

**TATIANE APARECIDA CANHAMERO**

**ESTUDO DOS MECANISMOS GENÉTICOS E CELULARES  
DURANTE A FASE INFLAMATÓRIA DO PROCESSO DE  
REGENERAÇÃO TECIDUAL EM ANIMAIS SELECIONADOS  
GENETICAMENTE PARA A MÁXIMA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA AGUDA HOMOZIGOTOS PARA OS ALELOS  
*R* OU *S* DO GENE *Slc11a1***

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Marcelo De Franco

**São Paulo**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**TATIANE APARECIDA CANHAMERO**

**ESTUDO DOS MECANISMOS GENÉTICOS E CELULARES  
DURANTE A FASE INFLAMATÓRIA DO PROCESSO DE  
REGENERAÇÃO TECIDUAL EM ANIMAIS SELECIONADOS  
GENETICAMENTE PARA A MÁXIMA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA AGUDA HOMOZIGOTOS PARA OS ALELOS  
*R* OU *S* DO GENE *Slc11a1***

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Marcelo De Franco

**São Paulo**

**2009**

Este trabalho foi desenvolvido no  
Laboratório de Imunogenética do  
Instituto Butantan com apoio financeiro  
da FAPESP sob o processo nº07/51661-6.

## **RESUMO**

CANHAMERO, T. **Estudo dos mecanismos genéticos e celulares durante a fase inflamatória do processo de regeneração tecidual em animais selecionados geneticamente para a máxima resposta inflamatória aguda homocigotos para os alelos *R* ou *S* do gene *Slc11a1***. 2009. 91 f. (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Sublinhagens de camundongos AIRmax e AIRmin homocigotas para os alelos *R* ou *S* do gene *Slc11a1* apresentam distinta capacidade regenerativa à perfuração de suas orelhas. Animais AIRmax<sup>SS</sup> exibiram regeneração tecidual precoce em comparação aos animais AIRmax<sup>RR</sup>, sugerindo que o alelo *S* favoreceu a regeneração nestes animais. Camundongos das sublinhagens AIRmin não apresentaram regeneração após perfuração de suas orelhas. Em resposta ao estímulo, animais AIRmax<sup>SS</sup> exibiram inflamação local mais intensa e tardia do que animais AIRmax<sup>RR</sup>, demonstrando elevados níveis de MPO e edema, e influxo celular predominantemente de neutrófilos. Ensaios de expressão gênica global demonstraram genes diferencialmente expressos entre as sublinhagens, evidenciando genes sobre-representados no tema biológico proliferação celular em ambas sublinhagens, enquanto somente nos animais AIRmax<sup>SS</sup> ocorreu sobre-representação para resposta inflamatória nos genes ativados e para contração muscular nos genes reprimidos. Os resultados de *microarray* foram validados por qPCR.

**Palavras-chave:** Resposta inflamatória. Reparo tecidual. Regeneração tecidual. Gene *Slc11a1*. Blastema. Regeneração epimórfica.

## **ABSTRACT**

CANHAMERO, T. **Study of genetic and cellular mechanisms during the inflammatory phase of tissue regeneration process in animals genetically selected for maximum acute inflammatory response homozygous for *Slc11a1* R and S alleles.** 2009. 91 p. Master Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Homozygous AIRmax and AIRmin sublines for *Slc11a1* R and S alleles present distinct regenerative capacity to the ear hole. AIRmax<sup>SS</sup> mice exhibited early tissue regeneration compared to AIRmax<sup>RR</sup> animals, suggesting that the *Slc11a1* S allele promotes regeneration in these animals. AIRmin sublines didn't show regeneration after ear punch. In response to the stimulus, AIRmax<sup>SS</sup> animals exhibited more intense and later local inflammation than AIRmax<sup>RR</sup> animals, presenting elevated levels of MPO, edema and cellular influx predominantly of neutrophils. Global gene expression analysis showed differentially-expressed genes between the sublines, in which over-represented biological theme is cell proliferation in both sublines. AIRmax<sup>SS</sup> animals displayed over-representation of inflammatory response in up-regulated genes and of muscle contraction in down-regulated genes. Microarray results were validated by using quantitative PCR.

**Key words:** Inflammatory response. Tissue repair. Tissue regeneration. *Slc11a1* gene. Blastema. Epimorphic regeneration.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>AIR</b>	Resposta Inflamatória Aguda
<b>AIRmax</b>	Resposta Inflamatória Aguda Máxima
<b>AIRmin</b>	Resposta Inflamatória Aguda Mínima
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>Ct</b>	Cycle Threshold
<b>D.O</b>	Densidade óptica
<b>EASE</b>	Expression analysis systematics explorer
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>ERK</b>	Extracellular signal-related protein kinase
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
<b>GRO</b>	Growth-Related Oncogene
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon - $\gamma$
<b>IGF</b>	Insulin-like growth factors
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IP-10</b>	Interferon - $\gamma$ - inducible protein 10
<b>JNK</b>	c-Jun NH(2)-terminal protein kinase
<b>KGF</b>	keratinocyte growth factor
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>M-CSF</b>	Macrophage-colony stimulating factor
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>MMP9</b>	Matriz Metaloproteinase - 9
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor - $\kappa$ B
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>Nramp1</b>	Natural resistance-associated macrophage protein-1

<b>PAF</b>	Platelet-activating factor
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factors
<b>PG</b>	Prostaglandinas
<b>PIA</b>	Artrite induzida por Pristane
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>QTL</b>	Quantitative trait loci
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>SAM</b>	Significance Analysis of Microarray
<b>Slc11a1</b>	Solute carrier family 11a member 1
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor- $\beta$
<b>TLR</b>	Toll like receptors
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor- $\alpha$
<b>TPA</b>	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato
<b>VCAM-1</b>	Vascular cell adhesion molecule-1
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor



**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

- Figura 1:** Estágios clássicos durante o processo de reparo tecidual..... 26
- Figura 2:** Gráfico representativo da divergência entre as linhagens AIR quanto ao número médio de leucócitos infiltrantes e extravasamento protéiconosítio de injeção do Biogel..... 30
- Figura 3:** Figura representativa da proteína de membrana codificada pelo gene *Slc11a1*..... 33
- Figura 4:** Avaliação de regeneração tecidual em diferentes períodos nos camundongos das sublinhagens AIRmax e AIRmin homozigotos para os alelos do gene *Slc11a1*..... 35
- Figura 5:** Representação do processo de regeneração tissular em camundongos AIRmax<sup>SS</sup> ..... 40
- Figura 6:** Controles negativos da lâmina de *microarray* ..... 49
- Figura 7:** Controles positivos da lâmina de *microarray*.....49
- Figura 8:** qPCR exemplificando a quantificação da  $\beta 2$  *microglobulina* e de citocina na orelha de alguns animais das sublinhagens AIRmax<sup>RR</sup>, AIRmax<sup>SS</sup> controles e experimentais..... 53
- Figura 9:** Cinética do aumento na espessura da orelha em camundongos AIRmax portadores dos alelos R e S do gene *Slc11a1* induzidos ao processo de regeneração tecidual.....57
- Figura 10:** Quantificação da mieloperoxidase presente na orelha de camundongos AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>, em resposta ao protocolo de indução a regeneração tecidual..... 58
- Figura 11:** Cinética do número de células presentes na orelha de camundongos AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> após perfuração..... 59
- Figura 12:** Cinética do número de neutrófilos infiltrantes na orelha de camundongos AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> após perfuração..... 60
- Figura 13:** Cinética do número de células mononucleares infiltrantes na orelha de camundongos AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> após perfuração..... 60

- 
- Figura 14:** Número de genes ativados e reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> experimentais em relação aos animais controles..... 62
- Figura 15:** Número de genes diferencialmente expressos (>2X) para a análise entre os animais AIRmax<sup>RR</sup> /AIRmax<sup>SS</sup>>2X versus AIRmax<sup>RR</sup>/AIRmax<sup>SS</sup><0,5X experimentais e controles..... 63
- Figura 16:** Expressão relativa do gene *Tnfa* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ou não ao protocolo de regeneração tecidual ..... 68
- Figura 17:** Expressão relativa do gene *Il6* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ou não ao protocolo de regeneração tecidual ..... 69
- Figura 18:** Expressão relativa do gene *Il1b* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ou não ao protocolo de regeneração tecidual ..... 70
- Figura 19:** Expressão relativa do gene *Tgfb* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ou não ao protocolo de regeneração tecidual ..... 71
- Figura 20:** Expressão relativa do gene *Il8rb* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ou não ao protocolo de regeneração tecidual ..... 72
- Figura 21:** Expressão relativa do gene *Cxcl2* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ou não ao protocolo de regeneração tecidual ..... 73
- Figura 22:** Expressão relativa do gene *Dap12* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ou não ao protocolo de regeneração tecidual ..... 74
- Figura 23:** Expressão relativa do gene *Trem1* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ou não ao protocolo de regeneração tecidual ..... 75
- Figura 24:** Expressão relativa do gene *Trem2* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ou não ao protocolo de regeneração tecidual ..... 76
- Figura 25:** Expressão relativa do gene *Mmp9* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ou não ao protocolo de regeneração tecidual ..... 77

---

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Seqüência de primers utilizados na síntese do RNAm.....	44
<b>Tabela 2</b>	Genes ativados sobre-representados em categorias funcionais nos animais AIRmax <sup>RR</sup> 48 horas após perfuração das orelhas ( $\geq 2 X$ ).....	64
<b>Tabela 3</b>	Genes reprimidos sobre-representados em categorias funcionais nos animais AIRmax <sup>RR</sup> 48 horas após perfuração das orelhas ( $\geq 2 X$ ).....	65
<b>Tabela 4</b>	Genes ativados sobre-representados em categorias funcionais nos animais AIRmax <sup>SS</sup> 48 horas após perfuração das orelhas ( $\geq 2 X$ ).....	65
<b>Tabela 5</b>	Genes reprimidos sobre-representados em categorias funcionais nos animais AIRmax <sup>SS</sup> 48 horas após perfuração das orelhas ( $\geq 2 X$ ).....	66
<b>Tabela 6</b>	Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão $\geq 2$ vezes nos animais AIRmax <sup>RR</sup> controle comparados aos animais AIRmax <sup>SS</sup> .....	66
<b>Tabela 7</b>	Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão $\geq 2$ vezes nos animais AIRmax <sup>RR</sup> após 48 horas de perfuração da orelha comparados aos animais AIRmax <sup>SS</sup> .....	67
<b>Tabela 8</b>	Correlações entre as expressões gênicas obtidas no qPCR e <i>microarray</i> de orelha induzida ao processo de regeneração tecidual .....	78

**SUMÁRIO**

<b>1</b>	<b><u>INTRODUÇÃO</u></b> .....	<b>22</b>
<b>2</b>	<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	<b>37</b>
<b>3</b>	<b><u>MATERIAIS E MÉTODOS</u></b> .....	<b>39</b>
3.1	Camundongos .....	39
3.2	Indução ao processo de regeneração tecidual.....	39
3.3	Teste para verificação de edema .....	40
3.4	Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase .....	40
3.5	Extração de RNA(RNAspin Mini Kit G.E Healthcare).....	41
3.6	Obtenção do cDNA .....	43
3.7	Análise da expressão gênica global .....	44
3.7.1	Preparação dos mRNA bacterianos .....	44
3.7.2	Síntese do cDNA de fita simples .....	45
3.7.3	Síntese do cDNA de fita dupla.....	45
3.7.4	Purificação do cDNA de dupla fita.....	46
3.7.5	Síntese do cRNA por transcrição in vitro (IVT).....	46
3.7.6	Purificação do cRNA.....	46
3.7.7	Fragmentação do cRNA .....	47
3.7.8	Hibridação .....	47
3.7.9	Detecção com Cy5-Streptavidina .....	48
3.7.10	Análise dos dados obtidos .....	48
3.8	Quantificação de expressão gênica relativa por PCR em tempo real	50
3.9	Análise estatística.....	54
<b>4</b>	<b><u>RESULTADOS</u></b> .....	<b>56</b>
4.1	Avaliação de edema nas orelhas dos camundongos das sublinhagens .....	56
4.2	Quantificação da enzima mieloperoxidase .....	57
4.3	Caracterização das populações celulares presentes na orelha dos camundongos .....	58
4.4	Estudo de expressão gênica global .....	61
4.5	Análise de expressão gênica relativa .....	67

---

<b>4.5.1</b>	<b>Níveis de expressão gênica para <i>Tnfa</i></b> .....	<b>68</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Níveis de expressão gênica para <i>Il6</i></b> .....	<b>69</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Níveis de expressão gênica para <i>Il1b</i></b> .....	<b>69</b>
<b>4.5.4</b>	<b>Níveis de expressão gênica para <i>Tgfb</i></b> .....	<b>70</b>
<b>4.5.5</b>	<b>Níveis de expressão gênica para <i>Il8rb</i></b> .....	<b>71</b>
<b>4.5.6</b>	<b>Níveis de expressão gênica para <i>Cxcl2</i></b> .....	<b>72</b>
<b>4.5.7</b>	<b>Níveis de expressão gênica para <i>Dap12</i></b> .....	<b>73</b>
<b>4.5.8</b>	<b>Níveis de expressão gênica para <i>Trem1</i></b> .....	<b>74</b>
<b>4.5.9</b>	<b>Níveis de expressão gênica para <i>Trem2</i></b> .....	<b>75</b>
<b>4.5.10</b>	<b>Níveis de expressão gênica para <i>Mmp9</i></b> .....	<b>76</b>
<b>5</b>	<b><u>DISCUSSÃO</u></b> .....	<b>80</b>
<b>6</b>	<b><u>CONCLUSÕES</u></b> .....	<b>95</b>
	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b> .....	<b>97</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

A resposta biológica a uma injúria é caracterizada por duas categorias distintas: reparo tecidual e regeneração do órgão lesado (CLARK *et al.*, 1998).

O reparo tecidual é um processo complexo que consiste em três fases distintas: 1) fase inflamatória (0-2 dias); 2) formação de novos tecidos (5-20 dias); 3) e um estágio de remodelação (>21 dias), no qual juntas, envolvem a participação de muitos genes (LI *et al.*, 2001; DOVI *et al.*, 1999; SINGER *et al.*, 1999; MARTIN, 1997).

Durante uma lesão, freqüentemente ocorre o rompimento de vasos sangüíneos seguido pela entrada de constituintes do sangue para dentro da injúria, e ainda, mecanismos de vasoconstrição que irão corroborar para a homeostase do tecido e início da fase inflamatória em resposta a injúria. Além disso, a injúria endotelial resulta na ativação de plaquetas que ativam a cascata de coagulação iniciando a formação de uma matriz de fibrina, permitindo provisoriamente a migração celular (TSIROGIANI *et al.*, 2006) (**Figura 1A**).

Outro mecanismo ativado no início da resposta contra uma injúria é a via do ácido araquidônico. Esta via induz a produção de tromboxana A2 favorecendo a vasoconstrição e o agrupamento de plaquetas, e ainda a produção de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) promovendo a vasodilatação dos capilares. A vasodilatação também pode ocorrer devido à ação de histamina liberada no local da lesão por mastócitos ativados. Pesquisadores demonstraram a importância destas células durante todo o processo de reparo tecidual, ou seja, na liberação de mediadores químicos como histamina, serotonina, de citocinas como TNF- $\alpha$ , no recrutamento de leucócitos, e ainda na conversão de fibroblastos em miofibroblastos (TSIROGIANI *et al.*, 2006; WELLER *et al.*, 2006).

A desgranulação das plaquetas infere na liberação de grânulos alfa que secretam fatores de crescimento como: *epidermal growth factor*

(EGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF) e *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) (BARRIENTOS *et al.*, 2008). O PDGF, juntamente com citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), são importantes na quimiotaxia de neutrófilos para o local da injúria (HANTASH *et al.*, 2008).

Os neutrófilos são as primeiras células nucleadas a infiltrar a injúria, e iniciam a descontaminação dessa região destruindo microrganismos invasores, quando houver, e minimizando a possibilidade de uma infecção. Além disso, produzem substâncias bioativas e proteases, que podem converter citocinas que atuam na injúria em uma forma ativa ou inativa, podendo assim interferir na lesão tecidual (DOVI *et al.*, 2004) (**Figura 1A**).

Macrófagos também participam do processo de reparo tecidual. Após 2 a 3 dias de injúria, monócitos do sangue migram para os tecidos, se ativam, e diferenciam-se em macrófagos, atuando durante todas as fases do reparo tissular, mas o papel tanto destas células, como o de neutrófilos neste processo ainda é pouco conhecido (GURTNER *et al.*, 2008). Estudos demonstram que estas células produzem fatores de crescimento que estimulam a angiogênese e a fibrinogênese (LEIBOVICH e ROSS, 1975; DANON *et al.*, 1989), e desempenham grande importância na remoção de neutrófilos apoptóticos (DOVI *et al.*, 2004). Participam também como um "sensor de patógenos" executando um papel importante no início da resposta inflamatória, na eliminação de patógenos, na resposta imune adaptativa e no reparo dos tecidos prejudicados. Estão presentes na maioria dos tecidos, onde são responsáveis por numerosos processos inflamatórios, imunológicos e metabólicos (PLOWDEN *et al.*, 2004). Além de todas as funções já descritas, macrófagos também secretam citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas em resposta a patógenos e sinais que indiquem "perigo". Estes incluem citocinas como interleucina 1 alfa e beta (IL1- $\alpha$  e  $\beta$ ), IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), *interferon* alfa e beta (IFN- $\alpha$  e

$\beta$ ), TGF- $\beta$ , *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF), e fatores angiogênicos como o *vascular endothelial growth factor* (VEGF), quimiocinas CXC (IL-8), *growth-related oncogene* (GRO), *interferon - $\gamma$ - inducible protein 10* (IP-10), fatores de coagulação, prostaglandina E2 (PGE2), leucotrienos, intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio, componentes do complemento, e várias enzimas e proteases). A secreção destes fatores depende do tipo de estímulo, do tipo e localização do macrófago (PLOWDEN *et al.*, 2004).

O impacto da resposta inflamatória local no processo de reparo e regeneração tecidual foi debatido por décadas. A participação de macrófagos ou granulócitos promovendo ou impedindo o reparo tecidual tem recebido muita atenção (EMING *et al.*, 2007). Estudos sugerem que neutrófilos podem inibir o processo de reparo tecidual, embora forneçam proteção contra infecções produzem uma variedade de fatores de crescimento que podem promover a revascularização e reparo do tecido injuriado, como IL-8 e VEGF, contudo, outros estudos sugerem que a re-epitelização da lesão é favorecida após a depleção de neutrófilos. Além disso, sinais liberados por estas, e outras células inflamatórias podem interferir na migração de queratinócitos e fibroblastos resultando em uma cicatrização não favorável e aumentando a fibrose (DOVI *et al.*, 2004; DOVI *et al.*, 2003; RENNEKAMPFF *et al.*, 2000; MCCOURT *et al.*, 1999; MURATA *et al.*, 1997; LINARES, 1996; BORDER e NOBLE, 1994).

A produção de todos os fatores mencionados acima, como também de proteinases produzidas por estas células inflamatórias, é necessária também na próxima fase do processo de reparo, a formação de novos tecidos (SCHÄFER e WERNER, 2008).

Este estágio ocorre no período de 2 a 10 dias após a injúria e é caracterizado por proliferação celular e migração de diferentes tipos celulares, envolvendo a migração e hiperproliferação de queratinócitos na margem da injúria, permitindo o início do processo de cobertura da lesão



com uma nova epiderme, processo esse chamado de re-epitelização e, concomitantemente a este processo, o reparo da derme também é iniciado (SCHÄFER e WERNER, 2008; GURTNER *et al.*, 2008). Em seguida, vasos sanguíneos surgem na margem da lesão e também o desenvolvimento de uma nova vasculatura, iniciando a angiogênese. Os principais reguladores positivos da angiogênese são: VEGF- $\alpha$  e o *fibroblast growth factor 2* (FGF2) (GURTNER *et al.*, 2008; WERNER e GROSE, 2003). Nesta fase, fibroblastos migram para o interior da lesão, onde proliferam e produzem grandes quantidades de matriz extracelular (ECM). Além disso, alguns fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos no qual são responsáveis pela diminuição da lesão e pela deposição adicional de matriz, formando então o chamado tecido de granulação (SCHÄFER e WERNER, 2008; OPALENIK e DAVIDSON, 2005) (**Figura 1B**).

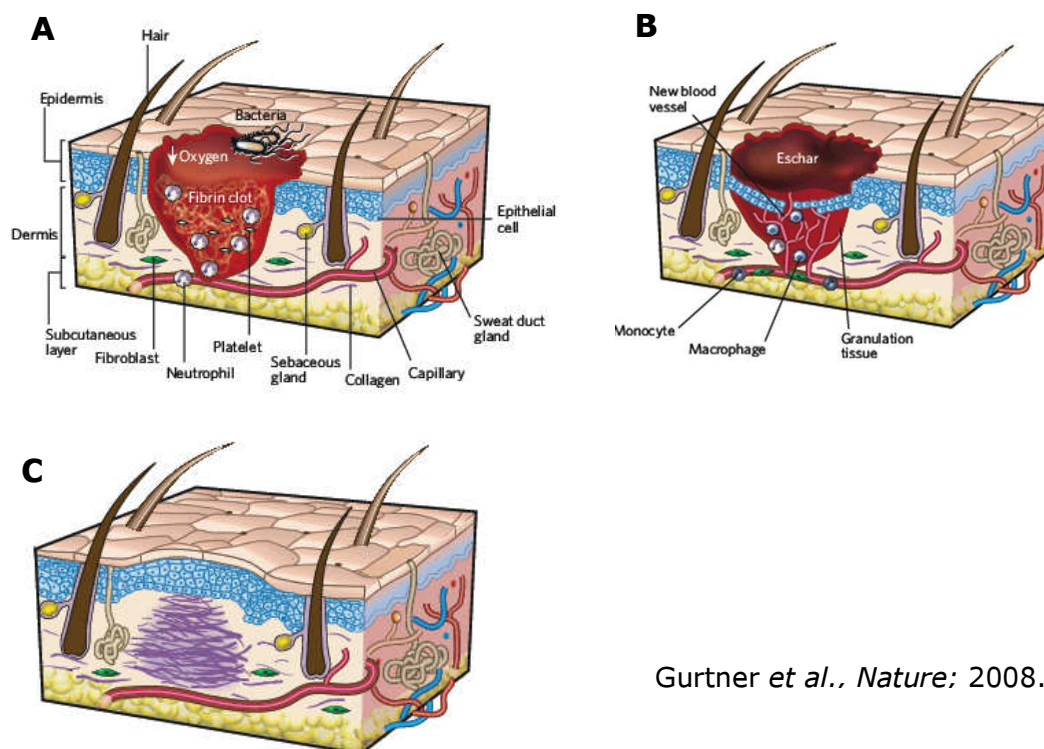
Os fibroblastos tornam-se o tipo celular predominante do dia 7 ao 14 do processo de reparo tecidual. Neste período, eles iniciam a produção de FGF, TGF- $\beta$ , PDGF, bem como de *keratinocyte growth factor* (KGF) e *insulin-like growth factor* (IGF) facilitando a síntese da matriz (TSIROGIANI *et al.*, 2006).

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

A fase final, de remodelamento, é iniciada 2 a 3 semanas após a injúria e permanece por um ano ou mais. Neste período, ocorre uma transição de tecido de granulação em tecidos maduros com cicatriz (GURTNER *et al.*, 2008; SCHÄFER e WERNER, 2008).

Durante este estágio, todos os processos que foram ativados por conta de uma injúria entram em declínio e cessam, e a maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos presentes sofrem apoptose ou

saem da lesão deixando uma massa contendo poucas células, que consiste principalmente de colágeno e outras proteínas de matriz extracelular (GURTNER *et al.*, 2008). A degradação de colágeno é dependente de enzimas proteolíticas específicas conhecidas como metaloproteinases de matriz (MMP), estas enzimas são produzidas por algumas células como, macrófagos, queratinócitos e fibroblastos (TSIROGIANI *et al.*, 2006; ANGELOV *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2000). No entanto, o remodelamento continuará por mais de 12 meses, embora as cicatrizes nunca recuperem a resistência de uma derme normal (MONACO e LAWRENCE, 2003) (**Figura 1C**).



Gurtner *et al.*, *Nature*; 2008.

**Figura 1:** Estágios clássicos durante o processo de reparo tecidual: (A) inflamação, (B) formação de novos tecidos e (C) remodelamento.

Estudos avaliando os mecanismos envolvidos no reparo tecidual estão sendo desenvolvidos. Um destes estudos mostra que a deficiência de complexo principal de histocompatibilidade II (MHC-II) compromete o

reparo tissular, refletindo em um impedimento na função de células imunes e na diminuição da atividade de fibroblastos na injúria (SCHÄFFER *et al.*, 2006). Por outro lado, Eming e colaboradores (2007) investigaram camundongos deficientes de interleucina 10 (IL-10), estes apresentaram uma regeneração acelerada no ferimento. Na injúria dos animais nocaute para a IL-10 havia mais macrófagos em relação à injúria dos camundongos normais controle, e formaram-se muitas células no tecido de granulação (EMING *et al.*, 2007). Outro tema interessante estudado refere-se à relação entre o processo de reparo tecidual e o desenvolvimento de câncer e, ainda, o envolvimento de receptores tipo Toll-like (TLRs) na relação entre o processo de reparo tecidual e carcinogênese (RAKOFF-NAHOUM e MEDZHITOV, 2009; SCHÄFER e WERNER, 2008).

Embora estudos com Biologia Molecular e Celular tenham explicado alguns dos processos biológicos que estão envolvidos no reparo e na regeneração tissular, ainda hoje sabemos pouco sobre este tema complexo nos quais estão envolvidos muitos genes (HEBER-KATZ, 1999; SINGER *et al.*, 1999; ROTHE e FALANGA, 1992).

O mecanismo comumente estudado em tecidos de mamíferos após uma lesão é o reparo, pois a capacidade de regeneração nestes, é limitada ou não existente (HEBER-KATZ *et al.*, 2004; STOCUM, 1996). Contudo, existem vários exemplos de regeneração epimórfica em mamíferos, regeneração esta, anteriormente observada apenas em anfíbios em que os membros foram completamente regenerados após amputação (STOCUM, 1984; GOSS e GRIMES, 1975).

O processo de regeneração, diferente do reparo, envolve uma completa substituição e restauração dos tecidos, exibindo estrutura e funções normais, incluindo condrogênese (RAJNOCH *et al.*, 2003).

Os primeiros mamíferos que exibiram regeneração epimórfica foram os coelhos. Estes animais regeneraram pequenas perfurações induzidas

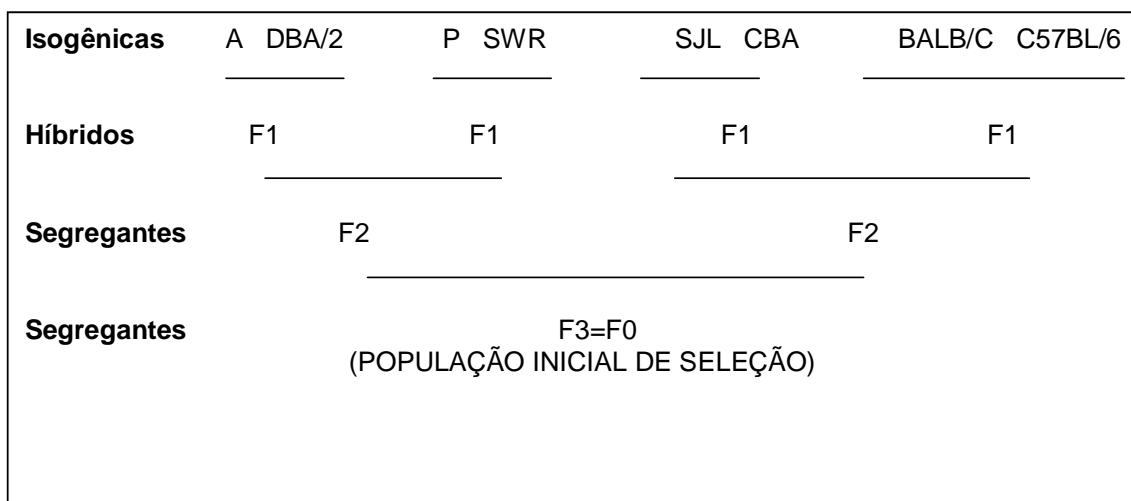
experimentalmente em suas orelhas exibindo regeneração semelhante à observada em anfíbios (GOSS e GRIMES, 1975).

No ano de 1998, Clark e colaboradores descobriram um modelo murino, a linhagem de camundongo isogênica MRL/Mpj, que foi capaz de regenerar um orifício de 2mm de diâmetro em suas orelhas no período de 30 dias, apresentando todas as características regenerativas, ou seja, a formação de blastema (estrutura tecidual que contém células-tronco mesenquimais indiferenciadas, observada em lesões de anfíbios), a cobertura total da injúria, formação de nova cartilagem da orelha e função tecidual normal, quando comparados à outras linhagens de camundongos isogênicas como C57BL/6 (B6), CAST/Ei, e SJL/J (SJL) que apresentaram apenas reparo parcial de suas orelhas (YU *et al.*, 2005; CLARK *et al.*, 1998; MCBREARTY *et al.*, 1998). Alguns estudos desenvolvidos contribuíram na identificação de vários QTL envolvidos neste fenótipo, indicando que a regeneração em camundongos deve-se a um fenótipo quantitativo controlado geneticamente (MASINDE *et al.*, 2001; CLARK *et al.*, 1998; MCBREARTY *et al.*, 1998).

Recentemente, Reines e colaboradores descreveram que camundongos C57BL/6 (B6) de meia idade aumentam sua capacidade regenerativa com o passar do tempo apresentando regeneração tecidual comparável à dos camundongos MRL (REINES *et al.*, 2009).

As linhagens de camundongos selecionadas geneticamente em nosso laboratório para a máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) resposta inflamatória aguda (AIR) (IBAÑEZ *et al.*, 1992), apresentam-se como um modelo experimental muito interessante para o estudo dos mecanismos genéticos e celulares envolvidos na regeneração tecidual. Estes modelos foram obtidos através de seleção genética bidirecional, iniciada a partir de uma população fundadora geneticamente heterogênea (F0) produzida através do inter cruzamento de oito linhagens de camundongos isogênicas de origem independente (STIFFEL *et al.*, 1990), estas são: A/J, DBA/2J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/cJ e C57BL/6J. Cada camundongo da F0 é

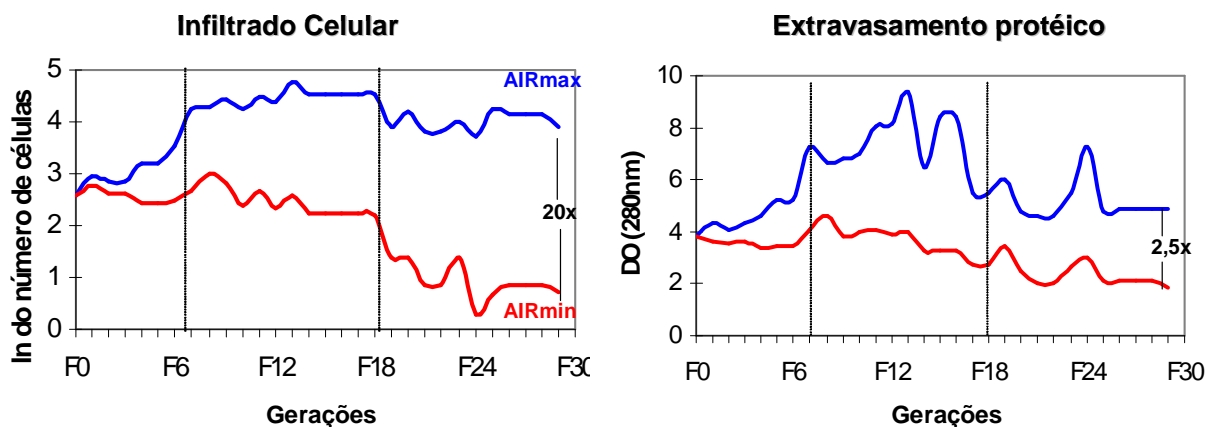
caracterizado por uma recombinação distinta de 12,5% do pool de genes de todas as linhagens isogênicas originais (IBAÑEZ *et al.*, 1992), conforme esquema abaixo:



A reação inflamatória aguda (AIR) foi produzida através da injeção subcutânea no dorso dos animais previamente depilados com uma suspensão de microesferas de Biogel P-100 que possuem uma porosidade com limite de exclusão para moléculas acima de 100 Kilodaltons, sendo um polímero quimicamente inerte, não biodegradável e não imunogênico. Os acasalamentos seletivos foram realizados através de cruzamentos baseados no valor fenotípico individual dos dois parâmetros investigados, medidos 24 horas após reação ao Biogel. Estes parâmetros são: quantidade de células infiltradas e concentração protéica no exsudato. O método quantitativo para avaliar a intensidade da reação inflamatória é baseado no modelo proposto por Robert Fauve e colaboradores (FAUVE *et al.*, 1983). As duas características estudadas são positivamente correlacionadas e possuem uma distribuição normal de freqüências o que permite a realização do processo de seleção (RIBEIRO, 1994; IBAÑEZ *et al.*, 1992; STIFFEL *et al.*, 1990).

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

A seleção de inflamação atualmente se encontra na 51ª geração, com uma divergência interlinhagens de 25 vezes para o infiltrado leucocitário e de 2,5 vezes para a concentração de proteína no exsudato. Este caráter é quantitativamente regulado por cerca de 7 a 11 *loci* gênicos, que segregaram independentemente e que são dotados de efeito aditivo (regulação poligênica) (BIOZZI *et al.*, 1998, IBAÑEZ *et al.*, 1992).



**Figura 2:** Gráfico representativo da divergência entre as linhagens AIR quanto ao número médio de leucócitos infiltrantes e extravasamento protéico no sítio de injeção do Biogel (Modificado de BIOZZI *et al.*, 1998, com permissão).

Em todas as gerações analisadas de ambas as linhagens, os leucócitos polimorfonucleares constituem o tipo celular predominante no exsudato, às células mononucleares são essencialmente monócitos e

pequenos linfócitos, estes últimos com contribuição desprezível (RIBEIRO *et al.*, 2003).

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 os alelos de "boa" resposta para o influxo celular e o exsudato protéico estão em homozigose na linhagem AIRmax, e os alelos de "má" resposta estão em homozigose na linhagem AIRmin (IBAÑEZ *et al.*, 1992).

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

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

Outro fenótipo que diferencia amplamente as linhagens é a sensibilidade à infecção por *Salmonella* Typhimurium. Os animais AIRmax são muito resistentes enquanto os animais AIRmin são muito suscetíveis, além disso foi observado um desequilíbrio de freqüência do alelo que confere suscetibilidade (S) do gene "*Natural resistanced-associated macrophage protein-1*" (*Nramp1*), estando presente em 60% nos animais AIRmin e em apenas 9% nos AIRmax, sugerindo que este desvio tenha ocorrido devido ao processo seletivo, e que o gene *Nramp1* ou algum outro gene muito próximo a ele no cromossomo 1, seria um dos QTL (*quantitative trait loci*) envolvidos na regulação da intensidade da reação inflamatória aguda (ARAÚJO *et al.*, 1998). Este desequilíbrio de freqüência também interferiu na evolução de artrite induzida pelo pristane (PIA) em animais AIRmax e AIRmin (PETERS *et al.*, 2007).

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

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

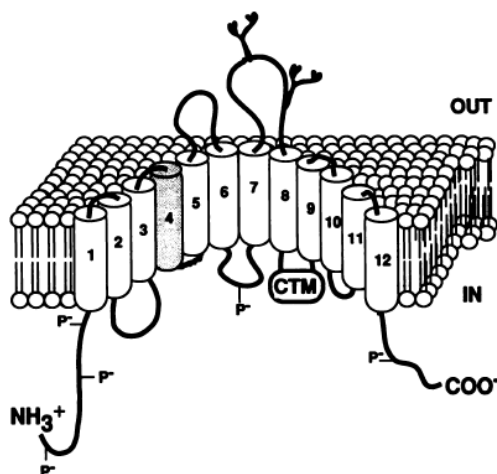
Em camundongos, a expressão do gene *Slc11a1* é encontrada no baço, fígado e peritônio (GOVONI e GROS, 1998) e em humanos, ocorre no pulmão, baço, fígado, e altamente expresso em leucócitos do sangue periférico. Além disso, a expressão do RNAm do gene *Slc11a1* pode ser estimulada pelo lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas (LPS) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), ou pelo estímulo inflamatório *in vivo* (CELLIER *et al.*, 1997; GOVONI *et al.*, 1997; VIDAL *et al.*, 1993).

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

Existe uma homologia entre o gene *Slc11a1* murino localizado no cromossomo 1 e o gene *SLC11A1* humano localizado no cromossomo 2. Ambos codificam uma proteína de membrana altamente hidrofóbica de aproximadamente 60 kDa, com características de uma proteína integral de membrana, que possui 12 domínios transmembrânicos, uma alça extracitoplasmática glicosilada, com vários sítios de fosforilação (BLACKWELL *et al.*, 1995; CELLIER *et al.*, 1995; VIDAL *et al.*, 1993), além de uma 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 (**Figura 3**) (CELLIER *et al.*, 1995).



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

**Figura 3:** Figura representativa da proteína de membrana codificada pelo gene *Slc11a1*.

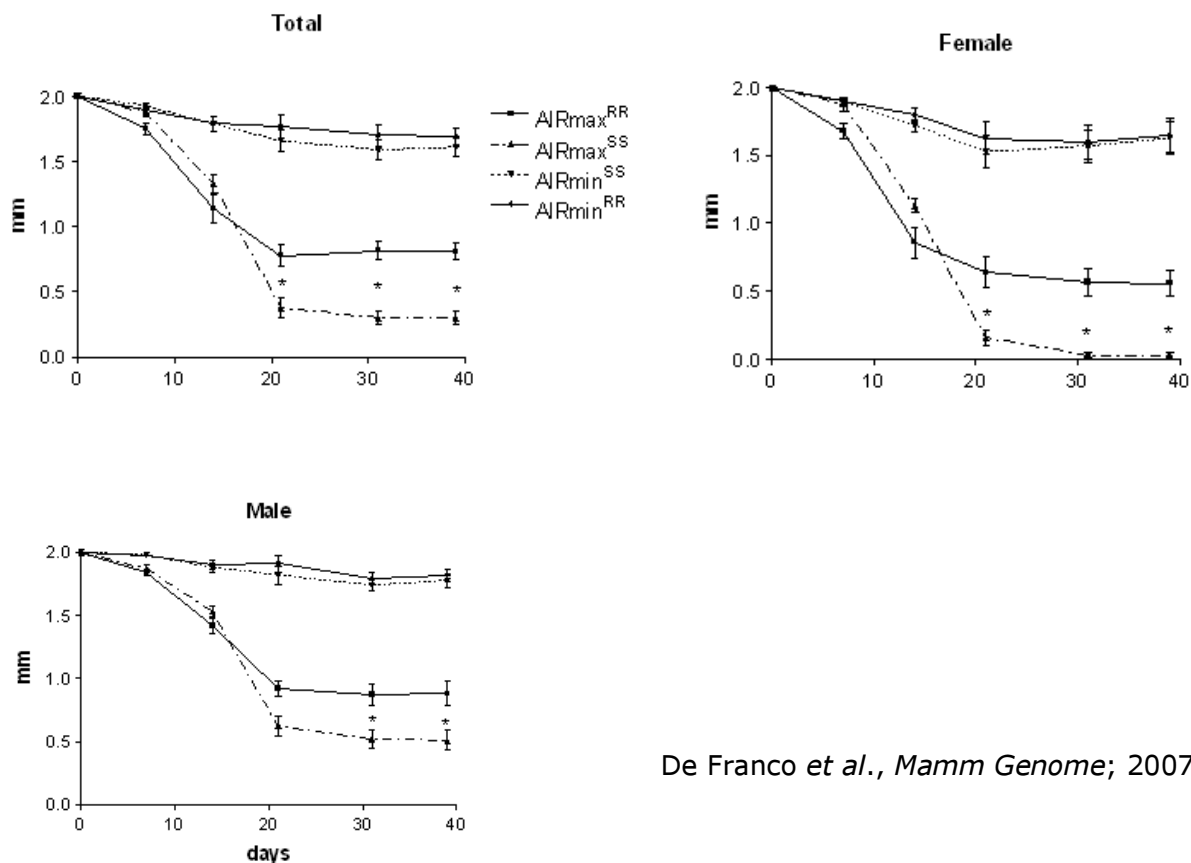
Quanto à função bioquímica desta proteína existem algumas controvérsias, porém, duas teorias são sugeridas: uma seria que o animal portador do alelo R, ou seja, que codifica a proteína funcional do gene *Slc11a1*, favoreceria a reação Fenton/Harber-Weiss por meio do transporte de ferro para o interior do fagolisossomo, gerando radicais hidroxilas altamente tóxicos para a bactéria (KUHN *et al.*, 2001), e a segunda teoria propõe que o macrófago do animal que não apresenta a mutação do gene realizaria o transporte de íons eficientemente para fora do fagolisossomo disponibilizando  $\text{Fe}^{+2}$  e cátions divalentes como  $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  essenciais para o crescimento bacteriano (WYLLIE *et al.*, 2002).

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

Com o intuito de estudar a participação do gene *Slc11a1* como um possível QTL regulador da intensidade da resposta inflamatória aguda (AIR), o efeito modulador deste gene no desenvolvimento da artrite induzida por pristane (PIA), e a infecção por *S. Typhimurium*, foram produzidas sublinhagens de camundongos homocigotos para os alelos R e S deste gene, chamadas de AIRmax<sup>RR</sup>; AIRmax<sup>SS</sup>; AIRmin<sup>RR</sup>; AIRmin<sup>SS</sup>. 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; BORREGO *et al.*, 2006).

Estes animais mantiveram os fenótipos de inflamação e o fundo genético heterogêneo, pois a produção das sublinhagens não afetou a capacidade de máxima e mínima resposta inflamatória aguda dos animais AIRmax e AIRmin, respectivamente. Além disso, as sublinhagens apresentaram o mesmo padrão de polimorfismos identificados nas linhagens parentais AIRmax e AIRmin para microssatélites analisados no cromossomo 1 (PETERS *et al.*, 2007; BORREGO *et al.*, 2006).

Estudos com o objetivo de verificar a relação de *loci* inflamatórios com o fenótipo de regeneração foram realizados, indicando que a variabilidade deste fenótipo é altamente influenciada pela interação de QTL de inflamação aguda, localizados no cromossomo 1 e 14. Camundongos da sublinhagem AIRmax<sup>SS</sup> apresentaram potente regeneração de suas orelhas comparável a linhagem de camundongo isogênico MRL, diferente dos animais AIRmax<sup>RR</sup> que exibiram regeneração tardia, sugerindo o envolvimento do gene *Slc11a1*, ou algum outro gene próximo a ele, no controle genético do fenótipo de regeneração, enquanto AIRmin<sup>RR</sup> e AIRmin<sup>SS</sup> apresentaram apenas reparo tecidual parcial da orelha e nenhum indício de regeneração. Animais AIRmax<sup>SS</sup> fêmeas e AIRmax<sup>SS</sup> machos também apresentaram diferenças no reparo tecidual (DE FRANCO *et al.*, 2007) (**Figura 4**).



De Franco et al., *Mamm Genome*; 2007.

**Figura 4:** Avaliação de regeneração tecidual em diferentes períodos nos camundongos das sublinhagens AIRmax e AIRmin homocigotos para os alelos do gene *Slc11a1*. Perfurações de 2mm foram feitas nas orelhas dos camundongos e o fechamento do orifício foi observado durante 40 dias. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,05$ .

Portanto, esses dados revelam que a diferença de regeneração à perfuração das orelhas observada em animais AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> apresentam-se como um modelo experimental muito interessante para o estudo dos mecanismos envolvidos na fase inicial do processo de regeneração tecidual.

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo geral é estudar a interação do gene *Slc11a1* com os *loci* reguladores da resposta inflamatória, avaliando os mecanismos genéticos e celulares envolvidos na fase inflamatória da regeneração tecidual nos animais AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>.

### **2.1 Objetivos específicos:**

- Avaliar a resposta inflamatória local devido à perfuração executada na orelha dos camundongos por meio da formação de edema, quantificação da enzima MPO e caracterização das populações celulares;
- Investigar os genes diferencialmente expressos durante o processo de regeneração tecidual por meio de expressão gênica global, e sua sobre-representação em temas biológicos;
- Validar os genes diferencialmente expressos por meio de experimentos de reação de polimerização em cadeia quantitativos, e analisar alguns genes envolvidos durante a fase inflamatória do processo regenerativo.

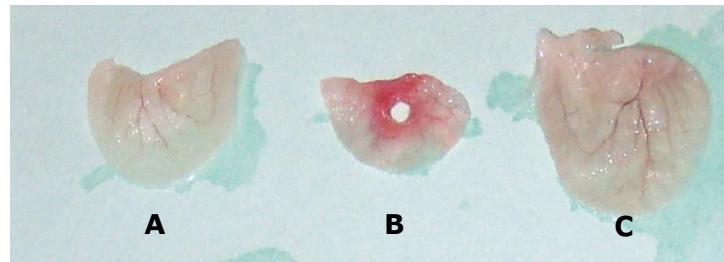
### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Camundongos**

Foram utilizados os camundongos das sublinhagens homozigotas para os alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1*: AIRmax *Slc11a1*<sup>RR</sup> (AIRmax<sup>RR</sup>) e AIRmax *Slc11a1*<sup>SS</sup> (AIRmax<sup>SS</sup>) produzidos através de cruzamentos assistidos por genotipagem. Fêmeas e machos de aproximadamente 2 a 4 meses foram utilizados nos experimentos. Estes animais são produzidos e mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Este projeto está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEEA).

#### **3.2 Indução ao processo de regeneração tecidual**

A indução ao processo de regeneração tissular foi desenvolvida por um modelo proposto pelo laboratório Jackson, no qual uma perfuração de aproximadamente 2 mm de diâmetro foi executado experimentalmente na orelha dos camundongos por meio de um perfurador (Fisher) e o processo regenerativo acompanhado durante 40 dias (**Figura 5**). O processo de perfuração da orelha é uma técnica microcirúrgica aceita em relação à saúde do animal, além disso, é uma técnica minimamente invasiva, e aparentemente indolor.



**Figura 5:** Representação do processo de regeneração tissular em camundongos AIRmax<sup>SS</sup>. A figura A representa a orelha de um animal controle, a figura B uma orelha excisada após 48 horas de perfuração, e a figura C a orelha completamente regenerada após 40 dias.

### 3.3 Teste para verificação de edema

A formação do edema foi avaliada nos dias 0, 1, 2, 3, 4 e 5 nas orelhas de camundongos das sublinhagens AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>, e o aumento na espessura da orelha foi mensurado antes e após a indução do processo de regeneração utilizando um micrômetro analógico (Starrett). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e a espessura expressa em média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.4 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase

Para a quantificação da mieloperoxidase (MPO) as orelhas dos animais foram primeiramente seccionadas com o auxílio de uma tesoura e depositadas em tubos contendo 1ml de HTAB 0,5% (250mg Brometo de hexadeciltrimetilamônio, 92,5 mg de EDTA e 50 ml de tampão fosfato). Os tecidos foram homogeneizados em Polytron (Brinkmann Instruments) e as amostras centrifugadas por 10 minutos a 27.000 g a 4 °C. Pipetou-se 10  $\mu$ l da amostra em duplicata na placa de 96 wells e em seguida 200 $\mu$ l de tampão substrato (2 ml de orto-dianisidina, 200  $\mu$ l de solução H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1% e 39 ml de tampão fosfato). Deixou-se a solução agir por 5 minutos e então foram adicionados 50  $\mu$ l de azida diluída (2 ml de azida e 6 ml de H<sub>2</sub>O destilada) para bloquear a reação. Para o branco, só foram utilizados

200 µl de tampão substrato. A leitura foi feita a 450 nm em leitor de ELISA (µQuant – Bio-Tek Instruments).

### **3.5 Extração de RNA (RNAspin Mini Kit da GE Healthcare)**

O RNA foi extraído das orelhas de animais controles (sem estímulo) e nos submetidos à injúria após 6, 24 e 48 horas.

As orelhas foram retiradas e colocadas em nitrogênio líquido. Para que ocorresse lise celular, 350 µl de tampão RA1 e 3,5 µl de β-mercaptoetanol foram adicionados às orelhas. As amostras foram então posteriormente submetidas ao vórtex vigorosamente.

Após a lise, as amostras foram filtradas por um mini filtro RNAspin e centrifugadas durante 1 minuto a uma velocidade de 13.000 g. Em seguida, o filtro foi descartado e o filtrado transferido para um novo tubo coletor de 1,5 ml.

Para o ajuste das condições de ligação do RNA foi colocado junto ao filtrado 350 µl de etanol 70% e estes foram submetidos ao vórtex de 2 a 5 segundos.

Na etapa posterior, a de ligação do RNA, as amostras foram homogeneizadas de 2 a 3 vezes e colocadas em uma nova coluna de RNAspin localizadas dentro de um tubo coletor de microcentrífuga de 2 ml, logo em seguida, foram centrifugadas durante 30 segundos a uma velocidade de 8.000 g. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor.

Para a obtenção da dissalinização da membrana de sílica, foi adicionado às amostras 350 µl de MDB (membrane desalting buffer) e então foram centrifugadas a 11.000 g durante 1 minuto para a secagem da membrana. A remoção do sal promove uma melhor digestão pela DNaseI.

Na fase de digestão do DNA foi aplicado 95 µl de reação da DNase (10 µl de DNaseI reconstituted + 100 µl do tampão de DNase) no centro

da membrana de sílica da coluna. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos.

Posteriormente, as membranas de sílica foram lavadas e secas. Para este procedimento, 3 etapas foram requeridas. Na primeira lavagem, 200 µl de tampão RA2 (tampão que inativa a DNaseI) foi adicionado à coluna RNAspin, esta foi então centrifugada durante 1 minuto a 11.000 g. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para dentro de um novo tubo coletor.

Em seguida, na segunda lavagem, foram adicionados à coluna RNAspin 600 µl de tampão RA3, e novamente as colunas foram centrifugadas durante 1 minuto na velocidade de 11.000 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a coluna colocada de volta dentro do tubo coletor.

Na terceira e última lavagem, foram adicionados 250 µl de tampão RA3 na coluna RNAspin. Para garantir que a membrana ficasse completamente seca, mais uma centrifugação foi necessária, agora durante 2 minutos a uma velocidade de 11.000 g. Ao término deste procedimento, a coluna foi colocada dentro de um tubo nuclease free de 1,5 ml. Para a eluição do RNA presente na membrana da coluna foi adicionado 50µl de água livre de RNA diretamente sobre a membrana, que foi centrifugada por 1 minuto a 11.000 g.

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 nm/280 nm) e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris-base 1M, ácido bórico 1M e EDTA 20 nM) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BET) (Pharmacia). O gel contendo as amostras foi colocado em cuba eletroforética, recoberto com tampão TBE e foi submetido a uma corrente elétrica de 80 V por cerca de 30 minutos. Após este período o gel foi analisado no "Pharmacia Biotech –



Image Master VDS” para a avaliação da presença das bandas de integridade do DNA.

### **3.6 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 mM) 2 µl de água livre de RNase, 1 µl de oligonucleotídeos dNTP (10 mM), a mistura foi homogeneizada e submetida a temperatura de 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 MgCl<sub>2</sub>), 1µl de DTT (0,1M) e 1 µl da enzima SuperScript III RNase H- Reverse Transcriptase – Invitrogen (200 U/ml), as amostras foram aquecidas a 50 °C por 50 minutos e inativadas a 70 °C por 15 minutos. As reações foram incubadas em aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200.

Para a amplificação dos cDNA específicos aos mRNA codificantes, foram utilizadas as seqüências sintéticas (*primers*). Estes *primers* foram desenhados para éxons que flanqueiam íntrons de grande tamanho (1000 pb) evitando assim a amplificação do DNA genômico (**Tabela 1**).

**TABELA 1-Sequência de primers utilizados na síntese do RNAm.**

<b>Primers</b>	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
<i>β2microglobulina</i>	5'-TGACCGGCTTGATGCTATC-3'	5'-CAGTGTGAGCCAGGATATAG-3'
<i>Tnfa</i>	5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3'	5'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'
<i>Il6</i>	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3'	5'-TGTACTIONCAGGTAGCTATGG-3'
<i>Il1b</i>	5'-TTGACGGACCCCAAAGATG-3'	5'-AGAAGGTGCTCATGTCCTCA3'
<i>Tgfb1</i>	5'-ACCGCAACAACGCCATCTAT-3'	5'-GTAACGCCAGGAATTGTTGC-3'
<i>Il8rb</i>	5'-GACTGTTACCTAACCGGTG-3'	5'-CATACCAAGATGGAAGGGAGC-3'
<i>Cxcl2</i>	5'-CCTGGTTCAGAAAATCATCCA-3'	5'-CTTTGGTCTTCCGTTGAGG-3'
<i>Dap12</i>	5'-CAGGATGGAAGAGCACAACA-3'	5'-GGGAAGTTCACCCTGAAACA3'
<i>Trem1</i>	5'-CAGGATGGAAGAGCACAACA-3'	5'-GGGAAGTTCACCCTGAAACA-3'
<i>Trem2</i>	5'-AGAGTGTGGTGACGGTTCC-3'	5'-TATGACGCCTGAAGCACTG-3'
<i>Mmp9</i>	5'-CGCTACTGTACCCGCTGTAT-3'	5'-TGGGACACATAGTGGGAGGT-3'

### 3.7 Análise de expressão gênica global

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)** Hibridação do alvo; **3)** Lavagem e marcação dos *arrays*; **4)** Escaneamento do *array* e **5)** Análise dos dados.

#### 3.7.1 Preparação dos mRNAs bacterianos

Uma solução de mRNAs bacterianos é utilizada como controle interno da lâmina, que possui seqüências que se hibridarão 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/ $\mu$ l, através da adição de 3  $\mu$ l da "solução estoque 1" somado a 997  $\mu$ l de água livre de nuclease. A partir desta solução foi realizada a solução de trabalho, onde 2  $\mu$ l da solução estoque 2 foi adicionada a 998  $\mu$ l de água livre de nuclease.

### **3.7.2 Síntese do cDNA de fita simples**

Para cada amostra de RNA total (2  $\mu$ g em 9  $\mu$ l) adicionamos 1  $\mu$ l (concentração de 0,1 pg/ $\mu$ l) da solução de trabalho de mRNAs bacterianos controles (1  $\mu$ l para cada 1  $\mu$ g de RNA total), 1  $\mu$ l 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  $\mu$ l do tampão fita simples 10X, 4  $\mu$ l de dNTP (5 mM), 1  $\mu$ l de inibidor de RNase e 1  $\mu$ l de transcriptase reversa. Essa solução de volume final de 20  $\mu$ l foi incubada durante 2 horas a 42 °C no aparelho termociclador (Eppendorf – Mastercycler Gradient ou MJ Research PTC 200).

### **3.7.3 Síntese do cDNA de fita dupla**

Os tubos da reação anterior foram mantidos em gelo, e receberam 63  $\mu$ l de água livre de nuclease, 10  $\mu$ l do tampão fita dupla 10X, 4  $\mu$ l de dNTP (5mM), 2  $\mu$ l de DNA polimerase e 1  $\mu$ l de RNase H. Essa solução de volume final de 80  $\mu$ l 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 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 11.000 g por 1 minuto. Em seguida, a coluna foi lavada com adição de 500 µl de tampão de lavagem e centrifugada a 11.000 g por 1 minuto. Após este procedimento, a coluna foi seca com uma nova centrifugação a 11.000 g 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 11.000 g por 1,5 minutos. Esse passo foi repetido para gerar pelo menos 20 µl de eluato final.

### **3.7.5 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.

### **3.7.6 Purificação do cRNA**

A purificação do cRNA foi feita através da utilização do kit CodeLink™ iExpress iPurify cDNA/cRNA Purification (GE Healthcare). Os volumes dos tubos foram ajustados para 100 µl, através da adição de 60 µl de água livre de nuclease. Foram adicionados 350 µl de tampão de ligação para cRNA e em seguida, foram adicionados 250 µl de etanol 100% e as amostras foram colocadas imediatamente na coluna e centrifugadas por 1 minuto a 8.000 g. 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 11.000 g 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 1M, ácido bórico 1M e EDTA 20 nM) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BET) (Pharmacia). O gel contendo as amostras foi colocado em 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" abaixo da banda 18s do RNA íntegro (controle).

### **3.7.7 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.

### **3.7.8 Hibridação**

Após transferir as amostras para um tubo de 1,5 ml foram adicionados 78 µl de tampão de hibridação A, 130 µl de tampão de

hibridação 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 3 g e a 37 °C, onde permaneceram por 18 horas.

### **3.7.9 Detecção com Cy5-Streptavidina**

A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão TNT 0,75X (Tris-HCl pH 7,6, NaCl 5M e 0,05% Tween 20) e colocadas em outro recipiente de tampão TNT 0,75X pré-aquecido a 46 °C por exatamente 1 hora, depois são colocadas em um recipiente com Cy5-streptavidina (1:500) em tampão TNB (Tris-HCl pH 7,6, NaCl 5M 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 g por 3 minutos.

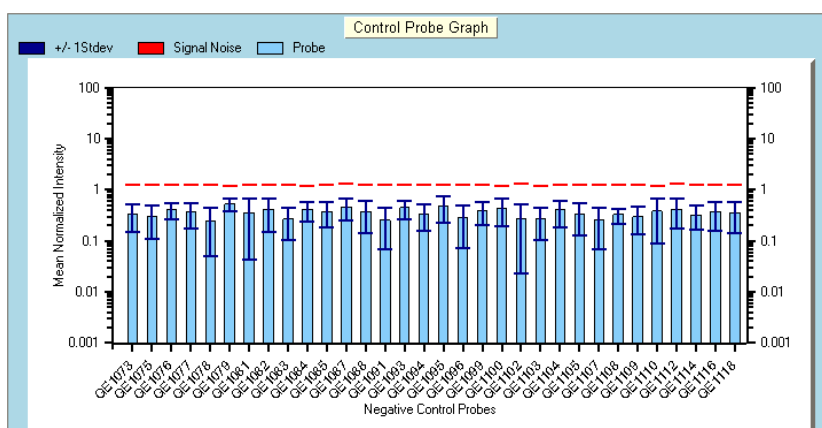
### **3.7.10 Análise dos dados obtidos**

As lâminas foram analisadas com o "*GenePix Array Scanner*". O estudo de expressão gênica foi realizado com a plataforma *CodeLink Gene Expression System* (GE Healthcare), que é composta por lâminas contendo oligonucleotídeos representando cerca de 36.000 genes distintos, com seqüências catalogadas em banco de dados (NCBI). Esta plataforma utiliza um sistema de detecção de cor única, baseado na incorporação indireta de apenas um fluorocromo para a marcação das amostras. Este sistema elimina resultados falsos decorrentes de parâmetros enzimáticos, que afetam a frequência de incorporação de fluorocromos distintos, ou relativos à sobreposição espectral de duas

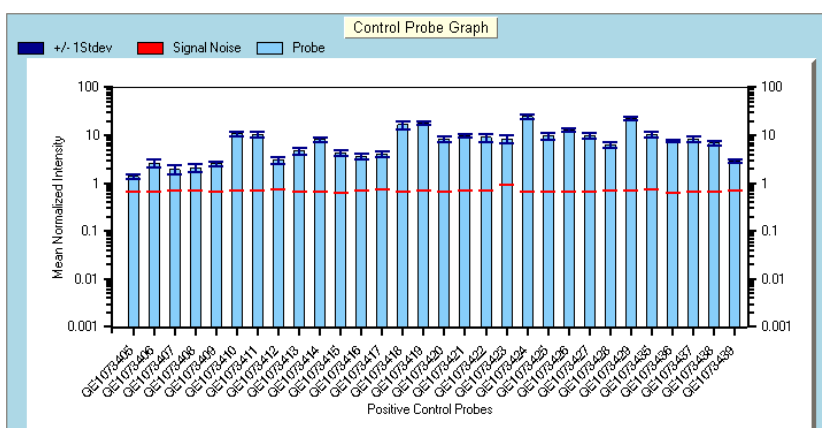
fluorescências. Os dados de expressão extraídos de cada *microarray* foram normalizados de acordo com os valores de fluorescência dos genes de expressão constitutiva, presentes nos chips como controles internos.

Os primeiros parâmetros avaliados foram os controles internos, que se apresentaram repetidos de maneira aleatória por toda a lâmina. Na **Figura 6**, estão os controles negativos bacterianos que possuem a expressão gênica abaixo da fluorescência de fundo ou ruído da lâmina.

Na **Figura 7** estão demonstrados os controles positivos, os quais apresentaram expressão gênica acima da fluorescência de fundo. Estes resultados certificam a qualidade dos experimentos desenvolvidos.



**Figura 6:** Controles negativos da lâmina de *microarray*. As expressões dos controles internos da lâmina estão abaixo da fluorescência de fundo.



**Figura 7:** Controles positivos da lâmina de *microarray*. As expressões dos controles internos da lâmina estão acima da fluorescência de fundo.

Genes expressos diferencialmente foram identificados pelas razões dos valores de intensidade fluorescente obtidos a partir de amostras controles e experimentais entre as linhagens, pelo programa *CodeLink Expression* v.2.3 (GE Healthcare). Critérios para definição de valores de *cut-off* para identificar genes diferencialmente expressos serão baseados em parâmetros biológicos (ex. razões  $\geq 2$  ou  $\leq 0.5$ ). Para as análises de agrupamentos funcionais foi utilizado o software 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 GenBank) um único gene pode ter mais de uma identificação. Para calcular a significância das categorias, o programa utiliza um teste estatístico chamado "EASE score". Esse teste nada mais é do que um teste exato de Fisher modificado, onde é penalizada a categoria composta por poucos genes (chamadas "instáveis") em favor de categorias representadas por um maior número de genes, levando em consideração a perspectiva dos temas globais biológicos, minimizando a possibilidade de falsos-positivos. É, portanto, um teste mais restritivo (HOSACK et al., 2003).

### **3.8 Quantificação de expressão gênica relativa por PCR em Tempo-Real**

Foi avaliada a expressão de genes envolvidos durante a fase inicial do processo de regeneração tissular descritos na literatura e os que se



apresentaram diferencialmente expressos nas análises de expressão gênica global, os cDNA obtidos das orelhas de AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> foram quantificados por meio de reações de PCR em Tempo Real (qPCR) para os genes candidatos.

Cada amostra 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.

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 incorporada ao material dupla fita amplificado a cada ciclo e efetuada da etapa final.

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

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

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

Para quantificar os resultados obtidos pelo qPCR foi utilizado o Método de *Threshold* Comparativo (Giuliett *et al.*, 2001; Livak *et al.*, 2001). Neste método, fórmulas aritméticas são 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  $\Delta Ct$  representam o valor de Ct do gene alvo (experimental ou controle) subtraído do valor de Ct do gene constitutivo ( *$\beta 2$  microglobulina*). Os valores de  $\Delta Ct$ , obtidos individualmente para as amostras de animais controle e experimentais, foram submetidos ao método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito por Livak e colaboradores (2001), que permite avaliar o efeito do tratamento experimental em relação a um controle interno. Na utilização deste método, torna-se importante a avaliação da eficiência dos *primers*, eficiência na qual deve estar próxima de 100%. Isto é possível através do cálculo da regressão linear entre diluições seriadas das amostras de RNA e o valor individual de Ct.

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

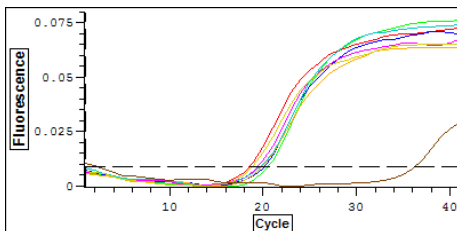
Portanto, aos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  das amostras individuais foram então realizadas as médias e desvio padrão para cada sublinhagem analisada e aos seus respectivos grupos controle. Os gráficos apresentados nos resultados demonstram as quantidades iniciais de RNA mensageiro entre os animais experimentais e controle, lembrando que destas amostras foi subtraído o valor do gene constitutivo  *$\beta 2$  microglobulina*.

A **Figura 8** abaixo, exemplifica a amplificação da  *$\beta 2$  microglobulina* nas amostras experimentais e controle bem como as respectivas curvas de *Melting*. Observa-se que não existe variação no Ct (*Cycle Threshold*) de animais controle e estimulados, pois as curvas aparecem e permanecem juntas durante todo o ciclo de amplificação indicando que o tratamento não interfere na expressão do gene constitutivo.

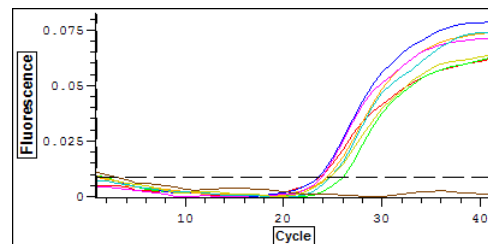
O mesmo é verificado nas curvas de *Melting*, em que as amostras apresentaram um único pico de dissociação, evidenciando que todas as duplas fitas do material analisado separam-se na mesma temperatura, isso indica a amplificação de uma banda específica de mesmo tamanho ( $\beta 2$  microglobulina).

### 1) Cycle Threshold

#### $\beta 2$ microglobulina

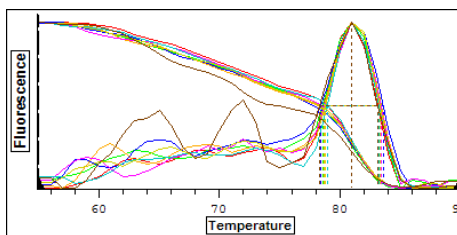


#### Citocina

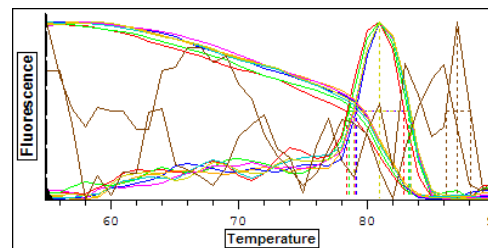


### 2) Curva de Melting

#### $\beta 2$ microglobulina



#### Citocina



**Figura 8:** qPCR exemplificando a quantificação da  $\beta 2$  microglobulina e de citocina na orelha de alguns animais das sublinhagens AIRmax<sup>RR</sup>, AIRmax<sup>SS</sup> controles e experimentais. Ensaio realizado no Chromo 4 (MJ Research) utilizando Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen).

### 3.9 Análise Estatística

As significâncias entre as médias foram estabelecidas pelo teste *t Student*, paramétrico e não pareado, sendo adotado o nível mínimo de 5% de probabilidade.

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

As análises de correlação foram realizadas por meio da função de Pearson, que estuda a relação e o grau de associação de duas ou mais variáveis.

## **4 RESULTADOS**

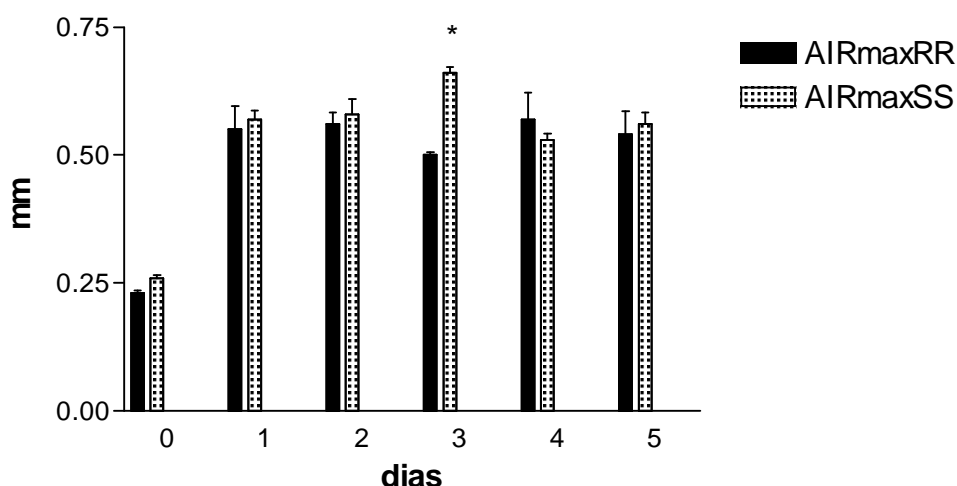
### **4.1 Avaliação de edema nas orelhas de camundongos**

Esta avaliação foi realizada com o intuito de evidenciar possíveis diferenças na resposta inflamatória local entre animais regeneradores das sublinhagens AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>. Para isso, a espessura das orelhas foi determinada antes da indução ao processo de regeneração (dia 0), e após este processo, nos dias 1, 2, 3, 4 e 5.

Logo no primeiro dia de avaliação ocorreu uma intensa resposta inflamatória em ambas as sublinhagens por conta do estímulo, e esse mesmo perfil de resposta foi observado no dia 2 e 5 da cinética.

Contudo, valores máximos na formação de edema foram encontrados no terceiro dia do experimento. Um inchaço significativamente maior nas orelhas dos camundongos AIRmax portadores do alelo *S* comparado as orelhas dos camundongos portadores do alelo *R* foi observado neste período.

No dia 4, os animais AIRmax não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (**Figura 9**).



**Figura 9:** Cinética do aumento na espessura da orelha em camundongos AIRmax portadores dos alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* induzidos ao processo de regeneração tecidual. Foram utilizados animais experimentais e controles (n=3). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,05$  – entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>.

#### 4.2 Quantificação da enzima mieloperoxidase

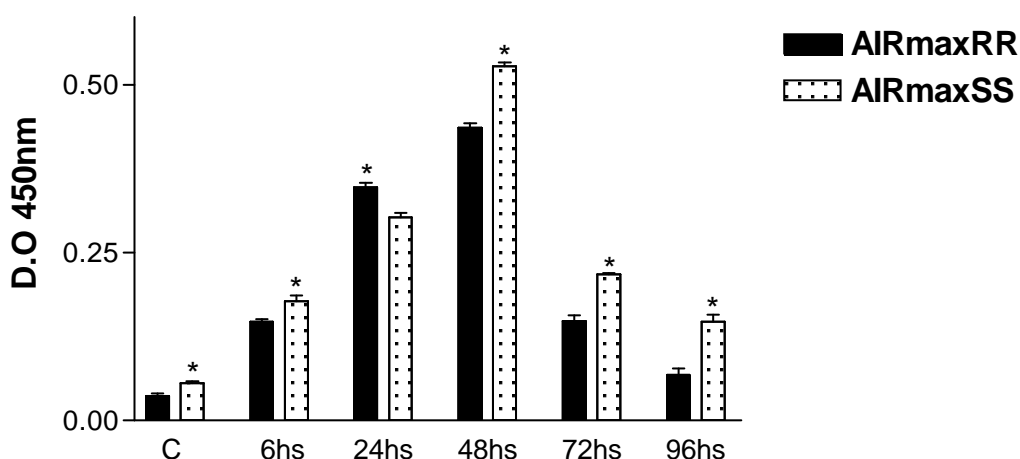
É sabido que neutrófilos são as primeiras células que migram para um local inflamado iniciando uma resposta local.

Para avaliar a fase inflamatória nos animais AIRmax das sublinhagens para os alelos do gene *Slc11a1*, foram realizados ensaios nos períodos de 6, 24, 48, 72 e 96 horas pós injúria com o intuito de quantificar a enzima MPO, a qual é considerada um marcador indireto de neutrófilos ativados. Para tanto, os animais foram submetidos ao protocolo de regeneração tecidual, como descrito em Materiais e Métodos.

Podemos observar abaixo, na **Figura 10**, uma diferença nos níveis de MPO que já pode ser notada no período de 6 horas entre os animais controles e entre os animais experimentais. Neste período, uma modulação de resposta a favor do alelo *S* foi observada, e esta diferença apresentou-se estatisticamente significativa. No período estudado de 48 horas, ambas as sublinhagens atingiram os valores máximos desta enzima, e novamente, os animais AIRmax<sup>SS</sup> exibiram níveis aumentados e

significativos do que os AIRmax<sup>RR</sup>. A partir de 72 e 96 horas de injúria, um declínio nas quantidades da enzima foi detectado, cuja resposta dos animais AIRmax<sup>RR</sup> retornou aos níveis basais em 96 horas após injúria e dos animais AIRmax<sup>SS</sup> ainda se manteve maior em relação aos animais portadores do alelos *R*.

Com 24 horas de experimento, um resultado diferente de todos os outros estudados nesta cinética ocorreu. Neste período, camundongos AIRmax<sup>RR</sup> exibiram níveis altos e significativos da enzima MPO comparados aos dos camundongos AIRmax<sup>SS</sup>, que nos três períodos anteriormente analisados, apresentaram maiores quantidades desta enzima, conforme representado na **Figura 10**.



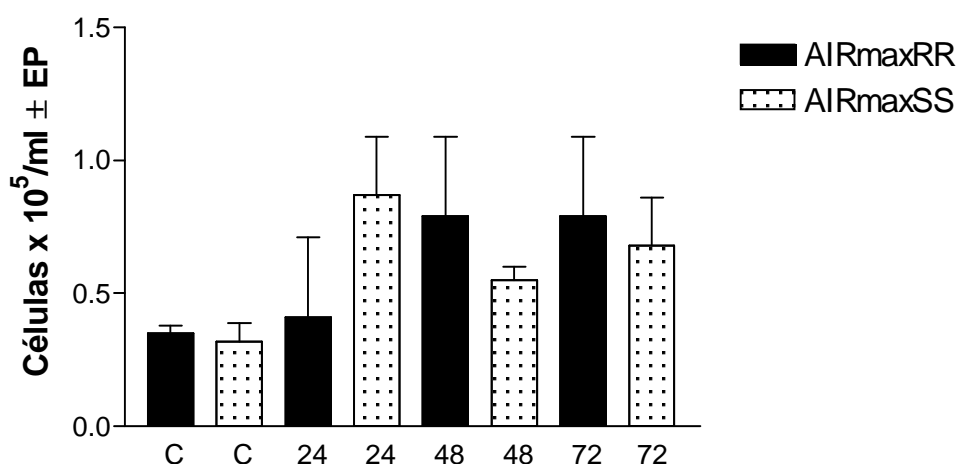
**Figura 10:** Quantificação da mieloperoxidase presente na orelha de camundongos AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>, em resposta ao protocolo de indução a regeneração tecidual. Foram utilizados animais experimentais e controles (n=4). Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,05$  – entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>.

### 4.3 Caracterização de populações celulares presentes na derme da orelha

O estudo da caracterização das populações celulares foi desenvolvido para que pudéssemos constatar quais seriam as populações celulares presentes nas orelhas dos camundongos após lesão, pois em

experimentos anteriores relacionados à resposta inflamatória local, como avaliação de edema e quantificação da enzima MPO, os animais das sublinhagens exibiram um perfil de resposta diferenciado após estímulo.

Com relação ao número total de células infiltrantes no local da lesão, observamos um número baixo de células na orelha após perfuração em ambas sublinhagens conforme demonstrado na **Figura 11**.



**Figura 11:** Cinética do número de células presentes na orelha de camundongos AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> após perfuração. Foram utilizados animais experimentais e controles (n=4). Os valores estão expressos como média ± erro padrão. \* p<0,05 – entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> dentro do respectivo período.

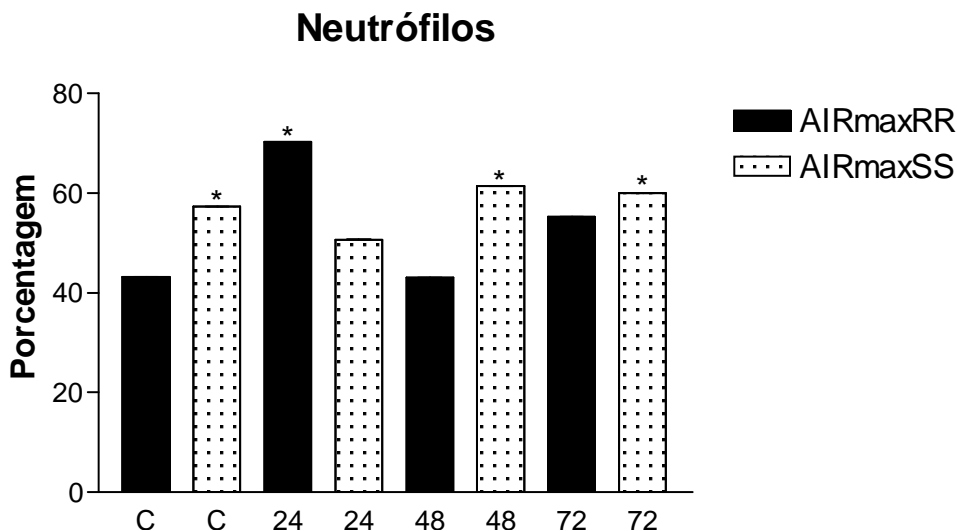
Quanto à caracterização das populações celulares, constatamos populações neutrofílicas e mononucleares no infiltrado da orelha em resposta ao estímulo (**Figuras 12 e 13**).

Durante as primeiras 24 horas de injúria, o perfil celular observado nas orelhas dos animais AIRmax<sup>RR</sup> foi predominantemente de neutrófilos, enquanto que o perfil observado neste período em animais AIRmax<sup>SS</sup> foram células mononucleares.

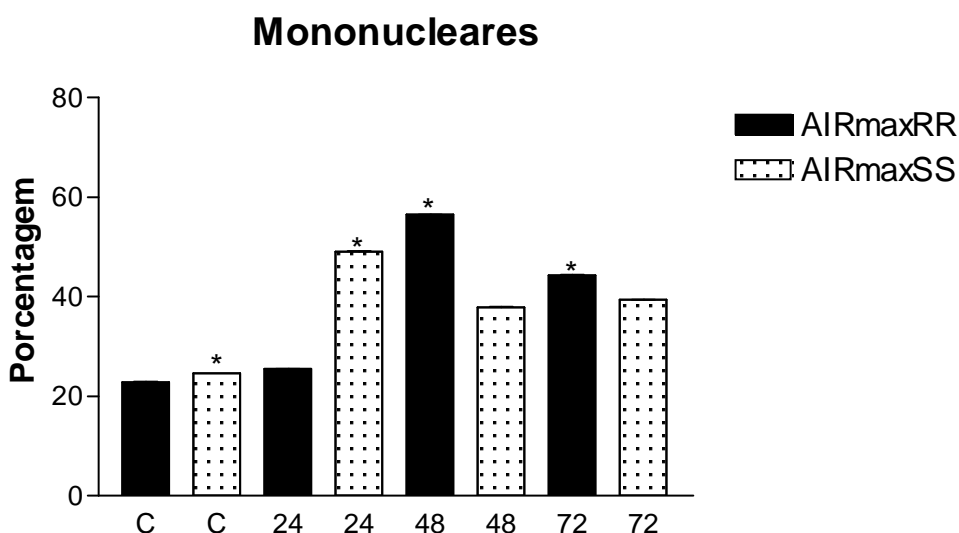
Nos períodos avaliados posteriormente, 48 e 72 horas, uma inversão da resposta obtida em 24 horas foi observada em ambas as sublinhagens, ou seja, camundongos AIRmax<sup>RR</sup> exibiram predominância de células monocíticas no local da lesão nestes dois outros períodos, enquanto



camundongos da sublinhagem AIRmax<sup>SS</sup> apresentaram infiltrado neutrofílico (**Figuras 12 e 13**).



**Figura 12:** Cinética do número de neutrófilos infiltrantes na orelha de camundongos AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> após perfuração. Foram utilizados animais experimentais e controles (n=4). Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da porcentagem de células. \* p<0,05 – entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>.



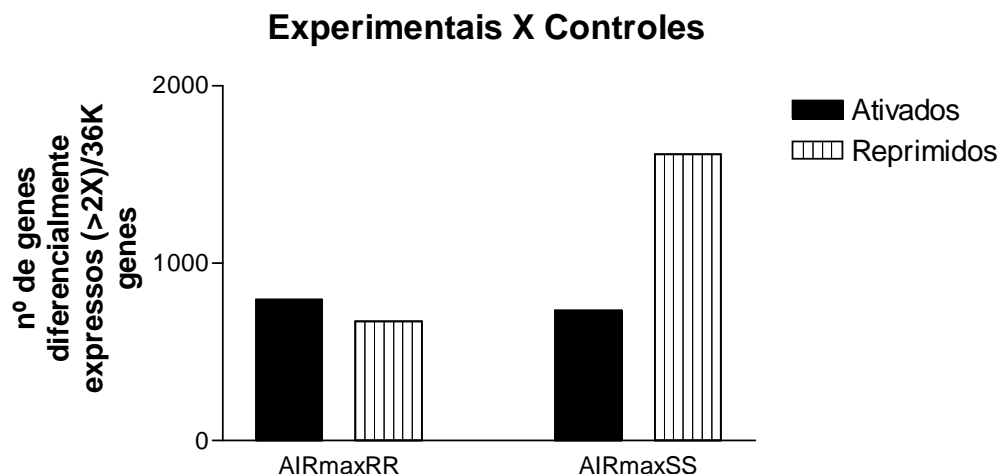
**Figura 13:** Cinética do número de células mononucleares infiltrantes na orelha de camundongos AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> após perfuração. Foram utilizados animais experimentais e controles (n=4). Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da porcentagem de células. \* p<0,05 – entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>.

#### 4.4 Estudo da expressão gênica global

A análise de expressão gênica global foi desenvolvida com a intenção de identificar, em um primeiro estudo, genes que são diferencialmente expressos entre os animais AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> e, em seguida, validar os resultados encontrados por meio de PCR em tempo real – qPCR.

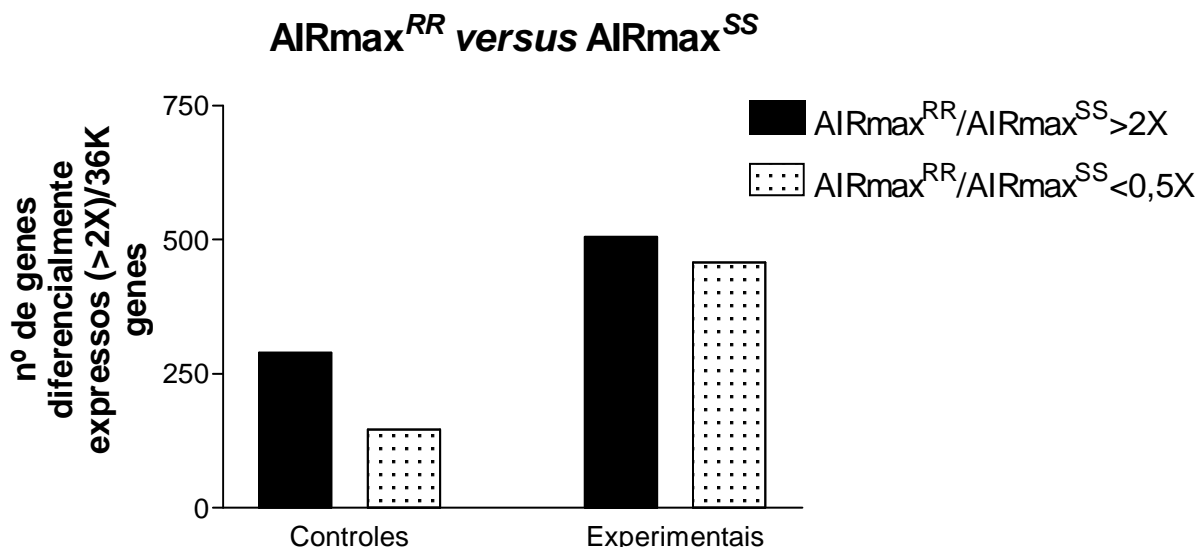
Esse ensaio de hibridação foi realizado 48 horas após a indução da injúria na orelha dos camundongos, e como procedimento utilizamos a plataforma *CodeLink Gene Expression System* (GE Healthcare) (descrita nos Materiais e Métodos).

Nesta primeira análise foi avaliada a modulação dos genes em ambas as sublinhagens para os alelos do gene *Slc11a1*. Animais AIRmax<sup>RR</sup> apresentaram 794 genes ativados, enquanto os animais AIRmax<sup>SS</sup> apresentaram 735 como podemos observar abaixo, na **Figura 14**. Analisando os genes que estavam reprimidos, uma resposta muito interessante e informativa foi observada, 1616 genes reprimidos foram identificados nas orelhas perfuradas dos camundongos AIRmax<sup>SS</sup>, sendo que apenas 674 apareceram reprimidos nas orelhas perfuradas dos AIRmax<sup>RR</sup>. Isso resulta em uma diferença de quase 3 vezes para a repressão de genes envolvidos no início do processo de regeneração após 48 horas de injúria.



**Figura 14:** Número de genes ativados e reprimidos nas orelhas dos animais AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> experimentais em relação aos animais controles. Os animais experimentais foram submetidos ao protocolo de regeneração tecidual durante um período de 48 horas, enquanto os animais controles não receberam nenhum estímulo. Neste experimento foram utilizados *pools* de 8 animais.

Outra análise foi realizada com o intuito de avaliar quantos genes estariam modulando o fenótipo de regeneração tecidual, após 48 horas de injúria na orelha dos camundongos. No total, 435 genes se expressaram diferencialmente nos animais controles, sendo que 289 foram expressos em maior nível (>2X) nos animais portadores do alelo R e 146 nos portadores do alelo S, como demonstrado na **Figura 15**. Quando os animais foram submetidos ao protocolo de regeneração tecidual, eles passaram a expressar diferencialmente, em números totais, 955 genes, ou seja, mais que o dobro de genes expressos em comparação aos animais controles. Deste total, 505 estavam expressos em maior nível nos animais AIRmax<sup>RR</sup> e 458 nos animais AIRmax<sup>SS</sup> (**Figura 15**).



**Figura 15:** Número de genes diferencialmente expressos (>2X) para a análise entre os animais AIRmax<sup>RR</sup> /AIRmax<sup>SS</sup>>2X versus AIRmax<sup>RR</sup>/AIRmax<sup>SS</sup><0,5X experimentais e controles. Neste experimento foram utilizados *pools* de 8 animais.

Os genes diferencialmente expressos em razão do estímulo foram analisados pelo programa EASE, com o intuito de avaliar a sobre-representação destes em categorias funcionais. Este programa permite que os genes diferencialmente expressos possam ser agrupados em temas biológicos de acordo com sua categoria funcional, sua localização cromossômica e sua representação em relação ao genoma total.

As categorias apresentadas nas **Tabelas 2 e 3** abaixo se referem a grupos de genes ativados por conta da lesão nos animais AIRmax<sup>RR</sup> em relação aos animais controles. Estão representadas somente as categorias estatisticamente significativas.

**TABELA 2-** Genes ativados sobre-representados em categorias funcionais nos animais AIRmax<sup>RR</sup> 48 horas após perfuração das orelhas ( $\geq 2 X$ ).

<b>Categoria Funcional</b>	<b>n° de genes</b>	<b>EASE score</b>	<b>Genes</b>
<u>Proliferação Celular</u>	81	6.97e-013	<i>Cdc20, Axl, Gab1, Ccnb1, Gmnn, Prim2, Prim1, Ppp1cb, Fosl1, Nop2, Cdc5l, Nuf2, Pttg1, Pole, Fgf5, Dut, Rfc3, Fanca, Fscn1, Ebna1bp2, Ncaph, Il1b, Il11, Aurka, Stat1, Skap2, Spp1, Orc2l, Orc1l, Ube2c, Cks2, Slfn2, Uhrf1, Bap1, Tspan3, Fzr1, Rbm14, Hdac7, Mad2l1, Rrm2, Chaf1a, Dbf4, Vegfa, Cxcr4, Uba1, Rfc2, Cdk6, Cdk4, Cdc25b, Cenph, Trex1, Rela, Anapc1, Mcm7, Mcm6, Mcm5, Mcm4, Mcm3, Gtf2h1, Gspt1, Cxcl1, Ccnf, Ccne1, Ccnd3, Ccnb2, Ccna2, Chaf1b, Mapk6, Cttnb1, Mtbp, Tgfb1, Lyn, Pard6g, Rfc5, Tfdp1, Tert, Rad54l, Rad21, Rac2, Cdk8, Dusp1.</i>
<u>DNA replication and chromosome cycle</u>	29	7.76e-013	<i>Prim2, Prim1, Nuf2, Pttg1, Pole, Dut, Rfc3, Ebna1bp2, Ncaph, Orc2l, Orc1l, Rbm14, Mad2l1, Rrm2, Chaf1a, Uba1, Rfc2, Cenph, Trex1, Mcm7, Mcm6, Mcm5, Mcm4, Mcm3, Ccne1, Chaf1b, Rfc5, Tert, Rad21.</i>
<u>Ciclo Celular</u>	64	6.65e-012	<i>Cdc20, Axl, Ccnb1, Gmnn, Prim2, Prim1, Nop2, Nuf2, Pttg1, Pole, Fgf5, Dut, Rfc3, Ebna1bp2, Ncaph, Il1b, Aurka, Stat1, Orc2l, Orc1l, Ube2c, Cks2, Fzr1, Rbm14, Hdac7, Mad2l1, Rrm2, Chaf1a, Dbf4, Vegfa, Uba1, Rfc2, Cdk6, Cdk4, Cdc25b, Cenph, Trex1, Rela, Anapc1, Mcm7, Mcm6, Mcm5, Mcm4, Mcm3, Gtf2h1, Gspt1, Cxcl1, Ccnf, Ccne1, Ccnd3, Ccnb2, Ccna2, Chaf1b, Mapk6, Mtbp, Lyn, Pard6g, Rfc5, Tfdp1, Tert, Rad54l, Rad21, Cdk8, Dusp1.</i>
<u>Citocinese</u>	18	3.68e-007	<i>Cdc20, Ccnb1, Ppp1cb, Cdc5l, Ube2c, Cks2, Fzr1, Cdk6, Cdk4, Cdc25b, Anapc1, Mcm5, Ccnf, Ccne1, Ccnd3, Ccnb2, Ccna2, Pard6g.</i>
<u>Metabolismo de DNA</u>	42	7.23e-007	<i>Prim2, Prim1, Asf1b, Pttg1, Pole, Dut, Rfc3, Parp1, Hat1, Atf7ip, Orc2l, Orc1l, Smarcc1, Actl6a, Csnk1d, Rbm14, Hdac7, Ruvbl2, Rrm2, Hmgb3, Chaf1a, Hdac2, Ung, Uba1, Ahcy, Gen1, Rfc2, Trex1, Recql, Mcm7, Mcm6, Mcm5, Mcm4, Mcm3, Gtf2h1, Ccne1, Chaf1b, Rfc5, Tert, Rad54l, Rad21, Kat2a.</i>

**TABELA 3**-Genes reprimidos sobre-representados em categorias funcionais nos animais AIRmax<sup>RR</sup> 48 horas após perfuração das orelhas ( $\geq 2 X$ ).

<b>Categoria Funcional</b>	<b>n° de genes</b>	<b>EASE score</b>	<b>Genes</b>
<u>Morfogênese</u>	49	1.74e-005	<i>Prlr, Klf6, Rapgef1, Fgf18, Fbn1, Ank, Jarid2, Ext1, Cadm1, Trim44, Myl10, Pdgfra, Pafah1b1, Igf2, Igf1, Efnb3, Flnb, Slit3, Slit2, Ski, Nfib, Sema5a, Serpinf1, Myoc, Mylpf, Atxn1, Hoxd8, Cux1, Msx1, Mstn, Creb1, Vegfc, Meis2, Utrn, Dpysl3, Myl9, Cd44, Fam174a, Asb1, Reln, Mef2a, Pnpla6, Tnni2, Tnni1, Lum, Gnaq, Sirt1, Ankrd17, Pth1r.</i>
<u>Enzyme linked receptor protein signaling pathway</u>	16	1.32e-004	<i>Prlr, Rapgef1, Pdpk1, Pdgfrb, Pdgfra, Igf1, Eif4ebp2, Pdgfrl, Spnb2, Frs2, Aig1, Nck2, Mstn, Grb2, Ptprm, Ptprk.</i>

Nas **Tabelas 4 e 5** estão representadas as categorias funcionais significativas de genes ativados e reprimidos por conta do estímulo em camundongos AIRmax<sup>SS</sup> em relação aos animais controles.

**TABELA 4**-Genes ativados sobre-representados em categorias funcionais nos animais AIRmax<sup>SS</sup> 48 horas após perfuração das orelhas ( $\geq 2 X$ ).

<b>Categoria Funcional</b>	<b>n° de genes</b>	<b>EASE score</b>	<b>Genes</b>
<u>Resposta Inflamatória</u>	17	2.01e-006	<i>Fcer1g, Itgb2, Il1b, Mefv, Pf4, Spp1, Cxcl2, Ccl20, Ccl2, S100a9, Dock2, Cxcl1, Cd14, Tnfrsf1a, Tlr1, Rac2, Tlr2.</i>
<u>Proliferação Celular</u>	49	3.57e-005	<i>Cdc20, Axl, Gab1, Ccnb1, Prkg2, Prim2, Fosl1, Nop2, Nuf2, Fanca, Fscn1, Irf2, Ncaph, Mad2l1bp, Il1b, Il11, Elf5, Aurka, Aurkb, Spp1, Orc1l, Oprm1, Ube2c, Spata1, Cgref1, Uhrf1, Tspan3, Sh2d2a, Rrm2, Pard3b, Dock2, Cdc25a, Trex1, Mcm6, Mcm5, Mcm3, Gtf2h1, Cxcl1, Ccni, Ccne1, Ccnd3, Ccna2, Sesn2, Chaf1b, Mapk6, Il31ra, Tfdp1, Rac2, Smc6.</i>

**TABELA 5**-Genes reprimidos sobre-representados em categorias funcionais nos animais AIRmax<sup>SS</sup> 48 horas após perfuração das orelhas ( $\geq 2 X$ ).

<b>Categoria Funcional</b>	<b>n° de genes</b>	<b>EASE score</b>	<b>Genes</b>
<u>Desenvolvimento Muscular</u>	22	1.50e-007	<i>Large, Tcf12, Gphn, Tcap, Acta1, Des, Mylpf, Myl3, Myh11, Mstn, Vamp5, Hdac5, Myl9, Pdlim3, Reln, Mef2a, Tnnt3, Tnni3, Tnni2, Tnni1, Tnnc2, Pvalb.</i>
<u>Contração Muscular</u>	18	2.55e-006	<i>Cnn3, Tcap, Actn3, Acta1, Smtnl1, Neb, Myh11, Nmu, Ckm, Myl9, Ttn, Mybpc2, Tnnt3, Tnni3, Tnni2, Tnni1, Tnnc2, Casq1.</i>
<u>Morfogênese</u>	89	3.45e-006	<i>Lce1a1, Mab21l2, Prlr, Large, Tcf12, Prkar2b, Ppp3cb, Gphn, Cdk5rap1, Adam23, Tcap, Polb, Phox2b, Fgf11, Fbn1, Ank, Jarid2, Acta1, Lce1a2, Pdgfra, Pbx1, Il18, Slitrk6, Igf2, Igf1, Spnb1, Irf8, Dvl2, Mkks, Sparc, Dnase2a, Slit3, Slit2, Npr3, Des, Nrn1, Nfib, Nfatc4, Sema3e, Myoc, Mylpf, Dab1, Tspan5, Gal3st1, Myl3, Myh11, Cux1, Taf4a, S100a1, Msx1, Mstn, Crym, Cryba4, Creb1, Tbce, Vamp5, Mixl1, Wnt2b, Col11a1, Epb4.1, Ppap2b, Vldlr, Hdac5, Bcl11b, Rpgr, Myl9, Pdlim3, Cd44, Cd3g, Reln, Mef2a, Gsx2, Tnnt3, Tnni3, Tnni2, Tnni1, Tnfrsf11a, Tnnc2, Lum, Gli3, Ankrd17, Med30, Ltbp3, Bmp6, Mapk14, Sigirr, Pvalb, Pth1r, Galr2.</i>

Nas tabelas seguintes, **Tabelas 6 e 7**, estão listadas as categorias funcionais sobre-representadas pelos genes diferencialmente expressos entre os animais controles e entre experimentais AIRmax<sup>RR</sup> em comparação aos animais AIRmax<sup>SS</sup> ( $\geq 2$ ) submetidos à perfuração das orelhas. Entretanto, nenhuma categoria funcional foi estatisticamente significativa nas análises de genes sobre-representados entre controles e entre experimentais AIRmax<sup>SS</sup> quando comparados aos animais AIRmax<sup>RR</sup> ( $\leq 0,5$ ).

**TABELA 6**-Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão  $\geq 2$  vezes nos animais AIRmax<sup>RR</sup> controle comparados aos animais AIRmax<sup>SS</sup>.

<b>Categoria Funcional</b>	<b>n° de genes</b>	<b>EASE score</b>	<b>Genes</b>
<u>Quimiotaxia</u>	8	1.00e-004	<i>Krtap6-2, Pf4, Cxcl2, Ccl7, Ccl24, S100a8, Ccr2, Utrn.</i>

**TABELA 7**-Categorias funcionais sobre-representadas pelos genes com expressão  $\geq 2$  vezes nos animais AIRmax<sup>RR</sup> após 48 horas de perfuração da orelha comparados aos animais AIRmax<sup>SS</sup>.

Categoria Funcional	nº de genes	EASE score	Genes
Desenvolvimento Muscular	10	2.10e-004	<i>Acta1, Des, Mylpf, Myl1, Hdac7, Pdlim3, Tnnt3, Tnni2, Tnnc2, Pvalb.</i>

#### 4.5 Análise de expressão gênica relativa

Para validar os resultados obtidos nos experimentos de expressão gênica global, alguns genes diferencialmente expressos encontrados nestas análises foram testados em experimentos de qPCR.

Os experimentos de PCR em tempo real foram desenvolvidos com o intuito de avaliar diferenças na expressão de genes envolvidos no início do processo de regeneração tecidual, e se possíveis diferenças encontradas ajudariam a contribuir na elucidação da diferença entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> para este fenótipo.

Para o desenvolvimento destes experimentos, os animais da sublinhagem para os alelos do gene *S/c11a1* foram submetidos ao protocolo de indução à regeneração tecidual. Perfurações de 2mm foram induzidas experimentalmente nas orelhas dos camundongos e, 6, 24 e 48 horas após perfuração, as orelhas foram coletadas para a obtenção do RNA mensageiro e a sintetização do cDNA utilizado nas reações de qPCR.

Foram escolhidos alguns genes envolvidos na fase inicial do processo de regeneração tissular descritos na literatura, e alguns que se apresentaram diferencialmente expressos nos experimentos de expressão gênica global como: *Tnfa, Il6, Il1b, Il1a, Tgfb, Casp8, Il8rb, Cxcl2, Ifng, Il12p35, Dap12, Trem1, Trem2, Il18, Mmp9*. É importante salientar que os *primers* escolhidos para os decorrentes experimentos apresentaram uma eficiência próxima de 100%.

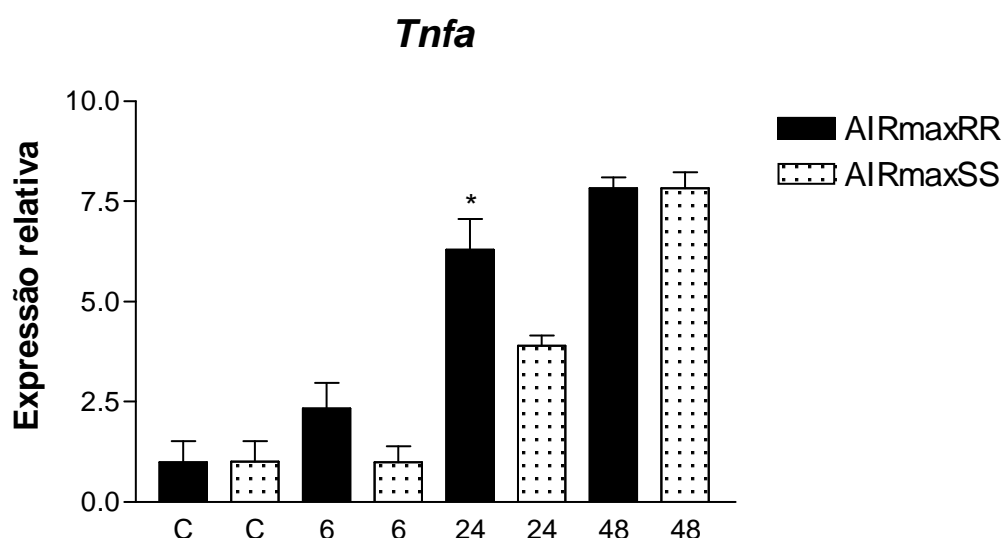
Nestas análises desenvolvidas por qPCR as amostras foram normalizadas através da subtração do valor do gene constitutivo



$\beta 2$ microglobulina (chamado de  $\Delta Ct$ ) e calibradas através da subtração do valor de  $\Delta Ct$  dos animais AIRmax<sup>SS</sup> controle, também chamado de calibrador comum, e os resultados abaixo estão expressos através da fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (como descrito nos Materiais e Métodos).

#### 4.5.1 Níveis de expressão gênica para *Tnfa*

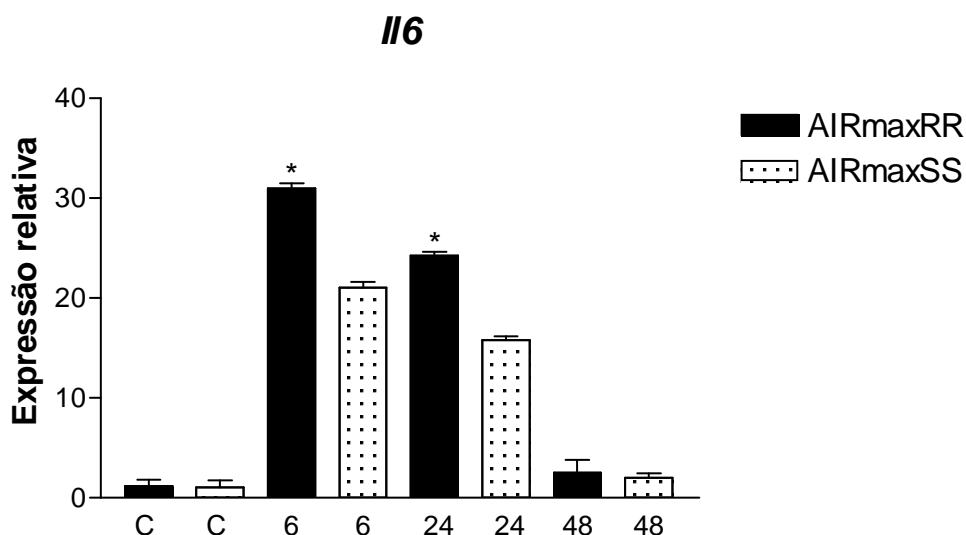
Avaliando os níveis de transcritos para o gene *Tnfa* podemos observar um aumento praticamente gradativo da expressão deste gene nos animais AIRmax<sup>RR</sup> nos três períodos analisados mas, uma diferença estatisticamente significativa entre as linhagens ocorreu somente 24 horas após a perfuração das orelhas. Este aumento também foi observado nos animais AIRmax<sup>SS</sup>, porém, inferior ao visto nos animais portadores do alelo *R*. Curiosamente com 48 horas de injúria, estes animais exibiram um grande aumento nos níveis de RNAm para este gene resultando em uma expressão similar aos animais AIRmax<sup>RR</sup> e, que até este momento apresentava uma expressão superior a estes animais (**Figura 16**).



**Figura 16:** Expressão relativa do gene *Tnfa* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ou não ao protocolo de regeneração tecidual. Foram utilizados animais experimentais (6, 24 e 48hs) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,05$  – entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>.

#### 4.5.2 Níveis de expressão gênica para *I/6*

Na **Figura 17** podemos observar uma expressão acentuada para o gene *I/6* em ambas as sublinhagens no período de 6 e 24 horas, entretanto, uma clara diferença a favor dos animais AIRmax<sup>RR</sup> foi observada e, além disso, esta diferença é considerada altamente significativa. Nos experimentos realizados com 48 horas após estímulo nenhuma expressão para este gene foi observada em ambas as sublinhagens.



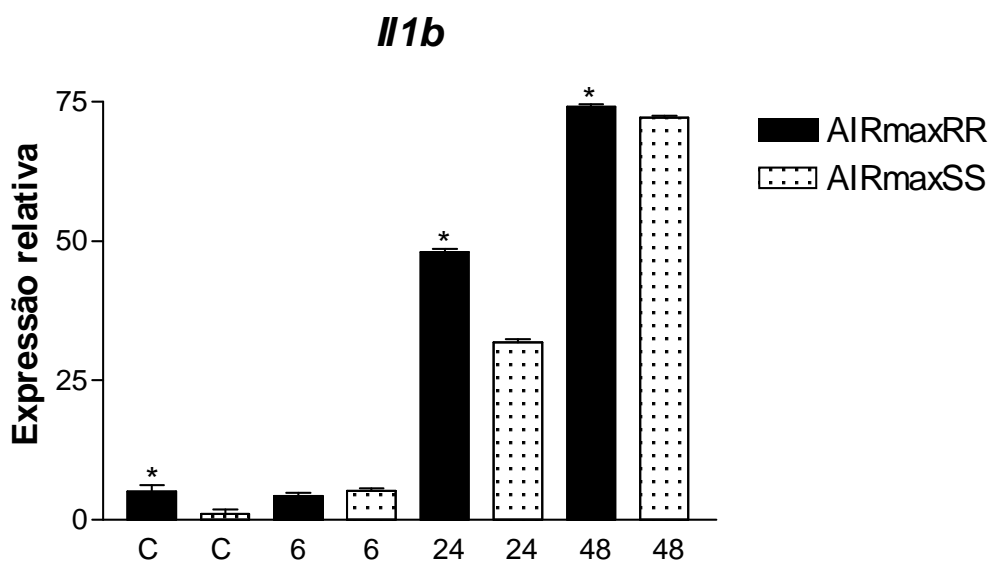
**Figura 17:** Expressão relativa do gene *I/6* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (6, 24 e 48hs) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão.

#### 4.5.3 Níveis de expressão gênica para *I/1b*

Níveis de transcritos para o gene *I/1b* foram somente observados durante os períodos de 24 e 48 horas após a perfuração das orelhas. Animais AIRmax portadores do alelo *R* apresentaram altas quantidades de RNAm para este gene em 24 horas de experimento em comparação aos animais AIRmax portadores do alelo *S* (**Figura 18**), e essa diferença mostrou-se altamente significativa. No período de 48 horas, ambas as

sublinhagens exibiram níveis máximos de expressão gênica para *I11b*, porém em animais AIRmax<sup>RR</sup> esses níveis se apresentaram significativamente superiores (**Figura 18**).

Os animais AIRmax<sup>RR</sup> controle exibiram níveis basais dos transcritos deste gene aumentados e significativos em relação aos animais AIRmax<sup>SS</sup>.

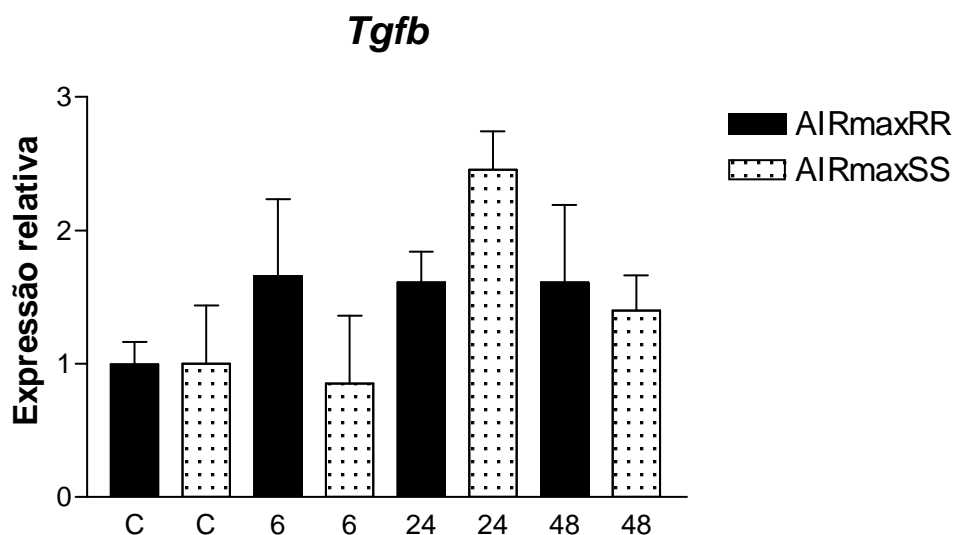


**Figura 18:** Expressão relativa do gene *I11b* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (6, 24 e 48hs) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão.

#### 4.5.4 Níveis de expressão gênica para *Tgfb*

Na **Figura 19** abaixo, podemos observar a expressão do gene *Tgfb*. Animais AIRmax<sup>RR</sup> exibiram um modesto aumento na expressão deste gene e um perfil muito semelhante nos três períodos analisados. Por outro lado, uma resposta interessante pôde ser observada nos experimentos com animais AIRmax<sup>SS</sup>. Com 6 horas de perfuração das orelhas, estes animais apresentaram repressão para o gene *Tgfb*, porém, com 24 horas, um pico nos níveis de transcritos foi notado e, no tempo mais tardio analisado, ocorreu um declínio na expressão do gene *Tgfb*. Apesar da

diferença entre as linhagens serem consideráveis com 24 horas de indução ao processo de regeneração, estas não apresentaram significância quando submetidas ao teste estatístico.

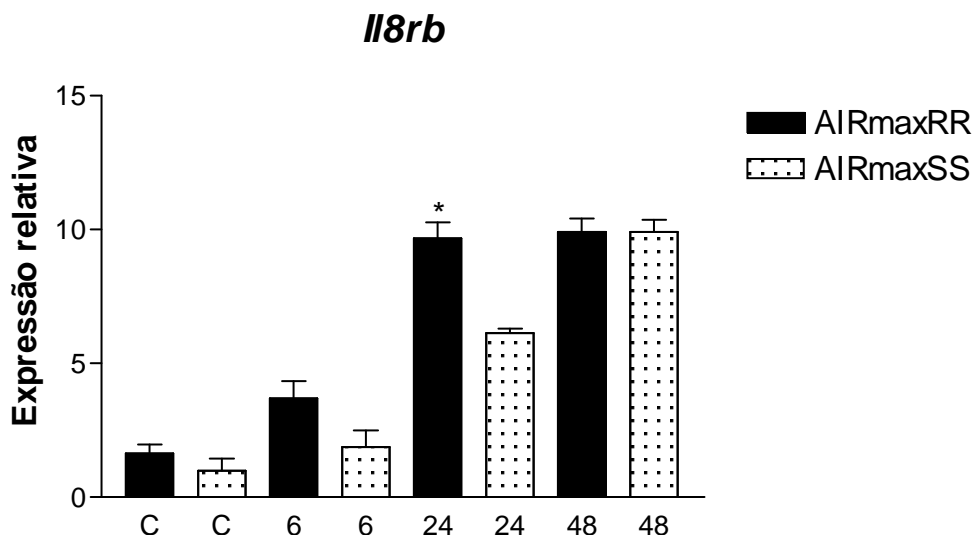


**Figura 19:** Expressão relativa do gene *Tgfb* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (6, 24 e 48hs) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.5.5 Níveis de expressão gênica para *I18rb*

Quanto à expressão do gene *I18rb*, animais AIRmax<sup>RR</sup> controle exibiram níveis basais aumentados nos experimentos testados, como demonstrado na **Figura 20**. Com 6 horas de indução ao processo de regeneração, animais AIRmax<sup>RR</sup> demonstraram um aumento notável e superior já neste período, quando comparado aos animais AIRmax<sup>SS</sup>. Após 24 horas de experimento, estes animais passaram a expressar ainda mais RNAm para *I18rb* e, embora os animais portadores do alelo S também tenham exibido um aumento nos níveis de expressão deste gene, estes ainda se mostraram inferiores aos animais portadores do alelo R, além disso, esta diferença observada entre as linhagens foi altamente significativa. Em um período mais tardio, ou seja, com 48 horas após

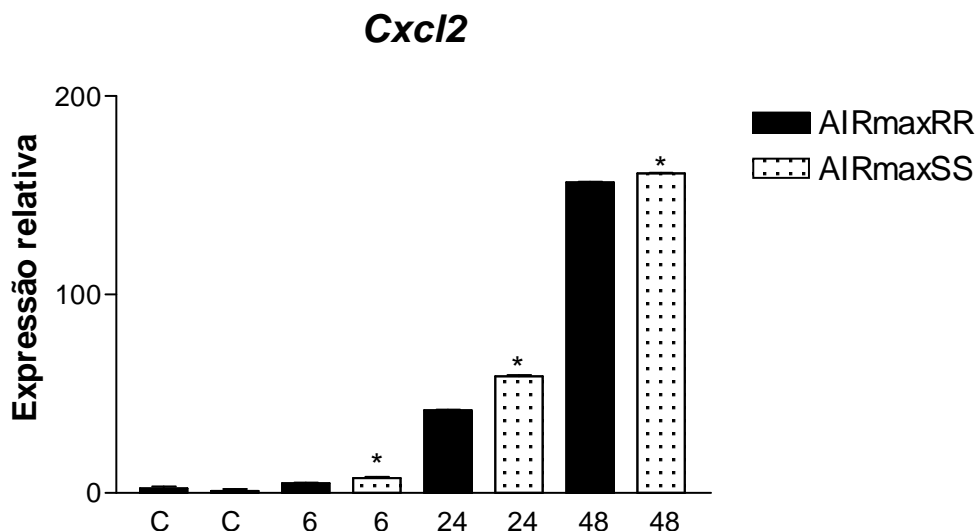
injúria, uma característica interessante ocorreu. Animais AIRmax<sup>SS</sup>, que antes apresentava uma expressão reduzida em relação aos animais AIRmax<sup>RR</sup>, passaram a exibir um perfil de expressão equiparado a estes animais.



**Figura 20:** Expressão relativa do gene *I18rb* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (6, 24 e 48hs) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. \* p<0,05 – entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>.

#### 4.5.6 Níveis de expressão gênica para *Cxcl2*

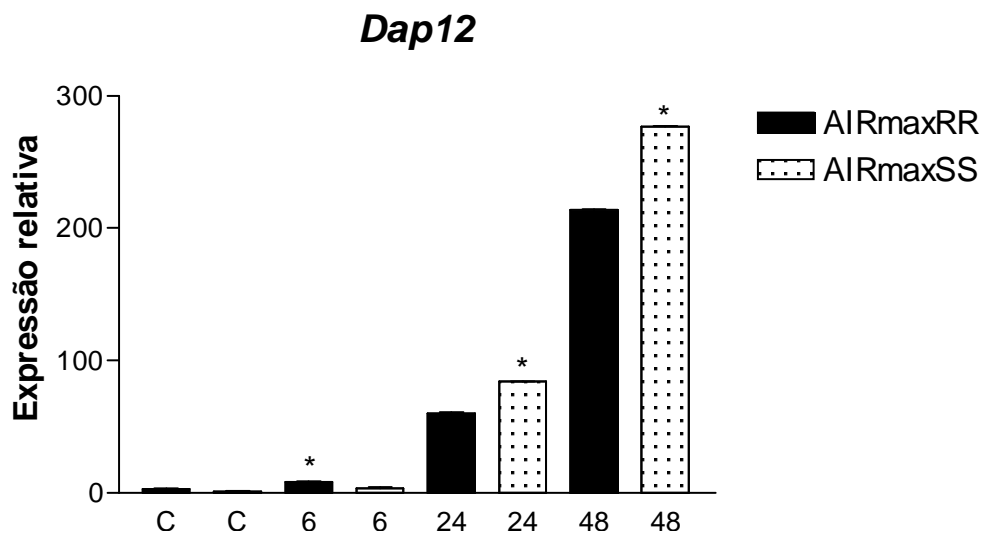
Os camundongos da sublinhagem AIRmax<sup>SS</sup> apresentaram alta expressão do gene *Cxcl2* após a injúria durante toda a cinética, em comparação aos animais da sublinhagem AIRmax<sup>RR</sup>. No período de 48 horas, foram observados maiores níveis transcricionais deste gene para ambas as sublinhagens, entretanto, os animais AIRmax portadores do alelo S continuaram a exibir expressão do gene *Cxcl2* significativamente maior em relação aos animais portadores do alelo R (**Figura 21**).



**Figura 21:** Expressão relativa do gene *Cxcl2* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (6, 24 e 48hs) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  – entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>.

#### 4.5.7 Níveis de expressão gênica para *Dap12*

Animais AIRmax<sup>SS</sup> regeneradores apresentaram níveis aumentados e significativos na expressão do gene *Dap12* quando comparados aos animais AIRmax<sup>RR</sup> experimentais durante as 24 e 48 horas pós perfuração das orelhas dos camundongos. Com 6 horas de experimento, ou seja, uma resposta inicial ao processo de regeneração, uma inversão desta resposta foi observada. Neste caso, os animais AIRmax<sup>RR</sup> apresentaram uma expressão mais elevada do que os animais AIRmax<sup>SS</sup> do grupo experimental e esta diferença apresentou-se estatisticamente significativa, como representado na **Figura 22**.

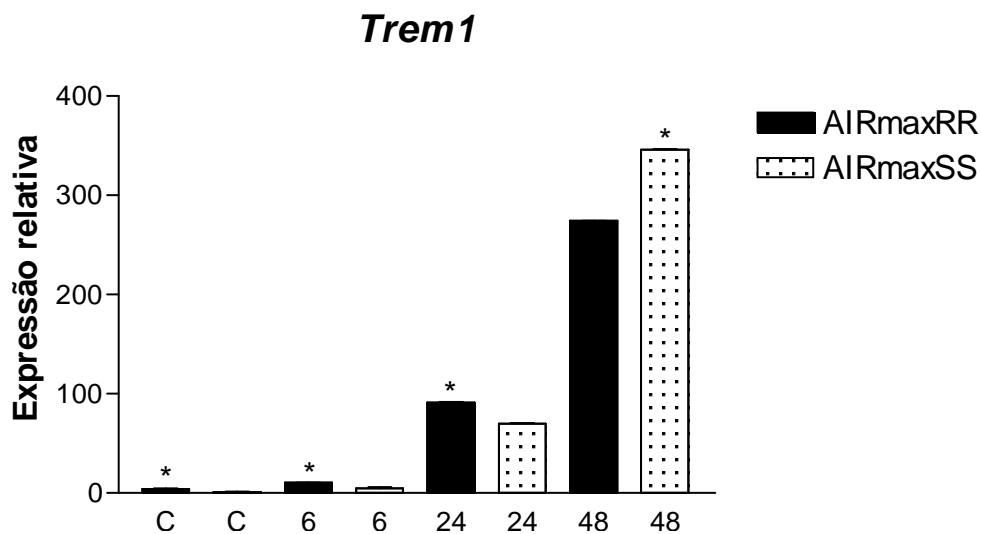


**Figura 22:** Expressão relativa do gene *Dap12* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (6, 24 e 48hs) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  – entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>.

#### 4.5.8 Níveis de expressão gênica para *Trem1*

Um perfil semelhante aos resultados demonstrados com o gene *Dap12* foi encontrado para o gene *Trem1*, nos períodos analisados em 6 e 48 horas de indução a injúria tecidual, como podemos observar na **Figura 23** abaixo. Entretanto, o mesmo não ocorreu nos resultados após 24 horas de experimento, houve uma modulação de resposta a favor dos animais portadores do alelo *R*, além disso, o aumento na expressão de *Trem1* apresentou-se altamente significativo.

Os animais AIRmax<sup>RR</sup> controle exibiram níveis basais dos transcritos deste gene aumentados e significativos em relação aos animais AIRmax<sup>SS</sup>.

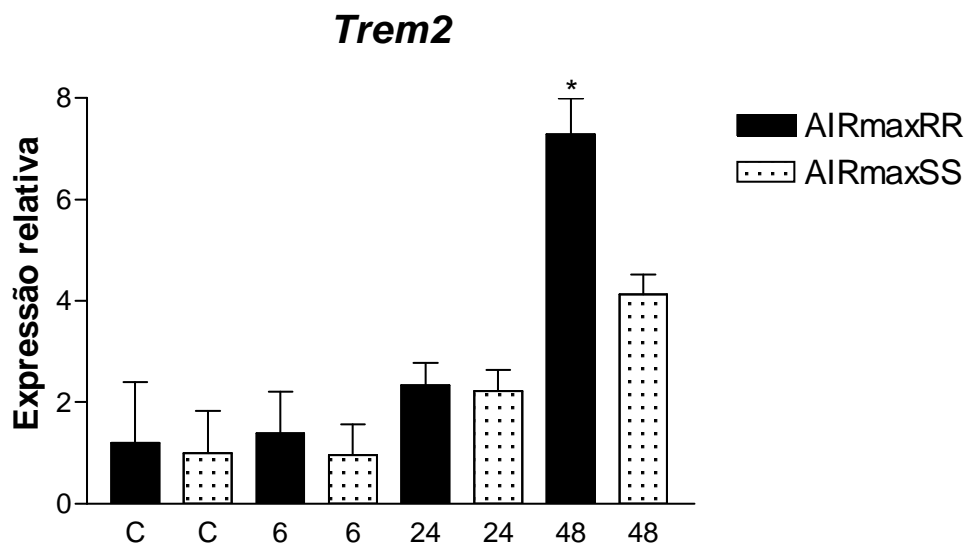


**Figura 23:** Expressão relativa do gene *Trem1* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (6, 24 e 48hs) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  – entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>.

#### 4.5.9 Níveis de expressão gênica para *Trem2*

Quanto à expressão do gene *Trem2*, no período de 48 horas de injúria, observamos uma expressão significativamente aumentada deste gene nos animais AIRmax<sup>RR</sup>, atingindo níveis superiores aos dos animais AIRmax<sup>SS</sup>. Nos períodos de 6 e 24 horas após a perfuração das orelhas, ambas as sublinhagens apresentaram expressão similar do gene *Trem2* (**Figura 24**).

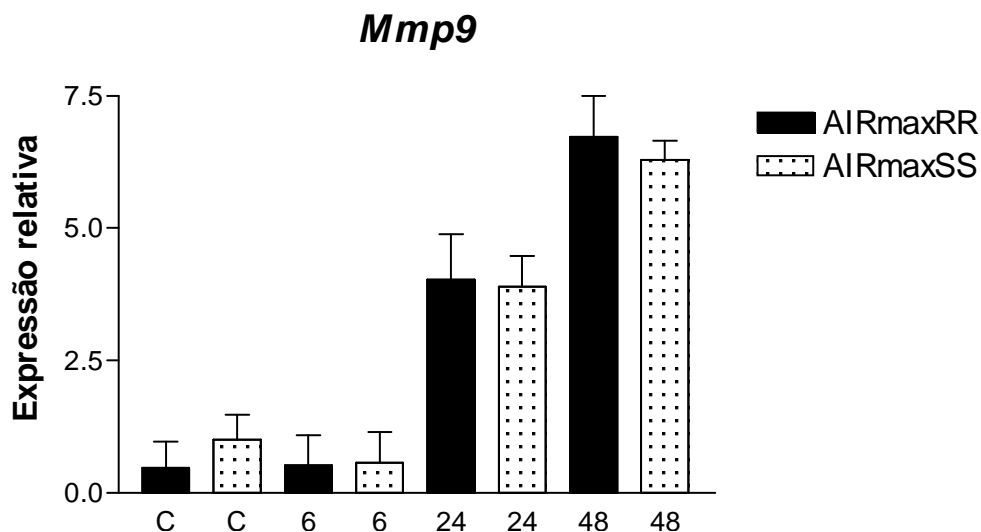




**Figura 24:** Expressão relativa do gene *Trem2* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (6, 24 e 48hs) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  - entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>.

#### 4.5.10 Níveis de expressão gênica para *Mmp9*

Um aumento nos níveis transcricionais do gene *Mmp9* ocorreu em ambas as sublinhagens após 24 e 48 horas de lesão em relação aos animais controles, no entanto, não houve diferenças na expressão entre os animais experimentais, como representado na **Figura 25**.



**Figura 25:** Expressão relativa do gene *Mmp9* a partir do cDNA obtido das orelhas de animais submetidos ao protocolo de regeneração tecidual ou não (controle). Foram utilizados animais experimentais (6, 24 e 48hs) e controles (n=4). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  – entre AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup>.

Outros genes que atuam de forma importante durante a fase inflamatória do processo de regeneração tecidual foram avaliados, entre eles estão *Il1a*, *Casp8*, *Il12p35*, *Il18* e *Ifng*, contudo, pouca ou nenhuma expressão foi observada durante todos os períodos analisados.

Após o término das avaliações de expressão gênica por reações de PCR em tempo real, foram desenvolvidas análises para identificar se existia correlação entre estes resultados e aqueles obtidos na avaliação de expressão gênica global. Foi verificado que existe correlação significativa entre os resultados dos dois experimentos para alguns dos genes estudados, como podemos observar na **Tabela 2**.

**TABELA 8**-Correlações entre as expressões gênicas obtidas no qPCR e *microarray* de orelha induzida ao processo de regeneração tecidual.

<b><u>Genes</u></b>	<b><u>Correlação de Pearson(r)</u></b>
<b><i>Tnfa</i></b>	0,89
<b><i>Il6</i></b>	0,89
<b><i>Il1b</i></b>	0,98
<b><i>Tgfb</i></b>	0,79
<b><i>Casp8</i></b>	0,53
<b><i>Il8rb</i></b>	0,89
<b><i>Dap12</i></b>	0,94
<b><i>Trem1</i></b>	0,85

 $p < 0,05$

---

## **5 DISCUSSÃO**

A resolução da lesão é um processo biológico complexo que engloba uma série de eventos seqüenciais com o objetivo de restaurar o tecido prejudicado (TSIROGIANNI *et al.*, 2006). A resposta a uma injúria de pele abrange duas categorias distintas, o reparo tecidual e a regeneração (CLARK *et al.*, 1998). O reparo tecidual envolve a migração de fibroblastos para o local da lesão, onde colágeno e outras moléculas da matriz extracelular são projetados de maneira desorganizada. Este processo resulta na formação de cicatrizes e na migração e proliferação do epitélio para a cobertura do local lesionado, porém, será desprovido de estruturas diferenciadas como folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Por outro lado, a regeneração tecidual envolve uma completa substituição e restauração dos tecidos, exibindo estrutura e funções normais (RAJNOCH *et al.*, 2003).

Vários tecidos de mamíferos possuem uma habilidade limitada para regenerar e algumas características de regeneração epimórfica, sendo os camundongos MRL/Mpj o mais novo modelo murino descoberto (STOCUM, 1995; CLARK *et al.*, 1998). Contudo, De Franco e colaboradores demonstraram que as sublinhagens AIRmax<sup>SS</sup> possuem uma capacidade regenerativa comparada as linhagens de camundongos MRL, sugerindo uma interação dos alelos *R* e *S* do gene *Slc11a1* com os *loci* reguladores da resposta inflamatória em relação ao fenótipo de regeneração tissular (DE FRANCO *et al.*, 2007).

Neste trabalho, o protocolo escolhido para indução do processo de regeneração tecidual foi um orifício de 2 mm na orelha dos camundongos. Primeiramente, avaliamos como as linhagens se comportariam em uma inflamação local frente a outro estímulo que não fosse o Biogel, e isso se tornou possível por meio da medida do edema formado no local da lesão, pela quantificação da enzima MPO e o influxo celular após estímulo. Camundongos AIRmax<sup>SS</sup> apresentaram inchaço significativamente maior

---

no terceiro dia de experimento do que os animais AIRmax<sup>RR</sup>, sugerindo uma modulação do alelo *S* do gene *Slc11a1* na formação de edema (**Figura 9**). Além disso, camundongos AIRmax<sup>SS</sup> apresentaram também maiores níveis da enzima MPO durante 6, 48, 72 e 96 horas de experimento, e uma inversão desta resposta foi observada somente com 24 horas, onde animais AIRmax<sup>RR</sup> exibiram níveis mais altos da enzima (**Figura 10**). Isso pode ter ocorrido porque neste período de inflamação as linhagens AIRmax foram selecionadas segundo os valores de celularidade e proteínas mais altos contra o agente Biogel, e uma influência dos genes reguladores da inflamação pode estar modulando a resposta para outro estímulo não sendo restrito somente ao agente selecionador das linhagens à inflamação. No modelo da AIR, utilizando o biogel como agente selecionador, uma diferença de leucócitos infiltrados no local da injúria foi observada entre as sublinhagens AIRmax e AIRmin, além disso, uma modulação a favor do alelo *R* nos animais AIRmax e AIRmin foi conferida (BORREGO *et al.*, 2006).

Possivelmente, para os outros períodos analisados, a presença do alelo *S* nas sublinhagens AIRmax pode ter favorecido uma maior resposta inflamatória local a este estímulo especificamente e ainda, um maior recrutamento celular, principalmente de neutrófilos, como pudemos notar quantificando a enzima MPO. Esta avaliação foi feita no intuito de verificar a diferença entre as linhagens com relação ao infiltrado inflamatório de uma forma indireta. Para justificar os resultados obtidos nos experimentos de quantificação da enzima MPO, caracterizamos o perfil celular presente nas orelhas de camundongos que receberam à perfuração experimentalmente. Um baixo influxo celular foi observado em todos os períodos avaliados (**Figura 11**), no entanto esta resposta corrobora com os dados da literatura que indicam que a perfuração experimental é um modelo minimamente invasivo (HEBER-KATZ, 1999). Embora poucas células tenham migrado para a lesão, identificamos que o perfil celular na orelha foi basicamente de células neutrofílicas e mononucleares (**Figuras**

---

**12 e 13**). No caso dos neutrófilos (**Figura 11**), uma cinética semelhante ao observado para detecção da enzima MPO ocorreu (**Figura 10**), sugerindo que a MPO significativamente detectada em AIRmax<sup>SS</sup> foi provavelmente proveniente de neutrófilos, mas não descartamos que parte dessa MPO detectada também foi derivada de células monocíticas, pois uma grande porcentagem dessas células estavam presentes na orelha dos camundongos. Outro fato que corrobora com os resultados obtidos nestes estudos é que camundongos AIRmax<sup>RR</sup> não apresentam o componente C5 do complemento (AMANO *et al.*, 2009). A falta de C5a ou seu receptor C5aR, por exemplo, confere uma diminuição na quimiotaxia de neutrófilos, e ainda na desgranulação de mastócitos e basófilos não só no reparo de tecidos como também para outros estímulos (GUO e WARD, 2005; MONACO *et al.*, 2003; ANTRUM e SOLOMKIN, 1986), resultando em uma menor permeabilidade dos vasos e prejudicando uma possível resolução da lesão. Isto poderia justificar uma menor formação de edema nestes animais e menores quantidades da enzima MPO durante as 6, 48 e 96 horas de experimento.

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

Nossa primeira investigação foi identificar quais genes seriam diferencialmente expressos entre as sublinhagens AIRmax durante a fase inflamatória da regeneração da orelha. Antes de iniciarmos uma análise de expressão gênica relativa, uma avaliação da expressão gênica global no período de 48 horas foi desenvolvida para que pudéssemos obter, de uma só vez, genes que apresentassem diferenças quanto a sua expressão.

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

---

diferencialmente expressos como *Slc11a1*, *Ang1*, *IL8rb*, *Vegfa*, *Vegfb*, *Fgf1*, *IL10*, *Csf3r*, *Alox12*, *Fgf18*, *Icam2*, *IL9r*, *Itga2b*, *Itgb3*, *Mpo*, *Ccl3*, *Ccl8*, *Ccl9*, *Ptgis*, e *Stat3* onde todos estão envolvidos na angiogênese e na inflamação (CARNEIRO *et al.*, 2009).

Avaliando a modulação dos genes para o fenótipo de regeneração nos animais AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> controles e experimentais, uma grande diferença foi observada quando os animais foram submetidos ao protocolo de regeneração tecidual, ou seja, os animais experimentais, 48 horas após a injúria, passaram a expressar mais genes quando foram estimulados a regenerar.

Outro resultado interessante está representado na **Figura 14**, onde os animais AIRmax<sup>SS</sup> experimentais apresentaram 3 vezes mais genes reprimidos em comparação aos camundongos AIRmax<sup>RR</sup>.

A partir disso, algumas questões foram ressaltadas: Seriam estes genes reprimidos os responsáveis pela diferença de regeneração tecidual destes animais? E quais são estes genes?

Os genes diferencialmente expressos foram agrupados em temas biológicos de acordo com sua categoria funcional, sua localização cromossômica e sua representação em relação ao genoma total por meio do programa EASE.

Ambas as sublinhagens AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> demonstraram genes ativado sobre-representados em temas biológicos relacionados a proliferação celular, e somente os animais AIRmax<sup>SS</sup> apresentaram genes ativado relacionados a resposta inflamatória e, além disso, ressaltamos que os animais AIRmax<sup>SS</sup> exibiram uma sobre-representação de um grupo de genes reprimidos em uma categoria funcional relacionada a contração muscular. O interessante dessa resposta é que a contração muscular está mais relacionada com o processo de reparo e não regeneração, e nesta fase há predominância de miofibroblastos na periferia da lesão, os quais são responsáveis pela diminuição da injúria e deposição adicional de matriz, corroborando desta forma com o reparo da

lesão e formação de cicatriz (MONACO e LAWRENCE, 2003). A repressão de genes relacionadas à contração muscular não foi observada nos animais AIRmax<sup>RR</sup>.

O envolvimento de genes ativados classificados em tema de resposta inflamatória na sublinhagem AIRmax<sup>SS</sup>, no início do processo, contradiz alguns trabalhos que relatam a má influência de eventos inflamatórios intensos para um reparo ou regeneração bem sucedida, pois a inflamação prolongada induz fibrose tissular, mas a reação intensa resolvida rapidamente, como é o caso dos animais AIRmax, favorece o microambiente da lesão. Além disso, se a resposta inflamatória mínima induzisse um fenótipo regenerativo, os animais AIRmin apresentariam características regenerativas, no entanto o observado nestes animais é um processo de reparo sem regeneração, no qual as orelhas permanecem com o orifício aberto (REINES *et al.*, 2008; DE FRANCO *et al.*, 2007; HARTY *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2001).

Em seguida, validamos os resultados de expressão gênica global por meio da análise da expressão de RNA mensageiro nas orelhas dos animais AIRmax<sup>RR</sup> e AIRmax<sup>SS</sup> durante a fase inicial da regeneração tissular, ou seja 6, 24 e 48 horas após perfuração das orelhas, e analisamos alguns genes relacionados ao processo.

Os primeiros genes estudados que exibiram diferenças nos níveis de transcritos entre os camundongos para 6, 24 e 48 horas após injúria foram as citocinas pró-inflamatórias *Tnfa*, *Il6* e *Il1b*.

O gene *Tnfa* é sintetizado após uma injúria aguda ou durante uma infecção e está entre os mediadores mais potentes em uma resposta do hospedeiro (LIN *et al.*, 2000). As principais fontes de TNF incluem monócitos, macrófagos e células T, onde são abundantemente localizadas no peritônio e nos tecidos esplênicos (VAN BERGE HENEGOUWEN *et al.*, 1998). Outras funções estão atribuídas ao TNF como ativação da coagulação, promovendo a expressão ou liberação de moléculas de



---

adesão, de prostaglandina E<sub>2</sub>, PAF, glicocorticóides, e eicosanóides (VAN DER POLL e LOWRY, 1995). Alguns estudos apontam que em períodos tardios após trauma, níveis significativos de TNF- $\alpha$  e IL-8 podem ser observados (FERGUSON *et al.*, 1998). Evidências com estes dados foram observados em nossos experimentos, onde um aumento nos níveis transcricionais em ambas as sublinhagens foi conferido para este gene no decorrer da cinética (**Figura 16**).

Além do TNF- $\alpha$  outra citocina importante secretada na fase inflamatória é a IL-1 $\beta$ , é expressa predominantemente por neutrófilos dentro de poucas horas após a injúria, e atua como principal indutora de quimionas, entretanto, em uma fase mais tardia do processo de reparo tecidual esta citocina passa a ser liberada também por macrófagos (HÜBNER *et al.*, 1996). Atua molecularmente através de três vias clássicas, sendo elas: a via MAPK, especialmente pela ERK, p38, e JNK, bem como NF $\kappa$ B (SAKLATVALA, 2006).

A expressão de *I1b* nas sublinhagens foi detectada somente nos períodos de 24 e 48 horas, indicando que possivelmente neutrófilos e macrófagos, portadores da proteína funcional do gene *Slc11a1*, presentes no local da injúria nestes períodos, estariam secretando altos níveis desta citocina em animais AIRmax<sup>RR</sup>, pois sabe-se que a proteína SLC11A1 está envolvida na produção de IL-1 durante a ativação dos neutrófilos e macrófagos (**Figura 18**).

A citocina IL-1 $\alpha$  também participa de forma importante durante o processo de regeneração da pele, pois esta é produzida por vários tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e queratinócitos no local do estímulo (ISHIDA *et al.*, 2006; SATO e OHSHIMA, 2000). Outros estudos apontaram o papel da IL-1 agindo local e sistemicamente, dando início a eventos celulares na regeneração de tecidos, como a indução da migração de células inflamatórias, re-epitelização e uma aceleração na formação de uma nova epiderme (LIAN *et al.*, 2008; SATO e OHSHIMA, 2000; ROBERTSON *et al.*, 1995).

---

Nos nossos resultados uma repressão deste gene foi observado com 6 horas de tratamento nos animais AIRmax<sup>SS</sup>, mas no decorrer da cinética as sublinhagens apresentaram baixa expressão de *I/1a* (dados não mostrados). Possivelmente a repressão observada com 6 horas de tratamento possa ter impedido a migração de várias células inflamatórias que agravassem ainda mais o local estimulado favorecendo a regeneração nesses animais.

Em relação a IL-6, esta desempenha um efeito muito similar ao da IL-1 e, além disso, participa na iniciação da inflamação e na manutenção de uma inflamação crônica, induzindo a ativação de linfócitos T, finalizando a diferenciação de linfócitos B e a secreção de imunoglobulinas (SHI e PESTKA, 2008; GUERNE *et al.*, 1999). Níveis elevados desta citocina foram encontrados somente as 6 e 24 horas após injúria, e novamente camundongos que apresentaram regeneração tissular tardia comparado aos animais AIRmax<sup>SS</sup>, ou seja, animais AIRmax<sup>RR</sup>, exibiram altos níveis de RNAm para *I/6*, indicando que mais um gene que atua na fase inicial deste processo está aumentado nestes animais, e que estes fatores em conjunto estariam promovendo uma inflamação mais intensa inicialmente nesses animais, resultando em uma regeneração retardatária (**Figura 17**). Além da participação desta citocina em um fenótipo de regeneração tecidual, esta também é secretada em altas quantidades em pacientes com doenças autoimunes como, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Crohn's e psoríase (GABAY, 2006; ISHIHARA e HIRANO, 2002).

Outro gene estudado de extrema importância durante o remodelamento de tecidos é o *Tgfb*, o qual faz parte de uma superfamília de genes que codificam proteínas que regulam diferentes processos fisiológicos incluindo desenvolvimento embrionário, homeostase, reparo tissular, quimiotaxia e controle do ciclo celular (LEASK e ABRAHAM *et al.*, 2004; MASSAGUE, 1998; MCCARTNEY-FRANCIS *et al.*, 1998). Suas principais fontes de secreção são as plaquetas, fibroblastos e macrófagos

---

que estão localizados na injúria e, além disso, participam como atrativos e/ou inibidores de queratinócitos, fibroblastos e na migração de células inflamatórias, agem ainda na regulação da síntese de colágeno e na modulação de modificações da matriz via efeitos inibidores por conta da matriz metaloproteinases e inibidores de MMP (LEASK e ABRAHAM *et al.*, 2004; WERNER e GROSE, 2003).

Adicionalmente, o TGF $\beta$  induz a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, um tipo celular importante na diminuição da injúria durante o processo de reparo tissular, sinalizado pela síntese ativa de constituintes de tecido de granulação, incluindo colágeno e fibronectina (BOUKHALFA *et al.*, 1996).

Em estudos realizados por Werner e Grose (2003), camundongos nocaute para *Tgfb* apresentaram melhor reparo, menos tecido de granulação e deposição reduzida de colágeno.

Diferente de todos os outros genes testados, camundongos AIRmax<sup>RR</sup> exibiram uma expressão deste gene constante durante toda a cinética, já camundongos AIRmax<sup>SS</sup> apresentaram uma repressão com 6 horas de lesão, um pico nos níveis transcricionais com 24 horas, e uma diminuição da expressão de *Tgfb* nas 48 horas de experimento, apresentando expressão do gene semelhante aos animais AIRmax portadores do alelo *R* (**Figura 19**). Embora as sublinhagens tenham apresentado sutis diferenças na expressão de *Tgfb*, a expressão para este gene se manteve baixa em todos os períodos analisados tanto em AIRmax<sup>RR</sup> quanto em animais AIRmax<sup>SS</sup>, sugerindo que esta baixa expressão favoreceu a regeneração tissular sem a formação de cicatriz nas orelhas destes animais, corroborando com os dados da literatura (WERNER e GROSE, 2003; BOUKHALFA *et al.*, 1996).

A Caspase 8 participa como membro das proteases, e está envolvida na apoptose, produção de citocinas, e na participação de uma resposta defensiva contra infecções e injúrias (BEN MOSHE *et al.*, 2007). Como todas as caspases, a Caspase 8 é sintetizada como pró-caspase inativa e

passa a ser ativada por meio de clivagem proteolítica, embora também possa ser autoativada após recrutamento para dentro de um complexo multimérico ou por meio de outras caspases (KRUIDERING e EVAN, 2000).

Segundo Ben Moshe e colaboradores (2007) uma rápida regeneração foi observada em lesões de fígado na ausência da Caspase 8, resultando em uma geração reduzida de mediadores que estimulam o crescimento (BEN MOSHE *et al.*, 2007). A expressão do gene *Casp8* também foi testada durante os experimentos, mas em todos os períodos avaliados animais AIRmax<sup>SS</sup> exibiram repressão deste gene enquanto camundongos AIRmax<sup>RR</sup> apresentaram expressão pouco relevante com 6 horas de lesão. Pode ser que a ausência de modulação inicial deste gene durante o processo de regeneração tecidual tenha favorecido o microambiente da lesão por causa de uma reduzida liberação de mediadores como citocinas e fatores de crescimento, e assim, uma regeneração eficiente nos animais AIRmax portadores do alelo S pôde ser observada (dados não mostrados).

Além das citocinas e alguns genes estudados localizados no cromossomo 1, próximo ao gene *Slc11a1*, outros reguladores inflamatórios também foram avaliados, entre eles estão as quimiocinas, as quais regulam o recrutamento de subtipos de leucócitos, contribuem para a regulação da epitelização, remodelamento tecidual e angiogênese (GILLITZER e GOEBELER, 2001).

O receptor do tipo beta da Interleucina 8 (IL8rb), localizado no cromossomo 1 do camundongo e próximo da região onde está o gene *Slc11a1*, é o homólogo murino do CXCR2, integra a superfamília de receptores acoplados a proteína G, e é expresso em neutrófilos, monócitos e células T (MURPHY, 1997). Este receptor se acopla a membros da família de quimiocinas CXC contendo o motivo ELR<sup>+</sup>, e ainda, está fortemente relacionado à quimiotaxia de neutrófilos em resposta a uma

---

injúria tecidual e a muitos tipos de infecções (ACOSTA *et al.*, 2008; JOHNSTON *et al.*, 2005; SUE *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2000).

Camundongos deficientes de CXCR2 apresentaram neovascularização comprometida, recrutamento de neutrófilo debilitado e de monócitos alterado, e ainda diminuição da secreção de IL-1 $\beta$  no local da injúria (DEVALARAJA *et al.*, 2000). O mesmo perfil de resposta encontrado na expressão do gene *Tnfa* foi observado para o gene *I18rb*, ou seja, um aumento nos níveis transcricionais em ambas as sublinhagens foi conferido para este gene no decorrer da cinética (**Figura 20**), isso pode ter ocorrido porque algumas citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  induzem a produção de IL-8 (ASAGOE *et al.*, 1998).

Outra quimiocina estudada integrante da família de quimiocinas CXC foi a Cxcl2. Esta quimiocina também está envolvida fortemente no efeito quimioatraente sobre neutrófilos e exibem potente atividade angiogênica (MURPHY, 1997; STRIETER *et al.*, 1995). Uma expressão significativamente superior do gene *Cxcl2* foi obtida em todos os períodos analisados em animais AIRmax<sup>SS</sup> em comparação aos animais AIRmax<sup>RR</sup> (**Figura 21**). Uma das hipóteses é que a expressão exacerbada desta quimiocina possa ter conferido a esses animais precocemente regeneradores um influxo neutrofílico maior no início da inflamação decorrente do estímulo. Esta quimiocina também está fortemente envolvida na angiogênese, porém nenhum experimento foi desenvolvido durante esta fase do processo.

Outras citocinas como IL-12p35 e IL-18 foram nossos objetos de estudo, estas citocinas atuam como reguladoras das repostas imunes em geral, além do mais, são extremamente importantes porque regulam a resposta inata durante uma infecção e determinam o tipo e a duração da resposta imune adaptativa (WATFORD *et al.*, 2003), entretanto não foi possível detectar expressão destes dois genes nos períodos avaliados.

Níveis de transcritos para o gene *Ifng* também não foram detectáveis nos experimentos em nenhum período avaliado, isso pode ter

---

ocorrido devido à ausência de expressão dos genes *Il12* e *Il18*, pois está descrito na literatura que a combinação destas duas citocinas induz a produção de IFN $\gamma$  pelas células apresentadoras de antígeno (O'DWYER *et al.*, 2006; WATFORD *et al.*, 2003).

Genes envolvidos na regulação da inflamação e na função de células apresentadoras de antígeno apresentaram-se diferencialmente expressos nas análises de expressão gênica global e, portanto, foram testados em reações de qPCR (ver em resultados), estes genes foram *Dap12*, *Trem1* e *Trem2*.

A DAP12 foi originariamente identificada como uma molécula adaptadora transmembrânica, a qual se une a receptores de células NK como, KIR2DS e NKG2D, e receptores de células mielóides, incluindo SIRP-1 $\beta$ , MDL-1, TREM-1, TREM-2 e TREM-3 (COLONNA, 2003; LANIER e BAKKER, 2000; TOMASELLO, 1998).

Existem algumas indicações que o Trem1 possui uma ligação direta entre a imunidade adaptativa, bem como a imunidade inata (BOUCHON *et al.*, 2000). Esta hipótese é sustentada pela habilidade do Trem1 em aumentar a produção de neutrófilos e quimiocinas, as quais recrutam linfócitos efetores no local inflamado. Este receptor é conhecido como amplificador de respostas imunes estimulando quimiocinas pró-inflamatórias e citocinas (BLEHARSKI *et al.*, 2003). Ainda, a produção de IL-8, um potente quimioatraente de neutrófilos, é fortemente induzido pela interação de Trem1, seguido pela produção de MCP-1, MCP-3 e MIP-1 $\alpha$  (BLEHARSKI *et al.*, 2003; COLONNA, 2003). Essa interação de Trem1 também induz granulócitos a liberarem mieloperoxidase, mas não induz fagocitose (BOUCHON *et al.*, 2000). A habilidade do receptor Trem1 em aumentar a produção de neutrófilos e quimiocinas e ainda induzir a liberação de MPO pode explicar alguns fatos curiosos encontrados em nossos experimentos. Uma maior expressão de *Trem1* pelos animais AIRmax<sup>RR</sup> foi observado em nossos experimentos com 24 horas (**Figura 23**), corroborando com os resultados de MPO, pois altos níveis dessa

---

enzima foram detectados no local da injúria neste período. Com 48 horas de indução ao processo de regeneração tecidual, animais AIRmax<sup>SS</sup> exibiram níveis transcricionais significativamente mais altos de *Trem1* e também altas quantidades da enzima MPO (**Figuras 23 e 10**).

Enquanto a principal função do Trem1 está relacionada aos granulócitos e monócitos/macrófagos, a do Trem2 está em controlar principalmente a função de outras células mielóides incluindo células dendríticas, osteoclastos e micróglia, deste modo indicando que enquanto o Trem1 amplifica a inflamação, a sinalização do Trem2 atua de forma anti-inflamatória (GIBOT *et al.*, 2007; HAMERMAN *et al.*, 2006; KLESNEY-TAIT *et al.*, 2006; TURNBULL *et al.*, 2006), além disso, células dendríticas ativadas induzem uma redução na regulação da expressão de *Trem2* (COLONNA, 2003; BOUCHON *et al.*, 2001). A expressão de *Trem2* foi observada somente as 24 e 48 horas após injúria, sendo a expressão em 48 horas significativamente maior nos animais AIRmax<sup>RR</sup> quando comparado aos animais AIRmax<sup>SS</sup> (**Figura 24**). No geral, camundongos AIRmax<sup>RR</sup> exibiram uma maior expressão dos genes testados do que os animais AIRmax portadores do alelo S, ou seja, quimiocinas e citocinas envolvidas em um processo inflamatório durante a regeneração tissular estão aparentemente atuando mais intensamente e precocemente nestes animais, o que explica uma maior expressão de *Trem2* nos animais AIRmax<sup>RR</sup> diminuindo a inflamação e iniciando a resolução da lesão.

Alguns tipos de proteases também são extremamente importantes durante a fase de remodelamento, uma destas proteases são as MMPs. Constituem uma família de endoproteases envolvidas na degradação dos componentes da matriz extracelular, e são produzidas por diferentes células como, por exemplo, fibroblastos, macrófagos, eosinófilos, mas em particular por polimorfonucleares (PMN) (BJARNSHOLT *et al.*, 2008; GOUREVITCH *et al.*, 2003).

A produção de MMP é estimulada por citocinas, fatores de crescimento e pelo contato célula-célula, além disso, é importante

---

ressaltar que estas proteases não são expressas em um tecido saudável, pelo contrário, podem ser detectadas em todos os processos de reparo e de regeneração, em tecidos lesados e inflamados, e em todas as culturas celulares em crescimento (BJARNSHOLT *et al.*, 2008; PARKS *et al.*, 2004). Além disso, participam na primeira fase do processo de reparo removendo tecidos revitalizados, já na fase de regeneração, são necessárias para angiogênese, na migração de fibroblastos e queratinócitos, e epitelização (BJARNSHOLT *et al.*, 2008). Por outro lado, alguns trabalhos sugerem que elevados níveis de MMPs ativa impedem o reparo tissular (IKEMA *et al.*, 2006; LOBMANN *et al.*, 2005; DE BENTZMANN *et al.*, 2000).

Uma das MMPs estudada neste trabalho foi a MMP9. A MMP-9 secretada por PMN possui um papel central na degradação das proteínas de matriz extracelular. OWEN e colaboradores (2003) demonstraram neste trabalho que a interação de MMP-9 na membrana plasmática de PMN permite que estas não sejam inibidas pelo TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteases), deste modo estas podem alterar o balanço proteolítico pericelular a favor da degradação da matriz extracelular (OWEN *et al.*, 2003). Essa degradação possivelmente permite a migração de neutrófilos ao local da injúria, e uma vez que estes neutrófilos migrem e se ativem, altas quantidades de MPO são produzidas. Nossos resultados demonstraram um aumento similar relevante nos transcritos para *Mmp9* entre os animais AIRmax portadores dos alelos R ou S do gene *Slc11a1* durante as 24 e 48 horas de injúria, indicando que não existe diferenças entre as sublinhagens no que se diz respeito ao envolvimento das MMPs (**Figura 25**).

Após a realização de todos esses experimentos observamos algumas evidências que favoreceram a regeneração tecidual nos animais AIRmax<sup>SS</sup> comparados aos animais AIRmax<sup>RR</sup>. No geral, animais AIRmax<sup>SS</sup> exibiram resposta inflamatória mais intensa e tardia em comparação aos animais AIRmax<sup>RR</sup>, por meio de formação de edema, níveis de MPO, influxo celular e expressão de genes moduladores deste fenótipo no início do processo.



Possivelmente, a regeneração retardada observada nos animais AIRmax<sup>RR</sup> pode ter ocorrido pelo fato desses animais apresentarem uma resposta inflamatória mais intensa no início do processo em resposta à perfuração da orelha, e o envolvimento do alelo funcional do gene promoveu-lhes uma melhor ativação de neutrófilos e macrófagos no local da lesão. A ativação eficiente dessas células deve ter proporcionado altas produções de citocinas agravando o local inflamado, inferindo em uma lesão acentuada, resultando em uma regeneração tardia.

Mais estudos devem ser realizados para uma completa elucidação dos mecanismos genéticos e celulares envolvidos na regeneração de tecidos, porém as linhagens de camundongos utilizadas em nosso estudo contribuíram na identificação de genes moduladores durante a fase inflamatória em um tipo de regeneração epimórfica.

## **6 CONCLUSÕES**

- Animais AIRmax<sup>SS</sup> apresentaram resposta inflamatória local intensa e tardia em resposta à perfuração da orelha em relação aos animais AIRmax<sup>RR</sup>, por meio da formação de edema, pelos níveis de MPO, e pela predominância de neutrófilos na lesão durante a fase inflamatória do processo de regeneração tissular.
- Ensaios de expressão gênica global demonstraram genes diferencialmente expressos entre as sublinhagens, evidenciando genes sobre-representados no tema biológico proliferação celular em ambas sublinhagens, enquanto somente nos animais AIRmax<sup>SS</sup> ocorreu sobre-representação para resposta inflamatória nos genes ativados e para contração muscular nos genes reprimidos.
- Os resultados obtidos nos experimentos de expressão gênica global foram validados por reações de PCR em tempo real. Uma modulação do alelo *S* do gene *Slc11a1* nos animais AIRmax promoveu uma baixa expressão de genes envolvidos nas primeiras horas da fase inflamatória deste processo, favorecendo desta forma a regeneração do orifício na orelha destes animais.

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>**

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

AMANO, M. T.; CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; DE FRANCO, M.; IBAÑEZ, O. M.; ISAAC, L.; STAROBINAS, N. A new model of outbred genetically selected mice which present a strong acute inflammatory response in the absence of complement component C5. **Inflamm. Res.**, v. 58, n. 4, p. 204-209, 2009.

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

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

ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W. H.; MOUTON, D.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M. Innate Resistance to Infections by Intracellular Bacteria Differs in Mice Selected for Maximal or Minimal Acute Inflammatory Response. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 9, p. 2913- 2920, 1998.

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

BARTON, C. H.; WHITEHEAD, S. H.; BLACKWELL, J. M. 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.

---

<sup>1</sup> \*De acordo com:

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

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

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAUJO, M. L.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. K.; SANT'ANNA, O.A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBANEZ, O. M. Effect of Genetic Modification of Acute Inflammatory Responsiveness on Tumorigenesis in the Mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 337-346, 1998.

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

BLACKWELL, J. M.; BARTON, C. H.; WHITE, J. K.; SEARLE, S.; BAKER, A. M.; WILLIAMS, H.; *et al.* Genomic Organization and Sequence of the Human NRAMP1 Gene: Identification and Mapping of a Promoter Region Polymorphism. **Mol. Med.**, v. 1, p. 194- 205, 1995.

BLANKENHORN, E. P.; TROUTMAN, S.; CLARK, L. D.; ZHANG, X.; CHEN, P.; HEBER- KATZ, E. Sexually Dimorphic Genes Regulate Healing and Regeneration in MRL Mice. **Mamm. Genome**, v. 14, p. 250- 260, 2003.

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

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

BORREGO, A.; PETERS, L. C.; JENSEN, J. R.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H. K.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Genetic Determinants of Acute Inflammation Regulate *Salmonella* Infection and Modulate *Slc11a1* Gene (Formerly *Nramp1*) Effects in Selected Mouse Lines. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 2766- 2771, 2006.

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

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

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

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

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

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

CELLIER, M.; SHUSTIK, C.; DALTON, W.; RICH, E.; HU, J.; MALO, D.; *et al.* The Human NRAMP1 Gene as a Marker of Professional Primary Phagocytes: Studies in Blood Cells and in Induced HL- 60 Promyelocytic Leukemia. **J. Leuk. Biol.**, v. 61, p. 96- 105, 1997.

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

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

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

DANON, D.; KOWATCH, M. A.; ROTH, G. S. Promotion of Wound Repair in Old Mice by Local Injection of Macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 2018-2020, 1989.

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

DE FRANCO, M.; CARNEIRO, P. S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O.G.; STAROBINAS, N.; CABRERA, W. K.; IBAÑEZ, O. M. *Slc11a1 (Nramp1)* Alleles Interact with Acute Inflammation Loci to Modulate Wound Healing Traits in Mice. **Mamm. Genome**, v. 18, n. 4, p. 263-269, 2007.

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

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

DOVI, J. V.; SZPADERSKA, A. M.; DIPIETRO, L. A. Neutrophil Function in the Healing Wound: Adding Insult to Injury? **Thromb. Haemost.**, v. 92, n. 2, p. 275-280, 2004. Review.

EMING, S. A.; WERNER, S.; BUGNON, P.; WICKENHAUSER, C.; SIEWE, L.; UTERMÖHLEN, O.; DAVIDSON, J. M.; KRIEG, T.; ROERS, A. Accelerated Wound Closure in Mice Deficient for Interleukin-10. **Am. J. Pathol.**, v. 170, n. 1, p. 188- 202, 2007.

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

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

FORBES, J. R.; GROS, P. Divalent- metal Transport by NRAMP Proteins at the Interface of Host- Pathogen Interactions. **Trends Microbiol.**, v. 9, p. 397- 403, 2001.

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

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

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

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

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

GOVONI, G.; GAUTHIER, S.; ISCOVE, N. N.; GROS, P. Cell Specific and Inducible *Nramp1* Gene Expression in Macrophages *in vitro* and *in vivo*. **J. Leukoc. Biol.**, v. 62, p. 277-286, 1997.

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

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

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

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

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

HACKAM, D. J.; ROTSTEIN, O. D.; ZHANG, W.; GRUENHEID, S.; GROS, P.; GRINSTEIN, S. Host Resistance to Intracellular Infection: Mutation of Natural Resistance- Associated Macrophage Protein 1 (*Nramp1*) Impairs Phagosomal Acidification. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 351- 364, 1998.

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

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

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

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

IBAÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; *et al.* Genetics of Nonspecific Immunity: I. Bidirectional Selective Breeding of Lines of Mice Endowed with Maximal or Minimal inflammatory Responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 2555-2563, 1992.

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

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

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

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



KITA, E.; EMOTO, M.; OKU, D.; NISHIKAWA, F.; HAMURU, A.; KAMIKAIDOU, N.; KASHIBA, S. Contribution of Interferon Gamma and Membrane- Associated Interleukin 1 to the Resistance to Murine Typhoid of *Ity* r Mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 51, p. 244- 250, 1992.

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

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

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

LANG, T.; PRINA, E.; SIBTHORPE, D.; BLACKWELL, J. M. Nramp1 Transfection Transfer *Ity/Lsh/Bcg* - Related Pleiotropic Effects on Macrophage Activation: Influence on Antigen Processing and Presentation. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 380- 386, 1997.

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

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

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The Role of the Macrophage in Wound Repair. A study with Hydrocortisone and Antimacrophage Serum. **Am. J. Pathol.**, v. 78, p. 71-100, 1975.

LI, X.; GU, W.; MASINDE, G.; HAMILTON-ULLAND, M.; XU, S.; MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Genetic Control of the Rate of Wound Healing in Mice. **Heredity**, v. 86, p. 668-674, 2001.

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

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

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

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

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

MARIA, D. A.; MANETTI, G.; GALBIATI, F.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA, M.; DRAGANI, T. A.; IBAÑEZ, O. M. Pulmonary Adenoma Susceptibility 1 (*Pas1*) locus Affects Inflammatory Response. **Oncogene**, v. 22, p. 426-432, 2003.

MARTIN, P. Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, 1997.

MASINDE, G. L.; LI, X.; GU, W.; DAVIDSON, H.; MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Identification of Wound Healing/Regeneration Quantitative Trait Loci (QTL) at Multiple Time Points that Explain Seventy Percent of Variance in (MRL/Mpj And SJL/J) Mice F2 Population. **Genome Res.**, v. 12, p. 2027-2033, 2001.

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

MASTELLOS, D. The ITAM bearing transmembrane adaptor DAP12 in lymphoid and myeloid cell function.; PAPADIMITRIOU, J. C.; FRANCHINI, S.; TSONIS, P. A.; LAMBRIS, J. D. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. **J. Immunol.**, v. 166, p. 2479-2486, 2001.

MCBREARTY, B. A.; CLARK, L. D.; ZHANG, X. M.; BLANKENHORN, E. P.; HEBER-KATZ, E. Genetic Analysis of a Mammalian Wound-Healing Trait. **Genetics**, v. 95, p. 11792-11797, 1998.

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

MCCOURT, M.; WANG, J. H.; SOOKHAI, S.; REDMOND, H. P. Proinflammatory Mediators Stimulate Neutrophil-Directed Angiogenesis. **Arch. Surg.**, v. 134, p. 1325-31; discussion 1331-2, 1999.

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

MUKHERJEE, T. K.; DINH, H.; CHAUDHURI, G.; NATHAN, L. Testosterone Attenuates Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 by Conversion to Estradiol by Aromatase in Endothelial Cells: Implications in Atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 4055- 4060, 2002.

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

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

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

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

OWEN, C. A.; HU, Z.; BARRICK, B.; SHAPIRO, S. D. Inducible Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-Resistant Matrix Metalloproteinase-9 on the Cell Surface of Neutrophils. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 29, p. 283-294, 2003.

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

PETERS, L. C.; JENSEN, J. R.; BORREGO, A.; CABRERA, W. H .K.; BAKER, N.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO, O. G.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Slc11a1 (Formerly NRAMP1) Gene Modulates both Acute Inflammatory Reactions and Pristane-Induced Arthritis in Mice. **Genes Immun.**, v. 8, p. 51- 56, 2007.

PLOWDEN, J.; RENSHAW-HOEISCHER, M.; ENGLEMAN, C.; KATZ, J.; SAMBHARA, S. Innate Immunity in Aging: Impact on Macrophage Function. **Aging Cell**, v. 3, n. 4, p. 161-7, 2004. Review.

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

RAMARATHINAM, L.; NIESEL, D. W.; KIMPEL, G. R. Ity Influences the Production of IFN- gamma by Murine Splenocytes Stimulated in vitro with Salmonella typhimurium. **J. Immunol.**, v. 150, p. 3965- 3972, 1993.

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

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

RENNEKAMPFF, H. O.; HANSBROUGH, J. F.; KIESSIG, V.; *et al.* Bioactive Interleukin-8 is Expressed in Wounds and Enhances Wound Healing. **J. Surg. Res.**, v. 93, p. 41- 54, 2000.

RIBEIRO, O.G. **Controle Genético da Inflamação**. Tese (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1994.

RIBEIRO, O. G.; MARIA, D. A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W. H. K.; MORISSET, J.; IBAÑEZ, O. M.; SEMAN, M. Convergent Alteration of Granulopoieses, Chemotactic Activity, and Neutrophil Apoptosis During Mouse Selection for High Acute Inflammatory Response. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, p. 497-506, 2003.

RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; MASSA, S.; DI PACE, R. F.; DE SOUZA, V. R.; STAROBINAS, N.; SEMEN, M.; IBAÑEZ, O. M. Genetic Selection for High Acute Inflammatory Response Confers Resistance to Lung Carcinogenesis in the Mouse. **Lung Res.**, v. 31, p. 105-116, 2005.

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

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

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

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

SCHÄFFER, M.; BONGARTZ, M.; HOFFMANN, W.; VIEBAHN, R. MHC-Class-II-Deficiency Impairs Wound Healing. **J. Surg. Res.**, v. XX, p. 1- 6, 2006.

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

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

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

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

STIFFEL, C.; IBAÑEZ, O.M.; RIBEIRO, O.G.; DECREUSEFOUND,C.; MOUTON,D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetic of Acute Inflammation: Inflammatory Reactions in Inbred Lines of Mice and in Their Interline Crosses. **Exp. Clin. Immunogenetics**, v. 7, p. 221-233, 1990.

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

STRIETER, R. M.; POLVERINI, P. J.; KUNKEL, S. L.; ARENBERG, D. A.; BURDICK, M. D.; KASPER, J.; DZUIBA, J.; VAN DAMME, J.; WALZ, A.; MARRIOTT, D.; et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v.270, n. 45, p. 27348-27357, 1995.

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

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

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

TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N. M.; MOUTSOPOULOS, H. M. Wound healing: immunological aspects. **Injury**, v. 37S, p. S5-S12, 2006.

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

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

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

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) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

VIDAL, S. M.; MALO, D.; VOGAN, K.; SKAMENE, E.; GROS, P. Natural Resistance to Infection with Intracellular Parasites: Isolation of a Candidate for Bcg. **Cell**, v. 73, p. 469- 485, 1993.

VIDAL, S. M.; PINNER, E.; GAUTHIER, S.; LEPAGE, P.; GROS, P. Nramp1 is an Integral Membrane Phosphoglycoprotein Absent from Macrophages of Inbred Mouse Strains Susceptible to Infection with Intracellular Parasites. **J. Immunol.**, v. 157, p. 3559- 3568, 1996.

VIDAL, S. M.; PINNER, E.; LEPAGE, P.; GAUTHIER, S.; GROS, P. Natural Resistance to Intracellular Infections: Nramp1 Encodes a Membrane Phosphoglycoprotein Absent in Macrophages from Susceptible (Nramp1 D169) mouse Strains. **J. Immunol.**, v. 157, p. 3559- 3568, 1996.

VIGAR, N. D.; CABRERA, W. K.; ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; OGATA, T. R. P.; SIQUEIRA, M.; *et al.* Pristane- induced Arthritis in Mice Selected for Maximal or Minimal Acute Inflammatory Reaction. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, p. 431-437, 2000.

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

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

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

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

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

WOJCIECHOWSKI, W.; DESANCTIS, J.; SKAMENE, E.; RADZIOCH, D. Attenuation of MHC class II Expression in Macrophages Infected with *Micobacterium bovis* BCG Involves class II Transactivator and Depends on the Nramp1 Gene. **J. Immunol.**, v. 163, p. 2688- 2696, 1999.

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

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

YU, H.; MOHAN, S.; MASINDE, G. L.; BAYLINK, D. J. Mapping the Dominant Wound Healing and Soft Tissue Regeneration QTL in MRL X CAST. **Mamm. Genome**, v. 16, p. 918- 924, 2005.

# 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](#)