

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA**  
**LABORATÓRIO DE ANGIOGENESE**

**Influência do *background* genético na angiogênese  
inflamatória em camundongos hétero- e isogênicos**

**ALUNA: Suzane Mota Marques Costa**

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Silvia Passos Andrade**

**CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. Paula Peixoto Campos**

**BELO HORIZONTE**

**2012**

**SUZANE MOTA MARQUES COSTA**

**Influência do *background* genético na angiogênese inflamatória em camundongos hétero- e isogênicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof. Dra. Sílvia Passos Andrade

Co-orientadora: Prof. Dra. Paula Campos Peixoto

Belo Horizonte / MG

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

REITOR: Clélio Campolina Diniz

VICE-DIRETORA: Rocksane de Carvalho Norton

**Pró-reitoria de Pós-graduação:**

Pró-reitor: Ricardo Santiago Gomez

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Diretor: Tomaz Aroldo da Mota Santos

Vice-diretora: Janetti Nogueira de Francischi

**Pós-graduação em Ciências Biológicas- Fisiologia e Farmacologia**

Coordenadora: Adelina Martha dos Reis

“Se as coisas são inatingíveis, isso não é motivo para não querê-las, que triste os caminhos sem a mágica presença das estrelas.” (Mário Quintana)

Dedico esse trabalho a Deus,  
aos meus pais, minha irmã,  
e à minha amiga Pollyana.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que me deu determinação para trilhar todo esse caminho, não me deixou esmorecer e me fez acreditar que eu fosse capaz.

Aos meus pais, exemplo de vida para mim. Minha mãe, uma mulher muito trabalhadora, que não desiste nunca dos seus objetivos, extremamente forte e batalhadora. Pai, um homem sempre disposto a ajudar as pessoas, muito dedicado a tudo que faz e com certeza uma das pessoas mais pacientes que conheço. Obrigada pelo exemplo de ética e determinação e por terem contribuído para a formação do meu maior bem, o caráter. Obrigada pelo apoio e carinho. Todo esforço que fizeram por mim foi essencial para a realização de todos os meus sonhos, incluindo esse. Amo muito vocês!

À minha irmã, a pessoa mais caridosa que conheço. Sempre pensando mais nos outros do que nela mesma, esteve sempre disposta a me ouvir e apoiar. Com toda certeza, a melhor amiga que tenho. Foi uma peça fundamental para que eu conquistasse esse sonho, ajudando financeiramente e emocionalmente. Caprichosa e detalhista, para tudo que faz se dá ao máximo. Obrigada irmã, por tudo! Amo muito você!

À minha orientadora Silvia Passos, por todos os conhecimentos que compartilhou comigo, pela paciência e tranquilidade. Foi peça fundamental para minha iniciação na ciência, pois é um exemplo de profissional, dedicando-se de corpo e alma ao seu trabalho. Além disso, é também um exemplo de ser humano, pois trata a todos com respeito e carinho e está sempre disposta a ajudar. Muito obrigada Silvia!

À minha amiga Pollyana, que sempre me auxiliou muito em todo mestrado. Amiga de longa data, dividiu comigo muito trabalho, incertezas, frustrações e também muitas alegrias. É uma pessoa extremamente boa, caridosa, amável e dedicada. Não sei o que seria de mim sem essa amiga. Muito obrigada, por tudo!

À minha amiga Fernanda (Fernandez), que foi uma surpresa muito agradável no laboratório e que trouxe muita alegria e descontração. Pessoa humilde, alegre, engraçada e com quem compartilhei momentos muito divertidos. Obrigada!

À minha amiga Cibele, uma pessoa muito tranquila e dedicada, que sempre esteve disposta a me ajudar e com quem também dividi momentos maravilhosos.

Ao meu amigo Celso, por toda força nos momentos de dificuldade e pela sua alegria diária.

Aos meus colegas de laboratório, Brígida e Arturzinho, Luiza, Jousie, Ciça, Leandro, Fabrício e Tiago, por todos os momentos agradáveis que passamos no laboratório.

Às professoras Mônica Ferreira e Paula Campos, pelas inúmeras contribuições ao meu trabalho.

À professora Lucíola Barcellos, pelo auxílio e paciência.

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação, Cintya e Nilda, pela paciência e colaboração.

À todos os funcionários do ICB, Zezé, Janine, Gilmar, Elmo, Gabriel, Vander, Paulo, Deusmira e Dejaime, por toda ajuda que me deram durante todo o Mestrado.

Obrigada a todos, sem vocês nada disso seria possível.



## Índice

<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Relação de figuras.....</b>	<b>IX</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>X</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XII</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Metodologia.....</b>	<b>18</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>27</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>42</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>52</b>
<b>7. Sumário e contribuições científicas.....</b>	<b>53</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>54</b>
<b>9. Anexos.....</b>	<b>77</b>

**Lista de abreviaturas:**

Abreviatura	Significado
Ang	Angiopietinas
CCL-2	Quimiocina ligante 2
Hb	Hemoglobina
IL	Interleucina
IFN- $\gamma$	Interferon gama
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
nmol	nanomol
NAG	N-acetil- $\beta$ -D- glucosaminidase
OPD	o-fenilenediamina dihidrocloride
rpm	rotações por minuto
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
SEM	Erro padrão da média
TGF- $\beta$ 1	Fator de crescimento transformante $\beta$ 1
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
$\mu$ g	Micrograma

As demais abreviaturas e siglas foram explicadas quando citadas pela primeira vez no texto.

**Relação de Figuras:**

**Figura 1-** Etapas da angiogênese inflamatória.

**Figura 2-** Cinética do influxo de células inflamatórias em implantes de camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/6J.

**Figura 3-** Cinética da produção das citocinas TNF- $\alpha$  e CCL-2 nos implantes de esponja de camundongos Swiss, C57BL/6J e BALB/c.

**Figura 4-** Cinética do conteúdo de hemoglobina, produção de VEGF e número de vasos nos implantes de esponja de Swiss, BALB/c e C57BL/6J.

**Figura 5-** Parâmetros vasculares nos implantes de camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/6J.

**Figura 6-** Cortes histológicos representativos de tecido fibrovascular induzido em implantes subcutâneos em camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/6J no dia 10 pós-implantação.

**Figura 7-** Cinética da deposição de colágeno e níveis de TGF- $\beta$ 1 em implantes de camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/6J.

**Figura 8-** Difusão de fluoresceína após injeção intradérmica do marcador em linhagens Swiss, BALB/c e C57BL/6J.

## Resumo

Inflamação e angiogênese são componentes essenciais do crescimento do tecido fibrovascular, um evento biológico relacionado a condições fisiológicas (cicatrização de feridas) e patológicas (desenvolvimento de tumor, inflamação crônica). A influência do *background* genético sobre esses componentes foi investigada em camundongos de linhagens frequentemente utilizadas: Swiss, C57BL/6J e BALB/c. Avaliou-se a cinética do recrutamento/ativação de células inflamatórias, neovascularização, deposição de matriz extracelular e produção de citocinas em esponjas de poliéster-poliuretano implantadas subcutaneamente em camundongos machos dessas três linhagens. O recrutamento/ativação de neutrófilos avaliada pela atividade da mieloperoxidase (MPO) foi 2 e 3 vezes maior em implantes de 24 horas de camundongos BALB/c comparados com implantes de camundongos Swiss e C57BL/6J, respectivamente. O número de macrófagos avaliado através da atividade de NAG (N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase) foi maior nos implantes em animais Swiss. Os níveis da proteína quimiotática de monócitos 1 (CCL-2) apresentou pico no décimo dia pós-implantação, nos implantes retirados das três linhagens de camundongo, sendo o maior nível de produção dessa proteína observada nos implantes de camundongos C57BL/6J. A angiogênese foi avaliada através dos níveis de hemoglobina (Hb), do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e do número de vasos; os quais diferiram entre as três linhagens de camundongos. Os implantes nos camundongos Swiss apresentaram maior conteúdo de hemoglobina, mas menores níveis de VEGF. Em contraste, implantes nos camundongos BALB/c apresentaram maiores níveis de VEGF, porém menor nível de Hb. A deposição de

colágeno e os níveis do fator de crescimento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) também variaram entre as linhagens. Implantes nos animais Swiss e BALB/c apresentaram progressivo aumento de TGF- $\beta 1$  do dia 4 ao 14, enquanto implantes nos camundongos C57BL/6J apresentam pico no dia 10 e redução no dia 14. Esses achados enfatizam a influência do *background* genético no padrão temporal e na intensidade da inflamação e angiogênese os quais podem ter conseqüências funcionais nas condições fisiológicas e patológicas onde esses processos co-existem.

**Palavras-chaves:** citocinas, implante de esponja, linhagens de camundongos, C57BL/6J, BALB/c, Swiss.

## Abstract

Inflammation and angiogenesis are key components of fibrovascular tissue growth, a biological event underlying both physiological (wound healing) and pathological conditions (tumor development, chronic inflammation). We investigated these components in three frequently used mouse strains (Swiss, BALB/c and C57BL/6J) to verify the influence of genetic background on the kinetics of inflammatory cell recruitment/activation, neovascularization, extracellular matrix deposition, and cytokine production in polyetherpolyurethane sponge implanted subcutaneously in male mice of these strains. The kinetics of neutrophil recruitment/activation as assessed by myeloperoxidase (MPO) activity was 2 and 3-fold higher in BALB/c implants at day 1 compared with Swiss and C57BL/6J implants, respectively. Macrophage accumulation/activation as NAG (N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase) activity was higher in Swiss implants. The levels the monocyte chemoattractant protein 1 (CCL-2) peaked at day 10 in the three types of implants but was produced more by C57BL/6J mice. Angiogenesis (hemoglobin, vascular endothelial growth factor (VEGF), and number of vessels differed among the strains. Swiss implants had the highest hemoglobin content but the lowest VEGF levels. In contrast, BALB/c implants had higher VEGF levels but lower hemoglobin. Collagen deposition and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ -1) levels also varied among the groups. Swiss and BALB/c implants had progressive increase in TGF- $\beta$ 1 from 4 to 14 days, while C57BL/6J implants achieved the peak at day 10 and fell at day 14. These findings emphasize the major contribution of genetic background in the temporal pattern and intensity of

inflammatory angiogenesis components that may have functional consequences in physiological and pathological conditions where these processes co-exist.

**Keywords:** cytokines, sponge implant, C57BL/6J, BALB/c, Swiss mouse strain

# 1. INTRODUÇÃO



## 1.1 *Background* genético

*Background* genético é a coleção de todos os genes presentes em um organismo que influencia uma ou mais características. Esses genes podem ser parte de uma mesma via bioquímica ou de sinalização ou de vias opostas ou podem ainda aparecer sem relação com o gene estudado. O *background* genético não é uma entidade fixa, podendo alterar-se com a idade ou com alterações do ambiente físico (SIGMUND, 2000; LEITER et al., 2004; ANDRIKOPOULOS et al., 2005; JOHNSON et al., 2006; DOETSCHMAN, 2009).

Para avaliar o impacto de alterações na atividade gênica, genes candidatos têm sido deletados ou superexpressos gerando modelos de animais geneticamente modificados (SIGMUND 2000; ANDRIKOPOULOS et al., 2005; BERTOK, et al., 2011; JEANSSON et al., 2011; MARRAZO et al., 2011; PAWLOWSKA, et al., 2011).

A utilização de linhagens de camundongos, transgênicos e nocautes, é uma importante ferramenta para testes e verificações de hipóteses, incluindo mecanismos que envolvem a cicatrização de feridas. Esses animais são frequentemente uma mistura genética e por isso apresentam dificuldades para aqueles que tentam usar controles mais apropriados em seus estudos (CHAN, 1999; HARTNER et al., 2003; PAL-GHOSH et al., 2008; THIESSE, et al., 2010; QIAO et al., 2011). Ao gerar um camundongo transgênico ou nocaute, a escolha da predisposição genética pode ter um efeito significativo no fenótipo. Isso implica que a seleção da linhagem do animal pode ser de vital importância para os resultados do estudo (BORNE et al., 2009; THIESSE et al., 2010; WANG et al., 2010). As

diferenças fenotípicas entre as linhagens de camundongos podem ser identificadas, mas a comparação entre dados obtidos é extremamente difícil (HARTNER et al., 2003; MASSET & BERK, 2005).

## 1.2 Classificação genética dos animais de laboratório

Com o avançar da Ciência de Animais de Laboratório vários estudos genéticos que resultaram da necessidade do conhecimento e aprimoramento do padrão genético das espécies trouxeram aos dias atuais uma diversidade de linhagens geneticamente definidas, que muito tem contribuído com as pesquisas biológicas (BISHOP, 1999).

Atualmente, a classificação genética das espécies se baseia e está de acordo com os programas de acasalamento utilizados. Estes definem a forma de transmissão dos caracteres genéticos. A partir desses entendimentos tem-se dois grandes sistemas: *inbred* (ou isogênicos) e *outbred* (ou heterogênicos) ([www.uff.br/animaislab/ap6.doc](http://www.uff.br/animaislab/ap6.doc)).

Animais isogênicos são obtidos a partir de cruzamentos entre irmãos da mesma geração, por pelo menos, vinte gerações consecutivas em pares monogâmicos permanentes. Isto assegura um alto grau de consaguinidade, cerca de 98,6%, fixando algumas características e perdendo outras. Em geral, são animais de menor porte, menos férteis e com menor número de filhotes por ninhada quando comparados aos animais heterogênicos. Nesse grupo, encontram-se as linhagens BALB/c e C57/BL6 ([www.uff.br/animaislab/ap6.doc](http://www.uff.br/animaislab/ap6.doc)).

Os camundongos C57/BL6 constituem a linhagem mais usada entre os animais isogênicos. Esta linhagem é caracterizada por uma alta susceptibilidade à obesidade induzida por dieta, com moderada hiperglicemia e hiperinsulinemia (SURWIT et al., 1991). Diferenças genéticas na resposta metabólica da gordura têm sido sugeridas como mais importantes para o desenvolvimento da obesidade e diabetes do que a ingestão calórica (SURWIT et al., 1995). Além disso, esses animais são altamente susceptíveis ao desenvolvimento de arteriosclerose, apresentando altos níveis de colesterol quando oferecida dieta rica em gordura (OOSTERLINCK et al., 2011).

Já os animais do tipo BALB/c são usados em vários tipos de estudos. Eles desenvolvem altos níveis de colesterol plasmáticos e altas pressões sanguíneas sistólicas, mas são resistentes à arteriosclerose induzida por dieta. Embora apresentem uma baixa frequência cardíaca média, eles mostram altas taxas de adaptação cardíaca (OOSTERLINCK et al., 2011).

Por outro lado, os animais heterogênicos são animais de constituição genética variada, por serem obtidos através de cruzamentos aleatórios, evitando que animais em acasalamento sejam parentes próximos. Com isso, busca-se manter um baixíssimo grau de consangüinidade, cerca de 1%. Esses animais são mais robustos, com maior fertilidade, com maior número de filhotes por ninhada e menos susceptíveis às variações do meio. A linhagem de camundongo Swiss se encontra nessa categoria ([www.uff.br/animaislab/ap6.doc](http://www.uff.br/animaislab/ap6.doc)).

Os camundongos Swiss são animais albinos, usados amplamente em todos os tipos de pesquisas biomédicas, especialmente pesquisas relacionadas ao câncer, estudos de toxicidade e doenças infecciosas (ABBOTT et al.; NYSKA et al., 1991; 1991; OOSTERLINCK et al., 2011).

### 1.3 Heterogeneidade fenotípica entre as linhagens

Embora todas as linhagens de camundongos possuam a mesma coleção de genes, seqüências diferentes e interações entre os alelos influenciam fenótipos específicos. Um grande número de trabalhos relata que a mesma alteração gênica produz fenótipos diferentes quando presentes em linhagens distintas de camundongos (SIGMUND 2000; LEITER et al., 2004; ANDRIKOPOULOS et al., 2005; JOHNSON et al., 2006; DOETSCHMAN, 2009).

Estudos anteriores têm demonstrado que fenótipos causados por modificações genéticas seletivas são influenciados por genes não associados ao locus alvo. Por exemplo, a deleção do gene p53 aumenta a freqüência de formação de tumores em camundongos nocautes comparada aos animais selvagens. Mas, os tipos de tumores, o número dos mesmos e a idade em que eles são formados variaram em diferentes *backgrounds* genéticos (HARVEY et al., 1993; DONEHOWER et al., 1995; VAN MEYEL et al., 1998).

Outras diferenças fenotípicas influenciadas pelo *background* genético já foram descritas. MANIGRASSO & O'CONNOR (2008), mostraram que comparando-se as três linhagens isogênicas C57BL/6J, DBA/2 e C3H4, os animais do tipo C57BL/6J apresentaram uma regeneração óssea mais acelerada. Por outro lado, ANDRIKOPOULOS et al. (2005) comparando também três linhagens isogênicas, C57BL/6J, DBA/2 e 129T2; observou que animais do tipo 129T2 obtiveram maiores níveis de glicose e insulina em jejum, além de maior glicose plasmática e menor secreção de insulina comparada às outras duas linhagens, independente da dieta oferecida.

Com relação à cicatrização, MASINDE et al. (2005) relataram que animais MRL/MPJ e MRL/lpr apresentam uma boa cicatrização, enquanto o C57BL/6J e SJL/J possuem uma cicatrização lenta e que cruzamentos entre eles podem melhorar ou amenizar essas características. Além disso, UENO et al. (2005) mostraram que camundongos C57BL/6J apresentaram uma pior cicatrização da córnea quando comparados a animais do tipo MRL, com reepitelização mais lenta, maior infiltrado de células inflamatórias e maior fibrose. Contudo, PAL-GOSH et al. (2008) observaram que os animais do tipo C57BL/6J possuem uma cicatrização da córnea mais rápida quando comparados à linhagem BALB/c. E por fim, BORNE et al. (2009) mostraram que o infarto ocorre com maior frequência em animais do tipo 129S6, seguida de C57BL/6J, FVB/N, Swiss e BALB/c.

Outros fenótipos observados influenciados pelo *background* genético incluem tolerância ao etanol (LINSENBARDT et al., 2009), sepse (ZHANG et al., 2010), susceptibilidade à glomerulonefrite autoimune (REYNOLS et al., 2006), resposta ao treinamento físico (MASSET & BERK, 2005), entre outros.

Porém, não foram encontrados relatos sobre a influência do *background* genéticos em resposta a estímulos que induzem a angiogênese inflamatória. Estímulos estes que co-existem em várias condições fisiológicas (cicatrização de feridas, reparos teciduais) e patológicas (artrite reumatóide, tumores). Assim, mostrou-se necessário um estudo que explicitasse de que forma o *background* genético pode influenciar nesse tipo de resposta. Neste contexto de heterogeneidade genética, SIGMUND, em 2000, ressalta a importância da publicação de resultados obtidos com relação às diferenças fenotípicas entre as

linhagens de camundongos, a fim de sugerir diretrizes na escolha dos animais a serem utilizados nos estudos.

#### **1.4 Reparo tecidual**

O reparo tecidual é um processo biológico complexo, compreendido de uma série de eventos seqüenciais que resultam no restabelecimento da integridade e função do tecido. O papel do sistema imune neste processo é reconhecer e combater antígenos no local da lesão, participar do debridamento da área lesada e contribuir para a restauração do tecido. O reparo é composto por quatro etapas que se sobrepõem temporal e espacialmente (CLARK, 1996; TSIROGIANNI et al., 2006).

##### **1.4.1 Fase de hemostasia e inflamação**

A fase inflamatória das lesões desempenha um papel central na cicatrização de feridas. Condições de estresse fisiológico ou patológico exigem adaptações das células e do microambiente. A inflamação é a primeira e a mais importante reação ao dano de células e tecidos (ALBINI et al., 2005; BALKWILL et al., 2005).

Com base na informação visual, os antigos caracterizam a inflamação por cinco sinais cardinais: rubor, edema, calor, dor e perda de função. A sensação de calor é causada pelo aumento da circulação de sangue através dos vasos dilatados, também resultando no rubor. O inchaço é resultado do aumento da passagem de fluidos dos vasos sanguíneos dilatados para os tecidos circulantes e a infiltração de células na região danificada. A dor é devido a efeitos diretos de mediadores,

causada pelo dano inicial ou resultante da resposta inflamatória em si e do alongamento das fibras sensoriais devido ao edema. A perda de função refere-se à simples perda de mobilidade em uma articulação, devido ao edema e a dor ou substituição de células funcionais por tecido de cicatrização (PUNCHARD et al., 2004).

Mais recentemente, a inflamação foi descrita como a sucessão de mudanças que ocorrem em um tecido vivo quando este está lesionado, desde que a lesão seja incapaz de destruir sua estrutura e vitalidade (PUNCHARD et al., 2004; HAHN & KIM, 2010).

Nesse contexto de inflamação, os neutrófilos são os primeiros tipos celulares que entram na área lesada predominando até o terceiro dia, com o pico em 48 horas pós-lesão. Essas células limpam a área lesada (fagocitose), impedindo a invasão e a proliferação de microorganismos (DIEGELMANN & EVANS, 2004; NUNES et al., 2011). Eles são atraídos por numerosas citocinas inflamatórias como as produzidas por plaquetas ativadas, células endoteliais e produtos de degradação de agentes patogênicos. As citocinas liberadas por essas células durante o processo de apoptose são importantes componentes no recrutamento de monócitos. Os monócitos circulantes penetram então na ferida e se transformam em macrófagos. Essas células são conhecidas por secretar fatores de crescimento e mediadores inflamatórios essenciais que coordenam processos importantes, como deposição de colágeno, contração da ferida e angiogênese (THURAISINGAM et al., 2010; WRIGHT et al., 2010; MURPHY et al., 2011). Entre esses fatores podemos destacar o óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias tais como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 ou IL-12 e a superexpressão do complexo principal de

histocompatibilidade (MHC). Essas substâncias também possuem características antibióticas e antitumorais (RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010).

#### **1.4.2 Fase proliferativa e angiogênese**

A fase proliferativa é caracterizada por angiogênese, deposição de colágeno, formação de tecido de granulação, contração da ferida em roedores e em humanos (NAYAK et al., 2009). Nessa fase, os fibroblastos migram sobre a estrutura de fibrina substituindo-a por uma rede de colágeno, através da excreção de colágeno e fibronectina, restaurando assim a matriz extracelular (MEC) na ferida. O colágeno é o principal componente que fortalece e suporta o tecido extracelular (NAYAK et al., 2009; MURPHY et al., 2011).

Na etapa de contração da ferida em camundongos, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos. Essas células contráteis ajudam a preencher as lacunas entre as bordas da ferida. No mesmo momento, fatores de crescimento produzidos pelo tecido de granulação irão favorecer a proliferação e diferenciação de células epiteliais que irão restaurar a integridade da barreira epitelial, através da remodelação das redes de colágeno (NAYAK et al., 2009, RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010; MURPHY et al., 2011).

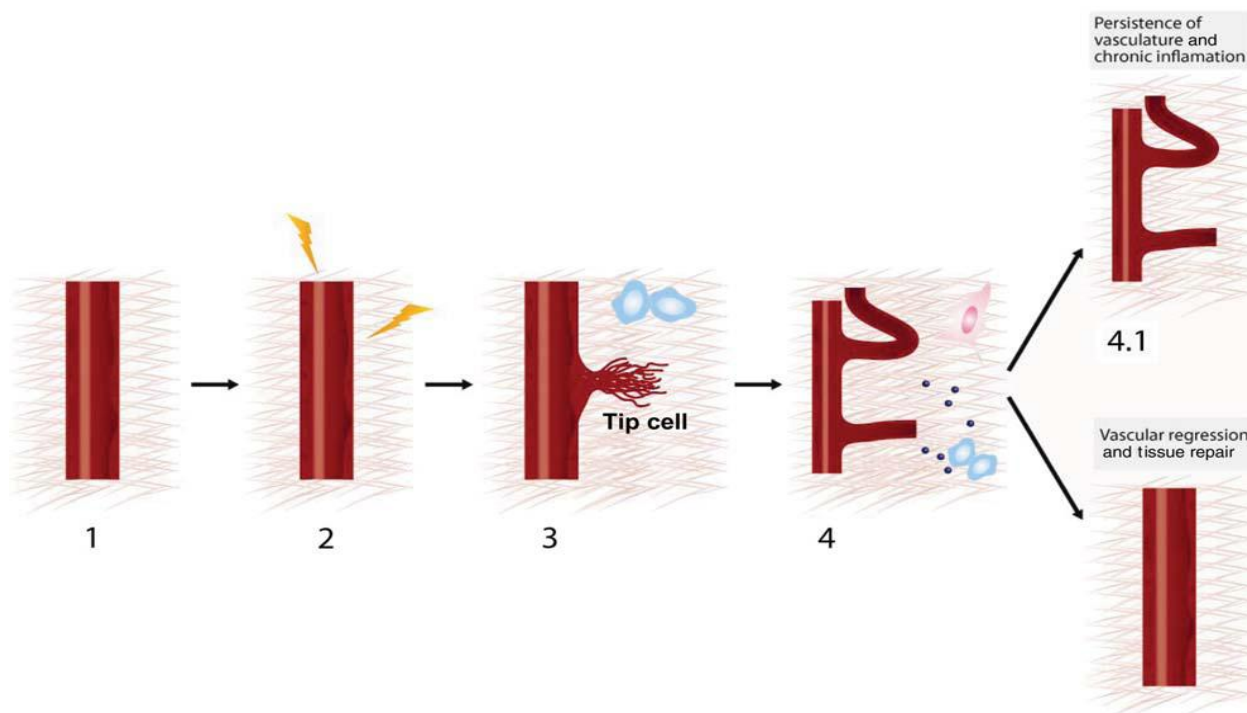
##### **1.4.2.1 Angiogênese**

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. Esse processo é de vital importância para a homeostase e



remodelamento tecidual. É um processo complexo, controlado por inúmeros fatores de regulação positiva e negativa. Na maioria dos tecidos, a vasculatura é primariamente quiescente, com taxas muito baixas de replicação (CARMELIER, 2005). Contudo, vasos pré-existentes podem dar origem a novos vasos sob a influência de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas liberados por infiltrado celulares presentes, como por exemplo, no processo inflamatório, na injúria vascular, na hipóxia e no estresse oxidativo (CHAO & HIRSCHI, 2010; RICHARDSON & YODER, 2011).

O processo de formação de novos vasos sanguíneos inicia-se com a ativação das células endoteliais as quais se separam de suas células vizinhas, devido à ruptura de junções de caderinas do endotélio vascular, resultando no aumento da permeabilidade vascular. A membrana basal é degradada por enzimas proteolíticas tais como metaloproteinases de matriz (MMPs), liberando fatores angiogênicos que, por sua vez, estimulam a proliferação e migração de células endoteliais. Formação do tubo capilar, deposição de uma nova membrana basal e anastomose levam ao fluxo sanguíneo (Figura 1). Fatores produzidos por células endoteliais tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), atraem células de suporte como os pericitos, enquanto o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e angiopoietinas (Ang) garantem a estabilidade do vaso (BONNET & WALSH, 2005; ARROYO & IRUELA-ARISPEM, 2010). A angiogênese permite o suprimento de oxigênio, nutrientes e células inflamatórias necessárias para o processo de cicatrização que ocorre dentro do tecido (ANDRADE et al., 1997 & BRASSHAW et al., 2001 & RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010).



**Figura 1-** Etapas da angiogênese inflamatória. (1) Vasculatura quiescente. (2) Inflamação induzida por fontes locais ou sistêmicas ativam um processo angiogênico por aumento da permeabilidade vascular e por desestabilização de junções de células endoteliais. (3) Proteólise da matriz extracelular por células endoteliais em processo de “brotamento” induzidas por estímulo inflamatório. (4) Formação dos vasos estimulados por células e mediadores inflamatórios. (4.1) Persistência dos vasos e inflamação crônica. (4.2) Regressão vascular e tecido de reparo (Copiado de ARROYO & IRUELA-ARISPEM, 2010).

### 1.4.3 Fase de remodelamento

A última etapa do processo de cicatrização consiste na involução gradual do tecido de granulação e regeneração. Este passo está associado com a apoptose de miofibroblastos, células endoteliais e macrófagos (RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010; WRIGHT et al., 2010).

Durante a fase de remodelamento, ocorre a reparação final da matriz extracelular, a fim de melhorar a resistência mecânica do tecido (GERIS et al.,

2010). Essa fase é a mais longa, podendo durar semanas ou até meses para ser concluída. Fibroblastos na ferida continuam remodelando colágeno e os vasos sanguíneos regridem deixando uma cicatriz avascular. O tecido resultante é caracterizado pelo aumento da densidade do colágeno, maiores níveis de alinhamento das fibras e proporções diferentes de colágeno I e III dos observados em tecidos normais (CUMMING et al., 2010).

### **1.5.1 Indutores de angiogênese**

O crescimento de vasos é uma complexa cascata de eventos biológicos, que requer a interação dinâmica, temporal e espacial entre células endoteliais, fatores de crescimento e uma rede complexa de componentes da matriz extracelular (EMING & HUBBELL, 2011; ZHANG et al., 2011). Nesse grande grupo, os fatores de crescimento de fibroblastos 1 e 2 (FGF-1 e FGF-2) são descritos como fatores essenciais para a angiogênese (EMING & HUBBELL, 2011). Mediadores inflamatórios também podem estimular a angiogênese direta ou indiretamente. Células inflamatórias que produzem esses fatores incluem macrófagos e mastócitos. Existem vários mecanismos pelo qual os macrófagos podem induzir a angiogênese. Essas células podem secretar fatores que estimulam também outras células, como células endoteliais e fibroblastos, para produzirem fatores angiogênicos como o VEGF.

Os fatores angiogênicos ativam complexas cascatas de sinalizações de células endoteliais (NAYAK et al., 2009; MURPHY et al., 2011). O VEGF é um dos fatores mais críticos e específicos que induz várias funções endoteliais ligadas à

angiogênese, incluindo migração e proliferação das células endoteliais, responsáveis pela cicatrização do tecido (KROLL et al., 2009; ZHANG et al., 2011). Essas células usam a matriz extracelular para formação de novos vasos (NAYAK et al., 2009; MURPHY et al., 2011).

Embora ainda não esteja bem definido, neutrófilos e linfócitos também tem sido relacionados à indução primária da angiogênese uma vez que ambos os tipos celulares produzem o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e VEGF (BONNET & WALSH, 2005).

Assim como as células inflamatórias, condições inflamatórias também estimulam a angiogênese. Hipóxia tecidual frequentemente ocorre no tecido inflamado e é um estimulador potencial da angiogênese. A expressão de VEGF é aumentada durante a hipóxia e acredita-se que essa estimulação da angiogênese seja uma tentativa de restaurar o baixo conteúdo de oxigênio no tecido (BONNET & WALSH, 2005).

## **1.6 Modelos experimentais para o estudo de inflamação e angiogênese**

Na literatura, encontram-se vários modelos experimentais *in vivo* desenvolvidos para o estudo da inflamação, como por exemplo: ensaio bidimensional mesentérico (BENEST & BATES, 2009), administração de radioisótopos inertes na corrente sanguínea e mensuração do tempo de captação destes pelos tecidos (TOZER et al, 2009), avaliação da migração de células endoteliais em matrigel (MALINDA, 2009), técnica de câmara de pregas cutâneas dorsais (SCKELL & LEUNIG, 2009), modelo da bolsa da córnea (ZICHE & MORBIDELLI, 2009), modelo de fibras ocas

(SHNYDER, 2009), modelo de janela óssea craniana (SCKELL & KLENKE, 2009<sup>2</sup>) e modelo de implantação de esponja (ANDRADE & FERREIRA, 2009).

### **1.6.1 Modelo de implantação de esponja**

No modelo de implantação de esponja, a resposta do hospedeiro a uma matriz sintética é análoga à cicatrização. As matrizes esponjosas, inicialmente acelulares e não vascularizadas, são implantadas no tecido subcutâneo do animal. Inicia-se, então, um processo complexo, primariamente gerido por células inflamatórias que acumulam dentro do compartimento da esponja e posteriormente por angiogênese e deposição de matriz extracelular no local da injúria. Assim sendo, este modelo proporciona um ambiente inflamado, em fase aguda ou crônica, dependendo do tempo em que o implante de esponja permanece no espaço subcutâneo do animal. Cada um dos vários componentes do tecido fibrovascular proliferativo (angiogênese, recrutamento e ativação de células inflamatórias e deposição de matriz extracelular) pode ser determinado após o extirpe e processamento do implante. O modelo de inflamação aguda é particularmente útil, permitindo a coleção e análise das fases fluidas e celulares do exsudato formado dentro da esponja. O modelo também foi modificado para o estudo de respostas inflamatórias mais crônicas e avaliação do tecido de granulação (ANDRADE et al., 1997; BRADSHAW, et al., 2001; BELO et al., 2005; CAMPOS et al., 2006).

Além disso, o modelo de implante de esponja é empregado para caracterizar a sequência de alterações histológicas na formação do tecido de granulação e para monitorar a cinética de proliferação celular. A medida da acumulação de neutrófilos

e macrófagos recrutados no compartimento da esponja tem sido possível através da determinação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) (ANDRADE & FERREIRA, 2009).

Dessa forma, esse modelo apresenta-se adequado para avaliação da influência do *background* genético na angiogênese inflamatória, uma vez que permite a determinação do crescimento do tecido fibrovascular.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência do background genético na angiogênese inflamatória induzida por implantes de esponjas em camundongos hereto- e isogênicos.

## **2.2 Objetivos específicos**

- 1- Caracterizar a cinética da inflamação, da angiogênese e da fibrogênese em implantes subcutâneos nestes animais utilizando-se parâmetros bioquímicos, morfológicos e funcionais em camundongos das linhagens Swiss, BALB/c e C57BL/6J.
- 2- Determinar os níveis intrainplante de marcadores inflamatórios (MPO, NAG, TNF- $\alpha$ ), angiogênicos (hemoglobina, VEGF, difusão de fluoresceína) e fibrogênicos (colágeno, TGF- $\beta$ ) nas três linhagens.
- 3- Avaliar e comparar características histológicas dos implantes nas três linhagens utilizando-se técnicas histoquímicas, para a determinação da celularidade, presença e diâmetro de vasos sanguíneos e infiltração de células inflamatórias.
- 4- Caracterizar o fluxo sanguíneo das três linhagens em um tecido pré-existente adjacente ao implante (pele do dorso).



## **3. METODOLOGIA**

### **3.1 Animais utilizados**

Foram utilizados animais machos das linhagens Swiss, BALB/c e C57BL/6J, com idade de 6 a 8 semanas, pesando aproximadamente 30 gramas, provenientes do Centro Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante todo o procedimento experimental in vivo, os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração.

### **3.2 Técnica de implantação**

#### **3.2.1 Confeção e preparo dos discos de esponja**

Inicialmente, foram confeccionados discos de esponjas de poliéster-poliuretano (Vitafoam Ltd., Manchester, UK) com 0,8 cm de diâmetro e 5 mm de espessura utilizando um *punch* cirúrgico. Em seguida, estes foram conservados em solução de etanol 70% v/v durante 24 horas antes à implantação.

Antecedendo o início do implante, os discos de esponjas foram lavados e fervidos em água destilada por aproximadamente 30 minutos.

#### **3.2.2 Implantação em camundongos**

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com Ketamina/Xilasina (Syntec; 1mg/Kg de peso corporal) e submetidos à tricotomia e assepsia da região dorsal com etanol 70%. Em seguida, realizou-se uma incisão de

aproximadamente 1 cm na pele e, após delicada divulsão do tecido subcutâneo, o disco de esponja foi introduzido a aproximadamente 1 cm da incisão, próximo à região cervical. Finalmente, suturou-se a incisão com fio de sutura agulhado, 5-0 (Procure). Após a cirurgia, os animais foram mantidos em observação para avaliação de possível desconforto ou sofrimento e após a recuperação foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso à água e a ração (ANDRADE & FAN & LEWIS, 1987).

### **3.2.3 Remoção dos implantes**

Em intervalos de tempo pré-determinados (1, 4, 10 e 14 dias) pós-implantação administrou-se uma “overdose” de anestésico para sacrifício e retirada dos implantes. Estes foram removidos, pesados e processados para estudos bioquímicos, histológicos e funcionais.

### **3.3 Dosagem de hemoglobina**

A dosagem do conteúdo de hemoglobina intraimplante quantifica indiretamente a neovascularização presente nos tecidos e tem sido utilizada como índice de vascularização em modelos de angiogênese. Esta técnica utiliza o método do reagente de Drabkin (DRABKIN & AUSTIN, 1932, FERREIRA et al., 2004; MENDES et al., 2009).

Os discos de esponja foram cuidadosamente extraídos dos animais, pesados, homogeneizados utilizando um homogeneizador para tecidos (Tekmar TR-10, Ohio,

EUA) em 2,0 mL de um reagente de Drabkin (Labtest, São Paulo, Brazil) e centrifugados a 10000 rpm por 40 minutos a 4° C. Em seguida, os sobrenadantes foram filtrados em membranas de 0,22µm (Millipore) e colocados em placas com 96 poços. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540 nm e a concentração de hemoglobina determinada por comparação a uma curva padrão de hemoglobina. Os resultados obtidos foram expressos em concentração de hemoglobina (microgramas-µg) por miligrama-mg de peso úmido do implante (FERREIRA et al., 2004; BARCELOS et al., 2005).

### **3.4 Avaliação da atividade da mieloperoxidase**

O acúmulo de neutrófilos é um indicador da resposta inflamatória. Esse tipo de célula possui função fagocítica, contribuindo para eliminação de detritos (MCDONAL et al., 2010). A mieloperoxidase é uma enzima presente em grânulos azurofílicos de neutrófilos sendo portanto utilizada para indicar o recrutamento desse tipo celular (CAMPOS, et al., 2008; XAVIER et al., 2010; ARAUJO et al., 2011; MOURA, et al., 2011).

Após a dosagem de hemoglobina, o sobrenadante foi desprezado e o disco de esponja dividido em duas partes semelhantes. As partes foram pesadas e utilizadas para dosagem da mieloperoxidase e N- acetil-β-D-glicosaminidase.

Inicialmente, o sedimento destinado à dosagem de mieloperoxidase foi homogeneizado e ressuspendido em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio 80mM (pH 5,4) e centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Foram retirados então 200 µL do sobrenadante e adicionados 200 µL de tampão de fosfato de sódio 0,05 M

(pH 5,4) contendo 0,5% de hexa-1,6-bisdecyltrimethylammonium bromide (HTAB). A atividade da enzima MPO no sobrenadante foi mensurada através da variação da absorvância (densidade óptica; DO) a 450nm. Às amostras (100  $\mu$ L) foram adicionados 100  $\mu$ L de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina 1,6 mM (TMB; Sigma) preparado em dimetilsulfóxido (DMSO) concomitantemente com 100  $\mu$ L de tampão fosfato 80mM (pH 5,4) contendo peróxido de hidrogênio 0,3 mM (Sigma). A reação foi interrompida com a adição de 100  $\mu$ L de ácido sulfúrico 4M (Maia) e quantificada colorimetricamente à 450 nm em leitor de microplaca. Os resultados são expressos em densidade óptica (DO) por miligrama de tecido úmido.

### **3.5 Avaliação da atividade da N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG)**

A quantificação de células mononucleares nos implantes de esponjas pode ser feita avaliando-se a atividade da enzima N- acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase, presente em altos níveis em lisossomas de macrófagos ativados (BELO et al., 2004).

A outra parte do sedimento de esponja foi pesada e homogeneizada em uma solução de NaCl 0,9% (Synth) contendo 0,1% de Triton X-100 (Promega) e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Para a realização do ensaio, 100  $\mu$ L da amostra foram colocadas em duplicada a uma placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L do substrato p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (pH 4,5) em uma concentração final de 2,34 mM. Posteriormente, a placa foi incubada à 37° C durante 30 minutos. Finalmente, a reação foi interrompida adicionando-se 100  $\mu$ L de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6). A absorvância foi medida por leitor de

microplaca (Thermoplate) em comprimento de onda de 400nm. Os resultados foram expressos em nanomol (nmol) por miligrama de tecido úmido.

### **3.6 Quantificação de citocinas (VEGF, TNF- $\alpha$ , CCL-2, TGF- $\beta$ 1)**

Para a determinação destas citocinas nos implantes foram utilizados 100  $\mu$ L do sobrenadante restante da dosagem de hemoglobina.

Para a realização do ensaio, diluições do sobrenadante foram adicionadas em duplicada à placa de ELISA que continham um anticorpo monoclonal específico. Em seguida, foi adicionado um anticorpo de detecção. Após realizar a lavagem para remover os anticorpos que não se ligaram, uma solução de substrato foi adicionada a placa de ELISA (50  $\mu$ L de uma 1:1 solução de peróxido de hidrogênio e 10 mg/ml de OPD (Sigma)). A reação foi interrompida após 20 minutos de incubação com 50 $\mu$ L de ácido sulfúrico 2N (Maia) e a intensidade da cor foi quantificada a 540 nm em leitor de microplaca (Thermoplate). Os resultados são expressos como picograma (pg) de citocina por mg de peso úmido.

### **3.7 Quantificação de colágeno**

A quantidade de colágeno solúvel total foi determinada através da colorimetria (PHILLIPS et al 2004; CAMPOS et al. 2008; MENDES et al 2009) baseada na reação de *picrossirius red*. As amostras de esponja foram homogeneizadas com salina/Triton-X100 (pH 7,8). Em seguida, foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 25°C. Posteriormente, adicionou-se 50 $\mu$ L do reagente *picrossirius red* a 25

$\mu\text{L}$  da amostra. Após incubação de 30 minutos a temperatura ambiente, o complexo colágeno-*picrossirius red* foi novamente centrifugado, a 3000 rpm por 10 minutos a 25°C. Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento lavado com 500  $\mu\text{L}$  de etanol (99% puro e livre de metanol, Synth) e o complexo colágeno-corantes é reconstituído em 1mL de reagente alcalino NaOH 0,5M (Synth). Após solubilização, as amostras foram transferidas para placa de 96 poços e lidas a 540nm em leitor de microplacas. A quantificação de colágeno foi determinada através da comparação de uma curva padrão utilizando padrão de gelatina (Merck) e os resultados expressos em microgramas ( $\mu\text{g}$ ) de colágeno por miligramas (mg) de implante.

### **3.8 Avaliação histológica**

Os implantes foram fixados em formol tamponado a 10% por no mínimo 48 horas e processados para inclusão em parafina. As seções de 5  $\mu\text{m}$  obtidas foram coradas pelo método da hematoxilina-eosina (HE) para quantificação da área fibrovascular e número de vasos e processados para estudos microscópicos. Para a análise morfométrica, imagens das seções obtidas de 15 campos (8533  $\mu\text{m}^2$ ) foram capturadas para um objetiva panacromática (40X) em luz microscópica (ampliação final =400x). As imagens foram digitalizadas através de uma microcâmera JVC TK-1270/JCB e transferidas para um analisador (Kontron Electronics, Carl Zeiss – KS300 versão 2). A contagem de vasos foi definida como uma estrutura com lúmen. A área vascular ( $\mu\text{m}^2$ ) foi calculada por medição do diâmetro de cada vaso em 50 campos de cada linhagem dividido pelo número de vasos obtidos pela média  $\pm$ s.e.m.

### **3.9 Avaliação do fluxo sanguíneo cutâneo em camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/6J (Técnica de difusão da fluoresceína)**

Esse ensaio foi realizado na pele dorsal de camundongos nos quais não foram submetidos ao implante de esponja para estabelecer se o *background* genético pode determinar variação nesse fenótipo. Nós utilizamos o método fluorimétrico em que a taxa de difusão da fluoresceína sódica aplicada por via intradérmica, indica o fluxo sanguíneo local (ANDRADE et al., 1997). Uma solução estéril (10 µl) de fluoresceína sódica (Sigma, USA; 1%) foi injetada intradermicamente. Amostras de sangue da veia da cauda (15 µl) foram retiradas 1,3,5,7,10,15,20,25 e 30 minutos após a injeção do marcador. As amostras de sangue foram adicionadas em 3 ml de solução salina isotônica, centrifugadas por 5 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi mantido para a determinação da fluorescência em espectrofotômetro de fluorescência (Varian) em uma excitação/emissão de 485/520. Esses resultados são expressos em picos de fluorescência na circulação sistêmica (minutos- min).

### **3.10 Análise estatística**

Todos os dados estão expressos em média  $\pm$ SEM. Comparações foram feitas entre os três grupos para cada variável em cada momento avaliado, utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida por fator de correção Newman-Keuls para comparações múltiplas. Diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de *p* foram menores que 0,05.



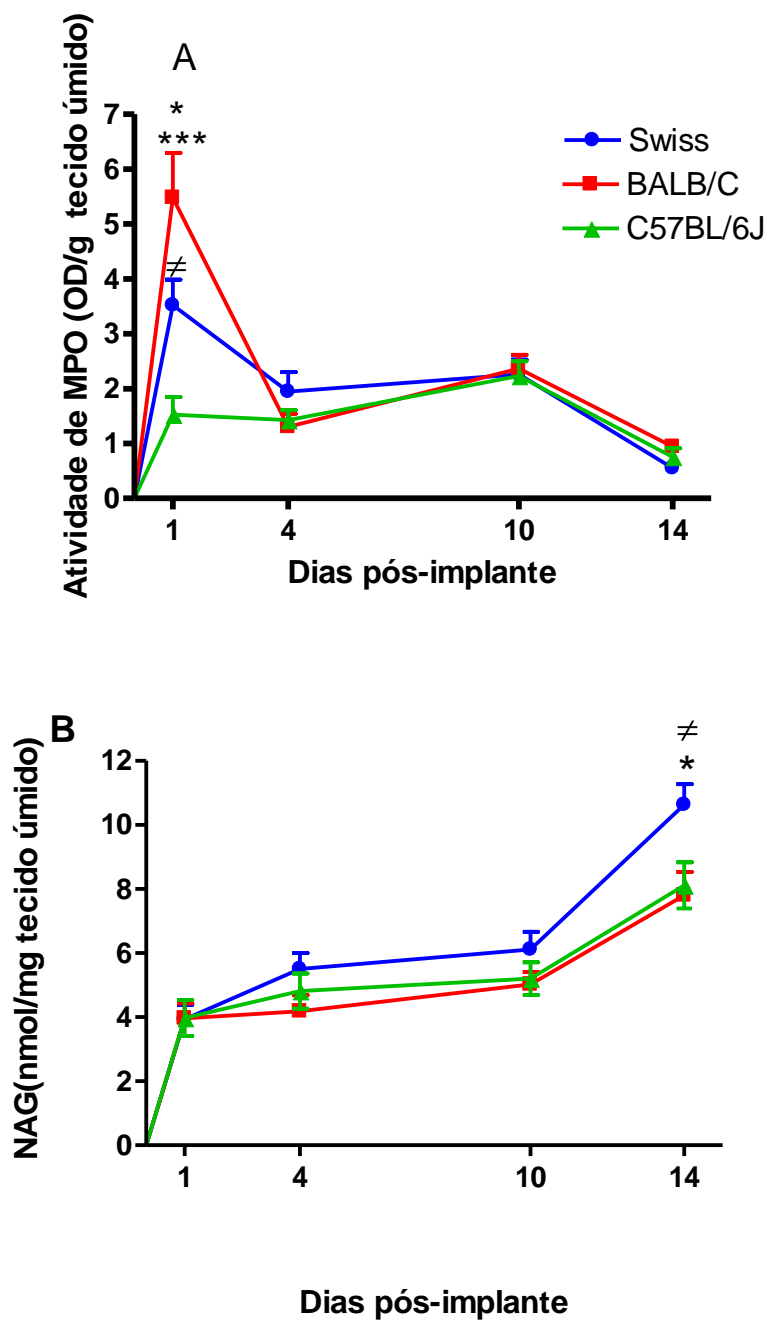
## **4. RESULTADOS**

#### **4.1 Cinética de inflamação induzida por esponja em camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/6J**

A matriz esponjosa foi bem tolerada por todas as três linhagens. Sinais de infecção ou rejeição não foram observados no local do implante durante o período de 14 dias de experimento *in vivo*. Os implantes foram facilmente dissecados do tecido adjacente (pele e músculo) em todos os intervalos de tempo.

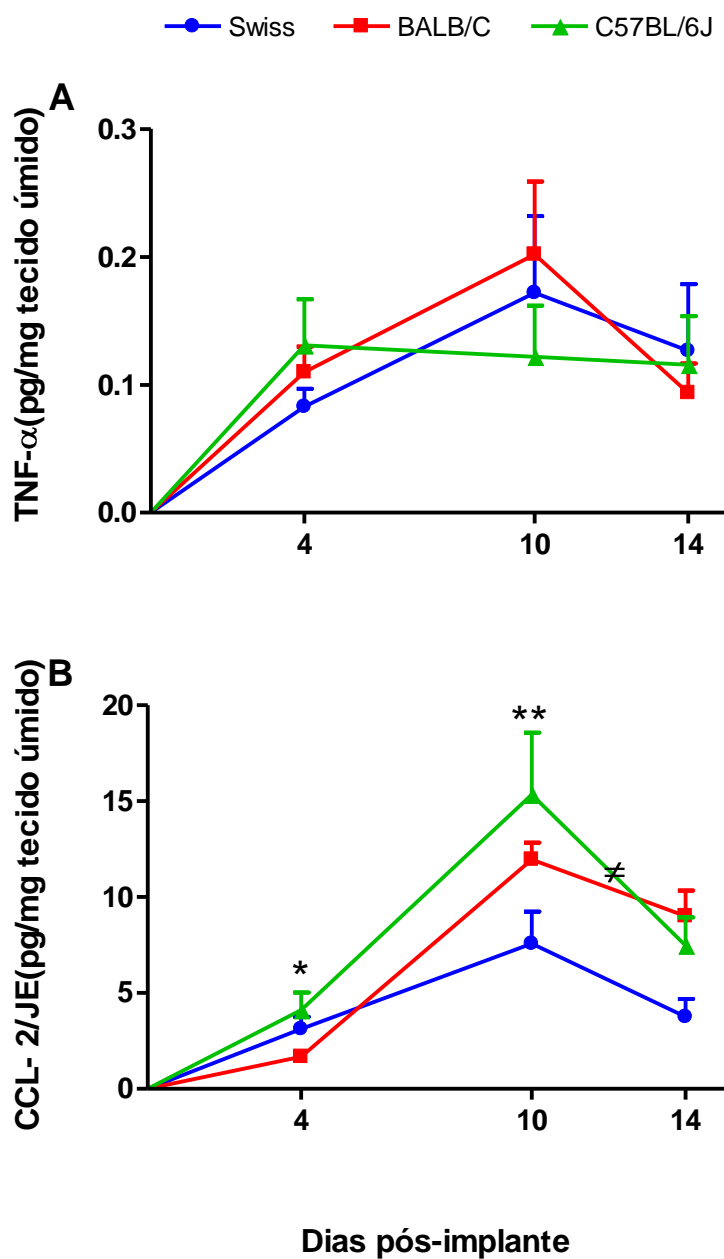
O acúmulo de leucócitos revelou diferenças no perfil da resposta inflamatória entre as linhagens (Figura 2A). A diferença na acumulação de neutrófilos (como atividade de MPO) nos implantes apareceu no primeiro dia pós-implantação e mostrou que a atividade desta enzima foi quase duas vezes maior em implantes em BALB/c ( $5,480 \pm 0,819$ ) comparada com os implantes em Swiss ( $3,520 \pm 0,469$ ) e 3 vezes maior que em implantes em camundongos C57BL/6J ( $1,527 \pm 0,321$ ) (Figura 1A). Após esse ponto, os níveis de atividade de MPO foram semelhantes entre os implantes nas três linhagens.

A atividade de NAG nos implantes foi similar nos três grupos durante os dias 1, 4 e 10, mas divergiu depois. No dia 14, os implantes em camundongos Swiss apresentaram uma maior resposta inflamatória ( $10,630 \pm 0,650$ ) comparada com os implantes em BALB/c ( $7,806 \pm 0,733$ ) e C57BL/6J ( $8,114 \pm 0,722$ ) (Figura 2B).



**Figura 2-** Cinética do influxo de células inflamatórias em implantes de esponjas de camundongos **(A)** Atividade de MPO e **(B)** atividade da NAG em datas pré-determinadas. Os valores representados são a média ( $\pm$ SEM) de grupos de 6-8 animais para cada ponto. \*Diferença significativa entre implantes de BALB/c e Swiss ( $p < 0.05$ ); \*\*\* diferença significativa entre implantes de BALB/c e C57BL/6J ( $p < 0.001$ );  $\neq$  diferença significativa entre as linhagens Swiss e C57BL/6J ( $p < 0.05$ ); ANOVA.

Os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , não mostraram diferenças entre os grupos nos tempos avaliados (Figura 3A). Por outro lado, a cinética da produção da citocina pró-inflamatória CCL-2, nos implantes nas três linhagens, foi similar e o pico foi atingido no dia 10 pós-implantação. No dia 4 pós-implantação, o nível desta citocina foi maior nos implantes na linhagem C57BL/6J ( $4,113 \pm 0,910$ ) em relação aos animais BALB/c ( $3,119 \pm 0,635$ ). No dia 10, os níveis de CCL-2 foram maiores nos implantes em animais C57BL/6J ( $15,340 \pm 3,240$ ) comparados aos do Swiss ( $7,570 \pm 1,670$ ) e, no dia 14, os implantes em animais da linhagem BALB/c ( $9,011 \pm 1,330$ ) apresentaram maiores níveis dessa citocina do que os implantes da linhagem Swiss ( $3,750 \pm 0,950$ ). Contudo, os níveis da citocina foram maiores nos implantes em camundongos C57BL/6J quando comparados com as outras duas outras linhagens (Figura 2B). Além disso, é importante destacar que o pico do CCL-2 foi anterior ao pico do NAG, o que é interessante, uma vez que essa citocina é quimiotática para macrófagos.

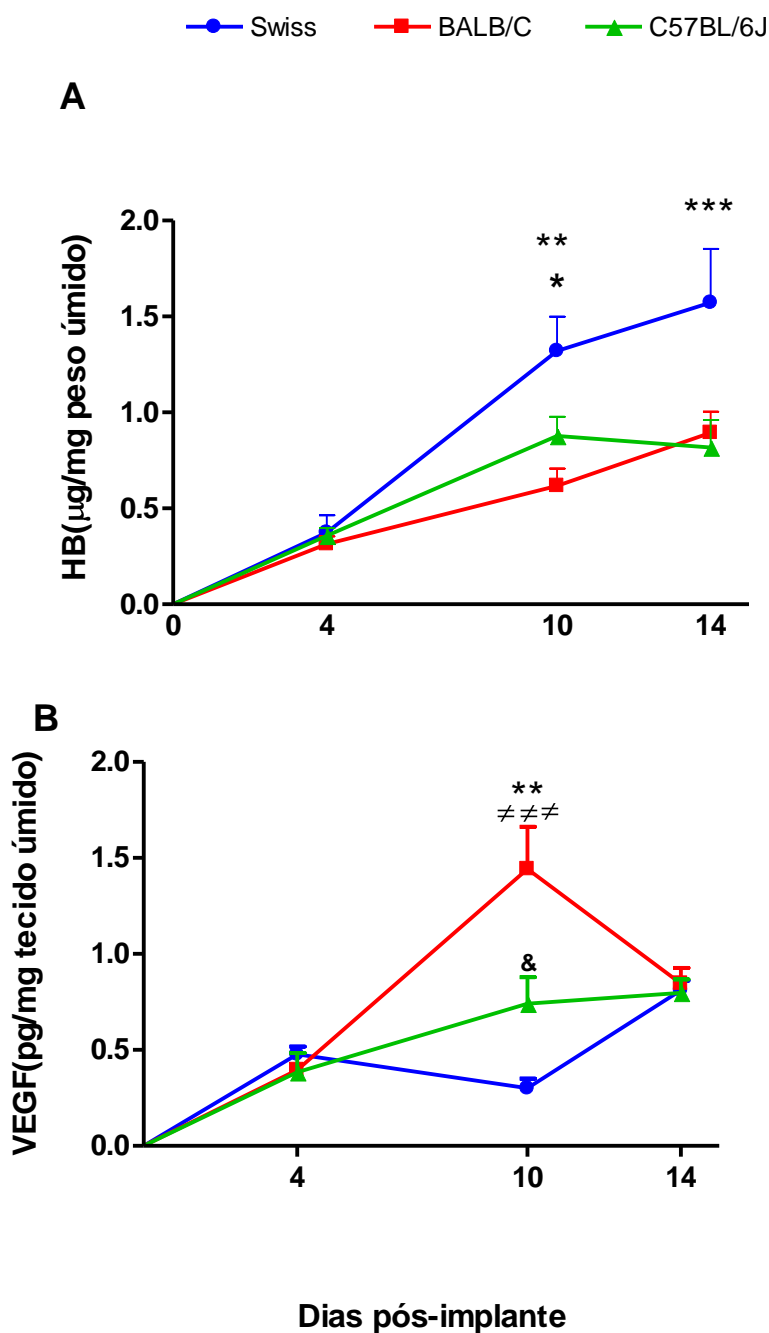


**Figura 3-** Cinética da produção da citocina (A) TNF- $\alpha$  e (B) CCL-2 nos implantes de esponja em camundongos. Os valores representados são as médias ( $\pm$ SEM) de grupos de 6-8 animais de cada ponto. \*Diferença significativa entre implantes de BALB/C e C57BL/6J ( $p < 0.05$ ); \*\* diferença significativa entre linhagens Swiss e C57BL/6J;  $\neq$  Diferenças significativas entre linhagens Swiss e BALB/C ( $p < 0.05$ ); ANOVA

## 4.2 Cinética da angiogênese induzida por implante em Swiss, BALB/c e C57BL/6J

Determinação dos níveis de hemoglobina (Hb) nos implantes fornece uma boa validação do índice de neovascularização (PASSANITI et al., 1992; HU et al., 1995; MENDES et al., 2009). Houve diferenças entre as linhagens nos dias 10 e 14 pós-implantação. Em ambos os intervalos de tempo, os implantes em camundongos da linhagem Swiss (dia 10:  $1,320 \pm 0,180$ , dia 14:  $1,573 \pm 0,280$ ) apresentaram maiores níveis de hemoglobina quando comparados aos implantes das duas outras linhagens (dia 10: BALB/c  $0,6180 \pm 0,090$  e C57BL/6J  $0,878 \pm 0,100$ ; dia 14: BALB/c  $0,895 \pm 0,110$  e C57BL/6J  $0,817 \pm 0,144$ ). Além disso, o conteúdo de hemoglobina dos implantes em camundongos Swiss aumentou progressivamente do dia 4 ao dia 14, atingindo um pico no décimo dia nos implantes das duas outras linhagens, mas não nos valores dos implantes em Swiss (Figura 4A).

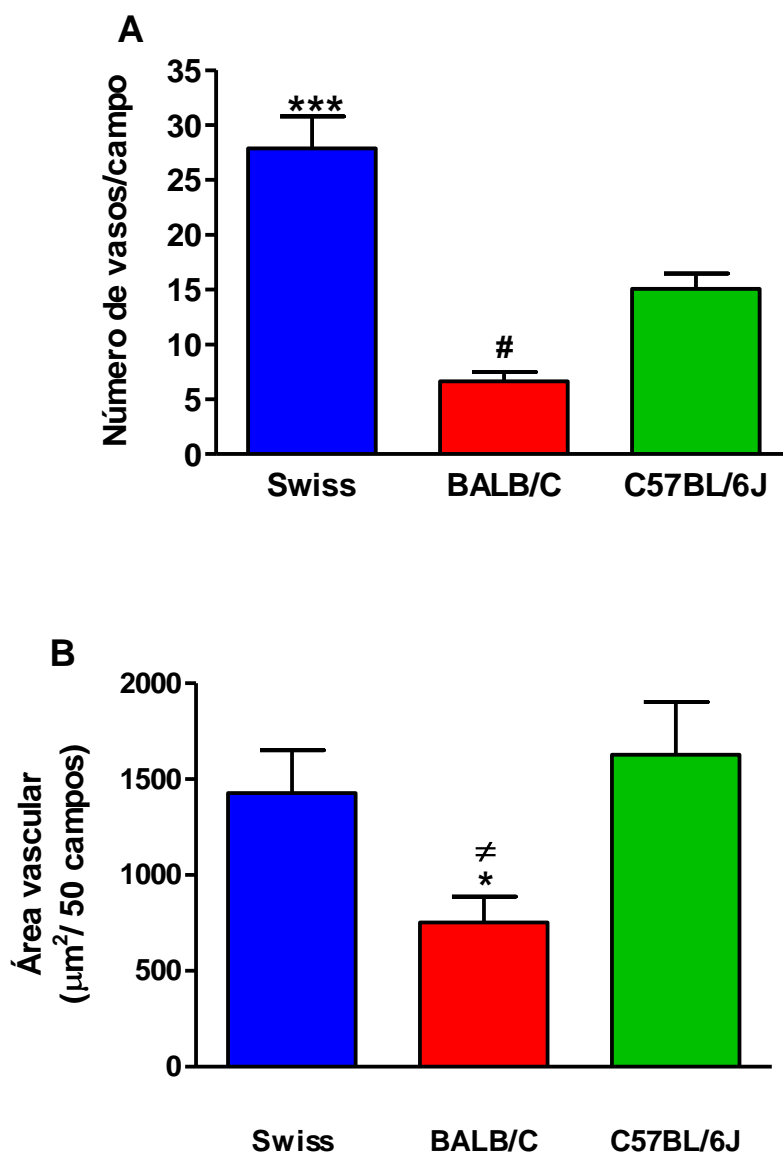
A mais importante citocina pró-angiogênica (VEGF) nos implantes de BALB/c apresentou pico no dia 10 ( $1,442 \pm 0,220$ ), enquanto os maiores níveis nos implantes nas outras duas linhagens foram atingidos apenas no dia 14 (Swiss  $0,810 \pm 0,050$  e C57BL/6J  $0,797 \pm 0,071$ ). No pico, que ocorreu no décimo dia pós-implantação, os níveis de VEGF dobraram nos implantes em BALB/c ( $1,442 \pm 0,220$ ) em comparação aos implantes em Swiss ( $0,300 \pm 0,051$ ) e C57BL/6J ( $0,740 \pm 0,140$ ) (Figura 4B).



**Figura 4** - Cinética do conteúdo de (A) hemoglobina e (B) produção de VEGF nos implantes de esponja em camundongos. Os valores representados são a média ( $\pm$ SEM) de grupos de 6-8 animais para cada ponto. Gráfico A- \*\* Diferença significativa entre implantes de Swiss e BALB/c ( $p < 0.01$ ); \* entre implantes de Swiss e C57BL/6J ( $p < 0.05$ ). \*\*\* Diferenças significativas entre implantes de Swiss e BALB/c ou C57BL/6J ( $p < 0.01$ ); ANOVA. Gráfico B-  $\neq \neq \neq$  Diferença significativa entre implantes de BALB/c e Swiss ( $p < 0.001$ ); \*\* Diferenças significativas entre BALB/c e C57BL/6J ( $p < 0.01$ ); & Diferença significativa entre Swiss e C57BL/6J ( $p < 0.05$ ). ANOVA

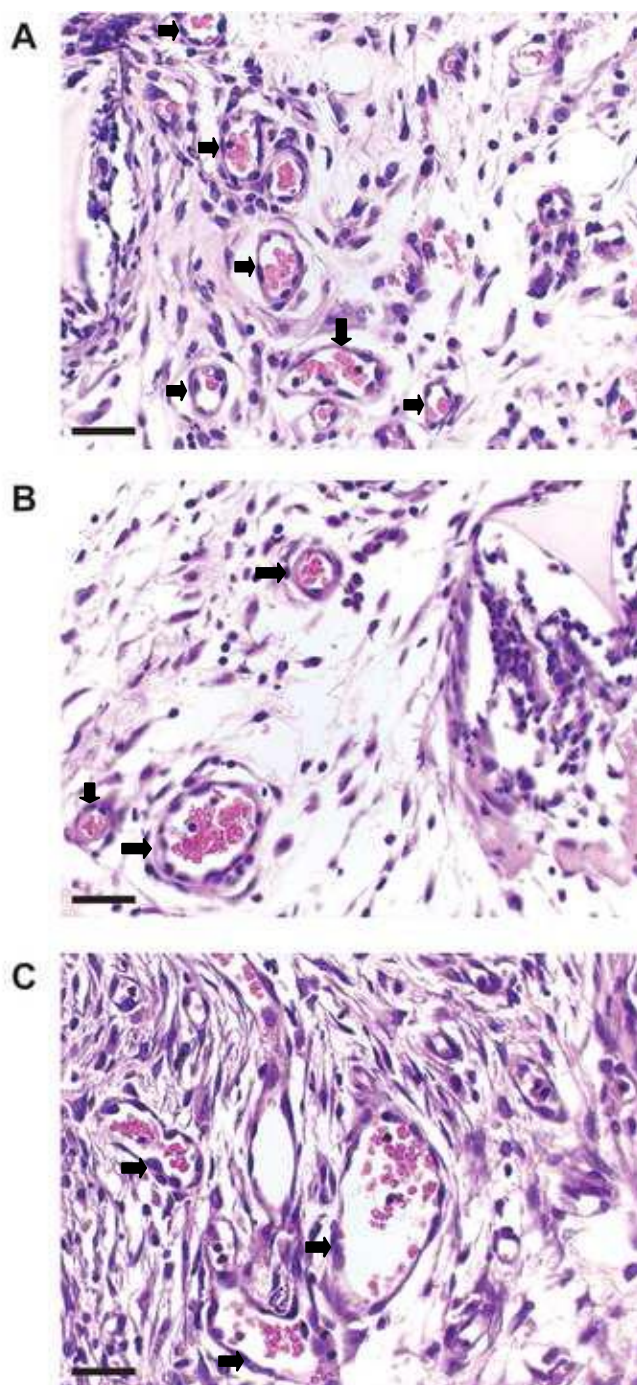
A análise morfométrica dos implantes foi realizada no dia 10 pós-implantação. Este foi o intervalo de tempo em que maiores diferenças foram observadas entre os implantes nas linhagens de camundongos com relação à neovascularização. Os resultados obtidos mostram que o número de vasos do implante em Swiss foi  $28 \pm 3$ /campo,  $7 \pm 1$ /campo em BALB/c e  $15 \pm 1$ /campo em C57BL/6J (Figura 5A). A mensuração da área vascular dos implantes do mesmo intervalo de tempo (10 dias pós-implantação) confirmou que os implantes em Swiss foram mais vascularizados que nos implantes de esponja nas outras duas linhagens (Figura 5B).





**Figura 5-** Parâmetros vasculares nos implantes de camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/6J no décimo dia pós-implantação. Em **A**, o número de vasos por campo e em **B**, a área vascular dos implantes. Os valores representam as médias ( $\pm$ SEM) de grupos de 4-5 animais.

Cortes histológicos representativos do tecido fibrovascular em implantes subcutâneos de esponja nas três linhagens de camundongos mostraram um estroma ocupando os poros da matriz sintética. Vasos sanguíneos, células inflamatórias, fibroblastos fusiformes são vistos em todos os cortes, mas há mais vasos sanguíneos nos implantes em Swiss comparado com as outras duas linhagens (Figura 6A,B,C).

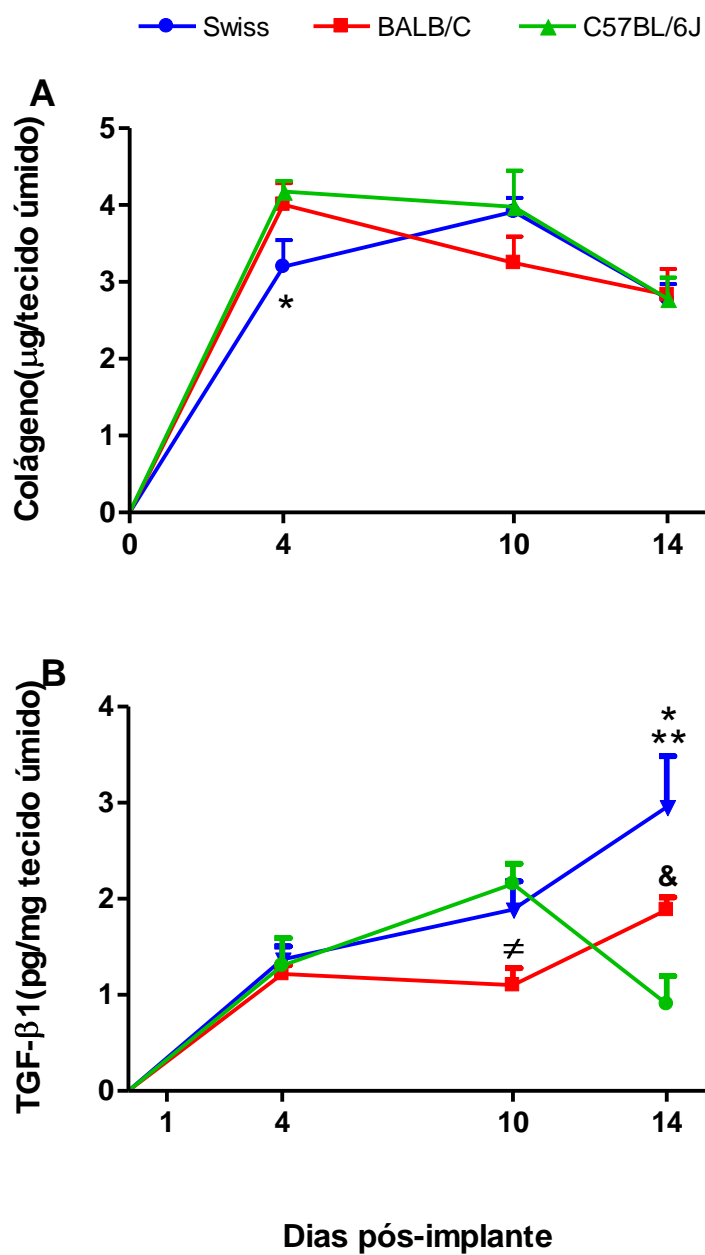


**Figura 6-** Cortes histológicos representativos (5  $\mu$ m, coradas com H&E) de tecido fibrovascular induzido em implantes subcutâneos em camundongos (A) Swiss, (B) BALB/c e (C) C57BL/6J no dia 10 pós-implantação. O estroma fibrovascular que ocupa os poros na matriz esponjosa (formas triangulares) é composto por vasos sanguíneos, células inflamatórias, fibroblastos fusiformes. As setas pretas indicam a localização de alguns vasos sanguíneos. Barra: 100  $\mu$ m

### 4.3 Deposição de colágeno e níveis de TGF- $\beta$ 1

O conteúdo de colágeno foi maior em implantes de BALB/c comparado com implantes em camundongos Swiss (Figura 7A). Tanto nos implantes em animais C57BL/6J ( $4,179 \pm 0,136$ ) quanto nos implantes em BALB/c ( $4,007 \pm 0,277$ ) o pico de colágeno foi atingido no dia 4 pós-implantação, enquanto para animais da linhagem Swiss essa deposição foi atingida no dia 10 ( $3,913 \pm 0,182$ ) e diminuiu em todas as linhagens no dia 14 (Swiss  $2,783 \pm 0,188$ ; BALB/c  $2,830 \pm 0,337$  e C57BL/6J  $2,780 \pm 0,274$ ).

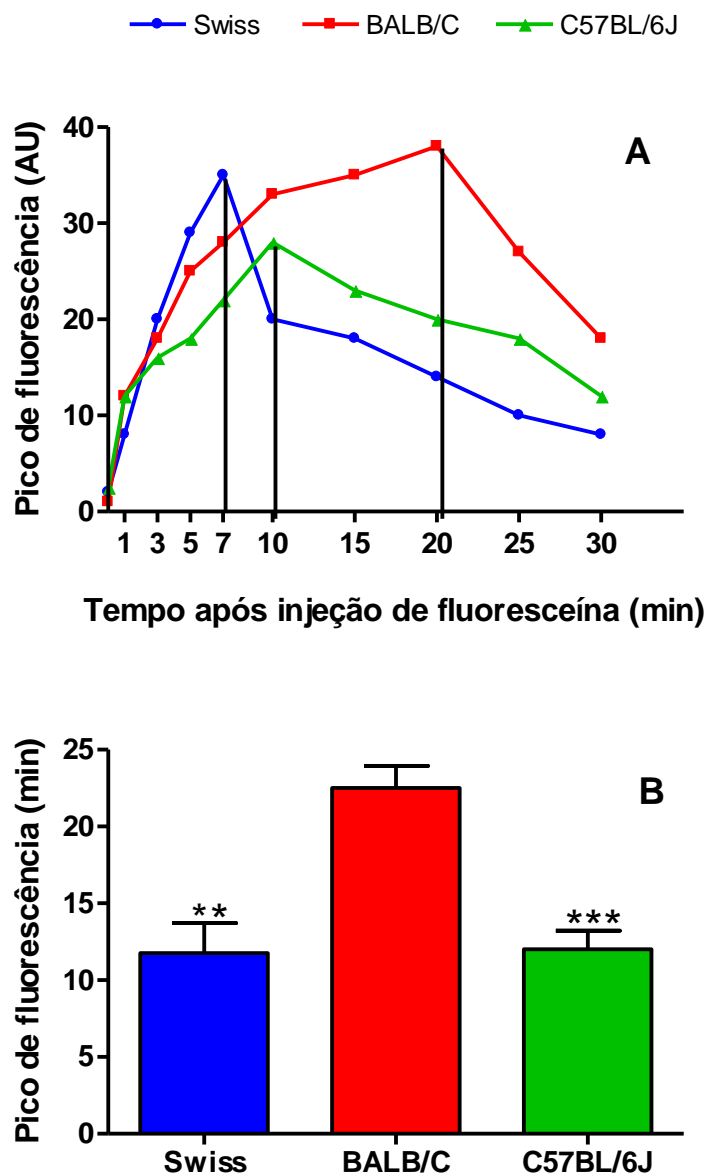
Além disso, os níveis da citocina pró-fibrogênica, TGF- $\beta$ 1, foi similar nos implantes nas três linhagens no dia 4, mas divergiu nos dias 10 e 14. No décimo dia pós-implantação, os níveis de TGF- $\beta$ 1 foram significativamente maiores em animais das linhagens Swiss ( $1,890 \pm 0,290$ ) e C57BL/6J ( $2,154 \pm 0,211$ ) comparados aos implantes em BALB/c ( $1,100 \pm 0,180$ ). Por outro lado, no décimo quarto dia, os implantes em camundongos Swiss apresentaram níveis mais altos dessa citocina ( $2,956 \pm 0,530$ ) comparada aos níveis dos implantes nas outras duas linhagens (BALB/c  $1,886 \pm 0,130$  e C57BL/6J  $0,906 \pm 0,290$ ). Os implantes em camundongos da linhagem BALB/c também apresentaram maiores níveis de TGF- $\beta$ 1 quando comparados à linhagem C57BL/6J. O pico desta citocina nos implantes em C57BL/6J ocorreu no dia 10 ( $2,154 \pm 0,211$ ), enquanto nas outras duas linhagens foi atingido no dia 14 (Swiss  $2,956 \pm 0,530$  e BALB/c  $1,886 \pm 0,130$ ). Os níveis de TGF- $\beta$ 1 foram maiores em implantes de Swiss (Figura 7B).



**Figura 7-** Cinética de deposição de (A) colágeno e (B) níveis de TGF-β1 em implantes de esponja em camundongos. Os valores representados são médias ( $\pm$  SEM) de grupos de 6-8 animais para cada ponto.  $\neq$  Diferenças significativas entre implantes de BALB/c e Swiss ou C57BL/6J; \* diferença significativa entre implantes de Swiss e BALB/c e \*\* de implantes de Swiss e C57BL/6J (\*\* $p < 0.01$ ; 1 símbolo  $p < 0.05$ ), & diferenças entre BALB/c e C57BL/6J, ANOVA.

#### **4.4 Fluxo sanguíneo cutâneo em camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/6J**

Tendo estabelecido as variáveis quantitativas e temporais no tecido fibroproliferativo recém-formado nas três linhagens de camundongos, nós investigamos se essas diferenças poderiam ser detectadas em um tecido normal pré-existente. A cinética da curva de difusão da fluoresceína apresenta padrão similar, uma fase ascendente seguida de uma descendente, nas três linhagens. A Figura 8A mostra um traçado representativo da cinética de difusão da fluoresceína obtida de um animal de cada linhagem. O pico de fluoresceína foi atingido em 20 minutos em camundongos BALB/c, mas muito antes em camundongos Swiss e C57BL/6J. A Figura 8B apresenta dados de diferenças significativas entre picos de fluorescência de BALB/c e as outras duas linhagens.



**Figura 8-** Difusão de fluoresceína após injeção intradérmica do marcador em linhagens de camundongos Swiss, BALB/C e C57BL/6J. Em **A**, cinética de difusão da fluoresceína (AU; unidade arbitrária) na circulação sistêmica após injeção intradérmica em camundongos. Em **B**, dados mostram uma diferença significativa entre o pico de fluorescência de BALB/c e as outras duas linhagens. Valores mostrados são as médias ( $\pm$ SEM) de grupos de 4-6 animais. \*\*Diferença significativa de linhagem Swiss e BALB/c e \*\*\*entre BALB/c e C57BL/6J; ANOVA;  $p < 0.05$ .

## **5. DISCUSSÃO**



Nós estudamos o desenvolvimento seqüencial da angiogênese inflamatória no tecido fibrovascular induzido por esponja de poliéster-poliuretano em três linhagens de camundongos (Swiss, BALB/c e C57BL/6J). Estas três linhagens são frequentemente utilizadas em investigação *in vivo* sobre parâmetros fisiológicos, respostas farmacológicas, pesquisas do sistema imune, estudos toxicológicos e patológicos. Nosso estudo é relevante, em primeiro lugar, porque se torna cada vez mais conhecido que o *background* genético pode resultar em um fenótipo diferente quando uma mesma manipulação genética é realizada (SIGMUND 2000; MURATA et al., 2002) e, em segundo lugar, porque diferentes linhagens podem exibir diferentes níveis de expressão gênica apesar do fato de que todas as linhagens de camundongos contém a mesma coleção de genes (SIGMUND, 2000; SCHADT et al., 2003). Nesse contexto, múltiplas vias de sinalização podem estar alteradas, produzindo assim diferentes fenótipos (LIU et al., 2010). De fato, a mesma alteração genética resulta em profundas diferenças fenotípicas quando presentes em diferentes linhagens, com diferentes *backgrounds*, influenciando vários parâmetros fisiológicos e patológicos estudados, incluindo tolerância ao álcool (LINSENBARDT et al., 2009), sepse (ZHANG et al., 2010), secreção de insulina (ANDRIKOPOULOS et al., 2005) e cicatrização (LI et al., 2001; LI et al., 2004; MASINDE et al., 2006; MANIGRASSO & O'CONNOR, 2008; PAL-GOSH et al., 2008; VAN BORNE et al., 2009).

Há evidências consideráveis sugerindo que inflamação e angiogênese co-existem e são processos chaves em condições fisiológicas e patológicas (JACKSON et al., 1997; PRESTA et al., 2009) mas estudos comparativos desses processos não avaliaram as diferenças entre as linhagens de animais em experimentação.

É bem documentado que o implante de esponja induz crescimento espacial e temporal de tecido fibrovascular localizado, permitindo a quantificação de vários componentes do processo inflamatório e angiogênico (FERREIRA et al., 2004; MENDES et al., 2009). Nós usamos este modelo experimental para avaliar o recrutamento de células inflamatórias, neovascularização e resposta fibrogênica em linhagens de camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/6J. Nossos resultados revelam importantes variações entre as três linhagens de camundongos em relação a essas respostas.

O componente inflamatório do tecido fibrovascular foi avaliado quanto à atividade de enzimas e citocinas inflamatórias. Estes parâmetros são amplamente aceitos como marcadores deste processo (RAMOS et al., 2007; ASSI et al., 2011; ECKERMANN et al., 2011; GALLET et al., 2011; SOUZA et al., 2011; KOBBE et al., 2012). A atividade da mieloperoxidase, uma enzima presente em grânulos azurofílicos de neutrófilos, tem sido, portanto utilizada para indicar o recrutamento de neutrófilos em vários tecidos e modelos experimentais, incluindo o modelo de implante de esponjas (CAMPOS et al., 2008; XAVIER et al., 2010; ARAUJO et al., 2011; MOURA, et al., 2011). Os neutrófilos representam a linha primária de defesa do organismo (DIEGELMANN & EVANS, 2004; NUNES et al., 2011), sendo atraídos para o local da lesão por numerosas citocinas inflamatórias produzidas por plaquetas ativadas, células endoteliais e por produtos de degradação de patógenos. Esse tipo celular pode ser ativado por agentes que incluem produtos bacterianos e citocinas ou quimiocinas, como por exemplo, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IFN- $\gamma$ . No local da infecção, os “corpos estranhos” são reconhecidos por receptores de membranas dos neutrófilos e então fagocitados. Além disso, esse tipo celular é capaz de sintetizar

mediadores pró-inflamatórios e apresentar antígenos às células T. Os neutrófilos entram em apoptose rapidamente, liberando citocinas que são importantes para o recrutamento de macrófagos (RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010; WRIGHT et al., 2010). Nossos resultados mostram níveis de MPO aproximadamente 2 e 3 vezes maiores nos implantes em BALB/c comparados à implantes em Swiss e C57BL/6J, respectivamente. Esses achados sugerem uma resposta mais acentuada nos implantes em camundongos da linhagem BALB/c no que diz respeito ao recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação.

A atividade da enzima N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), presente em macrófagos ativados está relacionada à fase inflamatória tardia (APPLETON et al., 1993; BARCELOS et al., 2004). Os macrófagos são células mielóides maduras, derivadas principalmente da diferenciação de monócitos circulantes. Essas células possuem inúmeras propriedades fisiológicas e patológicas, dependendo da estimulação de certas citocinas. Os macrófagos infiltram na ferida maciçamente e acentuam a atividade fagocitária (RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010; WRIGHT et al., 2010). Essas células também são importantes para o fechamento da ferida, bem como para a fibrose e formação de cicatriz. De maneira oposta aos achados relacionados ao MPO, os resultados indicam que camundongos da linhagem Swiss apresentaram maior habilidade para recrutar/ativar macrófagos quando comparados às outras duas linhagens, uma vez que os implantes apresentaram maiores níveis de NAG. Também foi observado, como esperado, que a atividade enzimática foi mais intensa em uma fase mais tardia (14 dias).

Além disso, também foram avaliados os níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e CCL-2. A citocina TNF- $\alpha$  é a citocina pró-inflamatória mais importante por promover o reparo

tecidual através da indução de componentes da membrana basal e de proteases para a degradação de colágeno, participando ativamente da reconstrução da matriz extracelular. Alguns autores acreditam que o TNF- $\alpha$  pode induzir também a angiogênese, através do aumento dos níveis de mRNA de IL-8, do fator de crescimento do endotélio vascular e do fator de crescimento fibroblástico em células endoteliais (YOSHIDA et al., 1997; BANNO et al., 2004; CHAKRAVARTY et al., 2011). Os níveis intrainplante da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  não mostraram diferenças significativas relacionadas às linhagens. As quimiocinas são proteínas pequenas que funcionam como quimioatrativos para facilitar a migração de células do sistema imunológico durante a vigilância imunológica e períodos de inflamação. A quimiocina ligante 2 (CCL-2/JE), anteriormente conhecida como proteína quimioatrativa 1 (MCP-1), recruta monócitos, linfócitos-T e basófilos para os locais de inflamação (PAGE et al., 2011). No entanto, os níveis de CCL-2 variaram de forma relevante nos implantes nas diferentes linhagens nos dias 4 e 10 pós-implantação. Implantes em camundongos Swiss apresentaram menores níveis dessa citocina enquanto implantes em BALB/c e C57BL/6J apresentaram níveis semelhantes da mesma. A discrepância entre os níveis de CCL-2 e a atividade de NAG em implantes em Swiss contradiz a noção da concentração-resposta geralmente observada (ROLLINS, 1997; RAMAN et al., 2011). Como a CCL-2 é uma quimiocina atrativa de macrófagos, esperava-se que doses mais altas desta resultassem em maiores níveis de NAG. Diante disso, é tentador especular que nas linhagens heterogênicas, o recrutamento/ativação de macrófagos pode contar com um sinal adicional ou suas células são mais sensíveis à citocina quimiotática. De maneira oposta, os macrófagos das duas linhagens isogênicas podem ser menos

sensíveis ou deficientes na resposta à CCL-2. Apesar da diferença na quantidade da citocina produzida pelos implantes nas duas linhagens isogênicas, C57BL/6J e BALB/c, não houve diferença na atividade de NAG entre elas. Há uma série de trabalhos avaliando a relevância funcional dos principais mediadores inflamatórios em animais geneticamente modificados (GROSE & WERNER, 2004), mas nós não encontramos estudos avaliando a influência do *background* genético em parâmetros inflamatórios investigados em nosso estudo.

A resposta angiogênica aos implantes de esponja também foi deduzida a partir de vários marcadores. Foi avaliada a quantidade de hemoglobina contida no implante, um marcador indireto da vascularização. Para os implantes em camundongos da linhagem Swiss, o conteúdo de hemoglobina (Hb) indicou um aumento constante na formação de novos sanguíneos até o dia 14. Esse perfil de manutenção da angiogênese também foi encontrado nos implantes nas linhagens BALB/c e C57BL/6J. Contudo, as linhagens isogênicas apresentaram quantidades de hemoglobina muito mais baixas comparadas à linhagem heterogênic. A quantidade de Hb nos implantes nas linhagens isogênicas também variou entre elas no dia 10. O VEGF é o fator angiogênico mais amplamente estudado, que aumenta a permeabilidade vascular e age também diretamente sobre proteínas angiogênicas, estimulando a mitogênese, migração e diferenciação (MOSCH et al., 2010; DI DOMENICO et al., 2011; MARTINS et al., 2011). Além disso, é uma proteína quimiotática de várias células inflamatórias, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células T e células supressoras derivadas da mielóide (DI DOMENICO et al., 2011). Interessantemente, a cinética da produção de VEGF variou entre as linhagens e foi contraditória aos achados de hemoglobina. O menor

nível de VEGF foi encontrado nos implantes em camundongos da linhagem Swiss, que por sua vez, apresentaram maior conteúdo de hemoglobina. De maneira oposta, o maior nível de VEGF foi encontrado nos implantes em BALB/c que apresentaram menor quantidade de hemoglobina. Nesse contexto, tem sido constantemente relatado o VEGF como mediador e promotor chave da angiogênese de forma direta e indireta, *in vitro* e *in vivo*, modulando várias fases e componentes da formação e remodelamento de vasos sanguíneos (KOWANETZ et al., 2006). Nossos resultados estão em contraste com os de WARD et al. (2007) que mostraram que altos níveis de expressão de VEGF coincidem com uma resposta angiogênica pronunciada induzida por hipóxia em camundongos CD1. É possível que em nossos experimentos os altos níveis de VEGF em implantes menos vascularizados (linhagens isogênicas) podem ser um mecanismo compensatório para estimular a formação de vasos sanguíneos no ambiente de hipóxia e inflamação dos implantes. De fato, hipóxia, estresse oxidativo e citocinas são fatores bem conhecidos que podem regular a expressão/produção de VEGF (MESSMER-BLUST et al., 2009).

Interessantemente, as diferenças relacionadas às linhagens na angiogênese em condições de hipóxia relatadas em camundongos BALB/c e C57BL/6J indicam que a heterogeneidade genética desempenha um papel na sinalização da angiogênese. Além disso, a expressão de fatores de crescimento dependente da linhagem pode determinar a divergência da resposta angiogênica (CHAN et al., 2005; WARD et al., 2007).

A histologia confirma os resultados obtidos para a hemoglobina, mostrando que os implantes em animais da linhagem Swiss apresentaram maior número de vasos por campo quando comparados aos implantes em camundongos BALB/c e

C57BL/6J. Esses resultados reafirmam o perfil mais angiogênico da linhagem do tipo Swiss. Além disso, ao se avaliar a área vascular nas três linhagens, os implantes nos animais da linhagem BALB/c mostraram uma menor área, o que também corrobora com os resultados da hemoglobina, indicando que diante de um mesmo estímulo, os animais da linhagem BALB/c apresentam menor angiogênese do que as outras duas linhagens.

Para a avaliação da fibrogênese, foram avaliados outros parâmetros, tais como o colágeno e a citocina TGF- $\beta$ 1. O remodelamento do tecido do estroma fibrovascular é regulado por complexas interações de proteínas pró- e anti-fibrogênicas dentro do tecido inflamatório. O TGF- $\beta$ 1 é uma citocina pró-fibrótica chave que induz a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos que, por sua vez, sintetizam colágeno (LEASK & ABRAHAM, 2004; BONNIAUD et al., 2005). Relatamos aqui diferenças na resposta fibrogênica em camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/6J. A deposição de colágeno foi mais rápida nos implantes de esponja em animais isogênicos quando comparados com implantes de animais da linhagem Swiss no dia 4. Por outro lado, os níveis da citocina pró-fibrogênica TGF- $\beta$ 1 aumentaram progressivamente do dia 10 ao 14 em implantes em Swiss e BALB/c mais diminuíram nos implantes em camundongos C57BL/6J no dia 14. Esse conjunto de dados revela uma fase de remodelamento mais rápida desses animais comparados com as outras linhagens. Nossos resultados são discordantes dos achados por KOLB et al. (2002) que mostram um grau significativamente menor de fibrose pulmonar em linhagem BALB/c comparada à linhagem C57BL/6J. Embora tais fatores como o tipo de estímulo usado e o tecido estudado possam explicar essa discrepância, a susceptibilidade genética provavelmente determina a resposta

fibrogênica. De fato, KOLB et al. (2002) relataram que camundongos BALB/c desenvolvem significativamente menor fibrose em resposta ao TGF- $\beta$ 1 comparada com camundongos C57BL/6J e essa diferença tem sido atribuída à susceptibilidade linhagem-dependente à fibrose.

Após a determinação de variações quantitativas e qualitativas nos componentes chaves do tecido fibroproliferativo recém-formado nas três linhagens, nós investigamos se diferenças poderiam ser detectadas em um tecido normal pré-existente. De fato, a avaliação do fluxo sanguíneo cutâneo usando o método de difusão da fluoresceína (ANDRADE et al., 1997) revela que a difusão do marcador em camundongos BALB/c foi menor que nas outras linhagens de camundongos, indicando uma diferença funcional na vasculatura da pele desses animais. Tem sido mostrado que camundongos BALB/c formam 50% menos vasos colaterais em relação a camundongos C57BL/6J e que esses vasos são perdidos 3 semanas após a sua formação (CHALOTHORN et al., 2007). É possível que esse traço vascular possa ocorrer na pele de camundongos BALB/c. Assim, uma consequência funcional dessa determinação genética pode ser um comprometimento do fluxo sanguíneo observado nos nossos experimentos.

Diante desses resultados, podemos sugerir que o *background* genético influencia uma série de eventos biológicos, interferindo em componentes inflamatórios, angiogênicos e fibrogênicos.

Assim, o modelo de implante de esponja induziu a formação de tecido fibrovascular que diferiu de maneira importante entre as linhagens. Nossos experimentos também quantificaram essas diferenças em termos de inflamação, angiogênese, produção de citocinas e tecido de remodelamento. Nossos estudos



sugerem que o *background* genético influencia quantitativa, temporal e qualitativamente o processo de crescimento do tecido fibrovascular. Esta informação pode ser relevante para direcionar a manipulação genética de genes-alvos envolvidos no processo fibrovascular, bem como para direcionar a escolha da linhagem de camundongo para experimentos funcionais específicos.

## **6. CONCLUSÕES**

- O modelo de implante de esponja se mostrou eficaz para avaliação de parâmetros inflamatórios, angiogênicos e fibrogênicos nas diferentes linhagens de camundongos, uma vez que induziu a formação de um tecido fibrovascular proliferativo e permitiu a determinação da cinética do recrutamento/ativação de células inflamatórias, neovascularização, deposição de matriz extracelular e produção de citocinas.

- O *background* genético influenciou quantitativa, temporal e qualitativamente o processo de crescimento do tecido fibrovascular, de acordo com os parâmetros e metodologia utilizada.

- Os implantes nas três diferentes linhagens apresentaram diferenças em termos de intensidade da inflamação, angiogênese, produção de citocinas e das características do tecido de remodelamento.

- A escolha da linhagem de animal a ser utilizada em estudos deve ser feita considerando-se que o *background* genético influencia as respostas encontradas diante mesmo estímulo.

# **7. Sumário e contribuições científicas**

## Sumário

Linhagem	Inflamação aguda	Angiogênese	Fibrogênese
<b>Swiss</b>	Intermediária	<b>Mais intenso</b>	Mais lenta
<b>BALB/c</b>	<b>Mais intenso</b>	Menos intenso	Intermediária
<b>C57BL/6J</b>	Menos intenso	Intermediário	<b>Mais rápida</b>

## Contribuições científicas

**Swiss** → Podem ser utilizados em testes de drogas anti-angiogênicas.

**BALB/c** → Podem ser usados como modelo para estudos de inflamação aguda.

**C57BL/6J** → Podem ser usados como modelo para estudos de cicatrização.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBOTT, S. L.; KOKKA, R. P.; JANDA, J. M.(1991). Laboratory investigations on the low pathogenic potential of *Plesiomonas shigelloides*. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(1):148–153.

ALBINI, A.; TOSETTI, F.; BENELLI, R.; NOONAN, D.M. (2005). Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Research*, 65(23):10637-10641.

ANDRADE, S.P.; FAN, T-P.D.; LEWIS, G.P. (1987). Quantitative in vivo studies on angiogenesis in rats sponge model. *British Journal of Experimental Pathology*, 68(6):755-766.

ANDRADE, S.P.; MACHADO, R.D.P.; TEIXEIRA, A.S.; BELO, A.V.; TARSO, A.M.; BERALDO, W.T (1997). Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvascular Research*, 54(3):253-261.

ANDRADE, S.P.; FERREIRA, M.A.N.D. The sponge model of angiogenesis. *Angiogenesis protocols*. Nittingham, 2009, Cap. 18, 295-304.

ANDRIKOPOULOS, S.; MASSA, C.M.; ASTON-MOURNEY,K.; FUNKAT, A.; FANT, B.C.; HULL, R.L.; KAHN, S.E.; PROIETTO, J.(2005). Differential effects of inbred mouse strain (C57BL/6J, DBA/2, 129T2) on insulin secretory function in response to a high fat diet. *Journal of Endocrinology*, 187(1): 45-53.

APPELTON, I.; TOMLINSON, A.; COLVILLE-NASH, P.R.; WILLOUGHBY, D.A. (1993). Temporal and spatial immunolocalization of cytokines in murine chronic granulomatous tissue. *Laboratory Investigations*, 69(4): 405-414.

ARAUJO, F.A.; ROCHA, A.A.; FERREIRA, M.A.N.D.; CAMPOS, P.P.; LEMOS, V.S.; ANDRADE, S.P. (2011). Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 38(4): 262-268.

ARROYO, A.G.; IRUELA-ARISPEM, A. (2010). Extracellular matrix, inflammation and the angiogenic response. *Cardiovascular Research*, 86 (2): 226-235.

ASSI, K.; PATTERSON, S.; DEDHARS S.; OWEN, D.; LEVINGS, M.; SALH, B. (2011). Role of epithelial integrin-linked kinase in promoting intestinal inflammation: effects on CCL-2, fibronectin and the T cell repertoire. *BMC Immunology*, 2011(12): 1-14.

BALKWILL, F.; CHARLES, K.A., MANTOVANI, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7(3): 211–217.

BANNO, T.; GAZEL, A.; BLUMENBERG, M. (2004). Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(31): 32633-32642.



BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; CASSALI, G.D.; ANDRADE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. (2004). Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL-2 in model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflammation Research*, 53(10): 576-584.

BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; VIEIRA, L.Q.; CASSALI, G.D.; ANDRADE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. (2005). Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(2): 352-358.

BELO, A.V.; BARCELOS, L.S.; FERREIRA, M.A.N.D.; TEIXEIRA, M.M.; ANDRADE, S.P. (2004). Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. *Life Sciences*, 74(23): 2827-2837.

BELO, A.V.; LELES, F.; BARCELOS, L.S.; FERREIRA M.A.N.D.; BAKHLE, Y.S.; TEIXEIRA, M.M.; ANDRADE, S.P. (2005). Murine chemokine CXCL2/KC is a surrogate marker for angiogenic activity in the inflammatory granulation tissue. *Microcirculation*, 12(7):597-606.

BENEST, A.V.; BATES, D.O. (2009). Measurement of angiogenic phenotype by use of two-dimensional mesenteric angiogenesis assay. *Methods in Molecular Biology*, 467: 251-270.

BERTOK, S.; WILSON, M.R.; DORR, A.D.; DOKPESI, J.O.; O'DEA, K.P.; MARCZIN, N.; TAKATA, M. (2011). Characterization of TNF receptor subtype expression and signaling on pulmonary endothelial cells in mice. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(5): 781-789.

BISHOP, J. Mouse husbandry and genetics. *Transgenic mammals*. London, 1999, Cap. 4. , 47-65.

BONNET, C.S.; WALSH, D.A. (2005). Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology*, 44(1): 7-16.

BONNIAUD, P.; MARGETTS, P.J.; ASK, K.; FLANDERS, K.; GAULDIE, J.; KOLB, M. (2005). TGF- $\beta$  and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *Journal of Immunology*, 175 (8): 5390-5395.

BORNE, S.W.M.V.; SCHANS, V.A.M.V.; STRZELECKA, A.E.; VERVOORT-PETERS, H.T.M.; LIJNEN, P.M.; CLEUTJENS, J.P.M.; SMITS, J.F.M.; DAEMEN, M.J.A.P.; JANSSEN, B.J.A.; BLANKESTEIJN, W.M. (2009). Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 84(2): 273-282.

BRADSHAW, A.D.; REED, M.J.; CARBON, J.G.; PINNEY, E.; BREKKEN, R.A.; SAGE, H. (2001). Increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol sponges in SPARC-null mice. *Wound Repair and Regeneration*, 9(6):522-530.

CAMPOS, P.P.; ANDRADE, S.P.; MORO, L.; FERREIRA, M.A.N.D.; VASCONCELOS, A.C. (2006). Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. *Histology and Histopathology*, 21(12):1263-1270.

CAMPOS, P.P.; BAKHLE, Y.S.; ANDRADE, S.P. (2008). Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain. *Wound Repair and Regeneration*, 16 (3): 416-424.

CHAKRAVARTY, A.K.; MAZUMDER, T.; CHATTERJEE, S.N. (2011). Anti-inflammatory potential of ethanolic leaf extract of *Eupatorium adenophorum* Spreng. Through alteration in production of TNF- $\alpha$ , ROS and expression of certain genes. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2011:1-10.

CHAN, A.W.S. (1999). Transgenic animals: current and alternative strategies. *Cloning*, 1(1): 25-46.

CHAN, C.K.; PHAM, L.N.; ZHOU, J.; SPEE,C.; RYAN, S.J.; HINTON, D.R. (2005). Differential expression of pro- and antiangiogenic factors in mouse strain-dependent hypoxia-induced retinal neovascularization. *Laboratory Investigation*, 85(6):721-733.

CHALOTHORN, D.; CLAYTON, J.A.; ZHANG, H.; POMP, D.; FABER, J.E. (2007). Collateral density, remodeling, and VEGF-A expression differ widely between mouse strains. *Physiological Genomics*, 30(2):179-191.

CHAO, M.; HIRSCHI, K.K. (2010). Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells? *Microvascular Research*, 79(3): 169-173.

CLARK, R.A.F. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2<sup>nd</sup> edn. Wound repair , New York, 1996, Cap. 4: 143-168.

CUMMING, B.D.; McELWAIN, DL.S.; UPTON, Z (2010). A mathematical model of wound healing and subsequent scarring. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(42): 19-34.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9: 283–289.

DI DOMENICO, M.; RICCIARDI, C.; FUSCO, A.; PIERANTONI, G.M. (2011). Anti-VEGf therapy in breast and lung mouse models of cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011:1-10.

DOETSCHMAN, T. (2009). Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes. *Methods in Molecular Biology*, 530: 423-433.

DRABKIN, D.L.; AUSTIN, J.H. (1932). Spectrophotometric constants common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *The Journal of Biological Chemistry*, 98: 719–733.

DONEHOWER, L.A.; HARVEY, M.; VOGEL, H.; McARTHUR, M.J.; MONTGOMERY, C.A. J.; PARK, S.H.; THOMPSON, T.; FORD, R.J.; BRADLEY, A. (1995). Effects of genetic background on tumorigenesis in p53-deficient mice. *Molecular Carcinogenesis*, 14(1):16-22.

DURBIN, R.K.; MERTZ, S.E.; KOROMILAS, A.E.; DURBIN, J.E. (2002). PKR protection against intranasal vesicular stomatitis virus infection is mouse strain dependent. *Viral Immunology*, 15 (1): 41-51.

ECKERMANN, J.M.; CHEN, W.; JADHAV, V.; HSU, F.P.; COLOHAN, A.R.; TANG, J.; ZHANG, J.H. (2011). Hydrogen is neuroprotective against surgically induced brain injury. *Medical Gas Research*, 1(1): 1-7.

EMING, S.A.; HUBBELL, J.A. (2011). Extracellular matrix in angiogenesis: dynamic structures with translation potential. *Experimental Dermatology*, 20(7): 605-613.

FERREIRA, M.A.N.D.; BARCELOS, L.S.; CAMPOS, P.P.; VASCONCELOS, A.C.; TEIXEIRA, M.M.; ANDRADE, S.P. (2004). Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFK-KO). *British Journal of Pharmacology*, 141(7): 1185-1192.

GALLET, P.; PHULPIN, B.; MERLIN, J.L.; LEUROUX, A.; BRAUETTI, P.; MECELLEN, H.; TRAN., N.; DOLIVET, G. (2011). Long-term alterations of cytokines and growth factors expression in irradiated tissue and relation with histological severity scoring. *Plos One*, 6(12):1-10.

GERIS, L.; SCHUGART, R.; OOSTERWICK, H.V (2010). In silico design of treatment strategies in wound healing and bone fracture healing. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 368(1920): 2683-2706.

GROSE, R.; WERNER, S.; (2004). Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Molecular Biotechnology*, 28(3); 147-166.

HAHN, Y.S.; KIM, J.G. (2010). Pathogenesis and clinical manifestation of juvenile rheumatoid arthritis. *Korean Journal of Pediatric*, 53(11): 921-930.

HARTNER, A.; CORDASIC, N.; KLANKE, B.; VEELKEN, R.; HILGERS, K.F. (2003). Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrology, Dialysis Transplantation*, 18(10):1999-2004.

HARVEY, M.; McARTHUR, M.J.; MONTGOMERY, C.A.J.; BRADLEY, A.; DONEHOWER, L.A. (1993). Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *The FASEB Journal*, 7(10):938-943.

HU, D.E., HILEY, C.R.; SMITHER,R.L.; GRESHAM,G.A.; FAN, T.P. (1995). Correlation of <sup>133</sup>Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. *Laboratory Investigation* 72(5), 601-610.

JACKSON, J.R.; SEED, M.D.; KIRCHER, C.H.; WILLOUGHBY, D.A.; WINKLER, J.D. (1997). The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *The FASEB Journal*, 11(6): 457-465.

JEANSSON, M.; GAWLIK, A.; ANDERSON, G.; LI, C.; KERJASCHLI, D.; HENKELMAN, M.; QUAGGIN, S.E. (2011). Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6): 2278-2289.

JOHNSON, K.R.; ZHENG, Q.Y.; NOBEN-TRAUTH, K. (2006). Strain background effects and genetic modifiers of hearing in mice. *Brain Research*, 26(1): 79-88.

KOBBE, P.; LICHTER, P.; SCHREIBER, H.; REISS, L.K.; UHLIG, S.; PAPE, H.C.; PFEIFER, R. (2012). Inhalative IL-10 attenuates pulmonary inflammation following hemorrhagic shock without major alterations of the systemic inflammatory response. *Mediators of Inflammation*, 2012:1-6.

KOLB, M.; BONNIAUD, P.; GALT, T.; SIME, P.J.; KELLY, M.M.; MARGETTS, P.J.; GAULDIE, J.(2002). Differences in the fibrogenic responses after transfer of active

transforming growth factor- $\beta$ 1 gene to lungs of “fibrosis-prone” and “fibrosis-resistant” mouse strains. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27(2): 141-150.

KOWANETZ, M.; FERRARA, N. (2006). Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clinical Cancer Research*, 12(17): 5018-5022.

KROLL, J.; EPTING, D.; KERN, K.; DIETZ, C.T.; FENG, Y.; HAMMES, H.; WIELAND, T.; AUGUSTIN, H.G. (2009). Inhibition of Rho-dependent kinases ROCK I/II activates VEGF-driven retinal neovascularization and sprouting angiogenesis. *American Journal of Physiology*, 296(3): 893-899.

LEASK A.; ABRAHAM, D.V. (2004). TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*, 18 (7): 816-827.

LEITER, E.H.; REIFSNYDER, P.C. (2004). Differential levels of diabetogenic stress in two new models of obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, 53, Suppl. 1:S4-11.

LI, T-T.; LARRUCEA, S.; SOUZA, S.; LEAL, S.M.; LOPEZ, J.A.; RUBIN, E.M.; NIESWANDT, B.; BRAY, P.F. (2004). Genetic variation responsible for mouse strain differences in integrin  $\alpha$ 2 expression is associated with altered platelet responses to collagen. *Blood*, 103(9): 3396-3402.



LI, X.; GU, W.; MASINDE, G.; HAMILTON-ULLAND, M.; XU, S.; MOHAN, S.; BAYLINK, D.J. (2001). Genetic control of the rate of wound healing in mice. *Heredity*, 86 (6): 668-674.

LINSENBARDT, D.N.; MOORE, E.M.; GROSS, C.D.; GOLDFAB, K.J.; BLACKMAN, L.C.; BOEHM II, S.L. (2009). Sensitivity and tolerance to the hypnotic and ataxic effects of ethanol in adolescent and adult C57BL/6J and DBA/2J mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(3): 464-476.

LIU, F.; SMITH, J.; ZHANG, Z.; COLE, R.; HERRON, B.J. (2010). Genetic heterogeneity of skin microvasculature. *Developmental Biology*, 340(2): 480-489.

MALINDA, K.M. (2009). In vivo matrigel migration and angiogenesis assay. *Methods in Molecular Biology*, 467: 287-294.

MANIGRASSO, M.B.; O'CONNOR, J.P. (2008). Comparison of fracture healing among different inbred mouse strains. *Calcified Tissue International*, 82(6): 465-474.

MARRAZO, G.; BELLNER, L.; HALILOVIC, A.; VOLT, G.L.; DRAGO, F.; DUNN, M.W.; SCHWARTZMAN, M.L.(2011). The role of neutrophils in corneal wound healing in HO-2 null mice. *PLoS One*, 6(6): 1-8.

MARTINS, S.F.; REIS, R.M.; RODRIGUES, A.M.; BALTAZAR, F.; FILHO, A.L. (2011). Role of endoglin and VEGF family expression in colorectal cancer prognosis and anti-angiogenic therapies. *World Journal of Clinical Oncology*, 10(6):272-280.

MASINDE, E.L.; LI, R.; NGUYEN, B.; YU, H.; SRIVASTAVA, A.K.; EDDERKAOUI, B.; WERGEDAL, J.E.; BAYLINK, D.J.; MOHAN, S. (2006). New quantitative trait loci that regulate wound healing in an intercross progeny from DBA/1J and 129 x 1/SvJ inbred strains of mice. *Functional & Integrative Genomics*, 6(2): 157-163.

MASSET, M.P.; BERK, B.C. (2005). Strain- dependent differences in responses to exercise training in bred and hybrid mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 586 (16): 3979-3990.

MCDONALD, B.; PITTMAN, K.; MENEZES, G.B.; HIROTA, S.A.; SLABA, J.; WATERHOUSE, C.C.M.; BECK, P.L.; MURUVE, D.A.; KUBES, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 330(6024): 362-366.

MENDES, JB.; ROCHA, M.A.; ARAÚJO, F.A.; MOURA, S.A.; FERREIRA, M.A.; ANDRADE, S.P. (2009). Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvascular Research*, 78 (3), 265-271.

MESSMER-BLUST, A.; AN, X.; LI, J. (2009). Hypoxia-regulated angiogenic inhibitors. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 19(8): 252-256.

MOSCH, B.; REISSENWEBER, B.; NEUBER, C.; PIETZSCH, J. (2010). Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis. *Journal of Oncology*, 2010:1-12.

MOURA S.A.; LIMA, L.D.; ANDRADE, S.P.; DA SILVA-CUNHA, A. Jr.; ORÉFICE, R.L.; AYRES, E.; DA SILVA, G.R. (2011). Local drug delivery system: inhibition of inflammatory angiogenesis in a murine sponge model by dexamethasone-loaded polyurethane implants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(7): 2886-2895

MURATA, K.; NOSE, M.; NDHLOVU, L.C.; SATO, T.; SUGAMURA, K.; JSHII, N. (2002). Constitutive OX40/OX40 ligand interaction induces autoimmune-like diseases. *The Journal of Immunology*, 169(8); 4628-4636.

MURPHY, K.E.; HALL, C.L.; McCue, S.W.; McELWINS, D.L.S (2011). A two-compartment mechanochemical model of the roles of transforming growth factor  $\beta$  and tissue tension in dermal wound healing. *Journal of Theoretical Biology*, 272(2011): 145-159.

NAYAK, B.S.; SANDIFOR, S.; MAXWELL, A. (2009). Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda cetrifolia* L. Leaf. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 6(3): 351-356.

NUNES, P.S.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C.; CAVALCANTE, D.R.R.; DANTAS, M.D.M.; CARDOSO, J.C.; BEZERRA, M.S.; SOUZA, J.C.C.; SERAFINI, M.R.; QUITANS-JR, L.J.; BONJARDIM, L.R.; ARAUJO, A.A.S. (2011). Collagen-based films containing liposome- loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1-9.

NUSSEMBAUM, F.; HERMAN, J.M. (2010). Tumor angiogenesis: insights and innovations. *Journal of Oncology*, 2010, 1-24.

NYSKA, A.; WANER, T.; TAL, H.; DAYAN, D. (1991). Spontaneous ameloblastic fibro-odontoma in a female mouse. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 20(5): 250–252.

OOSTERLINCK, W.; VANDERPER, A.; FLAMENG, W.; HERJIGERS, P. (2011). Glucose tolerance and left ventricular pressure-volume relationships in frequently used mouse strains. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1-7.

PAGE, S.H.; WRIGHT, E.K.Jr.; GAMA, L.; CLEMENTS, J.E. (2011). Regulation of CCL-2 expression by an upstream TALE homeodomain protein-binding site that synergizes with the site created by the A-25786 SNP. *Plos One*, 6(7):1-8.

PAL-GHOSH, S.; TADVALKAR, G.; JURJUS, R.A.; ZIESKE, J.D.; STEPP, M.A. (2008). BALB/C and C57BL6 mouse strains vary in their ability to heal corneal epithelial debridement wounds. *Experimental Eye Research*, 87(5): 478-486.

PASSANITI, A., TAYLOR, R.M.; PILI, R.; GUO, Y.; LONG, P.V.; HANEY, J.A.; PAULY, R.R.; GRANT, D.S.; MARTIN, G.R. (1992). A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and anti-angiogenesis agents using reconstituted basement membrane, heparin and fibroblast growth factor. *Laboratory Investigation* 67(4): 519-528.

PAWLOWSKA, M.; GADJA, M.; PYKA-FOSCIAK, G.; TOTON-ZURANSKA, J.; NIE PSUJ, A.; KUS, K.; BUJAK-GIZYCKA, B.; SUSKI, M.; OLSZANECKI, R.; JAWIEN, I.; KORBUT, R. (2011). The effect of doxycycline on atherogenesis in Apoe-Knockout mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 62(2): 247-250.

PHILLIPS, R.J.; BURDICK, M.D.; HONG, K.; LUTZ, M.A.; MURRAY, L.A.; XUE, Y.Y.; BELPERIO, J.A.; KEANE, M.P.; STRIETER, R.M. (2004). Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(3): 438-446.

PINTO, C. E. C. Classificação genética de animais de laboratório. *Disciplina Animais de Laboratório, Universidade Federal Fluminense*, Disponível em < [www.uff.br/animaislab/ap6.doc](http://www.uff.br/animaislab/ap6.doc)>. Acesso em 29 de agosto de 2011.

PRESTA, M.; ANDRÉS, G.; LEALI, D.; DELL'ERA, P.; RONCA, R. (2009). Inflammatory cells and chemokines sustain FGF2- induced angiogenesis. *European Cytokine Network*, 20 (2): 39-50.

PUNCHARD, N.A.; WHELAN, C.J.; ADCOCK, J. (2004). The Journal of Inflammation. *Journal of inflammation*, 1(1): 1-4.

QIAO, Q.; LI, T.; SUN, J.; LIU, X.; REN, J.; FEI, J. (2011). Metabolomic analysis of normal (C57BL/6J, 129S1/SVJmJ) mice by gas chromatography- mass spectrometry: Detection of strain and gender differences. *Talanta*, 85(1): 718-724.

RAMAN, D.; SOBOLIK-DELMARE, T.; RICHMOND, A. (2011). Chemokines in health and disease. *Experimental Cell Research*, 317(5): 575-89.

RAMOS, G.C.; FERNANDES, D.; CHARÃO, C.T.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M.; ASSREUY, J. (2007). Apoptotic mimicry: phosphatidylserine liposomes reduce inflammation through activated receptors (PPARs) *in vivo*. *British Journal of Pharmacology*, 151(6): 844-850.

REID, W.M.; ROLFE, A.; REGISTER, D.; LEVASSEUR, J.E.; CHURN, S.B.; SUNI, D. (2010). Strain-related differences after experimental traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*, 27(7): 1243-1253.

REYNOLDS, J.; ALBOUAINAIN, A.; DUDA, M. A.; EVANS, D.J.; PUSEY, D. (2006). Strain susceptibility to active induction and passive transfer of experimental autoimmune glomerulonephritis in the rats. *Nephrology, Dialysis Transplantation*, 21(12): 3398-3408.

RICHARDSON, M.R.; YODER, M.C. (2011). Endothelial progenitor cells: quo vadis? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50 (2): 266-272.

RODERO, M.P.; KHOSROTEHRANI, K. (2010). Skin wound healing modulation by macrophages. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(7): 643-653.

ROHAN, R.M.; FERNANDEZ, A.; UDAGAWA, T.; YUAN, J.; D' AMATO, R.J. (2000). Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice. *The FASEB Journal*, 14(7): 871-876.

ROLLINS, B.J. (1997). Chemokines. *Blood*, 90(3): 909-928.

SCKELL, A.; LEUNING, M. (2009). The dorsal skinfold chamber: studying angiogenesis by intravital microscopy. *Methods in molecular biology*, 467: 305-317.

SCKELL, A.; KLENKE, F.M. (2009). The cranial bone window model: studying angiogenesis of primary and secondary bone tumors by intravital microscopy. *Methods in Molecular Biology*, 467: 343-355.

SHNYDER, S.D. (2009). Use of the hollow fibre assay for studies of tumor neovasculature. *Methods in Molecular Biology*, 467, 331-342.

SCHADT, E.E., MONKS, S.A.; DRAKE, T.A.; LUSIS, A.J.; CHE, N.; COLINAYO, V.; RUFF, T.G.; MILLIGAN, S.B.; LAMB, J.R.; CAVET, G.; LINSLEY, P.S.; MAO, M.; STOUGHTON, R.B.; FRIEND, S.H. (2003). Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature*, 422(6929): 297-302.

SIGMUND, C.D. (2000). Viewpoint: are studies in genetically altered mice out of control? *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, 20(6):1425-1429.

SOUZA, C.E.; MAITRA, D.; SAED, G.M.; DIAMOND, M.P.; MOURA, A.A.; PENNATHUR, S.; ABU-SOUD, H.M. (2011). Hypochlorous acid-induced heme degradation from lactoperoxidase as a novel mechanism of free iron release and tissue injury in inflammatory diseases. *Plos One*, 6(11): 1-12.

THIESSE, J.; NAMATI, E.; SIEREN, J.C.; SMITH, A.R.; REINHARDT, J.M.; HOFFMAN, E.A.; McLENNAN, G. (2010). Lung structure phenotype variation in inbred mouse revealed through in vivo micro-CT imaging. *Journal of Applied Physiology*, 109(6):1960-1968.

SURWIT, R. S.; SELDIN, M. F.; KUHN, C. M.; COCHRANE, C.; FEINGLOS, M. N. (1991). Control of expression of insulin resistance and hyperglycemia by different genetic factors in diabetic C57BL/6J mice. *Diabetes*, 40(1): 82–87.



SURWIT, R. S.; FEINGLOS, M. N.; RODIN, J.; SUTHERLAND, A.; PETRO, A.E.; OPARA, E.C.; KUHN, C.M.; REBUFFÉ-SCRIVE, M. (1995). Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*, 44(5):645–651.

TSIROGIANNI, A.K.; MOUTSOPOULOS, N.M.; MOUTSOPOULOS, H.M. (2006). Wound healing: immunological aspects. *Injury*, 37, Suppl. 1:S5-12.

TOZER, G.M.; PRISE, V.E.; CUNNINGHAM, V.J. (2009) Quantitative estimation of tissue blood flow rate. *Methods in Molecular Biology*, 467, P. 271-286.

THURAISSINGAM, T.; XU, Y.Z.; EADIE, K.; HERAVI, M.; GUIOT, M.; GREEMBERR, R.; GAESTEL, M.; RADZIOCH, D. (2010). MAPKAPK- 2 signaling is critical for cutaneous wound healing. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(1): 278-286.

UENO, M.; LYONS, B.L.; BURZENSKI, L.M.; GOTT, B.; SHAFFER, D.J.; ROOPENIAN, D.C.; SHULTZ, L.D. (2005). Accelerated wound healing of alkali-burned corneas in MRL mice is associated with a reduced inflammatory signature. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(11): 4097-4106.

VAN DEN Borne, S.W.; VAN DE SCHANS, V.A.; STRZELECKA, A.E.; VERVCORT-PETERS, H.T.; LIJNEN, P.M.; CLEUTJENS, J.P.; SMITS, J.F.; DAEMEN, M.J.;

JANSSEN, B.J.; BLANKESTEIJN, W.M. (2009). Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 84(2): 273-282.

VAN MEYER, D.J.; SANCHEZ-SWEARMAN, O.H.; KERKVLIE, N.; STITT, L.; RAMSAY, D.A.; KHOKHA, R.; CHAMBERS, A.F.; CAIRNCROSS, J.G. (1998). Genetic background influences timing, morphology and disseminations of lymphomas in p53- deficient. *International Journal of Oncology*, 13(5): 917-922.

XAVIER, D.O.; AMARAL, L.S.; GOMES, M.A.; ROCHA, M.A.; CAMPOS, P.R.; COTA, B.D.C.V.; TAFURI, L.S.A.; PAIVA, A.M.R.; SILVA, J.H.; XIE, C.; ZHOU, X.; LIU, X.; MOHAN, C. (2003). Enhanced susceptibility to end-organ disease in the lupus-facilitating NZW mouse strain. *Arthritis and Rheumatism*, 48(4):1080-1092.

XAVIER, D.O.; AMARAL, L.S.; GOMES, M.A.; CAMPOS, P.R.; COTA, B.D.; TAFURI, L.S.; PAIVA, A.M.; SILVA, J.H.; ANDRADE, S.P.; BELO, A.V. (2010). Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(3): 220-225.

YOSHIDA, S.; ONO, M.; SHONO, T.; IZUMI, H.; ISHIBASHI, T.; SUZUKI, H.; KUWANO, M. (1997). Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha- dependent angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 17(7):4015-4023.

WANG, J.; OHMURAYA, M.; SUYAMA, K.; HIROTA, M.; OZAKI, N.; BABA, H.; NAKAGATA, N.; ARAKI, K. ; YAMAMURA, K. (2010). Relationship of strain-dependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of Press 1 and Spink 3 expression. *Laboratory Investigation*, 90(5): 654-664.

WARD, N.L.; MOORE, E.; NOON, K.; SPASSIL, N.; KEENAN, E.; IVANCO, T.L.; LAMANNA, J.C. (2007). Cerebral angiogenic factors, angiogenesis, and physiological response to chronic hypoxia differ among four commonly used mouse strains. *Journal of Applied Physiology*, 102(5): 1927-1935.

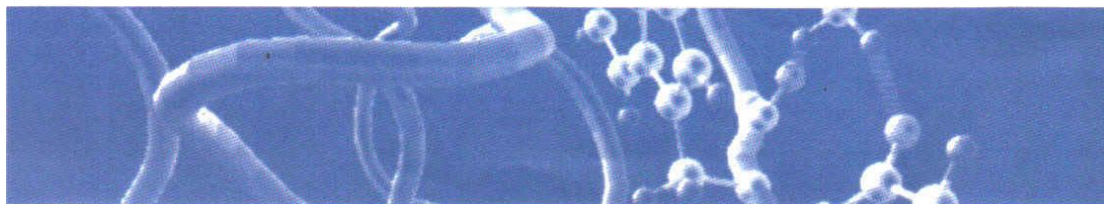
WRIGHT, H.L.; MOOTS, R.T.; BUCKNALL, R.C.; EDWARDS, S.W. (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*, 49(9): 1618-1631.

ZHANG, K.; JIANMING, L.; MORI, T.; SMITH-POWELL, L.; SYNOLD, T.W.; CHEN, S.; WEN, W. (2011). Baicalin increases VEGF expression and angiogenesis by activating the  $ERR\alpha/PGC-1\alpha$  pathway. *Cardiovascular Research*, 89(2):426-435.

ZHANG, J.; LIU, Z.G.; LUO, Y.W.; HE, Y.; GU, D.S.; WANG, M.; ZHENG, Y.T.; SUN, E.W. (2010). Differences in the response to sepsis between C57BL/6J and BALB/C mice. *Southern Medical Journal*, 30(5): 973-975.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L. The corneal pocket assay. *Angiogenesis protocols*. Nittingham, 2009. Cap. 20, 319-329.

**ANEXOS**



# FeSBE 2011

24 a 27 de agosto de 2011  
Rio de Janeiro - RJ

## CERTIFICADO DE HONRA AO MÉRITO

A FeSBE tem a grande satisfação de conferir este certificado de Honra ao Mérito pela brilhante apresentação do trabalho

17.065 - GENETIC BACKGROUND DETERMINES MOUSE STRAIN DIFFERENCES IN INFLAMMATORY ANGIOGENESIS Marques, S. M. ; Campos, P. P. ; Castro, P. R. ; Cardoso, C. C. ; Ferreira, M. A. N. D. ; Andrade, S. P. Fisiologia/Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada no Centro de Convenções Sulamérica, na cidade do Rio de Janeiro - RJ, de 24 a 27 de agosto de 2011.

Comissão Organizadora

