre as linhagens, através do programa *CodeLink Expression* v.2.3 (GE Healthcare). Estes dados foram inseridos na plataforma Mev e analisados pelo método programa de significância de *microarray* (SAM). SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) é um programa estatístico para encontrar genes diferencialmente expressos significativamente em réplicas de experimentos de *microarrays*. O SAM compara as expressões gênicas de cada experimento, assim como suas respostas variáveis. O SAM calcula um *score* estatístico d_i (SAM score: valor *t*-estatístico) para cada gene *i*, medindo a força da relação entre a expressão gênica e suas respostas variáveis. Ele usa permutações repetidas dos dados para determinar se a expressão de alguns genes está significativamente relacionada com a resposta. O valor de *cut-off* para a significância é determinado pelo parâmetro delta (*threshold*), escolhido pelo usuário baseando-se na taxa de falsos-positivos (FDR < 0,05) (CHU et al., 2006). A plataforma Mev também disponibiliza os gráficos de cores para expressão gênica.

Para as análises de agrupamentos funcionais foi utilizado o programa *Expression Analysis Systematic Explorer* (*EASE*). Esse *software* permite que os genes diferencialmente expressos possam ser agrupados em “temas biológicos”, de acordo com sua categoria funcional, localização cromossômica e representação em relação ao genoma total. O *EASE* calcula a sobrerrepresentação dos genes em relação ao total de genes utilizados no ensaio e anotados dentro de cada sistema, tendo o *Gene Ontology* como padrão. Utilizamos a conversão da identificação dos genes para números do *LocusLink* (HOSACK et al., 2003).

3.9 Obtenção do cDNA para PCR em tempo-real (qPCR)

A síntese de cDNA foi feita através de uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificad. A um volume de 10 µl contendo 1 µg de RNA, foram adicionados 1 µl de Oligo (dT)12-18, 2µl de água livre de RNase (50 mM) e 1 µl de oligonucleotídeos dNTP (10 mM). A mistura foi homogeneizada e submetida a temperatura de 65 ºC por 5 minutos. Após este período, permaneceu no gelo por 1

minuto. Foram adicionados 4 µl de tampão específico 5X concentrado (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl e 15 mM $MgCl_2$), 1µl de DTT (0,1 M) e 1 µl da enzima SuperScript III RNAse H- Reverse Transcriptase – Invitrogen (200 U/ml). As amostras foram aquecidas a 50 ºC por 50 minutos e inativadas a 70 ºC por 15 minutos. As reações foram incubadas em aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200 (WANG et. al., 2006).

3.10 PCR em tempo-real (qPCR)

A expressão gênica foi realizada com amostras individuais de cDNA das orelhas de animais-controle e experimentais das linhagens AIRmax e AIRmin. Cada amostra de 1 µl de cDNA foi adicionada a uma reação contendo as sequências específicas de *primers* (5 µM); 6,25 µl de Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen) e água para ajustar o volume final de reação em 12,5 µl por tubo. Na tabela 1 apresentada abaixo a relação dos genes analisados.

Tabela 1 - Relação dos *primers* utilizados nas reações de qPCR.

Primers	**Foward**	***Reverse***
Ciclofilina	5'-AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT-3'	5'-AAATGCCCGCAAGTCAAAAG-3'
Cxcl2	5'CCTGGTTGAGAAAATCATCCA3-'	5'-CTTTGGTTCTTCCCGTTGAGG-3'
Mmp9	5'-CGCTACTGTACCCGCTGTAT-3'	5'-TGGGACACATAGTGGGAGGT-3'
IL-1β	5'-CAGTTCTGCCATTGACCATC-3'	5'-TCTCACTGAAACTCAGCCGT-3'
IL-8rb	5'-GACTGTTCACCTAAACGGTG-3'	5'-CATACCAAGATGGAAGGGAGC-3'
TGF-β1	5'-ACCGCAACAACGCCATCTAT-3'	5'-GTAACGCCAGGAATTGTTGC-3'
TNF-α	5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3'	5'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'

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 etapa de ativação da enzima (*hot start*) a 95 ºC por 5 minutos. As seqüências alvo foram então amplificadas durante 40 ciclos, constituídos de etapas sucessivas de

desnaturação (95 °C por 20 segundos) e de anelamento (60 ° C por 35 segundos). A fluorescência foi incorporada ao material de dupla-fita amplificado 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 comece a aumentar acima da fluorescência de fundo, ou seja, no início da fase logarítmica de amplificação, a qual depende diretamente do número de cópias das seqüências alvo presente inicialmente em cada amostra.

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase *melting* na qual a temperatura variou de 55 ℃ a 90 ℃ e a f luorescência foi adquirida a cada 1 ℃, foi registrada a temperatura de dissociação (ou de desnaturação da dupla-fita do material amplificado), que indica o tamanho e, portanto, a especificidade do produto amplificado em cada reação. Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa *Opticon Monitor Analysis Software 2.03*.

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 usadas para calcular níveis de expressão relativos a um calibrador, que pode ser uma amostra-controle (amostra não tratada) - neste trabalho os animais AIRmin controle foram utilizados como calibradores. 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 et al. (2001), que permite avaliar o efeito do tratamento experimental em relação a um controle interno. Ao utilizar este método, torna-se importante a avaliação da eficiência dos *primers*, eficiência a 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ indica a mudança, em vezes, na expressão gênica relativa ao calibrador, permitindo a comparação entre todos os grupos experimentais e controle.

Portanto, a partir dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras individuais foram realizadas as médias aritméticas e desvio-padrão para cada linhagem analisada e

dos seus respectivos grupos-controle. Os gráficos apresentados nos resultados demonstram as quantidades iniciais de mRNA nos animais experimentais e controle, sendo que destas amostras foi subtraído o valor do gene constitutivo ciclofilina.

A figura 7 exemplifica a amplificação da ciclofilina nas amostras experimentais e controle bem como as respectivas curvas de *melting*. Observa-se que não existe variação no Ct (*Cycle Threshold*) de animais-controle e estimulados, pois as curvas aparecem e permanecem juntas durante todo o ciclo de amplificação, indicando que o tratamento não interfere na expressão do gene constitutivo.

O mesmo é verificado nas curvas de *melting*, nas quais as amostras apresentaram um único pico de dissociação, evidenciando que todas as duplas-fitas do material analisado separam-se na mesma temperatura. Isto indica a amplificação de uma banda específica de mesmo tamanho (ciclofilina).

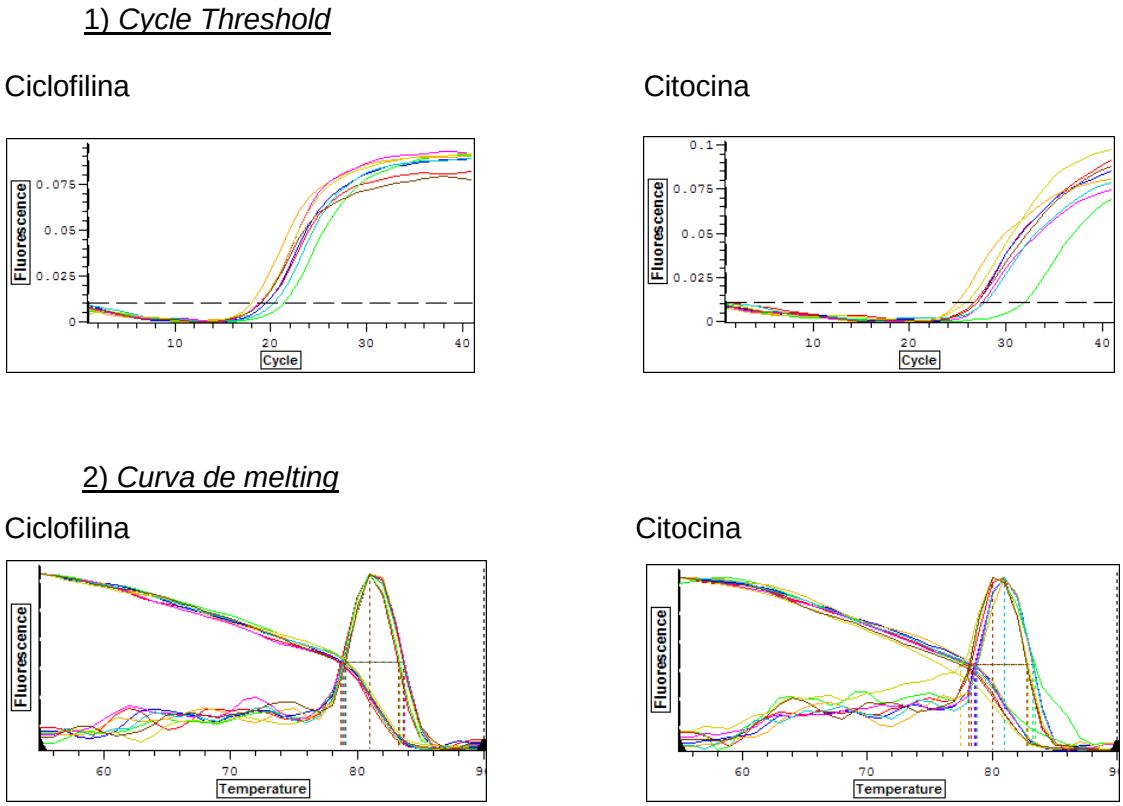


Figura 7 - qPCR exemplificando a quantificação da ciclofilina e da citocina na orelha de animais das linhagens AIRmax, AIRmin controles e experimentais. Ensaio realizado no Chromo 4 (MJ Research) utilizando Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen).

3.11 Análise Estatística

Para as análises entre os dois grupos de animais AIRmax e AIRmin foi utilizado o teste *ANOVA*, sendo estabelecido o nível mínimo de significância de $p \leq 0,05$ (5% de probabilidade).

Para os ensaios de edema e quantificação de MPO foram utilizado o teste t-student, e na análise de expressão gênica global utilizamos *EASE score* e Bonferroni.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do modelo de regeneração tecidual nas linhagens AIRmax e AIRmin

Na primeira parte do estudo os animais da seleção AIR foram submetidos ao protocolo de reparo e regeneração tissular estudado por De Franco (2007). Foram utilizados 27 camundongos sendo 14 AIRmax (6 machos e 8 fêmeas) e 13 camundongos AIRmin (6 machos e 7 fêmeas). Estes animais tiveram a orelha perfurada por um furador de metal (Fisher Scientific), de 2 mm de diâmetro e foram monitorados semanalmente com o auxílio de um paquímetro.

Os animais AIRmax apresentam uma regeneração tecidual mais rápida em relação aos animais AIRmin ao final do período estudado, restaurando totalmente o tecido. Os animais AIRmin não conseguiram regenerar o tecido, permanecendo o orifício e confirmando os resultados anteriores.

4.2 Estudo histológico dos animais da seleção AIR

Para uma melhor caracterização do processo inflamatório e das células presentes frente ao estímulo de perfusão da orelha, foi realizado um estudo histológico com os camundongos AIRmax e AIRmin. Foram coletadas orelhas de um animal de cada linhagem para confecção das lâminas sendo divididos em controles e experimentais nos períodos de 2 e 45 dias após injúria.

A figura 8 mostra os resultados encontrados nos animais controles (com as orelhas não perfuradas) e dos experimentais. As lâminas dos animais controles mostram uma cartilagem sem danos e nenhum sinal de processo inflamatório. Com 2 dias após injúria tanto os animais AIRmax quanto os animais AIRmin apresentam um infiltrado celular característico do processo inflamatório. Após 45 dias pode ser observada regeneração completa nos animais AIRmax, com neo-formação de núcleos de cartilagem, glândulas sebáceas e folículo piloso. Nos animais AIRmin

observa-se um reparo da estrutura injuriada mas não ocorre regeneração completa do tecido.

4.3 Avaliação do espessamento das orelhas nas linhagens AIR

Este protocolo foi realizado para a avaliação das diferenças na resposta inflamatória local entre os animais das linhagens AIRmax e AIRmin, para tanto foram utilizados 9 camundongos AIRmax (5 machos e 6 fêmeas) e 11 camundongos AIRmin (6 machos e 7 fêmeas). As orelhas sofreram uma perfusão de 2 mm no dia 0 e suas espessuras foram mensuradas por um micrômetro durante 4 dias. Os resultados obtidos foram dispostos na forma de gráfico através de suas médias aritméticas e desvio padrão.

Foi possível observar na figura 9 uma significativa formação de edema com 1 dia após a injúria, tendo o pico estabelecido em 2 dias, após este período a cinética começa a diminuir. O gráfico evidencia uma alta significância estatística dos resultados nos três primeiros dias do estudo. Também podemos observar que durante todo o processo os animais AIRmax apresentaram um maior inchaço em relação aos animais AIRmin. Neste estudo não foram observados diferenças significativas entre machos e fêmeas.

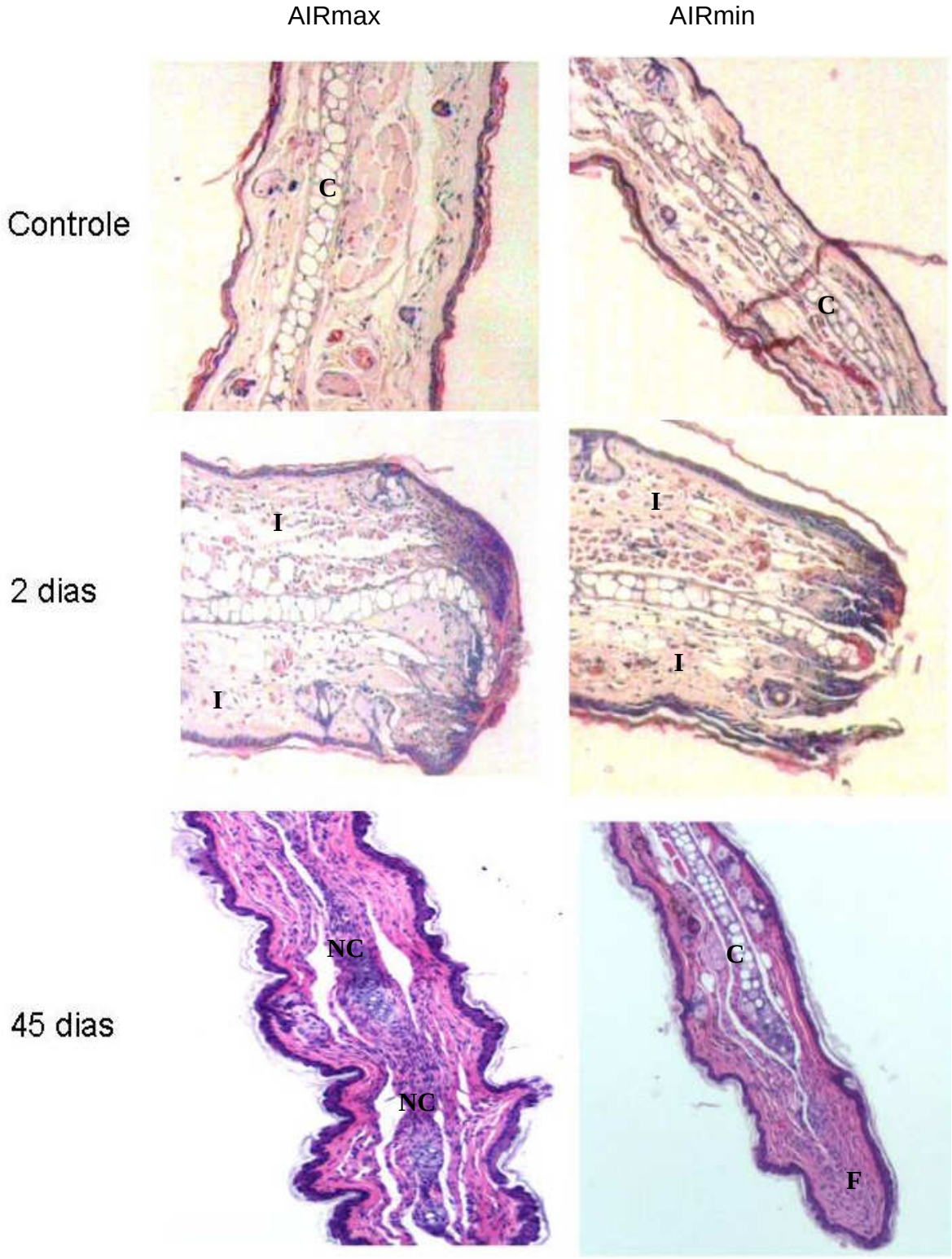


Figura 8 - Estudo Histológico das linhagens AIRmax e AIRmin controles e experimentais nos períodos de 2 dias e 45 dias. Legenda: **C** - cartilagem, **I** - Influxo de células inflamatórias, **NC** - formação do núcleo de cartilagem, **F** - acumulo de fibrinogênio e colágeno. Coloração realizada com hematoxilina e eosina. Aumento: 40 x.

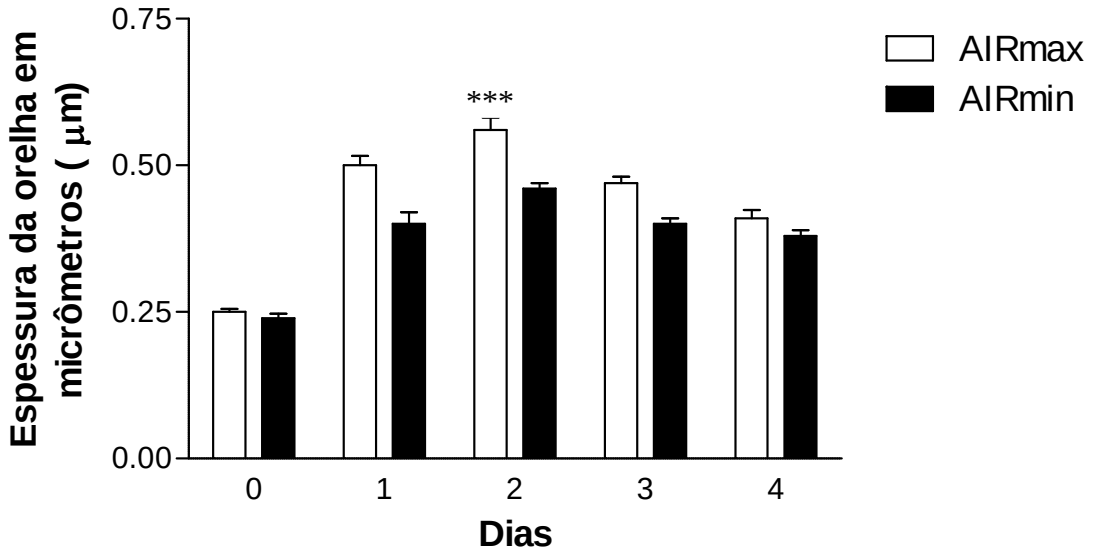


Figura 9 - Estudo do espessamento nas orelhas de camundongos AIRmax e AIRmin induzidos ao processo de regeneração tecidual. Foram utilizados animais experimentais e controles. Os resultados estão expressos em média aritmética ± desvio padrão. *** p<0,05 - entre AIRmax e AIRmin.

4.4 Quantificação da enzima Mieloperoxidase entre as linhagens

A enzima MPO é considerada um marcador indireto de neutrófilos ativados, que são uma das primeiras células a migrarem para o local da injúria em um processo inflamatório agudo dando início ao processo de reparo e regeneração do tecido.

Para melhor avaliar este período de migração dos neutrófilos, realizamos um estudo quantificando esta enzima durante os períodos de 24, 48, 72 e 96 horas após realização da injúria na orelha dos animais AIRmax e AIRmin.

Neste protocolo foram utilizados 6 animais para controle e 6 experimentais, sendo macho e fêmeas em iguais proporções. Na figura 10 foi possível verificar que após 24 horas há um aumento na quantidade da enzima mieloperoxidase o que podemos sugerir como início da migração de neutrófilos em ambas as linhagens, este processo vai aumentando gradativamente até chegar ao máximo em 72 horas após a injúria e declinando em 96 horas.

Durante o estudo verificamos que os animais AIRmax apresentam uma maior quantidade de enzima MPO em relação ao AIRmin. A diferença entre as duas

linhagens fica bem estabelecida em 72 horas, quando os camundongos AIRmax apresentam uma D.O. de 0,27, ao passo que os animais AIRmin, uma D.O. de 0,15. Não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas.

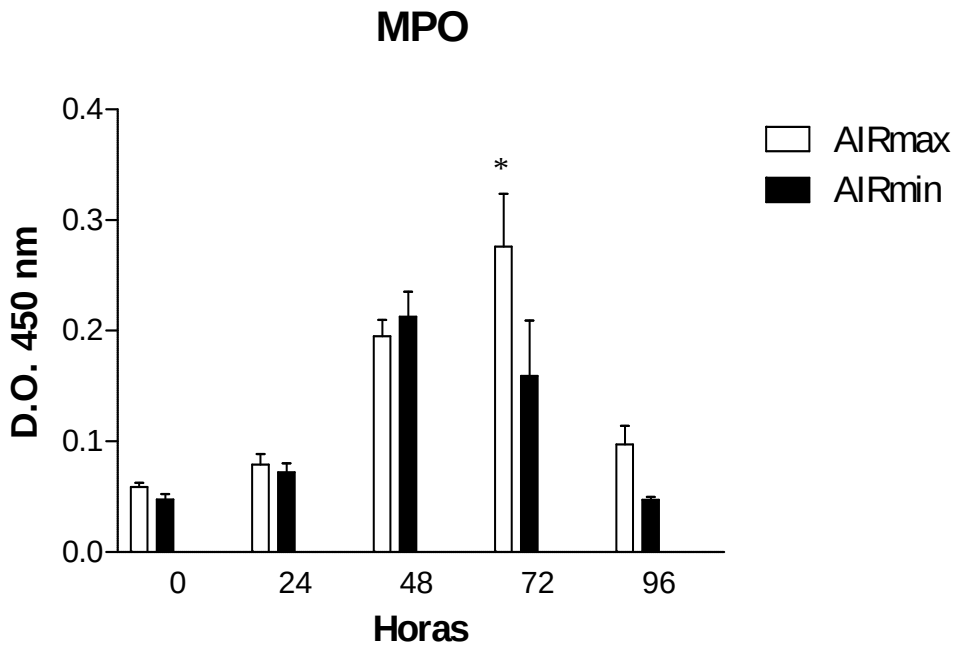


Figura 10 - Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) na orelha de camundongos AIRmax e AIRmin após injúria. Foram utilizados animais experimentais e controles (n = 3). Os valores estão expressos como média aritmética ± desvio-padrão. *p<0,05 – entre AIRmax e AIRmin, 0 - são animais controle.

4.5 Análise da expressão gênica global

O ensaio de expressão gênica global foi realizado 48 horas após a indução da injúria na orelha dos camundongos utilizando a plataforma *CodeLink Gene Expression System* (GE Healthcare).

Com este experimento foi possível analisar a quantidade de genes diferencialmente expressos entre os animais AIRmax e AIRmin e em quais processos biológicos eles estão envolvidos.

Na figura 11 é possível observar a modulação dos genes, sendo que os animais AIRmax apresentaram 794 genes ativados e 528 genes reprimidos em relação ao seu controle de um total de 1322 genes expressos. Já os animais AIRmin

apresentaram 1086 genes ativados e 1145 genes reprimidos em relação aos seus controles de um total de 2231 genes expressos.

Os animais AIRmin apresentaram duas vezes mais genes expressos (ativados e reprimidos) em relação aos animais AIRmax, na fase inflamatória (48 horas) no processo de regeneração da injúria.

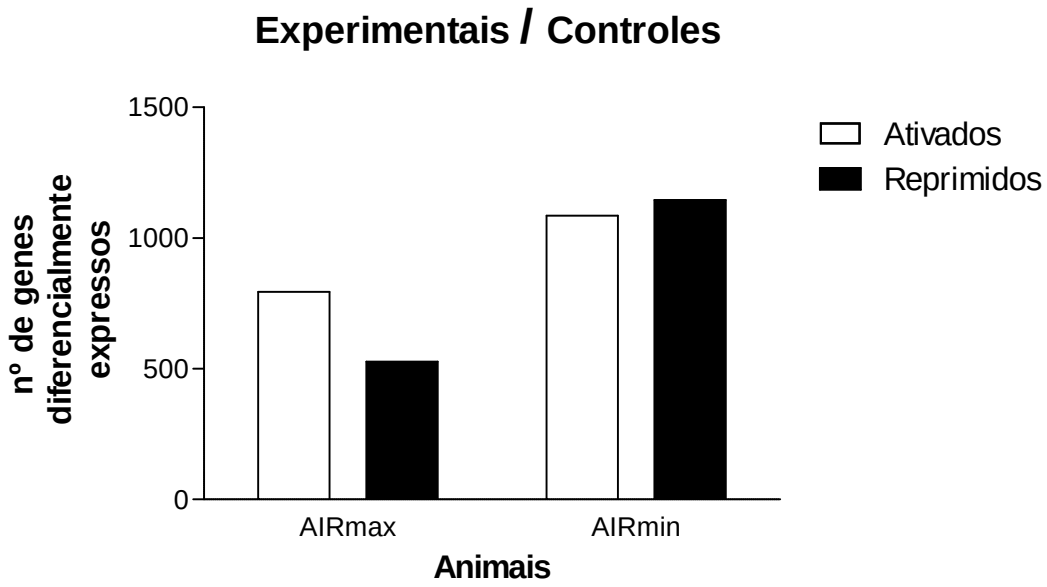


Figura 11 - Número de genes ativados e reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax e AIRmin em relação aos animais controles. Os animais experimentais foram submetidos ao protocolo de injúria durante um período de 48 horas, enquanto os animais controles não receberam nenhum estímulo. Neste experimento foram utilizados *pools* de 8 animais.

Verificamos também neste estudo a quantidade de genes que foram modulados para o fenótipo de reparo e regeneração tecidual entre os animais AIRmax/AIRmin experimentais e AIRmax/AIRmin controles (figura 12). Observamos que 686 genes foram mais expressos nos animais AIRmax controles, enquanto 358 foram mais expressos nos animais AIRmin. Em relação ao grupo experimental, 604 genes forma mais expressos nos AIRmax enquanto 111 genes forma mais expressos nos animais AIRmin.

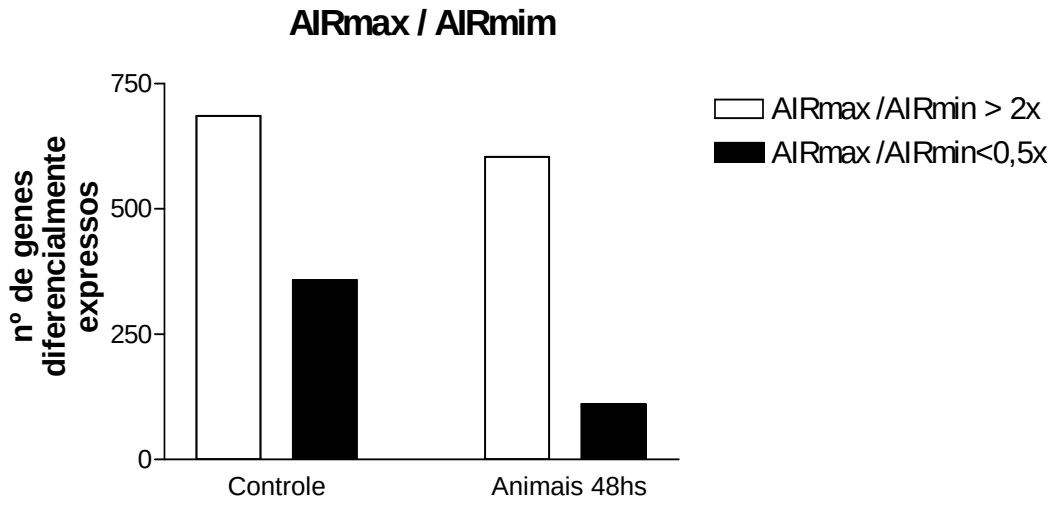


Figura 12 - Número de genes diferencialmente expressos para a análise entre os animais AIRmax/ AIRmin experimentais e controles. Neste experimento foram utilizados *pools* de 8 animais.

Os genes modulados foram então analisados através do programa *EASE*, com intuito de avaliar a sobrerrepresentação em categorias funcionais. Como descrito em Materiais e Métodos o programa EASE permite que os genes diferencialmente expressos sejam agrupados em “temas biológicos” de acordo com sua categoria funcional, localização cromossômica e sua representação em relação ao genoma total.

As tabelas 2 e 3 apresentam as categorias funcionais sobrerrepresentadas pelos genes ativados e reprimidos, respectivamente, nos animais AIRmax experimentais em relação aos seus controles. Somente estão representadas as categorias estatisticamente significantes.

As tabelas 4 e 5 demonstram as categorias funcionais sobrerrepresentadas pelos genes ativados e reprimidos, respectivamente, nos animais AIRmin experimentais em relação aos seus controles, sendo apresentados somente as categorias estatisticamente significantes.

As figuras 13 a 16 com mostram a representação por cores das expressões dos genes dessas tabelas (sendo cada figura intercalada com a tabela respectiva), obtidas pela plataforma Mev, possibilitando verificar em cada gene expresso, o grupo ao qual pertence e se está ativado ou reprimido.

Tabela 2 - Categorias funcionais sobrerrepresentadas nos genes ativados dos animais AIRmax em relação aos controles.

Categorias Funcionais	Nº de Genes	EASE score	Bonferroni	Genes Identificados
Resposta Inflamatória	30	6.61e-016	4.48e-013	*Fos, Fcer1g, Fcer1a, Cxcl14, Itgb2, Mefv, Pf4, Cxcl10, Cd302, Nfatc4, Cxcl12, Cxcl2, Ccl3, Ccl2, Ccl12, S100a9, Pla2g7, Ccr1, Dock2, Tpsb2, Cxcl1, Cd14, Tlr7, Tgfb1, Ly86, Rac2, Rac1, Tlr2, Ccl19, Ptx3.*
Resposta Imune	82	3.24e-011	2.20e-008	*C8b, Ifi202b, Oasl2, Dnajc3b, Fth1, Clec5a, Lgals3bp, Klra2, Fos, Fcgr3, Fcgr1, Fcer1g, Fcer1a, Cxcl14, Itgb2, Aire, Oas2, Irf1, Cfd, Cfp, Ada, Mefv, Igh-6, Ifitm1, Susd3, Pf4, Clcf1, Cd79b, Ifit1, Cxcl10, Cd302, Ifitm3, Oasl1, Ngp, Igl, Nfatc4, Sell, Cxcl12, Cxcl5, Cxcl2, Ccl6, Ccl3, Ncf2, Ccl2, Ccl12, Saa3, S100a9, Ctf1, Pla2g7, Ccr1, Gbp4, Dock2, Tyrobp, Cd84, Tpsb2, Cxcl1, Cd14, Tlr7, Pglyrp1, Lyz1, Lyz2, Tgfb1, Ly86, Ly6f, C1qc, C1qa, Serping1, Stab1, Homer3, Rac2, Rac1, Ltb, Lst1, Bst1, Ly6a, Ebi3, Tlr2, Ccl19, Ptx3, Gbp1.*
Quimiotaxia	16	2.14e-006	1.45e-003	*Cxcl14, Itgb2, Cmtm7, Pf4, Cxcl10, Cxcl12, Cxcl2, Ccl6, Ccl3, Ccl2, Ccl12, Ccr1, Dock2, Lsp1, Ccl19, Ptafr.*

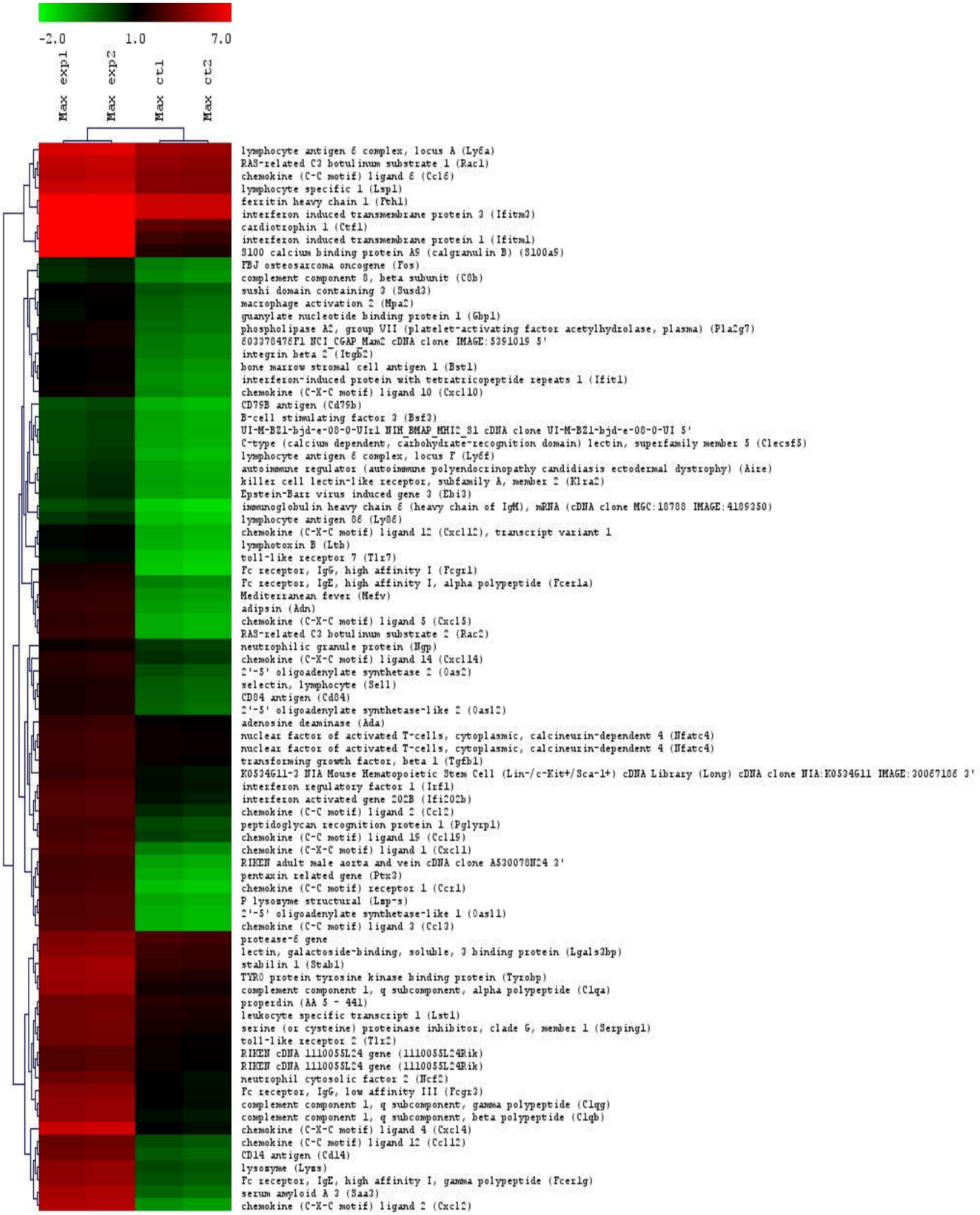
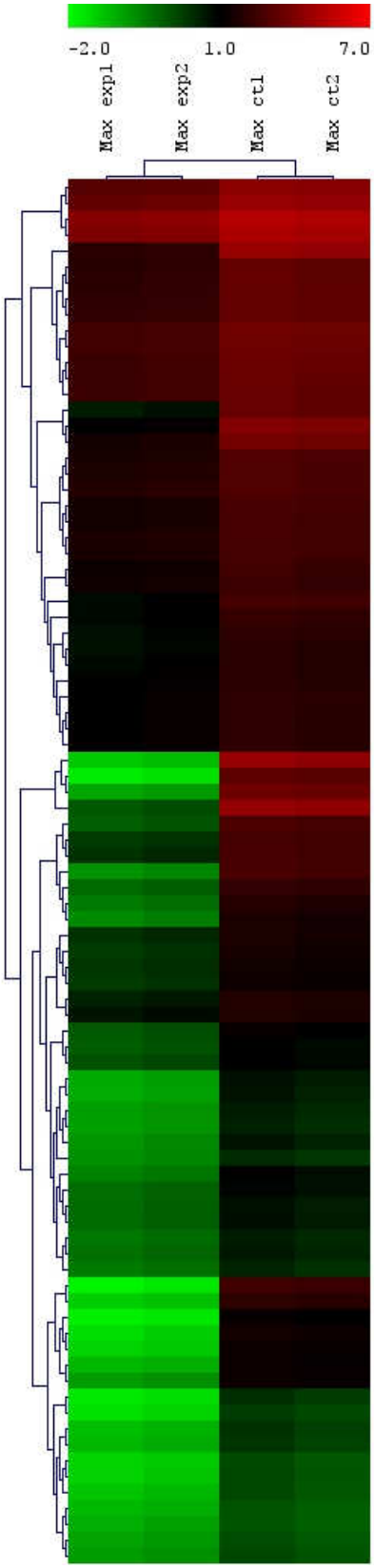


Figura 13 - Perfil de expressão dos genes ativados dos animais AIRmax e sobrerrepresentados para os temas biológicos de resposta inflamatória, resposta imune e quimiotaxia. Os experimentos de microarranjos foram feitos com “pools” de RNA de 6 animais em cada grupo. As cores representam os níveis de expressão altos (vermelho) e baixos (verdes) dos animais controles e 48 após perfusão da orelha.

Tabela 3 - Categorias funcionais sobrerrepresentadas nos genes reprimidos dos animais AIRmax em relação aos controles.

Categorias Funcionais	Nº de Gene	EASE score	Bonferroni	Genes Identificados
Transporte	51	4.89e-004	2.79e-002	Rassf9, Slc7a1, Atp2b2, Chic2, Eif4enif1, Kcne3, Ppp3ca, Gphn, Ap3s2, Ank, Amph, Klhl7, Slco1a4, Acot6, Kctd7, Syt2, Rims2, Sv2a, Tmem177, Mlst8, Cacng6, *Snap91*, Tmem104, Elmo1, Lca5, Slc6a2, Slc20a2, Abca5, Ncam1, Abcc5, Scn9a, Lgals8, Vti1a, Sytl1, Slco5a1, Slc1a4, Clca1, Slc24a3, Kcnq4, Slc24a1, Rab38, Dctn4, Trpc1, Grin2a, Grid2, Kctd15, Slc25a13, Hps4, Kif20a, Slco1a5, Map4k2.
Crescimento celular e/ou manutenção	85	6.22e-003	3.86e-002	*Rassf9, Decr2, Frk, Slc7a1, Atp2b2, Chic2, Eif4enif1, Krt33a, Kcne3, Cbx7, Ppp3ca, Krt86, Krt33b, Krt15, Gphn, Ap3s2, Ank, Amph, Ext1, Klhl7, Cttnbp2, Slco1a4, Ereg, Acot6, Kctd7, Arhgap10, Syt2, Rims2, Sv2a, Asah2, Tmem177, Mlst8, Cacng6, Dst, Nampt, Sos1, Snap91, Tmem104, Elmo1, Lca5, Slc6a2, Slc20a2, Abca5, Nfib, Clstn1, Neb, Nck2, Ncam1, Tspan5, Abcc5, Scn9a, Aif1l, Pard3b, Lgals8, Vti1a, Sytl1, Slco5a1, Myocd, Slc1a4, Kif20a, Nr6a1, Bmp6, Slco1a5, Map4k2.*
Sinalização Celular	11	4.67e-003	5.01e-002	*Dlg2, Tac1, Amph, Rims2, Sv2a, Nampt, Slc6a2, Clstn1, Ncam1, Grin2a, Grid2.*
Organogenesis	26	5.12e-003	5.01e-002	*Hopx, Gphn, Otor, Fgfr2, Ank, Itga4, Ext1, Ereg, Pbx1, Slitrk6, Il25, Snta1, Dnase2a, Nfib, Tspan5, Cux1, Myocd, Hes6, Bcl11b, Utrn,Tnnt3, Ankrd17, Bmp6, Boc, Sigirr, Lhx2.*



AGENCOURT_12770820 NIH_MGC_136 cDNA clone IMAGE:30286576 5'
dystonin (Dst)
deoxyribonuclease II precursor mRNA
potassium channel tetramerisation domain containing 15 (Kctd15)
synaptotagmin-like 1 (Sytl1)
solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2 (Slc6a2)
chloride channel calcium activated 1 (Clca1)
602336784F1 NCI_CGAP_Mam1 cDNA clone IMAGE:4459821 5'
nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1 (Nr6a1)
wh16e01x1 Soares_mammary_gland_NbMMG cDNA clone IMAGE:875640 3'.
chromobox homolog 7 (Cbx7)
tescalcin (Tesc)
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5 (Abca5)
N-acylsphingosine amidohydrolase 2 (Asah2)
epiregulin (Ereg)
premature mRNA for mFLJ00021 protein
UI-M-BH3-axg-a-01-0-UIs1 NIH_BMAP_M_S4 cDNA clone UI-M-BH3-axg-a-01-0-UI 3'.
Mmusculus mRNA for mouse hair acidic 3
Mmusculus mRNA for hair keratin, mHb6
12 days embryo eyeball cDNA, RIKEN clone:D230017C05 product:hypothetical protein, full insert sequence
0 day neonate skin cDNA, RIKEN clone:4632408A20 product:weakly similar to PEROXISOMAL ACYL-COENZYME A THIOESTER
RIKEN cDNA 2310015J09 gene (2310015J09Rik)
adult male tongue cDNA, RIKEN clone:2300008B03 product:hypothetical Microbodies C-terminal targeting signal con
"wa33e05r1 Soares_thymus_2NbMT cDNA clone IMAGE:1328288 5' similar to TR:Q14215 Q14215 NEBULIN ;."
adult male cerebellum cDNA, RIKEN clone:1500004E04 product:transient receptor protein 1, full insert sequence
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5 (Abcc5)
16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:9630005I06 product:hypothetical protein, full insert sequence
synaptic vesicle glycoprotein 2 a (Sv2a)
peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase COOH-terminal interactor (Pamci)
solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3 (Slc24a3)
vo07e11r1 Stratagene mouse skin (#937313) cDNA clone IMAGE:1040780 5'.
2-4-dienoyl-Coensyme A reductase 2, peroxisomal (Decr2)
RIKEN cDNA 2810003C17 gene (2810003C17Rik)
solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4 (Slc1a4)
adult male testis cDNA, RIKEN clone:4930502K01 product:cysteine-rich hydrophobic domain 2, full insert sequence
adult male aorta and vein cDNA, RIKEN clone:A530031G08 product:unknown EST, full insert sequence
ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2 (Atp2b2)
adult female vagina cDNA, RIKEN clone:9930005013 product:similar to NEPRILYSIN-LIKE PEPTIDASE GAMMA [Mus muscul
kinesin family member 20A (Kif20a)
potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 3 (Kcne3)
amphiphysin (Amph)
adult male olfactory brain cDNA, RIKEN clone:6430501M24 product:unclassifiable, full insert sequence
mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 2 (Map4k2)
myocardin (Myocd)
6 days neonate head cDNA, RIKEN clone:5430403C21 product:unknown EST, full insert sequence
adult male liver tumor cDNA, RIKEN clone:C730018L08 product:unclassifiable, full insert sequence
RIKEN 16 days embryo head cDNA clone C130089N16 3'
programmed cell death 1 ligand 2 (Pdcd1lg2)
adult male tongue cDNA, RIKEN clone:2310066F23 product:unknown EST, full insert sequence
keratin complex 1, acidic, gene 15 (Krt1-15)
fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2), transcript variant 1
RIKEN 3 days neonate thymus cDNA clone A630093M01 3'
H4055H07-3 NIA Mouse 74K cDNA Clone Set cDNA clone H4055H07 3'
RIKEN adult male olfactory bulb cDNA clone 6430526E05 3'
UI-M-BH3-avs-h-11-0-UIs1 NIH_BMAP_M_S4 cDNA clone UI-M-BH3-avs-h-11-0-UI 3'.
H8226C12-3 NIA Mouse Unique Gene Set Version 2 cDNA clone H8226C12 3'
L0943F09-3 NIA Mouse Newborn Kidney cDNA Library (Long) cDNA clone NIA:L0943F09 IMAGE:30004196 3'
ms98c07r1 Soares mouse 3NbMS cDNA clone IMAGE:619596 5'.
activated spleen cDNA, RIKEN clone:F830002G12 product:unknown EST, full insert sequence
type III sodium-dependent phosphate transporter (Slc20a2) mRNA
16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN clone:9630054E03 product:unknown EST, full insert sequence
"Soares_thymus_2NbMT cDNA clone IMAGp9980043182 ; IMAGE:1264347"
RIKEN 16 days neonate cerebellum cDNA clone 9630003N14 3'
ma40e04x1 Soares mouse p3NMF19.5 cDNA clone IMAGE:313182 3'.
ms11h01y1 Stratagene mouse skin (#937313) cDNA clone IMAGE:606673 5'.
adult male aorta and vein cDNA, RIKEN clone:A530051E17 product:unknown EST, full insert sequence
12 days embryo head cDNA, RIKEN clone:3010022N24 product:unknown EST, full insert sequence
AGENCOURT_6784759_updated NIH_MGC_137 cDNA clone IMAGE:6435713 3'
adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN clone:B230370I07 product:unknown EST, full insert sequence
synaptotagmin 2 (Syt2)
solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 1 (Slc24a1)
glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1) (Grin2a)
solute carrier organic anion transporter family, member 1a5 (Slc01a5)
adult male kidney cDNA, RIKEN clone:0610033N12 product:G protein beta subunit-like, full insert sequence
synaptosomal-associated protein 91 (Snap91)
RIKEN adult male hypothalamus cDNA clone A230010K05 3'
UI-M-BH3-ar1-d-05-0-UIr1 NIH_BMAP_M_S4 cDNA clone UI-M-BH3-ar1-d-05-0-UI 5'
potassium channel tetramerisation domain containing 7 (Kctd7)
lectin, galactose binding, soluble 8 (Lgals8)
solute carrier organic anion transporter family, member 1a4 (Slc01a4)
RIKEN cDNA 4930431B11 gene (4930431B11Rik)
mRNA similar to adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit (cDNA clone MGC:35931 IMAGE:3709410)
UI-M-CG0p-bim-d-06-0-UIs1 NIH_BMAP_Ret4_S2 cDNA clone UI-M-CG0p-bim-d-06-0-UI 3'.
adult male testis cDNA, RIKEN clone:4932442A14 product:unknown EST, full insert sequence
calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6 (Cacng6)
12 days embryo eyeball cDNA, RIKEN clone:D230039L18 product:unknown EST, full insert sequence
bone morphogenetic protein 6 (Bmp6)

Figura 14 - Perfil de expressão dos genes reprimidos dos animais AIRmax e sobrerrepresentados para os temas biológicos transporte, crescimento celular e organogênese. Os experimentos de microarranjos foram feitos com "pools" de RNA de 6 animais em cada grupo. As cores representam os níveis de expressão altos (vermelho) e baixos (verdes) dos animais controles e 48 após perfusão da orelha.

Tabela 4 - Categorias funcionais sobrerrepresentadas nos genes ativados dos animais AIRmin em relação aos controles.

Categorias Funcionais	Nº do Gene	EASE score	Bonferroni	Genes Identificados
Reposta Inflamatória	27	3.82e-009	3.56e-006	*Fos, Fcer1g, Cxcl14, Itgb2, Il1b, Mefv, Pf4, Cxcl12, Cxcl2, Ccl7, Ccl3, Ccl20, Ccl2, S100a9, Myd88, Pla2g7, Ccr2, Ccr1, Dock2, Cxcl1, Cd14, Tlr7, Tnfrsf1a, Tgfb1, Rac2 ,Rac1, Ccl19.*
Taxia	21	2.85e-007	2.66e-004	*Map2k1, Cxcl14, Itgb2, Il1b, Cyr61, Pf4, Cxcl16, Cxcl12, Cxcl2, Ccl9, Ccl7, Ccl6, Ccl3, Ccl20, Ccl2, Cxcr7, Ccr2, Ccr1, Dock2, Nipa2, Ccl19.*
Motilidade Celular	33	7.27e-006	6.79e-003	*St14, Atp1a1, Arpc1b, Actr3, Itgb2, Ptk2, Aldoa, Actr2, Actn2, Actc1, Yars, Stat3, Pafah1b2, Pafah1b1, Tpm3, Tspan3, Cxcl12, Hmmr, Crk, Astn2, Cnn2, Ccr2, Coro1a, Arpc5, Actn4, Sdcbp, Ttn, Ppap2c, Thbs4, Rac2, Rac1, 2900073G15Rik, Pten.*

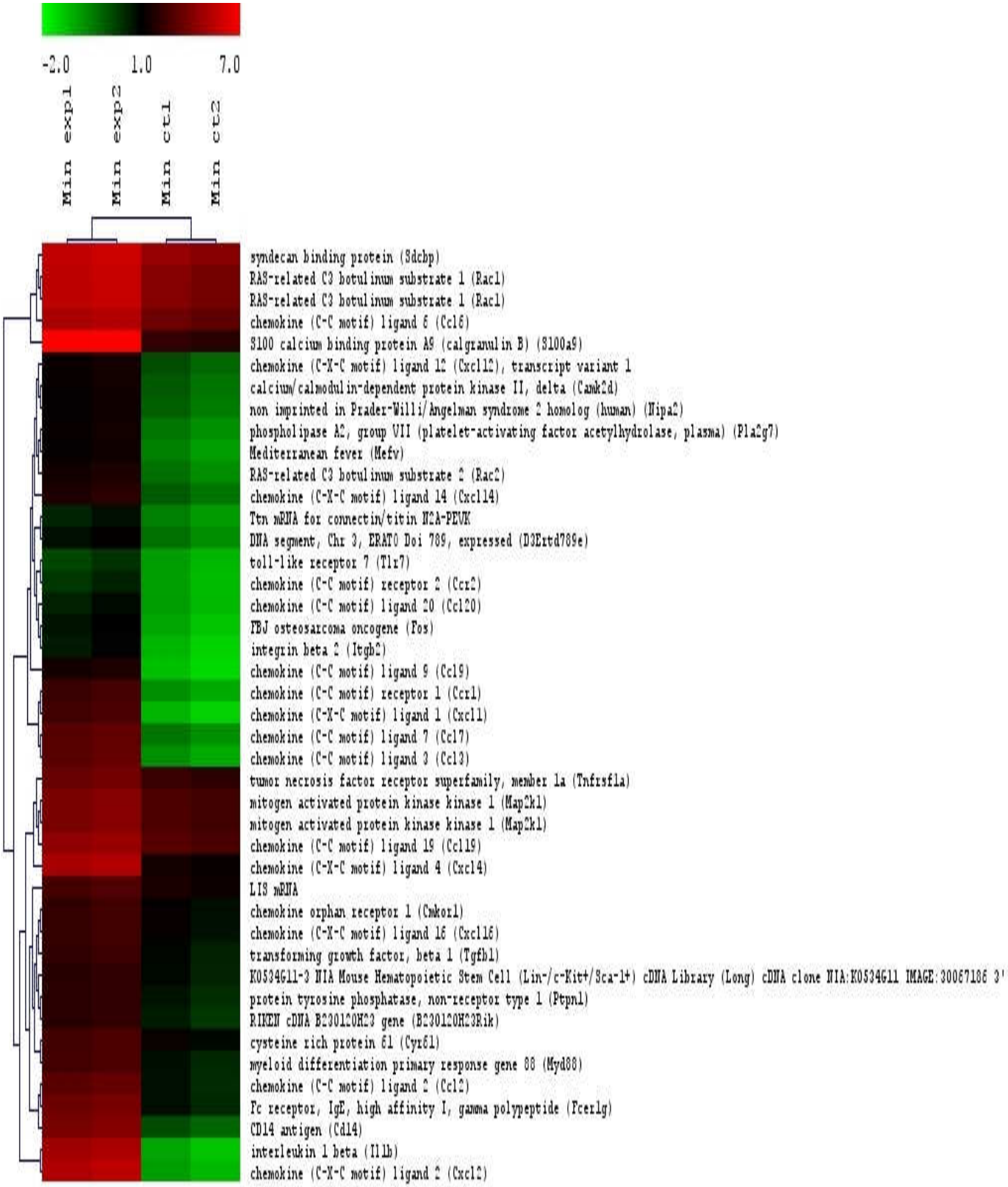


Figura 15 - Perfil de expressão dos genes ativados dos animais AIRmin e sobrerrepresentados para os temas biológicos de resposta inflamatória, e taxia. Os experimentos de microarranjos forma feitos com “pools” de RNA de 6 animais em cada grupo. As cores representam os níveis de expressão altos (vermelho) e baixos (verdes) dos animais controles e 48 após perfusão da orelha.

Tabela 5 - Categorias funcionais sobrerrepresentadas nos genes reprimidos dos animais AIRmin em relação aos controles.

Categorias Funcionais	Nº do Gene	EASE score	Bonferroni	Genes Identificados
Contração Muscular	15	1.87e-006	1.18e-003	*Atp2a2, Tcap, Kcnma1, Kcna1, Cald1, Smpx, Myl2, Utrn, Rock2, Ttn, Scn4a, Tpm1, Tnnt1, Tnni2, Tnni1*
Modificação de Proteína	59	2.05e-005	1.30e-002	*Ube2g1, Hs2st1, Frk, Cdc14b, Prkag1, Ppm1a, Ern1, Parp8, Wwp2, Itch, Map4k3, Erbb4, Epha4, Acvr2b, Kat2b, Abl2, D10Wsu52e, Igf1r, Ccdc39, Spnb2, Dyrk1a, Ube4a, Carm1, Huwe1, Pkn2, Ube2d3, Ube2d2, Myst4, Csnk1d, Ptplb, Nedd4, Dusp16, Dusp15, Dusp18, B3gnt2, Vrk3, Eif2ak4, Stk4, Rock2, Rock1, Ehbp1, Ube2k, Ube2e3, Ube2r2, Padi6, Smad2, Rps6ka3, Tgfbr2, Birc6, Stk35, Ror1, Camk2d, Mapk14, Map3k5, Map2k7, Ptprk, Ptprg, Pt, B230120H23Rik.*
Motilidade Celular	24	2.32e-005	1.47e-002	*Atp2a2, Tcap, Kcnma1, Kcna1, Epha4, Enah, Cald1, Pafah1b1, Elmo1, Smpx, Myl2, Tspan5, Ppap2b, Utrn, Rock2, Sdcbp, Ttn, Scn4a, Tpm1, Tnnt1, Tnni2, Tnni1, Mtss1, Srgap1*
Ciclo de Ubiquitina	13	6.37e-005	4.04e-002	*Ube2g1, Wwp2, Itch, Ube4a, Huwe1, Ube2d3, Ube2d2, Nedd4, Ehbp1, Ube2k, Ube2e3, Ube2r2, Birc6*

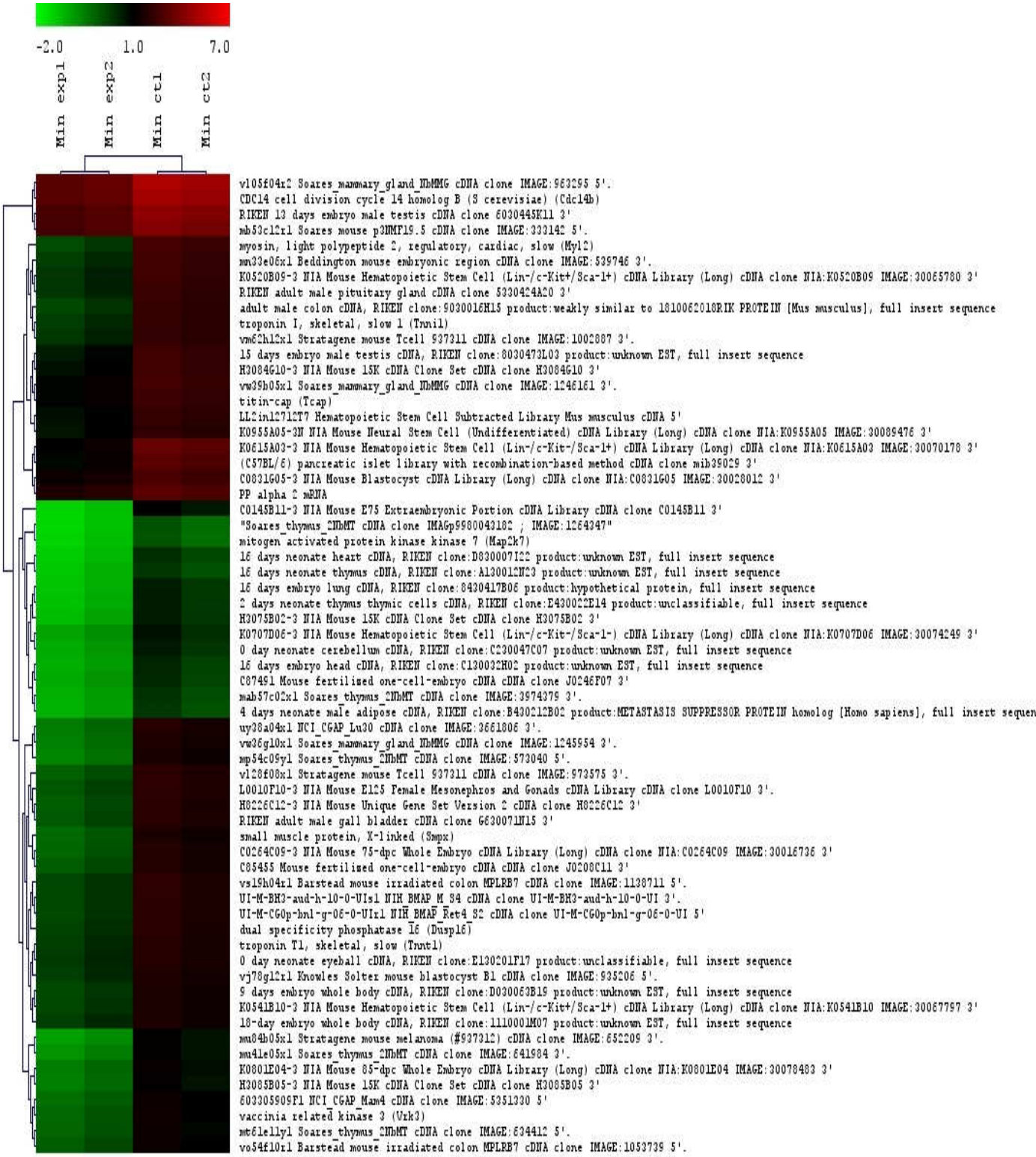


Figura 16 - Perfil de expressão dos genes reprimidos dos animais AIRmin e sobrerrepresentados para os temas biológicos contração muscular, modificação de proteínas e mobilidade celular. Os experimentos de microarranjos foram feitos com “pools” de RNA de 6 animais em cada grupo. As cores representam os níveis de expressão altos (vermelho) e baixos (verdes) dos animais controles e 48 após perfusão da orelha.

Os dados relatados nas tabelas 2, 3, 4 e 5 mostram os diferentes grupos funcionas expressos nas linhagens AIRmax e AIRmin.

Os animais AIRmax apresentaram uma modulação dos genes ativados nos grupos de processos biológicos responsáveis pela resposta inflamatória, resposta imune inata, resposta a estímulos bióticos, resposta à injúria, quimiotaxia, estímulos externos e à células de adesão.

Nesta mesma linhagem, os genes reprimidos identificados fazem parte de grupos funcionais envolvidos no transporte de íons de cálcio, crescimento celular e/ou manutenção, sinalização celular, organização de organelas, resposta à dor e a processos biológicos.

Os animais AIRmin apresentaram uma menor quantidade de genes ativados, com poucos grupos biológicos ativos: resposta inflamatória, taxia e motilidade celular. Os genes reprimidos encontram-se nos grupos biológicos de contração muscular, modificação de proteína, motilidade celular, e ciclo de ubiquitina finalizando com transcrição de DNA.

Foram analisados também os processos biológicos dos genes sobrerrepresentados nos cromossomos 1 e 14. No cromossomo 1 os animais AIRmax apresentaram repressão nos processos de transporte (*Slco5a1, Tmem177, Syt2*), crescimento celular e/ou manutenção (*Slco5a1, Dst, Tmem177, Syt2, Nck2, Pard3b*), morfogêneses (*Hes6, Elf3, Pbx1*) e organogênese (*Hes6, Elf3, Pbx1*).

Os animais AIRmin apresentaram repressão nos processos de contração muscular (*Tnni1*), modificação de proteína (*Erbb4, Epha4, Abl2*), mobilidade celular (*Epha4, Enah, Tnni1*), transcrição (*Elk4, Ivns1abp, Pbx1, Creb1, Cops5, Ncoa2, Ccnt2, Kdm5b, Pard3b*) e regulação da transcrição do DNA (*Elk4, Pbx1, Creb1, Cops5, Ncoa2, Ccnt2, Kdm5b, Pard3b*).

No cromossomo 14 encontramos repressão de genes nos camundongos AIRmax em morfogênese e organogênese (*Slitrk6, Il25*) e nos AIRmin, nas categorias contração muscular e mobilidade celular (*Kcnma1*), modificação de proteína (*Ptprg, Myst4)* e transcrição (*Klf12, Egr3, Ebf2, Myst4, Hmbox1, Rarb, Zdhhc20*).

Os genes ativados na linhagem AIRmax sobrerrepresentados no cromossomo 1 nos processos biológicos de resposta inata (*Fcer1g, Fcer1a, Cd84, Ifi202b, Ncf2, Sell, Fcgr3*), resposta para estímulos bióticos (*Cd84, Ifi202b, Ncf2, Sell, Fcgr3,*

Fcer1g, Fcer1a), resposta a patógenos e a parasitas (*Ncf2, Fcer1g, Fcer1a*), reposta a injúria (*Ncf2, Fcer1g, Fcer1a*), quimiotaxia (*Itgb2, Lsp1*), resposta para estímulos externos (*Cd84, Ifi202b, Ncf2, Sell, Fcgr3, Fcer1g, Fcer1a*), resposta a estresse (*Ncf2, Fcer1g, Fcer1a*), células de adesão (*Sell, Cadm3, Col6a3*) e catabolismo (*Cflar, Ncf2, Capn2*).

No cromossomo 14, os genes sobrerrepresentados pertencem às categorias: resposta de defesa (*Cd84, Ifi202b, Ncf2, Sell, Fcgr3, Fcer1g, Fcer1a*), resposta a estímulos bióticos (*Dnajc3b, Stab1, Nfatc4*), resposta a patógenos e parasitas (*Nfatc4*), resposta à injúria (*Nfatc4*) e resposta a estímulos externos (*Dnajc3b, Stab1, Gjb6, Gjb2, Nfatc4*).

Os animais AIRmin apresentaram genes ativados no cromossomo 1 para resposta a estresse (*Ncf2, Fcer1g, Fcer1a*), células de adesão (*Cadm3, Col6a3, Sell*) e catabolismo (*Cflar, Ncf2, Capn2*), ao passo que no cromossomo 14, os genes pertencem as categorias: resposta a estresse (*Nfatc4*), catabolismo (*Cma1, Mcpt4*) e células de adesão (*Stab1*).

Com o resultado da análise de expressão gênica global foi possível organizar figuras que apresentam os genes sobrerrepresentados das linhagens AIRmax e AIRmin em relação aos seus controles nos cromossomos 1 e 14.

Os genes candidatos encontrados *Slc11a1 e Ang 1*, (cromossomo 1 e 14 respectivamente), foram os que apresentaram QTL mais significativos para a regeneração tecidual no trabalho de De Franco *et al*. (2007).

No cromossomo 1, 150 genes encontram-se sobrerrepresentados, sendo 43 genes somente na linhagem AIRmax, 73 na linhagem AIRmin e 24 em ambas as linhagens. No cromossomo 14 um total de foram 79 genes sobrerrepresentados, sendo 20 genes na linhagem AIRmax, 51 na linhagem AIRmin e 8 em ambas as linhagens.

As figuras 17 e 18 apresentam a posição que estes genes ocupam no cromossomo em mega bases (MB), são considerados ativados os genes que expressaram valores acima de 2,00 e reprimidos os genes com valores abaixo de 0,5, este valores foram encontrados pelo protocolo de expressão global.

Cromossomo 1				
Genes	Símbolo	Posição (MB)	Animais	
			Max exp/cont.	Min exp/cont
interleukin 1 receptor, type II	Il1r2	40141613		2,53
Solute carrier family 9 (sodium/ hydrogen exchanger),member 2	Slc9a2	40738557		0,27
POU domain, class 3, transcription factor 3	Pou3f3	42753991	2,85	
non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2	Nck2	43502596	0,45	
RIKEN cDNA 1500015O10 gene	1500015O10Rik	43787539	3,53	2,34
RIKEN cDNA 1700029F09 gene	1700029F09Rik	44143458		2,44
signal transducer and activator of transcription 1	Stat1	52176282		2,06
glutaminase	Gls	52222427		2,02
major facilitator superfamily domain containing 6	Mfsd6	52714301	0,41	
serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)	Stk17b	53812356		2,24
ankyrin repeat domain 44	Ankrd44	54702184		0,31
heat shock protein 1 (chaperonin 10)	Hspe1	55145161	5,65	0,33
raftlin family member 2	Rftn2	55227003	0,24	
Ngg1 interacting factor 3-like 1 (*S. pombe*)	Nif3l1	58502472		2,16
family with sequence similarity 126, member B	Fam126b	58584077	2,33	
CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Cflar	58770130	2,53	
par-3 partitioning defective 3 homolog B (*C. elegans*)	Pard3b	61685817	0,48	
neuropilin 2	Nrp2	62749891		0,29
cAMP responsive element binding protein 1	Creb1	64579378		2,54
V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)	Erbb4	68086540		0,32
rcd1 (required for cell differentiation) homolog 1 (*S. pombe*)	Rqcd1	74552632		2,39
phospholipase C, delta 4	Plcd4	74589463		0,24
Eph receptor A4	Epha4	77363760		0,23
monoacylglycerol O-acyltransferase 1	Mogat1	78508466	2,78	2,40
family with sequence similarity 124, member B	Fam124b	80195281	0,41	
ArfGAP with FG repeats 1	Agfg1	82836058		2,10
RIKEN cDNA A030005L19 gene	A030005L19Rik	82909900		0,14

Figura 17 - Genes sobrerrepersentados nas linhagens AIRmax e AIRmin no cromossomo 1. Genes expressos nas linhagens AIRmin (vermelho), AIRmax (azul) e em ambas (verde).

Cromossomo 14				
			Animais	
Genes	Símbolo	Posição (MB)	Max exp/cont.	Min exp/cont
musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1	Mustn1	31692726	2,07	
stabilin 1	Stab1	31952203	5,01	
translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast)	Timm23	32993352		2,09
anthrax toxin receptor-like	Antxrl	34866656		2,00
ERO1-like (*S. cerevisiae*)	Ero1l	45903996		2,07
cyclin-dependent kinase inhibitor 3	Cdkn3	47380216		2,50
cornichon homolog (*Drosophila*)	Cnih	47395345		2,15
mitogen-activated protein kinase 1 interacting protein 1-like	Mapk1ip1l	47917989	3,19	
discs, large homolog-associated protein 5	Dlgap5	48007454		2,39
exocyst complex component 5	Exoc5	49631818		0,33
eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 4	Ear4	50125641		2,04
ajuba	Jub	55186309		3,50
interleukin 25	Il25	55551608	0,49	
transmembrane 9 superfamily member 1	Tm9sf1	56254803		0,49
magnesium-dependent phosphatase 1	Mdp1	56276743	0,12	
leukotriene B4 receptor 2	Ltb4r2	56380761		3,55
receptor-interacting serine-threonine kinase 3	Ripk3	56403834	4,03	3,39
chymase 1, mast cell	Cma1	56560288	3,17	
mast cell protease 4	Mcpt4	56678581	3,09	
poly (ADP-ribose) polymerase family, member 4	Parp4	57190783		0,37
paraspeckle protein 1	Pspc1	57341286		2,08
zinc finger, MYM-type 5	Zmym5	57409425		0,37
gap junction protein, alpha 3	Gja3	57654497		2,41
gap junction protein, beta 2	Gjb2	57717455	6,10	
gap junction protein, beta 6	Gjb6	57742140	2,17	
zinc finger, DHHC domain containing 20	Zdhhc20	58451539		0,27
spermatogenesis associated 13	Spata13	61252877	2,85	
C1q and tumor necrosis factor related protein 9	C1qtnf9	61386971		0,48
ADP-ribosylation factor-like 11	Arl11	61928590	6,57	3,37
emopamil binding protein-like	Ebpl	61959587		2,20
cathepsin B	Ctsb	63741302		2,08
family with sequence similarity 167, member A	Fam167a	64055292	2,65	2,60
L-threonine dehydrogenase	Tdh	64111184		3,35
homeobox containing 1	Hmbox1	65441055		0,29
zinc finger protein 395	Zfp395	65994231	0,49	
PDZ binding kinase	Pbk	66424748		3,39
BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like	Bnip3l	67604077		0,50
early B-cell factor 2	Ebf2	67852129		0,49
early growth response 3	Egr3	70477252		0,26
bridging integrator 3	Bin3	70499952		2,04
fibronectin type III domain containing 3A	Fndc3a	72937760		0,40
lysophosphatidic acid receptor 6	Lpar6	73637702		0,23
zinc finger CCCH type containing 13	Zc3h13	75684180	0,45	0,29
component of oligomeric golgi complex 3	Cog3	76102158		0,31
general transcription factor IIF, polypeptide 2	Gtf2f2	76296744	0,28	
leukocyte cell derived chemotaxin 1	Lect1	80037500	2,61	2,67

Figura 18 - Genes sobrerrepersentados nas linhagens AIRmax e AIRmin no cromossomo 14. Genes expressos nas linhagens AIRmin (vermelho), AIRmax (azul) e em ambas (verde).

As regiões próximas de 70 mega bases foram mais significantes para o nosso estudo, pois é onde está localizado o gene *Slc11a1*, no cromossomo 1. Encontramos a expressão de alguns genes importantes como o *Stat 1* ativado em AIRmin, CASP8 (*Cflar*) ativado em AIRmax, proteína de *heat shock* 1 (*Hspe1*) expressa em ambas as linhagens, sendo ativados em AIRmax e reprimidos em AIRmin. Estes genes estão ligados ao processo de apoptose e Il1r2 ativados em AIRmin que codifica para a citocina IL-1 que é um medidor inflamatório. Os genes encontrados são importantes tanto para a resolução da inflamação como para o reparo e regeneração.

No cromossomo 14, o gene candidato *Ang 1* está localizado a 51 mega bases e próximo a ele encontramos genes como *Lect1*, que está envolvido no processo de quimiotaxia, ativado em ambas as linhagens. *Fndc3a* é um domínio de fibronectina reprimido em AIRmin e envolvido no processo de reparo, ao passo que *Egr3,* que atua sobre o início da resposta de crescimento, também está reprimido em AIRmin.

4.6 Análise de expressão gênica por meio de reações de qPCR

Para validar os resultados obtidos pelo experimento de *microarray*, alguns genes diferencialmente expressos foram testados em experimentos de PCR em tempo real.

Para o desenvolvimento destes experimentos foram utilizados animais das linhagens AIRmax e AIRmin, submetidos ao protocolo de indução de injúria nos períodos de 24 e 48 horas.

Os genes escolhidos para a realização destas reações foram: *Cxcl2, Tnfa, Tgfb, Il1b, Il8rb* e *Mmp9.* Os *primers* escolhidos para os experimentos apresentaram uma eficiência próxima de 100%. As amostras foram normalizadas através da subtração do valor do gene constitutivo ciclofilina (chamado de ΔCt) e calibradas através da subtração do valor de ΔCt dos animais AIRmin controle, também chamado de calibrador comum. Os resultados a seguir estão expressos através da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.6.1 Níveis de expressão gênica para Cxcl2

Nos níveis de transcritos para o gene *Cxcl2* podemos observar um aumento gradativo em sua expressão nos animais AIRmax, dobrando o valor de sua expressão de um período para o outro durante os dois tempos estudados (24 e 48 horas).

Os animais AIRmin também apresentaram um aumento na expressão deste gene, mas a diferença encontrada é de 600 vezes mais em 48 horas do que em 24 horas. Esses animais apresentaram uma diferença na expressão de quase 3 vezes mais em 48 horas com relação aos animais AIRmax (figura 19).

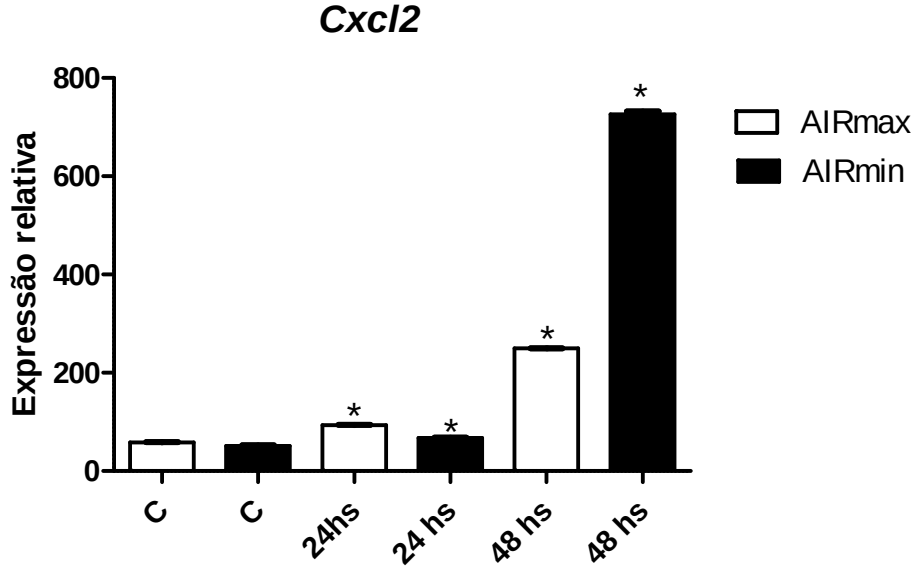


Figura 19 - Expressão relativa do gene *Cxcl2* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual e controle. Foram utilizados um n de 4 animais para cada período. Resultados expressos em média aritmética ± desvio padrão. * p<0,05 – entre animais-controle e experimentais.

4.6.2 Níveis de expressão gênica para Tnfa

Na figura 20 podemos avaliar os níveis de transcritos para o gene *Tnfa.* Observamos que os animais AIRmax (período de 24 horas)apresentam 2 vezes

mais expressão em relação ao seus controles e em 48 horas, níveis de expressão 40 vezes maiores do que os controles.

Os animais AIRmin, por sua vez, apresentam uma maior expressão de transcritos para este gene no período de 48 horas, chegando a 1700 vezes mais do que os controles e experimentais com 24 horas.

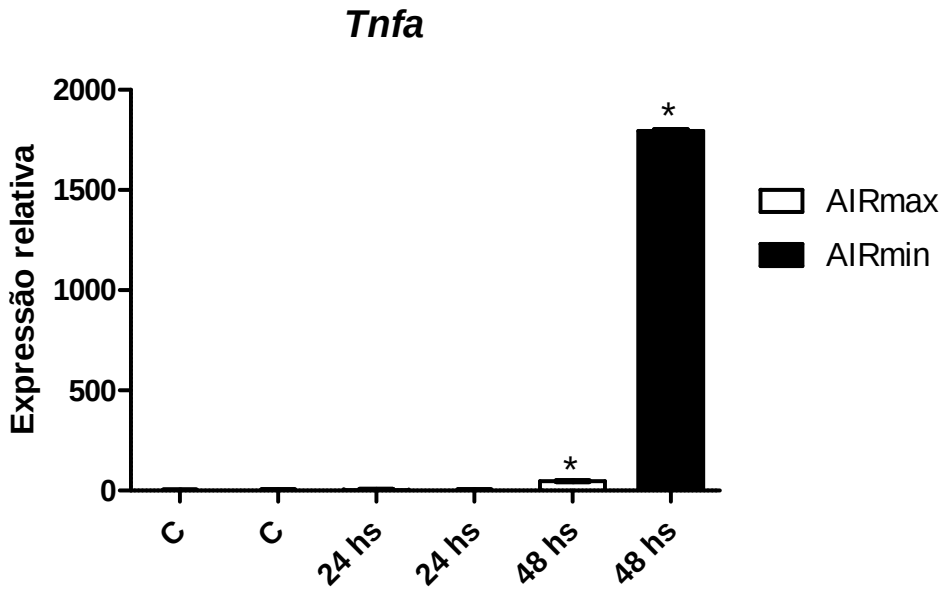


Figura 20. Expressão relativa do gene *Tnfa* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual e controle. Foram utilizados um n de 4 animais para cada período. Resultados expressos em média aritmética ± desvio padrão. * p<0,05 – entre animais-controle e experimentais.

4.6.3 Níveis de expressão gênica para Tgfb

O gráfico da figura 21 relata os transcritos expressos do gene *Tgfb.* No período de 24 horas, é possível observar que tanto os animais-controles como experimentais nos dois períodos (24 e 48 horas) de ambas as linhagens, apresentam uma expressão semelhante e muito próxima de níveis basais (cerca de 1).

Os animais AIRmin apresentam um grande aumento na expressão deste gene em 48 horas, sendo de quase 350 vezes mais do que seus controles.

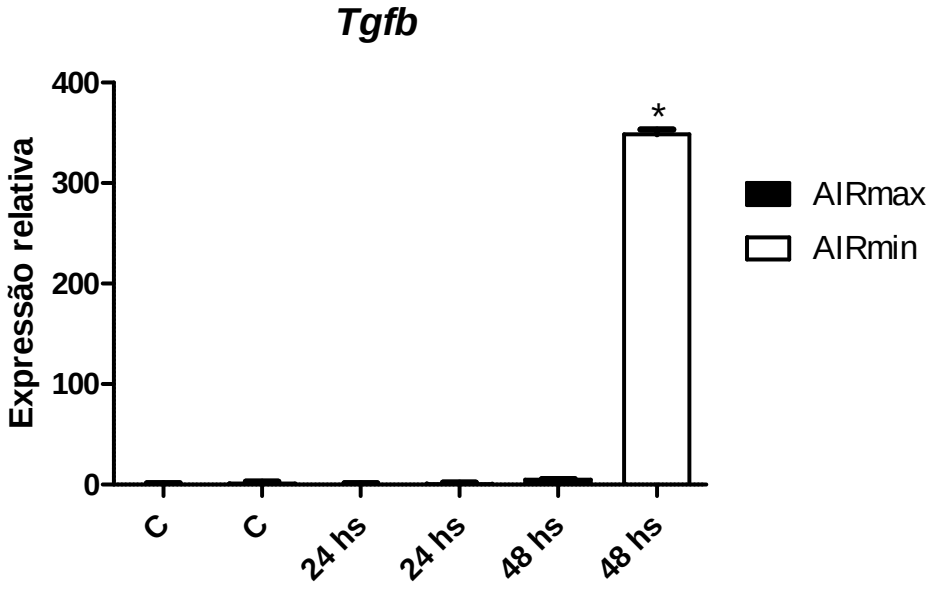


Figura 21. Expressão relativa do gene *Tgfb* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual e controle. Foram utilizados um n de 4 animais para cada período. Resultados expressos em média aritmética ± desvio padrão. * p<0,05 – animais-controle e experimentais.

4.6.4 Níveis de expressão gênica para Il1b

A expressão dos níveis de transcritos para o gene *Il1β* apresentaram um aumento de 10 vezes nos animais AIRmax experimentais no período de 24 horas em relação aos seus controles. Em 48 horas estes animais apresentam uma expressão 370 vezes maior do que seus controles.

O animais AIRmin apresentam um aumento em seus níveis de transcrição de 5 vezes no período de 24 horas em relação aos seus controles. Em 48 horas, esta diferença é de 90 vezes mais transcritos. Diferente do que foi visto para os genes *Cxcl2* e *Tnfa,* os animais AIRmax apresentaram uma maior expressão em relação aos animais AIRmin em 24 horas (Figura 22).

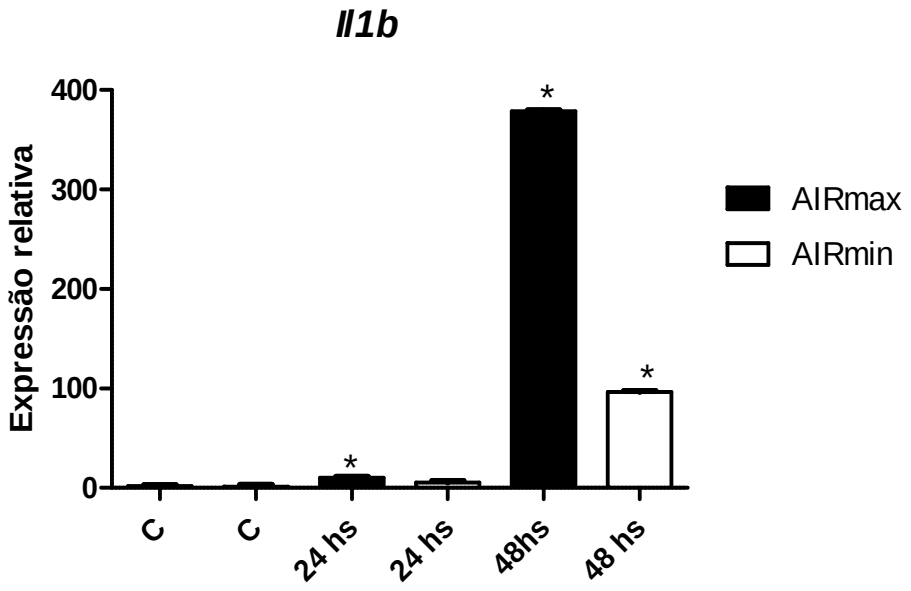


Figura 22. Expressão relativa do gene *Il1b* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual e controle. Foram utilizados um n de 4 animais para cada período. Os resultados foram expressos em média aritmética ± desvio padrão. * p<0,05 – entre AIRmax e AIRmin # p<0,05 – animais-controle e experimentais.

4.6.5 Níveis de expressão gênica para Il8rb

A expressão do gene *Il8rb* nas linhagens de camundongos AIR apresentou maiores níveis nos animais AIRmax experimentais em relação aos seus controles, e também em relação aos animais AIRmin (figura 23), como visto no perfil de expressão do gene de *Il1b* (figura 22).

Os animais AIRmax apresentam uma expressão 3 vezes maior do que os animais-controle para o gene *Il8rb* no período de 24 horas, ao passo que os animais AIRmin apresentam uma expressão duas vezes maior do que seus controles para o mesmo período.

No período de 48 horas foi possível observar que os animais AIRmax apresentam um aumento de 300 vezes do transcrito em relação aos animais-controle, sendo que os animais AIRmin mostram um aumento de 180 vezes no mesmo período.

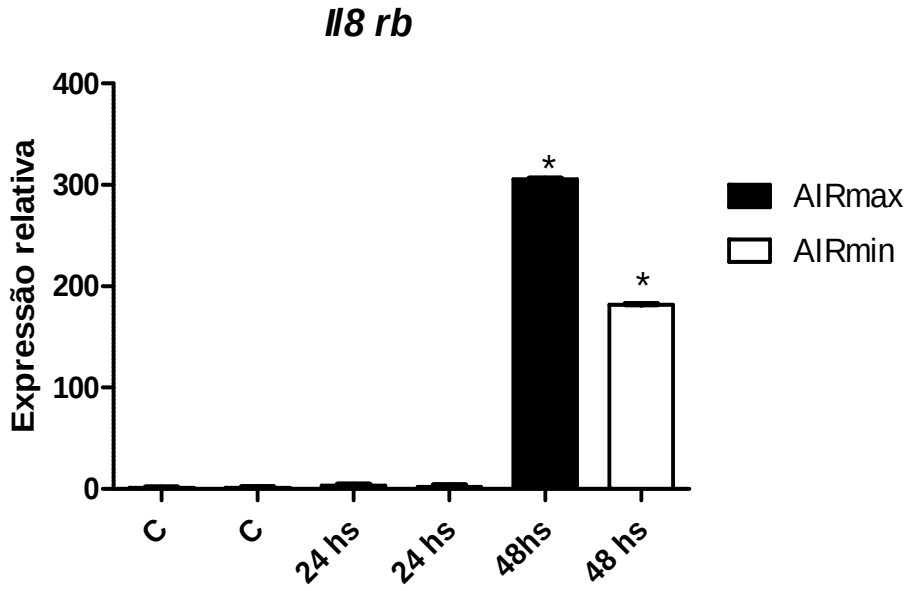


Figura 23. Expressão relativa do gene *Il8rb* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de reparo tecidual e controle. Foram utilizados um n de 4 animais para cada período. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. * p<0,05 – entre AIRma*x* e AIRmin # p<0,05 – entre camundongos controle e experimental.

4.6.6 Níveis de expressão gênica para Mmp9

Na figura 24, pode-se observar a expressão do gene *Mmp9*. Os dados mostram que os animais AIRmax apresentam uma expressão de 1,5 vez a mais do que seus controles no período de 24 horas, e os animais AIRmin, uma expressão de 2 vezes mais transcritos do que os animais-controle no mesmo período. Este perfil aumenta bastante em 48 horas, quando os animais AIRmax mostram uma expressão de 74 vezes mais transcritos e os animais AIRmin, uma expressão de 40 vezes mais em relação aos animais-controle.

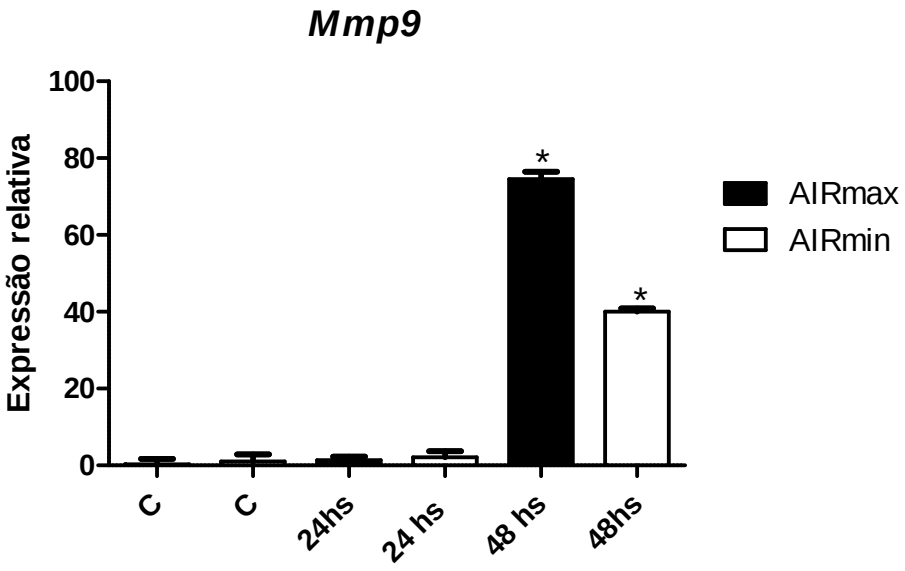


Figura 24. Expressão relativa do gene *Mmp9* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual e controle. Foram utilizados um n de 4 animais para cada período. Os resultados foram expressos em média aritmética ± desvio padrão. * p<0,05 – entre animais-controle e experimental.

A validação da expressão gênica global foi estabelecida pela expressão gênica por qPCR através da correlação de Pearson (r= 0,88; P<0,001) representados na tabela 8.

TABELA 6 - Correlações entre as expressões gênicas obtidas no qPCR e *microarray* de orelha induzida ao processo de regeneração tissular.

Genes	***Correlação de Pearson (r)***
Il1b	0,67
Tgfb	0,90
Il8rb	0,50
Mmp9	0,82
Cxcl2	0,86
Tnfa	0,55

5 DISCUSSÃO

Em seres humanos, o processo de reparo do tecido após trauma ou cirurgia pode levar à formação de uma cicatriz. Nos vertebrados, a lesão da pele inicia uma série de eventos, incluindo inflamação, formação de novos tecidos e remodelamento, que levam a uma reconstrução parcial da zona danificada (CHETTIBI e FERGUSON, 1999). Porém, uma rápida reparação da lesão é essencial como parte de um processo para estancar o sangramento e diminuir o risco de infecção (METCALFE et al., 2006).

No processo de reparo participam fibroblastos e células inflamatórias, ocorrendo a formação de novos capilares incorporados em uma matriz extracelular frouxa (EMC) de colágeno, fibronectina, ácido hialurônico e glicosaminoglicanos (GAGs). Com o tempo, o colágeno é reorganizado em feixes orientados regularmente e alinhados ao longo das linhas de tensão da cicatrização. O remodelamento ocorre em seguida, e à medida que progride, há uma redução gradual da celularidade e vascularização do tecido a ser reparado, o que resulta na formação de uma cicatriz de colágeno (FERGUSON e O'KANE, 2004).

A regeneração, ao contrário do processo de reparo, leva a formação de blastema e á substituição completa das estruturas lesadas, culminando em uma restauração total da função dos tecidos. Curiosamente, a regeneração ocorre frequentemente em locais do corpo que poderiam ser considerados não-essenciais e já há algum tempo se pensava que este processo era exclusivo de invertebrados, vertebrados inferiores e fetos. Mas Clark, Clark e Heber-Katz (1998) descreveram o modelo de regeneração tecidual a partir de uma perfusão na orelha de camundongos da linhagem MRL/MPJ. Neste modelo, os autores realizaram um orifício de 2 mm nas orelhas dos animais MRL/MPJ e após 4-5 semanas o tecido lesionado encontrava-se completamente regenerado, ao passo que nos animais da linhagem C57BL/6, os orifícios nas orelhas permaneceram e não regeneraram.

A genética em torno deste fenômeno tem sido estudada por diversos autores. Para isso, o mapeamento de QTL foi realizado por McBrearty et al. (1998). Esta metodologia demonstrou que os genes candidatos para a regeneração da orelha estavam presentes em vários cromossomos dos camundongos, mas a identificação

de todos os genes de regeneração é tarefa difícil (MASINDE et al., 2001, 2006; HEBER-KATZ et al., 2004, YU et al., 2005). Outros estudos sugerem que os componentes do sistema inflamatório podem desempenhar um papel importante na regeneração e no processo de reparação (LI et al., 2001; GAWRONSKA-KOZAK, 2004).

Assim, a regeneração de tecido em orelha é susceptível de ser controlada por uma multiplicidade de fatores. Estes incluem não apenas as cascatas de sinalização celular, mas também a síntese de nova cartilagem, a regeneração de nervos, deposição de glicosaminoglicanas e matriz extracelular no mesênquima e o desenvolvimento de estruturas semelhantes ao blastoma primitivo (METCALFE et al., 2006; HEBER-KATZ e GOUREVITH, 2009.

De Franco et al. (2007) observaram resultados semelhantes aos de Heber-Katz et al. (2004, 2009) com as sub-linhagens de camundongos AIRmax e AIRmin, homozigotas para os alelos R ou S do gene *Slc11a1,* que foram produzidas através de cruzamentos assistidos por genotipagem. Os camundongos da sub-linhagem AIRmax^{SS} possuem uma capacidade regenerativa comparável às linhagens de camundongos MRL, sugerindo uma interação dos alelos R e S do gene *Slc11a1* com os *loci* reguladores da resposta inflamatória em relação ao fenótipo de regeneração de tecidos.

Para o presente trabalho utilizamos o mesmo modelo de injúria de 2 mm descrito anteriormente em linhagens AIR e observamos que a linhagem de camundongos AIRmax apresenta um perfil de regeneração tissular semelhante ao encontrado em camundongos MRL/MPJ, demonstrando uma completa regeneração do tecido injuriado após 45 dias. Já os animais AIRmin apresentaram um perfil semelhante aos animais C57BL/6, os quais apresentaram reparo da injúria mas não regeneração completa do tecido, confirmando o estudo anterior.

Nesta primeira fase avaliamos o melhor período para ser estudado dentro da fase de inflamação aguda. Através de cortes histológicos (figura8) foi possível observar o infiltrado celular em ambas as linhagens no período de dois dias, característico do processo inflamatório.

Os animais AIRmax apresentaram um influxo celular similar aos animais AIRmin às 48 horas após a injúria e uma regeneração completa com 45 dias após formação de neo-núcleos de cartilagem, sem alta deposição de colágeno (sem a

formação decicatriz). Estes animais foram selecionados para resposta inflamatória aguda a partículas de poliacrilamida injetado por via subcutânea, para o qual apresentam diferenças de influxo de neutrófilos (IBAÑEZ et al., 1992). No entanto o estímulo provocado pela perfuração na orelha não mostrou diferenças histológicas significativas, provavelmente devido ao fato destes animais não terem sido selecionados para este fenótipo.

A formação de edema foi mais intensa nos animais AIRmax, sendo caracterizado pelo extravasamento anormal de líquidos do plasma para os espaços intersticiais. Os resultados (figura 9) mostram a formação de edema após 24 horas da injúria e um aumento significativo deste, após 48 horas, nos animais AIRmax em relação aos animais AIRmin, novamente sem diferença expressiva entre machos e fêmeas.

O edema observado nos animais AIRmax foi congruente com as observações anteriores, visto que estes animais foram selecionados para alta resposta inflamatória e apresentam o mesmo comportamento frente ao agente selecionador (partículas de poliacrilamida) (IBAÑEZ et al., 1992; RIBEIRO et al., 2003).

No estudo realizado com as sub-linhagens da seleção AIR, homozigotas para o alelo R de resistência ou para o alelo S de susceptibilidade do gene *Slc11a1*, os resultados foram semelhantes aos encontrados nas linhagens AIRmax e AIRmin, diferenciando no terceiro dia de experimento os animais AIRmax^{SS}. Estes animais exibiram edemas maiores do que os animais AIRmax^{RR}, sugerindo uma modulação do alelo *S* do gene *Slc11a1* na formação de edema (CANHAMERO, 2009).

Outro aspecto importante do processo inflamatório estudado foi a detecção da enzima mieloperoxidase (considerada um marcador indireto), que pode ser relacionada ao influxo de neutrófilos no tecido injuriado, fenômeno característico da fase de inflamação aguda. Porém, não foi feita uma contagem celular diferencial, mas apenas foi verificada a diferença de resposta entre linhagens. Os experimentos (figura 10) mostraram que 24 horas após a injúria inicia a migração de neutrófilos ativados para o local inflamado, verificando-se um aumento na sua quantidade até 72 horas, quando ocorre o ápice desta migração nos animais AIRmax em relação aos AIRmin.

Este quadro inverte-se somente no período de 48 horas, quando os animais AIRmin apresentaram uma maior quantidade da enzima MPO em relação aos

AIRmax como em protocolos anteriores, não foram encontradas diferenças significativas entre machos e fêmeas.

Ribeiro et al. (2003) demonstraram em seu trabalho que a alta resposta inflamatória observada nos animais AIRmax é resultado da soma de elementos do processo de seleção genética: capacidade destes animais de produzir um maior número de neutrófilos, alta produção de fatores quimiotáticos no exsudato inflamatório e resistência à apoptose espontânea dos neutrófilos extravasados ao sítio inflamatório.

Os dados apresentados mostram que a resposta inflamatória descrita pelo protocolo de partículas de poliacrilamida injetadas no dorso do animal é quase similar à resposta apresentada pelo protocolo de perfusão na orelha, ou seja, independente da estrutura do tecido lesado (METCALFE et al., 2006), a resposta inflamatória para o início do processo de regeneração tissular ocorre de forma semelhante.

Esta resposta também foi confirmada pelo trabalho de Canhamero (2009), no qual os camundongos AIRmax^{SS} apresentaram também maiores níveis da enzima MPO durante 6, 48 e 96 horas de experimento. Houve uma inversão desta resposta somente com 24 horas, quando os animais AIRmax^{RR} exibiram níveis mais altos da enzima. A explicação seria a influência dos genes reguladores da inflamação, os quais modulam a resposta para outro estímulo além das partículas de poliacrilamida.

Na etapa seguinte, após a caracterização do período inflamatório, o objetivo foi analisar a expressão gênica global, dando continuidade aos resultados obtidos no trabalho de De Franco et al. (2007). Para tanto, passamos a estudar a existência de genes que modulam tanto o fenótipo de regeneração quanto a resposta inflamatória aguda e a verificar a existência de alguns destes genes nos cromossomos 1 e 14, a partir de genes candidatos.

Os estudos de expressão gênica global por *microarray* foram realizados através de transcritos de DNA obtidos a partir das orelhas dos animais experimentais (48 horas após a injúria no tecido) e controles das linhagens da seleção de inflamação (AIR).

Recentemente, experimentos de *microarray* realizados com camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin, estimulados com partículas de poliacrilamida e utilizando células de medula óssea, indicaram vários genes diferencialmente

expressos, como *Slc11a1, Ang1, IL8rb, Vegfa, Vegfb, Fgf1, IL10, Csf3r, Alox12, Fgf18, Icam2, IL9r, Itga2b, Itgb3, Mpo, Ccl3, Ccl8, Ccl9, Ptgis e Stat3*, todos envolvidos no processo de angiogênese e na inflamação (CARNEIRO et al., 2009).

Através deste estudo (figura 11) foi possível observar que a linhagem AIRmin possui um maior número de genes ativados e reprimidos (1086 e 1145, respectivamente), quando comparado à linhagem AIRmax (794 e 528 respectivamente).

A sobrerrepresentação desses genes foi agrupada em categorias (grupos biológicos), o que auxiliou a identificar se os genes encontrados apresentavam uma expressão referente à resposta inflamatória aguda ou a processos envolvidos na regeneração. Observamos que nos animais AIRmax existe uma sobrerrepresentação dos genes ativados nas seguintes categorias: resposta inflamatória, resposta imune e quimiotaxia. Para os genes reprimidos, os temas biológicos sobrerrepresentados foram: transporte de íons de cálcio, crescimento celular e/ou manutenção, sinalização celular e organização de organelas.

Os animais AIRmin apresentaram genes ativados sobrerrepresentados nas categorias funcionais de resposta inflamatória, taxia e mobilidade celular. Já os genes reprimidos agruparam-se em: contração muscular, modificação de proteína e ciclo de ubiquitina.

Ambas as linhagens apresentaram categorias funcionais sobrerrepresentadas dos genes ativados para a resposta inflamatória, fato este que pode ser explicado pelo processo de seleção desses animais e pelo estímulo dado (IBAÑEZ et al.1992; RIBEIRO et al., 2003).

Os genes mais expressos para resposta inflamatória foram: *Fos, Fcer1g, Cxcl14, Itgb2, Il1b, Mefv, Pf4, Cxcl12, Cxcl2, Ccl7, Ccl3, Ccl20, Ccl2, S100a9, Myd88, Pla2g7, Ccr1, Ccr2, Dock2, Cxcl1, Cd14, Tlr7, Tnfrsf1a, Tgfb1, Rac2, Rac1* e *Ccl19,* sendo estes envolvidos em diversas outras categorias, como resposta imune inata, sinalização de transdução positiva, organização de citoesqueleto, quimiotaxia, regulação da proliferação celular, células de adesão, células de migração, desenvolvimento de células dendríticas, endocitose e no processo de regeneração.

Os resultados evidenciam que as linhagens AIRmax e AIRmin possuem ativação em comum de genes relacionados à resposta inflamatória, quimiotaxia e regeneração.

Através de análises pelo programa *EASE* foi possível observar quais os genes ativados presentes no cromossomo 1 (*Fcer1g, Fcer1a, Cd84, Ifi202b, Ncf2, Sell, Fcgr3, Itgb2, Lsp1, Cflar, Capn2, Cadm3* e *Col6a3*) e no cromossomo 14 (*Nfatc4, Dnajc3b, Stab1. Cma1* e *Mcpt4*) dos animais AIRmax. Os animais AIRmin apresentaram os genes *Ccl20, Fcer1g, Cxcr7, Nek2, Mcm3, Actr3, Arpc5, Stat1, Mcm3* e *G0s2* no cromossomo 1 e no cromossomo 14, *Bin3*.

Nos animais AIRmax os genes reprimidos no cromossomo 1 foram os seguintes: *Slco5a1, Tmem177, Syt2, Slco5a1, Dst, Nck2, Pard3b, Hes6, Elf3, Pbx1, Hes6* e *Pbx1* e no cromossomo 14, *Slitrk6 e Il25*. Os animais AIRmin apresentaram no cromossomo 1 os genes reprimidos a seguir *Tnni1, Erbb4, Epha4, Abl2, Enah, Elk4, Ivns1abp, Pbx1, Creb1, Cops5, Ncoa2, Ccnt2, Kdm5b* e *Pard3b* e no cromossomo 14, *Kcnma1, Ptprg, Myst4, Klf12, Egr3, Ebf2, Myst4, Hmbox1, Rarb, Zdhhc20, Klf12, Egr3* e *Ebf2*.

Vários genes candidatos nos cromossomos 1 e 14 foram encontrados ativados ou reprimidos nas duas linhagens próximos aos detectados anteriormente (DE FRANCO et al., 2007). No cromossomo 1, próximo ao gene *Slc11a1,* encontramos os genes *Stat1*, Casp8 (*Cflar*) e *Hspe1*, que estão envolvidos na apoptose celular, processo importante tanto para a resolução da resposta inflamatória como no início da regeneração tissular. Encontramos também o gene *Il1r2* ativados em AIRmin que codifica para a citocina IL-1 que é um medidor inflamatório significativo. No cromossomo 14 próximo ao gene *Ang1*, encontramos os genes: *Lect1*, envolvido no processo de quimiotaxia, *Fndc3a*, domínio de fibronectina envolvido no processo de regeneração e *Egr3,* que atua sobre o início da resposta de crescimento. Estes resultados confirmam a hipótese inicial deste trabalho sobre a existência de genes envolvidos nos fenótipos de resposta inflamatória e regeneração nos cromossomo candidatos e indicando quais seriam alguns deles.

Após a análise de expressão gênica global, foi realizado qPCR para validação deste teste. Para isso, *primers* com eficiência de 100% foram escolhidos, por estarem envolvidos nos processos de inflamação aguda, como: *Il1b* e *Tnfa* que são as principais citocinas da imunidade inata, e na regeneração como *Cxcl2 – Il-8rb*, *Tgfb e Mmp9* .

Analisando cada gene, sabe-se que *Cxcl2* codifica a quimiocina CXCL2 (também considerada a IL-8 murina) (BUCKLEY, 2003; SMITH et al., 2008), apresenta atividades pró-inflamatórias e participa da via de sinalização de Nfkb (PENG et al., 2010). O gene *Il8rb*, no qual se ligam as quimiocinas CXCL2 e CXCL1, é expresso em neutrófilos e células endoteliais pós-vasculares, pode ser encontrado em monócitos/macrófagos, linfócitos e queratinócitos (KUKULSKI et al., 2010). A expressão dessas quimiocinas também está associada aos processos de regeneração tecidual e angiogênese (ZHAO et al., 2004; KAGARI et al., 2007). A IL8 pode ser encontrada em altos níveis no período pós-inflamatório de tecidos traumatizados (FERGUSON e O'KANES, 2004).

Os resultados obtidos para o gene *Cxcl2* (figura 19) mostram um aumento gradativo em sua expressão em ambas as linhagem. No entanto, a diferença encontrada é de 600 vezes mais em 48 horas para os animais AIRmin em relação aos AIRmax. O resultado esperado seria uma maior expressão em AIRmax, por ser esta uma quimiocina envolvida na fase aguda da inflamação, processo que evidente nos animais AIRmax. Este dado mostra que durante o processo inflamatório os animais AIRmin também apresentam um elevado infiltrado celular, ocorrendo um alto recrutamento celular (RIBEIRO et al., 2003) Porém este infiltrado ainda é menos eficiente em sua resolução do que visto nos animais AIRmax, já que os animais AIRmin demoram mais tempo para resolver a inflamação e não apresentam ter uma regeneração completa.

Para os transcritos do gene *Il8rb* (figura 23), os animais AIRmax apresentaram maiores níveis em relação aos seus controles (300 vezes mais em 48 horas) e aos animais AIRmin (180 vezes mais, em 48 horas) nos dois períodos, como visto no perfil de expressão do gene *Il1b*. Este resultado está de acordo com o esperado, pois os animais AIRmax apresentam uma maior quantidade de neutrófilos ativados no período inflamatório (RIBEIRO et al., 2003). Assim, há uma maior expressão de citocinas e quimiocinas nestes animais, o que ocasiona um aumento no recrutamento celular. Acredita-se que esta característica (elevado processo inflamatório), bem como a rápida resolução da inflamação dos animais AIRmax seja uma das razões que levam a uma regeneração eficiente e completa, sem formação de cicatriz.

O gene *Tnfa,* juntamente com *Il1b* são primordiais na resposta inflamatória, pois codificam para as principais citocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, sendo produzidas por neutrófilos e macrófagos (VAN DEN BERG, 2000).

O *Tnfa* estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais. Além dessa função regula o metabolismo extracelular da matriz, reduzindo a síntese de colágeno, com a ajuda de metaloproteases de matriz (NAH e RHEE, 2009). Participa da via de ativação do NFKβ, a ativação desta via pode ser feita só pelo TNF ou sinergicamente com a IL-1β (PENG et al., 2010).

Os resultados dos níveis de transcritos para o gene *Tnfα* (figura 20) apresentaram uma alta expressão nos animais AIRmin, chegando a 1700 vezes a mais do que os seus controles no período de 48 horas. Os animais AIRmax evidenciram uma expressão 40 vezes maior em relação seus aos controles. Esta alta expressão nos animais AIRmin é um dado interessante, pois era esperado o contrário. No entanto, este dado pode dar indícios de quais são os mecanismos que levam a falta de regeneração nesses animais. Em altas quantidades, o TNFa, pode aumentar a liberação de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, gerando um grande influxo celular no local da injúria e uma alta redução na síntese de colágeno (NAH e RHEE, 2009), ocasionando um retardo no processo de regeneração tecidual.

O gene *Il1b* codifica a citocina pró-inflamatória IL-1β, envolvida na diferenciação e proliferação de células B e T, produção de anticorpos, ativação de células endoteliais e de osteoclastos, aumento da liberação de citocinas, hematopoese e produção de proteínas de fase aguda, entre outras funções. A produção destas citocinas está associada principalmente aos monócitos/macrófagos no tecido e líquido sinovial (MCINNES e SCHETT, 2007; SZEKANECZ e KOCH, 2007). Atuam molecularmente através de duas vias clássicas, sendo elas: a via MAPK, especialmente pela ERK,p38, e JNK, bem como a via NFKβ (SAKLATVALA, 2006; PENG et al., 2010).

Os animais AIRmax apresentaram em seus transcritos do gene *Il1b* (figura 22) um aumento de 10 vezes no período de 24 horas em relação aos seus controles e em 48 horas, a expressão foi 370 vezes maior. Os animais AIRmin apresentaram

um aumento em seus níveis de transcrição de 5 vezes no período de 24 horas e de 90 vezes em 48 horas. Por ser a IL1- β uma citocina expressa por monócitos e macrófagos na fase aguda da resposta inflamatória, estas diferenças indicam um aumento maior no influxo celular com 48 horas nas duas linhagens, ocorrendo assim uma maior produção da citocina. Este resultado já era esperado nos animais AIRmax em relação aos AIRmin devido ao processo de seleção, no qual os primeiros apresentam um maior recrutamento e infiltrado celular no local injuriado (RIBEIRO et al., 2003).

O gene *Mmp9* codifica para a metaloproteinase MMP9 (também conhecida como gelatinase B), secretada por polimorfonucleares e de papel relevante para a invasão de tumores. A MMP9 pode degradar o colágeno da membrana, (o que induz à migração celular) e degradar a matriz extracelular, invadindo assim os tecidos circundantes. Esta degradação é importante no processo de regeneração para a formação do blastema (GOUREVITICH et al., 2003; LOU et al., 2009). Sua produção pode ser estimulada por fatores de crescimento e citocinas. Tem papel importante nos processos inflamatórios e na regeneração tissular, pois participa da remoção de tecidos, sendo necessária para a angiogênese, migração de fibroblastos, queratinócitos e epitelização do local (GOUREVITICH et al., 2003; BJARNSHOLT et al., 2008).

Em seu trabalho, Gourevitich et al. (2003) mostraram a importância das metaloproteinases MMP-9 e MMP-2 e seus TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteases) para o processo de regeneração tissular da orelha em linhagens de camundongos MRL e C57B6, evidenciando o papel de uma alta expressão da MMP9 para a degradação da matriz e regeneração da orelha dos animais MRL sem formação de cicatriz.

No período de 24 horas (figura 24), os animais AIRmax apresentaram uma expressão do gene *Mmp9* de 1,5 vezes a mais do que seus controles e no mesmo período, os animais AIRmin apresentaram uma expressão de 2 vezes mais transcritos. Este perfil aumentou bastante em 48 horas: os animais AIRmax mostraram uma expressão de 74 vezes mais transcritos e os animais AIRmin apresentaram uma expressão 40 vezes maior em relação aos animais-controle.

O perfil de expressão da MMP9 vai ao encontro com o que foi visto para *Il1b* e *Il8rb* e também está de acordo os resultados de Gourevitich *et al*. (2003), no qual os

animais MRL, semelhantes em termos de regeneração aos AIRmax, apresentam maiores níveis de transcritos para este gene, demonstrando que MMP-9 é importante no processo de regeneração sem cicatriz.

O TGF-β é uma citocina multifuncional que controla a proliferação e diferenciação celular na maioria das células. É secretada por plaquetas, fibroblastos e macrófagos, células estas que estão localizadas na injúria (WERNER e GROSE, 2003).

Durante a regeneração o TGF-β pode desempenhar um papel importante na supressão da síntese de citocinas e quimiocinas, e é um mediador-chave na transição da inflamação para fibrose. Trabalhos com esta citocina, relacionada ao reparo cardíaco, têm mostrado que injeções de TGF-β reduzem a isquemia miocárdica mediada por citocinas pró-inflamatórias (como TNF-α) na fase inflamatória e colaboram na regeneração do miocárdio. A inibição da sinalização do TGF-β por um receptor de TGF-β II resulta na redução do remodelamento. Suas principais funções são: efeitos angiogênicos, redução na expressão de moléculas de adesão, desativação de macrófagos, repressão de quimiocinas e citocinas, diferenciação de miofibroblastos, proliferação de fibroblastos e síntese de proteínas da matriz extracelular (NAH e RHEE, 2009).

Os níveis de *Tgfb* (figura 21) foram próximos aos basais no período de 24 horas. Contudo, os animais AIRmin apresentaram um grande aumento na expressão deste gene em 48 horas, tento sido de quase 350 vezes maior do que seus controles.

Ao contrário do Tnfa, a alta expressão de *Tgfb* pode gerar uma supressão nas citocinas e quimiocinas que são importantes na fase de inflamação aguda para atrair neutrófilos e macrófagos para o local da injúria, prejudicando o processo de regeneração do tecido. Isto pode levar a uma alta deposição de colágeno e matriz extracelular no local, gerando reparo, mas com provável formação de cicatriz.

Os dados obtidos neste trabalho não são suficientes para elucidar todas as questões que ainda existem sobre os mecanismos genéticos e celulares envolvidos nos fenótipos de resposta inflamatória aguda e regeneração. No entanto, os resultados mostram que existe uma modulação de genes diferencialmente expressos para os dois fenótipos (Resposta Inflamatória e regeneração) nos cromossomos candidatos (1 e 14), ajudando a compreender um pouco mais sobre

interação gênica, revelando a importância do infiltrado celular nos dois processos e direcionando novas abordagens de pesquisas com identificação gênica.

6 - CONCLUSÕES

- Os animais AIRmax apresentaram melhor regeneração tissular em relação aos animais AIRmin, regenerando completamente o tecido após 45 dias, conforme visto através de cortes histológicos.

- Os animais AIRmax apresentaram uma maior formação de edema com 48 horas pós injúria. Os níveis da enzima MPO sugerem a presença de neutrófilos ativados no local lesionado e foram significativos nos animais AIRmax nos períodos de 24 a 72 horas.

- Análise de expressão gênica global realizada 48 horas após a injúria na orelha demonstrou que os animais AIRmin apresentaram 3 vezes mais genes ativados e reprimidos quando comparados com os animais AIRmax.

- Foram encontrados genes sobrerrepresentados em categorias funcionais. Os animais AIRmax apresentam genes ativados nas seguintes categorias: resposta inflamatória, resposta imune inata e quimiotaxia. Os genes reprimidos encontrados fazem parte de grupos funcionais envolvidos no transporte de íons de cálcio, crescimento celular e/ou manutenção, sinalização celular e organização de organelas.

- Nos animais AIRmin, os genes ativados fazem parte das seguintes categorias: resposta inflamatória, taxia e motilidade celular e os genes reprimidos, das categorias contração muscular, modificação de proteína, motilidade celular e ciclo de ubiquitina.

- Os cromossomos 1 e 14 confirmaram a presença de genes ligados aos fenótipos de inflamação aguda e regeneração tecidual pelo ensaio de expressão gênica global. Foram encontrados próximos ao gene candidato *Slc11a1* no cromossomo 1 os genes: *Stat1*, *Casp8* (*Cflar*), proteína de *heat shock* 1 (*Hspe1*) e *Il1r2*. E no

cromossomo 14, próximo ao gene candidato *Ang1.* os genes: *Lect1*, *Fndc3a* e *Egr3* .

- Os resultados encontrados nos experimentos de expressão gênica global foram validados por reações de qPCR. Foi possível observar uma maior expressão em animais AIRmin para os genes *Cxcl2, Tnfa e Tgfb,* sugerindo que a alta expressão desses genes pode contribuir para um retardo no reparo, formação de cicatriz e ausência de regeneração. A expressão dos genes *Il1b, Il8rb e Mmp9*, maiores para os animais AIRmax em 48 horas após injúria, sugerem que estes genes contribuem para a produção de citocinas e quimiocinas, que ao serem liberadas geram um maior infiltrado celular, uma resposta mais rápida e eficiente, colaborando para o processo de regeneração tissular sem formação de cicatriz.

REFERÊNCIAS*

ARANEO, B. A.; DOWELL, T.; DIEGEL, M.; DAYNES, R. A. Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and gamma-interferon, but not IL-2 by activated murine T cells. **Blood**, v.78, p.688-99, 1991.

ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M., DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S. Innate resistance to infections by intracellular bacteria differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 2913-20, 1998.

AYALA, A.; CHUNG, C.; GRUTKOSKI, P. S.; SONG, G. Y. Mechanisms of immune resolution. **Crit. Care. Med**., v. 31, p. 558-S571, 2003.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Multiple significance tests: the Bonferroni method. **BMJ**, v. 310, p. 170, 1995.

BLANKENHORN, E. P.; TROUTMAN, S.; CLARK, L. D.; ZHANG, X. M.; CHEN, P.; HERBER-KATZ, E. Sexually dimorphic genes regulate healing and regeneration in MRL mice. **Mamm. Genome**, v. 14, p. 250-60, 2003.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAUJO, M. L.; MARIA, D. A.; MOUTON, D.; SANT´ANNA, O. A.; IBAÑEZ, O. M.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; MASSA, S.; COVELLI, V.; NEVEU,T. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 337-346, 1998.

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

BORREGO, A.; PETERS, L. C.; JENSEN, R. J.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H. K.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBANEZ, 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. 2766-71, 2006.

BUCKLEY, C. D. Defining a role for fibroblasts in the persistence of chronic inflammatory joint disease. **Ann. Rheum. Dis.**, v.63, p. 92-95, 2004.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: Elaboração. Rio de Janeiro. 2002.

BUCKLEY, C. D. Why does chronic inflammatory joint disease persist? **Clin. Med.**, v. 3, n. 4, p. 361-366, 2003a.

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.

CANHAMERO, T. A. **Estudo dos mecanismos genéticos e celulares durante o processo de reparo tecidual em animais selecionados geneticamente para máxima resposta inflamatória aguda homozigotos para os alelos R ou S do gene *Slc11a1*.** Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

CARNEIRO, P. S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; JENSEN, J. R.; CABRERA, W. H. K.; IBAÑEZ, 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.

CHETTIBI, S.; FERGUSON, M. W. J. Wound repair: an overview. In GALLIN, J. I.; SNYDERMAN, R. (Ed.) **Inflammation**: Basic Principles and Clinical Correlates. 3. ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 865–881.

COSTA, R. A.; RUIZ-DE-SOUZA, V.; AZEVEDO, G. M. JR; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Effects of strain and age on ear wound healing and regeneration in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 12, p. 1143-9, 2009.

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. 263-9, 2007.

DOVI, V. J.; HE, LI-KE.; DIPIETRO, A. L. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **J. Leukoc. Biol.,** v. 73, p. 448-55, 2003.

DOVI, V. J.; SZPADERSKA, M. A.; DIPIETRO, A. L. Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? **Thromb Haemost**, v. 92, p. 275-80, 2004.

FAUVE, R. M.; JUSFORGUES, H.; HEVIN, B. Maintenance of Granuloma Macrophages in Serum-Free Medium. **J. Immunol. Methods**., v. 64, p. 345, 1983.

FENG, Q.; REN, Y.; WANG, Y.; MA H.; XU, J.; ZHOU, C.; YIN, Z.; LUO, L. Anti-inflammatory effect of SQC-β-CD on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **J. Ethnopharmacol.**, v. 118, p. 51-58, 2008.

FERGUSON, M. W.; O'KANES. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 359, p. 839-50, 2004.

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.

GAD S C.The mouse ear swelling test (MEST) in the 1990s. **Toxicology**, v. 22, p. 93, p. 33-46,1994.

GAWROSKA-KOZAK, B. Regeneration in the ears of immunodeficient mice: identification and lineage analysis of mesenchymal stem cells. **Tissue Eng.**, v. 10, n. 7-8, p. 1251-65, 2004.

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.

GOUREVITCH, D.; CLARK, L.; CHEN, P.; SEITZ, A.; SAMULEWICZ, S. J.; HERBER-KATZ, E. Matrix Metalloproteinase Activity Correlates with Blastema formation in the regeneration MRL Mouse Ear Hole Model. **Dev. Dyn.**, v. 226, p. 377-387, 2003.

GOVONI, G. & GROS, P. Macrophage *NRAMP1* and its Role in Resistance to Microbial Infections. **Inflamm. Res**., v. 47, p. 277- 284, 1998.

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

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, p. 384-92, 2004.

HEBER-KATZ, E. & GOUREVITH, D. The Relationship between Inflammation and Regeneration in MRL Mouse. **Longev. Regen. Optimal Health**, v. 1172, p. 110-114, 2009.

HOSACK, D. A.; DENNIS, G. Jr.; SHERMAN, B. T.; LANE, H. C.; LEMPICKI, R. A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. **Genome Biol**., v. 4, n. 10, p. 70, 2003.

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

KAGARI, T.; TANAKA, D.; DOI, H.; IWAKURA, Y.; SHIMOZATO, T. Anti-type collagen antibody accelerates arthritis via CXCR2-expressing cells in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 2753-2763, 2007.

KITA, E.; EMOTO, M.; OKU, D.; NISHIKAWA, F.; HAMURO, A.; KAMIKAIDOU, N.; KASHIBA, S. Contribution of interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of Ityr mice. **J. Leukoc Biol**., v. 51, p. 244-50, 1992.

KUKULSKI, F.; BEN, Y.; BAHRAMI, F.; FAUSTHER, M.; TREMBLAY, A.; SÉVIGNY, J. Endothelial P2Y2 receptor regulates LPS-induced neutrophil transendothelial migration *in vitro*. **Mol. Immunol.**, v. 5, p. 991-9, 2010.

LANG, T.; PRINA, E.; SIBTHORPE, D.; BLACKWELL, J. M. *Nramp1* transfection transfers *Ity/Lsh/Bcg*-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. **Infect. Immun**., v. 65, p. 380-6, 1997.

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.

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

LUO, Y.; LIANG, F.; ZHANG, Z. Y. PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through *Src* and ERK1/2 pathways. **Biochemistry**, v. 3, p.1838-46, 2009.

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

MARIA, D. A.; MANENTI, G.; GALBIATI, F.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; BARRERA, R. G.; PETTINICCHIO, A.; 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.

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. 11, p. 2027-2033, 2001.

MASINDE, G. L.; LI, R.; NGUYEN, B.; Yu, H.; SRIVASTAVA, A. K.; EDDERKAOUI, B.; WERGEDAL, J. E.; BAYLINK, D. J.; MOHAN, S. New quantitative trait *loci* that regulate wound healing in an intercross progeny from DBA/1J and 129 x 1/SvJ inbred strains of mice. **Funct. Integr. Genomics**, v. 6, p. 157-63, 2006.

METCALFE, A. D.; WILLIS, H.; BEARE, A.; FERGUSON, M. W. J. Characterizing regeneration in the mammalian external ear review. **J. Anat**., v. 209, p. 439–446, 2006.

MC BREARTY, B. A.; CLARK, L. D.; ZHANG, X. M.; BLANKEHORN, E. P.; HERBER-KATZ, E. Related Articles, Links Genetic analysis of a mammalian wound-healing trait. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**., v. 95, p.11792-7, 1998.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 429-442, 2007.

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

MOORE, A. Biology of the chronic wound. **J. Wound Care**, v. 8, p. 345-55, 1999.

NAH, D. Y.; RHEE, M. Y. The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction. **Korean Circ. J**., v. 39, n. 10, p. 393-8, 2009.

PENG, S. C.; WONG, D. S.; TUNG, K. C.; CHEN, Y. Y.; CHAO, C. C.; PENG, C. H.; CHUANG, Y. J.; TANG, C. Y. Computational modeling with forward and reverse engineering links signaling network and genomic regulatory responses: NF-kappaB signaling-induced gene expression responses in inflammation. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 308, 2010

PETERS, L. C.; JENSEN, J. R.; BORREGO, A.; CABRERA, W. H. K.; BAKER, N.; STAROBINAS, N; RIBEIRO, O. G.; IBAÑEZ, O.; DE FRANCO, M. *Slc11a1* (formerly Nramp1) gene modulates both acute inflammatory reaction and pristane-induced arthritis in mice. **Genes Immun.**, v. 8, p. 51-56, 2007.

PETERS, L. C. **Identificação dos *loci* reguladores da intensidade da resposta inflamatória aguda envolvidos no desenvolvimento da artrite induzida por pristane em camundongos selecionados geneticamente**, Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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.

RAMARATHINAM, L.; NIESEL, D. W.; KLIMPEL, G. R. *Ity* influences the production of IFN-gamma by murine splenocytes stimulated *in vitro* with *Salmonella typhimurium*. **J. Immunol.,** v. 150, p. 3965-72, 1993.

REINES, B.; CHENG, L.; MATZINGER, P. Unexpected regeneration in middle aged mice. **Rejuvenation Res**., v. 12, n. 1, p. 45-52, 2009**.**

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

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

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.

SMITH, E.; MCGETTRICK, H. M.; STONE, M. A.; SHAW, J. S.; MIDDLETON, J.; NASH, G. B.; BUCKLEY, C. D. E. D.; RAINGER, G. Duffy antigen receptor for chemokines and CXCL5 are essential for the recruitment of neutrophils in a multicellular model of rheumatoid arthritis synovium. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 7, p. 1968-1973, 2008.

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

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.

SZEKANECZA, Z.; KOCH, A. E. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 19, p. 289-295, 2007.

VAN DEN BERG, W. B.; Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. **Ann. Rheum. Dis.,** v. 1, p. 81-4, 2000.

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.** Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

VIDAL, S. M.; MALO, D.; VOGAN, K.; SKAMENE, E.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. **Cell,** v. 73, p. 469-85, 1993.

VIDAL, S. M.; TREMBLAY, M. L.; GOVONI, G. The *Ity/Lsh/Bcg locus*: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. **J. Exp. Med**., v. 182, p. 655-666, 1995.

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

ZINS, S. R.; AMARE, M. F.; ANAM, K.; ELSTER, E. A.; DAVIS, T. A. Wound trauma mediated inflammatory signaling attenuates a tissue regenerative response in MRL/MpJ mice. **J. Inflamm. (Lond)**, v. 25, p. 7, 2010.

WANG, Y.; CHEN, W.; LI, X.; CHENG, B. Degenerated primer design to amplify the heavy chain variable region from immunoglobulin cDNA. **BMC Bioinformatics**, v 12, p. 4-9, 2006.

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

WETZLER, C.; KAMPFER, H.; STALLMEYER, B.; Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. **J. Invest. Dermatol**., v. 115, p. 245-53, 2000.

WOJCIECHOWSKI, W.; DESANCTIS, J.; SKAMENE, E.; RADZIOCH, D. 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.,** v. 163, p. 2688-96, 1999.

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.

ZHAO, M.; WIMMER, A.; TRIEU, K.; DISCIPIO, R. G.; SCHRAUFSTATTER, I. U. Arrestin regulates MAPK activation and prevents NADPH oxidase-dependent death of cells expressing CXCR2. **J. Biol. Biochem.**, v. 279, n. 47, p. 49259-49267, 2004.