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

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 AlRmax e AlRmin 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 AlRmax e para taxia, contração muscular e ciclo de ubiquitina em AlRmin. 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 II1b, II8rb 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 *II-1β*, *II-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.

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 póslesão 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 mesênguima - 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-1 α 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.

Isogênicas	A/J x DBA2/J	SWR/J x P/J		SJL x CBA		C57BL/6J x BALB/cJ		BALB/cJ
Híbridos	F1	х	F1		F1	х	F1	
Segregantes		F2		х		F2		
Segregantes	F3=F0 População Inicial de Seleção							

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 P₁₀₀) 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).

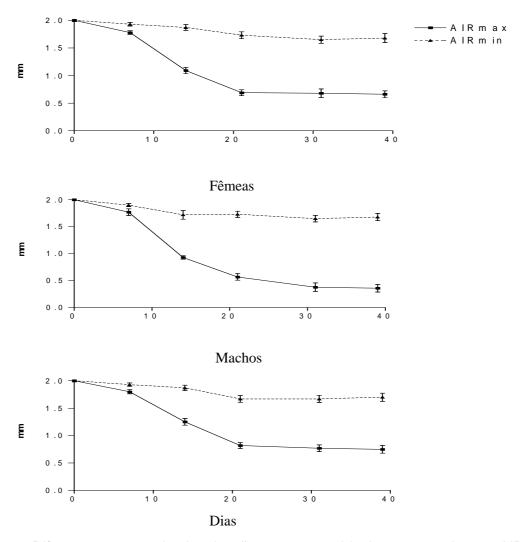


Figura 2 - Diferentes tempos de cicatrização e reparo tecidual em camundongos AIRmax e AIRmin. Os dados foram expressos em média aritmética e desvio padrão * P < 0,05.

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.

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 II1b, II8rb 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.

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 -AACt 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 (AlRmax) e mínima (AlRmin) 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.