

LUCIANA CARLA OLIVA MARQUES PETERS

**IDENTIFICAÇÃO DOS *LOCI* REGULADORES DA INTENSIDADE DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA ENVOLVIDOS NO
DESENVOLVIMENTO DA ARTRITE INDUZIDA POR PRISTANE EM
CAMUNDONGOS SELECIONADOS GENETICAMENTE**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Imunologia).

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUCIANA CARLA OLIVA MARQUES PETERS

**IDENTIFICAÇÃO DOS *LOCI* REGULADORES DA INTENSIDADE DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA ENVOLVIDOS NO
DESENVOLVIMENTO DA ARTRITE INDUZIDA POR PRISTANE EM
CAMUNDONGOS SELECIONADOS GENETICAMENTE**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Imunologia).

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Marcelo De Franco

São Paulo

2009

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

© reprodução total

Peters, Luciana Carla Oliva Marques.

Identificação dos *loci* reguladores da resposta inflamatória aguda envolvidos no desenvolvimento da artrite induzida por pristane em camundongos selecionados geneticamente / Luciana Carla Oliva Marques Peters. -- São Paulo, 2009.

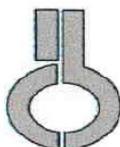
Orientador: Marcelo De Franco.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunogenética.

Versão do título para o inglês: Identification of acute inflammatory response *loci* involved on pristane-induced arthritis development in mice genetically selected.

Descritores: 1. Camundongos selecionados geneticamente 2. Resposta inflamatória aguda 3. *Loci* de traço quantitativo 4. Artrite induzida por pristane 5. Expressão gênica 6. Microarray e qPCR I. De Franco, Marcelo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB48/2009



**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 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

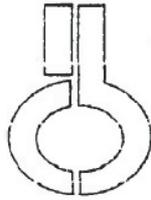
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n° **132** nas fls. **10** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo De Franco, Coordenador da Linha de Pesquisa "**Identificação do loci reguladores da intensidade da resposta inflamatória aguda envolvidos no desenvolvimento da artrite induzida pelo pristane em camundongos selecionados geneticamente para a máxima ou mínima resposta inflamatória aguda**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Luciana Carla Oliva Marques Peters** e os pesquisadores **Dra. Olga Célia Martinez Ibañez, Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho, Dra. Nancy Starobinas e Dra. Wafa Hanna Koury Cabrera**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **16.12.2004**.

São Paulo, 20 de dezembro de 2004.

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA



**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 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of. Circ.CEEA.06.08
WTL/mcgn

São Paulo, 08 de setembro de 2008.

Prezado^(a) Professor^(a),

REF.: Protocolo nº 132/04.

"Identificação do loci reguladores da intensidade da resposta inflamatória aguda envolvidos no desenvolvimento da artrite induzida pelo pristane em camundongos selecionados geneticamente para a máxima ou mínima resposta inflamatória aguda"

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, foi prorrogada por (3) três anos, a contar da data da sua aprovação pela CEEA/ICB.

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

Cordialmente.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da Comissão de Ética em
Experimentação Animal - ICB USP

Ilmo^(a) Sr^(a),

Prof^(a) Dr^(a) MARCELO DE FRANCO

Departamento de Imunologia

Instituto de Ciências Biomédicas -USP

EXPEDIÇÃO
DATA 12/09/08
REL. N.º 3815

*Este trabalho foi realizado no Laboratório de
Imunogenética do Instituto Butantan com o apoio
financeiro da Fapesp.*

Aos meus pais por sempre serem o meu “porto seguro”.

Aos meus irmãos que tanto amo: Caíto, Dani, Guto, Ana e Otávio.

Ao meu precioso sobrinho Caio.

Ao meu querido Fabrício, pelo amor e paciência.

Aos meus avôs, Nena e Edí, nem preciso falar.

*À minha amiga-irmã Patrícia, por tudo o que passamos
e pelo que passaremos juntas.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e “Boss”, Dr. Marcelo De Franco, pela imensa paciência e por ter me acolhido sempre, principalmente nos meus momentos mais difíceis. Muito obrigada por ter me orientado nestes quase oito anos!!!

À Dra. Olga Ibañez pela atenção e por ter me aberto as portas do Laboratório de Imunogenética.

À Dra. Milene Tino De Franco pela amizade.

Aos pesquisadores (as) e doutores (as) do Laboratório de Imunogenética: Wafa Cabrera, Orlando Ribeiro, Nancy Starobinas, Solange Massa, Solange Carbonare e ao meu bom amigo José Ricardo Jensen, que quando iniciei no mestrado era aluno de doutorado e hoje é um pesquisador!.

Às minhas amigas de laboratório Tatiane, Simone, Iana, Layra, Francisca, Débora, Andrea Borrego, Andrea Arruda, Alessandra, Jussara e Talita. A nossa amizade se iniciou no convívio do laboratório, mas continua fora dele.

Ao meu amigo Vinícius pela alegria em todos os momentos que passamos juntos, e ao Cristiano.

À Kazumi, pela preocupação, amizade, estadia, aprendizado... Ao seu esposo Laerte e meus irmãos de coração Adriano e César.

Às amigas: Adriana, Carla e Robertinha, que não estão mais no laboratório, mas que considero e sinto saudades.

Aos amigos que fiz no Feinstein Institute Max Brenner, Adriana Mello (Adri), Teresa Laragione e Franak Batliwalla nunca esquecerei tudo o que fizeram por mim.

Aos meus amigos de docência, com especial carinho ao Prof. Eduardo Filoni, Profa. Viviana Paes, Profa. Luciana Rodrigues e Profa. Andrea Colombo, pelo auxílio no desenvolvimento final desta tese. À todos os meus colegas de trabalho e aos meus alunos.

À minha sempre amiga Márcia Dellamano, por ter me auxiliado no início disso tudo.

À família Zavalloni, que sempre me ajudou aqui em São Paulo, me recebendo de portas abertas nos momentos mais difíceis que passei. Obrigada! Com especial carinho à Dona Anna.

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

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

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

E a Deus, inicial e principalmente...

“All endings are also beginnings”

Mitch Albom

RESUMO

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

Camundongos AIRmax e AIRmin homozigotos para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* foram avaliados para susceptibilidade à artrite induzida por pristane (PIA). A presença do alelo *S* aumentou a incidência e a gravidade nos AIRmax, sugerindo que o gene *Slc11a1*, ou outro próximo, esteja interagindo com os *loci* de resposta inflamatória na modulação de PIA. Para identificar estes *loci* foram realizados estudos de associação genótipo-fenótipo e de expressão gênica global. Os RNAs das patas dos animais foram isolados após 180 dias da indução por pristane. As análises de expressão gênica global foram realizadas usando a plataforma Codelink (36k genes), cujos resultados foram validados por PCR em tempo real. Os estudos de associação foram realizados através da análise de polimorfismo de microssatélites pelo programa MapManager. Foram identificadas duas regiões nos cromossomos 1 e 11. Um número grande de genes diferencialmente expressos foi verificado nos animais AIRmax SS cujos temas biológicos significativamente sobre-representados foram a resposta inflamatória e quimiotaxia. Os camundongos AIRmax SS também possuem uma ativação maior dos genes *Ccl3*, *Ccl7*, *C3ar1*, *Il10*, *Stat3*, *Tirap*, *Trem 1*, *Trem 3*, *Mefv*, *Ptx3*, *Chi3l3* e *Kras*. Alguns desses genes co-localizam com regiões previamente mapeadas nos cromossomos 1 e 11.

Palavras-chave: Resposta inflamatória aguda. Camundongos selecionados geneticamente. Artrite induzida por pristane. Loci de traço quantitativo. Expressão gênica.

ABSTRACT

PETERS, L. C. Identification of acute inflammatory response *loci* involved on pristane-induced arthritis development in genetically selected mice. 2009. 127f. Ph.D. Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

AIRmax and AIRmin mice homozygous for *Slc11a1* *R* and *S* allele were evaluated for pristane-induced arthritis (PIA) susceptibility. The presence of *S* allele increased the incidence and the arthritis severity in AIRmax mice, suggesting that *Slc11a1* or other closed-linked gene interacts with inflammatory *loci* to modulate PIA. In order to identify inflammatory modifier *loci* modulating experimental arthritis development, genotype-phenotype association studies and global gene expression analyses were performed. Mice received i.p. injections of pristane and the paw RNAs were isolated at day 180. Global gene expression analysis was performed on Codelink bioarrays (36k genes) and validated by real time PCR. The microsatellite polymorphism analyses were performed using MapManager program. Two regions on chromosomes 1 and 11 were identified. Higher number of differentially-expressed genes were detected in AIRmax SS subline, which significant over-represented biological themes were related to inflammatory response and chemotaxis. Susceptible AIRmax SS mice also display high up-regulation of *Ccl3*, *Ccl7*, *C3ar1*, *Il10*, *Stat3*, *Tirap*, *Trem 1*, *Trem 3*, *Mefv*, *Ptx3*, *Chi3l3* e *Kras* genes. Some of them co-localize with previously identified regions mapped on chromosomes 1 and 11.

Key words: Acute inflammatory response. Mice genetically selected. Pristane-induced arthritis. Quantitative Trait Loci. Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Avaliação da integridade do RNA total.....	64
Figura 2. Avaliação da integridade do cRNA.....	66
Figura 3. Controles negativos da lâmina de microarray.....	68
Figura 4. Controles positivos da lâmina de microarray.....	69
Figura 5. Gel exemplificando a detecção dos alelos <i>R</i> e <i>S</i> do gene <i>Slc11a1</i> em animais (A) AIRmax SS (n=7) e (B) AIRmax SS (n=8) da geração F14.....	71
Figura 6. (A) Incidência e (B) gravidade de artrite induzida por pristane nos animais AIRmax RR (n=16), AIRmax SS (n=19), AIRmin RR (n=17) e AIRmin SS (n=10).....	73
Figura 7. (A) Incidência e (B) gravidade de artrite nos animais segregantes F2 (AIRmax <i>versus</i> AIRmin) em relação aos animais AIRmax (n=16) e AIRmin (n=17) parentais.....	80
Figura 8. Representação esquemática da distribuição dos fenótipos da AIR na população F2 (AIRmax <i>versus</i> AIRmin), que seguem a curva de Gauss (A). Os círculos representam os animais com os fenótipos nos extremos da curva, em vermelho os extremos mínimos e em azul os extremos máximos para os fenótipos de seleção (B).....	81
Figura 9. Número de genes ativados e reprimidos nas patas dos animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS experimentais <i>versus</i> controles.....	85
Figura 10. Distribuição cromossômica dos genes modulados nas patas artríticas de animais AIRmax RR em relação aos controles.....	86
Figura 11. Distribuição cromossômica dos genes modulados nas patas artríticas de animais AIRmax SS em relação aos controles.....	89
Figura 12: Análise da expressão gênica de <i>Ilf6</i> por (A) qPCR e (B) <i>Microarray</i> em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles.....	91
Figura 13. Análise da expressão gênica de <i>Ilf1b</i> por (A) qPCR e (B) <i>Microarray</i> em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles.....	92
Figura 14. Análise da expressão gênica de <i>Tnfa</i> por (A) qPCR e (B) <i>Microarray</i> em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles.....	92
Figura 15. Análise da expressão gênica de <i>Ilf10</i> por (A) qPCR e (B) <i>Microarray</i> em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles.....	93
Figura 16. Análise da expressão gênica de <i>Ilf12a</i> por (A) qPCR e (B) <i>Microarray</i> em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de	

artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles.....94

Figura 17. Análise da expressão gênica de *I11b* por **(A)** qPCR e **(B)** *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS , AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles.....95

Figura 18. Análise da expressão gênica de *I118* por **(A)** qPCR e **(B)** *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS , AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles.....96

Figura 19. Análise da expressão gênica de *I18rb* por **(A)** qPCR e **(B)** *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS , AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles.....96

Figura 20. Análise da expressão gênica de *Caspase 8* por **(A)** qPCR e **(B)** *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS , AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles.....97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos primers utilizados nas reações de qPCR	61
Tabela 2. Análise no DNA genômico das linhagens isogênicas de marcadores de microssatélites e genes localizados no cromossomo 1.....	75
Tabela 3. Análise no DNA genômico das linhagens isogênicas de marcadores de microssatélites localizados no cromossomo 11.....	74
Tabela 4. Representação das frequências de alelos obtidos no cromossomo 1 na Seleção de inflamação.....	76
Tabela 5. Representação das frequências de alelos obtidos no cromossomo 1 na Seleção de inflamação.....	76
Tabela 6. Representação das frequências de alelos obtidos no cromossomo 1 nas sublinhagens.....	76
Tabela 7. Representação das frequências de alelos obtidos no cromossomo 1 nas sublinhagens.....	77
Tabela 8. Análise de correlação de marcadores de QTL no cromossomo 1 e 11 com o fenótipo de incidência de artrite nos animais AIRmax RR e AIRmax SS.....	78
Tabela 9. Análise de correlação de marcadores de QTL no cromossomo 1 e 11 com o fenótipo de gravidade de artrite nos animais AIRmax RR e AIRmax SS.....	78
Tabela 10. Avaliação dos fenótipos da intensidade da resposta inflamatória aguda nas linhagens parentais.....	79
Tabela 11. Avaliação dos fenótipos da intensidade da resposta inflamatória aguda após 24 horas de Biogel e de artrite induzida por pristane aos 180 dias de pristane nos extremos da população F2 segregante.....	82
Tabela 12. Análise de co-segregação de marcadores de QTL nos extremos AIR da população F2 para o fenótipo de incidência de artrite.....	83
Tabela 13. Análise de co-segregação de marcadores de QTL nos extremos AIR da população F2 para o fenótipo de gravidade de artrite.....	83
Tabela 14. Categorias funcionais sobre-representadas nos genes ativados dos animais AIRmaxRR artríticos em relação aos controles.....	86
Tabela 15. Categorias funcionais sobre-representadas nos genes reprimidos dos animais AIRmaxRR artríticos em relação aos controles.....	86
Tabela 16. Categorias funcionais sobre-representadas nos genes ativados dos animais AIRmax SS artríticos em relação aos controles.....	87
Tabela 17: Categorias funcionais sobre-representadas nos genes reprimidos dos animais AIRmax SS artríticos em relação aos controles.....	87
Tabela 18. Intensidade da expressão gênica por <i>Microarray</i> nos grupos experimentais e controles das sublinhagens, e genes ativados e reprimidos.....	88
Tabela 19. Correlações entre as expressões gênicas obtidas no qPCR e <i>Microarray</i>	90

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – ácido araquidônico

AIR – resposta inflamatória aguda

AIRmax – Linhagem de camundongos selecionados para alta resposta inflamatória aguda

AIRmin – Linhagem de camundongos selecionados para baixa resposta inflamatória aguda

BALB/c – Linhagem de camundongos isogênica

COX-1 – cicloxigenase-1

COX-2 – ciclooxigenase-2

DBA – Linhagem de camundongos isogênica

LX – Lipoxina

MCP-1 – *Monocyte chemoattractant Protein- 1*

MIP-1 α – *Macrophage Inhibitory protein - 1 α*

NF- κ B – Fator nuclear- κ B

NO – Óxido Nítrico

O₂⁻ - Ânion superóxido

PBS – Solução Salina em tampão fosfato

PG – Prostaglandina

PMN – Polimorfonucleares

qPCR – PCR quantitativo

QTL – *Quantitative Trait Loci*

TXB₂ – Tromboxana B₂

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Inflamação aguda e crônica.....	18
1.2 Camundongos selecionados para resposta inflamatória aguda e sua relação com o desenvolvimento de artrite induzida por pristane.....	37
2 OBJETIVOS.....	52
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1 Animais.....	53
3.2 Extração do DNA genômico.....	53
3.3 Genotipagem para o gene <i>Slc11a1</i>	54
3.4 Indução e avaliação de artrite induzida por pristane.....	55
3.5 Análise de polimorfismos de DNA.....	55
3.6 Produção da população segregante F2 (AIRmax versus AIRmin).....	56
3.6.1 Indução do processo inflamatório agudo.....	57
3.6.2 Análises de correlação e de co-segregação.....	57
3.7 Análise da expressão gênica.....	58
3.7.1 Extração do RNA total utilizando TRIzol.....	59
3.7.2 Purificação do RNA total.....	59
3.7.3 qPCR em Tempo Real.....	60
3.7.3.1 Obtenção do cDNA.....	60
3.7.3.2 Quantificação da expressão gênica por PCR em Tempo-Real.....	61
3.7.4 Análise da expressão gênica global por <i>Microarray</i>	62
3.7.4.1 Purificação do RNA.....	62
3.7.4.2 Preparação dos mRNAs bacterianos.....	64
3.7.4.3 Síntese do cDNA de fita simples.....	64
3.7.4.4 Síntese do cDNA de fita dupla.....	65
3.7.4.5 Purificação do cDNA de dupla fita.....	65
3.7.4.6 Síntese do cRNA por transcrição in vitro (IVT).....	65
3.7.4.7 Purificação do cRNA.....	65
3.7.4.8 Fragmentação do cRNA.....	67
3.7.4.9 Hibridização.....	67
3.7.4.10 Detecção com Cy5-Streptavidina.....	67
3.7.4.11 Análise dos dados obtidos.....	67
3.8 Análise estatística.....	70
4 RESULTADOS.....	71
4.1 Genotipagem para os alelos <i>R</i> e <i>S</i> do gene <i>Slc11a1</i>	71
4.2 Artrite induzida pelo pristane (PIA).....	72
4.3 Identificação de polimorfismos.....	73
4.4 Estudos de correlação dos desvios de frequências de genes e marcadores genéticos com os fenótipos de PIA.....	77
4.5 Estudos de co-segregação.....	78
4.6 Análise da expressão gênica global.....	84
4.6.1 Análise dos genes ativados e reprimidos nas sublinhagens da Seleção de Inflamação homocigotas para os alelos do gene <i>Slc11a1</i>	84
4.7 Validação do experimento de <i>Microarray</i> por qPCR.....	90
4.8 Expressão gênica por qPCR e <i>Microarray</i>	90
4.8.1 Expressão do gene <i>Il6</i>	90
4.8.2 Expressão do gene <i>Il1b</i>	91
4.8.3 Expressão do gene <i>Tnfa</i>	92
4.8.4 Expressão do gene <i>Il10</i>	93
4.8.5 Expressão do gene <i>Il12a</i>	93
4.8.6 Expressão do gene <i>Csf2</i>	94
4.8.7 Expressão do gene <i>Il18</i>	95
4.8.8 Expressão do gene <i>Il8rb</i>	96
4.8.9 Expressão do gene <i>Caspase 8</i>	97
5 DISCUSSÃO.....	98
6 CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS.....	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação aguda e crônica

A inflamação é uma resposta normalmente benéfica do hospedeiro a uma injúria tecidual por trauma, agentes químicos ou infecciosos, que pode em determinadas situações resultar na perda da integridade anatômica e funcional do tecido. Essa resposta envolve uma interação complexa entre diversos tipos de células, tanto as presentes no microambiente tecidual como as que são recrutadas ao local da injúria (BUCLEY, 2001, 2003a; TSIROGIANNI et al., 2006).

Os agentes indutores ou sinais iniciadores de uma resposta inflamatória podem ser exógenos ou endógenos. Os indutores exógenos podem ser classificados em dois grupos: microbianos e não-microbianos. O grupo de indutores microbianos compreende os fatores de virulência e os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) que são reconhecidos pelos receptores do tipo Toll (TLR – *Toll-like receptors*), enquanto o grupo não microbiano inclui alérgenos, irritantes, corpos estranhos e componentes tóxicos. Já os indutores endógenos da inflamação são sinais produzidos por tecidos ou células do próprio hospedeiro em estresse, danificados ou em mau funcionamento (RAKOFF-NAHOUM et al., 2004; MARIATHASAN et al., 2006; BIANCHI, 2007; DOSTERT et al., 2008; MEDZHITOV, 2008; ROCK e KONO, 2008; SOKOL et al., 2008, TURER et al., 2008).

A fase inicial da inflamação é um processo altamente regulado que depende do agente indutor e que visa à manutenção da homeostase no organismo. Quando efetiva, a resposta inflamatória assegura a resolução e restauração da arquitetura normal do tecido. Entretanto, um controle inapropriado deste mecanismo de defesa da imunidade inata pode contribuir para o desenvolvimento de uma inflamação crônica, a qual pode persistir por dias, meses ou vários anos (HOEBE et al., 2004; LAWRENCE e GILROY, 2007; POBER e SESSA, 2007).

Basicamente, a resposta inflamatória aguda envolve o extravasamento coordenado de componentes sanguíneos, como proteínas do plasma e leucócitos (inicialmente neutrófilos e posteriormente monócitos) ao local da injúria. Porém, o extravasamento destes elementos não ocorre ao acaso, dependendo de uma sequência ordenada de interações moleculares mediadas tanto pela expressão

como pela liberação de fatores inflamatórios (LAWRENCE e GILROY, 2007; MEDZHITOV, 2008).

Muitos destes fatores inflamatórios derivados de proteínas plasmáticas ou secretados por células possuem efeitos comuns na vasculatura e no recrutamento de leucócitos. Os mediadores celulares podem ser produzidos por leucócitos especializados, como por exemplo, mastócitos e macrófagos residentes nos tecidos ou por células presentes nos tecidos. A histamina é um exemplo de mediador pré-formado, armazenada em mastócitos, basófilos e plaquetas, outros fatores pré-formados circulam como precursores inativos no plasma como os zimogênios inativos da cascata da coagulação. Durante a fase aguda da resposta inflamatória, a concentração de mediadores pode aumentar acentuadamente, como resultado da ativação dos hepatócitos que produzem a proteína C reativa (CRP) regulada principalmente em resposta a IL-6. Além disso, os mediadores inflamatórios podem ser produzidos diretamente em resposta ao agente indutor (DE FILIPPIS et al., 2008; KRUPICZOJC et al., 2008; MANTOVANI et al., 2008; MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores inflamatórios podem ser classificados em sete grupos: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do sistema complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (KUMAR et al., 2003; MAJNO e JORIS, 2004; MEDZHITOV, 2008).

Aminas vasoativas como: a serotonina (5-HT), produzida pelas plaquetas, e a histamina produzida também pelas plaquetas, mastócitos e basófilos, atuam na vasculatura, causando aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação (ZARBOCK et al., 2007; DE FILIPPIS et al., 2008; MEDZHITOV, 2008).

Os peptídeos vasoativos podem ser armazenados em vesículas secretórias, como a substância P, ou gerados pelo processamento proteolítico de precursores inativos. A substância P, assim como o CGRP (*Calcitonin gene-related protein*) são neuropeptídeos liberados pelos neurônios sensoriais que atuam diretamente sobre os vasos sanguíneos causando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além da ativação de mastócitos (KUMAR et al., 2003; MAJNO e JORIS, 2004; MEDZHITOV, 2008).

Um peptídeo vasoativo gerado por proteólise é oriundo da ativação da via intrínseca da cascata de coagulação sanguínea, que depende da ativação por contato do fator XII ou fator de Hagemann que, entre outras funções, ativa o sistema cinina-caliceína, cujo principal é a bradicinina que é um potente vasodilatador, que

além de aumentar a permeabilidade vascular, causa dor pelo seu efeito pró-algésico. (KUMAR et al., 2003; MAJNO e JORIS, 2004; MEDZHITOV, 2008).

O sistema complemento é um importante sistema de vigilância dos mamíferos que compreende mais de trinta proteínas presentes no plasma (WALPORT, 2001). Os componentes do sistema complemento reconhecem e agentes indutores na forma de patógenos ou células alteradas do hospedeiro e iniciam uma cascata proteolítica produzindo fragmentos que induzem a resposta inflamatória aguda, lise celular, fagocitose e ativação de células B. Existem três maneiras principais de ativação do sistema complemento: 1ª) Via Clássica, através de presença de imunocomplexos (que são anticorpos das classes IgG e IgM ligados a antígenos específicos) e proteína C reativa. 2ª) Via das Lectinas, através da ligação de lectinas (proteínas que se ligam a açúcares) a padrões moleculares (como manose, N-acetilglicosamina ou fucose) encontrados em grande quantidade na superfície de microrganismos; 3ª) Via Alternativa, através de um mecanismo de ativação espontânea pela hidrólise do componente C3 do complemento, que ocorre em condições fisiológicas (GROS et al., 2008).

Os fragmentos do complemento C3a, C4a e C5a resultantes da ativação dessas três vias do sistema complemento, também conhecidos como anafilatoxinas, atuam como fatores quimiotáticos, ou seja, promovem o recrutamento de granulócitos e monócitos, além de induzirem a desgranulação de mastócitos no local da injúria (GROS et al., 2008; MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores lipídicos (eicosanóides e fator ativador de plaquetas) são derivados da clivagem dos fosfolipídeos das membranas plasmáticas pela enzima citosólica fosfolipase A₂ (cPLA₂) em ácido araquidônico (AA) e em ácido lisofosfatídico. O ácido araquidônico gera os eicosanóides através de sua metabolização tanto por ciclooxigenases (COX1 e COX2), que formam as prostaglandinas e tromboxanas, como pela ação de lipoxigenases, que geram os leucotrienos e lipoxinas. As prostaglandinas PGE₂ e PGI₂ (ou prostaciclina) são hiperalgésicas, potentes indutoras de febre e vasodilatadoras. A tromboxana A₂ (TXA₂) é vasoconstritora e induz a agregação plaquetária. Já as lipoxinas (protectinas e resolvinas) são inibidoras da inflamação, promovendo a resolução e o reparo tecidual. A segunda classe de mediadores lipídicos compreende o fator de ativação de plaquetas (PAF – *Platelet-activating factor*) que é gerado pela acetilação do ácido lisofosfatídico. Pode ser produzido por plaquetas, células endoteliais,

neutrófilos e macrófagos, e atuam no recrutamento e ativação de leucócitos, na vasodilatação e vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e ativação das plaquetas (ISHII e SHIMIZU, 2000; PRESCOTT et al., 2000; KUMAR et al., 2003; EGAN e FITZGERALD, 2006; SERHAN, 2007a).

As citocinas inflamatórias, como TNF- α (*Tumor necrosis factor-alpha*), IL-1 (*Interleukin-1*), IL-6 (*Interleukin-6*), são produzidas por vários tipos celulares, principalmente por macrófagos e mastócitos teciduais. Elas exercem diversas funções na resposta inflamatória, com atuação local na ativação das células endoteliais e leucócitos, e sistêmica na indução da resposta de fase aguda no fígado e de febre por atuar no sistema nervoso central (FILIPPIS et al., 2008; MEDZHITOV, 2008).

O TNF- α é uma citocina inflamatória e imunorregulatória produzida por macrófagos, monócitos, neutrófilos, células T e NK ativadas que pode agir localmente na inflamação ou sistemicamente. É um mediador central na resposta inflamatória do hospedeiro, pois ativa a expressão de moléculas de adesão, aumenta o trânsito de leucócitos, afeta a produção de citocinas e quimiocinas que controlam o recrutamento e ativação dos leucócitos, atua na resposta de fase aguda e na produção de febre (MOLLER e VILLIGER, 2006).

A principal fonte de IL-1 β são os fagócitos mononucleares ativados, que a produzem rapidamente na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), TNF- α , interferons (IFN) - α , β e γ , e da própria IL-1. É uma citocina pleiotrópica, que ativa as células B e T, monócitos e macrófagos, osteoblastos, fibroblastos, células musculares, endoteliais e epiteliais, além de induzir a resposta de fase aguda e febre. A IL-1 β é sintetizada na forma inativa, que necessita ser clivada pela enzima conversora da IL-1 (ICE) para ser ativada e secretada (DINARELLO, 2005; MOLLER e VILLIGER, 2006).

A IL-6 é predominantemente expressa por monócitos ou macrófagos ativados, mas também por células endoteliais e fibroblastos ativados em tecidos inflamados. Também é induzida por LPS, TNF- α , IL-1 e interferons. Discute-se se a IL-6 possui funções pró ou antiinflamatórias, pois a IL-6 não induz a produção de mediadores de atividade antiinflamatória como o hormônio corticotrófico (ACTH - *Adrenocorticotropic hormone*) e a expressão de inibidores teciduais de metaloproteases (TIMP – *Tissue inhibitor of metalloproteinases*) pelos sinoviócitos e

condrócitos. Além disso, induz a diferenciação terminal de células B em plasmócitos (GABAY, 2006; MOLLER e VILLIGER, 2006).

As quimiocinas são uma família de pequenas proteínas estruturalmente relacionadas que possuem de 70 a 90 resíduos de aminoácidos, que regulam a migração seletiva de leucócitos nos órgãos linfóides e tecidos inflamados. No processo de injúria tecidual, são produzidas por vários tipos celulares em resposta aos agentes indutores da inflamação (BORISH e STEINKE, 2003; MEDZHITOV, 2008; VIOLA e LUSTER, 2008). Além disso, podem induzir a ativação de leucócitos (como desgranulação e síntese de mediadores inflamatórios) e controlar a diferenciação e as funções efetoras de linfócitos (ROSSI e ZLOTNICK, 2000; BAGGIOLINI, 2001; MURPHY et al., 2001; DE FILIPPIS et al., 2008).

As quimiocinas são classificadas em quatro subfamílias baseadas na composição aminoterminal de aminoácidos, especialmente pela presença de motivos conservados de quatro resíduos de cisteínas, e são chamadas de subgrupos CC, CXC, C e CX₃C dependendo do arranjo aminoterminal dos resíduos conservados de cisteína (C) e de outros resíduos de aminoácidos (X) (LUSTER, 1999; BAGGIOLINI, 2001). Elas interagem com receptores que possuem sete domínios transmembrânicos acoplados a proteínas G os quais ativam várias vias de sinalização intracelular que conduzem a rearranjos no citoesqueleto e mobilização celular (MURPHY et al., 2001).

O recrutamento de neutrófilos ao tecido inflamado é direcionado principalmente pela subfamília CXC, caracterizada pelo motivo ELR (glutamato-leucina-arginina) na região aminoterminal. Todas as quimiocinas ELR⁺ são pró-inflamatórias, como por exemplo, CXCL8 ou interleucina-8 (IL-8) (VIOLA e LUSTER, 2008).

As enzimas proteolíticas (elastase, catepsinas, metaloproteases de matriz) possuem diversos papéis na inflamação, podendo degradar a matriz extracelular e proteínas da membrana basal (PARKS et al., 2004; MEDZHITOV, 2008).

Portanto, a produção desses mediadores inflamatórios resulta nos sinais cardinais da inflamação aguda: 1º) rubor e 2º) calor, como resultado do aumento do fluxo sanguíneo no tecido inflamado; 3º) tumor: pelo extravasamento do plasma rico em proteínas (chamado de exsudato) e pelo recrutamento e ativação dos leucócitos da circulação sanguínea para o tecido; 4º) dor: causada pela estimulação das fibras

nervosas sensoriais do tipo C e produção de bradicinina; podendo levar à 5^o) perda da função (LIBBY, 2007; POBER e SESSA, 2007; LAWRENCE et al., 2002).

De uma maneira sequencial, diante de uma injúria tecidual, infecciosa ou não, pode ocorrer o rompimento de vasos sanguíneos e vazamento de sangue para o ambiente tecidual, como consequência do dano às células endoteliais. Neste contexto ocorre a ativação da via do ácido araquidônico com produção de TXA₂ e PGI₂, que irão atuar, respectivamente, na vasoconstrição (contração) e vasodilatação (relaxamento) da musculatura lisa que envolve as arteríolas atuando na regulação do fluxo sanguíneo na microcirculação (EGAN e FITZGERALD, 2006; TSIROGIANNI et al., 2006).

Concomitantemente, ocorre a ativação das plaquetas e da cascata de coagulação sanguínea, que iniciam a restauração da lesão vascular através da formação de agregados de plaquetas e fibrinas, respectivamente. Além disso, as fibras de fibrina formadas pela cascata da coagulação podem ativar o sistema fibrinolítico e das cininas, culminando, respectivamente, na produção de peptídeos quimiotáticos derivados da degradação da fibrina e na ativação do sistema complemento, com produção de mais fatores quimiotáticos, como os fragmentos C3a e C5a; e na produção de bradicinina (GAILANI e RENNÉ, 2007; MACKMAN et al., 2007; TSIROGIANNI et al., 2006; MEDZHITOV, 2008).

As plaquetas ativadas neste microambiente produzem mediadores inflamatórios como histamina e serotonina, e fatores que visam à reconstituição do tecido vascular danificado, como os fatores de crescimento PDGF (*Platelet-derived growth factor*), VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) e TGF-β (*Transforming growth factor beta*), que também atuam como ativadores de macrófagos e fibroblastos (TSIROGIANNI et al., 2006; ZARBOCK et al., 2007; WOHNER, 2008).

A histamina atua nas células endoteliais das vênulas pós-capilares, causando a abertura de suas junções pela contração das fibras de actina e miosina presentes no citoplasma. Este processo altera a permeabilidade das vênulas, permitindo o extravasamento de proteínas do plasma sanguíneo para o local da injúria. Além disso, a histamina causa vasodilatação (POBER e SESSA, 2007).

Ao mesmo tempo, ocorre a ativação neurogênica no tecido conjuntivo lesado, com a liberação dos neuropeptídeos CGRP e substância P, que também irão atuar na musculatura lisa das arteríolas causando a vasodilatação, e nas células endoteliais das vênulas alterando a permeabilidade vascular (TSIROGIANNI et al.,

2006). Ocorre também a ativação dos macrófagos e mastócitos residentes no tecido conjuntivo que liberam vários mediadores inflamatórios, como a IL-1, TNF- α , quimiocinas, histamina, PAF, entre outros (TSIROGIANNI et al., 2006; LAWRENCE e GILROY, 2007; MEDZHITOV, 2008).

Neste momento da resposta inflamatória aguda, todos os mediadores inflamatórios produzidos estão atuando sobre as células endoteliais. Inicialmente induzindo o aumento da permeabilidade vascular e o extravasamento das proteínas plasmáticas para o local da injúria, em seguida induzindo a ativação das células endoteliais, que além de produzirem mediadores inflamatórios, passarão a expressar moléculas de adesão que irão interagir com os leucócitos presentes na circulação, promovendo a migração dos leucócitos para o local da injúria.

De acordo com Pober e Sessa (2007), a ativação das células endoteliais pode ocorrer de duas maneiras, através de uma resposta rápida e independente da expressão de novos genes (Tipo I) e uma resposta mais lenta, que depende da ativação de novos genes (Tipo II), através da presença do TNF- α e IL-1. A ativação endotelial do tipo I ocorre nos primeiros dez a vinte minutos após a injúria, e é mediada pela ligação a receptores heterotriméricos acoplados à proteína G, ou GPCRs (*G-protein-coupled receptor*), como receptores H1 de histamina. Após este período, esses receptores perdem a sensibilidade e não são mais estimulados, caracterizando a transitoriedade dessa sinalização, que limita o grau de inflamação (POBER e SESSA, 2007).

A ativação dos GPCRs resulta na ativação da fosfolipase A₂ celular (cPLA₂), que culmina na produção de PGI₂, além do óxido nítrico (NO – *Nitric Oxide*), que juntos induzem uma potente vasodilatação, relaxando o tônus da musculatura lisa das arteríolas terminais. Os eventos da ativação intracelular conduzem à contração dos filamentos de actina e miosina, e conseqüentemente à abertura de espaços entre as células endoteliais adjacentes, permitindo a passagem de proteínas do plasma para o tecido, que servem para criar uma matriz provisória que apóia e sustenta a entrada dos neutrófilos da circulação para o tecido, além de auxiliar na migração e sobrevivência dessas células (POBER e SESSA, 2007)

Esses eventos iniciam a exocitose dos corpos de Weibel-Palade (WPBs – *Weibel-Palade bodies*) que são vesículas secretórias especializadas que conduzem a P-selectina (CD62) para a superfície luminal da célula endotelial. Ocorre também a produção do PAF, que juntamente com a P-selectina, fornecem uma dupla

sinalização para os leucócitos sanguíneos. Estes iniciam o processo de ligação com as células endoteliais e de transmigração através de suas regiões adjacentes onde existe uma alta expressão de PECAM1 (*Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*) (POBER e SESSA, 2007).

A ativação endotelial do tipo II requer uma estimulação mais persistente, que envolve a presença de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-1 que, apesar de se ligarem a receptores diferentes (TNFR1 - *TNF receptor 1* e IL-1R1 - *Type 1 IL-1 receptor*, respectivamente), desencadeiam a ativação dos fatores de transcrição NF- $\kappa\beta$ (*Transcription factor nuclear- $\kappa\beta$*) e AP1 (*Activator protein 1*) na cascata de sinalização intracelular. Esse processo é mais lento em relação ao tipo I, pois depende da transcrição e tradução de novas proteínas pelas células endoteliais (POBER e SESSA, 2007).

A ativação do tipo II se assemelha à do tipo I, pois também induz vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular pela síntese dos mesmos mediadores. Entretanto, no tipo II ocorre uma maior síntese de PGI₂ que, juntamente com a IL-1 e o TNF- α , atuam no aumento da permeabilidade vascular, processo que determina a manutenção e persistência do extravasamento protéico ao tecido. Este por sua vez fornece uma matriz provisória firme, diferente do edema transitório na ativação do tipo I, podendo ter consistência mais firme devido à presença de fibrina proveniente do fibrinogênio plasmático (POBER e SESSA, 2007).

As citocinas inflamatórias também induzem a expressão da E-selectina e liberação da quimiocina IL-8 (ou CXCL8) pelas células endoteliais, resultando em um recrutamento de neutrófilos mais efetivo. A ativação endotelial do tipo II evolui havendo a expressão de ICAM1 (*Intercellular adhesion molecule 1*) e VCAM1 (*Vascular cell-adhesion molecule 1*) (POBER e SESSA, 2007).

A migração dos leucócitos do sangue para o foco inflamatório através das células endoteliais é um dos eventos centrais da inflamação, não somente para que ocorra a eliminação do agente indutor, mas também a reconstituição do tecido injuriado pelo processo de cicatrização e regeneração tecidual. Mas para chegarem ao tecido, os leucócitos passam por um processo chamado de cascata de adesão, cujas fases (rolamento, adesão e transmigração endotelial) ocorrem nas vênulas pós-capilares (LEY et al., 2007; SERHAN et al., 2007b).

As moléculas de adesão, essenciais nas interações entre as células endoteliais e os leucócitos, são da família das selectinas (E-selectina, P-selectina e

L-selectina), da superfamília das imunoglobulinas (PECAM, VCAM1 e ICAMs) e da família das integrinas (LFA1 e VLA4). As quimiocinas presentes nas glicoproteínas endoteliais e nas moléculas da matriz extracelular atuam nas fases de ativação e quimiotaxia dos leucócitos que possuem receptores específicos acoplados à proteína G (SALMI e JALKANEN, 2005).

Os primeiros leucócitos a alcançarem o local da inflamação são os neutrófilos que interagem de maneira reversível, por meio dos ligantes glicosilados PSGL1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*) e ESL-1 (*E-selectin ligand 1*), com as células endoteliais ativadas, que expressam P-selectina e E-selectina. Além disso, os neutrófilos expressam constitutivamente a L-selectina que interage com seu ligante nas células endoteliais (BEUTLER, 2004; LEY et al., 2007; SERHAN et al., 2007b).

A firme adesão dos neutrófilos ao endotélio ocorre através da ligação das integrinas LFA1 ou CD11a/CD18 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) e CR3 ou CD11b/CD18 (CR3 - *Complement receptor factor 3*) com as moléculas da ICAM1 e ICAM2 expressas nas células endoteliais. Nesta etapa também ocorre a ativação e espraiamento dos neutrófilos pela interação com os fatores quimiotáticos liberados TNF- α , PAF, C5a, LTB₄ e IL-8 (CXCL8), os quais promovem alterações conformacionais nas integrinas, possibilitando a firme adesão às ICAMs (BEUTLER, 2004; LEY et al., 2007b).

A IL-8 estimula a diapedese, processo de migração dos leucócitos através das células endoteliais em direção ao gradiente de produção da quimiocina, que também é dependente das interações descritas entre as integrinas e as moléculas da superfamília das Ig descritas acima, somadas à presença da PECAM-1 (BEUTLER, 2004)

Concomitantemente ocorre a síntese de outras quimiocinas, como a CCL2 (ou MCP-1 - *Monocyte chemotactic protein-1*) e CCL3 (ou MIP-1 α - *Macrophage inflammatory protein-1 alpha*) que modificam a expressão das moléculas de adesão, passando o VLA-4 (*Very Late Antigen-4*) dos monócitos a interagirem com a VCAM-1 endotelial. Esse processo favorece a transição de um rico em neutrófilos para um infiltrado rico em células mononucleares (POBER e SESSA, 2007).

Uma vez presentes no local da injúria, os neutrófilos, são eficientes fagócitos que engolfam e degradam microrganismos e detritos celulares, através de compartimentos chamados fagolisossomos, que utilizam uma combinação de mecanismos oxidativos, através da geração de espécies reativas do oxigênio (ROS

– *Reactive oxygen species*) e não oxidativos, através da fusão de seus grânulos contendo peptídeos e proteases (grânulos lisossomais) ao fagossomo (SERHAN et al., 2008; PHAM, 2006), além da liberação do conteúdo destes grânulos por exocitose no local da inflamação (NATHAN, 2006).

Os grânulos dos neutrófilos podem ser de quatro tipos, primários ou azurofílicos ou peroxidase positivos; secundários ou específicos; terciários ou gelatinase; e os secretórios, que são considerados peroxidase negativos, pela ausência de mieloperoxidase. Os grânulos primários sofrem uma limitada exocitose, podendo atuar em microrganismos extracelulares, entretanto, parecem contribuir principalmente na degradação intracelular de microrganismos presentes nos fagolisossomos. Possuem um grande conteúdo de mieloperoxidase (MPO), defensinas, BPI (*Bactericidal permeability increasing protein*), lisozimas e uma família estruturalmente relacionada com serino proteases (catepsina G, elastase e proteinase 3), entre outras classes de proteínas (PHAM, 2006; NATHAN, 2006; BORREGAARD et al., 2007)

Nos grânulos secundários, existem moléculas de adesão (CD11b/CD18), pentraxina 3, lisozima, lactoferrina, colagenase, leucolisina (MMP25), gelatinase (MMP9) entre outras classes de proteínas. Similarmente, os grânulos terciários possuem moléculas de adesão (CD11b/CD18), gelatinase (MMP9), leucolisina (MMP25), lisozima, NRAMP1, enquanto os grânulos secretórios possuem CD14, CD16, moléculas de adesão (CD11b/CD18), CR1 (*Complement receptor 1*) entre outras classes de proteínas (BORREGAARD et al., 2007; PHAM, 2006).

Portanto, os neutrófilos atuam na destruição tecidual, que apesar de aparentemente prejudicial, facilita a entrada de mais neutrófilos no local, permitindo o encontro dos neutrófilos com o agente infeccioso (e sua consequente fagocitose) e o contato do agente infeccioso com o conteúdo de seus grânulos liberados por exocitose no tecido (PHAM, 2006).

Ao mesmo tempo em que tudo isso está ocorrendo e à medida que o agente indutor da inflamação é eliminado, os neutrófilos também geram sinais para diminuir o seu próprio acúmulo, promover a sua própria morte por apoptose, atrair monócitos que irão se diferenciar em macrófagos teciduais que irão atuar na eliminação das células mortas, parando o processo de dano tecidual e iniciando o processo de reparo tecidual (PHAM, 2006; SERHAN et al., 2008).

Os principais mediadores antiinflamatórios liberados são as lipoxinas derivadas dos neutrófilos, assim como as resolvinas e protectinas produzidas pelos macrófagos em resposta à ingestão de neutrófilos apoptóticos. Esses mediadores inibem o recrutamento de neutrófilos. Além disso, esses mediadores antiinflamatórios e de pró-resolução recrutam monócitos não inflamatórios, que se diferenciam em macrófagos teciduais que irão secretar TGF- β . Alguns destes macrófagos podem deixar o tecido e migrar para o sistema linfático (PHAM, 2006; SERHAN et al., 2008)

De uma maneira geral, essa família de moléculas endógenas de pró-resolução atua de diversas formas e em diversas células, estimulando a produção de fatores de resolução e inibindo a produção de mediadores inflamatórios, a ativação das células endoteliais e a migração de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos) (SERHAN, 2008). Após a resolução da resposta inflamatória, ocorre o preenchimento do espaço lesado, através da formação de um novo tecido, epitélio e vasos sanguíneos (TSIROGIANNI et al., 2006). O processo de reparo tipicamente envolve duas fases: a regenerativa, na qual as células destruídas são substituídas pelo mesmo tipo celular, não deixando evidências de dano tecidual; e a fase conhecida como fibroplasia ou fibrose, na qual o tecido conjuntivo é substituído pelo parênquima normal (WYNN, 2008).

Como descrito anteriormente, a inflamação aguda é uma resposta rápida, que envolve o recrutamento e ativação de neutrófilos, macrófagos e de proteínas plasmáticas ao local injuriado ou infectado. Estas células atuam na eliminação do estímulo inicial, através da destruição de patógenos e remoção de detritos celulares. Porém, se o estímulo não é eliminado, o processo inflamatório irá persistir e evoluir, ocorrendo uma mudança no perfil de células recrutadas de neutrófilos para uma mistura inicial de fagócitos mononucleares e posteriormente de células T (POBER e SESSA, 2007).

As células T ativadas podem aumentar as funções efetoras dos fagócitos mononucleares ou recrutar células efetoras alternativas. Como consequência desses eventos, as células efetoras especializadas da imunidade adaptativa freqüentemente obtêm sucesso na eliminação do estímulo que resistiu à eliminação pela imunidade inata, permitindo a resolução e o reparo tecidual (HOEBE et al., 2004; POBER e SESSA, 2007).

Na inflamação crônica a fase de resolução se torna prolongada e desordenada, havendo a persistência do infiltrado inflamatório, hiperplasia tecidual e em último caso uma cicatriz tecidual. Ocorre, portanto, uma alteração no balanço homeostático entre os fatores que aumentam a celularidade (recrutamento de leucócitos, proliferação e retenção) e os que diminuem a celularidade (morte celular e emigração) (BUCLEY, 2003a; BUCLEY et al., 2004).

Fatores como estímulo antigênico prolongado, pela presença de microrganismos resistentes e a exposição de auto-antígenos podem conduzir a uma inflamação crônica com formação de um novo tecido, como o pannus na articulação de pacientes com artrite reumatóide, por exemplo, e podem levar à formação de estruturas linfóides ectópicas com áreas organizadas de células T e B (TAKEMURA et al., 2001; POBER e SESSA, 2007; BRENNAN e MCINNES, 2008).

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória auto-imune crônica, caracterizada pela inflamação e destruição da cartilagem e ossos das articulações, presença de células B e T auto-reativas, é pela presença de auto-anticorpos específicos para IgG (ou fator reumatóide), peptídeos citrulinados, colágeno do tipo II e proteoglicanos, BiP (*Immunoglobulin heavy gene binding protein*), proteínas de choque térmico (HSP – *Heat shock protein*), entre outros. Esta doença afeta cerca de 1% da população mundial causando significativa morbidade e mortalidade. É etiologicamente complexa, com importantes contribuições de vários fatores genéticos e ambientais (SELDIN et al., 1999; GABRIEL, 2001; STEINER e SMOLEN, 2002; FIRESTEIN, 2003; MACINNES e SCHETT, 2007; KLARESKOG et al., 2008).

Na articulação saudável a função fisiológica da membrana sinovial, formada por poucas camadas de fibroblastos e macrófagos sinoviais (ou sinoviócitos), é fornecer nutrientes e moléculas lubrificantes, como o ácido hialurônico, à cavidade articular e à cartilagem adjacente. Os fibroblastos sinoviais também estão envolvidos no contínuo remodelamento da matriz extracelular, através da produção de componentes da matriz, como colágeno e proteoglicanos, e também pela produção de várias enzimas que degradam a matriz, como as MMPs (SWEENEY e FIRESTEIN, 2004; MÜLLER-LADNER et al., 2007).

Nas articulações afetadas pela artrite reumatóide a membrana sinovial se torna hiperplásica devido à proliferação das células sinoviais e ao intenso infiltrado inflamatório. Como conseqüência, a camada interna da sinóvia aumenta para dez

camadas ou mais de células, num processo chamado pannus, ocorrendo também uma intensa neovascularização (PALEOG, 2002; KNEDLA et al., 2007; BRENNAN e MCINNES, 2008). O infiltrado inflamatório é caracterizado por macrófagos, células T, células B, plasmócitos, neutrófilos, mastócitos, células dendríticas e NK (*Natural Killer*) (TAK e BRESNIHAN, 2000; FIRESTEIN, 2003; SWEENEY e FIRESTEIN, 2004; MCINNES e SCHETT, 2007).

De uma maneira geral, uma vez iniciado, o processo auto-imune resultará na resposta inflamatória crônica contra antígenos próprios, na liberação de mediadores inflamatórios, produção de auto-anticorpos, formação de imunocomplexos, extravasamento e ativação de células T citotóxicas, células NK, macrófagos e células polimorfonucleares (PMN). Os anticorpos específicos para auto-antígenos induzem dano tecidual através de vários mecanismos, como por exemplo, acelerando a remoção das células ligadas aos auto-anticorpos, ativando o complemento, iniciando a citotoxicidade mediada por anticorpos ou interferindo nas funções celulares através da ligação em receptores de superfície da célula (ANDREAKOS et al., 2002; GREGERSEN e BEHRENS, 2006).

Em contrapartida, as células T medeiam a injúria tecidual através da interação célula-célula e da liberação de citocinas (células T CD4⁺) que ativarão células imunes, ou do ataque aos tecidos próprios (células TCD8⁺), resultando em grande dano tecidual. O estágio inicial das doenças auto-imunes é assintomático, enquanto o estágio de perpetuação resulta na persistência de células T e na manutenção da inflamação. Os processos iniciais de quebra da tolerância das células T e B são pouco definidos, e provavelmente ocorrem devido a defeitos na tolerância central e periférica (ANDREAKOS et al., 2002; GREGERSEN e BEHRENS, 2006).

Uma vez que processo artrítico está instalado, o tecido sinovial inflamado invade a cartilagem e ossos adjacentes promovendo a destruição da articulação, que é mediada por osteoclastos, condrócitos e pelos sinoviócitos. Somado a isso, a articulação na artrite reumatóide é um ambiente em um estado anormal de hipóxia e estresse biomecânico, que pode levar à formação de neo-antígenos que poderão ampliar a reação auto-imune (MCINNES e SCHETT, 2007; MÜLLER-LADNER et al., 2007; OTERO e GOLDRING, 2007; SHETT, 2007).

Portanto, o processo imunológico que ocorre nas articulações artríticas é complexo, mas de uma maneira geral, a presença destas células na membrana sinovial resulta na produção de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias

como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, linfotoxina (LT), GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), IFN- γ (*Interferon gamma*), IFN- α (*Interferon alpha*), FGF, VEGF, HMGB1 (*High mobility group box 1 protein*) e de seu receptor (FELDMANN et al., 1996; FIRESTEIN, 2003; SWEENEY e FIRESTEIN, 2004; MCINNES e LIEW, 2005; LUNDY et al., 2007).

Estes mediadores realizam sinalização parácrina e autócrina, atuando de várias maneiras: no recrutamento e retenção de células inflamatórias para as articulações; como ativadores de sinoviócitos, das células recrutadas e das próprias células produtoras, que ativadas, irão produzir mais do mesmo ou de outros tipos de citocinas, quimiocinas e enzimas (MMPs) que irão destruir as articulações e ossos adjacentes. Esta situação resulta em um mecanismo de *feedback* positivo, além do sinergismo entre os mediadores produzidos, formando uma rede de citocinas (SWEENEY e FIRESTEIN, 2004).

As citocinas estão envolvidas em vários processos que medeiam a inflamação crônica no processo de artrite. Apesar de a sinóvia normal ser relativamente acelular, durante o processo artrítico, a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, quimiocinas e VEGF na membrana sinovial, que recruta células imunes, as quais ficam retidas e sobrevivem na membrana sinovial pela presença nas articulações de TNF- α , IFN- α , IFN- β e IL-15. Em paralelo, ocorre uma resposta das células do tecido sinovial, de condrócitos e células da matriz óssea, pela presença de IL-17, RANKL (*Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*) e TGF- β , que provocam a destruição dos componentes teciduais e ósseos (MCINNES e LIEW, 2005).

Na sinóvia também são encontrados mediadores antiinflamatórios, como as citocinas IL-10, IL-11, IL-13, o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), e os receptores solúveis de TNF e IL-1, proteína ligante de IL-18 (IL18BP - *Interleukin 18 binding protein*). Entretanto, estudos sugerem que estes mediadores são insuficientes para regular o processo artrítico, havendo na artrite reumatóide um desequilíbrio entre a produção de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios (ANDREAKOS et al., 2002; MCINNES e LIEW, 2005). Além desses fatores antiinflamatórios foi detectada a presença de células T regulatórias (FOXP3⁺ CD4⁺ CD25⁺) no líquido sinovial de pacientes com artrite, porém com suas funções regulatórias diminuídas, provavelmente devido à presença do TNF- α que atua como

inibidor (EHRENSTEIN et al., 2004; SHAPENKO et al., 2005; NADKARNI et al., 2007).

A artrite reumatóide é etiologicamente complexa, com importantes contribuições de vários fatores genéticos e ambientais (FIRESTEIN, 2003). Fatores ambientais considerados fatores de risco para o desenvolvimento de artrite reumatóide incluem agentes microbianos, e estresse. Estudos recentes indicam que o hábito de fumar é um importante fator de risco, pois induz a citrulinização de proteínas próprias e a presença de anticorpos contra peptídeos citrulinados é uma característica altamente relacionada à artrite reumatóide e que possui associação com HLA (*Human Leucocyte Antigens*) (SELDIN et al., 1999; SCHELLEKENS et al., 2000; ZHANG et al., 2003; IRIGOYEN et al., 2005; COSTENBADER et al. 2006; KLARESKOG et al., 2006, 2007; MCINNES e SCHETT, 2007).

Dos fatores genéticos que possuem associação com a suscetibilidade e gravidade desta doença estão alguns alelos do sistema HLA, precisamente relacionado à herança de um elemento estrutural codificado por diferentes alelos da classe II do HLA, conhecido como epítipo compartilhado, localizado na terceira região hipervariável da cadeia DR β , chamado de alelos *HLA-DR β 1* (GREGERSEN et al., 1987; DEIGHTON et al., 1989; VAN DER HELM-VAN MIL et al., 2005).

Entretanto, a contribuição genética do HLA-DR no desenvolvimento da artrite reumatóide é estimada em torno de 40%, indicando que *loci* não relacionados ao MHC podem contribuir nesta patogênese, como os *loci* *PTPN22* (*Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22*), *PADI4* (*Peptidyl arginine deiminase type IV*), *CTLA4* (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), Fc γ Rs (Fc receptors for IgG), vários *loci* que codificam as citocinas TNF- α , IL-1, IL-10, IL-18 e seus receptores, *SLC11A1* (*Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter) member 1*) entre outros (DEIGHTON et al., 1989; SHAW et al., 1996; JOHN et al., 1997; SINGAL et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2002; VAN DER HELM-VAN MIL et al., 2005; AMOS et al., 2006; YEN et al., 2006).

O gene *SLC11A1* é o primeiro membro de uma superfamília de proteínas de membrana altamente conservadas, presente em vertebrados, plantas, insetos, fungos e bactérias (CELLIER et al., 1995, 2001). Em vista disso, foi nomeado como *Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter) member 1*, mas é conhecido também como *NRAMP1* (*Natural resistance-associated macrophage protein-1*) (VIDAL et al., 1993, 1995).

Existe uma homologia entre o gene *Slc11a1* murino localizado no cromossomo 1 e o gene *SLC11A1* humano localizado no cromossomo 2. Ambos codificam para uma proteína integral de membrana altamente hidrofóbica de aproximadamente 60 kDa, com 12 domínios transmembrânicos, uma alça extra citoplasmática glicosilada, com vários sítios de fosforilação (VIDAL, et al., 1993; BARTON et al., 1994; BLACKWELL et al., 1995; CELLIER et al., 1995), além de uma seqüência de transporte (*Consensus Transport Motif* – CTM) estruturalmente homóloga às proteínas de transporte de membrana encontradas em bactérias e eucariotos, indicando o envolvimento desta proteína no transporte de íons (CELLIER et al., 1995).

Esta proteína localiza-se nos compartimentos endossomal/lisossomal de macrófagos (GRUENHEID et al., 1997; SEARLE et al., 1998) e células dendríticas mielóides CD11c⁺ (STOBER et al., 2007), e nos grânulos terciários de neutrófilos (CELLIER et al., 1997; CANONNE-HERGAUUX et al., 2002), transportando ferro e outros cátions divalentes (KHUN et al., 1999; JABADO et al., 2000; BLACKWELL et al., 2001).

Os dados de literatura para a direção do transporte e o substrato transportado pela proteína *Slc11a1* são controversos (LAM-YUK-TSEUNG e GROS, 2003). Existem duas teorias: a primeira sugere que a *Slc11a1* retira os cátions de Fe⁺² das hemácias senescentes fagocitadas, do fagolisossomo para o citoplasma do macrófago (ATKINSON e BARTON, 1998, 1999). Um efeito direto deste transporte na resistência à infecção é de que o macrófago que possui o alelo normal do gene *Slc11a1* (*Slc11a1^R*) realizaria o transporte eficiente de íons para fora do fagolisossomo disponibilizando cátions essenciais para o crescimento (como o Fe⁺²) e o metabolismo bacterianos (como Zn⁺² e Mn⁺²) (GOMES e APPELBERG, 1998; ATKINSON e BARTON, 1999). A segunda teoria propõe que a proteína normal do gene *Slc11a1* transportaria o ferro para dentro do fagolisossomo, favorecendo a reação de Fenton/Harber-Weiss, que gera radicais hidroxilas altamente tóxicos para a bactéria (KHUN et al., 1999; ZWILLING et al., 1999; GOSWAMI et al., 2001; KHUN et al., 2001).

Em humanos, foi identificado que a região promotora do gene *SLC11A1* possui nove polimorfismos funcionais que codificam os alelos de 1 a 9 (BLACKWELL et al., 1995, 2000; GRAHAM et al., 2000; KOJIMA et al., 2001; ZAAHL et al., 2007). Estudos propõem que a alta expressão da *Slc11a1* em portadores do alelo 3 estaria

associada ao desenvolvimento de doenças auto-imunes, enquanto que a baixa expressão do alelo 2 está relacionada à suscetibilidade às infecções (BLACKWELL et al., 1995; SEARLE e BLACKWELL, 1999; BLACKWELL et al., 2000; ZAAHL et al., 2004; AWOMOJI, 2007).

Em camundongos, a susceptibilidade é associada à substituição do aminoácido glicina por ácido aspártico na posição 169, causada por uma mutação pontual na região codificadora do quarto domínio transmembrânico. Portanto, o alelo normal do gene *Slc11a1* produz uma proteína funcional na membrana dos fagolisossomos, enquanto o alelo mutado produz uma proteína não funcional (MALO e SKAMENE, 1994; VIDAL et al., 1995).

Portanto, o gene *SLC11A1* atua regulando a fase inicial da atividade microbicida do macrófago e possui efeitos pleiotrópicos, interferindo na ativação macrofágica através de efeitos na explosão respiratória e na produção de óxido nítrico e TNF- α (BARTON et al., 1995; CANONNE-HERGAUUX et al., 1999; LALMANACH et al., 2001; FRITSCHÉ et al., 2003). Além disso, interage na produção de IFN- γ e IL-1 (KITA et al., 1992; RAMARATHINAN et al., 1993; LALMANACH et al., 2001), e na expressão de moléculas de classe II do MHC (WOJCIECHOWSKI et al., 1999; FORTIER et al., 2005).

As maiorias dos avanços no entendimento da patogênese de artrite resultam de estudos em modelos animais, como ratos e camundongos (KANNAN et al., 2006). As vantagens no uso de modelos animais são: 1) monitoramento cuidadoso do desenvolvimento da patologia; 2) o conteúdo genético pode ser controlado e manipulado e 3) as influências ambientais podem ser controladas (JIRHOLT et al., 2001).

Um dos vários modelos murinos de artrite reumatóide é modelo de artrite induzido por pristane (PIA – *Pristane-induced arthritis*).

A artrite induzida por pristane é caracterizada por ser uma doença inflamatória crônica que, ao contrário dos outros modelos, é considerada tardia, com uma progressão que se estende de 60 a 200 dias dependendo da linhagem de camundongo utilizada (POTTER e WAX, 1981; BEDWELL et al., 1987; WOOLEY et al., 1989; PATTEN et al., 2004).

A PIA compartilha muitas características histológicas e clínicas com a artrite reumatóide, como o infiltrado inflamatório, hiperplasia da sinóvia com erosão da

cartilagem e ossos, formação de pannus nas articulações afetadas (HOPKINS et al., 1984; BEDWELL et al., 1987; WOOLEY et al., 1989).

O pristane (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano) é um óleo mineral utilizado inicialmente para a indução de plasmocitomas na cavidade peritoneal de camundongos, porém foi observado que aproximadamente 20% dos camundongos BALB/cAn e 70% de BALB/cJ desenvolveram artrite após 4 meses ou mais da injeção intraperitoneal de pristane (POTTER e WAX, 1981).

O modelo de PIA murino envolve injeções intraperitoneais (i.p.) de pristane induzindo uma resposta imune com importante participação de células T e B (THOMPSON et al., 1990; STASIUK et al., 1997), que sensibiliza os animais por um longo período de tempo, promovendo a instalação tardia de artrite (PORTER e WAX, 1981; VINGSBO et al., 1996).

No soro dos animais artríticos foi observada a presença de fator reumatóide circulante e de anticorpos contra colágeno (WOOLEY et al., 1989; THOMPSON et al., 1990) e apesar dos animais não receberem adjuvante micobacteriano na PIA foi observada uma resposta mediada por células T e por anticorpos específicos contra hsp65 de micobactéria no soro e articulações de camundongos com PIA (THOMPSON et al., 1990; STASIUK et al., 1997; THOMPSON et al., 1998).

Estudos mais recentes demonstraram a produção de anticorpos e a participação de linfócitos T contra um amplo espectro de antígenos presentes nas articulações, como hsp, agrecanos, fibronectina, decorinas, sulfatos A e B de condroitina, biglicanos, colágeno do tipo I e II, peptídeo CII, DNA dupla-fita, GPI (*Glucose-6-phosphate isomerase*), agregado murino de IgG, e para extratos da articulação de camundongos normais e artríticos (MORGAN et al., 2004; PATTEN et al., 2004). Além disso, estes estudos sugerem que no modelo de PIA exista uma ampla resposta aos componentes da articulação, e que talvez não exista um antígeno imunodominante, com exceção das hsp e dos colágenos do tipo I e II (WOOLEY et al., 1989; THOMPSON et al., 1998; PATTEN et al., 2004).

As proteínas de choque térmico (HSP - *heat shock protein*) são produzidas por células procariontes e eucariontes em resposta a uma variedade de estímulos, realizam funções relevantes em numerosos processos fisiológicos e estão relacionadas com a resposta imune. As HSP são subdivididas em diferentes famílias, de acordo com o seu peso molecular, entretanto, os membros da família HSP70 ocorrem em todas as espécies conhecidas e possuem uma estrutura

altamente conservada entre as espécies. As proteínas de choque térmico podem ser induzidas por vários fatores de estresse, como hipóxia, espécies reativas do oxigênio, citocinas (TNF- α e IFN- γ), aumento de temperatura (febre), deficiência nutricional, infecções virais, e são freqüentemente encontradas em locais de inflamação, inclusive nas articulações de pacientes com artrite, nos quais foram encontrados altos títulos de anticorpos anti-HSP autólogos (KAUFMANN, 1990; MORIMOTO e SANTORO, 1998; FINK, 1999; NAYLOR e HARTL, 2001; VAN EDEN et al., 2005).

Estudos demonstraram células T reativas para HSP, indicando que em particular HSP60 e HSP70, constituem um grupo de auto-antígenos que pela sua conservada evolução, permitem a reação cruzada com HSPs microbianas e HSPs próprias (VAN EDEN et al., 2005).

As proteínas de choque térmico estão entre os antígenos imunodominantes encontrados nas micobactérias, principalmente as de 70, 65, 18 e 14 kDa (SILVA et al., 1994). Em função desta imunodominância e do alto grau de homologia entre as HSP humanas e microbianas, surgiram hipóteses de que a HSP60 estejam envolvidas em várias doenças inflamatórias e auto-imunes (YOUNG et al., 1988; LAMB et al., 1989; KAUFMANN et al., 1990; YOUNG, 1990; JONES et al., 1993).

Estas hipóteses se baseiam principalmente no mimetismo molecular, pois a família de genes HSP60 inclui as hsp58 de mamíferos e as hsp65 de micobactérias. Conseqüentemente, os epítomos presentes nas hsp65 podem ser compartilhados pela hsp58 autóloga. A reação cruzada entre antígenos presentes no microambiente e as hsp expressas pelas células alvo desencadearia mecanismos importantes no processo de ativação da doença auto-imune (RES et al., 1988; GASTON et al., 1989; THOMPSON et al., 1990; VAN EDEN, 1991; VAN EDEN et al., 2005).

O mecanismo sugerido por Thompson et al. (1990) para explicar como um óleo mineral injetado em um local pode induzir artrite em outro, se baseia nas propriedades irritantes e adjuvantes do pristane (WILNER et al., 1963), que além de persistir na cavidade peritoneal poderia promover a apresentação repetida de auto-antígenos que normalmente não são apresentados, fazendo-o por um longo período de tempo. Portanto, a presença do pristane na cavidade peritoneal causa uma reação inflamatória local que poderia causar lesão e aumento de permeabilidade vascular no intestino, expondo antígenos bacterianos normalmente confinados no

intestino para a cavidade peritoneal e conseqüentemente, para o sistema imune (THOMPSON et al., 1990).

As células T, sensibilizadas para as hsp65 exógenas ou hsp58 endógenas (reação cruzada) se deslocariam para as articulações, mediadas por moléculas de adesão comuns ao endotélio das mucosas e da sinóvia. Camundongos mais velhos apresentam uma maior expressão de HSP nas articulações, o que poderia explicar a inflamação crônica e tardia causada pelo pristane (BARKER et al., 1996; THOMPSON et al., 1990).

1.2 Camundongos selecionados para resposta inflamatória aguda e sua relação com o desenvolvimento de artrite induzida por pristane

Os pesquisadores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan têm se dedicado ao estudo do controle genético da resposta imunológica através da produção, manutenção e utilização de linhagens de camundongos de alta e baixa resposta produzidos a partir do Processo de Seleção Genética Bidirecional.

O processo de seleção genética bidirecional visa à obtenção de animais com fenótipos extremos e opostos para uma determinada característica quantitativa, baseado em acasalamentos seletivos partindo de uma população inicial geneticamente heterogênea (STIFFEL et al., 1990).

Com o objetivo de estudar o controle genético da resposta imune inata foram produzidas linhagens de camundongos fenotipicamente selecionadas para a máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) intensidade da resposta inflamatória aguda (IBAÑEZ et al., 1992).

O método quantitativo utilizado para medir a intensidade da resposta inflamatória aguda (AIR) foi baseado no modelo proposto por Robert Fauve e colaboradores (1983), que utiliza como agente inflamatório microesferas de poliacrilamida (Biogel), substância porosa completamente insolúvel, não-biodegradável, não-antigênica e não-difusível, com nível de exclusão para proteínas até 4 ou 100 quilodaltons (kDa), chamadas, respectivamente, de Biogel P4 ou P100 (FAUVE et al., 1983; FONTAN e FAUVE, 1983).

Os parâmetros de seleção da intensidade da resposta inflamatória aguda ao Biogel foram: a determinação do número de células infiltradas e da concentração

protéica no exsudato inflamatório, parâmetros que são positivamente correlacionados (IBAÑEZ et al., 1992).

As condições experimentais ideais para a avaliação da AIR foram determinadas através da utilização de linhagens heterogêneas e isogênicas de camundongos que receberam volumes variados (de 0,25 ml até 1,25 ml) das suspensões de Biogel (P4 e P100), além da análise destes exsudatos em tempos diferentes (24, 48, 72 horas, 5 e 7 dias após a injeção subcutânea de Biogel) (HERODIN et al., 1983; STIFFEL et al., 1987, 1990; IBAÑEZ et al., 1992; RIBEIRO, 1994).

Estes estudos auxiliaram na escolha do Biogel P100 como agente selecionador, e na determinação do volume ideal da suspensão de Biogel P100 que seria utilizado para o início do processo seletivo, assim como na determinação do tempo de coleta do exsudato inflamatório, que ficou estabelecido respectivamente, em 0,75 ml de Biogel P100 aplicado subcutaneamente (s.c.) no dorso dos animais previamente depilados, com um tempo de coleta do exsudato de 72 horas após o estímulo inflamatório pelo Biogel (IBAÑEZ et al., 1992; RIBEIRO, 1994).

A partir da sexta geração de acasalamentos seletivos já foi possível identificar um aumento da capacidade inflamatória da linhagem de máxima resposta (AIR_{max}). Este aumento estava diretamente relacionado à concentração de células no local do estímulo inflamatório ao Biogel, fato que dificultou o processo de contagem celular pela formação de agregados celulares, impedindo a avaliação de um dos parâmetros de seleção. Para a resolução deste problema, a coleta do exsudato inflamatório foi antecipada de 72 para 48 horas (STIFFEL et al., 1990; IBAÑEZ et al., 1992) e atualmente, é realizada 24 horas após a injeção do agente inflamatório Biogel (RIBEIRO et al., 2003; RIBEIRO, 1994).

Estudos realizados por Stiffel e colaboradores (1987, 1990) indicavam o controle poligênico da resposta inflamatória aguda, conclusão baseada na extensa e contínua variação fenotípica da AIR observada inicialmente em linhagens de camundongos *High* e *Low* selecionadas para a produção quantitativa de anticorpos (STIFFEL et al., 1987) e posteriormente em linhagens isogênicas de camundongos, nas quais as variações intralinhagem eram sempre muito menores do que as variações interlinhagens (STIFFEL et al., 1990).

Para o início do processo seletivo foi produzida uma população fundadora (ou inicial) geneticamente heterogênea, chamada F0, obtida através do intercruzamento

balanceado de oito linhagens isogênicas de camundongos: A/J, DBA/2J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/cJ e C57BL/6J (STIFFEL et al., 1990; IBAÑEZ et al., 1992; RIBEIRO, 1994).

Após o estímulo inflamatório de Biogel, a linhagem isogênica P/J foi classificada como alta resposta, apresentando altos valores de concentração celular (células/ml) e protéica (Unidades de Absorbância/ml) ($64.30 \times 10^6 \pm 20.30$ e 5.20 ± 2.20 , respectivamente), enquanto a linhagem CBA/J foi considerada de baixa resposta apresentando baixos valores de concentração celular e protéica ($8.20 \times 10^6 \pm 3.70$ e 3.60 ± 0.90 , respectivamente) (STIFFEL et al., 1990; RIBEIRO, 1994).

As demais linhagens isogênicas (A/J, BALB/cJ, DBA/2J, C57BL/6J, SWR/J e SJL/J) apresentaram valores fenotípicos intermediários, com valores médios aproximados de $28.9 \times 10^6 \pm 4.0$ para a concentração celular e de 4.30 ± 0.60 para a concentração protéica (STIFFEL et al., 1990; RIBEIRO, 1994).

O intercruzamento balanceado destas oito linhagens isogênicas possibilitou que a população F0 contivesse cerca de 12,5% do *pool* de genes de cada uma das linhagens isogênicas originais (STIFFEL et al., 1990).

Uma vez definida, os animais da população F0 foram submetidos ao estímulo inflamatório pelo Biogel e obtiveram uma distribuição de frequência para os fenótipos de seleção (concentração de células e de protéica no exsudato inflamatório) que segue uma curva normal (IBAÑEZ et al., 1992; RIBEIRO, 1994).

Para o início do processo seletivo, os acasalamentos foram feitos pela escolha baseada no valor fenotípico individual dos dois parâmetros investigados, através da seleção dos animais com valores fenotípicos situados nos extremos da curva de Gauss. Ou seja, para a produção da linhagem de alta reatividade inflamatória aguda (AIRmax), os casais nas gerações consecutivas foram selecionados entre os camundongos que apresentaram os valores de proteína e celularidade mais altos, enquanto para a produção da linhagem de baixa reatividade inflamatória (AIRmin) foram selecionados para os respectivos acasalamentos, os animais com valores mais baixos de proteína e celularidade. Para minimizar a consangüinidade da colônia foram evitados os acasalamentos entre irmãos e primos (IBAÑEZ et al., 1992; RIBEIRO, 1994).

Após onze gerações de acasalamentos seletivos observou-se que a diferença entre as linhagens AIRmax e AIRmin aumentava progressivamente, com uma diferença de seis vezes para a concentração celular e de duas vezes para a

concentração protéica. Entretanto, esta diferença entre as linhagens foi atribuída fundamentalmente aos animais AIRmax que responderam melhor ao processo seletivo quando comparados à população F0, o mesmo não foi observado para a linhagem AIRmin quando comparada à população F0 (IBAÑEZ et al., 1992).

Estes resultados indicam que apesar da forte pressão de seleção aplicada, a intensidade da resposta inflamatória aguda não pode ser menor do que a obtida na população F0 e que os fatores genéticos acumulados durante o processo seletivo são capazes de aumentar a intensidade da resposta inflamatória aguda, mas, aparentemente são incapazes de fazê-la diminuir (IBAÑEZ et al., 1992; RIBEIRO, 1994).

Após 20 gerações de acasalamentos seletivos admitiu-se que as linhagens atingiram o máximo de separação fenotípica, chamado de limite de seleção. No limite de seleção foi considerado que os alelos de alta resposta para os fenótipos de seleção estão em homozigose na linhagem AIRmax e que os alelos de baixa resposta estão em homozigose na linhagem AIRmin (RIBEIRO, 1994; BIOZZI et al., 1998).

Os resultados do processo seletivo demonstraram a regulação poligênica da intensidade da resposta inflamatória aguda (AIR), ou seja, que este fenótipo é quantitativamente regulado por vários genes, aproximadamente 11 *loci* gênicos, que segregam independentemente e que são dotados de efeito aditivo (IBAÑEZ et al., 1992; RIBEIRO, 1994; BIOZZI et al., 1998).

Com relação ao tipo celular, no exsudato inflamatório da população F0 o tipo celular predominante foram os 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).

Na geração F27, a contagem de células no exsudato inflamatório dos animais AIRmax foi de $75 \pm 3.8 \times 10^6/\text{ml}$; de $4.6 \pm 1.2 \times 10^6/\text{ml}$ nos animais AIRmin e de $10.6 \pm 0.7 \times 10^6/\text{ml}$ no grupo controle de animais isogênicos BALB/c. A análise destas células por citometria de fluxo e confirmada por citologia, indicou que 85% eram neutrófilos em todas as linhagens analisadas (RIBEIRO et al., 2003).

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 ativação e 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).

Ribeiro e colaboradores (2003) concluíram que a diferença de intensidade da resposta inflamatória aguda (AIR) observada entre os animais da linhagem AIRmax em relação aos AIRmin é resultado da ação combinada de três elementos que divergiram entre elas durante o processo de Seleção Genética Bidirecional.

1. A produção quantitativa de neutrófilos pela medula óssea em consequência de uma resposta diferencial às citocinas granulopoéticas associada à expressão diferenciada de receptores específicos para estas citocinas.

2. Produção de fatores quimiotáticos nos exsudatos inflamatórios locais.

3. Resistência diferenciada à apoptose espontânea dos neutrófilos extravasados no sítio inflamatório.

Em resumo, 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, que responde fracamente aos sinais de estímulo provenientes dos exsudatos inflamatórios.

Além disso, análises *in vitro* de proliferação e diferenciação de PMN utilizando citocinas envolvidas na granulopoese indicaram que as células precursoras da medula óssea dos animais AIRmax são mais reativas às citocinas granulopoéticas (GM-CSF, IL-3 e IL-5) em relação às células da linhagem AIRmin (RIBEIRO et al., 2003).

Análises utilizando células *ex vivo* da medula óssea demonstraram que estas células nos animais AIRmax expressam maiores níveis de Cd131, um componente dos receptores das citocinas hematopoiéticas de GM-CSF, IL-3 e IL-5. Estes resultados sugerem que as células precursoras da medula óssea dos animais AIRmax comprometidas com a diferenciação em neutrófilos expressam rapidamente elevados níveis de receptores de citocinas (RIBEIRO et al., 2003).

A produção diferencial de fatores quimiotáticos entre as linhagens AIRmax e AIRmin foi identificada a partir da análise do conteúdo protéico dos exsudatos inflamatórios destes animais. O exsudato dos animais AIRmax apresentou diferenças quantitativas importantes às 24 horas de resposta ao Biogel pela presença de proteínas de baixo peso molecular que estão diretamente envolvidas

nos processos de recrutamento de neutrófilos para sítios inflamatórios, como as anafilatoxinas C3a e C5a, a proteína 14 induzível de fator de crescimento de fibroblasto (FGF-*inducible* 14), a proteína precursora de linfotaxia (XCL1) e a proteína 2 ativadora de macrófagos (MIP-2), que foram encontradas em menor quantidade nos animais AIRmin (RIBEIRO et al., 2003).

O exsudato inflamatório de 24 horas dos animais AIRmax exerceu 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 AIRmax contém altas concentrações desses fatores quimiotáticos que promovem uma intensa transmigração de neutrófilos para o sítio inflamatório (RIBEIRO et al., 2003).

A resistência diferenciada à apoptose espontânea foi observada em experimentos de avaliação da sobrevivência de neutrófilos que migraram ao local da resposta inflamatória induzida 24 horas após a injeção de Biogel. Através destas análises foi observado que os neutrófilos dos camundongos AIRmax são menos propensos à apoptose quando comparados aos das linhagens AIRmin ou BALB/c (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 AIRmax de produzirem um maior número de neutrófilos em consequência de uma alta resposta a citocinas granulopoéticas, da alta produção de fatores quimiotáticos no exsudato inflamatório destes animais que determina um maior infiltrado celular no local da injeção do Biogel e da resistência a apoptose espontânea dos neutrófilos extravasados ao local 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. Um aspecto importante é que a diferença fenotípica extrema entre as linhagens não parece se dever à presença de alelos defeituosos de grande efeito, mas sim de polimorfismos com efeitos aditivos de efeito baixo a moderado, os quais modelam melhor populações heterogêneas, como a humana.

Estudos realizados em híbridos F1 (AIRmax *versus* AIRmin), segregantes F2 e retrocruzados das linhagens AIRmax e AIRmin estimaram 7 a 11 QTL (*Quantitative Trait Loci*) com efeito aditivo regulam a Intensidade da Resposta Inflamatória Aguda, sendo que 7 QTL controlariam o extravasamento protéico e 11 QTL regulariam o infiltrado celular (IBAÑEZ et al., 1992; BIOZZI et al., 1998).

A diferença nos parâmetros da Intensidade da Resposta Inflamatória Aguda entre os animais AIRmax e AIRmin ocorreu para outros agentes inflamatórios não relacionados entre si ou não relacionados com o Biogel (agente selecionador), como o zimosan, a carragenina (VASQUEZ-BRAVO, 1996) e o veneno de *Bothrops jararaca* (CARNEIRO et al., 2002).

Além destas modificações, as alterações genéticas decorrentes do processo seletivo interferiram também na resistência e suscetibilidade destas linhagens a doenças auto-imunes (VIGAR et al., 2000; SANTOS-JÚNIOR et al., 2005; DE MORAES et al., 2006), tumorais (BIOZZI et al., 1998; MARIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005; DI PACE et al., 2006; DE SOUZA et al., 2008), infecciosas (ARAÚJO et al., 1998) e na regeneração tecidual (DE FRANCO et al., 2007).

Estes resultados demonstram que os QTL de AIR acumulados durante o processo seletivo ao Biogel também atuam em diferentes estímulos sejam eles agudos, infecciosos, tumorais ou crônicos. Portanto, a identificação desses QTL é de extrema importância, não só para a caracterização das linhagens, como também para identificação de quais *loci* de AIR estão associados a outros fenótipos.

A doença inflamatória crônica e auto-imune estudada nas linhagens AIRmax e AIRmin foi a artrite induzida por pristane (*Pristane-induced arthritis* - PIA) (VIGAR et al., 2000).

A linhagem de camundongos AIRmax foi esuscetível ao desenvolvimento de PIA, enquanto a linhagem AIRmin foi resistente. A incidência de artrite experimental nos animais AIRmax foi de 50% aos 120 dias, atingindo 65% dos animais aos 200 dias de indução e nos animais AIRmin a incidência foi de 7% aos 180 dias (VIGAR et al., 2000).

Os animais AIRmax apresentaram altos títulos de IgG1 anti-hsp65, enquanto que nos animais AIRmin a IgG2a foi predominante. Em experimentos de ELISPOT utilizando células esplênicas *ex vivo*, foi verificado um número de células secretoras de IL-4, IL-6 e TNF- α significativamente maior nos animais AIRmax do que nos AIRmin, caracterizando um perfil de resposta do tipo Th2 nos AIRmax. Os animais

AIRmin apresentaram um maior número de células secretoras de IFN- γ , evidenciando um perfil de resposta do tipo Th1 (VIGAR et al., 2000).

Este perfil de resposta imune difere do descrito na literatura, que sugere o perfil Th2 como protetor ao desenvolvimento de PIA (THOMPSON et al., 1998).

A linhagem AIRmax expressa predominantemente o haplótipo H-2^b do MHC (VIGAR et al., 2000), descrito como sendo um haplótipo de resistência (HESSE et al., 1996), enquanto que os animais AIRmin resistentes expressam preferencialmente o haplótipo H-2^d, descrito juntamente com o haplótipo H-2^q, como permissivos à artrite induzida pelo pristane em camundongos isogênicos (WOOLEY, 1989).

Estes resultados indicaram a participação de *loci* fora do MHC no desenvolvimento da artrite experimental em nosso modelo, e resultados anteriores (ARAÚJO et al., 1998) sugeriam que a região onde está localizado o gene *Slc11a1* poderia ser um destes *loci*.

Em estudos de infecção por *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) realizados na Seleção de Inflamação, foi observado um desvio de frequência do alelo *S* do gene *Slc11a1*, de 25% na população inicial (F0) para 60% nos animais AIRmin e apenas 9% nos AIRmax, sugerindo que este desvio tenha ocorrido devido ao processo seletivo e que o gene *Slc11a1* ou algum outro gene muito próximo a ele, poderia ser um dos QTL envolvidos na regulação da intensidade da reação inflamatória aguda (ARAÚJO et al., 1998).

Este mesmo desequilíbrio de frequência foi identificado em animais AIRmax e AIRmin submetidos à PIA. A frequência do alelo *S* nos animais AIRmax suscetíveis foi de 71%, enquanto todos animais AIRmax resistentes à artrite experimental eram homocigotos para o alelo *R* do gene *Slc11a1*. Estes resultados, portanto, sugeriam a participação deste gene na modulação da PIA, com o alelo *R* determinando a resistência enquanto o alelo *S* do gene *Slc11a1* determinaria uma maior suscetibilidade da linhagem AIRmax (PETERS et al., 2007).

Com intuito de estudar a participação do gene *Slc11a1* como um possível QTL regulador da intensidade da resposta inflamatória aguda (AIR) e o efeito modulador deste gene no desenvolvimento da PIA, foram produzidas sublinhagens de camundongos homocigotas para os alelos de *R* e *S* deste gene. Estes animais foram obtidos através de cruzamentos assistidos por genotipagem a partir das linhagens AIRmax e AIRmin da Seleção de Inflamação (PETERS et al., 2007).

Para a realização dos acasalamentos seletivos, inicialmente os animais AIRmax e AIRmin da geração F29 foram genotipados para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1*. Dos animais AIRmax aproximadamente 85% apresentavam o genótipo RR, 15% possuíam o genótipo RS, enquanto que nenhum animal apresentou o genótipo SS nos animais AIRmax. A frequência genotípica nos animais AIRmin foi de 10% para o genótipo RR, 60% para o genótipo SS e 30% de animais heterozigotos RS (ARAÚJO et al., 1998; BORREGO et al., 2006; PETERS et al., 2007).

Para a obtenção da sublinhagem AIRmax SS foram realizados cruzamentos entre animais AIRmax heterozigotos (RS), pela ausência de homozigotos *S*. Deste modo foram produzidas quatro sublinhagens homozigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* (AIRmax RR; AIRmax SS; AIRmin RR e AIRmin SS), que mantiveram os fenótipos de inflamação e o *background* genético heterogêneo, pois a produção das sublinhagens não afetou a capacidade de máxima e mínima resposta inflamatória aguda dos animais AIRmax e AIRmin, respectivamente (BORREGO et al., 2006; PETERS et al., 2007).

Além disso, foi observada uma diferença de infiltrado celular entre as sublinhagens homozigotas RR e SS, tanto AIRmax como AIRmin, onde a presença do alelo *R* do gene *Slc11a1* nos animais determinou um influxo celular mais intenso do que o alelo *S* após estímulo com Biogel (BORREGO et al., 2006; PETERS et al., 2007). Para o fenótipo de extravasamento protéico, esta modulação somente foi observada entre as sublinhagens AIRmax RR e AIRmax SS, na qual o alelo *R* determinou um maior extravasamento d em comparação ao alelo *S* (BORREGO et al., 2006; PETERS et al., 2007).

Estes resultados indicam que a modificação da resposta inflamatória aguda observada entre as sublinhagens pode ser atribuída ao próprio gene *Slc11a1* ou a um gene com localização cromossômica próxima, como o *receptor beta da interleucina-8 (Il8rb)* (BORREGO et al., 2006; PETERS et al., 2007).

As sublinhagens AIR homozigotas para os alelos do gene *Slc11a1* foram submetidas à PIA. Para o fenótipo de incidência 29,4% dos animais AIRmax RR desenvolvem artrite aos 150 dias, enquanto 70,6% dos AIRmax SS desenvolveram PIA aos 180 dias. Os AIRmin RR mostraram-se totalmente resistentes, enquanto 13,3% dos animais AIRmin SS desenvolveram artrite aos 210 dias de avaliação. O escore médio de gravidade de artrite nos AIRmax SS foi duas vezes maior que o dos AIRmax RR (PETERS et al., 2007).

No que se refere aos mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento de artrite induzida pelo pristane foi observada uma predominância do perfil de resposta do tipo Th2 em todas as sublinhagens, sugerindo que os mecanismos inflamatórios desempenham um papel fundamental neste modelo (PETERS et al., 2007).

Estes resultados demonstram a participação do gene *Slc11a1* na modulação da artrite experimental em camundongos da Seleção de Inflamação, sugerindo que a região cromossômica onde está localizado o gene *Slc11a1* no cromossomo 1 seja uma região reguladora da resposta inflamatória aguda e da suscetibilidade à PIA (PETERS et al., 2007).

Um dos objetivos deste trabalho é a identificação dos *loci* reguladores da intensidade da resposta inflamatória aguda que também estejam envolvidos no desenvolvimento de artrite induzida por pristane.

O método apropriado para a dissecação do controle genético de caracteres complexos é o mapeamento dos *loci* de caráter quantitativo (QTL - *Quantitative Trait Loci*), este tipo de abordagem genética tornou-se possível através da utilização de marcadores moleculares e de análises com metodologias estatísticas implementadas em programas de mapeamento de QTL (DIETRICH et al., 1994).

Um caráter quantitativo é a medida da variação fenotípica determinada por fatores genéticos e/ou ambientais, esta variação pode consistir de valores discretos ou contínuos. O QTL é um *locus* genético, no qual os alelos afetam a variação fenotípica, geralmente as características quantitativas são multifatoriais, influenciadas por vários genes polimórficos e por condições ambientais, portanto, um fenótipo ou característica pode ser controlado por um ou por vários QTL (ABIOLA et al., 2003).

A variação fenotípica também pode ser causada por fatores ambientais independentes do genótipo ou das interações gene-ambiente (ABIOLA et al., 2003).

O estudo genético de uma doença complexa, que é conseqüência de numerosas interações entre o fundo genético individual (com poucos ou múltiplos alelos em múltiplos *loci* gênicos) e o ambiente (REICH e LANDER, 2001), pode ser realizado através da utilização de marcadores próximos a um gene candidato envolvido no processo patológico, ou através da utilização de marcadores distribuídos ao longo de todo o genoma em um processo chamado de escaneamento do genoma (BARNETCHE et al., 2005).

O processo de rastreamento genômico foi realizado em *pools* de DNA de animais AIRmax e AIRmin da Seleção de Inflamação, e através dele foi possível identificar os marcadores polimórficos ao longo de todo o genoma destes animais (Informação verbal)¹. Os marcadores de microssatélites polimórficos, e conseqüentemente informativos, serão avaliados através de estudos de ligação.

A análise em *pools* de DNA é uma estratégia que permite a redução dos custos e do tempo que seria necessário na genotipagem de um grande número de amostras. Entretanto, este tipo de análise deve ser realizado em indivíduos com fenótipos relacionados, tais como grupos de caso e controle ou ainda grupos de indivíduos que apresentam extremos máximos e mínimos da característica ou patologia complexa de interesse (SHAM et al., 2002).

Os estudos de ligação representam uma estratégia metodológica que consiste na ligação física entre o marcador e o gene causador da doença/característica, estes estudos são baseados na tendência do gene e do marcador genético serem herdados juntos pela sua proximidade no mesmo cromossomo (BARNETCHE et al., 2005; XAVIER e RIOUX, 2008).

A distância genética entre um marcador de *locus* (de posição conhecida) e de um *locus* relacionado a uma doença ou caráter (de posição desconhecida) pode ser estimada pela fração de recombinação (θ), que representa o número de recombinações dividido pelo número total de meioses, quando ocorre 1 recombinação em 100 meioses, a fração de recombinação (θ) é 1% (VINK et al., 2002).

A segunda Lei de Mendel postula que a herança de um gene não é afetada pela herança de outro (Lei de Segregação Independente). Se dois *loci* estão em diferentes cromossomos ou estão distantes em um mesmo cromossomo, os eventos de recombinação entre os *loci* impedirão que os alelos sejam transmitidos juntos. Quanto mais perto dois *loci* estão no mesmo cromossomo, é menos provável que ocorra a recombinação durante a meiose, portanto, menos indivíduos recombinantes serão obtidos na progênie (VINK et al., 2002).

Se estes dois *locus* são independentes, não ligados, a fração de recombinação é maior ou igual 0.5 ($\theta \geq 0,5$). Quanto mais próximo e mais fortemente

¹ Fornecida por CABRERA, W.H.K., Pesquisadora do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, São Paulo, 2009.

ligado estiver o fator estudado ao gene envolvido, menor será a fração de recombinação, indicando que existe ligação entre os dois *loci* (VINK et al., 2002; BARNETCHE et al., 2005).

A fração de recombinação (θ) é utilizada como uma medida da distância genética, ou mapa de distância entre *loci* gênicos, que é expresso em centiMorgan (cM). A unidade de medida de 1 unidade no mapa ou de 1 centiMorgan (1 cM) corresponde aproximadamente à fração de recombinação (θ) de 1%, que equivale à região do cromossomo em que ocorre 1 evento de recombinação a cada 100 meioses, assim, quanto maior a frequência de recombinação (distância) entre o marcador estudado e o gene que determina o caráter, menor a probabilidade deste gene e o marcadores estarem segregando juntamente (VINK et al., 2002).

Os estudos de ligação em camundongos foram iniciados por Dietrich e colaboradores, através da utilização de aproximadamente 6.000 marcadores moleculares espaçados em torno de 1 cM ao longo de cada um dos 21 cromossomos, possibilitando a construção de um mapa genético de microssatélites (DIETRICH et al., 1996; DIETRICH et al., 1994).

Dentre os marcadores de DNA mais utilizados em estudos de ligação estão os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou ainda SSLPs (*Simple Sequence Length Repeat*), que são seqüências simples de 1-4 nucleotídeos repetidas; de localização cromossômica conhecida; amplamente dispersos no genoma, numerosos e altamente polimórficos, ou seja, possuem um número variável de repetições de seqüências entre indivíduos (DIETRICH et al., 1996).

As seqüências de DNA que flanqueiam as regiões contendo estas repetições curtas são conservadas dentro de cada espécie permitindo a utilização de seqüências específicas e adjacentes ao microssatélite, que pode ser facilmente amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). O polimorfismo ou a diferença no número de repetições pode ser identificado pelo padrão de migração eletroforética dos fragmentos amplificados (DIETRICH et al., 1994).

O estudo da ligação entre as formas alélicas de marcadores genéticos com fenótipos quantitativos é um método indireto, pois assume que a transmissão dos alelos parentais em cada um dos *loci* que contribuem na determinação do caráter é idêntica àquela observada para os marcadores próximos que mapeiam a região cromossômica implicada (MOORE e NAGLE, 2000).

Os microssatélites são marcadores de regiões cromossômicas que possibilitam o rastreamento da herança genética em gerações sucessivas. A ocorrência de desvios de frequência alélica de um marcador associado ao fenótipo de interesse é uma evidência da presença de um ou mais genes regulando este fenótipo naquela região cromossômica. Caso o marcador não tenha associação com o caráter observa-se que a sua herança na população segregante apresenta uma frequência que segue uma distribuição mendeliana simples e independente do fenótipo estudado (MOORE e NAGLE, 2000).

No mapeamento dos QTL envolvidos na determinação de características quantitativas e doenças complexas se utiliza marcadores moleculares que sejam polimórficos (informativos) entre as linhagens estudadas para analisar a herança ou a segregação das regiões cromossômicas com relação ao fenótipo em estudos de ligação/ co-segregação. Os dados gerados pelos estudos de co-segregação necessitam de programas estatísticos específicos para estabelecer a presença e a localização de QTL, diversos programas estatísticos são disponíveis para o cálculo da significância da co-segregação e de estimativa da localização dos QTL (MANLY e OLSON, 1999). O programa utilizado em nosso laboratório é o MapManager QTX (MANLY et al., 2001).

A identificação dos QTL envolvidos na regulação da Intensidade da Resposta Inflamatória Aguda já foi iniciada pelo Laboratório de Imunogenética indicando a presença destes QTL nos cromossomos 1, 5, 6, 11, 12, 13, 14, como descrito abaixo.

No cromossomo 1 existe uma região que aparentemente está implicada na resposta inflamatória aguda e provavelmente associados a *loci* de resistência à infecção por *Salmonella Typhimurium* e de sensibilidade aos efeitos tóxicos do LPS (BORREGO et al., 2006), no desenvolvimento de artrite induzida por pristane (PETERS et al., 2007) e no processo de regeneração tecidual (DE FRANCO et al., 2007) na qual estão presentes alguns genes candidatos relevantes como o *Cd28* (*Cd 28 antigen*), *Il8rb* (*Interleukin 8 receptor, beta*), *Slc11a1* (*Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter) member 1*), *Ctla4* (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) e *Sth1* (*Soft tissue heal 1*).

No cromossomo 5 foram encontradas regiões polimórficas onde estão presentes genes associados aos processos de tumorigênese de pele induzidos quimicamente e à resposta inflamatória aguda (AIR), como o oncogene *Kit*

(regulador da proliferação celular), o *locus Tpar1* (*TPA repressed gene*, também conhecido como *Cxcl12 - Chemokine (C-X-C motif) ligand 12*), os *loci Skts3* e *4* (*locus* de susceptibilidade ao tumor de pele 3 e 4), *Tlr1* (*Toll-like receptor 1*) e *Tlr6* (*Toll-like receptor 6*) (DE SOUZA, 2002).

No cromossomo 6 foi descrito o *locus Pas1* (*Pulmonary adenoma susceptibility 1*) que está envolvido tanto na resposta inflamatória aguda (AIR) como no desenvolvimento de carcinogênese pulmonar, nesta região o principal gene candidato é o *K-ras* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) (MARIA *et al.*, 2003).

Também foram identificados QTL reguladores da Intensidade da Resposta Inflamatória Aguda no cromossomo 11, onde estão localizados alguns genes candidatos, como: os fatores hematopoiéticos *Csf2* (*Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)*) e *Csf3* (*Colony stimulating factor 3 (granulocyte)*), o grupo de genes que codificam quimiocinas (*Chemokine (C-C motif) ligand – Ccl1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 16*) (RIBEIRO *et al.*, 2005; BORREGO *et al.*, 2006), no cromossomo 13, com o *Tcr γ* (*T-cell receptor gamma chain*) como gene candidato, além dos *receptores de angiotensina (Agtr1a)*, *dopamina (Drd1a)* e *histamina (Hrh2)* e do fator de crescimento de fibroblastos (*Fgfr4*), e *Il9* (*Interleukin 9*) (BORREGO *et al.*, 2006). E no cromossomo 14 foi descrito a presença de um QTL AIR envolvido na regeneração tecidual, localizado a 44,4 cM, que contém vários genes candidatos entre eles *Ang1* (*Angiopoietin 1*) (DE FRANCO *et al.*, 2007).

O estudo dos QTL de AIR envolvidos no desenvolvimento de artrite induzida por pristane (PIA) serão realizados através da análise de co-segregação em populações F2 obtidas a partir das linhagens AIRmax e AIRmin da Seleção de Inflamação.

Para isso, é necessária a identificação duas linhagens com fenótipos extremos e diferentes, pois quanto maior a disparidade dos fenótipos, maior a probabilidade de identificar seus *loci* reguladores. Depois, realizar acasalamentos até a segunda geração, para a obtenção de camundongos segregantes para os alelos causadores do fenótipo. Esta segunda geração, ou população F2, é obtida a partir do intercruzamento de animais híbridos F1, que por sua vez foram obtidos pelo cruzamento entre as linhagens parentais. A utilização de uma população F2 é apropriada quando as linhagens parentais diferem em magnitude no fenótipo estudado e o fenótipo obtido pelos híbridos F1 é intermediário. Além disso, a

população F2 representa uma recombinação das duas linhagens parentais, podendo revelar as combinações genéticas causadoras da grande diferença fenotípica observada originalmente nas linhagens parentais (MOORE e NAGLE, 2000).

As linhagens AIRmax e AIRmin possuem esses fenótipos extremos e diferentes para a intensidade da resposta inflamatória aguda ao Biogel, chamados de parâmetros de seleção, que foram iniciados e são mantidos há mais de quarenta gerações de acasalamentos seletivos.

Este trabalho também busca a identificação de fenótipos parciais que estejam envolvidos no desenvolvimento de artrite induzida por pristane, como a identificação dos genes modulados na fase tardia ou crônica da PIA, análise que foi realizada através da expressão gênica global pela técnica de *Microarray* e da expressão gênica relativa através da técnica de PCR em tempo real (qPCR).

2 OBJETIVOS GERAIS

Identificação de *loci* reguladores da intensidade da resposta inflamatória aguda que também estejam envolvidos no desenvolvimento de artrite induzida por pristane em camundongos da Seleção AIR; estudar a interação do gene *Sc11a1* com os *loci* de resposta inflamatória aguda no desenvolvimento de artrite experimental e identificação de fenótipos parciais envolvidos nestes fenótipos através de estudos de expressão gênica.

Para atingir esses objetivos foram realizados estudos de co-segregação entre os genótipos e fenótipos e estudos de expressão gênica por qPCR e *Microarray* no RNA mensageiro das patas de animais experimentais e controle das sublinhagens AIR homozigotas para os alelos do gene *Sc11a1*;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos das sublinhagens da Seleção de Inflamação homocigotos para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* (AIRmax RR; AIRmax SS; AIRmin RR e AIRmin SS) da geração F13, produzidos através de cruzamentos assistidos por genotipagem a partir da geração F29 das linhagens AIRmax e AIRmin da Seleção de Inflamação.

Para os estudos de identificação de polimorfismos de microssatélites foi utilizado o DNA de animais AIRmax e AIRmin da geração F37, com intuito de observar e comparar as frequências alélicas obtidas destes animais com as obtidas nas sublinhagens.

Foi produzida e utilizada uma população de animais segregantes F2 (n = 320), obtidas a partir de cruzamentos entre animais híbridos F1 (AIRmax x AIRmin) da geração F40 da Seleção de Inflamação.

Os animais AIRmax e AIRmin da geração F40 foram utilizados como grupo controle nos estudos dos fenótipos de AIR e PIA em relação à população F2 para estes mesmos fenótipos.

Os animais foram produzidos e mantidos em condições convencionais no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan e utilizados nos experimentos com 2 a 4 meses de idade em grupos com números equivalentes de machos e fêmeas.

3.2 Extração do DNA genômico

A ponta da cauda dos animais foi congelada em nitrogênio líquido. Para a extração do DNA, as caudas congeladas foram pulverizadas e incubadas a 65 °C durante 1 hora em 200 µl de tampão de lise contendo Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, SDS 0,5%, suplementado com 1,5 mg/ml de Proteinase K (Gibco, USA). Em seguida, foram adicionados 200 µl do tampão de lise sem a Proteinase K e as amostras foram mantidas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, foi acrescentado ao sobrenadante 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2 volumes de etanol 100%. O DNA precipitado foi lavado em etanol 70%, seco e diluído em tampão TE pH 8,0 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). A concentração de

DNA das amostras foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 nm e expressa em unidades de densidade óptica (D.O.). Nesta etapa de quantificação foi adotado um valor em torno de 2,0 para a razão DNA/Proteínas (260 nm/280 nm) como indicativo de uma boa extração, e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (Tris 0,1M, ácido bórico 0,1 M e EDTA 20 mM) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BET) (Pharmacia), por 20 minutos a 80 V. Os géis foram analisado no “Pharmacia Biotech – Image Master VDS” para a avaliação da presença das bandas de integridade do DNA.

3.3 Genotipagem para o gene *Slc11a1*

Os animais AIRmax RR; AIRmax SS; AIRmin RR e AIRmin SS, AIRmax e AIRmin da geração F13 foram genotipados para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1*.

A genotipagem teve início pela utilização de um primer comum para os dois alelos (5'-ACAGCCCGGACAGGTGGG-3'), e de primers alelo-específicos, para o alelo *R* (5'-ACGCATCCCGCTGTGGGG-3') e para o alelo *S* (5'-ACGCATCCCGCTGTGGGA-3') do gene *Slc11a1*.

Para as reações de amplificação foram usados 100 ng de DNA genômico, em uma mistura de tampão específico para PCR 10x concentrado (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 8,4); dNTP (2,5 mM); MgCl₂ (50 mM); 2 pM de cada um dos primers e 1U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 25 µl com H₂O deionizada estéril. Inicialmente a mistura foi aquecida a 94 °C por 3 minutos, e em seguida submetida a 27 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 60 °C por 20 segundos e 72 °C por 20 segundos, com extensão final de 7 minutos a 72 °C nos aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200. O produto desta amplificação, um fragmento de 650 pares de bases, foi visualizado em gel de agarose 1% por cerca de 20 minutos a 100 V. Para a avaliação do tamanho das bandas presentes foram realizadas a partir da comparação das mesmas com um padrão de peso molecular formado por fragmentos φX174 RF DNA/*Hae* III (72 pb a 1353 pb), aplicado no mesmo gel.

3.4 Indução e avaliação de artrite induzida por pristane

Os animais receberam duas injeções intraperitoneais (i.p.) de 0,5 ml de pristane (2, 6, 10,14-*tetramethylpentadecane* – Sigma Chemical CO), com intervalo

de 60 dias e foram examinados semanalmente durante 180 dias para registro dos fenótipos de incidência e gravidade de artrite. A incidência de artrite nas articulações foi facilmente identificada a olho nu pela presença ou ausência de inchaço nas articulações. A gravidade foi avaliada utilizando um sistema de *score*, no qual é observado o número e o grau de aumento das articulações afetadas. O grau 0 é dado para a pata normal, o grau 1 quando a pata apresenta um inchaço leve e/ou eritema, o grau 2 quando há um inchaço edematoso pronunciado e o grau 3 quando a pata apresenta artrose e rigidez da articulação. Cada pata é graduada, e o grau máximo obtido por animal é de 12 (WILLIAMS et al., 1992).

3.5 Análise de polimorfismos de DNA.

Esta análise foi realizada inicialmente no DNA genômico das oito linhagens isogênicas (A/J, BALB/c, C57BL/6, CBA/J, DBA/2J, P/J, SJL/J e SWR/J) que compuseram a população inicial (F0) da Seleção de Inflamação, posteriormente nas linhagens AIRmax e AIRmin da Seleção de Inflamação (geração F37), nas sublinhagens da Seleção de Inflamação homozigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* (geração F14) e na população segregante F2 (AIRmax *versus* AIRmin).

O método para identificação dos polimorfismos de genes ou de marcadores de microssatélites foi baseado na técnica de PCR que amplifica as seqüências genômicas onde estão localizados estes marcadores. Para isso, foram utilizados vários pares de primers de marcadores de microssatélites, que fazem parte do kit de rastreamento de polimorfismos da Research Genetics Huntsville ou foram desenhados pares de primers específicos para genes de interesse.

Para as reações de amplificação foram usados 100 ng de DNA genômico, em uma mistura de tampão específico para PCR 10x concentrado (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 8,4); oligonucleotídeos dNTP (2,5 mM; MgCl₂ (50 mM); 2 pM de cada um dos primers e 1U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) em um volume final de 25 µl com H₂O deionizada estéril.

As preparações foram submetidas às seguintes temperaturas: 94 °C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos com etapa de desnaturação de 94 °C por 30 segundos; de anelamento a 57 °C por 35 segundos e de extensão a 72 °C por 45 segundos para cada ciclo, seguidos de uma extensão final de 2 minutos a 72 °C, nos aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC

200. Foram analisados os seguintes microssatélites e genes no cromossomo 1: *D1Mit64* (5 cM); *D1Mit316* (7.9 cM); *D1Mit211* (15 cM); *D1Mit236* (25.7 cM); *Caspase 8* (30.1 cM); *D1Mit303* (34.8 cM); *D1Mit132* (132 cM); *D1Mit49* (54.5 cM); *D1Mit10* (56.6 cM); *D1Mit36* (92.3 cM) e *D1Mit291* (101.5 cM). E no cromossomo 11: *D11Mit231* (17 cM); *D11Mit242* (31 cM); *D11Mit4* (37 cM); *D11Mit36* (47 cM); *D11Mit124* (57 cM); *D11Mit214* (70 cM) e *D11Mit69* (71 cM).

Os produtos de amplificação dos microssatélites foram submetidos à análise em gel de agarose 4% (1 volume de agarose *low melt* e 1 volume de agarose *high melt* -Invitrogen), em TBE (Tris-base 1 M, ácido bórico 1 M e EDTA 20 mM) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BET) (Invitrogen). O gel contendo as amostras foi colocado em uma cuba eletroforética e recoberto com TBE, sendo em seguida submetido a uma corrente elétrica de 100 V por 1 hora. O gel foi então analisado no “Pharmacia Biotech – Image Master VDS”, e a avaliação do tamanho das bandas presentes foram realizadas a partir da comparação das mesmas com um padrão de peso molecular formado por fragmentos ϕ X174 RF DNA/*Hae* III (72 pb a 1353 pb), aplicado no mesmo gel.

3.6 Produção da população segregante F2 (AIRmax versus AIRmin)

Os animais 320 da população segregante F2 foram obtidos a partir do cruzamento entre os animais das linhagens AIRmax e AIRmin da Seleção de Inflamação. Primeiramente, os animais da linhagem AIRmax (n=95) e AIRmin (n=96) da geração F40 foram fenotipados para os parâmetros de seleção da resposta inflamatória aguda ao Biogel. Após este processo, foram realizados os acasalamentos entre as linhagens AIRmax e AIRmin da qual foi obtida uma população híbrida F1. A partir do intercruzamento entre a população híbrida F1, foi obtida a população segregantes F2 (AIRmax *versus* AIRmin).

O DNA genômico da população segregante F2 foi obtido (Método já descrito na página 35 e 36), as análises de polimorfismos de DNA foram realizadas (Método descrito na página 37 e 38), e esta população foi avaliada para os parâmetros de seleção e posteriormente para a indução de artrite por pristane (Método já descrito na página 37).

3.6.1 Indução do processo inflamatório agudo

Os parâmetros da Intensidade da Resposta Inflamatória Aguda, que são: infiltrado celular e concentração protéica, foram medidos após a injeção subcutânea de 0,75 ml da suspensão de Microesferas de poliacrilamida Biogel P₁₀₀ (BIORAD 100 Mesh com limite de exclusão molecular de 100.000 Daltons). As partículas de Biogel foram hidratadas em PBS, aquecidas a 90 °C e deixadas em repouso durante uma hora a temperatura ambiente. A suspensão foi submetida a uma pressão negativa por 30 segundos para a retirada do ar, e então autoclavada por 30 minutos a 120 °C. Em seguida, a preparação foi lavada três vezes com solução fisiológica estéril e ressuspensa na proporção de 1ml de partículas para 0,5 ml de salina, essa suspensão final contém aproximadamente 53 mg/ml de Biogel P100. O diâmetro médio das microesferas hidratadas é de 131×10^{-3} mm (STIFFEL et al., 1990). Os animais foram previamente depilados na região dorsal onde receberam a injeção subcutânea de 750 µl da suspensão de Biogel P100 em PBS. Após 24 horas da aplicação do Biogel, o exsudato inflamatório local foi recuperado em 1 ml de salina e o número de leucócitos infiltrados foi determinado por contagem em câmara hemocitométrica de Malassez e a concentração protéica foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm e expressa em unidades de densidade óptica (D.O.).

3.6.2 Análises de correlação e de co-segregação

As análises correlação (entre genótipo e fenótipo) nas sublinhagens AIR homozigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* e os estudos de co-segregação na população F2 (AIRmax *versus* AIRmin) foram realizadas através do programa MapManager QTX (MANLY e OLSON, 1999; MANLY et al., 2001).

No programa MapManager QTX foram adicionados individualmente os fenótipos de estudo, como infiltrado celular e dosagem de proteínas na resposta inflamatória aguda, assim como incidência e gravidade de artrite induzida por pristane, que foram correlacionados simultaneamente aos genótipos identificados para cada marcador de microssatélite ou gene avaliado no cromossomo 1 e 11.

A detecção do QTL pelo programa é dada pela existência de associação estatisticamente significativa entre os valores fenotípicos individuais e os genótipos observados. Esses valores foram avaliados pelo programa através de um teste de

regressão simples ou múltipla que calcula as associações entre esses valores para cada *locus* ou loci, respectivamente. Através da análise por regressão são gerados valores de LRS (*Likelihood Ratio Statistic*) como uma medida de significância de um possível QTL (HALEY e KNOTT, 1992), os valores de p obtidos pelo LRS podem ser interpretados como os valores de Qui-quadrado (CHMIELEWICZ e MANLY, 2002; LANDER e KRUGLYAK, 1995).

O programa QTX realiza então os testes de permutação baseados na re-amostragem dos dados originais, ou seja, através de combinações aleatórias entre os vários fenótipos e genótipos adicionados, para determinar o limiar de significância das associações dentro das amostras da população em estudo, de modo que a probabilidade de ocorrência de falsos positivos seja minimizada. Para isso é realizada uma análise de co-segregação dos marcadores e os valores de LRS obtidos, onde o LRS máximo é gravado, este processo é repetido centenas ou milhares de vezes, até a geração pelo programa de uma curva que representa a distribuição dos valores de LRS sob a premissa de ausência de um QTL. Os valores obtidos do teste de permutação são denominados como sugestivos ($P < 0,05$), significantes ($P < 0,001$) e altamente significantes ($P < 0,0001$) de associação entre o genótipo e o fenótipo estudado (LANDER e KRUGLYAK, 1995).

3.7 Análise da expressão gênica

A análise da expressão gênica global foi realizada pela técnica de *Microarray* e a específica por qPCR, para isso foram realizados os seguintes procedimentos:

3.7.1 Extração do RNA total utilizando TRIzol

O RNA total foi extraído das patas dos animais AIRmax RR; AIRmax SS; AIRmin RR e AIRmin SS, experimentais (patas com 180 dias de artrite induzida por pristane) e controle (sem estímulo).

As patas foram obtidas e maceradas em 1 ml de TRIzol (Invitrogen), incubadas em gelo e foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio (MERCK) para cada 1 ml de TRIzol. Após o período de agitação e centrifugação, o sobrenadante (incolor, que contém o RNA) foi transferido para outro tubo e o RNA precipitado em 0,5 ml de

álcool isopropílico (MERCK) para cada 1 ml de TRIzol. A mistura da solução foi realizada por inversão e após a incubação no gelo, a solução foi centrifugada a 11000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O pellet de RNA foi lavado com 1 ml de etanol 75% gelado para cada 1 ml de TRIzol. Após a secagem, e com o objetivo de dissolver o *pellet* foram adicionados 50 µl de água livre de RNase.

A concentração e pureza do RNA foram determinadas através de espectrofotômetro no 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/proteína (260/280 nm). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 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 V por 30 minutos. O gel foi então analisado no “Pharmacia Biotech – Image Master VDS”, e a avaliação da presença das bandas relativas à integridade do RNA.

3.7.2 Purificação do RNA total

O protocolo de purificação foi realizado através da utilização do Kit RNeasy – Mini (Qiagen), para o qual 100 µg do RNA total extraído das patas dos animais AIRmax RR; AIRmax SS; AIRmin RR e AIRmin SS controles e experimentais através do método TRIzol, foram ajustados ao volume de 100 µl de água livre de RNase. Às amostras foram adicionados inicialmente 350 µl do tampão RLT e posteriormente 250 µl de etanol (96-100%). As amostras foram adicionadas às colunas de purificação e foram centrifugadas a 10000 r.p.m. durante 15 segundos. O líquido que passou foi descartado e sobre a membrana da coluna, foram adicionados 500 µl de tampão RPE. Após a centrifugação de 15 segundos, foram novamente adicionados 500 µl de tampão RPE. As amostras foram centrifugadas durante 2 minutos a 10000 r.p.m. para a secagem da membrana. Para a eluição do RNA presente na membrana da coluna foram adicionados 50 µl de água livre de RNase e os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 10000 r.p.m.

A concentração de RNA das amostras foi medida por espectrofotometria em 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 (260/280 nm) e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% em 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 cuba eletroforética, recoberto com tampão TBE e foi submetido a uma corrente elétrica de 80 V por cerca de 30 minutos. Após este período o gel foi analisado no “Pharmacia Biotech – Image Master VDS” para a avaliação da presença das bandas de integridade do DNA.

3.7.3 PCR em Tempo-Real (qPCR)

3.7.3.1 Obtenção do cDNA

A síntese de cDNA foi feita através de uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado, ao volume de 10 µl contendo 1 µg de RNA foram adicionados a 1 µl de Oligo(dT)₁₂₋₁₈, (50 µM) 2 µl de água livre de RNase, 1 µl de oligonucleotídeos dNTP (10 µM) a mistura foi homogeneizada e incubada a 65 °C 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 MgCl₂), 1 µl 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 °C por 50 minutos e inativadas a 70 °C por 15 minutos. As reações foram incubadas em aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200.

3.7.3.2 Quantificação da expressão gênica por PCR em Tempo-Real

A expressão de gênica foi realizada no cDNA das patas de animais controle e experimentais das sublinhagens AIRmax RR; AIRmax SS; AIRmin RR e AIRmin SS.

Cada amostra de 1 µl de cDNA foi adicionada a uma reação contendo as seqüências específicas de primers (5 µM); 6.25 µl do Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen), e água para ajustar o volume final de reação em 12.5 µl por tubo. Na tabela 1 abaixo, está a relação dos genes analisados.

Tabela 1: Relação dos primers utilizados nas reações de qPCR:

Primers	Foward	Reverse
<i>β2</i>	5'-TGACCGGCTTGATGCTATC-3'	5'-CAGTGTGAGCCAGGATATAG-3'
<i>Caspase8</i>	5'-GGTGATCTGAGTTTGATCTCTGGAACACAT-3'	5'-CCCCTGACTCACTGTCTTGTCTCTT-3'
<i>GM-CSF</i>	5'-TGAACCTCCTGGATGACATG-3'	5'-GTGTTTCACAGTCCGTTTCC-3'
<i>IFN-γ</i>	5'-GCTCTGAGACAATGAACGCT-3'	5'-AAAGAGATAATCTGGCTCTGC-3'
<i>IL-1β</i>	5'-CAGTTCTGCCATTGACCATC-3'	5'-TCTCACTGAAACTCAGCCGT-3'
<i>IL-1α</i>	5'-TTGACGGACCCAAAAGATG-3'	5'-AGAAGGTGTCATGTCCTCA3'
<i>IL-3</i>	5'-GACCCTCTCTGAGGAATAAG-3'	5'-CTCCAGATCGTTAAGGTGGA-3'
<i>IL-4</i>	5'-TCGGCATTGGAACGAGGTC-3'	5'-GAAAAGCCCCGAAAGAGTCTC-3'
<i>IL-5</i>	5'-TCACCGAGCTCTGTTGACAA-3'	5'-CCACACTTCTTTTTGGCG-3'
<i>IL-6</i>	5'-GTTCTCTGGAAATCGTGGA-3'	5'-TGTACTCCAGGTAGCTATGG-3'
<i>IL-8rb</i>	5'-GACTGTTACCTAAACGGTG-3'	5'-CATACCAAGATGGAAGGGAGC-3'
<i>IL-10</i>	5'-TCAAACAAAGGACCAGCTGGACAACATACTG-3'	5'-CTGTCTAGGTCCTGGAGTCCAGCAGACTCAA-3'
<i>IL-12p35</i>	5'-GATCATGAAGACATCACACGG-3'	5'-AGAATGATCTGCTGATGGTGG-3'
<i>IL-12p40</i>	5'-CAGTACACCTGCCACAAAGGA-3'	5'-GTGTGACCTTCTGTCAGACA-3'
<i>IL-13</i>	5'-GACCCAGAGGATATTGGATG-3'	5'-GGAGGAAAGTCTGATGTGAG-3'
<i>IL-18</i>	5'-TTACAGGAGAGGGTAGACATTTTACTATCC-3'	5'-CAGCTACAGGACAAAGCCGCCTCAA-3'
<i>TGF-β1</i>	5'-ACCGCAACAACGCCATCTAT-3'	5'-GTAACGCCAGGAATTTGTC-3'
<i>TNF-α</i>	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, seguido da fase de ativação da enzima (*hot start*) 95 °C a 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 aquisição da fluorescência foi efetuada a cada ciclo e demonstrada na etapa final da reação.

A cada amostra foi atribuído um valor limiar, chamado 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, da qual depende diretamente o número de cópias das seqüências alvo inicial de cada amostra.

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase *Melting* onde a temperatura variou de 55 °C a 90 °C e a fluorescência foi adquirida a cada 1 °C, registrando-se a temperatura de dissociação, ou desnaturação da dupla fita do material amplificado, o que indica o tamanho e, portanto a especificidade do produto amplificado em cada reação. Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa Opticon Monitor Analysis Software 2.03, conforme indicado.

Para quantificação dos resultados obtidos foi utilizado o Método do Limiar Comparativo (GIULIETT et al., 2001; LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Neste método, fórmulas aritméticas são usadas para calcular níveis de expressão relativos a um calibrador, que pode ser uma amostra controle (ou amostra não tratada). 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 ($\beta 2$

microglobulina). Dos valores de ΔCt dos grupos controles e experimentais foram subtraídos o valor de ΔCt do calibrador escolhido arbitrariamente, que foi o valor de ΔCt da sublinhagem AIRmin RR controle, após esta subtração foi obtido o valor de $\Delta\Delta Ct$. Os valores de $\Delta\Delta Ct$ foram submetidos à fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001).

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.

3.7.4 Análise da expressão gênica global por *Microarray*

Os reagentes utilizados na preparação dos *Microarrays* fazem parte da plataforma do “CodeLink Gene Expression System”, GE Healthcare. Dividido nas principais etapas descritas abaixo: **1)** Preparação do alvo; **2)** Hibridização do alvo; **3)** Lavagem e marcação dos *arrays*; **4)** Escaneamento do *array* e **5)** Análise dos dados.

3.7.4.1 Purificação do RNA

Inicialmente foram realizados “pools” do RNA total de cada sublinhagem de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRminSS (n=4) experimentais e controles, respectivamente. O RNA total foi ajustado para a concentração de 120 μg em um volume final de 80 μl diluídos em água livre de nuclease

A purificação do RNA total foi realizada em RNAspin Mini Kit da GE Healthcare, e para cada volume da amostra foram adicionados 3,5 volumes do tampão RA1, ou seja, foram adicionados 280 μl de tampão RA1 para os 80 μl de RNA total. Após a mistura do lisado em vórtex, foram adicionados 3,5 volumes (280 μl) de etanol 95-100% que foi adicionado às colunas de purificação e centrifugado a 8000 g durante 30 segundos para a ligação do RNA à membrana. Para a dessalinização da membrana foram adicionados 350 μl do tampão TMB (*Membrane Desalting Buffer*) e para a secagem da membrana foi realizada uma nova centrifugação a 9000 rpm durante 1 minuto. Na etapa de digestão do DNA, foram adicionados 95 μl da reação de DNase I (composta de 10 μl de DNase I mais 90 μl do tampão de reação de DNase) diretamente à membrana de sílica da coluna. Após a incubação de 15 minutos a temperatura ambiente, a membrana foi submetida às respectivas lavagens com 200 μl do tampão RA2, 600 μl do tampão RA3 e 250 μl do

tampão RA3, após estas lavagens para a inativação da DNase I, as colunas foram centrifugadas a 9000 rpm por 2 minutos para a completa secagem da membrana. Finalmente, o RNA total foi eluído através da adição de 100 µl de água livre de nuclease à membrana e as colunas foram centrifugadas a 9000 rpm durante 1 minuto.

O RNA total purificado foi submetido à análise de pureza e integridade. A concentração e pureza foram determinadas através de espectrofotômetro no 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/proteína (260/280 nm). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE (Tris-base 1 M, ácido bórico 1 M e EDTA 20nM) 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 V por 30 minutos. O gel foi então analisado no “Pharmacia Biotech – Image Master VDS”, e a avaliação da presença das bandas relativas à integridade do RNA.

A integridade do RNA total foi demonstrada pela presença de bandas das espécies 18s e 28s ribossomais em eletroforese por gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (B.E.T.) (**Figura 1**).

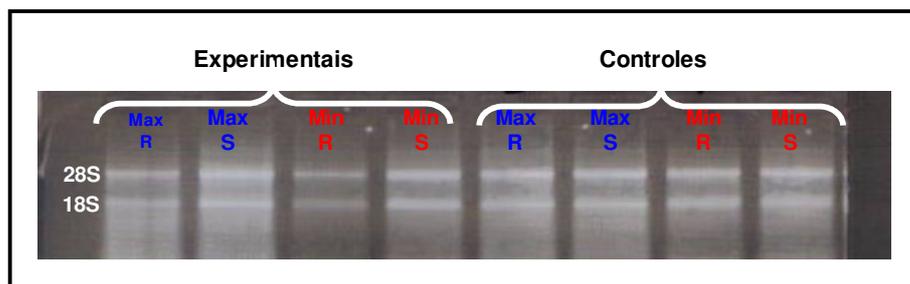


Figura 1: Avaliação da integridade do RNA total.

Realizado por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/ml de B.E.T. pela presença bandas das espécies 28s e 18s ribossomais em pools de amostras de RNA da pata de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS experimentais e controles.

3.7.4.2 Preparação dos mRNAs bacterianos

Uma solução de mRNAs bacterianos é utilizada como controle interno da lâmina, que possui seqüências 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 *leuB*) na concentração de 0,1 μg/μl, no volume de 2,5 μl cada, em um volume total de 15 μl. Essa solução foi dividida em 5 tubos (3 μl) e armazenada em freezer -70 °C. Uma nova diluição é realizada (solução estoque 2) de 50,2 pg/μl, através da adição de 3 μl da “solução estoque 1” somado a 997 μl de água livre de nuclease. A partir desta solução foi realizada a solução de trabalho, onde 2 μl da solução estoque 2 foi adicionada a 998 μl de água livre de nuclease.

3.7.4.3 Síntese do cDNA de fita simples

Para cada amostra de RNA total (2 μg em 9 μl) adicionamos 1 μl (concentração de 0,1 pg/μl) da solução de trabalho de mRNAs bacterianos controles (1μl para cada 1 μg de RNA total), 1 μl de T7 oligo(dT). Essa solução foi incubada por 10 minutos a 70 °C no termociclador (Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200) e colocada imediatamente no gelo durante 3 minutos. Em seguida, foram adicionados a solução anterior, 2 μl do tampão fita simples 10x, 4 μl de dNTP (5 mM), 1 μl de inibidor de RNase e 1 μl de transcriptase reversa. Essa solução de volume final de 20 μl foi incubada durante 2 horas a 42 °C no aparelho termociclador (Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200).

3.9.4 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, 4 μl de dNTP (5 mM), 2 μl de DNA polimerase e 1 μl de RNase H. Essa solução de volume final de 80 μl foi incubada durante 2 horas a 16 °C no termociclador (Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200), porém sem aquecimento da tampa.

3.7.4.5 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 gentilmente, colocada na coluna de purificação e centrifugada a 9000 rpm por 1 minuto. Em seguida a coluna foi lavada com adição de 500 µl de tampão de lavagem e centrifugada a 9000 rpm por 1 minuto. Após este procedimento a coluna foi seca com uma nova centrifugação a 9000 rpm durante 1 minuto. Para a eluição do cDNA foram adicionados 12 µl de água livre de nuclease pré-aquecida (58 °C) diretamente sobre a membrana. Após o período de incubação de 2 minutos a coluna foi centrifugada a 9000 rpm por 1,5 minutos. Esse passo foi repetido para gerar pelo menos 20 µl de eluato final.

3.7.4.6 Síntese do cRNA por transcrição in vitro (IVT)

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

3.7.4.7 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, foram adicionados 250 µl de etanol 100% e as amostras foram colocadas imediatamente na coluna e centrifugadas por 1 minuto a 8000 rpm. Este passo foi realizado mais uma vez 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 °C) diretamente sobre a membrana. Após o período de incubação de 2 minutos a coluna foi centrifugada a 9000 rpm por 1,5 minutos.

O cRNA purificado foi submetido à análise de pureza e integridade. A concentração e pureza foram determinadas através de espectrofotômetro no 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/proteína (260/280 nm). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 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 V 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” ou esfregaço abaixo da banda 18s do RNA íntegro (controle), como observado na **Figura 2** abaixo:

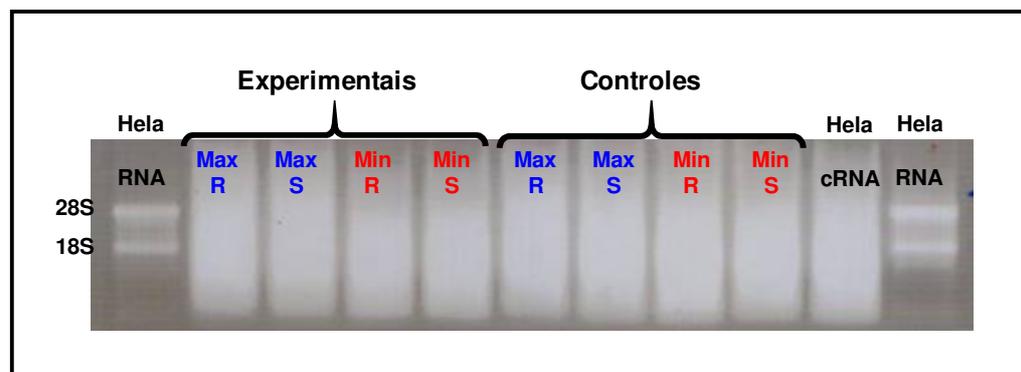


Figura 2: Avaliação da integridade do cRNA
Realizada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/ml de B.E.T. pela presença de um arraste de bandas abaixo da espécie 18s ribossomal. Além das amostras de cRNA dos animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS experimentais e controles, estão presentes no gel o RNA controle HeLa e o cRNA proveniente do RNA controle HeLa.

3.7.4.8 Fragmentação do cRNA

À alíquota de 10 µg em 20 µl foi adicionado 5 µl de tampão de fragmentação 5X e a amostra foi incubada em um 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.

3.7.4.9 Hibridização

Após transferir as amostras para um tubo de 1,5 ml foram adicionados 78 µl de tampão de hibridização A, 130 µl de tampão de hibridização B e 27 µl de água livre de nuclease e 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 colocadas no agitador a 300 rpm e a 37°C, onde permaneceram por 18 horas.

3.7.4.10 Detecção com Cy5-Streptavidina

A seguir as lâminas foram lavadas com tampão TNT 0,75x (Tris-HCl pH 7,6, NaCl 5 M e 0,05% Tween 20) e colocadas em outro recipiente de tampão TNT 0,75x pré-aquecido a 46 °C por exatamente 1 hora. A seguir as lâminas são 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 são lavadas em tampão TNT 1x durante 5 minutos por três vezes. Como última lavagem, as lâminas são colocadas em um recipiente com tampão SSC 0,1x / 0,05% Tween 20 e movimentadas durante 30 segundos, sendo em seguida secas em centrífuga a 664 xg por 3 minutos.

3.7.4.11 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 freqüência 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 e estão repetidos de maneira aleatória por toda a lâmina. Na **figura 3**, estão 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 4** estão demonstrados os controles positivos, nos quais a expressão gênica de todos os controles positivos 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.

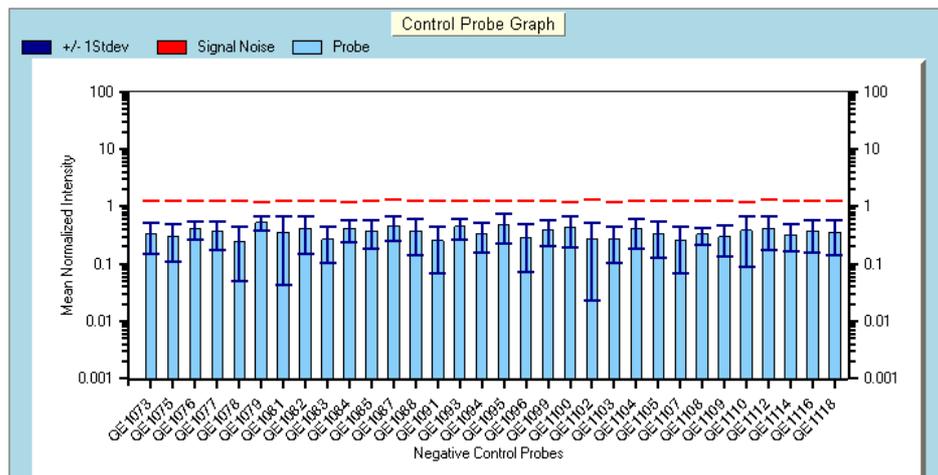


Figura 3: Controles negativos da lâmina de microarray.

As seqüências alvo dos mRNAs bacterianos estão distribuídas aleatoriamente pela lâmina. As expressões dos controles internos da lâmina estão abaixo da fluorescência de fundo.

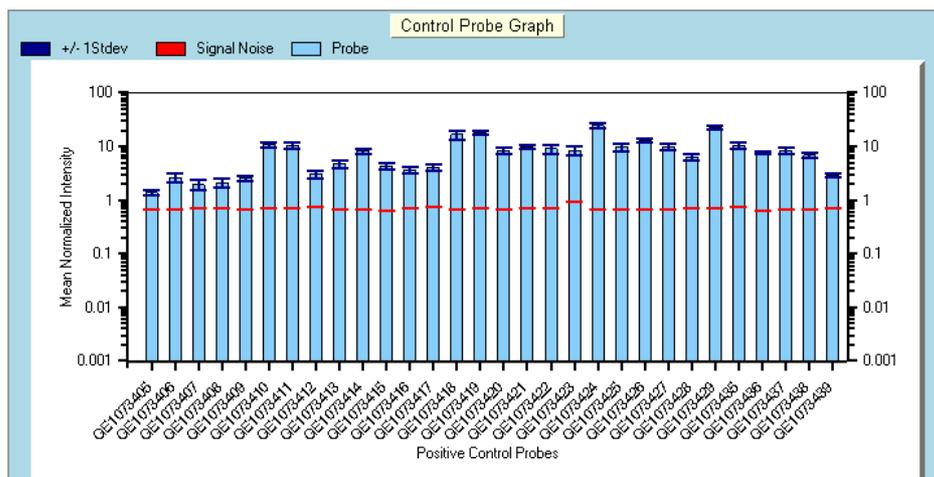


Figura 4: Controles positivos da lâmina de microarray.

As seqüências alvo dos mRNAs bacterianos estão distribuídas aleatoriamente pela lâmina. As expressões dos controles internos da lâmina estão acima da fluorescência de fundo.

Uma vez realizada a normalização, foram identificados os genes diferencialmente expressos pelas razões dos valores de intensidade de fluorescência obtidos a partir de amostras controle e experimentais entre as linhagens, pelo programa *CodeLink Expression* v.2.3 (GE Healthcare). Critérios para definição de valores de corte para identificar genes diferencialmente expressos foram baseados em parâmetros biológicos (ex. razões ≥ 3 ou ≤ 0.3).

Para as análises de agrupamentos funcionais foi utilizado o programa EASE (*Expression Analysis Systematic Explorer*). Esse software permite que os genes diferencialmente expressos possam ser agrupados em “temas biológicos” de acordo com sua categoria funcional, sua localização cromossômica e sua representação em relação ao genoma total. O EASE calcula a sobre-representação 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* para assegurar que cada gene fosse classificado apenas uma vez em cada categoria, já que em alguns sistemas (por exemplo, o *GeneBank*) um único gene pode ter mais de uma identificação. Para calcular a significância das categorias, o programa utiliza um teste estatístico chamado *EASE score*. Esse teste nada mais é do que um teste exato de Fisher modificado, onde é penalizada a categoria composta por poucos genes (chamadas “instáveis”) em favor de categorias representadas por um maior número de genes, levando em

consideração a perspectiva dos temas globais biológicos, minimizando a possibilidade de falsos-positivos. É, portanto, um teste mais restritivo (HOSACK et al., 2003).

3.8 Análise estatística

Para as análises entre dois grupos foi utilizado o teste *t* de *Student*, sendo estabelecido o nível mínimo de significância de $p \leq 0.05$. E para as análises entre mais de dois grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida por múltiplas comparações pelo método Tukey, sendo estabelecido o nível mínimo de significância de $p \leq 0,05$.

Nas análises de desequilíbrio de frequência de alelos, os valores de *p* foram obtidos através do teste exato de Fisher (para marcadores bialélicos) ou através do teste Qui-quadrado corrigido por Yates (para os marcadores com mais de 3 alelos), sendo estabelecido o nível mínimo de significância de $p \leq 0,05$.

As análises de correlação foram realizadas através da função de Pearson, que retorna um coeficiente de correlação (*r*), que quanto mais próximo dos valores 1 e -1 indica a relação linear perfeita entre dois conjuntos de dados.

4 RESULTADOS

4.1 Genotipagem para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1*

Todos os animais das sublinhagens AIR homocigotos para os alelos do gene *Slc11a1* utilizados ao longo deste trabalho foram previamente genotipados para os alelos *R* e *S* deste gene através da utilização de seqüências de *primers* específicos para cada alelo, como descrito nos Materiais e Métodos.

A genotipagem foi realizada com intuito de observar se houve a manutenção da homocigose dos alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* ao longo das sucessivas gerações de acasalamentos seletivos entre cada uma das sublinhagens.

Os resultados obtidos confirmaram a homocigose dos alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* nos animais AIRmax RR (n=16), AIRmax SS (n=19), AIRmin RR (n=17) e AIRmin SS (n=10) que foram então utilizados nos experimentos de indução de artrite por pristane (**Figura 5**).

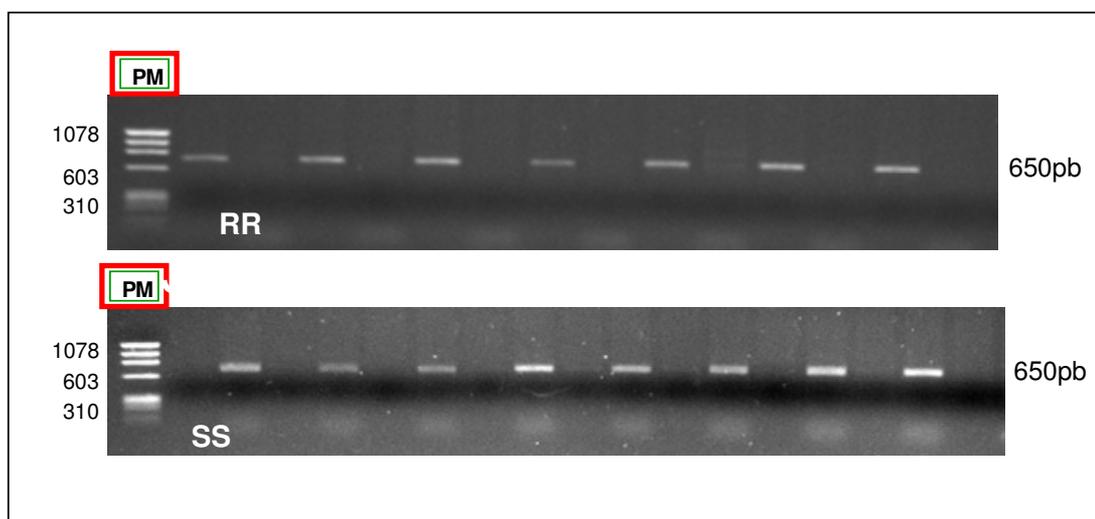


Figura 5: Gel exemplificando a detecção dos alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* em animais **(A)** AIRmax SS (n=7) e **(B)** AIRmax SS (n=8) da geração F14.

Os alelos específicos *R* e *S* do gene *Slc11a1* foram amplificados por PCR, utilizando duas amostras de 10 ng/ μ l de DNA genômico de cada animal. O produto das reações foi visualizado em gel de agarose 1%, contendo 0,5 μ g/ml de BET e utilizando PM Ladder Φ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments (72pb a 1353pb).

4.2 Artrite induzida pelo pristane (PIA)

Os animais AIRmax RR; AIRmax SS; AIRmin RR e AIRmin SS da geração F14 foram então submetidos a indução de artrite por pristane, e os fenótipos observados foram incidência e gravidade de artrite.

Nos animais AIRmax RR o processo artrítico teve início aos 90 dias com incidência de 18,75% (3/16), aos 120 dias a incidência de artrite foi de 33,3% (5/15), aos 150 dias a doença começa a regredir, atingindo 26,7% (4/15) dos animais e aos 180 dias somente 15,4% (3/13) dos AIRmax RR possuem artrite (**Figura 6A**). Em contrapartida, nos AIRmax SS o processo artrítico iniciou-se aos 120 dias com incidência de 39% (7/18), atingindo 66,7% (12/18) dos animais aos 150 dias, incidência que se manteve aos 180 dias (**Figura 6A**).

De modo semelhante aos experimentos anteriores, os animais AIRmin RR não desenvolveram artrite ao longo dos 180 dias de observação (**Figura 6A**). Não foram observados os fenótipos de PIA nos animais AIRmin SS, provavelmente devido a alta taxa de mortalidade destes animais no decorrer do experimento.

Para o fenótipo de gravidade de artrite foram observadas diferenças estatísticas favorecendo os animais AIRmax SS em relação aos AIRmax RR, que ocorreu aos 150 dias, onde a média da gravidade de artrite obtida pelos AIRmax SS foi maior ($7,83 \pm 5,74$) em relação à média dos AIRmax RR ($1,38 \pm 2,8$).

Esta diferença se mantém aos 180 dias, na qual os a média da gravidade de artrite nos animais AIRmax SS ($6,88 \pm 5,35$) é maior em relação à média dos animais AIRmax RR ($1,46 \pm 3,61$) (**Figura 6B**).

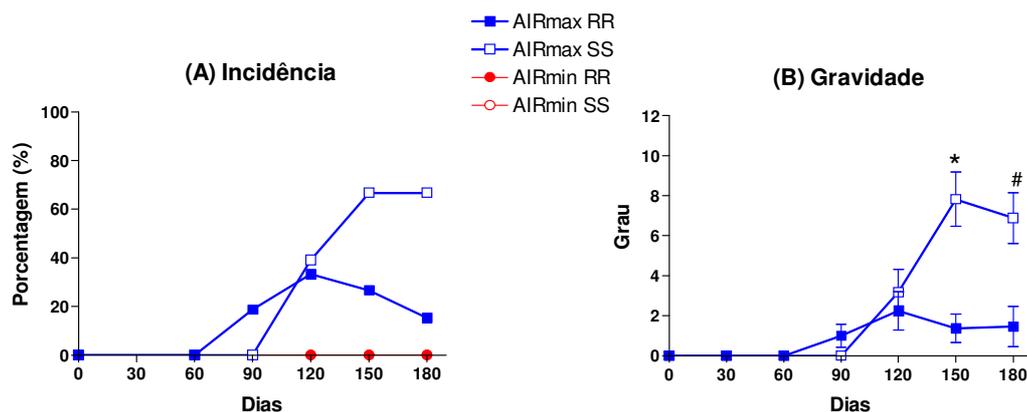


Figura 6: (A) Incidência e (B) gravidade de artrite induzida por pristane nos animais AIRmax RR (n=16), AIRmax SS (n=19), AIRmin RR (n=17) e AIRmin SS (n=10). Os animais receberam duas injeções i.p. de 0,5 ml de pristane, com um intervalo de 60 dias entre elas, e foram observados semanalmente durante 180 dias. Os resultados estão expressos em média e erro padrão.

* p=0,0004

p=0,0037

4.3 Identificação de polimorfismos

A identificação de polimorfismos gênicos ou de microssatélites foi realizada no cromossomo 1 e 11, e foram escolhidos os marcadores de microssatélites previamente determinados como informativos nas linhagens AIRmax e AIRmin da Seleção de Inflamação, ou foram selecionados genes localizados próximos ao *Slc11a1*, como a *Caspase 8* e o *Il8rb* (*Receptor beta de Interleucina 8*).

A análise foi realizada inicialmente no DNA genômico das oito linhagens isogênicas (A/J, BALB/c, C57BL/6, CBA/J, DBA/2J, P/J, SJL/J e SWR/J) que compuseram a população inicial (F0) da Seleção de Inflamação, nas linhagens AIRmax e AIRmin da Seleção de Inflamação (geração F37), nas sublinhagens da Seleção de Inflamação homocigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* (geração F14) e na população segregante F2 (dados não mostrados).

O objetivo desta etapa foi genotipar os animais das sublinhagens e da população segregante F2 para a realização dos estudos de correlação e co-segregação através do programa MapManager QTX, e para observar quais modificações ocorreram no cromossomo 1 após a produção das sublinhagens da Seleção de Inflamação homocigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1*.

A identificação alélica nas linhagens isogênicas que compuseram a população F0 da Seleção de Inflamação foi realizada com intuito de para caracterizar o padrão

de herança destes alelos na Seleção de Inflamação e nas sublinhagens. Através dessa população foram definidos os tamanhos (em pares de base – pb) dos alelos, que foram classificados de acordo com o seu peso molecular, portanto foi atribuído ao alelo com maior peso molecular a letra “a”, e assim sucessivamente (**Tabelas 2 e 3**).

Todos os marcadores de microssatélites analisados entre as linhagens isogênicas foram polimórficos, com exceção do gene *I18rb* (**Tabelas 2 e 3**).

Na **tabela 4 e 5**, estão demonstradas as freqüências alélicas para os marcadores ou genes estudados nos cromossomo 1 e 11, respectivamente, nas linhagens AIRmax e AIRmin da Seleção de Inflamação. É interessante observar que somente o *D1Mit236* e o *D11Mit69*, possuem uma fixação diferencial de alelos na Seleção de Inflamação, na qual a linhagem AIRmax possui o genótipo “aa” para os dois marcadores, enquanto a linhagem AIRmin possui o genótipo “bb” para estes marcadores (**Tabelas 4 e 5**).

Na **tabela 6 e 7**, estão representadas as freqüências alélicas dos marcadores ou genes estudados nos cromossomo 1 e 11, respectivamente, nas sublinhagens da Seleção de Inflamação homocigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1*, existem variações no número de animais das linhagens genotipados pela ausência de amplificação do DNA genômico em alguns animais utilizados e para alguns marcadores de microssatélites analisados (**Tabelas 6 e 7**).

Com intuito de observar quais modificações ocorreram no cromossomo 1 após a produção das sublinhagens, que foram obtidas através dos acasalamentos assistido por genotipagem visando a geração de animais da Seleção de Inflamação homocigotos para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1*. Através da comparação entre as tabelas 4 e 6, foi demonstrado que não ocorreram modificações entre os alelos observados nas linhagens parentais AIRmax e AIRmin (**Tabela 4**) em relação às sublinhagens AIRmax (RR e SS) e AIRmin (RR e SS), respectivamente (**Tabela 6**).

Estes resultados indicam que as sublinhagens herdaram somente a região pretendida onde está localizada o gene *Slc11a1*, ou seja, somente essa região foi modificada em relação às linhagens parentais. Com exceção das freqüências gênicas obtidas para a *Caspase 8* na sublinhagem AIRmin SS e do *D1mit211* nos animais AIRmax SS (**Tabela 6**). Observa-se todos os animais AIRmin SS genotipados possuem o alelo “aa” em homocigose enquanto que na linhagem parental AIRmin observa-se a fixação preferencial do alelo “b”.

Existem variações no número de animais das linhagens genotipados pela ausência de amplificação do DNA genômico em alguns animais utilizados e para alguns marcadores de microssatélites analisados.

Tabela 2: Análise de marcadores de microssatélites e genes no cromossomo 1 em linhagens isogênicas.

Marcadores	cM	A/J	BALB/cJ	CBA/J	C57BL/J	DBA/J	P/J	SJL/J	SWR/J
<i>D1Mit64</i>	5,0	a	a	b	a	a	a	a	a
<i>D1Mit211</i>	15,0	b	a	b	c	b	a	c	c
<i>D1Mit236</i>	25,7	b	a	b	a	b	b	b	b
<i>Caspase 8</i>	30,1	a	b	a	a	a	a	b	b
<i>D1Mit303</i>	34,8	b	a	b	a	b	a	b	a
<i>Slc11a1</i>	39,2	r	s	r	s	r	r	r	r
<i>Il8rb</i>	40,0	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>D1Mit132</i>	43,1	a	a	d	c	c	b	c	c
<i>D1Mit49</i>	54,5	b	a	a	a	b	a	b	b
<i>D1Mit10</i>	56,6	b	b	a	b	b	b	c	c
<i>D1Mit36</i>	92,3	a	b	b	b	a	a	a	a
<i>D1Mit291</i>	101,5	b	b	c	a	c	b	b	b

Produto das amplificações dos microssatélites nas 8 linhagens isogênicas de camundongos que compuseram a F0 da Seleção de Inflamação
 - PM Ladder ΦX174 RF DNA/*Hae* III Fragments (72pb a 1353pb).
 - As amostras foram amplificadas por PCR e visualizadas em gel de agarose 4%.

Tabela 3: Análise de marcadores de microssatélites e genes no cromossomo 11 em linhagens isogênicas.

Marcadores	cM	A/J	BALB/cJ	CBA/J	C57BL/J	DBA/J	P/J	SJL/J	SWR/J
<i>D11Mit231</i>	17,0	a	a	a	c	b	d	c	e
<i>D11Mit242</i>	31,0	a	d	d	c	c	b	e	c
<i>D11Mit4</i>	37,0	a	d	d	c	b	b	d	d
<i>D11Mit36</i>	47,0	a	b	a	b	c	a	c	c
<i>D11Mit124</i>	57,0	a	b	b	d	c	d	c	d
<i>D11Mit214</i>	70,0	b	a	b	a	a	a	a	a
<i>D11Mit69</i>	71,0	b	b	b	b	b	b	a	b

Produto das amplificações dos microssatélites nas 8 linhagens isogênicas de camundongos que compuseram a F0 da Seleção de Inflamação
 - PM Ladder ΦX174 RF DNA/*Hae* III Fragments (72pb a 1353pb).
 - As amostras foram amplificadas por PCR e visualizadas em gel de agarose 4%.

Tabela 4: Representação das frequências de alelos obtidos no cromossomo 1 na Seleção de Inflamação.

Marcadores	cM	AIRmax	AIRmin
<i>D1Mit64</i>	5,0	11aa	5aa/6ab/1bb
<i>D1Mit211</i>	15,0	8bb/3bc	12cc
<i>D1Mit236</i>	25,7	12aa	12bb
<i>Caspase 8</i>	30,1	9aa/3ab	11bb/1ab
<i>D1Mit303</i>	34,8	2aa/7ab/1bb	12aa
<i>D1Mit132</i>	43,1	1ac/1cc	1aa/1ac/1ad/2cd/4dd
<i>D1Mit49</i>	54,5	5aa/6ab	9aa/3ab
<i>D1Mit10</i>	56,6	1aa/2ab/7bb/1bc	5aa/4ab/2ac/1bb
<i>D1Mit36</i>	92,3	1ab/10bb	1aa/8ab/3bb
<i>D1Mit291</i>	101,5	1ac/6bb/3bc/2cc	4bb/5bc/3cc

Produto das ampliações dos microssatélites nas linhagens AIRmax (n=12) e AIRmin (n=12) da Seleção de Inflamação

- PM *Ladder* Φ X174 RF DNA/*Hae* III *Fragments* (72pb a 1353pb).

- As amostras foram amplificadas por PCR e visualizadas em gel de agarose 4%.

Tabela 5: Representação das frequências de alelos obtidos no cromossomo 11 na Seleção de Inflamação.

Marcadores	cM	AIRmax	AIRmin
<i>D11Mit231</i>	17,0	12cc	8aa/4ae
<i>D11Mit242</i>	31,0	5cc/5cd/2dd	8aa/4ad
<i>D11Mit4</i>	37,0	9cc/3dd	3aa/8ad/1dd
<i>D11Mit36</i>	47,0	5bb/5bc/2cc	2aa/3ac/4bc/3cc
<i>D11Mit124</i>	57,0	1aa/3cc/4ad/4dd	2ab/8bb/2bc
<i>D11Mit214</i>	70,0	12aa	5aa/2ab/5bb
<i>D11Mit69</i>	71,0	12aa	12bb

Produto das ampliações dos microssatélites nas linhagens AIRmax (n=10-12) e AIRmin (n=9-12) da Seleção de Inflamação

- PM *Ladder* Φ X174 RF DNA/*Hae* III *Fragments* (72pb a 1353pb).

- As amostras foram amplificadas por PCR e visualizadas em gel de agarose 4%.

Tabela 6: Representação das frequências de alelos obtidos no cromossomo 1 nas sublinhagens.

Marcadores	cM	AIRmax RR	AIRmax SS	AIRmin RR	AIRmin SS
<i>D1Mit64</i>	5,0	16aa	19aa	17aa	1aa/9ab
<i>D1Mit211</i>	15,0	16bb	19cc	6bb/8bc/3cc	8bb/1bc/1cc
<i>D1Mit236</i>	25,7	2aa/8ab/6bb	19aa	17bb	10bb
<i>Caspase 8</i>	30,1	11aa/5ab	19aa	17bb	10aa
<i>D1Mit303</i>	34,8	5ab/11bb	19bb	17aa	10aa
<i>D1Mit132</i>	43,1	1aa/8ac/6cc	19cc	17dd	6aa/4ad
<i>D1Mit49</i>	54,5	16aa	19bb	17aa	7aa/3bb
<i>D1Mit10</i>	56,6	16aa	19cc	17aa	4ab/6bb
<i>D1Mit36</i>	92,3	16bb	19bb	17bb	10aa
<i>D1Mit291</i>	101,5	4aa/10ac/2cc	7aa/10ac/2cc	17cc	10bb

Produto das ampliações dos microssatélites nas linhagens AIRmaxRR (n=16), AIRmax SS (n=19), AIRmin RR (n=17) e AIRmin SS (n=10).

- PM *Ladder* Φ X174 RF DNA/*Hae* III *Fragments* (72pb a 1353pb).

- As amostras foram amplificadas por PCR e visualizadas em gel de agarose 4%.

Tabela 7: Representação das frequências de alelos obtidos no cromossomo 11 nas sublinhagens.

Marcadores	cM	AIRmax RR	AIRmax SS	AIRmin RR	AIRmin SS
<i>D11Mit231</i>	17,0	16cc	19cc	10aa/4ae	10aa
<i>D11Mit242</i>	31,0	16dd	7cc/10cd/2dd	17ee	10aa
<i>D11Mit4</i>	37,0	16dd	19cc	1aa/4ad/12dd	10dd
<i>D11Mit36</i>	47,0	16bb	19bb	3bb/6bc/8cc	3bc/7cc
<i>D11Mit124</i>	57,0	16cc	14ad/5cc	17bb	10bb
<i>D11Mit214</i>	70,0	16aa	19aa	6ab/11bb	2ab/8bb
<i>D11Mit69</i>	71,0	16bb	19bb	17bb	10bb

Produto das ampliações dos microssatélites nas linhagens AIRmaxRR (n=16), AIRmax SS (n=19), AIRmin RR (n=17) e AIRmin SS (n=10).
 - PM Ladder Φ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments (72pb a 1353pb).
 - As amostras foram amplificadas por PCR e visualizadas em gel de agarose 4%.

4.4 Estudos de correlação dos desvios de frequências de genes e marcadores genéticos com os fenótipos de PIA

Os genótipos obtidos nos cromossomos 1 e 11 descritos acima foram correlacionados com os fenótipos de artrite induzida pelo pristane obtidos nas sublinhagens da Seleção de Inflamação homocigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1*.

No programa “MapManager QTX” (MANLY et al., 2001) foram adicionados individualmente os valores fenotípicos de incidência e gravidade de PIA à cada período de avaliação (ou seja, aos 90, 120, 150 e 180 dias) e os genótipos individuais identificados nos cromossomos 1 e 11.

Nas tabelas abaixo (**Tabelas 8 e 9**) estão demonstradas somente as correlações entre as sublinhagens, marcadores e dias de análise que foram significativos. Não foram observadas correlações significativas dos genótipos e fenótipos entre as sublinhagens AIRmin RR e SS.

Aos 180 dias, houve uma correlação significativa do marcador *D1Mit236* e do gene *Slc11a1* no cromossomo 1, e do marcador *D11Mit4* no cromossomo 11, com o fenótipo de incidência de artrite (**Tabela 8**).

Para a gravidade de artrite houve uma correlação significativa dos mesmos marcadores e genes, *D1Mit236*, *Slc11a1* e *D11Mit4*, aos 150 e 180 dias de análise de PIA (**Tabela 9**).

Portanto, a análise de regressão revelou a presença de uma região no cromossomo 1 marcada pelo *D1Mit236* (25,7 cM) e pelo *Slc11a1* (39,2 cM), e no cromossomo 11 marcada pelo *D11Mit4* (37 cM) que estariam associadas tanto à incidência quanto à gravidade de artrite experimental.

Tabela 8: Análise de correlação de marcadores de QTL no cromossomo 1 e 11 com o fenótipo de incidência de artrite nos animais AIRmax RR e AIRmax SS.

Período	Marcadores	LRS ¹	p	Limites de significância de LRS
180 dias	<i>D1Mit236</i>	10,4	0,00127	- Sugestivo ≥ 2,7 - Significante ≥ 8,8 - Altamente significativa ≥ 16,3
	<i>Slc11a1</i>	9,3	0,00232	
	<i>D11Mit4</i>	9,3	0,00232	

¹ - Limites de significância de LRS: - sugestivo P≤0,05.
- significativa P≤0,001.
- altamente significativa P≤0,0001.

Tabela 9: Análise de correlação de marcadores de QTL no cromossomo 1 e 11 com o fenótipo de gravidade de artrite nos animais AIRmax RR e AIRmax SS.

Período	Marcadores	LRS ¹	p	Limites de significância de LRS
150 dias	<i>D1Mit236</i>	9,7	0,00181	- Sugestivo ≥ 2,7
	<i>Slc11a1</i>	13,2	0,00028	
	<i>D11Mit4</i>	13,2	0,00028	- Significante ≥ 9,1
180 dias	<i>D1Mit236</i>	10,8	0,00100	- Altamente significativa ≥ 16,1
	<i>Slc11a1</i>	11,1	0,00088	
	<i>D11Mit4</i>	11,1	0,00088	

¹ - Limites de significância de LRS: - sugestivo P≤0,05.
- significativa P≤0,001.
- altamente significativa P≤0,0001.

4.5 Estudos de co-segregação

Os estudos de co-segregação foram realizados na população segregante F2, obtida pelo cruzamento entre animais AIRmax versus AIRmin, para a realização deste estudo os animais foram avaliados para os fenótipos de intensidade da resposta inflamatória aguda ao Biogel e posteriormente para os fenótipos de artrite induzida por pristane.

A intensidade da resposta inflamatória aguda ao Biogel foi avaliada nas linhagens parentais da geração F40 e nos animais segregantes F2 (AIRmax versus AIRmin), para a obtenção dos fenótipos de infiltrado celular e extravasamento protéico que são os parâmetros da Seleção de Inflamação.

Inicialmente 95 animais AIRmax e 96 animais AIRmin da geração F40 da Seleção de Inflamação foram fenotipados para estes parâmetros. Os valores médios de celularidade e proteína obtidos na linhagem AIRmax foram de $46,58 \times 10^6$ ($\pm 12,54$) e $6,10$ ($\pm 0,34$), respectivamente. Enquanto na linhagem AIRmin os valores médios de celularidade foram de $1,69 \times 10^6$ ($\pm 2,14$) e de proteína $2,21$ ($\pm 1,12$) (**Tabela 10**).

A partir do inter cruzamento entre os animais AIRmax e AIRmin da geração F40, foram obtidos os animais híbridos F1, e a partir do inter cruzamento destes foram obtidos 320 animais segregantes F2 (AIRmax *versus* AIRmin).

Toda a população F2 obtida foi avaliada para os parâmetros de seleção, e os valores médios de celularidade e proteína nesta população foram de $14,97 \times 10^6$ ($\pm 13,11$) e $3,60$ ($\pm 1,23$), respectivamente (**Tabela 10**).

Tabela 10: Avaliação dos fenótipos da intensidade da resposta inflamatória aguda nas linhagens parentais.

Animais	n	Infiltrado celular x \pm d.p. ($\times 10^6$)	Proteínas x \pm d.p. (D.O.)
AIRmax (F40)	95	$46,58 \pm 12,54^*$	$6,10 \pm 0,34^*$
AIRmin (F40)	96	$1,69 \pm 2,14$	$2,21 \pm 1,12$
F2 total	320	$14,97 \pm 13,11$	$3,60 \pm 1,23$

Os animais foram injetados s.c. com 0,75ml de Biogel e o exsudato inflamatório foi colhido após 24 horas. O número de células foi determinado pela contagem em câmara de Malassez e a concentração protéica foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda 280nm e expressa em unidades de D.O. Os resultados foram expressos em média e erro padrão.

* $p < 0,0001$ - análise entre AIRmax e AIRmin.

As linhagens parentais AIRmax e AIRmin da geração F40 e os animais da população F2 (AIRmax *versus* AIRmin da geração F40) foram submetidos a indução de artrite por pristane, e observados para os fenótipos de incidência e gravidade.

A linhagem parental AIRmax foi extremamente susceptível ao desenvolvimento de PIA, que teve início aos 90 dias após a injeção de pristane e atingiu 65% dos animais aos 180 dias (**Figura 7A**). Somente 6% dos animais da linhagem AIRmin desenvolveram artrite, que teve início aos 180 dias (**Figura 7A**). Os resultados de artrite obtidos nas linhagens parentais corroboram aos descritos na literatura (VIGAR et al., 2000).

Aos 90 dias 3.31% (10/302) dos animais da população F2 desenvolveram artrite experimental; aos 120 dias a incidência de artrite foi de 13.6% (40/294); aos 150 dias foi de 21.2% (61/288) e ao final do processo de observação, aos 180 dias, 13.62% (38/279) dos animais desenvolveram artrite experimental (**Figura 7A**).

Os animais F2 apresentaram baixos valores para o fenótipo de gravidade, que atingiu o grau máximo aos 150 dias ($0,77 \pm 1,67$) (**Figura 7B**).

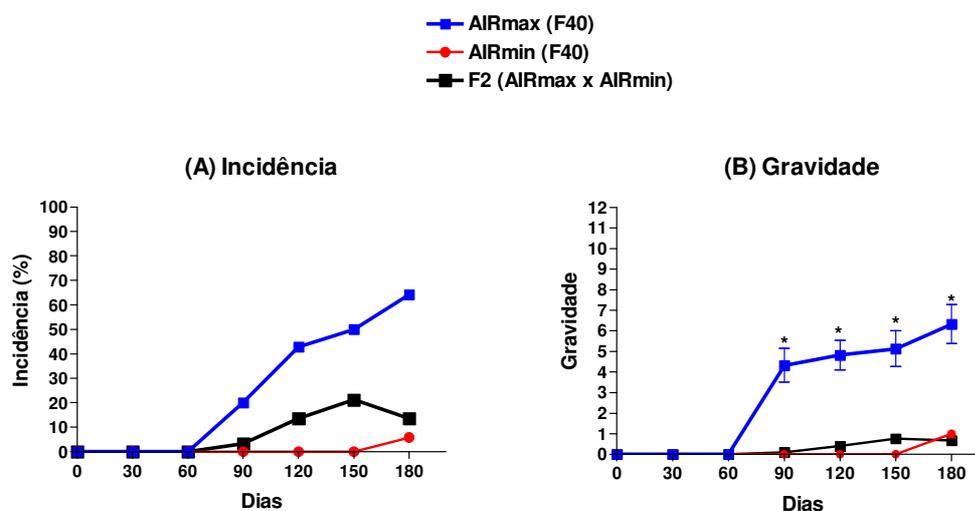


Figura 7: (A) Incidência e **(B)** gravidade de artrite nos animais segregantes F2 (AIRmax versus AIRmin) em relação aos animais AIRmax (n=16) e AIRmin (n=17) parentais. Os animais receberam duas injeções i.p. de 0,5 ml de pristane, com um intervalo de 60 dias entre elas, e foram observados semanalmente durante 180 dias. Os resultados de incidência estão expressos porcentagem e os de gravidade em média e erro padrão. *p<0,001

Os animais utilizados para os estudos de co-segregação foram escolhidos pelo processo de “genotipagem seletiva” baseado nos trabalhos de Lander e Botstein (1989), Darvasi e Soller (1995) e Darvasi (1997).

Na genotipagem seletiva de uma população retrocruzada ou segregante F2 somente os indivíduos com fenótipos nos extremos de alta ou baixa resposta são genotipados (DARVASI e SOLLER, 1995). Esse procedimento garante um alto poder de resolução na detecção do QTL através da genotipagem de, no máximo, 20 a 25% dos indivíduos situados nos extremos *high* e *low*, na qual a genotipagem de um maior número de indivíduos não reflete no aumento da precisão no mapeamento de QTL (DARVASI et al., 1997).

A seleção dos animais situados nos extremos de alta ou baixa resposta foi baseada no valor médio dos fenótipos da população F2, descritos na **Tabela 10**.

Portanto, para o extremo de mínima resposta foram selecionados os animais cujos valores fenotípicos se situavam abaixo do valor da média subtraído o respectivo desvio padrão (**Figura 8**).

Enquanto para o extremo de máxima resposta foram selecionados os animais cujos valores fenotípicos se situavam acima do valor da média acrescido o respectivo desvio padrão (**Figura 8**).

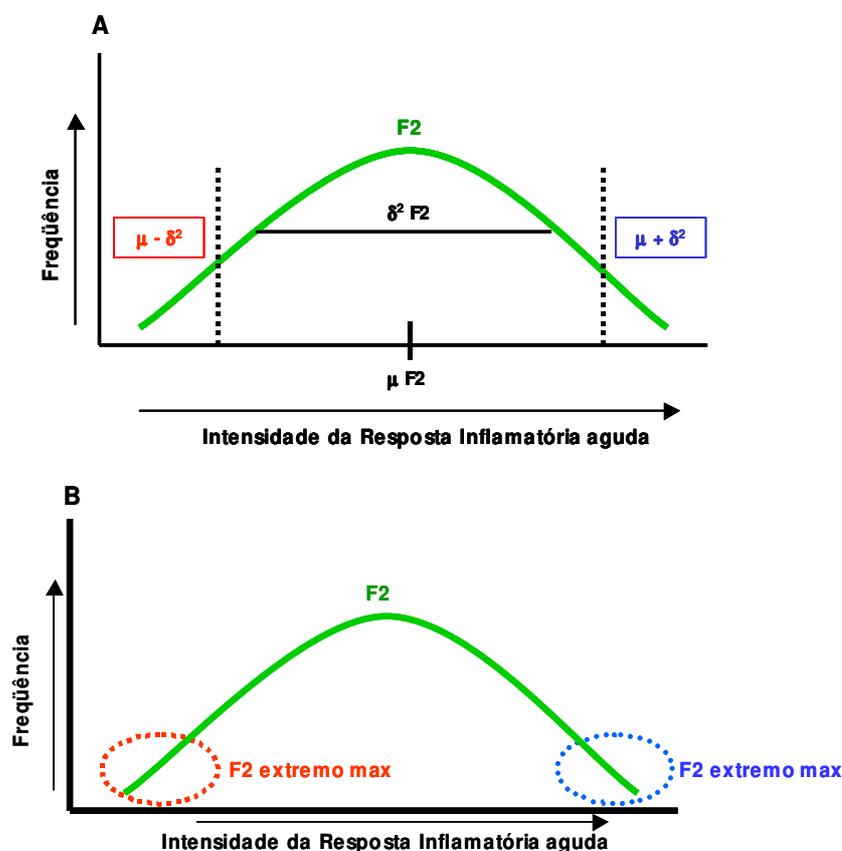


Figura 8: Representação esquemática da distribuição dos fenótipos da AIR na população F2 (AIRmax versus AIRmin), que seguem a curva de Gauss (**A**). Os círculos representam os animais com os fenótipos nos extremos da curva, em vermelho os extremos mínimos e em azul os extremos máximos para os fenótipos de seleção (**B**).

μ = valor da média da população F2

δ^2 = valor do desvio padrão da população F2

Para cada extremo da população F2 (AIRmax versus AIRmin) foram selecionados 30 animais (15 machos e 15 fêmeas). Os animais situados nos extremos de máxima celularidade e proteína possuíam valores médios de 36.22×10^6

(± 18.0) e de 4.81 (± 2.23), respectivamente, e foram chamados de “**F2 extremo max**” (Tabela 11).

Em contrapartida, os animais situados nos extremos de mínima celularidade e proteína possuíam valores médios de 2.40×10^6 (± 1.85) e 2.10 (± 1.10), respectivamente, e foram chamados de “**F2 extremo min**” (Tabela 11).

Na tabela 11 abaixo, estão os demonstrados os fenótipos de incidência e gravidade nos extremos da população F2, aos 180 dias após a primeira injeção de pristane. Pode-se observar que nos animais da “F2 extremo max” aos 180 dias, houve uma maior incidência de artrite experimental, atingindo 20% (6/30) desses animais em comparação à “F2 extremo min”, onde somente 6.6% (2/30) dos animais tiveram artrite aos 180 dias. Não foram observadas diferenças significativas entre esses animais para o fenótipo de gravidade de artrite.

Tabela 11: Avaliação dos fenótipos da intensidade da resposta inflamatória aguda após 24 horas de Biogel e de artrite induzida por pristane aos 180 dias de pristane nos extremos da população F2 segregante

Animais	n	Infiltrado celular x \pm d.p. ($\times 10^6$)	Proteínas x \pm d.p. (D.O.)	Incidência (%)	Gravidade x \pm d.p.
F2 extremo max	30	36,22 \pm 18,0*	4,81 \pm 2,23 *	20%	1,35 \pm 2,91
F2 extremo min	30	2,40 \pm 1,85	2,10 \pm 1,10	6,6%	0,45 \pm 1,38

Os animais foram injetados s.c. com 0,75ml de Biogel e o exsudato inflamatório foi colhido após 24 horas. O número de células foi determinado pela contagem em câmara de Malassez e a concentração protéica foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda 280nm e expressa em unidades de D.O. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

* $p < 0,0001$ - análise entre F2 extremo max e min.

Os animais receberam duas injeções i.p. de 0,5 ml de pristane, com um intervalo de 60 dias entre elas, e foram observados semanalmente durante 180 dias

Uma vez obtidos os fenótipos de interesse e os genótipos, foram iniciados os estudos de co-segregação.

Os estudos de co-segregação foram realizados através da utilização do programa MapManager QTX, no qual foram adicionados individualmente os fenótipos de AIR e PIA, e os genótipos obtidos no cromossomo 1 e 11.

Nenhum dos marcadores e genes analisados no cromossomo 1 e 11 co-segregaram com os fenótipos de infiltrado celular e concentração protéica da população “F2 extremo AIR”.

Entretanto, quando os fenótipos analisados foram incidência (Tabela 12) e gravidade (Tabela 13) de artrite experimental na população “F2 extremo AIR” foi

observado que os marcadores *D1Mit303* e *D11Mit242* apresentaram índices de co-segregação sugestiva para os fenótipos de PIA.

Estes resultados indicam a não existência de QTL reguladores da Resposta Inflamatória Aguda nos extremos de celularidade e proteína da população F2 (AIRmax versus AIRmin), porém, sugerem a presença nesta população de QTL reguladores de artrite induzida por pristane (PIA) nos cromossomos 1 e 11.

Tabela 12: Análise de co-segregação de marcadores de QTL nos extremos AIR da população F2 para o fenótipo de incidência de artrite.

Cr.	Marcadores	cM	LRS ¹	% ²	p
1	<i>D1Mit236</i>	25,7	4,2	7	0,11944
1	<i>Caspase 8</i>	30,1	1,6	3	0,44547
1	<i>D1Mit303</i>	34,8	9,4	15	0,00895
1	<i>Slc11a1</i>	39,4	5,4	11	0,06704
11	<i>D11Mit231</i>	17,0	2,9	5	0,23835
11	<i>D11Mit242</i>	31,0	6,0	10	0,05002
11	<i>D11Mit69</i>	71,0	0	0	0,99570

1 - Limites de significância de LRS: - sugestivos LRS≥4,4 (P≤0,05)
 - significantes LRS≥11,5 (P≤0,001)
 - altamente significantes LRS≥21,8 (P≤0,0001)
 2. % da variância total explicados pelo QTL

Tabela 13: Análise de co-segregação de marcadores de QTL nos extremos AIR da população F2 para o fenótipo de gravidade de artrite.

Cr.	Marcadores	cM	LRS ¹	% ²	P
1	<i>D1Mit236</i>	25,7	2,9	5	0,22890
1	<i>Caspase 8</i>	30,1	0,9	1	0,64481
1	<i>D1Mit303</i>	34,8	10	15	0,00676
1	<i>Slc11a1</i>	39,4	4,2	9	0,11981
11	<i>D11Mit231</i>	17,0	2,3	4	0,32191
11	<i>D11Mit242</i>	31,0	6,2	10	0,04464
11	<i>D11Mit69</i>	71,0	0,1	0	0,97507

1 - Limites de significância de LRS: - sugestivos LRS≥4,2 (P≤0,05)
 - significantes LRS≥12,0 (P≤0,001)
 - altamente significantes LRS≥28,0 (P≤0,0001)
 2 - % da variância total explicados pelo QTL

4.6 Análise da expressão gênica global

4.6.1 Análise dos genes ativados e reprimidos nas sublinhagens da Seleção de Inflamação homozigotas para os alelos do gene *Slc11a1*

Inicialmente, esta análise determinou o número de genes modulados nas patas controles (sem estímulo) e experimentais (após 180 dias de PIA) dos animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS das sublinhagens AIR homozigotas para os alelos do gene *Slc11a1*.

Para esta avaliação foram divididos os valores de intensidade de expressão gênica dos animais experimentais em relação aos seus respectivos controles, ou seja, entre os: AIRmax RR experimental/controle; AIRmax SS experimental/controle; AIRmin RR experimental/controle e AIRmin SS experimental/controle.

Os genes ativados foram considerados aqueles com uma intensidade de expressão igual ou acima de três vezes, enquanto, os genes reprimidos foram os que obtiveram intensidades iguais ou abaixo de 0,33 após o cálculo da relação experimental/controle.

A **figura 9** abaixo, demonstra que nos animais AIRmax RR 95 genes estavam ativados e 26 reprimidos, enquanto nos AIRmax SS existem 255 genes ativados e 270 reprimidos. Nos animais AIRmin RR e SS experimentais existem, respectivamente, 37 e 27 genes ativados e, 48 e 15 genes reprimidos (**Figura 9**).

Estes resultados indicam que durante o processo de inflamação crônica existe a modulação de um maior número de genes na linhagem mais suscetível ao desenvolvimento de artrite por pristane (PIA), os animais AIRmax SS, quando comparados aos animais AIRmax RR, que desenvolvem artrite experimental com incidência e gravidade moderados. Já nas linhagens resistentes ao desenvolvimento de PIA, AIRmin RR e SS, o número de genes modulados é menor e muito similar aos AIRmax RR.

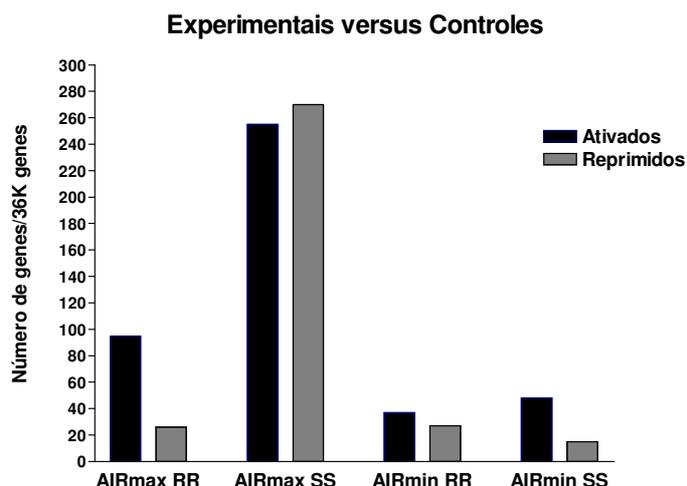


Figura 9: Número de genes ativados e reprimidos nas patas dos animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS experimentais *versus* controles.

Os animais experimentais receberam duas injeções i.p. de 0,5 ml de pristane e as patas foram obtidas após 180 dias, enquanto nos animais controles as patas foram obtidas sem nenhum tratamento prévio.

Os genes modulados foram então analisados através do programa EASE, com intuito de avaliar a sobre-representação em categorias funcionais.

Como descrito nos Materiais e Métodos o programa EASE (*Expression Analysis Systematic Explorer*) permite que os genes diferencialmente expressos ou modulados sejam agrupados em “temas biológicos” de acordo com sua categoria funcional, sua localização cromossômica e sua representação em relação ao genoma total.

Nas **tabelas 14 e 15** abaixo estão demonstradas as categorias funcionais sobre-representadas pelos genes ativados e reprimidos, respectivamente, nos animais AIRmax RR experimentais em relação aos controles. Somente estão representadas as categorias estatisticamente significantes.

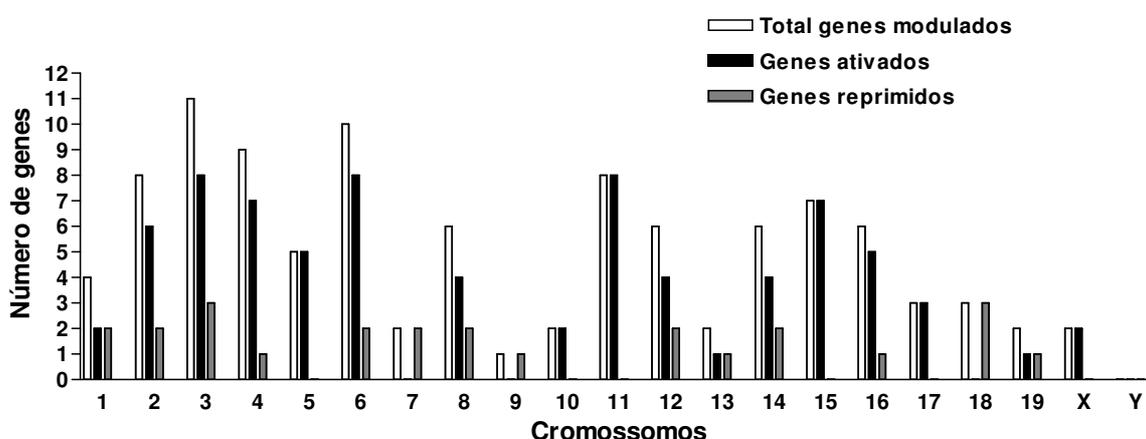
Tabela 14: Categorias funcionais sobre-representadas nos genes ativadas dos animais AIRmax RR artríticos em relação aos controles

Categoria funcional	n genes	EASE score	Genes
Resposta a substâncias químicas	5	7.89e-005	<i>Il1b, Defb3, Cxcl2, Cxcl13, Ccl19</i>
Resposta inflamatória	5	1.36e-004	<i>Il1b, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl13, Ccl19</i>
Quimiotaxia	4	5.98e-004	<i>Il1b, Cxcl2, Cxcl13, Ccl19</i>
Resposta de defesa	9	7.48e-004	<i>Il1b, Defb3, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl5, Ccl19, Saa3, Ctf1, Tnfsf11.</i>

Tabela 15: Categorias funcionais sobre-representadas nos genes reprimidos dos animais AIRmax RR artríticos em relação aos controles

Categoria funcional	n genes	EASE score	Genes
Metabolismo de lipídeos	6	3.44e-004	<i>Ptgis, Cidea, Hmgcs2, Scd3, Sult1a1, Adh1.</i>

O próximo passo foi avaliar a distribuição cromossômica dos genes ativados e reprimidos nos AIRmax RR experimentais em relação aos controles, pode-se observar que houve uma distribuição dos genes ao longo de todo o genoma com exceção no cromossomo sexual Y (**Figura 10**).

**Figura 10:** Distribuição cromossômica dos genes modulados nas patas artríticas de animais AIRmax RR em relação aos controles.

Nas **tabelas 16 e 17** abaixo estão demonstradas as categorias funcionais sobre-representadas pelos genes ativados e reprimidos, respectivamente, nos animais AIRmax SS experimentais em relação aos controles. Estão representadas somente as categorias estatisticamente significantes.

Tabela 16: Categorias funcionais sobre-representadas nos genes ativados dos animais AIRmax SS artríticos em relação aos controles

Categoria funcional	n genes	EASE score	Genes
Resposta inflamatória	11	9.02e-007	<i>Tirap, Il10, Il1b, Mefv, Ccl3, Ccl7, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl13, Ptx3, Chi3l3.</i>
Resposta imune	20	4.80e-004	<i>Stat3, Saa3, Oas2, Oasl1, Trem1, Trem3, C3ar1, Tnfsf11, Ptx3, Tirap, Il10, Il1b, Mefv, Ccl3, Ccl7, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl5, Cxcl13, Chi3l3.</i>
Quimiotaxia	7	6.11e-004	<i>Kras, Il1b, Ccl3, Ccl7, Cxcl2, Cxcl13, C3ar1.</i>
Resposta de cicatrização	11	1.45e-003	<i>Ptx3, Tirap, Il10, Il1b, Mefv, Ccl3, Ccl7, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl13, Chi3l3.</i>

Tabela 17: Categorias funcionais sobre-representadas nos genes reprimidos dos animais AIRmax SS artríticos em relação aos controles

Categoria funcional	n genes	EASE score	Genes
Diferenciação da epiderme	4	1.47e-003	<i>Krt1-17, Krt2-18, Ovol1.</i>

Na **figura 11** abaixo, está demonstrada a distribuição cromossômica dos genes ativados e reprimidos nos animais AIRmax SS experimentais em relação aos controles, pode-se observar que houve uma distribuição dos genes ao longo de todo o genoma com exceção no cromossomo sexual Y (**Figura 11**).

Observa-se uma agrupamento gênico significativo nos cromossomos 15 (EASE score = 4.58e-003) e 11 (EASE score = 5.29e-004) para os genes reprimidos nos animais experimentais AIRmax SS em relação aos seus controles (**Figura 11**).

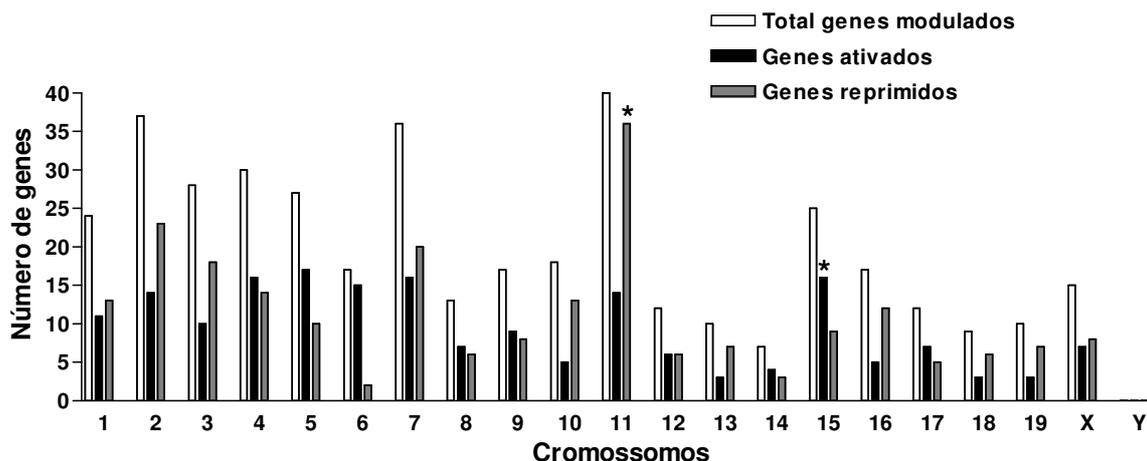


Figura 11: Distribuição cromossômica dos genes modulados nas patas artríticas de animais AIRmax SS em relação aos controles.

*EASE score de $6.30e-007$ no cromossomo 11 e de $4.58e-003$ no cromossomo 15.

Na **tabela 18** estão representados os valores de intensidade de todos os genes considerados ativados e reprimidos nas análises entre os animais AIRmax RR experimentais/controles e AIRmax SS experimentais/controles (**Tabela 18**).

Para as análises entre os animais AIRmin RR e AIRmin SS experimentais *versus* controles, não foram identificadas categorias funcionais sobre-representadas.

Tabela 18: Intensidade da expressão gênica global por *Microarray* nos grupos experimentais e controles das sublinhagens, e genes ativados e reprimidos.

Nome do gene e símbolo	EXPERIMENTAIS (PIA)				CONTROLES				EXP/CONT	
	Max R	Max S	Min R	Min S	Max R	Max S	Min R	Min S	MaxR PIA/C	MaxS PIA/C
<i>Defensin beta 3 (Defb3)</i>	58,89	2,02	3,93	20,83	1,46	2,41	1,79	2,56	40,44	0,84
<i>Interleukin 1 beta (Il1b)</i>	17,83	12,83	1,58	2,00	0,92	2,53	1,12	1,36	19,34	5,07
<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (Cxcl1)</i>	6,38	10,24	1,83	1,56	1,75	1,29	1,33	1,45	3,65	7,96
<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (Cxcl2)</i>	20,99	13,42	3,33	1,03	0,75	2,43	0,66	1,31	27,86	5,53
<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (Cxcl5)</i>	2,80	6,64	0,71	0,91	0,81	0,87	0,72	0,77	3,43	7,59
<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (Cxcl13)</i>	25,11	30,83	4,68	7,76	4,03	0,71	1,72	2,30	6,23	43,64
<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3 (Ccl3)</i>	2,85	5,54	1,55	0,68	1,59	1,30	0,99	1,33	1,80	4,27
<i>Chemokine (C-C motif) ligand 7 (Ccl7)</i>	7,06	19,46	6,32	5,63	3,04	2,68	4,40	3,38	2,32	7,26
<i>Chemokine (C-C motif) ligand 19 (Ccl19)</i>	14,00	15,22	15,22	16,29	4,54	7,32	16,92	14,60	3,08	2,08
<i>Serum amyloid A 3 (Saa3)</i>	81,05	31,76	10,02	3,86	13,80	3,54	4,22	4,67	5,87	8,97
<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 (Tnfsf11)</i>	14,29	12,94	1,79	1,53	3,08	1,98	1,49	1,88	4,64	6,54
<i>Cardiotrophin 1 (Ct1)</i>	26,10	10,81	7,31	6,64	5,07	12,83	5,17	6,88	5,15	0,84
<i>Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein (Tirap)</i>	2,06	4,73	1,51	1,56	1,42	1,22	1,50	1,50	1,45	3,89
<i>Interleukin 10 (Il10)</i>	1,01	4,94	0,79	0,82	0,54	0,79	0,70	0,68	1,86	6,24
<i>Mediterranean fever (Mefv)</i>	6,16	7,85	1,65	1,91	3,83	1,83	1,16	1,15	1,61	4,29
<i>Pentaxin related gene (Ptx3)</i>	7,82	9,21	2,49	2,68	3,96	1,99	2,20	2,28	1,98	4,64
<i>Chitinase 3-like 3 (Chi3l3)</i>	47,36	15,69	18,82	8,45	34,15	5,23	12,45	2,45	1,39	3,00
<i>Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)</i>	38,69	27,85	6,96	7,25	32,38	8,75	5,86	5,16	1,20	3,18
<i>2'-5' oligoadenylate synthetase 2 (Oas2)</i>	6,29	8,08	2,29	2,33	4,72	1,73	2,17	1,98	1,33	4,66
<i>2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1 (Oasl1)</i>	6,51	9,19	3,00	2,44	3,78	1,44	2,17	1,72	1,72	6,40
<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (Trem1)</i>	2,06	1,99	0,48	0,33	0,78	0,41	0,22	0,33	2,63	4,85
<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 3 (Trem3)</i>	38,44	16,64	5,30	8,75	25,39	4,88	3,43	4,93	1,51	3,41
<i>Complement component 3a receptor 1 (C3ar1)</i>	8,26	12,87	6,34	7,48	7,27	3,94	4,48	6,04	1,14	3,27
<i>Kirsten rat sarcoma oncogene 2, expressed (Kras2)</i>	2,11	14,45	1,58	1,79	2,28	1,62	1,79	1,47	0,92	8,90
<i>Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase (Ptgis)</i>	2,12	3,62	7,17	6,30	7,93	5,16	7,07	8,53	0,27	0,70
<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A (Cidea)</i>	2,40	1,47	9,12	11,02	8,21	7,67	6,84	6,44	0,29	0,19
<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (Hmgcs2)</i>	1,00	1,16	3,03	2,35	3,07	2,18	2,24	1,61	0,32	0,53
<i>Stearoyl-coenzyme A desaturase 3 (Scd3)</i>	0,76	1,15	7,28	5,79	2,97	3,24	4,77	4,69	0,26	0,36
<i>Sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1 (Sult1a1)</i>	1,10	1,91	7,43	4,07	4,22	3,36	3,13	3,40	0,26	0,57
<i>Alcohol dehydrogenase 1 (class I) (Adh1)</i>	6,29	5,66	20,01	16,43	23,47	16,86	15,86	15,12	0,27	0,34
<i>Keratin complex 1, acidic, gene 17 (Krt1-17)</i>	1,79	1,53	4,55	6,28	1,52	7,71	3,35	4,25	1,18	0,20
<i>Keratin complex 2, basic, gene 18 (Krt2-18)</i>	7,14	11,17	17,19	22,28	6,79	36,36	13,72	28,36	1,05	0,31
<i>OVO homolog-like 1 (Drosophila) (Ovol1)</i>	3,19	2,37	4,37	7,43	3,59	8,74	4,43	4,81	0,89	0,27

* Na última coluna à direita estão representados os genes ativados (≥ 3) e reprimidos ($\leq 0,33$) nos animais Max RR e SS experimentais em relação aos seus respectivos controles.

4.7 Validação do experimento de *Microarray* por qPCR

A validação do experimento de *Microarray* foi realizada pela avaliação de alguns genes diferencialmente expressos nos ensaios de PCR em Tempo Real (qPCR).

Na **Tabela 19** abaixo, estão demonstradas as correlações entre as duas metodologias para os genes *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Il18*, *Il12a* e *Csf2* e *Il8rb*.

Tabela 19: Correlações entre as expressões gênicas obtidas no qPCR e *Microarray*.

Genes	Correlação de Pearson (r)	Estatística
<i>Il6</i>	0,91	p= 0,001
<i>Il12a</i>	0,89	p= 0,001
<i>Il10</i>	0,84	p= 0,01
<i>Il1b</i>	0,81	p= 0,01
<i>Tnfa</i>	0,62	p= 0,05
<i>Csf2</i>	0,60	p= 0,05
<i>Il18</i>	0,52	p= 0,05

4.8 Expressão gênica por qPCR e *Microarray*

Vários genes foram analisados por qPCR (**Tabela 1 - Materiais e Métodos**), entre eles genes que codificam citocinas envolvidas no processo de artrite, genes próximos ao *Slc11a1* no cromossomo 1, como a *Caspase 8* e o *Il8rb*, ou no cromossomo 11, onde existe o grupo de genes *Csf2*, *Il3*, *Il4*, *Il5* e *Il13*.

Para alguns dos genes analisados não foi observada a presença de transcritos, como *Tgfb*, *Ifng*, *Il1a*, *Il3*, *Il4*, *Il5*, *Il12b* e *Il13*.

Apesar das escalas numéricas nos eixos Y dos gráficos serem as mesmas, deve-se notar que os resultados de qPCR estão em escala logarítmica enquanto os resultados de *Microarray* estão em escala linear.

4.8.1 Expressão do gene *Il6*

Os animais AIRmax RR e AIRmax SS artríticos expressaram níveis aumentados de RNA mensageiro para o gene da *Il6*, com diferenças significativas quando comparados aos AIRmin RR e AIRmin SS experimentais ($p \leq 0,001$) e

controles ($p \leq 0,001$) (**Figura 12A**). Entretanto, nos animais AIRmax RR controles existe uma expressão basal e significativa de *Il6* em relação aos demais grupos controle ($p \leq 0,05$), com exceção dos AIRmax SS controles (**Figura 12A**).

O mesmo perfil de expressão foi observado no experimento de *Microarray*, no qual os animais AIRmax RR e SS artríticos possuem altos níveis de expressão do gene *Il6* (**Figura 12B**).

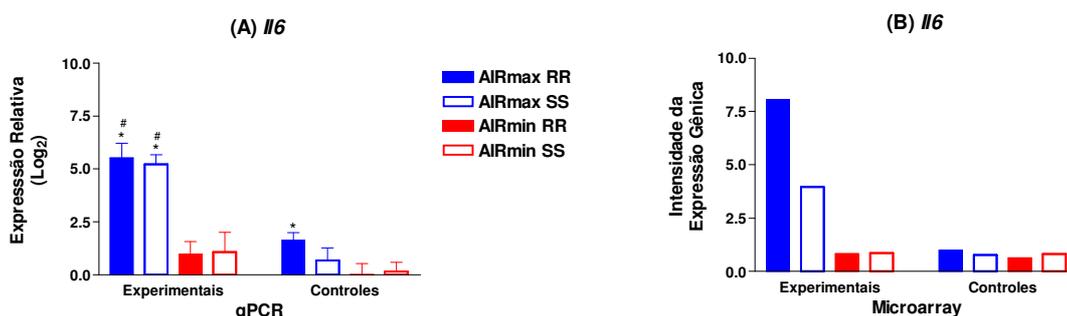


Figura 12: Análise da expressão gênica de *Il6* por (A) qPCR e (B) *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles. Foram analisados 4 animais por grupo, porém a análise foi individual no qPCR e em *pool* no *Microarray*. Os resultados estão expressos em média e erro padrão. * Análise estatística entre o mesmo grupo. # Análise estatística entre o grupo experimental e controle.

4.8.2 Expressão do gene *Il1b*

A mesma de modulação descrita acima para a *Il6* foi observada para o gene da *Il1b* (**Figura 13**), na qual os animais AIRmax artríticos, independente dos alelos do gene *Slc11a1*, expressaram níveis aumentados e significantes de RNAm para a citocina IL-1 β quando comparados aos AIRmin RR ($p \leq 0,01$) e AIRmin SS ($p \leq 0,05$) experimentais e controles ($p \leq 0,001$) (**Figura 13A**).

Entretanto, nos animais AIRmax RR e SS controles também existe uma expressão basal e significativa de *Il1b* (**Figura 13A**).

Nos resultados de *Microarray* também foi observada uma elevada expressão gênica nos animais AIRmax RR e SS artríticos (**Figura 13B**).

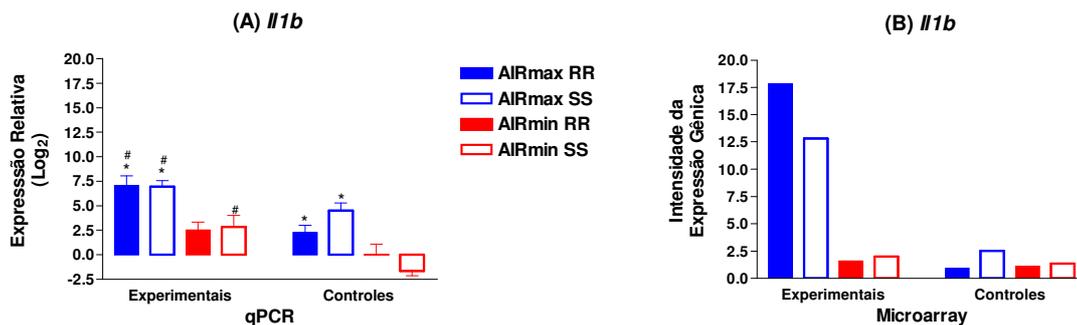


Figura 13: Análise da expressão gênica de *Il1b* por (A) qPCR e (B) *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles. Foram analisados 4 animais por grupo, porém a análise foi individual no qPCR e em *pool* no *Microarray*. Os resultados estão expressos em média e erro padrão. * Análise estatística entre o mesmo grupo. # Análise estatística entre o grupo experimental e controle.

4.8.3 Expressão do gene *Tnfa*

Nos animais AIRmax RR e SS artríticos existe uma elevada e significativa expressão do gene *Tnfa* em relação aos AIRmin RR e SS experimentais ($p \leq 0,05$) e controles ($p \leq 0,01$) (Figura 14A).

Porém, nos AIRmax RR e SS controles existe uma expressão basal significativa ($p \leq 0,05$) quando comparado aos demais grupos controles (Figura 14A).

Nos resultados de *Microarray* foi observada uma expressão gênica favorecendo os animais AIRmax RR e SS artríticos, porém este aumento foi mais discreto (Figura 14B).

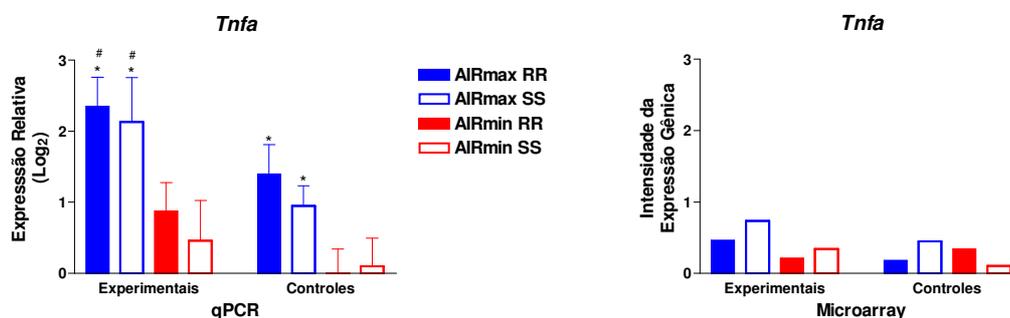


Figura 14: Análise da expressão gênica de *Tnfa* por (A) qPCR e (B) *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles. Foram analisados 4 animais por grupo, porém a análise foi individual no qPCR e em *pool* no *Microarray*. Os resultados estão expressos em média e erro padrão. * Análise estatística entre o mesmo grupo. # Análise estatística entre o grupo experimental e controle.

4.8.4 Expressão do gene *Il10*

Os animais AIRmax SS artríticos atingiram os níveis mais altos e significantes ($p < 0,001$) de expressão do gene *Il10* em relação a todos os demais grupos, e a diferença estatística foi mantida mesmo quando comparado aos animais artríticos AIRmax RR ($p < 0,02$) que possuem uma expressão significativa ($p < 0,05$) do gene *Il10* quando comparados aos demais grupos experimentais (**Figura 15A**).

Os AIRmax SS possuem uma expressão basal significativa ($p = 0,006$) quando comparado aos AIRmax RR (**Figura 15A**).

Nos resultados de *Microarray* é possível visualizar a elevada expressão de *Il10* nos animais AIRmax SS artríticos em relação aos demais grupos (**Figura 15B**).

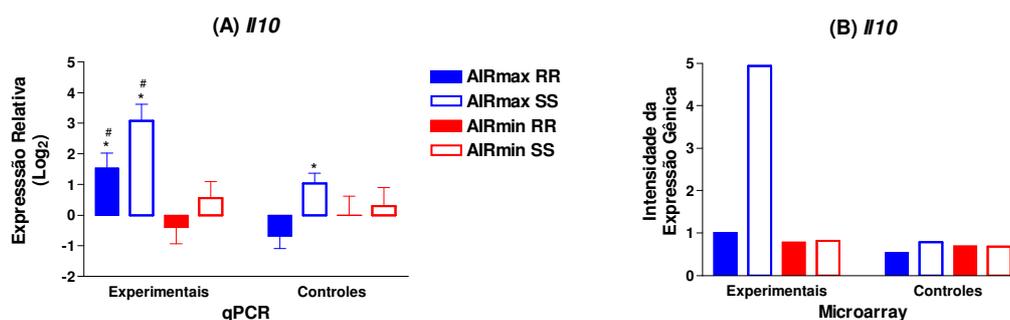


Figura 15: Análise da expressão gênica de *Il10* por (A) qPCR e (B) *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles.

Foram analisados 4 animais por grupo, porém a análise foi individual no qPCR e em *pool* no *Microarray*.

Os resultados estão expressos em média e erro padrão.

* Análise estatística entre o mesmo grupo.

Análise estatística entre o grupo experimental e controle.

4.8.5 Expressão do gene *Il12a*

Nos animais controles AIRmax RR ($p \leq 0,05$), AIRmax SS ($p \leq 0,01$) e AIRmin SS ($p \leq 0,01$) foram identificados níveis basais significativos de expressão de RNAm da subunidade p35 da citocina IL-12 quando comparados aos AIRmin RR controles (**Figura 16A**).

Os animais AIRmax RR controles mantém a significativa expressão de *Il12a* quando comparado aos grupos experimentais ($p \leq 0,05$), com exceção dos AIRmax

RR artríticos (**Figura 16A**).

O mesmo perfil de expressão gênica da *Il12a* é observado nos experimentos de *Microarray*, com a maior modulação gênica ocorrendo nos AIRmax RR controles (**Figura 16B**).

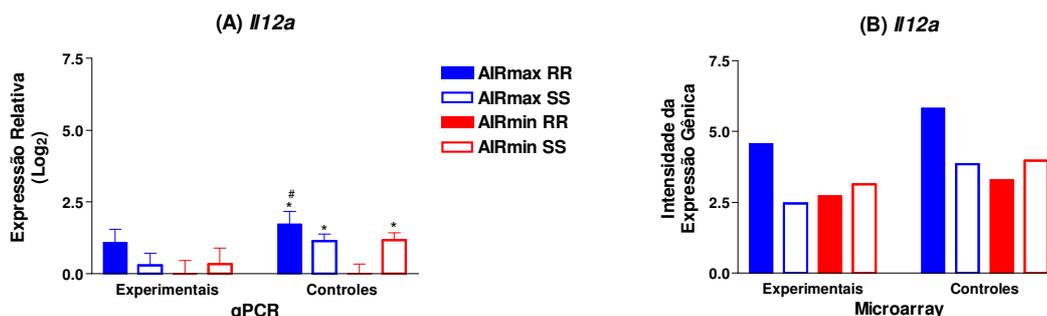


Figura 16: Análise da expressão gênica de *Il12a* por **(A)** qPCR e **(B)** *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles.

Foram analisados 4 animais por grupo, porém a análise foi individual no qPCR e em *pool* no *Microarray*.

Os resultados estão expressos em média e erro padrão.

* Análise estatística entre o mesmo grupo.

Análise estatística entre o grupo experimental e controle.

4.8.6 Expressão do gene *Csf2*

Não foram encontradas diferenças significativas da expressão do gene *Csf2* entre os animais experimentais e controles, pois houve muita variação entre os animais do mesmo grupo (**Figura 17A**).

O mesmo perfil de expressão gênica foi observado nos experimentos de *Microarray*, no qual os animais do grupo experimental e controle expressam níveis similares de *Csf2* (**Figura 17B**).

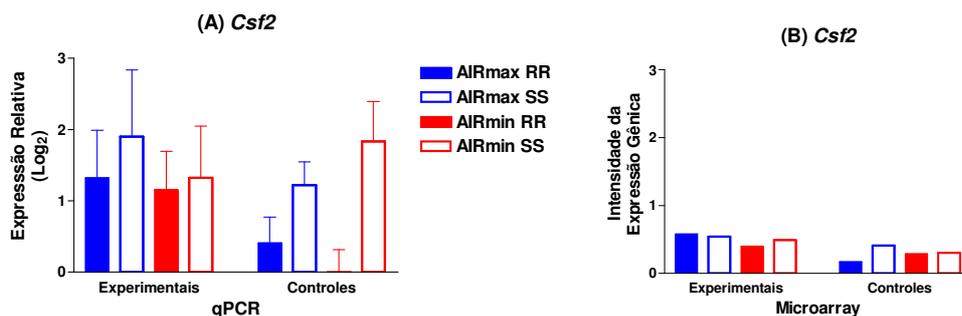


Figura 17: Análise da expressão gênica de *Il1b* por **(A)** qPCR e **(B)** *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles. Foram analisados 4 animais por grupo, porém a análise foi individual no qPCR e em *pool* no *Microarray*. Os resultados estão expressos em média e erro padrão.

4.8.7 Expressão do gene *Il18*

Os níveis de expressão do gene *Il18* foram elevados nos animais AIRmin RR e SS experimentais quando comparados aos AIRmax RR ($p \leq 0,05$) e SS ($p \leq 0,01$) experimentais e aos AIRmin RR ($p \leq 0,001$) e SS ($p \leq 0,01$) controles (**Figura 18A**).

Entretanto, houve uma expressão basal significativa de *Il18* nos animais AIRmax RR e SS controles em relação aos AIRmin RR ($p \leq 0,01$) e AIRmin SS ($p \leq 0,05$) controles (**Figura 18A**).

A expressão gênica da *Il18* nos experimentos de *Microarray* foi muito maior em escala quando comparada ao qPCR, entretanto o perfil de expressão foi muito semelhante entre os experimentos, com exceção de que somente os animais AIRmax SS controles possuem uma expressão basal aumentada em relação aos demais grupos (**Figura 18B**).

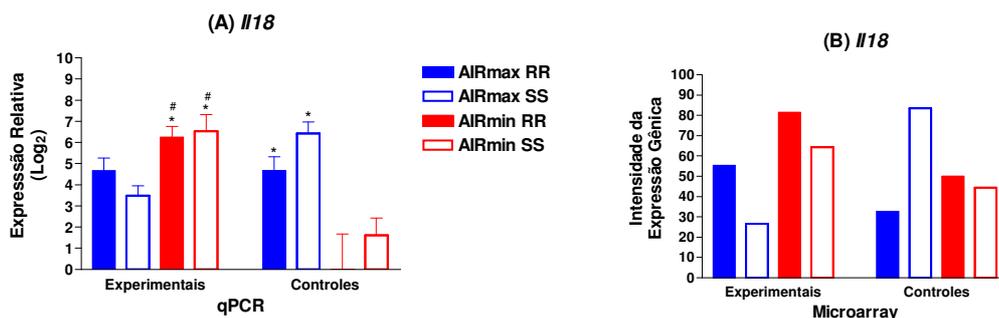


Figura 18: Análise da expressão gênica de *I18* por (A) qPCR e (B) *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles. Foram analisados 4 animais por grupo, porém a análise foi individual no qPCR e em *pool* no *Microarray*. Os resultados estão expressos em média e erro padrão. * Análise estatística entre o mesmo grupo. # Análise estatística entre o grupo experimental e controle.

4.8.8 Expressão do gene *I18rb*

A expressão gênica do gene *I18rb* só foi detectada por qPCR, para o qual existe uma ativação significativa nos animais AIRmax RR e SS experimentais e controles comparados aos AIRmin RR e SS dos dois grupos, com exceção do AIRmax SS controle, que possui valores significativos somente em relação aos AIRmin RR e SS controles (Figura 19A).

Os resultados de expressão por *Microarray* não atingiram os valores considerados biologicamente ativos que são os valores $\leq 0,33$ ou ≥ 3 (Figura 19B).

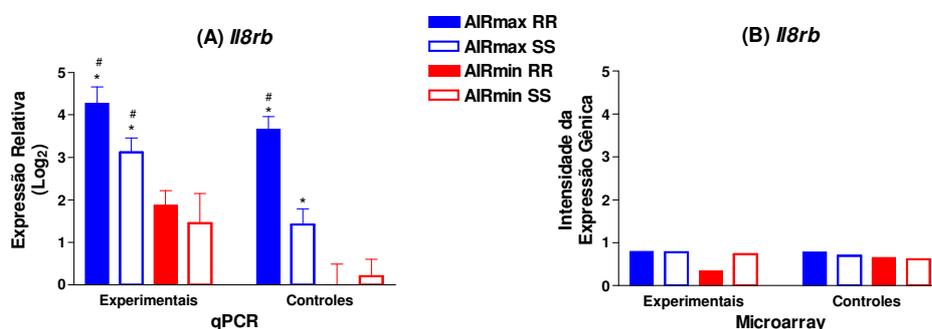


Figura 19: Análise da expressão gênica de *I18rb* por (A) qPCR e (B) *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles. Foram analisados 4 animais por grupo, porém a análise foi individual no qPCR e em *pool* no *Microarray*. Os resultados estão expressos em média e erro padrão. * Análise estatística entre o mesmo grupo. # Análise estatística entre o grupo experimental e controle.

4.8.9 Expressão do gene *Caspase 8*

Houve diferenças no número de transcritos observados entre a análise de expressão gênica global por *Microarray* e qPCR (**Figura 20**), onde na análise por *Microarray* foi observado um elevado número de transcritos entre todos os animais analisados, com uma maior expressão pelos animais AIRmax e AIRmin SS experimentais (**Figura 20B**), quando comparada à análise de expressão gênica relativa por qPCR, na qual o número de transcritos observados foram muito menores e variáveis entre o animais experimentais quando comparados aos controles (**Figura 20A**)

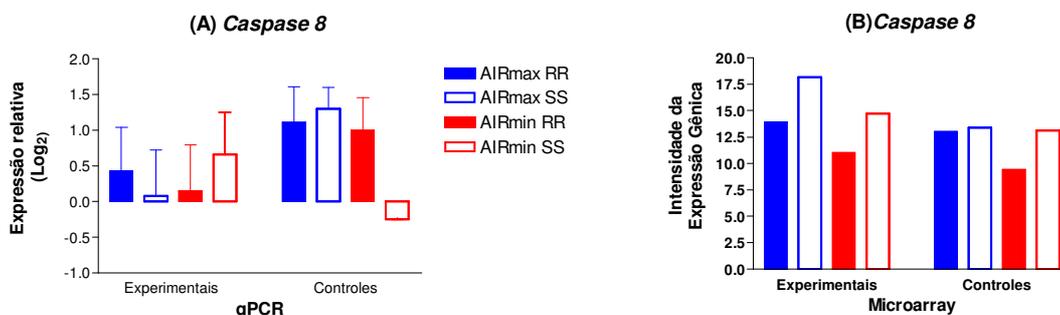


Figura 20: Análise da expressão gênica de *Caspase 8* por **(A)** qPCR e **(B)** *Microarray* em patas de animais AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS aos 180 dias de artrite induzida por pristane, e em seus respectivos controles. Foram analisados 4 animais por grupo, porém a análise foi individual no qPCR e em *pool* no *Microarray*. Os resultados estão expressos em média e erro padrão.

5 DISCUSSÃO

Estudos anteriores ao nosso demonstraram que a linhagem AIRmax é suscetível ao desenvolvimento de artrite induzida por pristane, enquanto a linhagem AIRmin é resistente (VIGAR et al., 2000), indicando que *loci* reguladores da resposta inflamatória aguda, acumulados e em homozigose durante o processo seletivo para a obtenção da Seleção de Inflamação, poderiam estar envolvidos no desenvolvimento de uma doença inflamatória crônica e auto-imune como a PIA.

Estudos posteriores demonstram a participação do gene *Slc11a1*, presente no cromossomo 1, no desenvolvimento de PIA, onde o alelo *S* deste gene favorece os fenótipos de incidência e gravidade de artrite experimental, enquanto o alelo *R* contribui para uma maior resistência e menor gravidade em animais AIRmax ou para a total resistência em animais AIRmin quando presente em homozigose (PETERS et al., 2007).

Análises de identificação de polimorfismos realizadas no cromossomo 1 indicam que a produção das sublinhagens, modificou somente a região onde está presente o gene *Slc11a1*, como pretendido com o início do processo de acasalamentos assistidos por genotipagem. Além disso, indicam a presença de um fundo genético altamente heterogêneo para *loci* não relacionados aos fenótipos de seleção.

Somente dois marcadores apresentaram desvio de frequência de alelos nas sublinhagens em relação aos parentais. Esta fixação diferencial poderia ser explicada pela diminuição da variabilidade genética nestes animais em decorrência do reduzido número de famílias necessárias para a realização dos acasalamentos assistidos por genotipagem, ou ainda pela ocorrência de eventos de recombinação que estariam favorecendo a fixação de alelos que não são tão freqüentes nesta população.

Além disso, as frequências gênicas foram observadas nas linhagens parentais da geração F37 de Inflamação, enquanto que os acasalamentos para a obtenção das sublinhagens foram iniciados a partir da geração F29 da Seleção de Inflamação, na qual não foi possível realizar esta análise, portanto, não sabemos se na geração F29 havia um desequilíbrio de frequência dos alelos da *Casp8* e *D1mit211* em relação à geração F37.

De qualquer maneira, nossos resultados permitem a delimitação de uma região de aproximadamente 5 cM acima e/ou abaixo do gene *Sc11a1*, na qual o gene *Slc11a1* ou algum outro ligado ou muito próximo a ele, estejam modulando o desenvolvimento de PIA nas sublinhagens.

Na busca de identificar os *loci* reguladores da resposta inflamatória aguda que também regulam o desenvolvimento de artrite induzida por pristane foram realizados os estudos de correlação nas sublinhagens da Seleção de Inflamação homozigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* e de co-segregação na população F2 obtida pelo intercruzamento entre as linhagens parentais AIRmax e AIRmin da Seleção de Inflamação.

Os resultados da análise de correlação indicaram que o marcador *D1Mit236* (25,7 cM) e o gene *Slc11a1* (39,2 cM) presentes no cromossomo 1, e o *D11Mit4* (37 cM) presente no cromossomo 11 obtiveram valores significativos de correlação com os fenótipos de incidência e gravidade de artrite induzida por pristane aos 180 dias e aos 150 dias para gravidade de artrite.

Interessantemente, os estudos de co-segregação sugerem a associação dos marcadores *D1Mit303* (34,8 cM) no cromossomo 1 e *D11Mit242* (31 cM) no cromossomo 11 com os fenótipos de incidência e gravidade de PIA aos 180 dias após a primeira injeção de pristane.

A fase tardia ou crônica da artrite induzida por pristane foi escolhida para os estudos de co-segregação, pelas evidências correlação entre marcadores e genes analisados nos cromossomos 1 e 11 com os fenótipos de PIA nas sublinhagens. Além disso, aos 180 dias da primeira injeção de pristane que são observadas as maiores diferenças fenotípicas de incidência e gravidade de artrite entre as sublinhagens.

Estes resultados reforçam a hipótese da existência de QTL de resposta inflamatória aguda regulando o processo de artrite induzida por pristane mesmo em uma fase crônica da resposta inflamatória.

Estas regiões que já foram implicadas como possíveis reguladoras da resposta inflamatória aguda (AIR) em vários estudos realizados no Laboratório de Imunogenética (RIBEIRO, 2003; BORREGO et al., 2006; PETERS et al., 2007; DE FRANCO et al.,

2008), e os principais genes candidatos no cromossomo 1 são como o *Cd28* (*Cd 28 antigen*), *Il8rb* (*interleukin 8 receptor, beta*), *Slc11a1* (*Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter) member 1*) e *Ctla4* (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*). E no cromossomo 11 compreendem os genes para fatores hematopoiéticos *Csf2* (*Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)*) e *Csf3* (*Colony stimulating factor 3 (granulocyte)*) o grupo de genes que codificam quimiocinas (*Chemokine (C-C motif) ligand – Ccl1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 16*) e citocinas (*Il3, Il4, Il5 e Il13*).

Estas regiões são de grande interesse, além da indicação da presença de QTL reguladores dos fenótipos de AIR e PIA em nosso modelo murino, são regiões que co-localizam com vários *loci* de reguladores de doenças auto-imunes em camundongos, ratos e seres humanos.

No cromossomo 1 existem os QTL relacionados aos modelos murinos de artrite induzida por colágeno (*Cia20* localizado a 44 cM) e por *Borrelia burgdorferi* (*Bbaa11* a 32.8 cM) (ROPER et al., 2001; ADARICHEV et al., 2003). Além da presença de QTL moduladores de lúpus eritematoso sistêmico (*Sle7* a 32.8 cM) e diabetes insulino-dependente (*Idd5* a 34.8 cM; *Idd5a* a 38.5 cM e *Idd5b* a 41 cM) (HILL et al., 2000).

Essas regiões são homólogas à região 33 localizada no braço curto do cromossomo 2 em seres humanos, onde está localizado o gene *CTLA4* (*Citotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) que é positivamente associado a doenças auto-imunes como a artrite reumatóide, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes do tipo I e tireoidite (SERRANO et al., 2006). Estudos de ligação também indicam que cromossomo 2 em humanos, mas na região 35 do braço curto deste cromossomo, está o gene *SLC11A1* que desempenha um papel na susceptibilidade a artrite reumatóide (SHAW et al., 1996; JOHN et al., 1997; SINGAL et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2002; AMOS et al., 2006; YEN et al., 2006).

No cromossomo 11, existem também QTL relacionados aos modelos murinos de artrite induzida por proteoglicanos (*Pgia7* a 42 cM) (OTTO et al., 1999; ADARICHEV et al., 2003); de lúpus eritematoso sistêmico (*Sle13* a 49 cM) e de encefalomielite experimental auto-imune (*Eae22* a 38 cM e *Eae7* a 48 cM) (KARLSSON et al., 2003).

Essas regiões são homólogas ao cromossomo 10 de ratos e ao cromossomo 17q22-q25 em humanos (BRENNER et al., 2006).

O *locus Cia27* localizado no cromossomo 10 de linhagens de ratos congênicos ACI.DA (*Cia27*) está envolvido com a severidade de artrite induzida por colágeno (CIA), além disso, esta região está implicada na susceptibilidade a artrite reumatóide em humanos e em outras doenças auto-imunes, como a esclerose múltipla e psoríase (BARTON et al., 2004; JAWAHEER et al., 2001; BRENNER et al., 2006).

Outros genes candidatos estão presentes nesta região, como o *Nos2* (*nitric oxide synthase2*) e o *Scya* (*small inducible cytokine*), localizados em QTL descritos para o modelo murino de *Leishmania major*, que também está envolvido com o fenótipo de hepatomegalia (VLADIMIROV et al., 2003). O gene *NOS2A*, localizado na região 11-12 do braço curto do cromossomo 17 em humanos, foi descrito em estudos de ligação como uma região cromossomal localizada fora do MHC e relacionada à susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças auto-imunes (SERRANO et al., 2006), e mais especificamente com artrite reumatóide (PASCUAL et al., 2002).

Os estudos de expressão gênica relativa por qPCR e global por *Microarray* foram realizados através de transcritos de DNA obtidos das patas dos animais experimentais (aos 180 dias da primeira injeção de pristane) e controles das sublinhagens da Seleção de Inflamação homozigotos para os alelos do gene *Slc11a1*. O objetivo desta etapa do trabalho foi identificar fenótipos parciais, como genes modulados na fase tardia ou crônica de PIA e a interação destes genes com o gene *Slc11a1* e/ou com a capacidade inflamatória das sublinhagens.

Através dos estudos de expressão gênica global por *Microarray* foi possível observar que a sublinhagem AIRmax SS, mais suscetível à PIA, possui um maior número de genes ativados e reprimidos, 255 e 270 respectivamente, quando comparada às demais sublinhagens, inclusive em relação aos AIRmax RR, que possuem 95 genes ativados e 26 reprimidos.

É importante lembrar que a obtenção dos genes modulados foi realizada através da relação entre os animais experimentais e controles, e que foram considerados

ativados e reprimidos os genes com intensidades de expressão iguais ou acima de 3 vezes, e iguais ou abaixo de 0,33 vezes, respectivamente.

Quando estes genes modulados foram agrupados em categorias funcionais, os animais AIRmax RR e SS tiveram seus genes ativados agrupados em categorias funcionais em comuns, como resposta inflamatória e quimiotaxia, que estão totalmente relacionadas com a alta capacidade inflamatória destes animais. Além disso, existem genes ativados comuns entre as duas sublinhagens, como: *Il1b*, *Cxcl1*, *Cxcl2* e *Cxcl13*.

Dos genes ativados e diferentes entre as duas sublinhagens e que estão agrupados nas categorias funcionais descritas acima, temos o gene *Ccl19* presente nos AIRmax RR, enquanto que nos AIRmax SS estão os genes *Ccl3*, *Ccl7*, *C3ar1*, *Il10*, *Tirap*, *Mefv*, *Ptx3*, *Chi3l3* e *Kras*.

As demais categorias funcionais sobre-representadas nos genes ativados dos animais AIRmax RR são resposta a substâncias químicas e resposta de defesa, que incluem os genes descritos acima, assim como: *Defb3*, *Cxcl5*, *Saa3*, *Ctf1* e *Tnfsf11*, e nos genes reprimidos foi o metabolismo de lipídeos com os genes *Ptgis*, *Cidea*, *Hmgcs2*, *Scd3*, *Sult1a1* e *Adh1*.

Nos AIRmax SS, as categoria sobre-representadas nos genes ativados são de resposta imune e resposta de cicatrização, que incluem os genes já descritos, assim como: *Stat3*, *Saa3*, *Oas2*, *Oasl1*, *Trem1*, *Trem3*, e *Tnfsf11*, e nos genes reprimidos foi a categoria funcional de diferenciação de epiderme, envolvendo os genes *Ktr1-17*, *Ktr2-18* e *Ovol1*.

Nos animais AIRmin RR e SS não foram formadas categorias funcionais sobre-representadas, devido ao pequeno número de genes modulados nestas sublinhagens.

Os resultados obtidos de expressão gênica global por *Microarray* foram validados através dos experimentos de expressão relativa utilizando o PCR em Tempo Real (qPCR) para confirmação dos resultados obtidos.

Nossos resultados indicam que as linhagens AIRmax RR e AIRmax SS possuem uma ativação em comum de genes relacionados à resposta inflamatória, quimiotaxia, assim como dos genes *Cxcl5*, *Saa3* e *Tnfsf11* agrupados em categoria funcionais distintas entre as duas sublinhagens.

Analisando cada gene ativado, sabe-se que o gene *Il1b* codifica a citocina pró-inflamatória IL-1 β , os genes *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl5* e *Cxcl13* que codificam para quimiocinas CXCL1, CXCL2 (também considerada a IL-8 murina) e CXCL5 que são fatores quimiotáticos de neutrófilos, enquanto que a quimiocina CXCL13 ou BCA-1 (*B cell-attracting chemokine-1*) está associada ao acúmulo de linfócitos e formação de tecido linfóide (PROUDFOOT, 2002; BUCKLEY, 2003; MANTOVANI et al., 2006; VILLIGER e MOLLER, 2006; KOBAYASHI, 2008; SMITH et al., 2008; VIOLA e LUSTER, 2008).

O gene *Saa3* codifica a proteína amilóide 3 do soro (*Serum amyloid A 3*), que faz parte da família das proteínas de fase aguda produzidas durante a resposta inflamatória aguda em resposta à citocinas pró-inflamatórias (UHLAR e WHITEHEAD, 1999; HE et al., 2003), mas que podem ser produzidas em outros locais como na articulação de pacientes com artrite reumatóide (CUNNANE et al., 2000; VALLON et al., 2001).

O gene *Tnfsf11* (*Tumor necrosis factor ligand superfamily, member 11*) codifica para a proteína RANKL (Receptor activator of nuclear factor NF- κ B ligand) que ligada ao receptor RANK (Receptor activator of NF- κ B) inicia a via de degradação óssea e a formação de osteoclastos (GRAVALLESE et al., 2000; SHIGEYAMA et al., 2000; PAPADOPOULI et al., 2008).

Inicialmente, podemos concluir que a alta capacidade inflamatória dos animais AIRmax, independente dos alelos do gene *Slc11a1*, determina a ativação de genes relacionados com a resposta inflamatória e quimiotaxia de neutrófilos mesmo em uma fase crônica e tardia de artrite induzida por pristane. Essa ativação provavelmente ocorre na tentativa de resolução desse processo, entretanto, genes relacionados aos fenótipos de seleção são ativados, o que poderia resultar no contínuo acúmulo e ativação de neutrófilos para o local da injúria. Ribeiro e colaboradores (2003) demonstraram o processo seletivo para a obtenção das linhagens AIRmax e AIRmin da Seleção de Inflamação, os neutrófilos são o principal tipo celular que compõem fenótipo de infiltrado celular inflamatório nos AIRmax, além de estarem em maior número em comparação ao infiltrado inflamatório dos AIRmin (RIBEIRO et al., 2003).

Associado a isso, estudos de expressão gênica relativa por qPCR demonstram a elevada e significativa expressão do gene *Il8rb* nos AIRmax RR e SS experimentais e controles, porém com uma maior ativação nos AIRmax RR de ambos grupos em relação aos AIRmax SS.

Este gene codifica para o receptor beta da IL-8, também conhecido como CXCR2, que se liga à CXCL2 e CXCL1. Este receptor está expresso constitutivamente em neutrófilos e células endoteliais pós-vasculares, mas pode ser encontrado em monócitos/macrófagos, linfócitos, queratinócitos e condrócitos. A expressão dessas quimiocinas também está associada aos processos de regeneração tecidual e angiogênese (ZHAO et al., 2004; KAGARI et al., 2007; SZEKANECZ e KOCH, 2007; MILATOVIC e RICHMOND, 2008).

Este receptor poderia favorecer um acúmulo de neutrófilos para o local da inflamação crônica. Análises de cortes histológicos de patas artríticas de animais AIRmax RR e SS aos 180 dias, no qual observa-se a presença de um grande infiltrado celular e erosão óssea, que é mais intenso de acordo com o grau de artrite da pata analisada (dados não publicados).

Na inflamação aguda ao Biogel foi observado que os AIRmax, mesmo após os cruzamentos assistidos por genotipagem para produção das sublinhagens da Seleção de Inflamação homozigotos para os alelos do gene *Slc11a1*, possuem uma alta capacidade inflamatória, entretanto, observa-se que existe um maior infiltrado de neutrófilos nos AIRmax RR 24 horas após o estímulo de Biogel (PETERS et al., 2007), que poderia estar relacionada à maior expressão de *Il8rb* pelos AIRmax RR em relação aos AIRmax SS

Vários trabalhos descrevem a importância dos neutrófilos no processo artrítico, no qual o acúmulo destas células no fluido sinovial e na interface entre a cartilagem e pannus conduz à degradação das proteínas da matriz extracelular, liberam intermediários reativos do oxigênio, proteases presentes nos grânulos, promovem a erosão articular e são mais resistentes à apoptose (WIPKE e ALLEN, 2001; LALLY et al., 2005; CROSS et al., 2006; FILER et al., 2006; PARSONAGE et al., 2008).

Recentemente, estudos demonstraram o CXCR2 humano e murino se liga ao fator de inibição de macrófagos (MIF - *Macrophage migration inhibitory factor*) mediando a migração *in vivo* de monócitos em um contexto de inflamação peritoneal e aterosclerose (BERNHAGEN et al., 2007; WEBER et al., 2008) e de artrite reumatóide (GREGORY et al., 2004). Além disso, outros estudos identificaram a expressão de RNAm para CXCR1 e CXCR2 no baço murino, que é constituído principalmente por linfócitos, em células T e B e em macrófagos (MOEPPS et al., 2006).

Com relação ao gene *Tnfsf11*, sabe-se que a inflamação crônica nas articulações modifica o processo fisiológico normal de formação e reabsorção óssea através da expressão de *RANKL* que induz a diferenciação de monócitos e macrófagos em osteoclastos, que são células responsáveis pelo remodelamento ósseo ao longo de toda a nossa vida. A grande quantidade de monócitos/macrófagos na membrana sinovial estimulados via RANK/RANKL, induz a diferenciação destas células em osteoclastos que realizam somente o processo reabsorção óssea. Portanto, a ativação excessiva dessas células causa um desequilíbrio que favorece a degradação dos ossos periarticulares durante processo de artrítico (TEITELBAUM, 2000; MCINNES e SCHETT, 2007; SCHETT, 2007; PAPADOPOULI et al., 2008).

Somados aos resultados de expressão gênica global por *Microarray*, foi observado nos AIRmax RR e SS experimentais a expressão elevada e significativa dos genes *Tnfa*, *Il1b* e a *Il6* através dos estudos de expressão gênica relativa por qPCR. Estes resultados corroboram os obtidos por *Microarray* e demonstram a expressão basal destes genes nos AIRmax RR e SS controles.

Estudos de expressão gênica global por *Microarray* realizado em células da medula óssea de animais da Seleção de Inflamação demonstram a expressão diferencial do gene *Il1b* nos animais controles da linhagem AIRmax (CARNEIRO et al., 2009). Em conjunto, esses resultados que indicam a alta capacidade inflamatória desta linhagem mesmo em condições normais.

O TNF- α , IL-1 β e IL-6 são citocinas intrinsecamente associadas à patogênese de artrite. De uma maneira geral, estão envolvidas na inflamação, diferenciação e proliferação de células B e T, produção de anticorpos, ativação de células endoteliais e

de osteoclastos, aumento da liberação de citocinas, hematopoese, produção de proteínas de fase aguda, entre outras funções. A produção destas citocinas está associada principalmente aos monócitos/macrófagos no tecido e líquido sinovial (ISHIHARA e HIRANO, 2002; CAMPBELL et al., 2003; DAYER, 2003; NISHIMOTO e KISHIMOTO, 2006; MCINNES e SCHETT, 2007; SZEKANECZ e KOCH, 2007).

Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por Patten e colaboradores (2004) que identificaram nas patas de linhagens DBA/1 níveis elevados de RNAm para TNF- α , IL-1 β e IL-6 aos 70 e 180 dias após a primeira injeção de pristane, considerados pelo autor como períodos de instalação e de fase tardia da artrite induzida por pristane (PATTEN et al., 2004).

A elevada expressão de *Il6* e *Cxcl13* observada nestes animais poderia atuar na diferenciação de células B e na migração destas células para as articulações artríticas, respectivamente (ISHIARA e HIRANO, 2002; MCINNES e SCHETT, 2007).

O acúmulo de células B durante o processo artrítico está relacionado à produção de auto-anticorpos, na apresentação de antígenos às células T, produção de citocinas como a IL-10 e na manutenção das estruturas linfóides ectópicas (O'NEILL et al., 2005; MAURI e EHRENSTEIN, 2007).

Além disso, os animais AIRmax RR também possuem o gene *Ccl19* ativado, que juntamente com *Cxcl13*, podem codificar as quimiocinas CCL19 e CXCL13. Estudos descrevem que a expressão de CCL19, CXCL13 e CCL21 está envolvida na ontogenia dos órgãos e tecidos linfóides, pois estas quimiocinas são fatores quimiotáticos para células T virgens, células B, células Th foliculares e células dendríticas, que em estados inflamatórios crônicos como na artrite pode conduzir à formação de estruturas linfóides ectópicas com áreas organizadas de células T e B (BUCKLEY, 2003; MANTOVANI et al., 2006; BRENNAN e MCINNES, 2008; VIOLA e LUSTER, 2008).

Os demais genes estão ativados somente nos AIRmax SS são: *Ccl3*, *Ccl7*, *C3ar1*, *Il10*, *Stat3*, *Tirap*, *Trem 1*, *Trem 3*, *Mefv*, *Ptx3*, *Chi3l3* e *Kras*, indicando a interação do alelo *S* do gene *Slc11a1* com os QTL de resposta inflamatória aguda atuando na modulação destes genes.

Analisando cada um deles, temos genes relacionados à produção das quimiocinas CCL3 (ou MIP1 α – *Macrophage inflammatory protein-1 alpha*) e CCL7 (ou MCP3 – *Monocyte chemoattractant protein-3*), que atuam principalmente no recrutamento de monócitos para o local da injúria (MANTOVANI et al., 2006; VIOLA e LUSTER, 2008). O gene *C3ar1*, codifica para o receptor acoplado a uma proteína G de membrana (C3aR) presente em células apresentadoras de antígenos (APCs - *Antigen-presenting cells*), que ao se ligar ao fragmento C3a do complemento possuem uma capacidade aumentada de estimular as células T, fornecendo sinais co-estimulatórios e de sobrevivência às células T CD4⁺ (LI et al., 2008; STRAINIC et al., 2008)

O gene *Il10* codifica para a citocina IL-10, que é uma potente citocina imunossupressora e antiinflamatória (MOORE et al., 2001; MCINNES e SCHETT, 2007), enquanto o gene *Tirap* codifica para a proteína adaptadora que contém o domínio TIR (*Toll-interleukin1 receptor*), também chamada de MAL, que está envolvida na transdução de sinal através dos receptores TLR2 e TLR4 (O'NEILL e BOWIE, 2007). O gene *Ptx3* que codifica as proteínas longas chamadas de pentraxinas, que são receptores solúveis de reconhecimento padrão (PRRs - *soluble pattern recognition receptors*), atuam como proteínas de fase aguda e opsoninas que são liberadas pelas células teciduais residentes e da resposta imune inata, em resposta a sinais inflamatórios e patógenos (MANTOVANI et al., 2007; BOTTAZZI et al., 2009).

Os genes *Trem1* e *Trem3* codificam receptores do tipo imunoglobulina TREM1 e TREM3 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 1, 3), respectivamente, expressos em neutrófilos e monócitos/macrófagos, que uma vez ativados em resposta a produtos microbianos, como o LPS, induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias (CHUNG et al., 2002; GIBOT et al., 2004; ZENG et al., 2007).

O gene *Kras* (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) é um dos candidatos aos *locus Pas1* que está relacionado ao desenvolvimento espontâneo e quimicamente induzido de câncer de pulmão (MANENTI e DRAGANI et al., 2005; TO et al., 2006; MANENTI et al., 2008; WONG et al., 2008), enquanto o gene *Chi3l3* (*Chitinase 3-like 3*) codifica proteínas do tipo lectina presentes nos grânulos de neutrófilos (HARBORD et al., 2002). O gene *Mefv* está envolvido no desenvolvimento

da *Familial Mediterranean fever* (FMF) que é uma desordem inflamatória autossômica recessiva, que também envolve o aparecimento de artrite (KAVUCKU et al., 2009).

Podemos concluir, através do perfil gênico descrito nos AIRmax SS, que estes animais possuem uma resposta inflamatória crônica exacerbada em relação aos AIRmax RR, e que esta ativação está relacionada ao alelo *S* do gene *Slc11a1*, que determina a ativação de genes relacionados: ao recrutamento de monócitos (*Ccl3* e *Ccl7*) para a articulação, de ativação de monócitos/macrófagos, neutrófilos, células T CD4⁺ na articulação e de regulação da resposta imune através da produção de IL-10.

Ao mesmo tempo, a ativação dos genes *Ptx3*, *C3ar*, *Tirap*, *Trem1* e *Trem3* parecem estar mais relacionados à ativação das células que expressam o gene defeituoso *Slc11a1*, talvez para compensar a falta dessa proteína presente, por exemplo, no fagolisossomo dos macrófagos. Nos animais que possuem o gene defeituoso, não ocorre a expressão da proteína *Slc11a1* no fagolisossomo, havendo o comprometimento das funções efetoras dos macrófagos, como a produção de IFN- γ , óxido nítrico, TNF- α , IL-1 β e expressão de moléculas de classe II do MHC (KITA et al., 1992; RAMARATHINAN et al., 1993; BARTON et al., 1995; CANONNE-HERGAUUX et al., 1999; WOJCIECHOWSKI et al., 1999; LALMANACH et al., 2001; FRITSCHÉ et al., 2003; OEXLE et al., 2003; FORTIER et al., 2005; AWOMOYI, 2007).

Nossos estudos de expressão gênica ainda são iniciais, mas a ativação destes genes somada a outros poderia levar a uma ativação exacerbada dos macrófagos na articulação, além do contínuo recrutamento de monócitos para esse local, o que poderia favorecer o processo artrítico como observado nos AIRmax SS.

Entretanto, os monócitos/macrófagos não são as únicas células presentes e responsáveis pela destruição da articulação durante o processo artrítico, mas com certeza desempenham funções importantes, por estarem presentes em grande número na membrana sinovial e na junção pannus-cartilagem, pela produção de citocinas (Ex: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-18) quimiocinas (Ex: IL-8, MIF), fatores de crescimento (Ex: GM-CSF, VEGF), metaloproteases (MMP9, MMP12) proteínas de fase aguda (Ex: SAA, CRP), entre outras características, que contribuem para a inflamação

e destruição articular na fase aguda e crônica da artrite reumatóide (KINNE et al., 2006; SZEKANECZ e KOCH, 2007).

Um resultado muito interessante é a elevada expressão de *Il10* nas patas dos animais AIRmax SS, que foi confirmada pelas análises por qPCR, que demonstram a expressão basal deste gene nos controles. Esses resultados indicam a modulação da *Il10* pelo alelo *S* do gene *Slc11a1*.

Corroborando nossos resultados, estudos realizados em humanos e camundongos demonstram que macrófagos que possuem o gene *Slc11a1* não funcional expressam níveis elevados de RNAm para IL-10 em resposta à infecção por *Salmonella Typhimurium* (PIE et al., 1996), secretam elevados níveis de IL-10 após o estímulo *in vitro* com a proteína purificada de *Mycobacterium tuberculosis* (ROJAS et al., 1999), e indicam a possível associação do alelo 2 do gene *SLC11A1* com a produção de IL-10 em humanos determinando a susceptibilidade à tuberculose (AWOMOYI et al., 2002).

Fritsche e colaboradores (2008), por sua vez realizaram estudos *in vitro* que também demonstram a inversa associação entre a funcionalidade do gene *Slc11a1* e a produção de IL-10, pois observaram que linhagens de macrófagos murinos que expressavam o gene *Slc11a1* não funcional produziam os transcritos e a proteína IL-10, que esta produção é resultante da sinalização através da via JAK/STAT, utilizando o fator de transcrição STAT3 (FRITSCHE et al., 2008).

A IL-10 que está envolvida na inativação de macrófagos e células dendríticas, na inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de moléculas co-estimulatórias e do MHC de classe II (MOORE et al., 2001; DING et al., 1993; FIORENTINO et al., 1991). Entretanto, os mecanismos que conduzem à produção desta citocina não são exclusivos das células do tipo Th2, são comuns em diferentes tipos celulares, como células B, macrófagos, células dendríticas, células Th1, Th17 e T regulatórias (Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺) (UHLIG et al., 2006; KAMANAKA et al., 2007; O'GARRA e VIEIRA, 2007).

Apesar da IL-10 ser conhecida como um potente inibidor da síntese de citocinas pró-inflamatórias por monócitos/macrófagos e células T (MOORE et al., 2001), alguns

estudos recentes sugerem que a IL-10 atua como uma citocina pró-inflamatória na articulação de pacientes com artrite reumatóide (MCINNES, 2005; ANTONIV e IVASHKIV, 2006; TAKASUGI et al., 2006).

Antoniv elvashkiv (2006) analisaram o perfil de expressão gênica dependente de IL-10 em tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (AR) e observaram que o estímulo com IL-10 aumenta preferencialmente a expressão de genes dependentes de IFN- γ (ANTONIV e IVASHKIV, 2006). O mecanismo que explicaria esta expressão preferencial está relacionado à ativação do fator de transcrição STAT1, relacionado à produção de IFN- γ pelas células Th1 (SHARIF et al., 2004; HERRERO et al., 2003).

Neste trabalho, os macrófagos sinoviais respondem ao estímulo de IL-10 com a ativação de IFN- γ , que poderia explicar os casos clínicos de ineficácia dos efeitos antiinflamatórios no tratamento com IL-10 em pacientes com artrite reumatóide (ANTONIV e IVASHKIV, 2006; GERGELY et al., 2002; LI et al., 1997; MONGAN et al., 1997).

O'Garra e Vieira (2007) descrevem que a produção de IL-10 durante a resposta imune do tipo Th1 está envolvida no controle da inflamação reduzindo a imunopatologia, entretanto, ainda não se sabe se a produção de IL-10 pela células Th1 representa o término da diferenciação das células Th1 secretoras de IFN γ , ou se existem células produtoras tanto de IFN γ e IL-10 (O'GARRA e VIEIRA, 2007).

Alguns trabalhos descrevem também a presença de RNAm para TNF- α , IL-1 β , IL-17 e IL-10 na membrana sinovial como prognóstico de progressão de artrite reumatóide (KIRKHAM et al., 2006), correlacionando com a expressão de IL-23p19 e a produção de IL-23 e IL-17 em fibroblastos sinoviais durante a AR (KIM et al., 2006).

Entretanto, nos modelos murinos de artrite a administração de IL-10 diminuiu o inchaço da articulação, o infiltrado celular, a produção de citocinas e a destruição da cartilagem (ASADULLAH et al., 2003; KEYSTONE et al., 1998).

Em nossos modelo, a expressão aumentada da IL-10 nos animais artríticos AIRmax SS poderia estar correlacionada ao efeito pró-inflamatório da IL-10, o que explicaria a maior susceptibilidade destes animais para os fenótipos de incidência e gravidade de artrite quando comparados aos AIRmax RR, entretanto, é provável que a

ativação de *Il10* somada à ativação de *Stat3*, tenha a função imunossupressora e antiinflamatória, porém que não é suficiente para controlar o processo inflamatório crônico instalado nas patas dos AIRmax SS.

As categoria funcionais sobre-representadas nos genes reprimidos nos AIRmax RR e AIRmax SS são: diferenciação da epiderme e metabolismo de lipídeos, respectivamente.

Vários outros genes foram analisados por qPCR, que foram selecionados por codificarem citocinas envolvidas no processo de artrite, como a *Il6*, *Il1b*, *Tnfa*, *Il18*, *Il1a*, *Il12a*, *Il12b*, *Ifng*, *Tgfb*, ou por serem genes próximos ao *Slc11a1*, como a *Caspase 8* e o *Il8rb*, ou por estarem localizados no cromossomo 11, como *Csf2*, *Il3*, *Il4*, *Il5* e *Il13*, onde existem indicações da existência de QTL reguladores da resposta inflamatória aguda. Para alguns dos genes analisados não foi a presença de transcritos, como *Ifng*, *Tgfb*, *Il1a*, *Il12b*, *Il3*, *Il4*, *Il5* e *Il13*. E para outros, como *Il18*, *Il2a*, *Csf2*, *Caspase 8* não foram observadas diferenças entre as sublinhagens.

Em conclusão, através dos nossos estudos de expressão gênica relativa por qPCR e global por *Microarray*, identificamos alguns genes modulados nos animais AIRmax RR e SS que co-localizam com as regiões mapeadas nos cromossomos 1 e 11 através dos estudos de correlação e co-segregação. No cromossomo 1 estão presentes os genes *Il10* (69,9 cM) e *Chi3l3* (50,5 cM) e no cromossomo 11 estão os genes *Ccl3* (47,6 cM) *Ccl7* (46,5 cM) e *Stat3* (60,5 cM).

Os estudos de interação de loci e seus respectivos genes na determinação de artrite em modelos experimentais possibilitam o direcionamento de pesquisas clínicas para novas abordagens terapêuticas e descobertas de biomarcadores de diagnóstico e progressão da doença.

6 CONCLUSÕES

- As análises da frequências gênicas realizadas no cromossomo 1 indicam que somente a região próxima ao gene *Slc11a1* foi herdada em homozigose na realização dos acasalamentos assistidos por genotipagem para a produção das sublinhagens AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR e AIRmin SS.
- Os estudos de associação indicam a presença de duas regiões reguladoras da resposta inflamatória aguda moduladores de artrite induzida por pristane, localizadas nos cromossomos 1 e 11, respectivamente.
- No cromossomo 1 essa região está localizada próximo ao gene *Slc11a1*, marcada pelo *D1Mit236* (25, 7 cM) , *D1Mit303* (30, 1 cM) e pelo próprio *Slc11a1* (39,2 cM), e no cromossomo 11 essa região está localizada próximo ao grupo de genes que codificam para citocinas e quimiocinas, marcado pelos marcadores *D11Mt242* (31 cM) e pelo *D11Mit4* (37 cM).
- As análises de expressão gênica global por *Microarray* demonstraram que as sublinhagens AIRmax, independente do genótipo do gene *Slc11a1*, possuem uma ativação em comum de genes relacionados à resposta inflamatória e quimiotaxia.
- Os estudos de expressão gênica global por *Microarray* foram validados através dos experimentos de expressão relativa utilizando o PCR em Tempo Real.
- O alelo *S* do gene *Slc11a1* modula a expressão gênica nos AIRmax SS, ativando genes nestes animais que poderiam contribuir para a maior suscetibilidade dessa sublinhagem em relação aos AIRmax RR.
- Alguns dos genes modulados obtidos através dos estudos de expressão gênica nos animais AIRmax RR e SS co-localizam com as regiões mapeadas nos cromossomos 1 e 11 através dos estudos de associação.

REFERÊNCIAS¹

- ABIOLA, O. et al. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. **Nat. Rev. Genetics**, v.4, p.911-916, 2003.
- ADARICHEV, V. A. et al. Sex effect on clinical and immunologic quantitative trait loci in a murine model of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.48, p.1708-1720, 2003.
- AMOS, C. I. et al. High-density SNP analysis of 642 caucasian families with rheumatoid arthritis identifies two new linkage regions on 11,12 and 2p33. **Genes Immun.**, v.7, p.277-286, 2006.
- ANDREAKOS, E. T. et al. Cytokines and anti-cytokines biological in autoimmunity: present and future. **Cytok. Growth Fact. Rev.**, v.13, p.299-313, 2002.
- ANDREAKOS, E. T. et al. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? **Immunol. Rev.**, v.202, p.250-265, 2004.
- ARAÚJO, L. M. M. et al. Innate resistance to infections by intracellular bacteria differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reactivity. **Eur. J. Immunol.**, v.28, p.2913-2920, 1998.
- ATKINSON, P. G.; BARTON, C. H. High level expression of Nramp1G169 in RAW264.7 cell transfectants: analysis of intracellular iron transport. **Immunology**, v.96, p.656-662, 1999.
- AWOMOYI, A. A. The human solute carrier family 11 member 1 protein (SLC11A1): linking infections, autoimmunity and cancer? **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.49, p.324-329, 2007.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **J. Intern. Med.**, v.250, p.91-104, 2001.
- BARNETCHE, T. et al. Strategies in analysis of the genetic component of multifactorial diseases; biostatistical aspects. **Transplant. Immunol.**, v.14, p.255-266, 2005.
- BARTON, C. H. et al. Nramp transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. **Mol. Med.**, v.1, p.267-279, 1995.
- BARTON, A. et al. Haplotype analysis in simplex families and novel analytic approaches in a case-control cohort reveal no evidence of association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.50, p.748-752, 2004.
- BEDWELL, A. E. et al. Immunological involvement in the pathogenesis of pristane-induced arthritis. **Scand. J. Immunol.**, v.25, p.393-398, 1987.

¹ De acordo com:

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

- BERNHAGEN, J. et al. MIF is a noncognate ligante of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. **Nat. Med.**, v.13, p.587-596, 2007.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol. Immunol.**, v.40, p.845-859, 2004.
- BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J. Leukoc. Biol.**, v.81, p.1-5, 2007.
- BIOZZI, G. et al. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v.19, p.337-346, 1998.
- BLACKWELL, J. M. et al. Understanding the multiple functions of Nramp1. **Microbes Infect.**, v.2, p.317-321, 2000.
- BLACKWELL, J.M. et al. Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. **Mol. Med.**, v.1, p.194-205, 1995.
- BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.111, p.460-475, 2003.
- BORREGAARD, N. et al. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends Immunol.**, v.28, n.8, p.340-345, 2007.
- BORREGO, A. et al. Genetic determinants of acute inflammation regulate Salmonella infection and modulate Slc11a1 gene (formerly Nramp1) effects in selected mouse lines. **Microbes Infect.**, v.8, n.12-13, p.2766-71, 2006.
- BORZI, R. M. et al Chemokines in cartilage degradation. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 427, p. S53-61, 2004.
- BOTTAZZI, B. et al. The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral patternrecognition receptor : interplay with cellular innate immunity. **Immunol. Rev.**, v.227, p.9-18, 2009.
- BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.**, v.118, p.3537-3545, 2008.
- BRENNER, M. et al. Cia 27 is a novel non-MHC arthrtis severity locus on chromosome 10 syntenic to the rheumatoid arthritis 17q22-q25 locus. **Genes Immun.**, p.1-7, 2006.
- BUCKLEY, C. D. et al. 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.
- BUCKLEY, C. D. Why do leukocytes accumulate within chronically inflamed joints? **Rheumatology**, v.42, p.1433-1444, 2003b.

- CALVANO, S. E. et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. **Nature**, v.437, p.1032-1037, 2005.
- CAMPBELL, I. K. et al. Molecular targets in immune mediated diseases: the case of tumor necrosis factor and rheumatoid arthritis. **Immunol. Cell Biol.**, v.83, p.354-66, 2003.
- CAMPBELL, J. J.; BUTCHER, E. C. Chemokines in tissue-specific and microenvironment specific lymphocyte homing. **Curr. Opin. Immunol.**, v.12, p.336-341, 2000.
- CANONNE-HERGAUX, F. et al. Expression and subcellular localization of NRAMP1 in human neutrophil granules. **Blood**, v.100, p.268-275, 2002.
- CARNEIRO, A. S. et al. Local inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, v.40, p.1571-1579, 2002.
- CELLIER, M. et al. Nramp defines a family of membrane proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, n.22, p.10089-10093, 1995.
- COSTENBADER, K. H. et al. Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. **Am. J. Med.**, v.119, p.503.e1-503.e9, 2006.
- CROSS, A. et al. Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, p. 521-528, 2006.
- CUNNANE, G. et al. Serum amyloid A in the assessment of early inflammatory arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 27, p. 58-63, 2000.
- DARVASI, A. The effect of selective genotyping on QTL mapping accuracy. **Mamm. Genome**, v.8, p.67-68, 1997.
- DARVASI, A.; SOLLER, M. Advanced intercross lines, an experimental population for genetic mapping. **Genetics**, v.141, p.1199-1207, 1995.
- DAYER, J. M. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v.42, p.113-120, 2003.
- DE FILLIPIS, D. D. et al. Cannabinomimetic control of mast cell mediator release: new perspective in chronic inflammation. **J. Neuroendocrinol.**, v.20, n.1, p.20-25, 2008.
- DE FRANCO, M. et al. Slc11a1 (Nramp1) alleles Interact with acute inflammation loci to modulate wound-healing traits in mice. **Mamm. Genome**, v.18, p.263-269, 2007.
- DE SOUZA, V. R. C. **Análise de polimorfismo de regiões cromossômicas envolvidas na resistência/susceptibilidade à indução de tumores de pele em linhagens de camundongos selecionados segundo a reatividade inflamatória aguda.** Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

- DE SOUZA, V. R. C. et al. Aryl receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. **Int. J. Cancer**, v.124, n.6, p.1478-1482, 2008.
- DEIGHTON, C. M. et al. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. **Clin. Genet.**, v.36, p.178-182, 1989.
- DI PACE, R. F. et al. Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse selected based on acute inflammatory responsiveness. **Carcinogenesis**, v.27, p.1517-1525, 2006.
- DIETRICH, W. F. et al. A comprehensive genetic map of the mouse genome. **Nature**, v.14, n.380, p.149-152, 1996.
- DIETRICH, W. F. et al. A genetic map of the mouse with 4.006 simple sequence length polymorphisms. **Nat. Genetics**, v.4, n.2, p.220-225, 1994.
- DINARELLO, C. A. Blocking IL-1 in systemic inflammation. **JEM**, v.201, n.9, p.1355-1359, 2005.
- DOSTERT, C. et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science**, v.320, p.674-677, 2008.
- EGAN, K.; FITZGERALD, G. A. Eicosanoids and the vascular endothelium. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v.176, p.189-211, 2006.
- EHRENSTEIN, M. R. et al., Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. **J. Exp. Med.**, v.200, p.277-285, 2004.
- FAUVE, R. M. et al. Maintenance of granuloma macrophages in serum-free medium. **J. Immunol. Methods**, v.64, p.345, 1983.
- FILER, A. et al. Differential survival of leukocyte subsets mediated by synovial, bone marrow and skin fibroblasts. **Arthritis Rheum.**, v. 54, n. 7, p. 2096-2108, 2006.
- FINK, A. L. Chaperone-mediated protein folding. **Physiol. Rev.**, v.79, p.425-449, 1999.
- FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v.423, p.356-361, 2003.
- FORTIER, A. et al. Single gene effects in mouse models of host: pathogen interactions. **J. Leukoc. Biol.**, v.77, p.868-877, 2005.
- FRITSCHÉ, G. et al. Nramp1 functionality increases inducible nitric oxide synthase transcription via stimulation of IFN regulatory factor 1 expression. **J. Immunol.**, v.171, p.1994-1998, 2003.
- FRITSCHÉ, G. et al. Nramp1 functionality increases inducible nitric oxide synthase transcription via stimulation of IFN regulatory factor 1 expression. **J. Immunol.**, v.171, p.1994-1998, 2003.
- GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Res. Ther.**, v.8, n.S2, p.1-6, 2006.

- GAILANI, D.; RENNÉ, T. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.27, n.10, p.2507-2513, 2007.
- GIULIETTI, A. et al. An overview of Real-Time quantitative PCR Applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v.25, p.386-401, 2001.
- GOMES, S. M.; APPELBERG, R. Evidence for a link between iron metabolism and Nramp1 gene function in innate resistance against Mycobacterium avium. **Immunology**, v.95, p.165-168, 1998.
- GOSWAMI, T. Natural-resistance associated macrophage protein 1 is a H⁺/bivalent cation antiporter. **Biochem. J.**, v.354, p.511-519, 2001.
- GRAHAM, A. M. et al. Identification of novel alleles at a polymorphic microsatellite repeat region in the human NRAMP1 gene promoter: analysis of allele frequencies in primary biliary cirrhosis. **J. Med. Genet.**, v.37, p.150-152, 2000.
- GRAVALLESE, E. M.; MANNING, C.; TSAY, A.; NAITO, A.; PAN, C.; AMENTO, E.; GOLDRING, S. R. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. **Arthritis Rheum.**, v. 43, p. 250-258, 2000.
- GREGERSEN, P. K. et al. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.30, p.1205-1213, 1987.
- GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Genetics of autoimmune diseases – disorders of immune homeostasis. **Nat. Rev. Genet.**, v.7, p.917-928.
- GREGORY, J.L. et al. Reduced leukocyte-endothelial cell interactions in the inflamed microcirculation of macrophage migration inhibitory factor-deficient mice. **Arthritis Rheum.**, v.50, p.3023–3034, 2004.
- GROS, P. et al. Complement driven by conformation changes. **Nat. Rev. Immunol.**, v.8, n.1, p.48-58, 2008.
- GRUENHEID, S. et al. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. **J. Exp. Med.**, v.185, p.717-730, 1997.
- HARBORD, M. et al. Ym1 is a neutrophil granule protein that crystallizes in p47^{phox}-deficient mice. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.5468-5475, 2002.
- HE, R.; SANG, H.; YE, R. D. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. **Blood**, v. 101, n. 4, p. 1572-1581, 2003.
- HERODIN, F. et al. Inflammation sous-cutanée induite chez la souris par le polyacrylamide. **Ann. Immunol.**, v.134C, p.401-410, 1983.
- HESSE, M. et al. Protective major histocompatibility complex genes and the role of interleukin-4 in collagen-induced arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v.26, p.3234-3237, 1996.

- HOEBE, K. et al. The interface between innate and adaptive immunity. **Nat. Immunol.**, v.5, p.971-974, 2004.
- HOPKINS, S. J. et al., Pristane-induced arthritis in BALB/c mice: I. Clinical and histological features of the arthropathy. **Rheumatol. Int.**, v.5, p.21-30, 1987.
- IBAÑEZ, O. M. et al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v.22, p. 2555-2563, 1992.
- IRIGOYEN, P. et al. Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: contrasting effects of HLA-DR3 and the shared epitope alleles. **Arthritis Rheum.**, v.52, p.3813-3818, 2005.
- ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. **Cytokine Growth Fact. Rev.**, v.13, v.357-368, 2002.
- ISHII, S.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. **Prog. Lipid Res.**, v.39, p.41-82, 2000.
- JAWAHEER, D. et al. A genome wide screen in a multiplex rheumatoid arthritis families suggests genetic overlap with other autoimmune diseases. **Am. J. Hum. Genet.**, v.68, p.927-936, 2001.
- JIRHOLT, J. et al. The genetics of rheumatoid arthritis and the need for animal models to find and understand the underlying genes. **Arthritis Res.**, v.3, p.87-97, 2001.
- JOE, B.; WILDER, R. L. Animal models of rheumatoid arthritis. **Mol. Med. Today**, v.5, p., 1999.
- JOHN, S. et al. Linkage and association studies of the natural resistance associated macrophage protein-1 (Nramp1) locus in rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v.24, p.452-457, 1997.
- KAGARI, T. et al. 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.
- KANNAN, K. et al. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. **Pathophysiology**, v.12, p.167-181, 2006.
- KARLSSON, J. et al. Novel quantitative trait loci controlling development of experimental autoimmune encephalomyelitis and proportion of lymphocyte subpopulations. **J. Immunol.**, v.170, p.1019-1026, 2003.
- KAUFMANN, S. H. Heat shock proteins and the immune response. **Immunol. Today**, v.11, p.129-136, 1990.
- KITA, E. et al. Contribution of interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of lty r mice. **J. Leukoc. Biol.**, v.51, p.244-250, 1992.

- KLARESKOG, L. et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. **Arthritis Rheum.**, v.54, p.38-46, 2006.
- KLARESKOG, L. et al. Antibodies to citrullinated proteins in arthritis: pathology and promise. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v.20, p.300-305, 2008.
- KLARESKOG, L. et al. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v.19, p.49-54, 2007.
- KNEDLA, A. et al., Developments in the synovial biology field 2006. **Arthritis Res. Ther.**, v.9, n.2, p.209-216, 2007.
- KOJIMA, Y. et al. Inflammatory bowel disease is associated with a novel promoter polymorphism of natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene. **Tissue Antigens**, v.58, p.379-384, 2001.
- KRUPICZOJC, M. A. et al. Coagulation signaling following tissue injury: focus on the role of factor Xa. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.40, p.1228-1237, 2008.
- KUHN, D. E. et al. Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1Gly169 or Nramp1Asp169. **J. Leukoc. Biol.**, v.66, p.113-119, 1999.
- KUHN, D.E. et al. Iron transport into mycobacterium avium-containing phagosomes from an Nramp1(Gly169)-transfected RAW264.7 macrophage cell line. **J. Leukoc. Biol.**, v.69, p.43-49, 2001.
- KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. **Robbins Basic Pathology**. 7. ed. Philadelphia Sauders: Hardcover, 2003.
- LALLY, F. et al. A novel mechanism of neutrophil recruitment in a coculture model of the rheumatoid synovium. **Arthritis Rheum.**, v. 52, n. 11, p. 3460-3469, 2005.
- LALMANACH, A. C. et al. Effect of the mouse Nramp1 genotype on the expression of IFN-gamma gene in early response to Salmonella infection. **Microbes Infect.**, v.3, p.639-644, 2001.
- LAM-YUK-TSEUNG, S.; GROS, P. Genetic control of susceptibility to bacterial infections in mouse models. **Cel. Microbiol.**, v.5, p.299-313, 2003.
- LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RLFP linkage maps. **Genetics**, v.121, p.185-189, 1989.
- LAWRENCE, T. et al. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v.2, n.10, p.787-795, 2002.
- LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int. J. Exp. Pathol.**, v.88, n.2, p.85-94, 2007.

- LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade update. **Nat. Rev. Immunol.**, v.7, p.678-689, 2007.
- LEY, K. The role of selectins in inflammation and disease. **Trends Mol. Med.**, v.9, p.263-268, 2003.
- LI, K. et al. Cyclic AMP plays a critical role in C3a-receptor-mediated regulation of dendritic cells in antigen uptake and T-cell stimulation. **Blood**, v.15, p.5084-5094, 2008.
- 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.
- LUSTER, A. D. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.**, v.338, p.436-445, 1998.
- LYBBY, P. Inflammatory mechanisms: The molecular basis of inflammation and disease. **Nutr. Rev.**, v.65, n.12, p.140-146, 2007.
- MACKMAN, N. et al., Role of extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.27, n.6, p.1687-1693, 2007.
- MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, tissues, and disease principles of general pathology**. 2. ed. Oxford: Oxford Univ. Press, 2004.
- MALO, D.; SKAMENE, E. Genetic control of host resistance to infection. **Trends Genet.**, v.10, p.365-371, 1994.
- MANENTI, G. Cis-acting genomic elements of the Pas1 locus control Kras mutability in lung tumors. **Oncogene**, p.1-6, 2008.
- MANLY, K. F.; OLSON, J. M. Overview of QTL mapping software and introduction to map manager QT. **Mamm. Genome**, v.10, n.4, p.327-334, 1999.
- MANLY, K.F.; CUDMOMORE, R.H.; MEER, J.M. Map manager QTL cross-platform software for genetic mapping. **Mamm. Genome**, v.12, n.12, p.930-932, 2001.
- MANTOVANI, A. et al. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. **J. Clin. Immunol.**, v.28, p.1-13, 2008.
- MANTOVANI, A. et al. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. **Nat. Rev. Immunol.**, v.6, p.907-918, 2006.
- MARIA, D.A. et al. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. **Oncogene**, v.22, p.426-432, 2003.
- MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v.440, p.228-232, 2006.

- MCINNES, I. B.; LIEW, F. Y. Cytokine networks-towards new therapies for rheumatoid arthritis. **Nat. Clin. Practice Rheumatol.**, v.1, n.1, p.31-39, 2005.
- MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Immunol.**, v.7, p.429-442, 2007.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, n.24, p.428-435, 2008.
- MERZ, D. et al. IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene alpha/CXCL1 induce chondrocyte hypertrophic differentiation. **J. Immunol.**, v. 171, p. 4406-4415, 2003.
- MOLLER, B.; VILLIGER, P. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF α in immune-mediated inflammatory diseases. **Spring Semin. Immunol.**, v.27, p.391-408, 2006.
- MOORE, K. J.; NAGLE, D.L. Complex trait analysis in the mouse: the strengths, the limitations and the promise yet to come. **Annu. Rev. Genet.**, v.34, p.653-686, 2000.
- MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v.19, p.683-765, 2001.
- MORIMOTO, R. I.; SANTORO, M. G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. **Nat. Biotechnol.**, v.16, p.833-838, 1998.
- MÜLLER-LADNER, U. et al. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: Synovial fibroblasts. **Arthritis Res. Ther.**, v.9, n.6, p.223-233, 2007.
- MURPHY, P. M. et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacol. Rev.**, v.52, p.145-176, 2000.
- NADKARNI, S. et al., Anti-TNF α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF β . **J. Exp. Med.**, v.204, p.33-39, 2007.
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol.**, v.6, n.3, p.173-771, 2006.
- NAYLOR, D. J.; HARTL, F. U. Contribution of molecular chaperones to protein folding in the cytoplasm of prokaryotic and eukaryotic cells. **Biochem. Soc. Symp.**, v.68, p.45-68, 2001.
- NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Interleukin 6: from bench to bedside. **Nat. Clin. Pract. Rheumatol.**, v. 2, n. 11, p. 619-626, 2006. Erratum in: **Nat. Clin. Pract. Rheumatol.**, v. 2, n. 12, p. 691, 2006.
- O'NEILL, L. A. J.; BOWIE, A. The family of five: TIR-domains-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. **Nat. Rev. Immunol.**, v.7, p.353-364, 2007.
- OTERO, M.; GOLDRING, M. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: Chondrocytes. **Arthritis Res. Ther.**, v.2, n.5, p.220-233, 2007.

- OTTO, J. M. et al. Identification of multiple loci linked to inflammation and autoantibody production by genome scan of a murine model of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.42, p.2524-2531, 1999.
- PALEOG, E.M. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res. Ther.**, v.4, p.81-90, 2002.
- PAPADOPOULI, A. E. et al. Role of OPG/RANKL/RANK axis on the vasculature. **Histol. Histopathol.**, v. 23, p. 497-506, 2008.
- PARKS, W. C. et al. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v.4, n.8, p.617-629, 2004.
- PARSONAGE, G. et al. Prolonged, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNF alpha. **Arthritis Res. Ther.**, v. 10, p.1-12, 2008.
- PASCUAL, M. et al. Genetic determinants of rheumatoid arthritis: the inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene promoter polymorphism. **Scand. J. Rheumatol.**, v.3, p.299-301, 2002.
- PATTEN, C. et al., Characterization of pristane-induced arthritis, a murine model of chronic disease. Response to antirheumatic agents, expression of joint cytokines, and immunopathology. **Arthritis Rheum.**, v.50, n.10, p.3334-3345, 2004.
- PETERS, L.C. et al. Slc11a1 (formerly Nramp1) gene modulates both acute inflammatory reaction and pristane-induced arthritis in mice. **Genes Immun.**, v.8, p.51-56, 2007.
- PHAM, C. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v.6, n.7, p.541-550, 2006.
- POBER, J.; SESSA, W. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v.7, n.10, p.803-815, 2007.
- PRESCOTT, S. M. et al. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annu. Rev. Biochem.**, v.69, p.419-445, 2000.
- RAKOFF-NAHOUM, S. et al. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, v.118, p.229-241, 2004.
- RAMARATHINAM, L. et al. Ity influences the production of IFN-gamma by murine splenocytes stimulated in vitro with Salmonella typhimurium. **J. Immunol.**, v.150, p.3965-3972, 1993.
- REICH, D. E.; LANDER, E. S. On the allele spectrum of human disease. **Trends Genet.**, v.17, p.502-510, 2001.
- RIBEIRO, O. G. **Controle genético da inflamação**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1994.

- RIBEIRO, O. G. et al. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.**, v.74, n.10, p.497-506, 2003.
- RIBEIRO, O. G. et al. Genetic selection for high acute inflammatory response confers resistance to lung carcinogenesis in the mouse. **Lung Res.**, v.31, p.105-116, 2005.
- ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annu. Rev. Pathol.**, v.3, p.99-126, 2008.
- RODRIGUEZ, M. R. Association of NRAMP1 promoter gene polymorphism with susceptibility and radiological severity of rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v.59, p.311-315, 2002.
- ROSSI, D.; ZLOTNICK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v.18, p.217-242, 2000.
- SALMI, M.; JALKANEN, S. Cell-surface enzymes in control of leucocyte trafficking. **Nat. Rev. Immunol.**, v.5, n.10, p.760-771, 2005.
- SANTOS-JÚNIOR, R. R. et al. Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in a animal model of arthritis. **Human Gene Ther.**, v.16, n.11, p.1338-1345, 2005.
- SHELLEKENS, G. A. et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. **Arthritis Rheum.**, v.43, p.155-163, 2000.
- SCHETT, G. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: Osteoclast. **Arthritis Res. Ther.**, v.9, n.1, p.203-208, 2007.
- SEARLE, S. et al. Localization of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. **J. Cell Sci.**, v.111, p.2855-2866, 1998.
- SEARLE, S.; BLACKWELL, J. M. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. **J. Med. Genet.**, v.36, p.295-299, 1999.
- SELDIN M. F. et al. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.42, p.1071-1079, 1999.
- SERHAN, C. N. et al. Resolution of inflammation: state of art, definitions and terms. **FASEB J.**, v.21, p.325-332, 2007a.
- SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators and pathways. **Annu. Rev. Immunol.**, v.25, p.101-137, 2007b.
- SERHAN, C. N. et al. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat. Rev. Immunol.**, v.8, p.349-361, 2008.
- SERRANO, N. C. et al. Non-HLA associations with autoimmune disease. **Autoimmun. Rev.**, v.5, p.209-214, 2006.

- SHAM, P.C. et al. DNA pooling: a tool for large-scale association studies. **Nat. Rev. Genet.**, v.3, p.862-71, 2002.
- SHAPENKO, A. et al. The role of T cell in autoimmune inflammation. **Arthritis Res. Ther.**, v.2, S.2, p.4-14, 2005.
- SHAW, M. A. et al. Linkage of rheumatoid arthritis to the candidate gene NRAMP1 on 2q35. **J. Med. Genet.**, v.33, p.672-677, 1996.
- SHIGEYAMA, Y.; PAP, T.; KUNZLER, P.; SIMMEN, B. R.; GAY, R. E.; GAY, S. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 43, p. 2523-2530, 2000.
- SINGAL D. P. et al. NRAMP1 gene polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v.55, p.44-47, 2000.
- SMITH, E. et al. 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.
- SOKOL, C. L. et al. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. **Nat. Immunol.**, v.9, p.310-318, 2008.
- STASIUK, L. M. et al., Pristane-induced arthritis is CD4+ T-cell dependent. **Immunology**, v.90, p.81-86, 1997.
- STEINER, G.; SMOLEN, J. Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. **Arthritis Res.**, v.4, p.S1-S5, 2002.
- STIFFEL, C. et al. Genetic of acute inflammation reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. **Exp. Clin. Immunogenet.**, v.7, p.221-233, 1990.
- STIFFEL, C. et al. genetic regulation of the specific and non-specific component of immunity. **Immunol. Lett.**, v.16, p.205-218, 1987.
- STOBER, C. et al. Slc11a1, formerly, Nramp1, is expressed in dendritic cells and influences major compatibility complex class II expression and antigen-presenting cell function. **Infect. Immun.**, v.75, n.10, p.5059-5067, 2007.
- STRAINIC, M. G. et al. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both coestimulatory and survival signals to naïve CD4+ T cells. **Immunity**, v.28, p.429-435, 2008.
- SWEENEY, S.E.; FIRESTEIN, G.S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.36, p.372-378, 2004.
- SZEKANECZA, Z.; KOCH, A. E. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v.19, p.289-295, 2007.

- TAK, P. P.; BRESNIHAN, B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. **Arthritis Rheum.**, v.43, p.2619-2633, 2000.
- TAKEMURA, S. et al. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. **J. Immunol.**, v.167, p.1072-1080, 2001.
- THOMPSON, S. J. et al. An immunodominant epitope from mycobacterial 65-kDa heat shock protein protects against pristane-induced arthritis. **J. Immunol.**, v.160, p.4628-4634, 1998.
- THOMPSON, S. J. et al. Autoimmune reactions to heat-shock proteins in pristane-induced arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v.20, p.2479-2484, 1990.
- THORN, C. F.; WHITEHEAD, A. S. Differential transcription of the mouse acute phase serum amyloid A genes in response to pro-inflammatory cytokines. **Amyloid**, v.9, p.229-236, 2002.
- TO, M. D. et al. A functional switch from lung cancer resistance to susceptibility at the Pas1 locus in Kras2LA2 mice. **Nat. Genet.**, v.38, 926-930, 2006.
- TSIROGIANNI, A. K. et al. Wound healing: immunological aspects. **Injury**, v.37, p.5-12, 2006.
- TURER, E. E. et al. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. **J. Exp. Med.**, v.205, p.451-464, 2008.
- UHLAR, C. M.; WHITEHEAD, A. S. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. **Eur. J. Biochem.**, v. 265, n. 2, p. 501-523, 1999.
- VALLON, R. et al. Serum amyloid A (apoSAA) expression is up-regulated in rheumatoid arthritis and induces transcription of matrix metalloproteinases. **J. Immunol.**, v. 166, p. 2801-2807, 2001.
- VAN EDEN, W. et al. Heat shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v.5, p.318-330, 2005.
- 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) – Faculdades de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- VIDAL, S. M. et al. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. **Cell**, v.73, p.469-485, 1993.
- VIDAL, S. M. et al. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. **J. Exp. Med.**, v182, p.655-666, 1995.
- VIGAR, N. D. et al. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. **Eur. J. Immunol.**, v.30, p.431-437, 2000.
- VINK, J. M.; BOOMSMA, D. I. Gene finding strategies. **Biol. Psychol.**, v.61, p.53-71, 2002.

- VIOLA, A.; LUSTER, A. D. Chemokines and their receptors: drugs targets in immunity and inflammation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.48, p.171-197, 2008.
- VLADIMIROV, V. et al. Different genetic control of cutaneous and visceral disease after *Leishmania major* infection in mice. **Infect. Immun.**, v.71, p.2041-2046, 2003.
- WALPORT, M. J. Complement: first of two parts. **N. Engl. J. Med.**, v.344, p.1058-1066, 2001.
- WEBER, C. et al. Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment. **PNAS**, v. 105, n. 42, p. 16278-16283, 2008.
- WIPKE, B. T.; ALLEN, P. M. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. **J. Immunol.**, v. 167, p. 1601-1608, 2001.
- WOHNER, N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. **Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.**, v.6, n.3, p.224-228, 2008.
- WOJCIECHOWSKI, W. et al. Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG involves class II transactivator and depends on the Nramp1 gene. **J. Immunol.**, v.163, p.2688-2696, 1999.
- WONG, C. E. et al. Kras regulatory elements and exon 4A determine mutation specificity in lung cancer. **Nat. Genet.**, v.40, p.1240-1244, 2008.
- WOOLEY, P.H. et al. Pristane-induced arthritis: the immunologic and genetic features of experimental murine model of autoimmune disease. **Arthritis Rheum.**, v.32, p.1022-1030, 1989.
- WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J. Pathol.**, v.214, p.199-210, 2008.
- XAVIER, R. J.; RIOUX, J. D. Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases. **Nat. Rev. Immunol.**, v.8, n.8, p.631-643, 2008.
- YEN, J. et al. Natural resistance-associated macrophage protein 1 gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. **Immunol. Lett.**, v.102, p.91-97, 2006.
- ZAAHL, M. G. et al. Expression of the SLC11A1 (NRAMP1) 50-(GT)_n repeat: opposite effect in the presence of -237C/T. **Blood Cells Mol. Dis.**, v.33, p.45-50, 2004.
- ZAAHL, M. G. et al. The -237C/T promoter polymorphism of the SLC11A1 gene is associated with a protective effect in relation to inflammatory bowel disease in the South African population. **Int. J. Colorectal Dis.**, v.21, p.402-408, 2007.
- ZAJA-MILATOVIĆ, S.; RICHMOND, A. CXC chemokines and their receptors: a case for a significant biological role in cutaneous wound healing. **Histol. Histopathol.**, v. 23, n. 11, p. 1399-1407, 2008.
- ZARBOCK, A. et al. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. **Blood Rev.**, v.21, p.99-111, 2007.

ZHANG, X. et al. Microbe hunting in the joints. **Arthritis Rheum.**, v.49, n.4, p.479-482, 2003.

ZHAO, M. et al. 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.

ZWILLING, B. S. et al., Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth. **Infect. Immun.**, v.67, p.1386-1392, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)