ALESSANDRA PAES SUPPA

**MECANISMOS REGULADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
AGUDA SISTÊMICA PRODUZIDA PELA ISQUEMIA E REPERFUSÃO
INTESTINAL EM CAMUNDONGOS GENETICAMENTE
SELECIONADOS PARA ALTA OU BAIXA REATIVIDADE
INFLAMATÓRIA**

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

SÃO PAULO
2015

ALESSANDRA PAES SUPPA

**MECANISMOS REGULADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
AGUDA SISTÊMICA PRODUZIDA PELA ISQUEMIA E REPERFUSÃO
INTESTINAL EM CAMUNDONGOS GENETICAMENTE
SELECIONADOS PARA ALTA OU BAIXA REATIVIDADE
INFLAMATÓRIA**

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

Área de concentração: Imunogenética

Orientador: Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho

Versão Original

SÃO PAULO

2015

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

© reprodução total

Suppa, Alessandra Paes.

Mecanismos reguladores da resposta inflamatória aguda sistêmica produzida pela isquemia e reperfusão intestinal em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória / Alessandra Paes Suppa. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Regulação genética da reação inflamatória, neoplasias e doenças autoimunes.

Versão do título para o inglês: Regulatory mechanisms of systemic acute inflammation produced by intestinal ischemia and reperfusion in mice genetically selected for high or low inflammatory reactivity.

1. Isquemia/Reperfusão 2. Hipoxia 3. Inflamação 4. Pulmão 5. Intestino I. Ribeiro Filho, Prof. Dr. Orlando Garcia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB048/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Alessandra Paes Suppa

Título da Tese: Mecanismos reguladores da inflamação aguda sistêmica produzida pela isquemia e reperfusão intestinal em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória.

Orientador (a): Orlando Garcia Ribeiro Filho

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de **Doutorado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 39 nas fls. 85 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Orlando Garcia Ribeiro Filho, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Mecanismos reguladores da inflamação pulmonar e sistêmica após hipóxia causada pela I/R intestinal em camundongos AITmax e AIRmin** do qual participou(aram) o(s) **Alessandra Paes Suppa, Layra Lucy Maria Albuquerque da Costa, Iana Suly Santos Katz, Camila do Nascimento Moreira e os pesquisadores Olga Célia Martinez Ibañez, Nancy Starobinas, Wafa Hanna Koury Cabrera, José Ricardo Jensen, Marcelo de Franco Wothan Tavares de Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **08.06.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 08 de junho de 2010.

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

Prof. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 055.13

São Paulo, 05 de agosto de 2013.

REF.: Protocolo nº 039/2010.

"Mecanismos reguladores da inflamação pulmonar e sistêmica após hipóxia causada pela I/R intestinal em camundongos AITmax e AIRmin "

Prezado Professor,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 08.06.2016.**

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

Cordialmente,

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

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Mecanismos reguladores da inflamação pulmonar e sistêmica após hipóxia induzida pela isquemia e reperfusão intestinal em camundongos AIRmax e AIRmin" **protocolo nº 751/10**, sob a responsabilidade de Orlando Garcia Ribeiro Filho e Alessandra Paes Suppa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 14/10/2010.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
10/2010 – 05/2014	
Laboratório de Imunogenética	32 camundongos AIRmax Machos 32 camundongos AIRmin Machos 32 camundongos A/J Machos 32 camundongos C57Bl/6 Machos 32 camundongos Balb/c

São Paulo, 15 de outubro de 2010.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

*Dedico,
àqueles que SEMPRE
estiveram ao meu lado.*

*À minha FAMÍLIA...
Aos meus pais Ângela e Gabriel,
ao meu sogro Waltinho,
aos meus irmãos Vanessa e Gabriel Augusto
e ao meu amado esposo Paulo.*

Agradecimentos

“Hoje, vendo esta tese concluída, não posso deixar de agradecer a todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!”

Ao meu orientador e amigo, Orlando Garcia Ribeiro Filho

Posso dizer, que ao longo desta jornada, a qual não termina aqui, nós construímos uma relação de amizade, respeito e admiração. Agradeço por todos os momentos dedicados a este trabalho e pela confiança a mim designada, os quais juntos refletem neste trabalho.

Aos colaboradores

Dr. Wothan Tavares de Lima, pelo modelo de Isquemia e Reperfusão e pela indispensável e prazerosa colaboração neste trabalho.

Dra. Márcia Regina Franzolin, pela grande colaboração nos experimentos de Translocação Bacteriana, pela acessibilidade e simpatia.

Dr. Luís Roberto C. Gonçalves e Dr. Bianca Cestari Zychar, pela colaboração nos experimentos de Microscopia Intravital.

Dra. Adriana Franco Paes Leme do LNbio pela colaboração nos experimentos de espectrometria de massas.

Aos Pesquisadores do Laboratório de Imunogenética

Dra. Olga Ibañez, Dr. Marcelo de Franco, Dra. Wafa Cabrera, Dra. Nancy Starobinas, Dr. José Ricardo Jensen, Dra. Solange Massa, Dra. Mônica Spadafora e Dra. Andrea Borrego.

À Banca de Qualificação

Dr. Wilmar Dias da Silva, Dra. Sônia Jancar Negro, Dra. Alessandra Pontillo. Obrigada pela grande contribuição para finalização desta tese, pelo olhar criterioso e pelo exemplo de profissionalismo. Posso dizer que foi muito construtiva e prazerosa a vossa arguição.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Em especial...

À Tereza Cristina Soutto Mayor, do Serviço de Tratamento da Informação. Obrigada pela gentileza, simpatia, atenção e comprometimento no auxílio à formatação desta tese.

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética

Layra, Iana, Camila, Débora, Andressa, Tatiane, Lillian, Cristiano, Jussara, Fernanda, Pricillia, Renata, Priscila, Marcela, Mara, Luciana, Patrícia, Vinícius e Francisca, muito obrigada pela força e companheirismo nos desafios de cada dia.

Aos funcionários e ex-funcionários do Laboratório de Imunogenética

Sandra Regina Ottoboni, Neusa Maria Coração Miranda, Marinalva de Jesus Lima, Tânia Maria Braga Vieira, Ronaldo Antônio Mateus, Rosa Maria da Silva e Mara de Oliveira Irineu, pela maravilhosa convivência e pelo auxílio no preparo dos materiais utilizados.

Aos funcionários e ex-funcionários do biotério do Laboratório de Imunogenética

Celso dos Santos, Joel Faustino de Camargo, Luiz Carlos Hilário, Marinalva dos Santos Silva, Sergio Branco de Miranda, pelo cuidado com os animais.

À funcionária do Laboratório de Virologia e amiga Luzia

Pela força e alegria contagiante que me proporcionou desde o primeiro momento em que cheguei ao Instituto Butantan.

Aos colegas da COVISA

À minha chefe Marília Natalie Giroto e aos colegas da COVISA pela compreensão e incentivo durante a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

Aos amigos queridos

Cristiano Rossato, Janete Rosolen, Marcos Rosolen, João Caldeira, Elisangela Caldeira, Francesco D'Antoni, Teresa Pace, Martina D'Antoni, Alice D'Antoni, Giuseppe D'Antoni, Mário D'Antoni, Enzo D'Antoni.

Às minhas amadas amigas

Layra Albuquerque, Tatiane Canhamero Gasparello, Thami Nascimento, Sandra Cofano, Silmara Figueiró, Ana Elena D'Império. O que seria de mim sem os amigos... Não existiriam histórias para contar, nem gargalhadas ao vento. Obrigada pelo carinho, sinceridade e incentivo. Amo vocês!

Aos meus avós

À minha avó Pedrina que hoje com 86 anos é um exemplo de força, esperança, justiça e determinação. Aos meus amados avós, Nelson, Giuseppe e Timmy, pelo exemplo de vida (in memoriam).

À todos os integrantes da minha família

Em especial...

Aos meus tios amados e queridos Paulo Suppa, Cláudia Gontijo, Sandra Paes, Marcia Paes de Barros, obrigada!

Ao meu querido e amado tio ZÉ, José Barros (in memoriam). Obrigada pelo carinho!

Aos meus primos Marina Suppa, Bárbara Suppa, Daniela Paes, Júlia Paes, Henrique do Amaral, Giovanna do Amaral e Rafaella do Amaral.

Ao meu pai Gabriel

Pelo incentivo, exemplo profissional, carinho, amor e apoio. Te amo!

Aos meus irmãos

Vanessa (Vanessão) e Gabriel Augusto (Gutinho), pela infância maravilhosa, pelas risadas antes de dormir, pelo carinho e pelo amor correspondido. Amo vocês!

Ao meu sogro Walter Wolf (Waltinho)

Obrigada pelo apoio, incentivo, paciência e carinho de pai. Amo-te como filha!

Ao meu esposo Paulo Wolf

Pelo amor, amizade e companheirismo. Obrigada pelo incentivo, pelo carinho, paciência e apoio. Te amo!

À minha mãe

Por sempre estar ao meu lado, por acreditar nos meus objetivos, e principalmente pelo seu amor infinito. Antes de saber o que era amor já te amava, te amo e sempre te amarei!

*"A mente que se abre a uma ideia, jamais
voltará ao seu tamanho original".
(Albert Einstein)*

*"O mistério da vida não é um problema
para ser resolvido, mas uma realidade
para ser experimentada".
(Aart Van Der Leew)*

RESUMO

SUPPA, A. P. **Mecanismos reguladores da resposta inflamatória aguda sistêmica produzida pela Isquemia e Reperfusão intestinal em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória.** 2015. 113 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Alterações no mecanismo de transporte de oxigênio (O₂) frequentes em inflamações, infecções, tumores, transplantes e isquemia, levam a um hipóxia tecidual. Estabelecida a obstrução do fluxo sanguíneo, espécies reativas do O₂ são produzidas e citocinas inflamatórias são liberadas engatilhando uma série de eventos, os quais são amplificados após a restituição do fluxo sanguíneo resultando em uma inflamação sistêmica. No presente estudo, caracterizamos os mecanismos que regulam a inflamação aguda produzida pela indução de hipóxia após isquemia e reperfusão intestinal (I/Ri) e avaliamos a participação do fator de transcrição HIF-1 α (*Hipoxia inducible factor 1 alpha*) na modulação da reação inflamatória aguda (AIR). Para tanto, camundongos selecionados para alta (AIRmax) e baixa (AIRmin) AIR foram submetidos a I/Ri e analisados em diferentes períodos de reperfusão. Avaliamos: 1) leucócitos circulantes; 2) interações leucócito-endotélio na microcirculação; 3) resposta inflamatória local (íleo) e sistêmica (pulmão) pela atividade da mieloperoxidase (MPO); 3) expressão gênica do intestino e pulmão; 4) translocação de bactérias (BT) do trato gastro intestinal para os linfonodos mesentéricos (LMN) e o baço; 5) expressão intracelular do HIF-1 α nos granulócitos infiltrados no pulmão; 6) proteoma do pulmão e sequenciamento por espectrometria de massa. Nossos resultados demonstraram uma maior sensibilidade da linhagem AIRmax frente a situações de hipóxia, confirmada por uma maior mobilização de neutrófilos para circulação periférica, refletindo em uma maior adesão celular e aumento da migração granulocítica para o intestino e pulmão, bem como maior número de bactérias translocadas para os LMN e baço. Foi evidenciado nesta linhagem um aumento de expressão dos genes *Tnfa*, *Il1*, *Il6* e *Hif1a*. Corroborando estes resultados, observamos que os animais AIRmax após I/Ri apresentaram maior expressão da proteína HIF-1 α e daquelas envolvidas nos processos inflamatórios tais como S100A9, Annexina 1, Profilina 1, Tropomiosina. Por outro lado, a linhagem AIRmin foi considerada pouco responsiva aos efeitos da I/R. Diante do exposto, nós concluimos que a sensibilidade dos camundongos AIRmax à injúria após indução de I/Ri está associada ao agravamento da inflamação sistêmica, a qual foi determinada pela indução de HIF-1 α atrelada à expressão de proteínas pró- inflamatórias e TB, indicando o compartilhamento e/ou a co-segregação dos genes envolvidos na AIR induzida por agente flogístico ou por hipoxia.

Palavras-chave: Hipóxia. Isquemia/Reperfusão. Inflamação. Pulmão. Intestino HIF-1 α . AIRmax. AIRmin.

ABSTRACT

SUPPA, A.P. **Regulatory mechanisms of systemic acute inflammation produced by intestinal ischemia and reperfusion in mice genetically selected for high or low inflammatory reactivity.** 2015. 113 p. Ph D. thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Changes in oxygen (O₂) transport mechanism frequent in inflammation, infection, tumors, transplantation and ischemia, lead to tissue hypoxia. Once established the blood flow obstruction, reactive species of O₂ are produced and inflammatory cytokines are released triggering a series of events, which are amplified after blood flow restoration, resulting in systemic inflammation. The organism response in hypoxia situation is associated with specific gene expression like HIF1α (hypoxia inducible factor 1 alpha). In the present study, we characterized the Acute Inflammatory Response (AIR) produced by induction of ischemia and reperfusion (I/R) of the mesenteric artery, and evaluated the role of HIF-1α transcription factor in local and systemic inflammatory phenotype. Lines of mice genetically selected for high (AIRmax) or low (AIRmin) Acute Inflammatory Response were used as a model for the study of genetic and functional mechanisms involved in the inflammatory response induced by tissue hypoxia. For this purpose, the animals were assessed at baseline and at different time periods (0, 1, 4 and 24 hours) after restoration of blood flow. We evaluated: 1) leukocytes of peripheral circulation; 2) leukocyte-endothelial interactions in the mesenteric microcirculation; 3) local inflammatory response (ileum) and systemic (lung) by myeloperoxidase activity (MPO); 3) gut and lung gene expression by qPCR; 4) bacteria translocation from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and intestinal extra sites; 5) granulocyte intracellular HIF-1α identification in the lung; 6) proteomic analysis (2D Gel) and sequencing by mass spectrometry of the lung. Our results showed a higher sensitivity in AIRmax in response to hypoxic state, confirmed by greater mobilization of leukocytes and neutrophils to peripheral circulation, resulting in cell adhesion and leukocyte migration increased into the gut and lung, as well as increased bacteria translocation to spleen or LMN after I/Ri. AIRmax mice has shown an increase of gene expression and inflammatory cytokines such as TNF, IL1, IL6 and HIF1A under hypoxic conditions. After I/Ri we observed that AIRmax mice showed a higher expression of HIF-1α protein and proteins involved in inflammatory processes such as S100A9, Annexin 1, profilin 1, Tropomyosin than AIRmin mice. We concluded that the I/Ri sensitivity of the AIRmax mice were associated with worsening of systemic inflammation, which was determined by HIF-1α induction linked to the expression of pro-inflammatory proteins and TB, indicating the share and/or co-segregation of the genes involved in AIR.

Keywords: Hypoxia. Ischemia/Reperfusion. Inflammation. Lung. Gut. HIF-1α. AIRmax. AIRmin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Regulação pós- transcricional do HIF-1 α
- Figura 2 -** Fisiopatologia da isquemia e reperfusão da artéria mesentérica
- Figura 3 -** Ilustração esquemática da origem da população F0, a qual originou Seleção AIR (*Acute Inflammatory Response*)
- Figura 4 -** Divergência fenotípica entre AIRmax e AIRmin
- Figura 5 -** Perfil temporal dos leucócitos da circulação periférica
- Figura 6 -** Interações leucócito endotélio na microcirculação: Rolamento e Adesão.
- Figura 7 -** Atividade da mieloperoxidase no íleo terminal.
- Figura 8 -** Expressão dos genes *Hif1a*, *Hif1b*, (*Arnt*), *Vhl*, *Tgfb* e *Tnfa* no íleo terminal.
- Figura 9 -** Translocação Bacteriana: Unidades Formadoras de Colônias
- Figura 10 -** Perfil temporal da migração de leucócitos no pulmão.
- Figura 11 -** Expressão dos genes *Hif1a*, *Hif1b* (*Arnt*), *Vhl*, *Vegfa* no pulmão de camundongos AIRmax e AIRmin.
- Figura 12 -** Expressão dos genes *Il6*, *Il1b* e *Tgfb* no pulmão de camundongos AIRmax e AIRmin
- Figura 13 -** Infiltrado leucocitário pulmonar dos camundongos AIRmax após I/R 2h.
- Figura 14 -** Infiltrado leucocitário pulmonar dos camundongos AIRmin após I/R 2h.
- Figura 15 -** Infiltrado leucocitário pulmonar dos camundongos AIRmax e AIRmin após I/R 2h.
- Figura 16 -** Eletroforetograma em duas dimensões dos camundongos submetidos à I/R
- Figura 17 -** Eletroforetograma em duas dimensões dos camundongos falso operados

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Sequência dos primers utilizados na reação de qPCR
- Tabela 2 -** Identificação das colônias em Linfonodos e baço de AIRmax e AIRmin submetidos à I/Ri.
- Tabela 3 -** Proteínas identificadas (Espectrometria de Massas).
- Tabela 4 -** Proteínas do pulmão diferencialmente expressas entre as linhagens AIRmax e AIRmin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A₄₅₀ -	Absorbância 450nm
ADP -	Adenosina Difosfato
AHR -	Receptor de Hidrocarbonetos Aromáticos (<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>)
Akr1a4 -	Álcool desidrogenase (<i>Alcohol dehydrognase</i>)
AIR -	Resposta Inflamatória aguda
AIR_{max} -	Resposta Inflamatória Aguda Máxia
AIR_{min} -	Resposta Inflamatória Aguda Mínima
ALI -	Injúria aguda do pulmão
AMP -	Adenosina monofosfato
Anax1 -	Anexina 1 (<i>Anexin1</i>)
Anax5 -	Anexina 5 (<i>Anexin 5</i>)
ARDS -	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
Arhgdia -	Inibidor 1 da dissociação- Rho GDP (<i>Rho GDP- dissociation inhibitor 1</i>)
Arhgdib -	Inibidor 2 da dissociação- Rho GDP (<i>Rho GDP- dissociation inhibitor 2</i>)
ARNT -	Translocador Nuclear de Hidrocarbonetos Aromáticos (<i>Aryl HydrocarbonNuclear Translocator</i>)
ATP	Adenosina Trifosfato
bHLH -	Básico-leice -alça -hélice (<i>Basic- helix -loop-helix</i>)
TB -	Translocação Bacteriana
CBP/p300	Co- activators Binding Protein/p300
Cbr1 -	Carbonil redutase (<i>Carbonyl redutase</i>)
cM -	CentiMorgan
cT -	Cycle Threshold
DMBA -	7,12-dimetilbenzantraceno
DO -	Densidade óptica
Eif5a -	Fator inicial de tradução eucariótica 5A (<i>Eukariyotic translation factor 5 A</i>)
F0 -	População inicial

F1 -	Híbridos interlinhagem
F2 -	Segregantes interlinhagens
GM-CSF -	Fator estimulador de crescimento granulócito-macrófago
Gm6316	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (<i>Gliceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase</i>)
HIF-1 -	Fator Indutor de Hipóxia 1
HREs -	Elementos Responsivos de Hipóxia
IL-1β -	Interleucina 1 β
IL-6 -	Interleucina 6
IL-10 -	Interleucina 10
I/R -	Isquemia e Reperfusão
I/Ri -	Isquemia e Reperfusão intestinal
Krt1 -	Queratina tipo II citoequeleto 1 (<i>Keratin, typeII cytoskeletal1</i>)
Mtap4 -	Proteína 4 associada ao microtúbulo (<i>Microtubule-associated protein</i>)
MGI -	<i>Mouse Genomic Informatics</i>
MPO -	Mieloperoxidase
NF-κB -	Fator Nuclear κ B
ODD -	Domínio de degradação dependente de oxigênio
PAF -	Fator ativador de plaqueta
PAHs -	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
PAS -	<i>Period aryl hidrocarbon receptor nuclear translocator single- minded</i>
PBS -	Salina tamponada com fosfatos
PCR -	Reação em cadeia da polimerase
PHD -	Protil Hidroxilase
PI3K -	Fosfatidilinositol 3- kinase
pO₂ -	Pressão parcial de O ₂
rTEM -	migração transendotelial reversa (<i>reverse transendotelial cell migration</i>)
TAD-C -	Domínio de transativação C terminal
TAD-N -	Domínio de transativação N terminal
TGF-β -	Fator de crescimento tumoral β
TNF-α -	Fator de Necrose Tumoral α

Tpm2 -	Tropomiosina 2 (Tropomyosin 2)
UTI -	Unidade de tratamento intensivo
VEGF -	Fator de crescimento do endotélio vascular
VHL -	von Hippel –Lindau

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Hipóxia.....	24
1.2 Mecanismos e fisiopatologia da isquemia e reperfusão intestinal aguda.	28
1.3 Isquemia/ Reperfusão intestinal e lesão pulmonar	31
1.4 Modelo Experimental	33
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Estratégias Experimentais	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Camundongos	41
3.2 Indução da Isquemia e Reperfusão Intestinal (I/R).....	41
3.2.1 Perfusão Pulmonar	41
3.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	42
3.4 Obtenção das células do sangue	42
3.5 Contagem diferencial dos leucócitos	42
3.6 Expressão Gênica por PCR em Tempo Real (Real Time PCR)	43
3.6.1 Extração de RNA Total	43
3.6.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)	43
3.6.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-Time PCR)..	44
3.6.4 Cálculo da expressão relativa	44
3.7 Citometria de fluxo para identificação das células Ly6G⁺CD11b⁺HIF-1α⁺	46

3.7.1 Extração das células do pulmão por colagenase	46
3.7.2 Marcação extracelular com anti- Ly6G e anti- CD11b	47
3.7.3 Marcação intracelular com anti- HIF 1-α	47
3.8 Quantificação do conteúdo proteico total das células do pulmão	47
3.8.1 Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em duas dimensões (Gel-2D)	48
3.8.2 Coloração dos géis de proteína com nitrato de prata	49
3.9 Microscopia Intravital	49
3.10 Translocação Bacteriana	50
3.11 Análise Estatística.....	51
4 RESULTADOS	52
4.1 Cinética dos leucócitos da circulação periférica	53
4.2 Efeito da isquemia e reperfusão nas alterações de interações leucócito-endotélio na microcirculação do mesentério de camundongos AIRmax e AIRmin.	55
4.3 Avaliação da resposta inflamatória local à I/R intestinal	58
4.3.1 Atividade da Mieloperoxidase no intestino (íleo terminal).....	58
4.3.2 Avaliação dos genes envolvidos em condição de hipóxia e de inflamação aguda no intestino	60
4.3.3 Translocação Bacteriana	63
4.4 Avaliação da resposta inflamatória sistêmica: pulmonar	65
4.4.1 Cinética da atividade da Mieloperoxidase no pulmão	65
4.4.2 Cinética da expressão gênica do Pulmão após indução de isquemia e reperfusão	67
4.4.3 Análise da expressão proteica do Fator de Transcrição HIF-1α nas células infiltradas no pulmão após indução de Isquemia e	

Reperusão	71
4.4.4 Análise eletroforética em Duas dimensões (SDS-PAGE 2D) da proteínas extraídas do pulmão dos animais AIRmax e AIRmim submetidos à I/R intestinal.	76
5 DISCUSSÃO	82
6 CONCLUSÕES	100
7 REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipóxia

A homeostase do oxigênio é essencial para o desenvolvimento fisiológico e sobrevivência dos organismos. A evolução dos seres vivos eucariotos a seres pluricelulares complexos abrangeu o desenvolvimento de sistemas os quais assegurassem a distribuição de O_2 por todo organismo. Alterações no mecanismo de transporte de oxigênio devido a um simples deslocamento geográfico para áreas com baixas concentrações de oxigênio (grandes altitudes) ou a obstruções físicas do fluxo sanguíneo como inflamações, infecções, tumores, transplantes e isquemia, levam a um estado de baixa tensão de oxigênio nos tecidos (hipóxia). Uma das causas mais comuns que levam a hipóxia tecidual é a isquemia, caracterizada pela diminuição da oferta de sangue para os tecidos, consequência da diminuição da luz das artérias, arteríolas, vênulas e capilares. (SEMENZA, 2014; SOYDAN et al., 2009; WELBOURN et al., 1991).

Em tecidos íntegros a tensão de oxigênio (ou pressão parcial de O_2) encontra-se geralmente entre 20 e 70 mm Hg, entretanto, uma perfusão inadequada de O_2 pode gerar áreas de hipóxia, onde a tensão de O_2 pode chegar a menos de 10 mm Hg (LEWIS et al., 1999). Esta condição afeta profundamente as propriedades celulares como: produção de citocinas, expressão de receptores para quimiocinas, adesão, migração e sobrevivência das células. Como consequência a viabilidade celular pode ser comprometida levando à perda de função e integridade do organismo (CARDEN; GRANGER, 2000; DE PERROT et al., 2003; LEWIS et al., 1999; NILAKANTAN et al., 2009; ROLO et al., 2009;).

Na tentativa de manter a integridade do tecido, é de importância vital que as células mielóides e linfóides exerçam suas funções especializadas nas áreas lesionadas, onde o aporte de oxigênio e de nutrientes encontra-se baixo (BORREGAARD; HERLIN, 1982; NILAKANTAN et al., 2009; SEMENZA, 2007, 2008, 2014). A capacidade destas células de responderem às modificações na tensão de oxigênio do microambiente é resultado da expressão de um grupo de genes específicos os quais codificam proteínas responsáveis por manter a homeostase tecidual. O grupo de proteínas que realiza esta função compreende o complexo gênico do HIF (do inglês: *Hypoxia Inducible Factor*)

incluindo *Hif1a*, *Hif1b* (*Arnt*) e *Vhl* (von Hippel Lindau), assim como os genes alvos codificadores de citocinas clássicas pró- ou anti-inflamatórias como *Il1b*, *Il6* e *Tnfa* (DEHNE; BRUNE, 2009; LEE et al., 2004; PAPANDREOU et al., 2005).

O HIF-1 α é um fator de transcrição, responsável pela regulação dos elementos responsivos à hipóxia (*Hipoxia Responsive Elements* –HREs), composto por duas subunidades, HIF-1 α e HIF-1 β (ARNT). As subunidades α e β pertencem à família de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (*basic helix-loop-helix* -bHLH) os quais apresentam dois domínios PAS (*Period Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Single Minded*- Per/Arnt/Sim), designados PAS-A e PAS-B (KIZAKA-KONDOH et al., 2009; SEMENZA 2008, 2014).

Modificações pós-transcricionais regulam a atividade do HIF-1 α , aumentando a estabilidade da proteína e a sua capacidade de transativação. Neste sentido, em situação de hipóxia, a hidroxilação do HIF-1 α dependente de O₂ é reduzida, estabilizando a proteína e permitindo sua dimerização com o ARNT (*Aryl Receptor Nuclear Translocator*), formando um complexo transcricional ativo. O componente central da complexa regulação da expressão de HIF-1 α é o produto da expressão do gene supressor de tumor *Vhl* o qual, codifica a proteína von Hippel-Lindau (KIZAKA-KONDOH et al., 2009; LEE et al., 2004; MAXWELL et al., 1999; PALAZON et al., 2014; SEMENZA 2008, 2014).

Em condições de normóxia, a estabilidade da proteína HIF-1 α é regulada pela hidroxilação dependente de O₂. A associação do HIF-1 α com a proteína VHL é iniciada por modificações pós-transcricionais representadas pela hidroxilação de resíduos de prolina, mediados pela prolil hidroxilase (PHD) ou HIF prolil hidroxilase (HPH). A hidroxilação destes resíduos proporciona a associação do HIF-1 α com a proteína VHL. Nesse momento, a proteína VHL atua como substrato de reconhecimento do complexo ubiquitina ligase E3, levando à rápida degradação do HIF-1 α via proteassomo (KIZAKA-KONDOH et al., 2009; LEE et al., 2004; SEMENZA 2008, 2014) (**Figura 1**).

Além da condição de hipóxia, outros estímulos produzidos por, citocinas, hormônios, fator de crescimento tumoral (TGF), fator de crescimento derivado

de plaqueta (PGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), interleucina-1 β (IL-1 β), lipopolissacarídeo (LPS) e insulina são capazes de induzir a transcrição e o acúmulo de HIF-1 α em condições normais de oxigênio. Provavelmente os fatores de crescimento se ligam ao receptor tirosina kinase, ativando as vias PI3K (fosfatidilinositol 3-kinase) e MAPK, (*Mitogen Activated Protein kinase*) (HELLWING-BURGEL et al., 2005; LEE et al., 2004; MCMAHON et al., 2006).

Figura 1 – Regulação Pós transcricional do HIF-1 α .

Fonte: Modificado de KIZAKA- KONDOH et al, 2009.

Vários estudos foram desenvolvidos no sentido de elucidar o papel do HIF-1 α na regulação das reações inflamatórias. Camundongos C57Bl/6 nocautes para os genes *Hif1a* ou *Vhl*, foram desenvolvidos e submetidos a condições adversas de oxigênio. A deleção do gene *Vhl* causou uma hiperinflamação, em modelo de indução inflamação cutânea local por TPA (12-

O-tetradecanoil-forbol-13-acetato), além de aumentar a produção de lactato e induzir a formação de edema. Já camundongos nocautes para o *Hif1a* apresentaram inibição da formação de edema, e diminuição de células inflamatórias. Segundo estes autores, a perda de capacidade inflamatória está relacionada aos defeitos na ativação metabólica e ocorre sem qualquer alteração no desenvolvimento normal e de diferenciação das células mielóide. Assim, o HIF-1 funcionaria como um regulador de metabolismo basal de energia nestas células diretamente relacionado com a produção de ATP. Neste contexto, macrófagos e neutrófilos de camundongos *Hif1a null* após estímulo com LPS, apresentaram diminuição dos níveis de ATP e diminuição da produção de lactato, quando comparados às linhagens selvagens. Por outro lado, camundongos *Vhl null* apresentaram aumento de lactato indicando aumento da atividade glicolítica (CRAMER et al., 2003).

Em estudos realizados no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, utilizando linhagens selecionadas para alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) resposta inflamatória aguda (*Acute Inflammatory Response-AIR*) foi observada maior reatividade inflamatória aguda acompanhada de elevada expressão do gene *Hif1a* nos camundongos AIRmax. Este perfil foi evidenciado tanto na vigência da inflamação local (orelha) induzida pela aplicação cutânea do agente promotor de hiperplasia TPA (SIQUEIRA, 2009), como também no pulmão destes camundongos em situações de hipóxia, após a indução da artéria mesentérica por 45 minutos e 4 horas de reperfusão (SUPPA, 2009).

Em análises genéticas por microssatélites, observou-se polimorfismo entre as linhagens AIRmax e AIRmin no cromossomo 12 ao redor de 15 e 45 cM, região na qual está localizado o gene *Hif1a* (SIQUEIRA, 2009). Nesta região encontram-se também os genes de susceptibilidade a tumor de pele (*Skf5*), de resistência de adenomas pulmonares (*Par3*) e o gene codificador do receptor de hidrocarbonetos aromáticos (*Ahr*), cujos alelos de alta e baixa afinidade estão respectivamente fixados em AIRmin e AIRmax (DE SOUZA et al., 2009).

1.2 Mecanismos e fisiopatologia da isquemia e reperfusão intestinal aguda.

A circulação intestinal representa uma significativa proporção do débito cardíaco recebendo 25% do fluxo sanguíneo durante períodos de repouso (jejum) e 35% após ingestão de alimentos. De fato, para manter constante o fluxo sanguíneo intestinal frente a mudanças na pressão arterial sistêmica, torna-se necessário o desenvolvimento de mecanismos de auto-regulação. Nesse sentido, supõe-se que mecanismos miogênicos e metabólicos estariam contribuindo para a homeostase da circulação intestinal. De acordo com a teoria miogênica, a diminuição aguda da pressão de perfusão é compensada pela redução da tensão na parede dos vasos por meio de receptores de tensão arterial mantendo assim o fluxo sanguíneo. Já a teoria metabólica, sugere que um desequilíbrio entre demanda e fornecimento de oxigênio levará ao aumento de metabólitos, tais como espécies reativas de O_2 , os quais por sua vez causam vasodilatação e hiperemia. (BYARD, 2012; LOFFROY et al., 2010; VOLLMAR; MENDER, 2011).

As células do endotélio vascular são particularmente vulneráveis aos efeitos deletérios da hipóxia gerados durante a isquemia e acentuados após a reperfusão (reoxigenação). A carência de oxigênio provoca alterações diretas nas mitocôndrias, o que ocasiona a diminuição da fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, queda dos níveis de ATP (adenosina trifosfato). Na tentativa de diminuir os efeitos da hipóxia, o tecido isquêmico utiliza vias alternativas, como a glicólise anaeróbia, visando a produção de ATP para gerar o metabolismo mínimo capaz de manter a homeostase celular. No entanto, o estoque de ATP é consumido e degradado durante o estado de hipóxia, levando à geração de hipoxantina. A queda dos níveis de ATP compromete o sistema de produção proteica pelas células e desregulação eletrolítica pelo funcionamento inadequado da bomba de sódio/potássio (Na^+/K^+), a qual culmina em edema celular. Paralelamente, ocorre o acúmulo de Ca^{++} no citosol, provocando a ativação de proteases, que convertem a enzima xantina desidrogenase em xantina oxigenase (CARDEN; GRANGER, 2000; DE PERROT, et al., 2003; GRISHAM et al., 1986; NILAKANTAN et al., 2009; ROLO et al., 2009).

Após a restituição do fluxo sanguíneo (reperfusão) são produzidas substâncias tóxicas e precursores de radicais livres. A hipoxantina resultante da degradação de ATP é convertida em xantina pela ação da enzima xantina oxigenase e posteriormente em ácido úrico tendo como subprodutos o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O ânion superóxido promove a liberação de íons metálicos (Fe^{++}), os quais reagem com H_2O_2 , formando o radical hidroxila (OH) responsável pela peroxidação dos ácidos graxos da membrana. O peróxido de hidrogênio ativa a fosfolipase A_2 que catalisa a hidrólise dos lipídios de membrana liberando o ácido araquidônico o qual é metabolizado pela cicloxigenase em tromboxanos e prostaglandinas ou pelas lipoxigenases em leucotrienos (PORTUGAL-COHEN; KOHEN, 2009).

A produção elevada de espécies reativas do oxigênio resulta na ativação de fatores quimiotáticos, como fragmentos do complemento (C5a), fator de ativação de plaquetas (PAF) e leucotrieno B_4 (LTB_4) (CARDEN; GRANGER, 2000; LAMMERS, et al., 2003). Estes promovem a quimiotaxia de leucócitos, como também a indução da expressão de moléculas de adesão como as β_2 integrinas (CD11/CD18) em sua superfície. Paralelamente, as espécies reativas do oxigênio promovem a expressão inicial de P-selectinas, além de ativarem fatores de transcrição nuclear como o $NF\kappa B$. Este último, é responsável por promover a síntese de várias proteínas, dentre elas as citocinas inflamatórias, além de induzir nas células endoteliais a expressão de moléculas como ICAM-1 e PECAM-1, responsáveis pelo fenômeno de adesão e migração dos leucócitos (VOLLMAR; MENDER, 2011).

Radicais livres e espécies reativas do oxigênio, acumulados durante a isquemia, ativam e atraem indiretamente neutrófilos para os tecidos injuriados aumentando o consumo de oxigênio de modo a amplificar e perpetuar a resposta inflamatória. Os neutrófilos, uma vez ativados secretam enzimas proteolíticas, como a mieloperoxidase, elastase, proteinase 3, catepsina G, espécies reativas do oxigênio e nitrogênio acentuando a lesão tecidual (CARDEN; GRANGER, 2000; DE PERROT et al., 2003; KLAR et al., 2012; TANG et al., 2008). Nesse sentido, a inflamação após isquemia/reperfusão pode promover um dano na microcirculação estabelecendo uma disfunção na barreira intestinal, a qual facilitaria um evento denominado translocação

bacteriana (BT) (FEINMAN et al., 2010; VOLLMAR; MENDER, 2011; YASUHARA, 2005;).

Translocação bacteriana (BT) é definida como a migração de bactéria ou produtos bacterianos do lúmen intestinal para os linfonodos mesentéricos (LNMs) ou para outros órgãos ou sítios extra intestinais como baço, fígado, rins pulmão, cavidade peritoneal e circulação sanguínea, representando um desequilíbrio da microbiota que leva a uma resposta inflamatória ou até mesmo infecção. São descritos três fatores fundamentais capazes de promover a translocação bacteriana: supercrescimento bacteriano na luz intestinal, disfunção da barreira intestinal e deficiência na imunidade do hospedeiro (BERG, 1992, DEITCH, 1990; TSUJIMOTO et al., 2009). No entanto, duas vias fundamentais são descritas para explicar o mecanismo pelo qual as bactérias intestinais alcançariam a circulação sistêmica e sítios extra-intestinais: a via hematogênica portal e a via linfática (NEUGEBAUR et al., 2008; VAN LEEUWEN, et al., 1994; WUEST e GARCIA-TSAO, 2005). A via hematogênica refere-se à passagem das bactérias da luz intestinal pela microcirculação da mucosa, veia porta, veias hepáticas, veia cava inferior, chegando ao coração onde serão disseminadas para outros órgãos pela circulação. Já na via linfática, as bactérias evadidas para a lâmina própria da mucosa intestinal são transportadas pela linfa aferente até os linfonodos mesentéricos (LNM) e via ducto linfático mesentérico e ducto torácico atingem a circulação sistêmica (NEUGEBAUR et al., 2008; WUEST e GARCIA-TSAO, 2005).

Os efeitos da translocação bacteriana após a isquemia e reperfusão acentuam a lesão local pela liberação de mediadores inflamatórios, provocando danos teciduais irreversíveis levando à necrose da mucosa intestinal. Além disso, a translocação bacteriana eleva a resposta inflamatória sistêmica já iniciada durante a isquemia e reperfusão pela presença de bactérias e endotoxinas na circulação (FEINMAN et al., 2010; VOLLMAR; MENDER, 2011; YASUHARA, 2005). Uma vez estabelecida a resposta inflamatória sistêmica, órgãos vitais são atingidos sofrendo injúrias inflamatórias as quais, podem levar à perda da função e falência do órgão (**figura 2**).

Figura 2 – Fisiopatologia da lesão por isquemia e reperfusão da artéria mesentérica.

Fonte: Modificado de VOLLMAR; MENDER, 2011.

1.3 Isquemia/ Reperfusão intestinal e lesão pulmonar

Isquemia e reperfusão intestinal é uma condição clínica de alto risco de morte, induzida por diversas causas. Pacientes com histórico de arritmias cardíacas, aterosclerose, hipovolemia, sepse, trombose, embolia arterial assim como aqueles submetidos a cirurgias recentes, traumas graves e transplantados, possuem um alto risco de desenvolverem isquemia intestinal. Esta condição ocorre quando o suprimento sanguíneo para os intestinos é inadequado, resultado de lesões que afetam uma ou mais das três artérias mesentéricas: a artéria celíaca (AC), a artéria mesentérica superior (AMS) e a artéria mesentérica inferior (AMI) (BYARD, 2012; LOFFROY et al., 2010; VOLLMAR; MENDER, 2011;).

A artéria mesentérica superior (AMS) é uma das ramificações da aorta abdominal considerada a principal via de aporte sanguíneo para o intestino, responsável pelo suprimento sanguíneo do pâncreas, intestino delgado e parte

do cólon. Nesse sentido, a obstrução desta artéria (AMS) está entre os eventos isquêmicos intestinais com maior capacidade lesiva para o organismo (BYARD, 2012; VOLLMAR; MENDER, 2011).

Nas últimas décadas, cerca de 60 a 80% das mortes ocorridas em hospitais são decorrentes de isquemia e reperfusão intestinal (BYARD, 2012; VOLMAR; MENDER, 2011). A Associação Americana de Gastroenterologia classifica Isquemia e reperfusão intestinal em três subgrupos de acordo com suas características: isquemia mesentérica aguda, isquemia mesentérica crônica e colite isquêmica. A perfusão sanguínea deficiente no intestino e sequelas associadas à hipóxia, como translocação bacteriana, inflamação local e sistêmica são características comuns destas enfermidades. No entanto, cerca de 85% dos casos de isquemia entérica (intestinal) são caracterizados como isquemia mesentérica aguda. (BYARD, 2012; VOLMAR; MENDER, 2011; STANILOAE, 2012).

Órgãos vitais como coração, cérebro, rim, fígado e pulmão são sensíveis às condições de hipóxia geradas por lesões isquêmicas. Podemos citar o pulmão como um dos principais órgãos alvo de isquemia e reperfusão (HALLDORSSON et al., 2000; HUDSON; STEINBERG, 1999; PARKS et al., 1982; SCHWARZ; ALBERT, 2004; SHERIDAN et al., 2008; VAN SOEREN et al., 2000). Alguns estudos experimentais e clínicos são compatíveis com a hipótese de que o pulmão esteja relacionado com a manutenção da resposta inflamatória no organismo (ABRAHAM, 2003; CHIUMELLO et al., 1999; MUEHLSTEDT et al., 2002).

A lesão pulmonar aguda (ALI- *Acute Lung Injury*) pode ocorrer por meio de um insulto direto no parênquima pulmonar resultante de pneumonia, aspiração-inalação gástrica ou indiretamente como resultado de uma resposta inflamatória sistêmica associada à isquemia e reperfusão intestinal. Nesse último caso, a lesão pulmonar aguda é agravada pelo fato deste órgão receber, após o débito cardíaco, todos os mediadores inflamatórios e espécies reativas do oxigênio liberadas durante o período isquêmico (DAO-FEN BEN et al., 2010; FELTES et al., 2012; REISS, et al., 2012).

A inflamação aguda no pulmão pode agravar, resultando na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (ARDS- *Acute Respiratory Distress Syndrome*), descrita como um processo inflamatório do parênquima pulmonar,

caracterizado principalmente por uma situação de hipoxemia grave acompanhada do acúmulo de neutrófilos e monócitos, além de um extravasamento eritrocítico e de proteínas plasmáticas. A evolução deste processo inflamatório em pacientes que desenvolveram a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo pode levar à falência múltipla de órgãos (HALLDORSSON et al., 2000; HASLETON; ROBERTS, 1999; HUDSON; STEINBERG, 1999; PARKS et al., 1982; SCHWARZ; ALBERT, 2004; SHERIDAN et al., 2008; VAN SOEREN et al., 2000).

Mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos, fragmentos do complemento, neuropeptídeos e fatores de crescimento, ocupam lugar de destaque na modulação desta reação (BERNARD et al., 1999; DE PERROT et al., 2003). Neste contexto, as células recrutadas para o pulmão liberam um amplo espectro de mediadores inflamatórios e de enzimas, desencadeando a reação inflamatória pulmonar propriamente dita (WAGNER et al., 2002; WHEELER et al., 1998).

Estudos indicam aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio pulmonar, durante a isquemia como evento fundamental para o recrutamento e ativação de neutrófilos. (CARDEN; GRANGER, 2000; DE PERROT et al., 2003; HASLETON; ROBERTS, 1999;). Moléculas de adesão como as P-selectinas, ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) e CD18 (β 2-integrina) quando bloqueadas durante a reperfusão, podem reduzir a injúria no pulmão (CONDLIFFE et al., 1996; HUGHES, et al., 2007; MINAMIYA et al., 1998). O bloqueio das E-selectinas e L-selectinas também pode ser benéfico após algumas horas de reperfusão quando os neutrófilos apresentam um papel preponderante na indução da injúria (REIGNIER et al., 1997).

1.4 Modelo Experimental

Atualmente, o protocolo de indução experimental de isquemia e reperfusão intestinal está bem estabelecido. Muitos modelos animais dentre os quais, suínos (HARKIN et al., 2001; TADROS et al., 2003), equinos (DARIEN et al., 1995) e roedores (FEINMAN et al., 2010; GIELIS et al., 2014) vem sendo utilizados para elucidar os mecanismos pelos quais ocorrem as lesões em resposta a isquemia e reperfusão. Em modelos murinos, a indução da

isquemia e reperfusão intestinal consiste na obstrução da artéria mesentérica superior durante 45 minutos (isquemia) seguida da liberação do fluxo sanguíneo (reperfusão). Como consequência, ocorre uma reação inflamatória sistêmica, proporcionando uma reatividade inflamatória pulmonar. Modelos utilizando ratos ou camundongos aumentaram nos últimos anos, visto às diversas condições favoráveis, tais como: baixo custo, variabilidade de linhagens e a disponibilidade de transgênicos e nocautes genéticos. Várias linhagens isogênicas são utilizadas para elucidar tais mecanismos, porém não são suficientes para podermos estrapolar estes mecanismos à população humana as quais apresentam uma constituição genética heterogênea.

O grupo de pesquisadores do laboratório de Imunogenética estuda há vários anos o controle genético da imunidade inata, especificamente da reação inflamatória aguda, por meio da utilização de linhagens heterogêneas de camundongo fenotipicamente selecionadas para a alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) reatividade inflamatória aguda à partícula de poliacrilamida (biogel) (BIOZZI et al., 1998; IBÁÑEZ et al., 1992, STIFFEL et al., 1990). Assim, é possível estudar nestas linhagens fenótipos complexos, multifatoriais, relacionados às doenças inflamatórias, infecciosas, auto-imunes e neoplasias.

Estas linhagens de camundongos diferem na capacidade de desenvolver resposta inflamatória aguda (AIR- Acute Inflammatory Response) em resposta à inoculação subcutânea de Biogel (gel de poliacrilamida, quimicamente inerte e não imunogênico) e apresentam também diferenças marcantes na susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções (ARAUJO et al., 1998; BORREGO et al., 2006), tumores (BIOZZI et al., 1998; MARIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005) na capacidade de reparo do DNA frente á efeitos genotóxicos (KATZ, 2012) e mielotoxicidade na medula óssea (Katz et al., 2014).

As linhagens AIRmax e AIRmin foram obtidas por Seleção Genética Bidirecional a partir de uma população geneticamente heterogênea (F0) constituída por cruzamentos equilibrados entre oito linhagens isogênicas (A/J, BALB/cJ, C57BL/6J, CBA/J, DBA/2J, P/J, SJL/J e SWR/J. Cada camundongo da F0 apresentava a combinação aleatória de 12,5% do pool dos genes das linhagens isogênicas parentais. A partir desta população F0, foram selecionados aqueles animais que apresentaram alta ou baixa reatividade

inflamatória aguda (AIR), segundo o número de leucócitos infiltrados e a concentração de proteínas extravasadas em resposta à injeção subcutânea de Biogel (IBAÑEZ et al., 1992; RIBEIRO, 1994; STIFFEL et al., 1990;) (**Figura 3**).

Figura 3– Demonstração esquemática da origem da população F0, a qual originou Seleção AIR (*Acute Inflammatory Response*)

FONTE: Baseado em IBAÑEZ et al., 1992.

Os acasalamentos dos animais escolhidos nos extremos de resposta alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) foram repetidos em gerações consecutivas, até ser atingido o limite máximo de separação entre as duas linhagens. A partir da vigésima geração de acasalamentos seletivos, observou-se a conservação dos fenótipos extremos nas gerações posteriores, indicando que os genes relacionados aos caracteres selecionadores fixaram-se em homozigose em cada linhagem, contudo, o fundo genético heterogêneo foi mantido (BIOZZI et al., 1998; RIBEIRO, 1994).

Durante o processo seletivo houve aumento progressivo da diferença fenotípica entre as duas linhagens AIR indicando que este caráter é quantitativamente regulado pela interação aditiva de vários genes que segregam independentemente e cujos alelos de efeito de alta ou de baixa

reatividade inflamatória foram acumulados progressivamente durante o processo de seleção. Por métodos de genética quantitativa foi estimada a participação de 7 a 12 loci gênicos independentes (BIOZZI et al., 1998; IBÁÑEZ et al., 1992) (**Figura 4**).

Figura 4 - Gráfico representativo da divergência entre as linhagens AIR com relação o número de células infiltradas e extravasamento proteico no local de aplicação ao biogel.

Fonte : Modificado de BIOZZI et al., 1998

A diferença fenotípica entre as duas linhagens deu-se, sobretudo, no número médio de leucócitos migrantes ao sítio de injeção do Biogel, tendo como células predominantes os neutrófilos. Essa diferença foi aproximadamente de 20 vezes a favor dos camundongos AIRmax. Análises quantitativas recentes da resposta inflamatória na geração F65 demonstraram a conservação da diferença fenotípica entre as duas linhagens. O número elevado de neutrófilos encontrado no exsudato dos camundongos AIRmax tratados com Biogel é decorrente da convergência de três fatores principais: (i) maior capacidade da medula óssea em produzir neutrófilos maduros; (ii) maior produção de fatores quimiotáticos pelas células residentes ou infiltradas e (iii) maior resistência a apoptose das células do exsudato (RIBEIRO et al., 2003).

Assim, o objetivo deste estudo foi o de ampliar a caracterização dos mecanismos que regulam a inflamação aguda local ou sistêmica produzida pela indução de hipóxia após isquemia e reperfusão intestinal utilizando como

modelo experimental as linhagens AIR. Neste sentido, avaliamos a participação do fator de transcrição HIF-1 α , proteínas pro- e anti-inflamatórias bem como uma possível translocação bacteriana decorrente da hipóxia.

A nossa hipótese é a de que genes expressos em condições de hipóxia interfiram ou mesmo modulam as reações inflamatórias locais ou sistêmicas neste modelo animal.

2 Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar os mecanismos que regulam a inflamação aguda sistêmica produzida pela indução de hipóxia após isquemia e reperfusão intestinal e avaliar a participação do fator de transcrição HIF-1 α na modulação da reação inflamatória aguda.

2.2 Estratégias Experimentais

- i) Cinética da Reação inflamatória Aguda após I/R: avaliação dos leucócitos da circulação periférica; avaliação das células infiltradas no intestino e pulmão.
- ii) Avaliação de mecanismos fisiopatológicos que envolvam as lesões proporcionadas pela I/R intestinal: microcirculação; translocação bacteriana.
- iii) Avaliação dos genes de citocinas inflamatórias, como também genes expressos em condições de hipóxia, no intestino e pulmão.
- iv) Análises qualitativas e quantitativas das proteínas expressas no pulmão, Identificação por Western blotting ou Citometria de Fluxo do HIF- 1 α .

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Camundongos AIRmax e AIRmin, machos de 8 a 12 semanas de idade, mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan em condições padrões, recebendo dieta de camundongo Nuvital® e água *ad libitum*. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética Experimentação Animal do ICB/USP (Protocolo nº 039/2010) e Instituto Butantan. (Protocolo nº 751/10).

3.2 Indução da Isquemia e Reperfusão Intestinal (I/R)

Os animais foram anestesiados com a associação de Quetamina e Xilazina nas doses de 10 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente. Após laparotomia mediana e desvicerização, foi realizada a obstrução da artéria mesentérica por 45 minutos com oclusor vascular “Vascu Satt” nº 1001-531 (Scalan Internat, Minn, USA). Após o período isquêmico (45 minutos), a pinça vascular foi retirada para a restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão). A incisão mediana foi suturada e foi injetado 1 mL de salina estéril subcutaneamente para re-hidratação. Após tempos variados da reperfusão (0, 1, 4 e 24 horas), os animais foram anestesiados e mortos por dessangramento da aorta abdominal e a reação inflamatória local e sistêmica foi avaliada. Os grupos controles constituíram de animais falso-operados e não manipulados (basais). Os procedimentos realizados após anestesia, nos animais falso operados foram: laparotomia e devicerização. As análises destes animais foram realizadas de acordo com o tempo de reperfusão estipulado para os animais isquêmicos.

3.2.1 Perfusão pulmonar

Para avaliar a resposta inflamatória pulmonar, os animais foram previamente anestesiados e o leito pulmonar dos animais foi perfundido com 10 mL/minuto de PBS através do ventrículo direito atingindo a artéria pulmonar. Como resultado da perfusão, o sangue circulante nos pulmões é expelido, o qual é observado pela coloração branca ao final do procedimento. Assim

podemos restringir a análise às células residentes do parênquima e as células infiltradas no pulmão.

3.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Após a indução da isquemia e reperfusão, o pulmão perfundido e íleo terminal foram retirados, lavados em PBS e homogeneizados (Politron-BRINCKMAN) por 40 segundos em 1 mL de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB), a 0,5%, em EDTA (10 mM). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g, durante 10 minutos a 4 °C. A atividade de MPO foi determinada no sobrenadante.

O ensaio de MPO foi conduzido em placa de 96 poços, na qual foram adicionados 10 µL da amostra em duplicata e 200 µL de tampão substrato, constituído de: tampão fosfato a 50 mM, pH 6.0, peróxido de hidrogênio a 0,1%, orto-dianisidina 1,3% em H₂O. Após 5 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 50 µL de solução de azida sódica, a 1,3% em H₂O. Os valores de atividade de MPO foram expressos pelo valor das absorbâncias, obtidas a 450 nm em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments).

3.4 Obtenção das células do sangue

Amostras de sangue foram colhidas do plexo retro orbital por meio de pipeta Pasteur embebida em citrato de sódio a 3% (3 g de citrato de sódio anidro, 1 mL de solução de formaldeído comercial 37%, 100 mL de água destilada). O número de leucócitos foi determinado em câmara hemocitométrica (Malassez) com diluição na proporção de 1:20 em Azul de Metileno 1% em ácido acético a 1%.

3.5 Contagem diferencial dos leucócitos

Os diversos tipos celulares presentes na circulação periférica foram determinados por meio da coloração em lâminas. Uma gota de sangue (25 µL) foi colocada sobre a lâmina e com o auxílio da borda de outra lâmina fazendo um ângulo de 45° graus foi feita uma extensão sanguínea seguidamente corada

com Panótipo (Laborclin®). Com auxílio de microscopia óptica foram contadas no mínimo 200 células para cada amostra. A contagem diferencial dos leucócitos foi expressa em valores absolutos (leucócito/mm³ de sangue).

3.6 Expressão Gênica por PCR em Tempo Real (Real Time PCR)

3.6.1 Extração de RNA Total

Aproximadamente 100 mg do tecido pulmonar e intestinal (íleo terminal) de cada animal foi retirado e picotado em 1 mL de Trizol (Invitrogen). As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio (MERCK) para cada 1 mL de Trizol. As amostras foram submetidas à agitação e então centrifugadas por 15 minutos a 12000 x g. O sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo eppendorf e o RNA precipitado em 0,5 mL de álcool isopropílico (MERCK) para cada 1 mL de Trizol. A mistura da solução foi feita por inversão após a incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, em seguida centrifugou-se a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado de RNA foi lavado por 5 minutos a 7500 x g com 1 mL de etanol a 75% gelado para cada 1 mL de Trizol. Após a secagem, adicionou-se 50 µL de água livre de RNase para dissolver o precipitado. A concentração do RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro (260/280 nm) e a integridade ou a qualidade das preparações foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE seguida por coloração com brometo de etídeo. O material foi estocado a -80 °C até o processamento para a obtenção de cDNA.

3.6.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada por transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para tanto, 10 µL contendo 1 µg de RNA foram adicionados a 1 µL de oligo (dT) (50 mM), 2 µL de água livre de RNase e 1 µL de dNTP 10 mM (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados). As amostras foram homogeneizadas e incubados por 5 minutos a 65 °C. Após o período de incubação adicionou-se,

4 μL de tampão específico 5x concentrado (250 mM Tris- HCL pH 8,3; 375 mM KCL e 15 mM MgCl_2), 1 μL de DTT 0,1 M (dithiothreitol) e 1 μL da enzima SuperScript (200 U/mL) (Invitrogen). As amostras foram incubadas em aparelhos termocicladores a 50 °C por 50 minutos e a reação foi bloqueada por uma incubação de 15 minutos a 70 °C.

3.6.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-Time PCR)

Para cada amostra de 2 μL do cDNA (diluição 1:2) foi adicionada uma solução contendo as sequências sintéticas específicas ou *primers* a 5 μM (1 μL de cada *primer*); 12,5 μL do Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen), e água livre de RNA para ajustar o volume final de reação em 25 μL por tubo.

As reações foram incubadas no termociclador PT-200 (MJ Research, Inc. Watertown, MA, EUA) e submetidas inicialmente a uma fase de ativação da enzima polimerase a 95 °C por 15 min. (“hot start”). A amplificação das sequências alvo ocorreu em 50 ciclos constituídos de etapas sucessivas de desnaturação (95 °C por 20 segundos), anelamento (55 °C por 20 segundos) e extensão (72 °C por 1 min). A fluorescência do SYBR Green incorporada ao material dupla fita amplificado a cada ciclo foi detectada na etapa de extensão pelo aparelho Chromo 4 (MJ Research, Inc. Watertown, MA, EUA).

Os resultados foram analisados no programa “Opticon Monitor Analysis Software 2.03” e a cada amostra foi atribuído um valor de CT (“Cycle Threshold”) referente ao número de ciclos necessários para que a fluorescência incorporada às duplas fitas amplificadas ultrapasse a fluorescência de fundo das reações, ou seja, no início da fase Log de amplificação das sequências alvo.

3.6.4 Cálculo da expressão relativa

A expressão dos genes estudados foi estimada por meio do método comparativo do *Cycle Threshold* (cT).

Tabela 1- Sequência dos primers utilizados na reação de qPCR

Gene	Primer (5'-3')
<i>Ciclofilina</i>	F: AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT R: AAATGCCCCGCAAGTCAAAAG
<i>β₂ microglobulina,</i>	F: TAGCCGGCTTGTATGCTATC R: GAGTGTGAGCCAGGATATAG
<i>Gapdh</i>	F: AGACGGCCGCATCTTCTTGTGC R: TACGGCCAAATCCGTTACACCG
<i>Rps29</i>	F: TCTACTGGAGTCACCCACGGAAGT R: GTCAGTCGAATCCATTCAAGGTCGC
<i>Hif1a</i>	F: TATGGAGGCCAGAAGAGGGTAT R: CCCACATCAGGTGGCTCATAA
<i>Hif1b (Arnt)</i>	F: TGGCTCCTACAAGCCATCTT R: CATAACCACCCGTCCAGT
<i>Vhl</i>	F: GCAAAGCTTCAGTCCCTCCT R: AACAAGGCCTGAGCTTCAT
<i>Vegfa</i>	F: GTCCCATGAAGTGATCAAGTTCA R: ATCCGCATGATCTGCATGG
<i>Il1b</i>	F: TTGACGGACCCCAAAAGATG R: AGAAGGTGCTCATGTCTCTCA
<i>Il6</i>	F: GTTCTCTGGGAAATCGTGGA R: TGTACTCCAGGTAGCTATGG
<i>Il10</i>	F: ATGAAGGACTTTAAGGGTACTTG R: TAGACACCTTGGCTTGGAGCTTA
<i>Tnfa</i>	F: TCTCATCAGTTCTATGGCCC R: GGGAGTAGACAAGGTACAAC
<i>Ifng</i>	F: GCTCTGAGACCATGAACGCT R: AAAGAGATAATCTGGCTCTGC
<i>Tgfb1</i>	F: ACCGCAACAACGCCATCTAT R: GTAACGCCAGGAATTGTTGC
<i>Cox2</i>	F: ACACACTCTATCACTGGCACC R: TTCAGGGAGAAGCGTTTCC
<i>Icam1</i>	F: CACGCTACCTCTGCTCCTG R: AAGGCTTCTCTGGGATGGAT

Pequenas variações relativas às diferenças na quantidade do RNA total dos genes alvo foram corrigidas por normalização. Para normalização dos genes alvos foram testados quatro genes constitutivos sendo eles: *β*2 microglobulina (*B₂m*), Gliceraldeído -3- fosfato desidrogenase (*Gapdh*) *Ciclofilina* e *Proteína Ribossomal S 29* (*Rps29*). No entanto, os genes constitutivos que se adequaram para as análises do intestino e pulmão foram a *Ciclofilina* e a *Beta 2 microglobulina*, respectivamente. Pelos valores do *Cycle Threshold* (cT) calculou-se o Delta cT (ΔcT) para cada amostra de cDNA, que consiste na diferença entre o cT do gene de interesse e do gene constitutivo ($\Delta cT = cT_{\text{gene alvo}} - cT_{\text{gene constitutivo}}$). A expressão dos genes entre vários grupos experimentais foi determinada pela comparação entre o ΔcT das amostras em diferentes condições experimentais e o ΔcT do grupo controle (calibrador): $\Delta \Delta cT = \Delta cT_{\text{teste}} - \Delta cT_{\text{calibrador}}$: a expressão relativa, portanto, é igual $2^{-\Delta \Delta cT}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Como calibrador utilizamos o valor da média dos ΔcT dos animais AIRmin basais para todas as condições.

3.7 Citometria de fluxo para identificação das células Ly6G⁺CD11b⁺HIF-1 α ⁺

3.7.1 Extração das células do pulmão por collagenase

Após indução de 45' de isquemia e 2 horas de reperfusão os pulmões foram perfundidos, segundo item "3.2.1 Perfusão pulmonar". Em seguida os pulmões foram picotados e incubados com 3 mL de collagenase (1 A SIGMA) a 0,25 mg/mL em placa de Petri de 35 mm de diâmetro por 45 minutos à 37°C. A atividade da collagenase foi bloqueada com 1 mL de PBS com 20% de SBF (soro bovino fetal). O tecido pulmonar foi lavado por 5 vezes com PBS 20% e as suspensões celulares foram centrifugadas a 250 x g em 10 mL de PBS 20% SBF. O precipitado celular foi ressuspensionado em 1 mL de PBS 2% SBF. Para determinar a concentração de células viáveis uma alíquota da suspensão foi utilizada na contagem por exclusão com azul de tripan 1% em câmara hemocitométrica de Malassez. Os resultados foram expressos como células por mL.

3.7.2 Marcação extracelular com anti- Ly6G e anti- CD11b

Alíquotas de 100 μ L das suspensões (10^7 células/mL) foram incubadas com anticorpo bloqueador da porção Fc CD16/CD32 (Fc γ III/II clone :93) por 10 minutos a 4 °C. Em seguida as suspensões celulares foram marcadas com anticorpos monoclonais dirigidos contra: granulócitos-Ly-6G (GR-1, clone: RB6) e receptor da cadeia α de Mac-1 CD11b (clone: Mi/70), marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e alofococianina (APC), respectivamente. Como isótipos controles foram utilizados: IgG2b de rato (clone: A95-1) marcado com FITC ou APC. Os anticorpos utilizados para marcação extracelular foram obtidos da PharMingen.

3.7.3 Marcação intracelular com anti- HIF 1- α

Após marcar as moléculas de superfície celular com anti- Ly6G e anti- CD11b, as células foram fixadas adicionando à suspensão 0,5 mL de paraformaldeído a 4% por 10 minutos. Para permeabilização, as suspensões foram centrifugadas a 250 x g e as células ressuspendidas em 2 mL de saponina a 0,05%. Em seguida, foi realizada a marcação intracelular com o anticorpo monoclonal dirigido contra o Fator de Transcrição HIF 1- α (R&D Systems), marcado com ficoeritrina (PE). Como isótipos controles foram utilizados: IgG2b de rato (clone: A95-1) marcado com PE.

O registro de 10000 células foi adotado utilizando o FACS Canto II e as análises foram obtidas com auxílio do programa Flow Jo[®] (Becton-Dickinson).

3.8 Quantificação do conteúdo proteico total das células do pulmão

Os pulmões dos animais dos grupos basal, falso operado e isquêmico de ambas as linhagens foram submetidos ao processo de extração proteica por meio da lise celular com tampão contendo 8M de ureia, 4% de CHAPS, 40 mM de Tris base e 40 mL de H₂O destilada). O lisado obtido foi submetido à centrifugação a 12500 g por 10 minutos e os sobrenadantes foram congelados a -80 °C. A concentração proteica foi determinada pela técnica de Ácido Bincicônico (BCA), utilizando placa de 96 poços. Foram adicionados 25 μ L das

amostras ou 25 µL de Albumina Sérica Bovina (BSA) 1000 µg/mL para determinar a curva Padrão, as quais foram respectivamente diluídas em série (Log 2). Após adição dos reagentes a placa foi transferida para a estufa à 37°C e incubada por 30 minutos. Decorrido este tempo, as densidades óticas das amostras foram determinadas a 520 nm (Labsystem). Baseado na curva padrão foi determinado a concentração proteica das amostras.

3.8.1 Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em duas dimensões (Gel-2D)

As amostras de proteínas obtidas dos pulmões dos animais AIRmax e AIRmin referentes aos grupos experimentais e controles, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (BioRad) e aplicadas de 40 µg a 100 µg (de acordo com a concentração de proteína obtida), ao terminal catódico de membranas de gel de gradiente imobilizado de pH (immobilized pH gradient gel IPG, (GE Healthcare Life Sciences) na faixa de pH 3 a 10. As fitas foram reidratadas por 18 horas à temperatura ambiente, utilizando tampão de reidratação (8M de uréia, 1M de DTT, 2% de CHAPS e 0,5% de tampão IPG) e a eletro-focalização foi realizada por 18-20 h a 32000 Vh, utilizando uma unidade IPGphor (Amersham bioscience®). Em seguida, os géis foram equilibrados por 10 minutos em tampão contendo: 2% de SDS, 50 mM de TRIS-HCl pH 8,8, 6M de UREIA, 30% de glicerol, 0,01% azul de Bromofenol e 100 mg DTT (Dithiothreitol) e por mais 10 minutos em tampão contendo: 2% de SDS, 50 mM de TRIS-HCl pH 8,8, 6M de UREIA, 30% de glicerol, 0,01% azul de Bromofenol e 250mg de iodoacetamida. Para a eletroforese em segunda dimensão, as fitas foram colocadas sobre o gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12,5% em unidade de eletroforese ETTAN DALTsix (GE Healthcare Life Sciences) o qual foi submetido a uma corrente elétrica de 600 V 30 mA por 1h e em seguida 600 V 80mA por aproximadamente 3hs.

3.8.2 Coloração dos géis de proteína com nitrato de prata

Os géis foram fixados *overnight* com 50% de metanol 12% de ácido acético e formaldeído 37% *overnight*. Após a fixação, os géis foram lavados com uma solução de 30% de etanol durante 1 minuto no forno de micro-ondas e mantidos sob agitação constante à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, os géis foram sensibilizados por 1 minuto no forno de micro-ondas com uma solução de 0,02% de tiosulfato de sódio e agitados à temperatura ambiente por 2 minutos. Após a sensibilização, os géis foram lavados 2x com água destilada e incubados em 0,2% de nitrato de prata por 30 segundos em forno de micro-ondas e 5 minutos no agitador à temperatura ambiente. Lava-se novamente com água destilada e acrescenta-se uma solução reveladora contendo 0,05% de formaldeído e 3% de carbonato de sódio. Por fim, a reação foi interrompida com 12% de ácido acético e 50% de metanol. As imagens dos géis foram obtidas no ImageScanner III (GE Healthcare) e estas foram analisadas no programa de análise ImageMaster 6.0®.

Aqueles *spots* que apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas entre os géis 2D de AIRmax e AIRmin foram extraídos e digeridos com tripsina para a realização do sequenciamento por Espectrometria de Massas. Esta análise foi realizada no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), sob a coordenação da Dra. Adriana Franco Paes Leme.

3.9 Microscopia Intravital

As interações leucócito-endotélio foram avaliadas por meio do ensaio de microscopia intravital. Após a indução da isquemia por 45 minutos seguidas de tempos variados de reperfusão (30 minutos, 1 e 2 horas) os camundongos foram anestesiados com uma associação de Cloridrato de Quetamina e Xilazina (de 10 mg/kg e 100 mg/kg respectivamente). Anestesiados, os camundongos foram submetidos a uma laparotomia mediana expondo o mesentério. A preparação foi mantida sobre uma placa com temperatura controlada (37 °C), dotada de uma área transparente, através da qual o leito

microvascular foi visualizado (BAEZ et al., 1973). O mesentério exposto foi mantido úmido e aquecido por irrigação com solução tampão de Ringer-Locke, a 37 °C, em fluxo de 2 mL/min. Esta preparação foi montada em um microscópio (Zeiss Axioskop) equipado com uma câmera para captação de imagens (JVC TK-C600). As imagens foram transmitidas a um aparelho de televisão ligado a um gravador de vídeo, e a um computador provido de um programa de análise de imagens (KONTRON, KS 300).

Uma a três vênulas pós-capilares foram selecionadas aleatoriamente (diâmetros entre 20-40 μm , e comprimento de, pelo menos, 100 μm) foram observadas em cada animal.

Foram avaliados o rolamento dos leucócitos e a adesão ao endotélio vascular. Os leucócitos em rolamento foram contados durante um período de 3 minutos. Consideramos leucócitos aderidos os que estavam estagnados por um tempo maior que 30 segundos ao longo dos 100 μm do vaso. Os resultados foram expressos pela média de células contadas.

3.10 Translocação Bacteriana

Após a indução da I/R intestinal em condições estéreis, os animais foram anestesiados e submetidos a uma laparotomia mediana. Em seguida foram coletados os linfonodos mesentéricos e o baço. Após a pesagem dos órgãos estes foram macerados em homogeneizadores teciduais em um volume de 500 μL de tampão fosfato estéril pH 7,2. Alíquotas de 100 μL foram semeadas em duplicata, em placas de Petri (15x100 mm) contendo meio de cultura ágar MacConkey ou ágar Sangue. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida foi realizada a contagem das colônias bacterianas crescidas nas placas, a identificação das colônias por meio de coloração de Gram e identificação bioquímica (lactose, glicose gás, urase triptofano desaminase, lisina descarboxilase, indol, citrato e motilidade). A identificação das colônias e as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan em colaboração com a Dra. Márcia Regina Franzolin.

3.11 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média dos valores $\pm$ erro padrão. A análise de significância entre as médias foi realizada pelo teste paramétrico ANOVA. Diferenças com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Cinética dos leucócitos da circulação periférica

O processo de seleção das linhagens AIRmax e AIRmin, cujo objetivo foi selecionar fenótipos extremos de alta ou baixa resposta inflamatória aguda local, propiciou a obtenção de linhagens de camundongos com diferença fenotípica de aproximadamente 20 vezes para o número de leucócitos infiltrados e 2,5 vezes para concentração de proteínas extravasadas ao local da injeção de Biogel P-100 (BIOZZI et al.,1998). Este nível de diferença entre as linhagens vem sendo mantido nas gerações subsequentes à 30ª geração em decorrência da manutenção dos acasalamentos seletivos ao longo de 65 gerações.

Com objetivo de avaliar se essa divergência inflamatória entre as linhagens AIRmax e AIRmin observada após um estímulo local ao Biogel poderia também ser encontrada após a indução de hipóxia, nós avaliamos o desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica após a indução de 45 minutos de hipóxia seguida de tempos variados de reperfusão entre 0 e 24 horas.

Inicialmente avaliamos o número de leucócitos presentes na circulação periférica após I/Ri. Na **figura 5A** observamos uma diminuição acentuada e significativa ($p<0,05$) da concentração leucocitária logo após o término do período isquêmico (0h) nos camundongos AIRmax I/Ri como também nos AIRmax falso operados (FO). Por outro lado, os camundongos AIRmin não apresentaram alterações após ter decorrido este período (0h). A partir do momento em que o fluxo sanguíneo foi restituído pela desobstrução da artéria mesentérica superior houve um aumento progressivo do número de leucócitos circulantes nas duas linhagens, atingindo valores máximos em 1 h (AIRmin) e 4 horas (AIRmax), apresentando, neste último período, uma diferença entre as linhagens AIRmax e AIRmin altamente significativa ($p<0,001$). Foi observado uma diferença significativa ($p<0,05$) intra-linhagem (IR x FO) nos animais AIRmin, devido ao aumento do número de células dos camundongos submetidos à I/Ri em 1 hora após a reperfusão. Às 24 horas após a reperfusão em ambas as linhagens foram observados níveis basais de celularidade.

Após traçar o perfil leucocitário na circulação periférica frente a I/R intestinal, nós avaliamos morfolologicamente estes leucócitos. Apesar de não

existir uma diferença significativa no número totais de leucócitos entre os camundongos isquêmicos e falso operados da linhagem AIRmax, foi possível observar no período de 4 horas uma diferença significativa no número de neutrófilos ($p < 0,005$) entre os grupos I/Ri, falso operados e basais. (**Figura 5B**). Foi observado também um maior número de neutrófilos ($p < 0,05$) na circulação periférica dos camundongos AIRmax quando comparados aos AIRmin. Neste sentido, podemos afirmar que houve uma mudança no tipo celular presente na circulação dos camundongos AIRmax submetidos a uma condição de hipóxia, sendo a população neutrofílica responsável por cerca de 60% dos leucócitos totais.

FIGURA 5 - Perfil temporal dos leucócitos da circulação periférica

Leucócitos totais (**A**) e Neutrófilos (**B**) presentes na circulação de camundongos AIRmax e AIRmin após 45 minutos de isquemia seguidos por 0, 1, 4 e 24 horas de reperusão. (*) diferença entre AIRmax e AIRmin (inter-linhagem) (#) diferença entre I/R e demais controles (intra-linhagem); (α) diferença entre o grupo experimental e o grupo Basal (não manipulado).

4.2 Efeito da isquemia e reperfusão nas alterações de interações leucócito-endotélio na microcirculação do mesentério de camundongos AIRmax e AIRmin.

A isquemia e reperfusão está associada às alterações microvasculares caracterizadas pela dilatação das arteríolas, tráfico de leucócitos e extravasamento proteico das vênulas pós-capilares. Com o objetivo de avaliar as possíveis variações nos eventos inflamatórios que precedem a migração leucocitária após a indução de hipóxia, avaliamos o processo de rolamento e de adesão das células inflamatórias às vênulas mesentéricas após 45 minutos de isquemia seguidas de 30 minutos, 1 hora e 2 horas de reperfusão. Assim, através da microscopia intravital do mesentério, pudemos visualizar e analisar a microcirculação e a dinâmica das células em processo de quimiotaxia.

Na **figura 6**, estão mostrados os resultados do número de células em rolamento ou aderidas ao endotélio vascular. Observamos um maior número de células em rolamento nos camundongos AIRmin em condições basais ($p < 0.05$) quando comparados aos AIRmax. Aos 30 minutos de reperfusão o índice de adesão celular foi equivalente em ambas as linhagens, tanto no grupo isquêmico como no falso operado.

Após 1 hora de reperfusão o nível de rolamento celular nos camundongos AIRmin I/Ri foi significativamente maior ($p < 0.001$) quando comparados aos AIRmax I/Ri. No entanto, ao avaliar as células aderidas neste período observamos um aumento expressivo (4 vezes) nos camundongos AIRmax I/Ri ($p < 0,001$) quando comparados aos seus controles intra-linhagem, como também quando avaliados junto aos animais AIRmin I/Ri. Em duas horas após a reperfusão nós observamos que as células dos camundongos AIRmin I/Ri reduziram o nível de rolamento celular, quando comparados aos seus respectivos valores em 1 hora.

Nos períodos avaliados foi evidenciado maior número de células em rolamento no epitélio vascular mesentérico dos camundongos AIRmin, enquanto que a adesão celular nesta linhagem não sofreu variações durante os períodos avaliados. Já os Camundongos AIRmax não apresentaram alterações significantes no rolamento celular entre os períodos de reperfusão (30', 1h e 2h). Por outro lado, foram evidenciadas variações na taxa de adesão celular,

as quais demonstraram um aumento significativo em 1 hora seguida de redução em 2 horas após a restituição do fluxo sanguíneo.

FIGURA 6 - Interações leucócito endotélio na microcirculação: Rolamento e Adesão.

Camundongos AIRmax e AIRmin em condições basais, falsos operados, e I/R (30', 1h e 2h) foram analisados por microscopia intravital. Vênulas com diâmetro de 20-40 μm foram analisadas por 3 minutos. (*) diferença entre AIRmax e AIRmin (inter-linhagem), (#) diferença entre I/R e demais controles (intra-linhagem);(α) diferença entre o grupo experimental e o grupo Basal (não manipulado).

4.3 Avaliação da resposta inflamatória local à I/R intestinal

4.3.1 Atividade da Mieloperoxidase no intestino (íleo terminal)

Antes de avaliar a inflamação pulmonar como alvo remoto dos efeitos da isquemia e reperfusão intestinal, nós avaliamos o desenvolvimento da reação inflamatória à hipóxia no local da obstrução do fluxo sanguíneo. Neste sentido, sabendo que a isquemia e reperfusão induziu um aumento da população neutrófilos na circulação, avaliamos, por meio da atividade da mieloperoxidase, o infiltrado inflamatório no intestino. Dentre os períodos avaliados no experimento anterior nós escolhemos o tempo de 4 horas de reperfusão, o qual apresentou um maior número de neutrófilos na circulação. Para tanto, foi quantificada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), como medida indireta de infiltrado neutrofílico, uma vez que esta enzima está estocada, em sua forma inativa, nos grânulos destas células. Todavia, a MPO também está presente, mas em menor quantidade nos monócitos, os quais cessam sua produção durante o processo de maturação para macrófago. (BORREGARD, et al., 1982; DALLEGRI; OTTONELLO, 1997).

Utilizando um fragmento de aproximadamente 4 cm do íleo terminal avaliamos atividade da mieloperoxidase (MPO). Observamos um aumento desta enzima no íleo terminal dos camundongos AIRmax submetidos a isquemia e reperfusão, o qual não foi observado nos camundongos controles desta mesma linhagem (basal e FO). Já os camundongos AIRmin não demonstraram alterações significativas, na atividade da MPO (**Figura 7**).

Figura 7 - Atividade da mieloperoxidase no íleo terminal.

Atividade da mieloperoxidase no íleo terminal de camundongos AIRmax e AIRmin após 45 minutos de isquemia seguidos por 4 horas de reperfusão. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão de 4 animais/grupo. (*) diferença entre AIRmax e AIRmin (inter-linhagem), (#) diferença entre I/R e demais controles (intra-linhagem); (α) diferença entre o grupo experimental e o grupo Basal (não manipulado).

4.3.2 Avaliação da expressão dos genes envolvidos em condição de hipóxia e de inflamação aguda no intestino

Para dar continuidade à avaliação local da inflamação após a indução de hipóxia, nós avaliamos a expressão de alguns genes sabidamente envolvidos na modulação da resposta inflamatória aguda (*Hif1a*, *Hif1b*, *Vhl*, *Il6*, *Il1b*, *Il10*, *Cox2* e *Icam1*). Inicialmente foram testados quatro genes para a escolha do melhor gene a ser utilizado como constitutivo na reação de PCR: β_2 microglobulina, Ciclofilina, *Gapdh* e *Rps29*. O gene codificador da Ciclofilina foi o que mais se adequou ao intestino. Como linha de corte para expressão gênica nós utilizamos somente as reações que apresentaram o valor de *cT* (*cycle Threshold*) inferior a 35 (*cut off 35*).

Na **figura 8** estão representados os valores de variação de expressão gênica relativa ($2^{\Delta\Delta CT}$). As diferenças inter-linhagens e intra-linhagens encontradas foram resultados de ativação ou supressão gênica em relação ao perfil do calibrador (AIRmin basal).

Ao avaliar os níveis de expressão do complexo gênico do *Hif1a*, o qual compreende o translocador nuclear *Hif1b* (*Arnt*) e o regulador negativo *Vhl*, nós observamos uma maior expressão do gene codificador da proteína Von Hippel Lindau (*Vhl*) nos camundongos AIRmax basais, os quais estariam em situação de normóxia. Quanto aos genes *Hif1a* e *Hif1b* nós não observamos mudanças significativas relacionadas à ativação ou repressão gênica nas linhagens AIRmax e AIRmin.

Durante a análise dos genes que codificam as citocinas envolvidas na resposta inflamatória aguda, nós observamos uma expressão elevada do gene *Il6* nos camundongos isquêmicos de ambas as linhagens quando comparados com seus controles falsos operados e basais. O gene *Tnfa* apresentou um aumento significativo da sua expressão nos animais AIRmax quando comparado ao seu controle falso operado. Já o gene *Tgfb* não apresentou diferenças significativa entre os grupos experimentais avaliados. Os genes dos mediadores inflamatórios *Il1b*, *Il10* e da *Cox2* apresentaram sua expressão acima de 35 ciclos, portanto não considerados na análise.

Sabendo que há uma maior migração leucocitária ao intestino (íleo terminal) dos camundongos AIRmax isquêmicos nós avaliamos o gene *Icam1*,

que codifica a molécula de adesão da superfamília das imunoglobulinas a qual interage com as integrinas presentes nos leucócitos. Nós observamos, uma ativação significativa deste gene nos camundongos AIRmax I/Ri, quando comparado ao seu grupo controle (FO) ou à linhagem AIRmin I/Ri.

Figura 8 - Genes inflamatórios expressos em condições de Hipóxia no íleo terminal dos Camundongos AIRmax e AIRmin.

Expressão gênica relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) do íleo terminal em camundongos AIRmax e AIRmin após 45 minutos de isquemia seguidos por 4 horas de reperfusão. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão de 3 animais/grupo. (*) diferença entre AIRmax e AIRmin (inter-linhagem), (#) diferença entre I/R e demais controles (intra-linhagem); (α) diferença entre o grupo experimental e o grupo Basal (não manipulado).

4.3.3 Translocação Bacteriana

Disfunções na microcirculação são determinantes para manifestação e propagação da isquemia e reperfusão intestinal. Eventos característicos como falência da perfusão nutritiva, resposta inflamatória, comprometimento da função da barreira epitelial com translocação bacteriana podem levar a uma inflamação sistêmica agravando a injúria local e afetando órgãos à distância.

Neste sentido, avaliamos a translocação de bactérias do trato gastrointestinal para os linfonodos mesentéricos (LNMs) e baço nos camundongos AIRmax e AIRmin submetidos ao procedimento de isquemia seguido de 4 horas de reperfusão e seus respectivos controles FO e basal.

O baço e linfonodos mesentéricos desses animais foram macerados e plaqueados em Ágar Sangue ou Ágar MacConkey para a identificação de enterobactérias. As placas foram então cultivadas por 24 horas e analisadas quanto ao número e característica das colônias. Após análise, observamos um maior número de unidades formadoras de colônias (CFU) nas culturas dos linfonodos mesentéricos ($p < 0,05$) e baço oriundos dos animais isquêmicos AIRmax quando comparados aos seus controles falso operado e basal ou, ainda, aos animais AIRmin isquêmicos nas mesmas condições experimentais (**Figura 9**).

Testes microbiológicos e bioquímicos das colônias encontradas nos grupos I/Ri revelaram cinco espécies de enterobactérias gram negativas presentes na microbiota do trato gastrointestinal: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia sp* e *Staphylococcus* (**Tabela 1**). Dentre as cinco espécies identificadas, *Klebsiella pneumoniae* e *Providencia sp* mostraram-se ausentes nos LNMs e baço dos camundongos AIRmax. Já nos camundongos AIRmin apenas *Proteus mirabilis* esteve ausente.

Ao avaliar a proporção das colônias das espécies bacterianas translocadas, verificamos uma predominância da espécie *Escherichia coli* em ambas as linhagens, representando 66% nos LNMs e 9% no baço dos camundongos AIRmax e 50% nos LNMs e 16% no baço dos camundongos AIRmin.

Figura 9 - Translocação Bacteriana: Unidades Formadoras de Colônias

Número de unidades formadoras de colônias por órgão: Homogenatos dos LNN e baço cultivadas em ágar Sangue ou MacConkey. (*) diferença entre AIRmax e AIRmin (inter-linhagem), (#) diferença entre I/R e demais controles (intra-linhagem); (α) diferença entre o grupo experimental e o grupo Basal (não manipulado).

Tabela 2- Identificação das colônias em Linfonodos e baço de AIRmax e AIRmin submetidos à I/Ri.

Bactérias	AIRmax		AIRmin	
	LNMs	Baço	LNMs	Baço
<i>Escherichia coli</i>	66%	69%	50%	16,6%
<i>Proteus mirabilis</i>	34%	1%	ausente	ausente
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ausente	ausente	9%	33,3%
<i>Providencia sp</i>	ausente	ausente	12%	50%
<i>Staphylococcus</i>	ausente	29%	28%	ausente

Identificação das colônias presentes no LNM e baço por análises bioquímicas e de Gram. Resultados expressos em porcentagens.

4.4 Avaliação da resposta inflamatória sistêmica pulmonar

4.4.1 Cinética da atividade da Mieloperoxidase no pulmão

Diante do divergente perfil inflamatório observado entre as duas linhagens no local da indução da isquemia e reperfusão, evidenciado pela expressão gênica de citocinas inflamatórias, infiltrado inflamatório e translocação bacteriana, seguimos para a avaliação da inflamação em órgão remoto.

Assim, objetivando caracterizar o perfil da resposta inflamatória pulmonar aguda em camundongos AIRmax e AIRmin após a injúria promovida pela indução de isquemia e reperfusão da artéria mesentérica, avaliamos o infiltrado celular por meio da atividade da mieloperoxidase em tempos variados de reperfusão (0, 1, 4 e 24 horas).

Na **figura 10** podemos observar que o perfil da inflamação aguda no pulmão foi semelhante nas duas linhagens, atingindo o máximo de atividade enzimática às 4 horas pós-reperfusão. Os animais AIRmax I/Ri responderam mais eficazmente ao estímulo de I/Ri com níveis de MPO significativamente superiores ($p < 0,001$) aos seus respectivos controles e aos animais AIRmin a partir de 1 hora de reperfusão sanguínea. Às 24 horas, todos os animais retornaram aos seus níveis basais. Os camundongos do grupo falso operado de ambas as linhagens apresentaram um equivalente infiltrado inflamatório sem alterações significativas durante toda a cinética, demonstrando que o processo cirúrgico não interferiu no infiltrado neutrofílico.

Figura 10 - Perfil temporal da migração de leucócitos no pulmão.

Perfil temporal da inflamação pulmonar por quantificação da atividade de mieloperoxidase (Densidade Ótica) em lisado tecidual. Camundongos AIRmax e AIRmin submetidos aos 45 minutos de isquemia seguidos por 0, 1, 4 e 24 horas de reperfusão. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão de 6 animais/grupo) (*) diferença entre AIRmax e AIRmin (inter-linhagem), (#) diferença entre I/R e demais controles (intra-linhagem); (α) diferença entre o grupo experimental e o grupo Basal (não manipulado).

4.4.2 Cinética da expressão gênica do Pulmão após indução de isquemia e reperfusão

Para avaliar a expressão dos genes envolvidos durante as condições de hipóxia no pulmão provocada pelo procedimento de isquemia da artéria mesentérica superior e posterior reperfusão, foram obtidas amostras de RNAm do tecido pulmonar total dos camundongos AIRmax e AIRmin. Seus respectivos cDNAs foram sintetizados para os ensaios de PCR em tempo real. Os genes escolhidos para a realização dos ensaios de expressão foram: *Hif1a*, *Vhl*, *Vegfa*, *Hif1b*, *Tgfb*, *Tnfa*, *Il1*, *Il6* e *Il10*. Dentre os quatro constitutivos testados (β_2 microglobulina, *Ciclofilina*, *Gapdh* e *Rps29*) o gene codificador da β_2 microglobulina foi o que mais se adequou ao pulmão. Como linha de corte para expressão gênica nós utilizamos somente os genes que apresentaram o seu *cT* (*cicle Threshold*) com valor menor de 35. (*cut off 35*).

As **figuras 11 e 12** representam os valores de variação de expressão gênica relativa em $2^{-\Delta\Delta Ct}$. As diferenças inter-linhagens e intra-linhagens encontradas foram resultados de ativação ou supressão gênica, com relação ao perfil do calibrador (AIRmin *basal*).

Ao avaliar os níveis de expressão de AIRmax e AIRmin nos vários grupos experimentais, foi possível observar nos pulmões dos camundongos AIRmax submetidos à I/Ri um aumento significativo da expressão do gene *Hif1a*. Ao avaliar pontualmente os tempos estabelecidos durante a cinética, foi evidenciado na linhagem AIRmax um aumento da expressão do *Hif1a* durante o período isquêmico, o qual representa somente a obstrução do fluxo sanguíneo (0 horas de reperfusão). Nos períodos de reperfusão, os quais são caracterizados pela retomada do fluxo sanguíneo, nós observamos a progressão da expressão do *Hif1a* até 1 hora, sendo que nas horas subsequentes foi observado um platô, que se manteve até às 24 horas de reperfusão.

O gene supressor de tumor *Vhl*, que codifica a proteína Von Hippel-Lindal (VHL) apresentou semelhante perfil de expressão entre as duas linhagens, porém, na linhagem AIRmin o pico de expressão deste gene ocorreu precocemente, durante o período de isquemia (0 horas de reperfusão), decaindo nas horas seguintes até os níveis basais. Já os camundongos

AIRmax atingiram pico de expressão desse gene entre 1 e 4 horas após o início da reperfusão. As expressões dos genes *Hif1a* e *Vhl* nos grupos controles (FO e basal) mostraram-se equivalentes em ambas as linhagens sem qualquer alteração significativa ao longo do período analisado. (**Figura 11**).

Na mesma figura, observamos que a linhagem AIRmax, durante a cinética, apresentou equivalente expressão do gene *Hifb* (*Arnt*) nos três grupos experimentais, I/Ri, FO e basal. Por outro lado, os camundongos AIRmin mostraram maior expressão deste gene no período de 0 horas, quando comparados aos seus controles basais e aos camundongos AIRmax I/Ri e FO neste mesmo período. Já o gene *Vegfa* não apresentou diferenças significativas entre as linhagens durante a cinética (**Figura 11**).

Na figura **Figura 12**, podemos observar a expressão gênica de algumas citocinas envolvidas na resposta inflamatória aguda produzida pela I/Ri. Assim como no íleo terminal (intestino), observamos um aumento significativo dos níveis da expressão do gene da *Il6* no pulmão dos camundongos isquêmicos após a liberação do fluxo sanguíneo (1, 4 e 24 horas de reperfusão), porém este aumento restringiu-se somente aos camundongos da linhagem AIRmax. Quanto ao gene *Il1b* nós não evidenciamos diferenças de expressão entre as linhagens AIRmax e AIRmin nos primeiros períodos da análise (0, 1 e 4 horas), no entanto, após este período observamos um aumento expressivo em ambas as linhagens. Já a expressão da citocina multifuncional envolvida na proliferação e diferenciação celular, *Tgfb*, não sofreu variações significativas nos dois períodos analisados independente da conduta experimental.

Não foi detectada a expressão gênica dos genes das citocinas *Il10* e *Tnfa* nos tempos avaliados (dados não mostrados).

Figura 11 - Genes expressos em condições de Hipóxia no pulmão dos camundongos AIRmax e AIRmin.

Cinética da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos genes *Hif1a*, *Hif1b*, *Vhl* e *Vegfa* no pulmão dos camundongos AIRmax e AIRmin após 45 minutos de isquemia seguidos por 0, 1, 4 e 24 horas de reperfusão. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão de 6 animais/grupo (*) diferença entre AIRmax e AIRmin (inter-linhagem), (#) diferença entre I/R e demais controles (intra-linhagem); (α) diferença entre o grupo experimental e o grupo Basal (não manipulado).

Figura 12 - Genes inflamatórios expressos em condições de Hipóxia no pulmão dos camundongos AIRmax e AIRmin.

Cinética da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos genes *Il6*, *Il1b* e *Tgfb* no pulmão dos camundongos AIRmax e AIRmin após 45 minutos de isquemia seguidos por 0, 1, 4 e 24 horas de reperfusão. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão de 6 animais/grupo. (*) diferença entre AIRmax e AIRmin (inter-linhagem), (#) diferença entre I/R e demais controles (intra-linhagem); (α) diferença entre o grupo experimental e o grupo Basal (não manipulado).

4.4.3 Análise da expressão proteica do Fator de Transcrição HIF-1 α nas células infiltradas no pulmão após indução de Isquemia e Reperusão.

Após evidenciar um significativo aumento da expressão do gene *Hif1a* no pulmão dos camundongos AIRmax submetidos à indução de isquemia e reperusão da artéria mesentérica superior, nos propusermos avaliar a expressão proteica intracelular deste fator de transcrição, o qual é responsável pela síntese de diversas proteínas inflamatórias.

Nossas análises, até o presente momento, demonstraram uma maior mobilização leucocitária com predominância de granulócitos na circulação (**Figura 5**), intestino (**Figura 7**) e pulmão (**Figura 8**) dos camundongos AIRmax I/Ri. Neste sentido, para verificar a presença do HIF-1 α nos neutrófilos infiltrados nos pulmões, células do parênquima pulmonar dos camundongos AIRmax e AIRmin foram isoladas para subsequente marcação com anticorpos anti-Ly6G, anti-CD11b e anti-HIF-1 α . Como verificado na **Figura 11**, os valores máximos de expressão do gene *Hif1a* ocorreram após 1 hora de reperusão, mantendo-se constante nos períodos posteriores. Diante deste resultado, estabelecemos o período de duas horas de reperusão para a detecção do fator de transcrição HIF-1 α .

Nas **figuras 13 e 14** estão apresentados os citogramas representativos das avaliações por citometria de fluxo das populações celulares presentes no parênquima pulmonar dos animais submetidos à I/Ri e controles (FO e basal). Primeiramente, foi analisada a população com fenótipo Ly6G⁺CD11b⁺, a qual refere-se aos granulócitos. Seleccionados os granulócitos, analisamos dentro desta população as células HIF1- α ⁺. A partir das porcentagens obtidas pelas análises das diferentes populações (**Figuras 13 e 14**), calculamos os valores absolutos dos granulócitos, Ly6G⁺/CD11b⁺ e Ly6G⁺/CD11b⁺/HIF1 α ⁺ (**Figuras 15A e 15B**).

Corroborando nossos resultados anteriores, podemos observar um maior infiltrado granulocítico no pulmão dos animais AIRmax I/Ri, quando comparados aos seus respectivos controles como também, quando avaliados junto à linhagem AIRmin (**Figura 15 A**). Reforçando a hipótese do papel do fator de transcrição HIF-1 α na regulação da resposta inflamatória nos

camundongos AIRmax, observamos um maior número de granulócitos HIF-1 α ⁺ infiltrados no pulmão desta linhagem submetida à I/Ri. Por outro lado, em duas horas de reperfusão os granulócitos infiltrados no parênquima pulmonar dos camundongos AIRmin não apresentaram expressão intracelular do fator de Transcrição HIF-1 α (**Figura 15 B**).

Figura 13 - Infiltrado leucocitário pulmonar dos camundongos AIRmax após I/R 2h.

Citogramas representativos das populações de células do pulmão, evidenciadas pelas moléculas de superfície Ly6G/CD11b e Ly6G/CD11b/HIF-1 α , após indução de 45 minutos de isquemia e 2 horas de reperfusão. **(A)** AIRmax I/R, **(B)** AIRmax FO, **(C)** AIRmax Basal.

Figura 14 - Infiltrado leucocitário pulmonar dos camundongos AIRmin após I/R 2h

Citogramas representativos das populações de células do pulmão, evidenciadas pelas moléculas de superfície Ly6G/CD11b e Ly6G/CD11b/HIF-1 α , após indução de 45 minutos de isquemia e 2 horas de reperfusão. **(A)** AIRmin I/R, **(B)** AIRmin FO, **(C)** AIRmin Basal.

Figura 15 - Infiltrado leucocitário pulmonar dos camundongos AIRmax e AIRmin após I/R 2h.

Número absoluto das células infiltradas no pulmão (n=3/grupo) dos camundongos AIRmax e AIRmin após indução de 45 de isquemia e 2 horas de reperfusão. **(A)** População Ly6G⁺CD11b⁺ **(B)** População HIF-1 α ⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão de 3 animais por grupo. (*) diferença entre AIRmax e AIRmin (inter-linhagem), (#) diferença entre I/R e demais controles FO e Basal (intra-linhagem); (α) diferença entre o grupo experimental e o grupo Basal (não manipulado).

4.4.4 Análise eletroforética em duas dimensões (SDS-PAGE 2D) da proteínas extraídas do pulmão dos animais AIRmax e AIRmin submetidos à I/R intestinal.

Em adição às abordagens celulares e moleculares apresentadas até o presente momento, nós optamos por uma análise geral do perfil proteico das células residentes e/ou migrantes do parênquima pulmonar na vigência da inflamação induzida pela hipóxia tissular a fim de candidatar algumas proteínas relacionadas ao divergente fenótipo observado entre as linhagens AIRmax e AIRmin.

Nesta abordagem proteômica, o perfil global das proteínas foi obtido em experimentos de SDS-PAGE em duas dimensões e a análise realizada por meio de análise computacional, utilizando o programa ImageMaster 7.0® da GE, o qual possibilita a análise de todos os spots, gerando um relatório para cada gel. Como parâmetros para esta análise estão listados os valores de intensidade, área e volume de cada *spot*. Desta forma, além de analisar qualitativamente o conteúdo proteico pela presença ou ausência de determinados *spots*, é possível analisá-los quantitativamente.

Na figura **16A e 16B** estão representados dois géis referentes aos grupos isquêmicos (I/Ri) das duas linhagens AIR. Em destaque está selecionada uma região, onde as diferenças quantitativas e qualitativas entre os géis foram mais evidentes. A visualização em 3D dos *spots* proporcionada pelo programa ImageMaster 7.0® destacam esta diferença (**Figura 16C e 16D**). O conteúdo proteico dos controles falso operados de ambas as linhagens está representado na **figura 17**.

Partindo dos géis 2D, alguns *spots* foram selecionados e os respectivos conteúdos proteicos foram extraídos e submetidos à espectrometria de massas. Dentre as proteínas sequenciadas foram identificadas àquelas envolvidas na adesão celular, migração, metabolismo energético, proteínas de membrana, ciclo celular, transporte de oxigênio e apoptose. Estas proteínas são: Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (*Gliceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase* –Gm6316), Álcool desidrogenase (*Alcohol dehydrognase* - Akr1a4), Proteína 4 associada ao microtúbulo (*Microtubule-associated protein 4-Mtap4*), Inibidor 1 da dissociação- Rho GDP (*Rho GDP-dissociation inhibitor*

1- Arhgdia), Queratina tipo II citoequeleto 1 (*Keratin, typeII cytoskeletal1*- Krt1), Profilina- 1 (*Profilin 1* - Pnfn1), Proteína S100-A9 (*Protein S100-A9*), Anexina 1 (*Anexin1* - Anax1), Tropomiosina 2 (*Tropomyosin 2*- Tpm2), Fator inicial de tradução eucariótica 5A (*Eukariyotic translation factor 5 A* - Eif5a), Inibidor 2 da dissociação- Rho GDP (*Rho GDP- dissociation inhibitor 2* -Arhgdib), Anexina 5 (*Anexin 5*- Anax5) e Carbonil redutase (*Carbonyl redutase*- Cbr1) **(Tabela 2)**. Pode- se observar uma prevalência da expressão de proteínas envolvidas em processos inflamatórios nos pulmões dos camundongos AlRmax, responsáveis pela regulação da migração leucocitária e proliferação e sobrevivência das células endoteliais **(Tabelas 3 e 4)**.

Figura 16 - Eletroforetograma em duas dimensões dos camundongos submetidos à I/R.

Géis 2D-PAGE das proteínas pulmões de camundongos AIRmax e AIRmin submetidos aos 45 minutos de isquemia e 4 horas de reperfusão. **(A)** AIRmax I/Ri, **(B)** AIRmin I/Ri. Análise em 3D de spots **(C)** AIRmax, **(D)** AIRmin.

Figura 17 - Eletroforetograma em duas dimensões dos camundongos falso operados.

Géis 2D-PAGE das proteínas dos pulmões de camundongos AIRmax e AIRmin submetidos à laparotomia mediana (falso operados). **(A)** AIRmax FO, **(B)** AIRmin FO.

Tabela 3 - Proteínas identificadas (Espectrometria de Massas).

Spot/ Proteína	pI	PM	Intensidade		Área		Volume		% Volume	
			AIRmax I/Ri	AIRmin I/Ri	AIRmax I/Ri	AIRmin I/Ri	AIRmax I/Ri	AIRmin I/Ri	AIRmax I/Ri	AIRmin I/Ri
Gm6316	9,34	16	0,38	0,87	387,09	410,03	0,53	158,15	0,15	0,30
Akr1e1	9,28	16	0,99	130,29	401,43	533,33	173,58	352,52	0,52	0,68
Mtap4	8,81	15	0,22	-	447,31	-	0,39	-	0,11	-
Arhgdia	8,66	16	0,43	-	392,83	-	0,60	-	0,18	-
Krt1	8,23	16	0,25	-	49,60	-	0,41	-	0,12	-
Pfn1	8,05	16	0,63	0,32	332,61	412,9	0,75	0,47	0,22	0,09
S100A9	7,79	16	0,16		100,07	-	0,58		0,17	-
Anxa1	7,74	17	0,40	0,17	378,49	498,92	0,48	0,25	0,14	0,05
Tpm2	5,05	24	0,91	0,34	318,28	150,88	0,52	0,02	0,13	0,02
Elf5a	5,27	21	0,23	109,08	410,03	550,54	0,32	254,37	0,02	0,10
Arhgdib	6,1	24	0,88	0,95	759,86	627,96	37,47	369,78	0,32	0,14
Anx5	4,73	24	136,32	104,5	490,32	564,87	280,87	315,82	0,84	0,61
Cbr1	9,81	23	153,91	145,13	622,26	125,30	465,60	870,00	139,70	168,83

Proteínas do pulmão de AIRmax I/Ri e AIRmin I/Ri (*pool* de 3 animais por grupo) sequenciadas e identificadas por espectrometria de massas. Spots analisados pelo programa ImageMaster 7.0. Destacadas em vermelho, proteínas diferencialmente expressas.

Tabela 4 - Proteínas do pulmão diferencialmente expressas entre as linhagens AIRmax e AIRmin.

Proteína	Função	% Volume		AIRmax/AIRmin
		AIRmax	AIRmin	
Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (Gm6316)	Metabolismo energético	0,15	0,30	0,5
Proteína 4 associada ao microtúbulo (Mtap4)	Papel na regulação da apoptose p53 - dependente	0,11	-	*
Inibidor 1 da dissociação- Rho GDP (Arhgdia)	Mobilidade celular	0,18	-	*
Queratina tipo II citoesqueleto 1 (Krt1)	Rearranjo do citoesqueleto e microtúbulo	0,12	-	*
Profilina- 1 (Pfn1)	Migração celular, dinâmica célula-célula	0,22	0,09	2,4
Proteína S100A9 (S100A9)	Alarmina (ligante de TLR4), migração de granulócitos	0,17	-	*
Anexina 1 (Anxa1)	Resolução da inflamação, regula a atividade da Fosfolipase A	0,14	0,05	2,8
Tropomiosina cadeia beta (Tpm2)	Adesão e migração celular	0,13	0,02	6,5
Fator inicial de tradução eucariótica (Eif5a)	Dinâmica célula-célula, ciclo celular e apoptose p53/Tp dependente	0,02	0,10	0,2
Inibidor 2 da dissociação- Rho GDP (Arhgdib)	Mobilidade celular	0,32	0,14	2,3

Proteínas do pulmão de AIRmax I/Ri e AIRmin I/Ri (*pool* de 3 animais por grupo) diferencialmente expressas no pulmão. Análises pelo programa ImageMaster 7.0. (*) Proteínas ausentes nos pulmões dos camundongos AIRmin.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A fisiopatologia da isquemia e reperfusão intestinal (I/Ri) vem sendo reconhecida por apresentar um grave prognóstico com alto risco de morte, caracterizada por uma complexa cascata de eventos, a qual envolve um processo inflamatório agudo como precursor. Por outro lado, sabe-se que a resposta inflamatória decorrente de injúrias teciduais e infecções é essencial para manter o equilíbrio homeostático do organismo. Portanto, compreender os mecanismos que regulam a manutenção e resolução da resposta inflamatória aguda produzida pela isquemia e reperfusão intestinal é fundamental para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas eficazes (KLAR et al., 2012; LEWIS et al., 1999; SEMENZA, 2014; WALMSLEY et al., 2005; WELBOURN et al., 1991).

Estudos utilizando modelos de camundongos transgênicos e ou deficientes para genes codificadores de proteínas moduladoras da resposta inflamatória associada à hipóxia tecidual, tais como HIF1- α , vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de elucidar os mecanismos pelos quais situações de hipóxia decorrentes de isquemia e reperfusão levam a inflamação sistêmica (FEINMAN et al., 2010; KANNAN et al., 2010). A necessidade de um modelo experimental para o estudo de doenças inflamatórias associadas à hipóxia que englobe uma população heterogênea com fenótipos extremos, bem como o observado na população humana é de grande importância para uma melhor compreensão destes mecanismos.

Neste estudo, nós apresentamos um modelo experimental, utilizando duas linhagens de camundongos heterogêneos, selecionados para alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) Resposta Inflamatória Aguda local (AIR), por meio de acasalamento consecutivos. Dados anteriores obtidos no nosso laboratório, utilizando a linhagem AIR evidenciaram polimorfismo em alguns genes envolvidos na inflamação, os quais são responsáveis por modular as características fenotípicas que distinguem AIRmax e AIRmin, assim como controle genético da produção de IL-1 β , na susceptibilidade a infecções e a processos de carcinogênese na pele, pulmões e no intestino. (ARAÚJO, et al., 1998; DE SOUZA, et al., 2009; MARIA, et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003; SIQUEIRA, 2009; VORRARO et al., 2010).

Considerando o controle genético da resposta inflamatória e a participação de genes envolvidos na adaptação do organismo a condições adversas de oxigênio, nós avaliamos os mecanismos que regulam a inflamação aguda sistêmica produzida pela indução de hipóxia após I/Ri intestinal. Para tanto, utilizamos o modelo de isquemia e reperfusão intestinal que consiste na obstrução da artéria mesentérica por 45 minutos e posterior reperfusão. No presente estudo, avaliamos a resposta inflamatória aguda local e sistêmica durante o período isquêmico (0 horas) e em períodos distintos de reperfusão.

Primeiramente, o nosso objetivo foi o de avaliar a mobilização dos leucócitos para a circulação periférica frente à hipóxia. Após períodos distintos (0, 1, 4 e 24 horas) da indução da I/R intestinal, nós observamos um maior número de leucócitos nos animais AIRmax em 4 horas de reperfusão. Porém, não observamos diferenças entre o grupo isquêmico e falso operado desta linhagem. Por outro lado, os camundongos AIRmin apresentaram diferença intra-linhagem (I/R x FO) significativa. Uma possível explicação para estes resultados seria fundamentada no processo de seleção destes camundongos, o qual constitui em uma seleção genética bidirecional, na qual a linhagem AIRmax foi selecionada de acordo com o fenótipo de alta reatividade inflamatória, refletindo em uma resposta rápida e exacerbada a um estímulo inflamatório. Assim, nesta linhagem, a lesão estabelecida apenas pela laparotomia nos animais falso operados foi suficiente para proporcionar uma rápida mobilização de leucócitos, o que não aconteceu nos camundongos selecionados para mínima resposta inflamatória aguda (AIRmin).

Ao avaliar morfológicamente as células da circulação observamos um maior número de neutrófilos nos camundongos AIRmax isquêmicos, indicando que estes animais apresentam uma dinâmica de populações diferente dos demais grupos experimentais após a indução de I/R intestinal. Ao encontro do observado, sabemos que em condições de estresse como injúrias teciduais e infecções, a medula óssea sob a ação de citocinas inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento, inicia uma rápida mobilização de neutrófilos para o sangue periférico (LEY et al., 2007), capacidade evidenciada nos animais da linhagem AIRmax (Ribeiro et al., 2003). Corroborando os nossos resultados, Costa (2013), ao avaliar a resposta inflamatória após 3 horas do estímulo subcutâneo por Biogel P-100 observou que os camundongos AIRmax

apresentaram um aumento no número de células CD11b⁺GR1⁺ na circulação periférica. Por outro lado, o número de leucócitos totais manteve-se equivalente entre as linhagens AIRmin e AIRmax.

A migração dos leucócitos ao sítio inflamatório é um processo orquestrado por uma variedade de mediadores inflamatórios, o qual envolve uma precisa interação ao endotélio vascular (LEY et al., 2007). Nesse sentido, ao avaliar possíveis variações nos eventos inflamatórios que precedem a migração leucocitária, após a indução de hipóxia nos animais das linhagens AIR, observamos que em condições basais os camundongos AIRmin apresentam maior número de leucócitos em rolamento nas vênulas.

Segundo alguns autores, o estado basal de ativação das integrinas em subpopulações de leucócitos circulantes e sua topologia na membrana plasmática, como a expressão em clusters pré-formados ou em microvilosidades provavelmente têm um papel na regulação da inflamação facilitando e aumentando o contato dos leucócitos ao endotélio vascular (LEY et al., 2007). Além disso, em um estudo realizado no nosso laboratório, no qual foi avaliado o transcriptoma de pulmão em animais basais e tratados com uretana (indução de carcinogênese química), observou-se que em condições basais moléculas de adesão foram *down* reguladas nos camundongos AIRmax quando comparados aos AIRmin (FRANCO et al., 2010).

No nosso modelo de inflamação aguda (AIR), após 1 hora de reperusão (I/R1h), foi observado um maior rolamento de leucócitos ao endotélio vascular nos camundongos AIRmin I/Ri quando comparados aos AIRmax I/Ri. Por outro lado, neste mesmo período foi observado um aumento significativo na adesão celular nos camundongos AIRmax I/Ri. Está descrito, que os leucócitos sob a ação de mediadores inflamatórios tais como TNF (fator de necrose tumoral) e IL-1 β promovem a expressão de E-selectinas e um aumento de ICAM1 sobre as células endoteliais, como consequência, a taxa de rolamento de neutrófilos torna-se lenta (menor que 5 μ m/s), caracterizando o estado de *slow rolling* (LEY et al., 2007). Sabendo que o *slow rolling*, é o passo que antecede a adesão firme, nós sugerimos que após 30 minutos de reperusão os leucócitos dos camundongos AIRmax I/Ri estariam neste estado de interação, o que facilitaria a adesão observada em 1 hora de reperusão. Reforçando esta ideia, sabe-se que quimiocinas são responsáveis por regular a afinidade, a valência e a

avidez da interação das integrinas presentes nos leucócitos aos membros das famílias das imunoglobulinas como ICAM1 e VCAM1, presentes nas células endoteliais. Condizente com estes dados, em um estudo anterior do grupo foi observado maior produção de fatores quimiotáticos pelas células residentes ou infiltradas nos animais AIRmax após a indução subcutânea de Biogel P-100 (RIBEIRO, 2003).

Prosseguindo o estudo, avaliamos a resposta inflamatória local (íleo terminal) após 4 horas da indução da I/R intestinal. Assim ao avaliar a atividade da MPO intestinal, nós observamos uma maior reatividade inflamatória nos camundongos AIRmax I/Ri. Corroborando o nosso estudo, DU e colaboradores (2015) ao avaliar a lesão proporcionada por isquemia e reperfusão intestinal em camundongos C57Bl/6 deficientes do gene *Wip1*, o qual é descrito por regular negativamente a maturação e desenvolvimento de granulócitos, observaram que os camundongos deficientes desta proteína apresentaram um maior número de neutrófilos infiltrados no intestino e um aumento da expressão gênica da molécula de adesão *Icam1* e da citocina inflamatória *Tnfa*. Estes autores correlacionam a sensibilidade à isquemia e reperfusão observada nos camundongos *Wip1* KO com um maior número de neutrófilos maduros em resposta a ausência da proteína *WIP1*. Ao encontro desses resultados, Costa (2013), ao fenotipar as células da medula óssea das linhagens AIR após indução de biogel, observou uma produção significativa de granulócitos indiferenciados e neutrófilos maduros nos camundongos AIRmax.

Uma vez observada a maior reatividade intestinal dos camundongos AIRmax frente à I/R intestinal, nós avaliamos a expressão de genes envolvidos na regulação da resposta inflamatória como *Il1b*, *Il6*, *Tnfa*, *Tgfb*, *Il10*, *Cox-2* e *Icam1*, como também genes expressos em condições adversas de oxigênio *Hifa*, *Hifb* e *Vhl*. Vários estudos correlacionam o complexo transcricional HIF como um regulador máster da homeostase do oxigênio, envolvido em diversas desordens afetando o sistema circulatório tais como isquemias, câncer e hipertensão arterial pulmonar (POON et al., 2009; SEMENZA, 2001 a, 2001 b, 2008, 2014). Composto por duas subunidades, HIF-1 α e HIF-1 β , os autores consideram que a subunidade alfa é oxigênio-dependente, por outro lado, relatam que a subunidade beta é constitutiva do núcleo e a sua expressão não

varia frente a mudanças na tensão de oxigênio, o que explicaria a equivalente expressão deste último gene entre as linhagens após indução da I/R intestinal.

A estabilidade do fator de transcrição HIF-1 α é dependente da expressão do gene *Vhl* (*Von Hippel Lindau*), responsável por codificar uma proteína, a qual em condições de normóxia induz a degradação do HIF-1 α via proteassomo (POON et al., 2009; SEMENZA, 2001 a, 2001 b, 2003, 2014). Ao avaliarmos a expressão do gene *Vhl* nas linhagens AIR, nós constatamos que este gene foi significativamente mais expresso nos camundongos AIRmax basais. Uma vez que em condições basais, o gene *Vhl* está mais expresso no intestino dos camundongos da linhagem AIRmax, podemos sugerir que neste órgão ocorra uma regulação do fator de transcrição HIF-1 α dependente da proteína VHL. Por outro lado, a equivalente expressão do gene *Vhl* nos grupos experimental (I/R) e controles (FO e basal) na linhagem AIRmin pode indicar uma regulação por outro fator, independente ou associada ao VHL.

Estudos recentes têm demonstrado que a expressão do *Hif1a* durante situações de hipóxia é transitória e envolve uma fase de resolução mesmo quando estas células permanecem em hipóxia. Estes estudos demonstraram o papel de microRNAs (miRNAs) na regulação pós-transcricional do *Hif1a* em condições de hipóxia. Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA endógenos com aproximadamente 22 nucleotídeos que regulam a expressão gênica por meio de desestabilização do mRNA ou por reprimir a sua tradução. No entanto, a expressão de miRNAs e sua atividade reguladora dependem do tipo celular e local onde esta molécula está sendo expressa. Nesse contexto, foi descrito que em condições de hipóxia células do epitélio intestinal induzem a expressão do micro RNA “miR-155” o qual regula negativamente a sinalização dependente de *Hif1a* (BRUNING et al., 2011; TANG et al., 2015). Sendo assim, a aparente ausência da regulação do HIF-1 α pela proteína VHL nos camundongos AIRmin e o fenótipo de baixa inflamação após indução de isquemia e reperfusão nestes animais poderia ser explicada pela atuação destes micro RNAs sobre transcrito *Hif1a*, impedindo a sua sinalização.

Em resposta ao estresse celular proporcionado pela inflamação e ou infecção, citocinas são sintetizadas e liberadas pelas células residentes e infiltradas visando controlar o estresse e minimizar o dano tecidual (PERROT et

al., 2003). O processo de isquemia e reperfusão nas linhagens AIR induziu um aumento equivalente da expressão do gene *Il6* nos intestinos dos animais isquêmicos de ambas as linhagens. A IL-6 é sintetizada por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular, além de outras células em resposta a micro-organismos e citocinas, especialmente IL-1 β e TNF- α (KAPLANSKI et al, 2003). Por outro lado, foi observada uma ativação do gene *Tnfa* nos camundongos AIRmax I/Ri.

O TNF- α é uma citocina pró inflamatória que tem como função estimular as células do endotélio vascular a expressarem moléculas de adesão. Estimulam também, os macrófagos a secretarem quimiocinas que acentuam a afinidade das integrinas leucocitárias por seus ligantes e induzem a quimiotaxia de leucócitos (PERROT et al., 2003; SHARMA et al., 2007). Condizentes à literatura, ao avaliar a expressão gênica da molécula de adesão *Icam1*, observamos uma ativação deste gene no intestino dos camundongos AIRmax I/Ri. Essa ativação poderia explicar o aumento da adesão dos leucócitos às células endoteliais mesentéricas nos camundongos AIRmax I/Ri. Além disso, fatores inflamatórios como o IFN- γ e TNF- α alteram proteínas juncionais, as *tight junctions*, que fazem parte da barreira epitelial. Estas junções são formadas por uma variedade de proteínas dentre elas a ocludina, e as claudinas que determinam quais as moléculas atravessam a barreira epitelial. Neste contexto, o TNF- α além de estimular a expressão de uma *tight junction* específica, a claudina 2 que de forma direta aumenta a permeabilidade intestinal devido à formação de poros na membrana celular, desencadeia, também, a apoptose das células epiteliais intestinais, comprometendo assim a barreira epitelial (KELSALL, 2008; SHIH; TARGAN, 2008). Os genes que codificam os mediadores inflamatórios *Il1b*, *Il10* e *Cox2*, não apresentaram níveis de expressão suficientes para a análise.

Corroborando nossos resultados, estudos utilizando camundongos C57B6/129 selvagens (Hif1a^{+/+}) e parcialmente deficientes de HIF-1 α (Hif1a^{+/-}), em indução de I/R intestinal pelo modelo de choque hemorrágico e oclusão aguda da artéria mesentérica, demonstraram que a ativação deste fator de transcrição foi necessária para o desenvolvimento da reação inflamatória intestinal. Foi observado que camundongos parcialmente deficientes de HIF-1 α sujeitos ao trauma hemorrágico reduzem a expressão de genes pró-

inflamatórios como *Tnfa*, *Il1b* e *Il6*. Associado a este resultado, constatou-se que os camundongos *Hif1a*^{+/-} reduziram significativamente a quantidade de colônias bacterianas translocadas para os linfonodos mesentéricos. Segundo estes autores, uma prolongada ativação do HIF-1 α seria responsável pela injúria da mucosa intestinal e pela lesão pulmonar induzida pela I/Ri (FEINMAN et al., 2010; KANNAN et al., 2010).

Em decorrência do diferente perfil de sensibilidade e resistência aos efeitos deletérios da hipóxia, no qual a linhagem AIRmax apresentou uma significativa reatividade inflamatória, representada pelo maior número de leucócitos na circulação e aumento da inflamação no intestino, nós avaliamos a possibilidade da ocorrência de translocação bacteriana nos linfonodos mesentéricos (LNMs) e no baço destes animais. Diversos estudos têm ressaltado a importância da translocação bacteriana em modelos experimentais como trauma, choque hemorrágico e isquemia e reperfusão, como sendo a principal causa da ativação da resposta inflamatória do GALT e pela subsequente inflamação sistêmica (DEITCH, 1990; LEE; MAZMANIAN, 2010; NEUGEBAUR et al., 2008; SENTHIL et al., 2007; TSUJIMOTO et al., 2009; VOLLMAR; MENDER, 2011).

Corroborando estes autores, nós observamos um maior número de colônias bacterianas nas culturas dos linfonodos mesentéricos e baço dos camundongos AIRmax I/Ri quando comparados aos seus controles intra-linhagem e aos animais AIRmin I/Ri. Após testes microbiológicos e bioquímicos das colônias presentes nas culturas destes órgãos, identificamos cinco espécies de enterobactérias gram negativas presentes na microbiota do trato gastrointestinal: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia sp* e *Staphylococcus*. Segundo alguns autores, bactérias Gram negativas são facilmente translocadas do trato gastrointestinal para LNMs e para outros órgãos pela via linfática ou pela veia porta hepática. Estes autores descrevem como espécies mais translocadas a *Enterobacter cloacae* e a *Escherichia coli*, correlacionando a ocorrência da translocação destas bactérias com o agravamento da inflamação sistêmica (GONÇALVES et al., 2000). No mesmo sentido, no nosso modelo encontramos uma maior porcentagem da espécie *Escherichia coli* nos LNMs e no baço de ambas as linhagens.

Interessantemente, dentre as cinco espécies identificadas apenas duas estavam presentes em ambas as linhagens, sendo que três delas estavam segregadas diferentemente entre as linhagens AIRmax e AIRmin. As espécies, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia sp*, foram observadas apenas nos linfonodos e baços dos camundongos da linhagem AIRmin, enquanto que a espécie, *Proteus mirabilis*, restringiu-se aos órgãos dos camundongos AIRmax. Sabe-se que a microbiota intestinal tem um papel fundamental na eficácia da resposta imune e que fatores genéticos podem influenciar na diversidade da microbiota interferindo na resistência ou suscetibilidade a infecções, doenças inflamatórias e tumores (ELINAV et al., 2011; LEE; MAZMANIAN, 2010).

Além disso, em um estudo recente foi demonstrado que ácidos graxos de cadeias curtas (SCFAs- *Short chain fatty acids*), os quais são substâncias produzidas pela fermentação de carboidratos complexos pelas bactérias da microbiota intestinal podem atuar como inibidores de histonas deacetilases (HDAC- *Histone Deacetylase*) modulando processos epigenéticos. Foi evidenciado por estes autores, que células endoteliais do rim estimuladas com um coquetel de citocinas inflamatórias, tratadas com SCFAs reduzem a ativação do fator de transcrição NFκB e a translocação do HIF1- α para o núcleo, como também, diminuem a produção de óxido nítrico, lactato e espécies reativas do oxigênio. Além disso, esses autores observaram que o tratamento com SCFA reduz o dano renal após isquemia e reperfusão intestinal (ANDRADE-OLIVEIRA et al., 2015). No mesmo sentido, KONG e colaboradores (2006), demonstraram que inibidores de histonas deacetilases induzem uma maior expressão no gene Vhl, aumentam a degradação do HIF1- α via proteasomo e consequentemente reduzem a translocação nuclear do HIF1-α.

Diante destes dados, nós poderíamos sugerir que os genes selecionados em cada linhagem influenciam na diversidade da microbiota, a qual pode apresentar bactérias que produzam quantidades diferentes de SCFAs. Neste contexto, os camundongos AIRmin estariam produzindo estes carboidratos em maior quantidade atuando de forma anti- inflamatória o que proporcionaria a sua resistência à lesão por isquemia e reperfusão intestinal. Estudos referentes à diversidade da microbiota nas linhagens AIRmax e

AIRmin estão sendo realizados no momento em nosso laboratório visando elucidar este mecanismo.

Como passo seguinte do estudo dos mecanismos reguladores da resposta inflamatória sistêmica após I/R intestinal nós avaliamos o reflexo desta resposta a órgão remoto. Sabe-se que a resposta inflamatória após I/R intestinal pode ser agravada por diversos fatores fisiológicos celulares e moleculares, uma vez que o desequilíbrio entre a demanda e o fornecimento de oxigênio no intestino levará a um aumento de metabólitos do oxigênio, citocinas e produtos bacterianos os quais por sua vez atingem a circulação, levando a disseminação da inflamação sistêmica. (DEITCH, 1990; LEE; NEUGEBAUR et al., 2008; SENTHIL et al., 2007; VOLLMAR e MENDER, 2011).

O pulmão é um dos principais órgãos afetados, tornando-se bastante vulnerável aos efeitos da resposta inflamatória sistêmica por receber os mediadores inflamatórios liberados na circulação após o débito cardíaco. (FELTES et al., 2011). Corroborando o perfil fisiopatológico observado nas linhagens AIRmax e AIRmin no local da injúria (intestino), foi observado um infiltrado inflamatório mais intenso no parênquima pulmonar dos camundongos AIRmax I/Ri com início em 1 hora, estendendo-se às 4 horas após a desobstrução da artéria mesentérica superior. Um resultado semelhante a este foi evidenciado no pulmão dos camundongos AIRmax após inoculação s.c. de 0,75 µg/g de veneno de *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo), no qual foi observado um aumento da atividade da MPO em 1 e 2 horas, como também o aumento de populações de neutrófilos Ly6G⁺ (LARA, 2012). Nossos resultados, ressaltam a importância dos neutrófilos na injúria pulmonar e o perfil de sensibilidade dos camundongos AIRmax em desenvolver inflamação sistêmica em resposta à isquemia e reperfusão intestinal.

Alguns estudos relatam que neutrófilos e monócitos são capazes de realizarem uma migração transendotelial reversa (reverse *transendotelial cell migration*- rTEM). Utilizando microscopia confocal para analisar a dinâmica de transmigração neutrofílica em cremaster de camundongos, foi descrita uma pronunciada rTEM nos animais submetidos à injúria de isquemia e reperfusão. Estes autores correlacionado a rTEM com o aparecimento de populações de neutrófilos murinos ICAM^{high}, os quais foram funcionalmente primados pelo

aumento de espécies reativas do oxigênio na microcirculação levando ao desenvolvimento da inflamação pulmonar (BEYRAU et al., 2013).

Correlacionando o aumento da resposta inflamatória pulmonar com a expressão de genes responsivos à hipóxia, nós observamos um aumento progressivo da expressão do gene *Hif1a* no pulmão dos camundongos AIRmax após a indução da isquemia (0h) o qual manteve-se constante após 1 hora de reperfusão. Essa resposta é condizente com o fenótipo da linhagem AIRmax visto a sua potencialidade inflamatória e participação do gene em questão na retomada da homeostase diante o estado de hipóxia. No entanto, podemos sugerir que na linhagem AIRmax durante o início (1 e 4 horas) da resposta inflamatória este fator de transcrição teria um papel na mobilização de neutrófilos em resposta aos efeitos deletérios da hipóxia. Por outro lado, mais tardiamente, o *HIF1a* pode estar sendo expresso por outras células inflamatórias como os macrófagos e fibroblastos, tendo como papel o remodelamento tecidual. Estudos demonstraram que ratos Wistar-Kyoto expostos às condições de hipóxia crônica induzem um acúmulo monócitos, fibroblastos e células dendríticas na artéria pulmonar, promovendo o remodelamento deste tecido (BURK et al., 2009).

Condizente como perfil de expressão do *Hif1a*, o gene *Vhl*, apresentou-se mais expresso nos animais AIRmax I/Ri após 1 e 4 horas de reperfusão. Neste sentido, uma vez que a expressão exacerbada e descontrolada do *Hif1a* pode não ser viável para o animal, proporcionando um descontrole da inflamação, a expressão do gene supressor de tumor *Vhl*, responsável pela degradação da proteína HIF, é de suma importância para manter o nível da mesma viável para a sobrevivência destes camundongos. Em acordo com dados da literatura, o gene *Hif1b* ou *Arnt*, no nosso modelo, apresentou uma equivalente expressão entre os grupos experimental I/Ri e os controles FO e basal.

A proteína VEGF- α é uma das principais produzidas, pelas células progenitoras endoteliais em condições de hipóxia para iniciar o processo de neo-vascularização em resposta ao baixo aporte de oxigênio (MURA et al., 2006; SEMENZA 2003, 2008, 2014). A ativação do VEGF- α desencadeia diversas rotas de sinalização intracelular que resultam em proliferação, sobrevivência, mitogênese, migração e diferenciação das células endoteliais,

assim como na atuação no aumento da permeabilidade vascular. Nesse sentido, era esperada uma expressão aumentada do gene *Vegfa* nos animais submetidos a I/Ri. Porém, não observamos alterações significativas na expressão deste gene entre as duas linhagens. Possivelmente sua indução poderá ocorrer por outras vias ou por outros estímulos e não somente a hipóxia. A transcrição do mRNA do *Vegfa* pode ser induzida pela secreção de diferentes fatores de crescimento e citocinas, incluindo, PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), EGF (fator de crescimento epidermal), TNF- α (fator de necrose tumoral), TGF- β (fator de crescimento tumoral) e IL-1 (interleucina 1). (MILKIEWICZ et al., 2005).

A magnitude da resposta inflamatória gerada em resposta à isquemia e reperfusão intestinal depende da ação sinérgica de uma série de mediadores inflamatórios, dentre eles citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos, fragmentos do complemento, neuropeptídeos e fatores de crescimento (KRISHNADASAN et al., 2003; PERROT et al., 2003). É importante ressaltar que o microambiente inflamatório está estreitamente relacionado com o controle da regulação do HIF-1 α . Nesse sentido, a expressão de mediadores inflamatórios pode favorecer a tradução e o acúmulo desta proteína (DEHNE; BRUNE, 2009; MC MAHON et al., 2006).

A inflamação sistêmica causada pela isquemia e reperfusão intestinal é caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e INF- γ . Estes mediadores são capazes de induzir alterações funcionais no local onde ocorreu a I/Ri como também em órgãos distantes como pulmão, fígado e rim, via circulação sanguínea. Nesse sentido, o desenvolvimento da Inflamação Aguda Pulmonar é dependente de uma ampla expressão de mediadores, os quais compreendem as citocinas pró-inflamatórias citadas acima, como também citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento como IL-10 e TGF- β , GM-CSF (DAO-FEN, et al., 2010; REISS, et al., 2012).

Apesar da equivalente expressão gênica da citocina *Il6* evidenciada no intestino dos camundongos de ambas as linhagens submetidos a I/Ri, nós observamos elevados níveis de mRNA desta citocina no pulmão dos camundongos AIRmax submetidos à I/Ri, quando comparados aos AIRmin I/Ri. Esse resultado ressalta a alta sensibilidade do pulmão em resposta à hipóxia e

o papel do endotélio vascular pulmonar e das células residentes na modulação da resposta inflamatória deste órgão provocada por isquemia e reperfusão intestinal. Por outro lado, o gene da *Il1b* não apresentou diferenças significativas entre as linhagens, no entanto, em 24 horas de reperfusão houve um aumento expressivo deste gene em ambas as linhagens.

A IL-1 β é um importante mediador pró-inflamatório secretado principalmente por fagócitos mononucleares, podendo ser produzida por outras células tais como neutrófilos, células epiteliais e endoteliais. Seus efeitos são dependentes de sua concentração, assim, em baixas concentrações, a IL-1 β atua como um mediador da inflamação local estimulando a expressão de moléculas de adesão leucocitárias e endoteliais, promovendo o recrutando de células para o sítio da injúria ou infecção. Já em quantidades maiores, a IL-1 β atinge a corrente sanguínea atuando de forma sistêmica, na qual exerce efeitos endócrinos, podendo afetar a regulação térmica do organismo. (JIANG et al., 2007).

Em experimentos não mostrados, nos quais foram dosadas por ELISA citocinas presentes no sobrenadante de explante pulmonar (cultura de células do pulmão) após 1 hora de reperfusão foi observado um aumento da proteína IL-1 β nos camundongos AIRmax I/Ri. Corroborando estes resultados, utilizando as mesmas técnicas de expressão gênica e proteica, Carvalho (2013), ao avaliar o câncer hepático e pulmonar após injeção i.p. de dietilnitrosamina observou níveis significantes desta proteína no macerado pulmonar dos camundongos AIRmax, apesar da equivalente expressão gênica da *Il1b* entre as linhagens. A elevada concentração proteica da IL-1 β frente à sua baixa expressão gênica observada nos sobrenadantes e ou macerados pulmonares dos camundongos AIRmax submetidos a modelos de inflamação aguda por I/Ri ou tumorigênese química (CARVALHO, 2013), pode ser resultante da secreção de IL-1 β pela ativação do inflamassoma.

O inflamassoma é um complexo multiproteico de alto peso molecular composto por proteínas que se auto-oligomerizam formando um esqueleto capaz de recrutar outras moléculas, tais como as caspases, promovendo a maturação de mediadores inflamatórios (MARTINON, 2012). Em experimentos *in vitro*, realizados no nosso laboratório, no qual objetivou-se a ativação do inflamassoma via estimulação das células sanguíneas por LPS seguido de ATP

foi evidenciada uma maior produção de IL-1 β (VORRARO et al., 2010). Além disso, em experimentos recentes, utilizando o mesmo protocolo de ativação das células sanguíneas, observou-se que o perfil de expressão gênica de proteínas relacionadas à ativação do inflamassoma via NALP3 parece ser responsável pela maior produção de IL-1 β pela linhagem AIRmax (CARVALHO, 2013).

O fator de transformação de crescimento β (TGF- β) é produzido por células inflamatórias como neutrófilos, eosinófilos e células estruturais como as células epiteliais e fibroblastos. Considerado um importante fator fibrinogênico, o TGF- β pode funcionar como outras citocinas pró ou anti- inflamatórias (JIANG et al., 2007). Segundo Ambalavanan e colaboradores (2008), a condição de hipóxia gera um sinal inicial para expressão de *Tgf β* . Estudos em progressão de tumor apontam para a contribuição do TGF- β no acúmulo de HIF-1 α em condições de normóxia. Foi demonstrado que TGF- β 1 atenua a proliferação e hidroxilação do HIF no domínio de degradação (ODD) e como consequência ocorre um acúmulo do HIF-1 α no citoplasma (MCMAHON et al., 2006; AMBALAVANAN et al., 2008). No entanto, no nosso modelo, nós não observamos diferenças significativas deste gene nos órgãos avaliados (intestino e pulmão) devido às variações encontradas dentro de um mesmo grupo. Possivelmente, essas variações devem-se ao *background* genético destes animais, pois apesar destes camundongos estarem em homozigose para os genes reguladores da reação inflamatória aguda eles apresentam um fundo genético heterogêneo.

Avaliar o perfil de expressão gênica é uma abordagem muito importante, na qual podemos candidatar genes aos possíveis reguladores de determinados fenótipos, bem como caracterizar processos biológicos que os definiram. Porém sabe-se que esta abordagem detecta apenas alterações em nível de transcrição, enquanto vários genes passam por processos de regulação pós-transcricional, na qual afetam a estabilidade do mRNA, início da tradução e a estabilidade da proteína. Assim, avaliamos a expressão específica da proteína HIF1- α , e analisamos também, em um contexto geral o perfil proteico do pulmão dos animais submetidos à I/Ri. Nossas análises até o presente momento demonstraram uma maior mobilização leucocitária com

predominância de granulócitos na circulação intestino e pulmão dos camundongos AIRmax I/Ri.

De encontro dos resultados anteriores, as análises de citometria de fluxo demonstraram uma predominância de granulócitos (Ly6G⁺CD11b⁺) no parênquima pulmonar. No mesmo sentido, ao avaliar a expressão intracelular da proteína HIF-1 α nos granulócitos infiltrados no pulmão de ambas as linhagens, observamos uma pronunciada população de células com o fenótipo HIF1- α ⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ nos camundongos AIRmax submetidos à I/Ri. Por outro lado, a ausência de expressão do fator de transcrição HIF1- α nos camundongos AIRmin no período avaliado reflete o fenótipo observado nesta linhagem, o qual proporcionou uma resistência à lesão inflamatória devido à isquemia e reperfusão intestinal.

Corroborando os nossos resultados, Feinman e colaboradores (2010), utilizando o procedimento de I/R da artéria mesentérica superior em camundongos C57Bl/6 selvagens (Hif1a^{+/+}) e parcialmente deficientes de HIF-1 α (Hif1a^{+/-}), evidenciaram na mucosa intestinal um fenótipo proteico semelhante ao que observamos no pulmão. Utilizando a técnica *Western Blotting*, estes autores observaram que os camundongos selvagens apresentaram um pronunciado aumento dos níveis proteicos de HIF-1 α quando comparados aos seus respectivos controles falso operados. No entanto, os animais parcialmente deficientes de HIF-1 α apresentaram níveis extremamente baixos desta proteína (FEINMAN et al., 2010).

Ao avaliar o perfil proteico pulmonar global por análise em Gel de Duas Dimensões (2D SDS-PAGE), o qual separa as proteínas de acordo com o ponto isoelétrico (migração eletroforética em gradiente de pH) e tamanho (peso molecular) nós observamos diferenças proteicas quantitativas e qualitativas entre as linhagens. Após o sequenciamento foram identificadas proteínas envolvidas nos processos de adesão celular, migração, metabolismo energético, transporte de oxigênio e apoptose, além de proteínas de membrana e participantes do ciclo celular. Foi observada uma correlação positiva entre o fenótipo inflamatório no pulmão dos camundongos AIRmax e o perfil de expressão proteica. Dentre as proteínas sequenciadas destaca-se a proteína S100A9, classificada como alarmina ou DAMP (*Damage-associated molecular pattern*). Está proteína somente foi detectada nos pulmões dos camundongos

AIRmax I/Ri. Este resultado vai ao encontro com o fenótipo observado na linhagem AIRmax, visto o papel desta proteína na modulação da resposta inflamatória.

As alarminas são moléculas intracelulares primariamente envolvidas na homeostase celular, no entanto, também podem atuar como sinalizadoras extracelulares de dano ou podem ser secretadas por células ativadas. A expressão desta proteína tem sido observada em células mielóides, incluindo, granulócitos, monócitos e macrófagos, bem como células endoteliais. Estas moléculas interagem com componentes do citoesqueleto dependente de cálcio, os quais são críticos para a migração de fagócitos. Atuam também, sobre as células endoteliais aumentando a expressão de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias, resultando na perda do contato célula a célula e aumento da permeabilidade vascular. Está descrito que a proteína A100A9 aumenta a afinidade do receptor de integrinas CD11b/CD18 sobre os neutrófilos promovendo a adesão destas células ao endotélio, resultando no aumento do extravasamento leucocitário durante a inflamação (EHRCHEN, et al., 2009). Além disso, foi observado que esta proteína atua como um ligante endógeno de TLR4 (Toll Like 4), envolvida na amplificação dos efeitos do LPS (lipopolissacarídeos) sobre os fagócitos. Desta forma, camundongos S100A9^{-/-} mostraram uma clara redução da resposta inflamatória ao LPS (EHRCHEN et al., 2009).

A proteína Mtap4 (Proteína 4 associada ao microtúbulo) é conhecida por se ligar, polimeriza e estabiliza os microtúbulos. Por outro lado, a desestabilização dos microtúbulos tem sido descrita em associação com a iniciação ou progressão do apoptose em certos tipos celulares. Alguns estudos identificaram uma diminuição da expressão do gene e da proteína Mtap4 após a indução de apoptose via p53. O gene p53 codifica a proteína supressora tumoral que age como indutor de transcrição ligando-se diretamente ao promotor de seus genes alvo, os quais são envolvidos no bloqueio do ciclo celular (MURPHY, 1996). Katz e colaboradores (2012) ao avaliar a capacidade de reparo do DNA após indução de citotoxicidade e genotoxicidade por DMBA (7,12 dimetilbenzentraceno) observou que os camundongos AIRmax apresentam uma maior capacidade de reparo do DNA e uma maior expressão do gene *Parp1*, cuja função é restaurar a integridade genômica.

Por outro lado, os camundongos AIRmin apresentaram maior expressão de *p53* e *caspase 3* e consequentemente um bloqueio do ciclo celular (KATZ, 2012). Em nosso estudo nós somente detectamos níveis protéicos da proteína Mtap4 nos camundongos AIRmax. Esses resultados estão de acordo com KATZ (2012), indicando que os camundongos AIRmax apresentam mecanismos de reparo do DNA mais eficiente, os quais tornam os neutrófilos desta linhagem resistentes a apoptose, agravando a lesão tecidual. Por outro lado, a ausência de expressão desta proteína nos camundongos AIRmin pode estar relacionada com a indução de morte programada via *p53*. No mesmo sentido, o Fator inicial de tradução eucariótica (*Eif5a*), o qual está envolvido na dinâmica celular e nos mecanismos de ciclo celular e apoptose *p53* dependentes foram mais expressos nos camundongos AIRmin.

Muitas das proteínas associadas aos rearranjos do citoesqueleto e conformação das fibras de actina, tais como Profilina-1 (Pfn1), Tropomiosina cadeia beta, (Tpm2), Queratina tipo II citoesqueleto1(Krt1) foram diferencialmente expressas no pulmão dos camundongos AIRmax I/Ri. A proteína Profilina-1 é conhecida por apresentar um papel crucial no desenvolvimento e na reestruturação precoce do esqueleto de actina, entretanto seu papel em doenças é pouco estudado. A Tropomiosina é uma clássica proteína envolvida na contração das células endoteliais e musculares. O aumento de Ca^{++} intracelular leva a uma mudança conformacional, a qual permite que a miosina se ligue com a actina resultando na contração endotelial e aumentando os espaços entre as células. A Krt1 é um filamento intermediário do citoesqueleto (STARR et al., 2011). A associação em conjunto destas proteínas exerce um papel na manutenção da barreira epitelial, migração e permeabilidade vascular.

A proteína anti-inflamatória Anexina 1 é um potente mediador inflamatório da família de proteínas ligantes de fosfolipídios dependentes de cálcio e expressa constitutivamente em muitas células, incluindo os neutrófilos. Em nosso modelo, observamos uma maior expressão desta proteína no pulmão dos camundongos AIRmax quando comparados aos AIRmin. GUIDO e colaboradores (2013), ao avaliar o papel da Anexina-A1 como regulador endógeno da injúria proporcionada pela isquemia e reperfusão intestinal em linhagens de camundongos isogênicos C57Bl/6, observou uma redução dos

neutrófilos no pulmão e um aumento destas células nos vasos sanguíneos após tratamento com peptídeo Ac2-26- Anexina 1.

Uma vez que a linhagem AIRmax possui maior capacidade desenvolver resposta inflamatória após indução de I/R intestinal, faz-se necessário a indução de mediadores responsáveis pela retomada da homeostase. Sabe-se que esta linhagem tem a habilidade de responder mais rapidamente a um estímulo inflamatório do que a linhagem AIRmin, além disso, dados obtidos no nosso laboratório demonstram que os camundongos AIRmax resolvem mais rapidamente inflamações pulmonares, enquanto que a linhagem AIRmin apresentam um processo mais lento e prolongado, levando a uma inflamação crônica com consequências neoplásicas (RIBEIRO et al., 2005).

De acordo com os dados obtidos até o momento, podemos inferir que o processo de lesão de isquemia e reperfusão, constitui um fenótipo complexo decorrente de elementos moleculares e celulares em desequilíbrio, na tentativa do organismo retornar à condição de homeostase. Tudo indica que o HIF-1 α possua um papel central na iniciação e na manutenção da inflamação promovida pela carência de oxigênio. Além disso, fatores ambientais como a diversidade da microbiota e a translocação bacteriana, cujos valores correlacionam-se positivamente com a intensidade da reação inflamatória induzida pela I/Ri, podem estar operando de maneira diferenciada nestas linhagens.

Portanto, a utilização de um modelo de camundongos fenotipicamente selecionados para características inflamatórias no estudo desse fenótipo complexo, cujas características são amplas e diversificadas, pode ser uma estratégia interessante e adequada para a melhor compreensão da prevalência e do potencial patogênico dos desdobramentos de isquemias, visando à elaboração de estratégias terapêuticas eficazes para a intervenção em mecanismos inflamatórios pontuais, sem comprometer a resposta imune inata. As linhagens AIRmax e AIRmin assumem, portanto, este papel por apresentarem fenótipos opostos de sensibilidade e resistência à indução de processos inflamatórios, além de manter um fundo genético heterogêneo, característico de uma população natural.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os Camundongos AIRmax são mais sensíveis aos efeitos deletérios da injúria provocada pela I/Ri por apresentarem mecanismos fisiopatológicos divergentes dos camundongos AIRmin, os quais proporcionam uma amplificação da resposta inflamatória aguda.

O aumento de bactérias translocadas para os linfonodos mesentéricos e baço observado na linhagem AIRmax pode contribuir para a amplificação da resposta inflamatória sistêmica.

O fator de transcrição HIF-1 α demonstrou ter um papel fundamental na regulação da resposta inflamatória pulmonar após I/R neste modelo experimental de inflamação aguda (Linhagens AIRmax e AIRmin)

O aumento de expressão de proteínas envolvidas na adesão e migração celular via rearranjos do citoesqueleto e alarminas pode ser responsável pelo fenótipo de alta resposta inflamatória nos AIRmax. Por outro lado, a menor expressão destas proteínas e uma maior expressão de proteínas envolvidas na apoptose via p53 estão de acordo com o perfil de baixa resposta inflamatória da linhagem AIRmin

Os mecanismos reguladores da resposta a hipóxia estão associados com a AIR após indução de I/Ri indicando compartilhamento de genes reguladores destes dois fenômenos inflamatórios e co- segregação dos mesmos.

REFERÊNCIAS

REFERENCIAS*

ABRAHAM, E. Neutrophils and acute lung injury. **Crit Care Med.**, v. 31, p.195-199, 2003.

AMBALAVANAN, N.; NICOLA, T.; HAGOOD, J.; BULGER, A.; SERRA, R.; MURPHY-ULLRICH, J.; OPARIL, S.; and CHEN, Y.F. Transforming growth factor- β signaling mediates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling and inhibition of alveolar development in newborn mouse lung. **AM. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v.295, p. 86–95, 2008.

ANDRADE-OLIVEIRA, V.; AMANO, M. T.; CORREA-COSTA, M.; CASTOLDI, A.; FELIZARDO, R. J.; DE ALMEIDA, D. C.; BASSI, E. J.; MORAES-VIEIRA, P. M.; HIYANE, M.I.; RODAS, A. C.; PERON, J. P, AGUIAR, C. F; REIS, M. A; RIBEIRO, W.R.; VALDUGA, C. J.; CURI, R., VINOLO, M. A; FERREIRA, C. M; CÂMARA, N. O. Gut Bacteria Products Prevent AKI Induced by Ischemia-Reperfusion. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v 26, p.1-12, 2015.

ARAUJO, L. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO. M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W. H. K.; MOUTON, D.; SEMAN. M.; IBAÑEZ, O. M. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 2913-2920, 1998.

BAEZ, S. An open cremaster muscle preparation for study of blood vessels by in vivo microscopy. **Microvasc. Res.**, v 5; n. 3; p.384-394, 1973.

BERG, R. D. Bacterial translocation fom the gastrointestinal tract. **J. Med.**, v. 8, p. 217-244, 1992.

BEYRAU, M.; BODKIN, J.V.; NOURSHARGH, S. Neutrophil heterogeneity in hath and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. **Open boil.**, v.2, p. 120-134, 2013.

BERNARD, G. R. Research in sepsis and acute respiratory distress syndrome: are we changing course? **Crit. Care Med.**, v. 27, p. 434-436, 1999.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAUJO, L. M.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. K.; SANT'ANNA, O. A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O .M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v.19, p. 237-246, 1998.

BORREGAARD, N.; HERLIN, T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. **J. Clin. Invest.**, v. 70, p. 550-557, 1982.

BORREGO, A.; PETERS, L. C.; JENSEN, J. R; RIBEIRO,O. G.; CABRERA, W. H. K.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M.

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

Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate Scl11a1 gene (Formely Nramp1) effects in selected mouse line. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 2766-2771, 2006.

BRUNING, U.; CERONE, L.; NEUFELD, Z.; FITZPATRICK, S.F.; CHEONG, A.; SCHOLZ, C.C.; SIMPSON, D.A.; LEONARD, M.O.; TAMB UWALA, M.M.; CUMMINS, E.P.; TAYLOR, C.T. MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1alpha activity during prolonged hypoxia. **Mol. Cell Biol.**, v. 31, p. 4087-4096, 2011.

BURKE, D. L; FRID, M. G; KUNRATH, C. L.; KAROOR , V.; ANWAR, A.; WAGNER, B. D.; STRASSHEIM, D.; STENMARK, K. R. Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** v. 297, p.238-250, 2009.

BYARD, R.W. Acute mesenteric ischaemia and unexpected death. **J Forensic Leg. Med.**, v.19, p.185-190, 2012.

CARDEN, D. L.; GRANGER, D. N. Pathophysiology of Ischemia-reperfusion injury. **J. Pathol.**, v. 190, p. 255-66, 2000.

CARVALHO, L. R. **Inflamação e Câncer hepático e pulmonar em camundongos geneticamente selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Imunologia Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CAVRIANI, G.; OLIVEIRA-FILHO, R. M; TREZENA, A.G.; DA SILVA, Z.L; DOMINGOS, H.V.; DE ARRUDA, M.J.; JANCAR, S.; TAVARES DE LIMA, W. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. **Eur. J. Pharmacol.**, v.494, p. 241-249, 2004.

CHIUMELLO, D.; PRISTINE, G.; SLUTSKY, A. S. Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress. **Am. J Respir. Crit. Care Med.**, v. 160, p. 109-116, 1999.

CONDLIFFE, A. M.; CHILVERS, E. R.; HASLETT, C.; DRANSFIELD, I. R. Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. **Immunology**, v. 89, p. 105-111, 1996.

COSTA, Layra Lucy Maria Albuquerque da. **Mielopoese em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda.** 2008. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

COSTA, Layra Lucy Maria Albuquerque da. **Estudo dos genes e proteínas envolvidos na regulação da mielopoese em modelo murino de resposta inflamatória aguda**. 2013. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CRAMER, T.; YAMANISHI, Y.; CLAUSEN, B. E.; FÖRSTER, I.; PAWLINSKI, R.; MACKMAN, N.; HAASE, V. H.; JAENISCH, R.; CORR, M.; NIZET, V.; FIRESTEIN, G. S.; GERBER, H. P.; FERRARA, N.; JOHNSON, R. S. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. **Cell**, v. 112, p. 645-657, 2003.

DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. **Inflamm. Res.**, v.46, p.382-391, 1997.

DAO-FENG, B.; XI-YA, Y.; GUANG-YU, J.; DE-YI, Z.; KAI-YANG, L.V. ; BING, M. A.; ZHAO-FAN, X. TLR4 Mediates Lung Injury and Inflammation in Intestinal Ischemia- Reperfusion. **J. Surg. Res.**, v. 174, p. 326–333, 2012.

DARIEN, B.J.; STONE, W. C.; DUBIELZIG, R. R.; CLAYTON, M. K. Morphologic changes of the ascending colon during experimental ischemia and reperfusion in ponies. **Vet. Pathol.**, v.32, n.3, p.280-8 1995.

DE PERROT, M.; LIU, M.; WADDELL, T. K.; KESHAVJEE, S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v.167, p. 490-511, 2003.

DE SOUZA, V. R. C.; CABRERA, W. H. K.; GALVAN, A.; RIBEIRO, O. G; DE FRANCO, M.; VORRARO, F.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; DRAGANI, T. A.; IBÁÑEZ, O. M.; Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. **Int. J. Câncer**, v.124, p. 1478-1482, 2009.

DEHNE, N; BRÜNE, B. HIF-1 in the inflammatory microenviroment. **Exp. Cell. Res.**, v. 315, n.11, p.1791-7, 2009.

DEITCH, E. A. Bacterial translocation of the gut flora. **J. Trauma**. v. 30, p. 184-189, 1990.

DU, J.; LI, X.; LIN, C.; HE, X. Protective Effects of Arachidonic Acid Against. Paraquat-Induced Pulmonary Injury. **Inflammation**, v. 15, p. 120-126, 2015.

ELINAV, E.; STROWING, T.; KAU, A.L.; HENAO-MEJIA, J.; THAISS, C.A.; BOOTH, C.J.; PEAPER, D.R.; BERTIN, J.; EISENBARTH, S.C.; GORDON, F.I.; FLAVELL, R.A. NLRP6 inflamassome regulates colonic microbia ecology and risk for colitis. **Cell.**, v.145, p.745-757, 2011.

EHRCHEN, J. M.; SUNDERKÖTTER, C.; FOELL, D.; VOGL, T.; ROTH, J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as

innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. **J. Leukoc. Biol.**, v. 86, p. 557-566, 2009)

KLAR, E.; RAHMANIAN, P. B.; BÜCKER, A.; HAUENSTEIN, K.; JAUCH, K. W.; LUTHER, B. Acute Mesenteric Ischemia: a Vascular Emergency. **Dtsch. Arztebl. Int.** v. 109, p. 249-256, 2012.

FEINMAN, R.; DEITCH, E.A.; WATKINS, A. C.; ABUNGU, B.; COLORADO, I.; KANNAN, K. B.; SHETH, S. U.; CAPUTO, F. J.; LU, Q.; RAMANATHAN, M.; ATTAN, S.; BADAMI, C. D.; DOUCET, D.; BARLOS, D.; BOSCH-MARCE, M.; SEMENZA, G. L; XU, D. Z. HIF-1 mediates pathogenic inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion injury. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.299, p. 833-43, 2010.

FELTES, C. M; HASSOUN, H. T; LIE, M. L; CHEADLE, C.; RABB, H. Pulmonary endothelial cell activation during experimental acute kidney injury. **Shock**, v.36, p. 170–176, 2011.

FRANCO, M. D.; COLOMBO, F.; GALVAN, A.; CECCO, L. D.; SPADA, E.; MILANI, S.; IBANEZ, O. M.; DRAGANI, T. A. Transcriptome of normal lung distinguishes mouse lines with different susceptibility to inflammation and to lung tumorigenesis. **Cancer Lett.**, v. 294, p. 187-94, 2010.

GIELIS, J. F; JUNGRAITHMAYR, W.; BOULET, G. A; BOGERS, J. P; WEDER, W.; COS, P.; VAN SCHIL, P. A murine model of lung ischemia and reperfusion injury: tricks of the trade. **J. Surg. Res.**, v.4804, p.1-8, 2014.

GONÇALVES, C.R, VAZ, TMI; PISANI, B; SIMÕES M.; LEITE D.; PRANDI, M.M. Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter agglomerans* in Campinas. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 42, p. 1-7, 2000.

GRISHAM, M. B.; HERNANDEZ, L. A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. 567-574, 1986.

GUIDO, B. C; ZANATELLI, M.; TAVARES-DE-LIMA, W.; OLIANI, S .M; DAMAZO, A. S. Annexin-A1 peptide down-regulates the leukocyte recruitment and up-regulates interleukin-10 release into lung after intestinal ischemia-reperfusion in mice. **J Inflamm. (Lond)**, v.10, p.1-10, 2013.

HALLDORSSON, A. O.; KRONON, M. T.; ALLEN, B. S.; RAHMAN, S.; WANG, T. Lowering reperfusion pressure reduces the injury after pulmonary ischemia. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 69, p. 198-203, 2000.

HAMILTON, R. F JR.; BUFORD, M.; XIANG, C.; WU, N.; HOLIAN, A. NLRP3 inflammasome activation in murine alveolar macrophages and related lung pathology is associated with MWCNT nickel contamination. **Inhal. Toxicol.**, v.14, p. 995-1008, 2012.

HARKIN, D. W.; BARROS, D. 'SA A. A.; MCCALLION, K.; HOPER, M.; HALLIDAY, M. I.; CAMPBELL, L. F. C. Bactericidal/permeability-increasing protein attenuates systemic inflammation and acute lung injury in porcine lower limb ischemia-reperfusion injury. **Ann. Surg.**, v. 234, p. 233-44, 2001.

HASLETON, P. S.; ROBERTS, T. E. Adult respiratory distress syndrome -an update. **Histopathology**, v.34, p. 285-294, 1999.

HEFLIN, A. C.; BRIGHAM, K. L. Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. **J. Clin. Invest.**, v. 68 p. 1253–1260, 1981.

HELLWING-BURGEL, T.; STIEHL, D. P.; WAGNER, A. E.; METZEN, E.; JELKMANN, W. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 25, p. 297-310, 2005.

HUDSON, L. D.; STEINBERG, K. P. Epidemiology of acute lung injury and ARDS. **Chest.**, v. 116, p. 74-82, 1999.

HUGHES, S. F.; HENDRICKS, B. D.; EDWARDS, D. R.; BASTAWROUS, S.; ROBERTS, G. E.; MIDDLETON, J. F. Mild episodes of tourniquet-induced forearm ischaemia-reperfusion injury results in leukocyte activation and changes in inflammatory and coagulation markers. **J. Inflamm.**, v. 4, p.12-18, 2007.

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

JIANG, Y.; DAI, A.; Li, Q.; Hu, R. Hypoxia induces transforming growth factor-beta1 gene expression in the pulmonary artery of rats via hypoxia-inducible factor-1alpha. **Acta. Biochim. Biophys. Sin.**, v. 39, p. 73-80, 2007.

KANNAN, K. B.; COLORADO, I.; REINO, D.; PALANGE, D.; LU, Q.; QIN, X.; ABUNGU, B.; WATKINS, A.; CAPUTO, F.J.; XU, D.Z.; SEMENZA, G.L.; DEITCH, E.A.; FEINMAN, R. Hypoxia-inducible factor plays a gut-injurious role in intestinal ischemia reperfusion injury. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 300, p. 853-61, 2011.

KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO-JULIAN, F.; MANTOVANI, A.; FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol.**, v. 24, p. 25-29, 2003.

KATZ, Iana Suly Santos. Mielotoxicidade por 7,12-dimetilbenzantraceno e sua repercussão na resposta imunológica dos camundongos AIRmax e AIRmin. 2012. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

KATZ, I. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; SUPPA, A. P.; DE SIQUEIRA, D. M.; ROSSATO, C.; DA SILVA, G. B.; JENSEN, J. R.; STAROBINAS, N. .; DE FRANCO, M.; BORELLI, P.; IBÁÑEZ, O. M.; RIBEIRO, O. G. 7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene-induced myelotoxicity differs in mice selected for high or low acute inflammatory response: relationship with aryl hydrocarbon receptor polymorphism. **Int. J. Toxicol.**, v.33, p.130-142, 2014.

KELSALL, B. L. Innate and adaptive mechanisms to control pathological intestinal inflammation. **J. Pathol.**, v. 214, p. 242-259, 2008.

KIZAKA-KONDOH, S.; TANAKA, S.; HARADA, H.; HIRAOKA, M. The HIF-1-active microenvironment: An environmental target for cancer therapy. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 61, p. 623–632, 2009.

KONG, X.; LIN Z.; LIANG D.; FATH D.; SANG N.; CARO. J. Histone Deacetylase Inhibitors Induce VHL and Ubiquitin-Independent Proteasomal Degradation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α . **Mol. Cell Biol.**, v. 26, n. 6, p. 2019-28, 2006.

KRISHNADASAN, B.; NAIDU, B. V.; BYRNE, K.; FRAGA, C.; VERRIER, E. D.; MULLIGAN, M. S. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.125, p. 261-272, 2003.

LARA, P. G. **Efeito do veneno de *Tutyus serrulatus* em camundongos selecionados geneticamente para máxima ou mínima resposta inflamatória.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Imunologia Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

LAMMERS, K. M.; INNOCENTI, G.; VENTURI, A.; RIZZELLO, F.; HELWIG, U. The effect of transient intestinal ischemia on inflammatory parameters. **Int. J. Colorectal Dis.**, v. 18, p.7, 2003.

LEE, Y.K.; MAZMANIAN, S. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? **Science**, v. 330, n.6012, p.1768-7173, 2010.

LEE, J .W.; BAE, S. H.; JEONG, J. W.; KIM, S. H.; KIM, K. W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its proteinsability and biological functions. **Exp. Mol. Med.**, v. 36, n.1, p. 1-12, 2004.

LEY, K.; LAUDANNA, C; CYBULSKKY, M. I; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature rev.**, v.7, p. 678-689, 2007.

LEWIS, J. S.; LEE, J. A.; UNDERWOOD, J. C.; HARRIS, A. L.; LEWIS, C. E. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66, p. 889- 900, 1999.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻[Delta Delta C(T)]. **Methods.**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOFFROY, R.; GUIU, B.; CERCUEIL, J-P, ADDOM, D.K. Chronic mesenteric ischemia: efficacy and outcome of endovascular therapy. **Epub.**, v. 35, n.3, p. 306-14, 2009.

MARIA, D. A.; MANENTI, G.; GALBIATI, F.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H. K.; BARRERA, R. G.; PETTINICHIO, A.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA, M.; DRAGANI, T. A.; IBÁÑEZ, O. M. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas 1) locus affects inflammatory response. **Oncogene**, v. 22, p. 426-432, 2003.

MARTINON, F. Dangerous liaisons: mitochondrial DNA meets the NLRP3 inflammasome. **Immunity.** v. 36, p.313-315, 2012.

MAXWELL, P. H.; WIESENER, M. S.; CHANG, G. W.; CLIFFORD, S. C.; VAUX, E. C.; COCKMAN, M. E.; WYKOFF, C. C.; PUGH, C. W.; MAHER, E. R.; RATCLIFFE, P. J. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. **Nature.**, v. 399, p. 271-275, 1999.

MCMAHON, S.; CHARBONNEAU, M.; GRANDMONT, S.; RICHARD, D. E.; DUBOIS, C. M. Transforming grow factor β 1 induces Hypoxia- inducible Factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. **J. Biol Chem.**, v. 281, n. 34, p. 24171-24181, 2006.

MILKIEWICZ, M.; HUDLICKA, O.; BROWN, M.D.; SILGRAM, H. Nitric oxide, VEGF, and VEGFR-2: interactions in activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 289, p. H336-H343, 2005.

MINAMIYA, Y.; MOTOYAMA, S.; KITAMURA, M.; SAITO, S.; TERADA, K.; OGAWA, J. The requirement of intercellular adhesion molecule-1 for neutrophil respiratory burst in the pulmonary circulation of rats infused with endotoxin. **Am.J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 158, n.2, p. 635-42, 1998.

MUEHLSTEDT, S. G.; RICHARDSON, C. J.; LYTE, M.; RODRIGUEZ, J. L. Systemic and pulmonary effector cell function after injury. **Crit Care Med.**, v.30, n.6, p. 1322-1326, 2002.

MURA, M.; HAN, B; ANDRADE, C. F.; SETH,R.; HWANG, D.; WADDELL, T. K.; KESHAVJEE, S.; LIU, M. The early responses of VEGF and its receptors during acute lung injury: implication of VEGF in alveolar epithelial cell survival. **Crit. Care.**, v.10, n.5, p. 130, 2006.

MURPHY, M.; HINMAN, A.; LEVINE, A.J. Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule- associated protein. **Genes & Dev.**, v. 10, p. 2971-2980, 1996.

NEUGEBAUER, H.; HARTMANN, P.; KRENN, S.; GLÜCK, T.; SCHÖLMERICH, J.; STRAUB, R.; WIEST, R. Bacterial translocation increases phagocytic activity of polymorphonuclear leucocytes in portal hypertension: priming independent of liver cirrhosis. **Liver Int.**, v.28, p.1149-57, 2008.

NILAKANTAN, V.; LIANG, H.; MAENPAA, C. J.; JOHNSON, C. P. Differential patterns of peroxynitrite mediated apoptosis in proximal tubular epithelial cells following ATP depletion recovery. **Apoptosis.**, v. 13, n. 5, p. 621-33,2008.

PALAZON, A.; GOLDRATH, A. W.; NIZET, V.; JOHNSON, R. S. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. **Immunity**, v.41, n.4, p.518-28, 2014.

PAPANDREOU, I.; POWELL, A.; LIM A. L.; DENKO, N. Cellular reaction to hypoxia: sensing and responding to an adverse environment. **Mutat. Res.**, v. 569, p. 87-100, 2005.

PARKS, D. A.; BULKLEY, G. B.; GRANGER, D. N.; HAMILTON, S. R.; MCCORD, J. M. Isquemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. **Gastroenterology**, v. 92, n.5, p. 896-901, 1982.

POON, E.; HARRIS, A. L. E.; ASHCROFT, M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v.11. p. 26, 2009.

PORTUGAL-COHEN, M.; KOHEN, R. Exposure of human keratinocytes to ischemia, hyperglycemia and their combination induces oxidative stress via the enzymes inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase. **J. Dermatol. Sci.**, v. 2, p.82-90. 2009.

REIGNIER, J.; SELLAK, H.; LEMOINE, R.; LUBINEAU, A.; MAZMANIAN, G. M.; DETRUI, H.; CHAPELIER, A.; HERVÉ, P. Prevention of ischemia-reperfusion lung injury by sulfated pentasaccharide. **J. Appl. Physiol.**, v. 82, p.1058-1063, 1997.

REISS, L. K; UHLIG, U.; UHLIG, S. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. **Eur. J. Cell Biology**, v. 91, p.590-601, 2012.

RIBEIRO FILHO, O. G. **Controle Genético da Inflamação**, Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1994.

RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K. H.; MARIA, D. A.; MORISSET, J.; DE FRANCO, M.; MASSA, S.; DI PACE, R. F.; DE SOUZA, V. R.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M. IBAÑEZ, O. M. Genetic Selection for High Acute Inflammatory

Respose Confers Resistance to lung carcinogenesis in the Mouse. **Lung Res.**, v. 31, p. 105-116, 2005.

RIBEIRO, O. G.; MARIA, D. A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W. H.; MORISSET, J.; IBAÑEZ, O. M; SEMAN, M. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, n. 4, p. 497-506, 2003.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PERALTA, C.; ROSELLO-CATAFAU, J.; PALMEIRA, C. M. Prevention of I/R injury in fatty livers by ischemic preconditioning is associated with increased mitochondrial tolerance: the key role of ATP synthase and mitochondrial permeability transition. **Transpl. Int.**, v. 22, p. 1081-1090, 2009.

SCHWARZ, M. I. ; ALBERT, R. K. Imitators" of the ARDS: implications for diagnosis and treatment. **Chest.** , v. 25, n. 4, p.1530-1535, 2004.

SEMENZA, G. L Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. **Annu. Rev. Med.**, v. 54, p. 17-28, 2003.

SEMENZA, G. L. HIF-1 and human disease: one highly involver factor. **Genes Development.**, v.14, p.1983-1991, 2007.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor-1: control of oxygen homeostasis in health and disease. **Pediatr. Res.**, v. 49, p. 614- 617, 2001a.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor-1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. **Trends Mol. Med.**, v. 7, p. 345-350, 2001b.

SEMENZA, G. L. Regulation of Oxygen Homeostasis byHypoxia-Inducible Factor 1. **Physiology**, v. 2, p. 97-106, 2008.

SEMENZA, G. L. Oxygen Sensing Hipoxia- Inducible Factors and Disease Pathophysioly. **Annu. Rev. Pathol.**, v.9, p.47-71, 2014.

SENTHIL M.; WATKINS A.; BARLOS D.; XU D-Z.; ABUNGU B. CAPUTO F. FEINMAN R. DEITCH E.A. Intravenous injection of trauma-hemorrhagic shodk mesenteric lymph causes lung injury that is dependent upon activation of the nitric synthase pathway. **Annals of Surg.**, v.246, n. 5, p. 822-830, 2007.

SHARMA, K. A.; FERNANDES, L. G.; AWAD, A. S.; KRON, I. L.; LAUBACH, V. E. Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhaced by alveolar macrophage- produced TNF- α during pulmonary ischemia- reperfusion injury. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 293, p. 105- 113, 2007.

SHERIDAN, M.; DONNELLY, M.; BAILIE, R.; POWER, M.; SEIGNE, P.; AUSTIN, S.; MARSH, B.; MOTHERWAY, C.; SCULLY, M.; FAGAN, C.;

BENSON, P.; MCAULEY, D.; TRINDER, J.; BATES, J.; BAILIE, K. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in Ireland: a prospective audit of epidemiology and management. **Crit. Care**, v. 12, n.1, p. 30, 2008.

SHIH, D.Q. e TARGAN, S.R. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, V.14, n.3, p.390-400, 2008

SIQUEIRA, Débora Mathias de. **Estudo da correlação entre a expressão de genes reguladores do estado de hipóxia e a intensidade da resposta inflamatória aguda**. 2009. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOYDAN, G.; CEKIÇ, E. G.; TUNCER, M. Endothelial Dysfunction in the Mesenteric Artery and Disturbed Nonadrenergic Noncholinergic Relaxation of the Ileum due to Intestinal Ischemia-Reperfusion Can Be Prevented by Sildenafil. **Pharmacology**, v. 84, p.61-67, 2009.

STANILOAE, C. S. The New State of the Art in Endovascular Treatment of Chronic Mesenteric Ischemia. **J. endovasc ther.**, v. 19, p.495–496 , 2012.

STARR, E. M; UEDA, J.; YAMAMOTO, S; EVERS A, M.; SAITO, H. The effects of aging on pulmonary oxidative damage, protein nitration, and extracellular superoxide dismutase down-regulation during systemic inflammation. **Free Radic. Biol. Med.**, v.50, p. 371–380, 2011.

STIFFEL, C.; IBANEZ, O. M; RIBEIRO, O. G.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. **Exp. Clin. Immunogenet.**, v.7, n. 4, p.221-33,1990.

SUPPA, Alessandra Paes. **Estudo da expressão dos genes regulatórios de hipóxia durante a inflamação pulmonar produzida pela isquemia e reperfusão intestinal em camundongos AIRmax e AIRmin**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TADROS, T.; TRABE, D. L.; HEGGERS, J. P.; HERNDON, D. N. Effects of interleukin-1alpha administration on intestinal ischemia and reperfusion injury, mucosal permeability, and bacterial translocation in burn and sepsis. **Ann. Surg.**, v. 237, n.1, p.101-109, 2003.

TANG, B.; WANG, Z.; QI, G.; YUAN, S.; YU, S; LI, B.; WEI, Y.; HUANG, Q.; ZHAI, R.; HE, S. MicroRNA-155 deficiency attenuates ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in mice. **Transpl. Int.** 2015.

TANG, P. S.; MURA, M.; SETH, R.; LIU, M. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 294, n. 4, p.632-641, 2008.

TSUJIMOTO, H.; ONO S.; MOCHIZUKI, H. Role of Translocation of Pathogen-Associated Molecular Patterns in Sepsis. **Dig. Surg.**, v.26, p.100-109, 2009.

VAN LEEUWEN, P. A. M.; BOERMEESTER, M. A.; WESDORP, R. I. C Clinical significance of translocation. **Gut**, v. 35, p.28–34, 1994.

VAN SOEREN, M. H.; DIEHL-JONES, W. L.; MAYKOT, R. J.; HADDARA, W. M. Pathophysiology and implications for treatment of acute respiratory distress syndrome. **AACN Clin. Issues.**, v. 11, p. 179-197, 2000.

VOLMAR, B. e MENDER, M.D. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and function consequences. **Langenbecks Arch Surg.**, v. 396, p. 13-29, 2011.

VORRARO, F.; GALVAN, A.; CABRERA, W.H.; CARNEIRO, P. S.; RIBEIRO, O. G; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; JENSEN, J. R.; SEMAN, M.; DRAGANI, T. A; IBAÑEZ, O. C. Genetic control of IL-1 beta production and inflammatory response by the mouse *Irm1* locus. **J Immunol.**, v.185, n.3, p.1616-21, 2010.

WAGNER, J. G.; HARKEMA, J. R.; ROTH, R. A. Pulmonary leukostasis and the inhibition of airway neutrophil recruitment are early events in the endotoxemic rat. **Shock**, v. 17, n. 2, p.151-158, 2002.

WALMSLEY, S. R.; CADWALLADER, K. A.; CHILVERS, E. R. The role of HIF-1a in myeloid cell inflammation. **Trends Immunol.**, v. 26, n.8, p. 434-439, 2005.

WELBOURN, C. R. B.; GOLDMAN, G.; PATERSON, I. S.; VALERI, C. R.; SHEPRO, D.; HECHTMAN, H. B. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. **J. Surg.**, v. 78, p. 651-655, 1991.

WHEELER, A. P.; CHRISTMAN, B.; SWINDELL, B. Lung dysfunction in sepsis: impact of ibuprofen. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 157, p. 115, 1998.

WUEST, R; GARCIA-TSAO, G. Bacterial translocation (BT) in Cirrhosis. **Hepatology**, V.41, n.3, p.422-33, 2005.

YASUHARA H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. **Surg. Today.**, v. 35, n.3, p. 185- 195, 2005.

ZHAO, H.; MONTALTO, M. C.; PFEIFFER, K. J.; HAO, L.; STAHL, G. L. Murine model of gastrointestinal ischemia associated with complement-dependent injury. **J. Appl. Physiol.**, v.93, n.1, p. 338-45, 2002.