Mirna Alameddine

Resposta molecular do endotélio pulmonar à exposição
aguda de material particulado fino

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Chin Jia Lin

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Alameddine, Mirna

Resposta molecular do endotélio pulmonar à exposição aguda de material
particulado fino / Mirna Alameddine. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Chin Jia Lin.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Material particulado 3.Endotélio 4.Pulmão
5.*Microarray* 6.Inflamação

USP/FM/SBD-446/09

Aos meus amados pais,
Fahd R. Alameddine e
Amal Z. Alameddine,
pelos valores que sustentaram minha formação
e de quem tenho muito orgulho.

Aos meus queridos irmãos,
Rima, Nabil e Dunia,
que tornam minha vida cada dia mais rica.

AGRADECIMENTOS

Durante um “café da tarde” num dia de abril de 2005, descubro as aventuras do Prof. Dr. Gyorgi M. Bohm ao estudar inflamação pulmonar na década de setenta. Seu relato apaixonado me contagiava, principalmente porque o assunto envolvia minha área formação, Pneumologia, e a de desejo de especialização, a circulação pulmonar. Estava numa fase reflexiva sobre os caminhos a percorrer após a residência, quando o que mais marcou o começo do meu Doutorado, e com certeza guardo como uma lição para vida, foi ele me dizer que “nas principais decisões, estamos sozinhos”.

Unindo minha decisão por um doutorado em disciplina básica, minha curiosidade pelo endotélio e minha admiração pela sua já conhecida extraordinária inteligência, fico grata pelo Prof. Dr. Chin Jia Lin me acolher nesta orientação. Apesar do Laboratório de Patologia Molecular ser recém-inaugurado na época, já nos primeiros meses foi recheado de idéias, propostas e projetos. Com o constante apoio do Prof. Carlos Augusto Pasqualucci, principalmente no suporte ao novo laboratório, e com as inúmeras idéias diárias do Prof. Paulo H. Nascimento Saldiva, nasceu a proposta de avaliar os efeitos da poluição sobre o endotélio pulmonar e o sistema cardiovascular. Assim, o Prof. Chin me surpreendeu mais uma vez com a sugestão de isolar células endoteliais do pulmão, com micro-imãs (descobri que isto existe!), e analisar a expressão gênica de endotélio exposto à poluição com uma nova plataforma, de *microarray* (mais uma novidade para mim). Enquanto esperávamos os materiais importados,

buscamos compreender o impacto da inflamação sobre o endotélio, utilizando um banco de dados público em que dados de *microarray* são depositados. Começou, então, o estudo de bioinformática e de métodos de análise de dados de *microarray* que culminou num trabalho que comparou a resposta endotelial pulmonar com outros tipos de endotélio ao estímulo de citocinas. Este trabalho foi fundamental para ganharmos familiaridade com as novas técnicas de análise e contribuiu para aprofundarmos o conhecimento de resposta molecular do endotélio pulmonar frente a estímulos inflamatórios. O trabalho é apresentado como um segundo capítulo desta tese.

De volta à primeira proposta, o árduo trabalho de padronizar métodos e de compreender os resultados inesperados foi acompanhado pela Profa. Dra. Thais Mauad, que abriu as portas dos Laboratório de Histologia e Imunohistoquímica. Sem o excelente trabalho das técnicas Cássia, Keila, Rose, Celina, Weluma e Sandra, o projeto não sairia do piloto. Mais dificuldades pelo caminho e mais pessoas abrindo as portas para desfazer barreiras. Na Patologia, a Sra Liduvina Barros, que diminui a carga de preocupações do aluno tomando iniciativas vitais para manter seu vínculo em ordem; o Sr. Cesar José de Oliveira, que sempre foi o ponto de comunicação entre os departamentos para todas as tarefas; o Dr. Luiz Pires e os Srs. Davi e Ivan do biotério do LIM 05, que não deixavam faltar recursos para os experimentos; as Dras. Dolores Rivero e Regiani de Oliveira, pelo auxílio na extração de material particulado e nas discussões sobre poluição e, por fim, mas fundamental para a conclusão do projeto, a

Dra. Emília M. Pinto, que com sua praticidade e objetividade, desafiou métodos e impôs um ritmo acelerado na obtenção de resultados. No Laboratório Central, a Profa. Dra. Leila D'Antonangelo, com suas discussões valiosas e seu colaborador Mestre César, com sua ajuda na contagem celular de tecidos e sangue. Muitas dúvidas de pesquisa básica e experimentos-piloto não seriam resolvidos se não fosse pela Dra. Suely Kubo, que doa seu suporte técnico “a qualquer hora”, e pelo Dr. Antonio Lerario, antecessor no aprendizado da metodologia utilizada e pronto para compartilhar os segredos do sucesso experimental. Parte da infra-estrutura utilizada no trabalho foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Hormônios, a quem agradeço nomeando a Profa. Dra. Berenice B. Mendonça. A revelação das membranas no Instituto de Ciências Biomédicas I só foi possível graças ao profissionalismo e amizade do aluno de mestrado Emerson Santos do Laboratório de Biologia das Neoplasias Bucais. E contrapondo muitas de minhas preocupações, diariamente encontrava a compreensão dos colegas de trabalho da AstraZeneca e o estímulo para conclusão da tese com sucesso.

Ao fim deste Programa de Doutorado, a tese escrita representa um trabalho de muitos. E meu maior aprendizado é que muitas pessoas caminham ao nosso lado até chegarmos ao solitário momento da decisão. A todos que caminharam ao meu lado, que deram suporte técnico e/ou emocional com seu “sim” e que me desafiaram com seu “não”, meus sinceros agradecimentos.

"Torrou no ar aos milhões com a pressa da ganância

*Portais e barreiras não contiveram sua trajetória de
meteoro*

*Grosseira, rompeu a delicada malha da vida com seus
tubos e fluidos*

*As lentes de Galileu e a matemática de Descartes
permitiram compreender este estrago*

*O respeito à Vida e a vontade do Homem permitem mudar
este destino"*

De um poeta que preferiu ficar anônimo

CAPÍTULO I

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS	58
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÕES	85
7. REFERÊNCIAS	86
CAPÍTULO II	100

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina de Soro Bovino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
cRNA	Ácido ribonucleico complementar
FDR	Taxa de falso positivo (do inglês. False Discovery Rate)
LBA	Lavado Broncoalveolar
MP	Material Particulado
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato; do inglês: <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCA	Análise de componente principal; do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>
SF	Soro Fisiológico
UTP	Uridina trifosfato (nucleotídeo)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Instilação intratraqueal de suspensão de MP	18
Figura 2 – Rendimento celular de pulmão e coração para determinação da concentração ideal de collagenase tipo I	22
Figura 3 – Resumo das etapas de revestimento das microesferas com anticorpo e isolamento celular	24
Figura 4 – Resultado de microeletroforese de RNA em chip	27
Figura 5a – Exemplo de formatação da membrana de <i>microarray</i>	30
Figura 5b – Cilindro contendo membrana de <i>microarray</i>	31
Figura 6 – Rendimento médio de células totais provenientes de pulmão e coração	60
Figura 7 – Resultado típico de um experimento de <i>microarray</i>	63
Figura 8a – Dispersão dos valores de expressão de endotélio pulmonar de controles	65
Figura 8b – Dispersão dos valores de expressão de endotélio pulmonar de expostos	66
Figura 9a – Representação da análise de componente principal (PCA) utilizando os 13 genes diferencialmente expressos como variáveis	72
Figura 9b – Representação da análise de componente principal (PCA) utilizando os 13 membranas como variáveis	73
Figura 10 – Exemplo de uma imagem obtida de amostra cardíaca (esquerda) e seus valores de expressão (direita)	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de genes do microarray adotado no estudo	32
Tabela 2 – Composição e concentração dos elementos de MP _{2,5} extraídos dos filtros de polycarbonato	59
Tabela 3 – Parâmetros hematológicos dos animais	61
Tabela 4 – Genes diferencialmente expressos entre endotélios pulmonares de expostos e controles	68

RESUMO

Alameddine, M. Resposta molecular do endotélio pulmonar à exposição aguda de material particulado fino [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009

Estudos epidemiológicos estabelecem uma associação evidente entre poluição do ar e o aumento de morbimortalidade cardiovascular e respiratória. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos do material particulado fino (MP_{2,5}) sobre o organismo ainda estão pouco esclarecidos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o impacto da exposição ao MP_{2,5} sobre a biologia do endotélio pulmonar e do coração, através da avaliação do perfil de expressão gênica por *microarray*. Camundongos adultos fêmeas foram anestesiados e submetidos à instilação intratraqueal de MP_{2,5} (grupo exposto) ou veículo (grupo controle). Os animais foram sacrificados 12 a 18 horas após a instilação e pulmão, coração e sangue da veia cava inferior foram coletados. Os pulmões foram dissociados com collagenase tipo I e células endoteliais foram positivamente selecionadas por captura imuno-magnética através de micro-ímãs acoplados a anti-CD31. O cRNA derivado de endotélio pulmonar e de coração total foi hibridizado em membrana de *microarray* de baixa densidade desenhada para representar genes relevantes à biologia endotelial. Os genes encontrados diferencialmente expressos no pulmão foram Itgb1, Cxcl1, Tnf, Ecgf1 e Tnfaip3 (hiper-expressos em expostos a MP_{2,5}) e Enpep, Pdgfra, Gzmb, Birc2, Npr1, Angpt1, Cxcl5 e Il7 (hipo-expressos). Não foi possível realizar análise de inferência estatística de membranas do coração neste trabalho. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos exposto e controle na contagem sangüínea de neutrófilos, linfócitos ou plaquetas, apesar dos dois grupos apresentarem plaquetose. Os achados indicam que MP_{2,5} altera a transcrição de genes envolvidos não só na inflamação e estresse oxidativo, mas também no tônus e remodelamento vascular, que podem ser os responsáveis pelos efeitos cardiovasculares agudos do MP_{2,5}.

Descritores: 1. Poluição do ar 2. Material particulado 3. Endotélio 4. Pulmão 5. *Microarray* 6. Inflamação

SUMMARY

Alameddine, M. Molecular response of pulmonary endothelial cells to acute exposure to fine particulate matter [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009

Epidemiological studies establish a clear association between air pollution and increased cardiovascular and respiratory morbidity and mortality. However, the molecular mechanisms underlying the effect of fine particulate matter (PM_{2.5}) are still poorly understood. The aim of this study was to characterize the impact of exposure to PM_{2.5} on the biology of pulmonary endothelium and the heart, through the assessment of gene expression profiling by microarray. Adult female mice were anesthetized and submitted to intratracheal instillation of either PM_{2.5} (challenged group) or vehicle (control group). The animals were sacrificed 12 to 18 hours after instillation and lung, heart and blood samples from the inferior vena cava were collected. The lungs were dissociated with collagenase type I and endothelial cells were positively selected by immuno-magnetic capture through microbeads coupled to anti-CD31. The cRNA derived from the pulmonary endothelial cells and heart were hybridized to low-density microarray designed specifically to represent genes relevant to endothelial biology. Genes found differentially expressed in the lung were *Itgb1*, *Cxcl1*, *Tnf*, *Ecgf1*, and *Tnfaip3* (over-expressed in challenged group) and *Enpep*, *Pdgfra*, *Gzmb*, *Birc2*, *Npr1*, *Angpt1*, *Cxcl5* and *IL7* (under-expressed). It was not possible to perform statistical inference of heart samples in this study. There was no statistically significant difference between challenged and control groups in blood counts of neutrophils, lymphocytes or platelets, despite both groups presented increased number of platelets. The findings indicate that PM_{2.5} alters transcription of genes involved not only in inflammation and oxidative stress, but also in vascular tonus and remodeling, which may be responsible for the acute cardiovascular effects of PM_{2.5}.

Descriptors: 1. Air pollution 2. Particulate matter 3. Endothelium 4. Lung 5. Microarray 6. Inflammation

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A História relata episódios eventuais de mortes relacionadas à poluição desde a Antiguidade. Poluentes de fontes naturais, como erupções vulcânicas, há muito foram associados a fatalidades¹. Foi o século XX, no entanto, um divisor de águas ao concentrar eventos que chamaram a atenção da população geral, dos cientistas e dos governantes para os efeitos deletérios da poluição sobre a saúde². A primeira metade desse século abrigou marcantes episódios associando picos de poluentes do ar com aumento de morbimortalidade: 63 óbitos e milhares de indivíduos com queixas pulmonares no Vale do Meuse, na Bélgica^{3,4}, em apenas três dias no início de dezembro de 1930; 20 mortes e mais de 7000 pessoas foram hospitalizadas ou ficaram doentes durante os últimos dias de outubro de 1948 em Donora na Pensilvânia; um excesso de 4500 mortes em apenas uma semana de dezembro de 1952^{5, 6} causadas pela “*Big Smog*” na Inglaterra, que acabou por estender seus efeitos por meses causando mais de 13000 mortes até março de 1953⁷.

Nas últimas décadas, apesar de não se presenciar eventos de tamanho impacto, a geração de poluentes aumentou de forma exponencial, principalmente nos centros urbanos, tornando a poluição do ar um dos maiores fatores de risco à saúde. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 2 milhões de pessoas morrem ao ano prematuramente por causa da poluição do ar³. Nas últimas duas décadas, a literatura colecionou uma série bastante sólidas de evidências epidemiológicas associando a poluição do ar com efeitos deletérios sobre a

saúde e com aumento da mortalidade⁸⁻¹⁹. Estes efeitos ocorrem mesmo sob concentrações habituais de poluentes de vários centros urbanos²⁰ e, até o momento, não foram encontrados limites de concentração mínima abaixo dos quais não haja risco à saúde humana.

1.1 Poluição do ar

Considera-se ar poluído quando as características naturais da atmosfera são alteradas por agentes químicos, físicos ou biológicos, em decorrência da atividade do homem ou de fenômenos naturais. Segundo o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), entende-se como “poluente atmosférico qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar: I - impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde; II - inconveniente ao bem-estar público; III - danoso aos materiais, à fauna e flora e IV - prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade”²¹.

A poluição atmosférica é uma mistura complexa formada por materiais de estados físicos variados e de diversas naturezas químicas: gases, líquidos e material particulado (MP). Os poluentes do ar monitorados em diversos países por anteciparem risco grave à saúde pública são: dióxido de enxofre (SO₂), dióxido de nitrogênio (NO₂), MP, ozônio (O₃) e monóxido de carbono (CO). No Brasil, a Resolução N° 3 do CONAMA de 1990 estabelece limites para os seguintes poluentes²¹: SO₂, NO₂, MP₁₀, CO e O₃.

1.2 Material particulado

O material particulado consiste de uma mistura de partículas sólidas, líquidas ou ambas, suspensas no ar, e que agrupa de forma complexa substâncias orgânicas e inorgânicas. Essa mistura heterogênea varia em composição, tamanho e origem. Os principais componentes do MP são sulfatos, nitratos, amônia, cloreto de sódio, carbono, poeira mineral e água²². Dada sua complexidade, o MP é classificado em partículas de acordo com seu diâmetro aerodinâmico, que resume suas propriedades físico-químicas e que corresponde à distribuição trimodal encontrada na atmosfera: partículas grossas, finas e ultrafinas¹⁸. As partículas grossas inaláveis apresentam diâmetro aerodinâmico menor do que 10 μm (MP_{10}). Enquanto MP_{10} atinge vias aéreas superiores, traquéia e brônquios centrais, partículas finas, menores que 2,5 μm ($\text{MP}_{2,5}$) e partículas ultrafinas, menores que 0,1 μm ($\text{MP}_{0,1}$ ou UFP: do inglês, *Ultrafine Particulate Matter*) alcançam as pequenas vias aéreas e alvéolos, sendo assim consideradas capazes de maior agressão ao organismo. O tamanho das partículas também determina o tempo em que elas permanecem suspensas na atmosfera. MP_{10} é removido por fenômenos de sedimentação e precipitação poucas horas após sua emissão, enquanto $\text{MP}_{2,5}$ pode permanecer por dias e até semanas suspenso no ar. Conseqüentemente, $\text{MP}_{2,5}$ pode ser carregado por longas distâncias atuando também longe de seu sítio de emissão²³.

De acordo com seu mecanismo de formação, estas partículas podem ser classificadas como primárias, emitidas diretamente na atmosfera, ou secundárias, formadas por reações químicas com gases poluentes no ar.

As primárias têm como fonte emissora natural o solo ou outros materiais da crosta terrestre¹. Adicionalmente, as partículas primárias podem ser geradas por processos antropogênicos que incluem combustão em motores de automóveis (a gasolina ou diesel), de carvão e queima de biomassas, atividades industriais (construção, mineração, produção de cimento, cerâmica e tijolos) e erosão de asfaltos pela fricção de pneus com a pavimentação. Nas cidades com alta densidade de tráfego, uma parte significativa da fração grossa é produzida pela fricção dos pneus dos veículos com o asfalto das ruas, contendo elementos do pavimento e da borracha dos pneus¹. As partículas secundárias são produtos de transformação atmosférica de partículas com gases como óxido de nitrogênio, liberado pelo tráfego e por processos industriais, e óxido de enxofre, emitido por combustão de produtos contendo enxofre (como diesel). A maioria das partículas secundárias é encontrada na fração fina de MP¹.

Fazem parte do MP_{2,5}, ainda, partículas de carvão produzidas pela combustão dos combustíveis fósseis, que possuem adsorvidas à sua superfície diferentes elementos e compostos, tais como metais pesados e hidrocarbonetos. As partículas ultrafinas, por sua vez, têm tempo de residência no ar curto e/ou são diretamente inaladas ou agregam-se em partículas finas¹⁸.

1.3 Efeitos do material particulado sobre a saúde

1.3.1 Epidemiologia

Nos últimos anos, acumulam-se as evidências de que MP aumenta a morbimortalidade cardiovascular e respiratória. O aumento da mortalidade ocorre ou concomitantemente ao aumento dos níveis de MP ou 1 a 5 dias após sua emissão/exposição¹⁸. Apesar das limitações dos diferentes métodos estatísticos utilizados nos estudos epidemiológicos, a variação na mortalidade diária associada ao MP é estimada em 0,5-1,5%/10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de aumento em MP_{10} ou em 5-6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de aumento em $\text{MP}_{2,5}$ ^{18,19}. A mortalidade por todas as causas aumenta, mas a taxa de mortalidade eleva-se principalmente às custas de doenças cardiovasculares e respiratórias. De forma consistente, estudo da Sociedade Americana de Câncer²⁴ mostrou que cada aumento de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dos níveis de $\text{MP}_{2,5}$ no ar eleva em 6% as mortes por causas cardiopulmonares. Segundo a OMS, MP causa em torno de 2% da mortalidade cardiorrespiratória no mundo²³.

O sistema respiratório é particularmente vulnerável à poluição do ar. Asmáticos, portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica, crianças menores de 5 anos e idosos são os que mais sofrem os efeitos da exposição aos poluentes²⁵⁻²⁹. Além da descompensação da doença de base, há também aumento das taxas de infecções do trato respiratório superior e inferior com aumento dos níveis de MP. Cinco por cento dos cânceres de traquéia, brônquios e pulmão e aproximadamente 1% da mortalidade por infecção respiratória mundialmente²³ são atribuídos ao MP. A procura de salas de emergência e de admissões hospitalares eleva-se nitidamente a

partir de horas até alguns dias após o aumento dos níveis de poluição do ar³⁰⁻³³.

Em relação às doenças cardiovasculares, elas representam uma das mais importantes causas de mortalidade em centros urbanos^{9, 14, 17, 34}. Aumento de MP pode desencadear infarto do miocárdio¹⁷, arritmias cardíacas³⁵ e provocar alteração do controle autonômico cardíaco^{11, 18, 36}. Atualmente, há evidências epidemiológicas suficientes para considerar a poluição do ar, especificamente o MP, um outro fator de risco para aterosclerose¹⁶ e para morte prematura por doença cardiopulmonar³⁷.

A análise dos dados publicados permite que algumas características da relação entre doença cardiovascular e MP sejam identificadas: (1) dose-dependência: quanto maior a concentração do MP no ar, maior a frequência de eventos cardiovasculares¹³; (2) curto período de latência: o tempo que decorre entre o incremento dos níveis de MP e o efeito sobre o sistema cardiovascular é de horas a 5 dias; (3) inexistência de um limiar mínimo de concentração de MP abaixo do qual não haja nenhum risco à saúde³⁸. Em função destas características, é de vital importância a compreensão da intimidade dos mecanismos subjacentes aos efeitos tóxicos do MP sobre o sistema pulmonar e cardiovascular, pois permitiria que fossem desenhadas estratégias de redução de risco baseadas não apenas no controle de emissão de MP, mas também atuando sobre a fisiologia humana.

1.3.2 Mecanismos fisiopatológicos e papel do endotélio

Os mecanismos pelos quais o MP age sobre nosso organismo ainda estão pouco esclarecidos. Existem evidências, no entanto, de que estão envolvidos o sistema nervoso autonômico, o sistema imune e o estresse oxidativo em diferentes órgãos. O modelo neural defende a idéia de que a interação do MP com receptores pulmonares ativa reflexos neurais (via aferência vagal) que alteram o tônus autonômico, provocando a instabilidade de placas ateromatosas, vasoconstrição coronariana e arritmias cardíacas^{11, 13, 39}. Evidências que apóiam este modelo são a curta latência (algumas horas) entre variação da concentração ambiental do MP e aumento da mortalidade e admissão hospitalar por causas cardiovasculares^{31, 40}, a aceleração do ritmo cardíaco⁴¹, bem como a diminuição da variabilidade da frequência cardíaca frente à poluição⁴. Alterações de repolarização em eletrocardiograma e de frequência cardíaca já foram identificadas não só em indivíduos com doença coronariana prévia, mas também em modelos de animais saudáveis⁴².

As outras teorias também admitem que o pulmão seja a porta de entrada de poluentes a partir do qual uma resposta sistêmica é deflagrada. A controvérsia está em como o sistema cardiovascular é afetado. A primeira hipótese defende que, uma vez depositadas as partículas poluentes no parênquima pulmonar, elas deflagram uma reação inflamatória local que “derrama” mediadores pró-inflamatórios para a circulação sangüínea, provocando uma resposta inflamatória sistêmica e exacerbando uma doença cardiovascular pré-existente⁴³. Por outro lado, alguns pesquisadores

acreditam que haja translocação de nanopartículas poluentes dos septos alveolares para a circulação sangüínea, sugerindo um efeito direto nos tecidos-alvo^{44,45}. Este achado, no entanto, ainda não foi consistentemente demonstrado^{46, 47}.

É possível que os dois mecanismos acima citados não sejam excludentes e, nos dois contextos, o endotélio pulmonar ganha um papel pivô como o principal órgão modulador dos efeitos do MP. Em repouso, o endotélio é responsável por (1) manter a fluidez do sangue, inibindo sinais de coagulação e de agregação plaquetária, (2) modular o fluxo sangüíneo, liberando fatores de relaxamento vascular, (3) preservar a permeabilidade vascular, através dos complexos juncionais e do sistema cavéolo-vesicular e (4) manter os leucócitos circulantes quiescentes⁴⁸. Se as células endoteliais não realizarem uma destas atividades básicas de forma adequada, o endotélio é caracterizado como disfuncional.

Vários trabalhos já exploraram aspectos de ativação e disfunção endotelial associada a poluentes do ar. Ao longo dos últimos anos crescem as evidências de que ocorre uma resposta inflamatória local (pulmonar) após exposição aguda a poluentes, inclusive ao MP. Em animais, por exemplo, Saldiva et al. encontraram aumento de neutrófilos em lavado broncoalveolar (LBA) de ratos (normais e portadores de bronquite crônica) após inalação aguda de MP⁴⁹, assim como Dybdahl et al. identificaram aumento de macrófagos e neutrófilos em pulmões de camundongos agudamente expostos a partículas de exaustão de diesel (DEP: do inglês *Diesel Exhaust Particles*)⁵⁰. Em acordo com a ativação endotelial que ocorre no pulmão, há

aumento de mediadores pró-inflamatórios, como proteína-2 inflamatória de macrófago (MIP-2: do inglês, *Macrophage Inflammatory Protein-2*) e fator de necrose tumoral (TNF: do inglês, *Tumor Necrosis Factor*) em lavado broncoalveolar⁵¹⁻⁵⁴ e interleucina-6 (IL-6) em tecido pulmonar⁵⁰. Aparentemente, este processo inflamatório varia segundo a dose e o tipo de partícula utilizada⁵⁵. Achados semelhantes são vistos em pulmões de indivíduos saudáveis expostos a concentrado de partículas ambientais e ozônio, em que marcadores inflamatórios estão elevados em LBA e biópsia^{56, 57}.

O processo inflamatório caminha em conjunto com o estresse oxidativo pulmonar⁵⁸, pois células inflamatórias ativadas geram radicais livres capazes de acionarem vias de sinalização celular e de provocarem lesão celular⁵⁹. Espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) são produtos de um conjunto de reações redox que ocorre de forma não compartimentalizada na célula, levando ao acúmulo de grandes quantidades de radicais livres. No estresse oxidativo, a atividade dos antioxidantes naturais da célula, como a superóxido-dismutase, a glutational peroxidase e a catalase, é insuficiente frente às necessidades de defesa contra as ROS^{60, 61}. Esse excesso de espécies reativas não somente exerce um efeito tóxico direto sobre a célula endotelial, mas também pode desencadear e perpetuar a resposta inflamatória⁶² e mediar a vasoconstrição arterial³⁸. A ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear - kappa B (NF-κB: do inglês, *Nuclear Factor kappa B*), e a maior expressão de citocinas pró-inflamatórias são respostas desta interação,

assim como maior produção de moléculas de adesão na superfície endotelial e nas células inflamatórias⁴. Todos esses efeitos podem ser evidenciados dentro de 24 horas após a exposição inicial ao MP^{58, 63}.

Como proposto por Seaton et al. em 1995, acredita-se que alterações hematológicas favoreçam aumento da viscosidade plasmática no contexto da disfunção endotelial horas após a exposição ao MP, concomitantemente ao aumento de marcadores inflamatórios no sangue periférico⁴³. Chuang et al. avaliaram a associação de marcadores de inflamação e estresse oxidativo em adultos jovens com poluentes atmosféricos e concluíram que a associação é positiva para proteína C-reativa ultrasensível (hs-CRP: do inglês, *high-sensitivity C-Reactive Protein*) e 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), marcadores de inflamação e estresse oxidativo, e para inibidor-1 de ativador de plasminogênio (PAI-1: do inglês, *Plasminogen Activator Inhibitor-1*) e fibrinogênio, mediadores pró-trombóticos⁶⁴. Em uma avaliação de indivíduos voluntários, Routledge et al. mostraram aumento de viscosidade plasmática e aumento da concentração de proteína C-reativa em associação com altos níveis de MP⁶⁵.

Por outro lado, a disfunção endotelial representada por aumento dos fatores constritores derivados do endotélio é sugerida por Batalha et al., que identificaram uma diminuição da luz de artérias pulmonares em resposta à exposição aguda a concentrado de partículas ambientais em ratos⁶⁶. Dados semelhantes foram obtidos por Ferreira Rivero et al. que, além de descreverem redução da relação luz/parede de pequenas artérias pulmonares em ratos expostos a MP_{2,5}, encontraram ainda que a constrição

de artérias pulmonares é dose-dependente⁵⁵. Em estudo com voluntários humanos, o efeito vasoconstritor da combinação de MP_{2,5} e ozônio foi além de sua ação local⁶⁷. Os autores observaram por ultrassonografia alteração do tônus de artéria braquial, ou seja, a resposta vasoconstritora foi identificada em uma artéria sistêmica, sugerindo alteração de tônus vascular para além da circulação pulmonar. Em linha com o predomínio de fatores vasoconstritores sistêmicos, outros trabalhos mostraram aumento de níveis plasmáticos de endotelina-1 agudamente após exposição a MP_{2,5} e ozônio⁵¹ e atenuação do relaxamento vascular dependente do endotélio, seja por redução da produção de óxido nítrico (NO) ou por diminuição de sua bioatividade⁶⁸.

Compreender os mecanismos da resposta sistêmica secundária à exposição de MP é desafiador. É difícil precisar qual dos mecanismos acima citados predomina na extensamente caracterizada associação epidemiológica entre inalação de MP e aumento da morbimortalidade cardiovascular. Interessantemente, os marcadores inflamatórios e fatores vasoconstritores descritos no experimentos com poluentes do ar coincidem com as características de estágios iniciais de doença aterosclerótica, marcada por disfunção endotelial, em que arteríolas paradoxalmente se contraem ou falham em se dilatar em resposta a estímulo fisiológico como o exercício⁶⁹. Isto é atribuído à deficiência de NO e/ou excesso de fatores constritores como endotelinas e angiotensina II. Uma variedade de fatores envolvidos na inflamação parece ter papel pró-aterogênicos através de indução óxido-mediada do fator NF-κB, com aumento de expressão de

várias citocinas e moléculas de adesão por células endoteliais e leucócitos circulantes. Estes fatores aterogênicos incluem angiotensina II e citocinas inflamatórias^{70, 71}. Assim, a disfunção endotelial subjacente à formação de placas ateroscleróticas parece também ser desencadeada, mantida e/ou potencializada pelos efeitos de MP sobre o sistema vascular⁷², o que faz da poluição do ar mais um fator de risco para doença arteriosclerótica⁷³⁻⁷⁶.

A associação inversa entre MP e doenças cardiovasculares parece ocorrer. Medidas de controle dos níveis de MP_{2,5} resultaram em redução no risco de morte cardiorrespiratória⁷⁷. Neste contexto, em que os poluentes do ar são um fator de risco cardiovascular e respiratório universal, e onde há lacunas no conhecimento a respeito dos mecanismos que ligam a exposição ao MP à disfunção endotelial e doenças cardiovasculares, é fundamental compreender os mecanismos pelos quais os poluentes atmosféricos acometem a integridade biológica.

A proposta deste trabalho, portanto, foi compreender a ação local de MP_{2,5} sobre o endotélio pulmonar e, ao mesmo tempo, avaliar os efeitos cardíacos de uma exposição aguda a ele. A fim de desvendar os mecanismos moleculares subjacentes à agressão pelo MP_{2,5}, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão gênica do endotélio, por meio de *microarray*, identificando as principais vias moleculares envolvidas numa resposta à poluição do ar.

2 OBJETIVO

2. OBJETIVO

Em virtude da relevância da poluição por material particulado na mortalidade e morbidade pulmonares e cardiovasculares e da ausência de dados conclusivos a respeito do mecanismo patogênico principal, este trabalho visou explorar as bases moleculares da lesão endotelial induzida por material particulado com objetivo de caracterizar, com o uso de *microarray*, o perfil de expressão gênica das células endoteliais da circulação pulmonar e miocárdica para identificar os genes relevantes à biologia de células endoteliais, cuja expressão é modificada pela exposição ao material particulado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho

Visando explorar os mecanismos moleculares subjacentes à morbidade e mortalidade cardiovasculares do material particulado fino (MP_{2,5}), foram utilizados camundongos adultos fêmeas divididos em dois grupos: exposto e controle. O grupo exposto foi submetido à instilação intratraqueal de MP_{2,5} (ver adiante o protocolo de exposição) ao passo que o controle recebeu apenas veículo (soro fisiológico). O impacto da exposição ao MP_{2,5} sobre a biologia do endotélio pulmonar e do coração foi avaliado comparando o perfil de expressão gênica de células endoteliais do pulmão e de células cardíacas entre os grupos, utilizando uma plataforma de *microarray* de baixa densidade, e avaliando a intensidade de atividade inflamatória sistêmica pela contagem de células sangüíneas.

Este projeto foi aprovado pela Comissão De Ética Para Análise De Projetos De Pesquisa – CAPPesq – do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Nº 554/05).

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de 10 semanas de idade, mantidos em condições controladas de umidade e temperatura no biotério do LIM-05 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), com ração e água *ad libitum*.

A partir de experimentos pilotos constatou-se que, para obtenção de células endoteliais pulmonares e cardíacas em quantidade suficiente para um único experimento de perfilamento da expressão gênica, era necessário combinar células de 3 animais. Por esta razão, os animais foram submetidos individualmente à instilação de suspensão de MP_{2,5} ou solução fisiológica (SF) de acordo com o protocolo estabelecido. Após o sacrifício, pulmões retirados de 3 animais submetidos ao mesmo tratamento foram misturados e submetidos à dissociação tecidual e isolamento celular por captura imunomagnética; os corações de 3 animais também eram considerados uma única amostra e foram armazenados a -80 °C para posterior extração de RNA (ver adiante).

3.3 Coleta e análise do material particulado

O material particulado foi obtido de 19 filtros de polycarbonato da Millipore (Isopore™ Membrane Filters Polycarbonate, 0,8 mcm, 37 mm, Millipore, USA). As partículas poluentes foram retidas nos filtros por um período de 24 horas utilizando coletores de pequeno volume tipo “Harvard”. Os coletores permitem separar partículas com diâmetro aerodinâmico menor ou igual a 2,5 µm, a uma taxa de fluxo de 10 l/min. Os filtros foram acondicionados por pelo menos 24 horas em umidade e temperatura controladas (50% e 20 °C) e seus pesos obtidos pelo método gravimétrico em balança microanalítica (UMX2, da Mettler e Toledo, Suíça).

A determinação da composição elementar foi realizada através do método de fluorescência de raios-x por dispersão de energia, em um

aparelho de marca Shimadzu, modelo EDX-700HS (Shimadzu Corporation, Analytical Instruments Division, Kioto, Japão). As intensidades medidas foram convertidas em concentrações (ng/cm^2) utilizando uma amostra padrão certificada NIST SRM 2783 - Air Particulate on Filter Media (National Institute of Standards, 158, Gaithersburg, MD, USA)⁷⁸.

3.4 Extração do $\text{MP}_{2,5}$ e preparo da suspensão de instilação

Para instilação de $\text{MP}_{2,5}$, foi preparada uma suspensão contendo extrato de $\text{MP}_{2,5}$ em SF. Os subcomponentes do $\text{MP}_{2,5}$ presos nos filtros de polycarbonato foram removidos com a ajuda de um banho ultrassônico até que a maior parte do $\text{MP}_{2,5}$ tivesse sido removida do filtro e que, à inspeção visual, o tratamento ultrassônico não fosse mais capaz de liberar o $\text{MP}_{2,5}$. Durante a extração, a temperatura do banho foi monitorada e controlada para que a mesma não ultrapassasse $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, os filtros foram secados por 24 horas a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os pesos secos antes e após a extração do $\text{MP}_{2,5}$ foram utilizados para cálculo da eficiência de extração, que foi de 74,2%. A concentração final da suspensão de $\text{MP}_{2,5}$ foi de 0,354 mg/ml. A suspensão com $\text{MP}_{2,5}$ foi mantida armazenada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5 Protocolo de exposição

Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de uma mistura de ketamina (50 mg/ml - 80 mg/kg de peso) e xylazina (2% - 16 mg/kg de peso)⁷⁹. Após tricotomia, era realizada uma pequena incisão em linha média na região cervical anterior para expor a traquéia⁸⁰. Depois

disso, a traquéia era puncionada com agulha de 13 mm × 0,45 mm montada em seringa graduada de 1 ml e um bolo de 50 µl da suspensão de MP_{2,5} ou SF era injetado (Figura 1). Em seguida, a incisão era suturada com fio nylon 6.0 e os animais recolocados em condições ambientais prévias (biotério) após o despertar da anestesia; água e ração eram oferecidos *ad libitum*.

Figura 1 – Instilação intratraqueal de suspensão de MP

Exemplo do procedimento de exposição do camundongo à suspensão de MP_{2,5}. Exposição da traquéia sob anestesia para instilação intratraqueal em bolo, realizada com seringa através de punção de um espaço intercartilaginoso do terço proximal da traquéia.

3.6 Coleta de tecidos e amostras de sangue

Doze a 18 horas após a exposição, os camundongos eram novamente anestesiados por injeção intraperitoneal. Amostras de sangue para análise de parâmetros hematológicos eram coletadas por punção da veia cava inferior. Em seguida, os animais eram sacrificados por exsanguinação seccionando a aorta abdominal. Pulmão e coração eram ressecados em bloco, mantidos em 15 ml de meio de isolamento (meio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) contendo 4500 mg glicose/ml, 20% soro fetal bovino, 100 UI/ml de penicilina, 100 UI/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina) e levados à capela de fluxo laminar. A partir deste momento, os órgãos removidos eram manipulados de maneira asséptica: todo o instrumental cirúrgico era substituído por outros autoclavados e as luvas para manipulação trocadas por novas estéreis. Dos tecidos ressecados, grandes vasos e vias aéreas centrais eram desprezados e apenas os lobos pulmonares eram selecionados para obtenção de células endoteliais (ver na seção seguinte). Os corações, por sua vez, eram dissecados, as câmaras auriculares retiradas e os ventrículos imersos em reagente de preservação tecidual e estabilizador de RNA (RNAlater, Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) conforme instruções do fabricante e preservados a -80 °C para posterior extração de RNA.

Todos os reagentes e soluções utilizados na extração ou processamento de tecidos eram livres de RNase conforme indicado pelos fornecedores. Os instrumentos utilizados foram autoclavados e tratados com

preparado comercial específico para inativação de RNase (RNaseZap, Applied Biosystems/Ambion, Austin TX).

3.7 Isolamento de células endoteliais pulmonares

A seleção positiva por captura imuno-magnética das células endoteliais da microcirculação pulmonar foi realizada conforme o protocolo modificado da Divisão de Pesquisa Vascular, Departamento de Patologia, Brigham and Women's Hospital, Universidade de Harvard⁸¹.

Os lobos pulmonares submersos em meio de isolamento eram cortados com tesoura em pequenos fragmentos e transferidos para um frasco de cultura de tecidos de 75 cm², onde os fragmentos eram digeridos com 25 ml de solução (1 mg/ml) de collagenase tipo I (Collagenase Type I, Invitrogen/Gibco™, Carlsbad, CA) dissolvida em solução balanceada de Hank (HBSS) contendo 1,26 mM CaCl₂, 0,493 mM MgCl₂ e 0,407 mM MgSO₄ (Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) 1×, Cat. No. 24020-117, Invitrogen/Gibco™, Carlsbad, Ca) pré-aquecida por 1 hora a 37 °C. A concentração de collagenase I foi estabelecida através de curva dose-resposta para rendimento celular (Figura 2), assim como o tempo ótimo de digestão, a partir de experimentos-piloto. A digestão dos lobos pulmonares era realizada a 37 °C por 40 minutos com o frasco inclinado a 45 graus e sob agitação horizontal contínua a 80 rotações por minuto (rpm). A etapa final da digestão constava em passar a suspensão de collagenase com fragmentos teciduais, delicadamente por 12 vezes, através de um gelco 14 acoplado a uma seringa de 20 ml, com o cuidado de evitar formação de

espumas durante o processo. Este procedimento otimiza a separação celular destacando células de grumos formados durante a digestão. Em seguida, a suspensão era filtrada através de uma malha de nylon de 70 μm (cell strainer BD Falcon™ #35 2350, Becton, Dickinson and Company, NJ) em tubo de polipropileno cônico de 50 ml. O material filtrado era lavado com 10 ml de meio de isolamento gelado e as células sedimentadas por centrifugação a 400 g por 8 minutos a 4 °C. A partir deste momento, as amostras eram mantidas em gelo ao longo de todo o experimento. A viabilidade celular foi avaliada pela técnica de exclusão por corante. Este método utiliza um corante para demonstrar lesão de membrana celular: células que absorvem corante, como o “*trypan blue*”, são consideradas não viáveis. A avaliação da viabilidade foi realizada junto com a contagem celular em hemocitômetro e o resultado apresentado em porcentagem de células viáveis em relação à quantidade de células totais da amostra⁸².

Figura 2 – Rendimento celular de pulmão e coração para determinação da concentração ideal de collagenase tipo I

No eixo da abscissa, os valores representam o número de animais utilizados para o experimento e a concentração de collagenase em mg/ml. Por exemplo, 2X1 significa que a amostra tecidual foi proveniente de 2 animais e submetida à collagenase a 1 mg/ml.

Para o isolamento positivo das células endoteliais (Figura 3), microesferas magnéticas (Dynabeads® Sheep anti-Rat IgG, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) eram incubadas com anticorpo anti-CD31 (Purified anti-mouse CD31 (PECAM-1), BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), na relação de 1,5 µg de anticorpo para 1×10^7 microesferas, em um tubo de microcentrífuga submetido à inversão lenta e contínua, durante 30 min a 4 °C. Após a incubação, as microesferas revestidas com anticorpo eram capturadas durante 1 min por exposição ao campo magnético (MPC-15, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) e lavadas com solução salina tamponada por fosfato (Phosphate-Buffered Saline (PBS), pH 7.2, Cat N° 20012027, Invitrogen/Gibco™, Carlsbad, CA) acrescida de 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) e 2 mM EDTA, pH 7,4.

O *pellet* celular resultante da dissociação tecidual era ressuspenso em 2 ml de PBS gelada acrescida de 0,1 % de BSA e incubado com $1,2 \times 10^7$ microesferas recobertas de anti-CD31 em regime de inversão lenta e contínua por 20-30 minutos a 4 °C. Ao fim da incubação, as células endoteliais (CD31+) acopladas às microesferas eram positivamente selecionadas durante 2 minutos pela exposição da suspensão ao campo magnético. O sobrenadante era descartado e o material capturado lavado com 1 ml de PBS acrescida de 0,1 % de BSA e 2 mM EDTA, pH 7,4. A lavagem era repetida 4 vezes. Às células isoladas era adicionado RNAlater e as amostras armazenadas em freezer -80 °C até extração do RNA.

Figura 3 – Resumo das etapas de revestimento das microesferas com anticorpo e isolamento celular (manual do fabricante)

3.8 Extração de RNA total de células endoteliais pulmonares

O RNA total das células endoteliais pulmonares foi purificado com a utilização de um *kit* comercial que utiliza colunas de sílica (RNAqueous®-Micro Applied Biosciences/Ambion, Austin, TX) conforme manual do produtor. Modificamos o protocolo original do fabricante para acomodar uma etapa de remoção das microesferas após a lise das células, pois foi a maneira encontrada para evitar que as microesferas magnéticas obstruíssem a coluna de separação. Após a eluição, o RNA extraído era tratado com DNase I por 20-30 minutos a 37 °C para remoção de DNA genômico contaminante. O RNA purificado era mantido em solução aquosa e armazenado a -80 °C até a utilização nos experimentos.

3.9 Extração de RNA total de coração

O RNA total do coração foi extraído pelo método de purificação em etapa única, descrito por Chomczynski e Sacchi⁸³, com a utilização de um reagente monofásico disponível comercialmente (TRIzol® Reagent Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Após precipitação e lavagem, os RNAs totais foram solubilizados em 50 a 100 µl de água tratada com DEPC (DEPC treated water Invitrogen, Carlsbad, CA) e armazenados em freezer – 80 °C para posterior utilização.

3.10 Avaliação da qualidade e quantidade de RNA de pulmão e coração

A concentração e possível contaminação por proteína do RNA total das amostras foram estimadas pela absorvância a 240 nm e relação de absorvância 240/260 com o uso de espectrofotometro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA). A integridade dessas amostras foi verificada pela micro-eletroforese capilar em chip comercial (RNA Chips, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) utilizando-se Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Este sistema utiliza um procedimento computacional para determinar a integridade de RNA total que é expresso como RIN (*RNA Integrity Number*)⁸⁴. Foram aproveitadas as amostras com integridade RIN maior ou igual a 7,0 (Figura 4).

Figura 4 – Resultado de microeletroforese de RNA em chip

Exemplo típico de resultado gerado pela microeletroforese em chips (Bioanalyzer 2100). O eletroferograma apresentado é de RNA extraído de células endoteliais pulmonares de animais expostos (amostra de pulmão exposto: EP4). Nele são visíveis os dois picos correspondentes aos RNAs ribossomais 18s e 28s. Encontra-se à direita do eletroferograma uma imagem simulada do gel na qual cada fração do RNA total é representada por bandas discretas cuja tonalidade de cinza é proporcional à intensidade da fluorescência.

3.11 Descrição da plataforma de *microarray*

Escolheu-se a análise de perfil de expressão gênica como a abordagem para avaliar os efeitos da exposição do animal ao MP_{2,5}. Esta estratégia tem como vantagem a análise em paralelo da expressão de vários genes, o que permite detectar, num mesmo experimento, os genes relevantes às alterações funcionais conseqüentes à exposição ao MP_{2,5}. Além disso, ao avaliar simultaneamente a expressão de vários genes, pode-se identificar os genes corregulados pelo mesmo estímulo (neste caso, exposição a MP_{2,5}) e formular hipóteses úteis a respeito da base biológica de respostas funcionais do tecido estudado. Várias são as estratégias para análise do perfil de expressão gênica. A adotada neste estudo foi a tecnologia de *microarray*, em que os experimentos são situações típicas de hibridação reversa. Neste tipo de hibridação, as sondas não são marcadas e são imobilizadas em pontos determinados sobre um suporte (membrana ou lâmina de vidro) formando um arranjo em que cada ponto representa um gene (Figura 5a). Este suporte com as sondas é incubado com moléculas-alvos marcadas sintetizadas a partir do conjunto de transcritos de um(a) tecido/célula. A marcação das moléculas-alvo permite que as mesmas possam ser detectadas por emissão de sinal, que é proporcional à quantidade de cada transcrito presente no transcrito estudado.

Em relação à abrangência, os *microarrays* podem ser genômicos (ou de alta densidade) ou seletivos (também chamados de baixa densidade, boutique ou via-específica), em que há um critério pré-estabelecido para selecionar os genes representados. Neste estudo, foi selecionado um

microarray de baixa densidade de membrana de nylon especificamente desenhado para estudo dos genes relevantes à biologia endotelial (Oligo GEMArray Mouse Endothelial Cell Biology Gene Microarray, SABiosciences, Frederick, MD) (Tabela 1). Em cada membrana (2,5 × 3,8 cm), estão imobilizados oligonucleotídeos sintéticos de 60 bases de comprimento que reconhecem 113 genes associados à biologia de células endoteliais além de sete genes de expressão constitutiva e seqüências que correspondem a controles negativos (seqüências artificiais e de plasmídeo). Os 113 genes que esta plataforma contempla correspondem às seguintes categorias:

- (i) Permissividade e tônus vascular: representada pelos sistemas de angiotensina, óxido nítrico, prostaciclina, endotelina, atividade oxidorreductase, regulação da pressão arterial e regulação da vasoconstrição;
- (ii) Marcadores de angiogênese: representada por genes envolvidos na formação de novos vasos e pelos que têm papel de regulação positiva ou negativa da angiogênese;
- (iii) Marcadores de ativação endotelial: categoria composta por moléculas de adesão, moléculas da matriz extracelular, genes de atividade pró-trombótica, de citocinas e de envolvidos no crescimento celular; e
- (iv) Marcadores de lesão endotelial: representada por genes envolvidos na resposta ao estresse, na ativação da via da caspase e por genes indutores ou inibidores da apoptose

Figura 5a – Exemplo de formatação da membrana de *microarray*

Acima, exemplo esquemático de uma membrana: à esquerda, representação da impressão das sondas na membrana. Para cada sonda há 4 impressões justapostas; à direita, em vermelho, genes considerados constitutivos e em azul, controles. Abaixo, representação esquemática da localização dos genes da membrana utilizada no estudo. As definições de cada gene estão na Tabela 1.

Gapdh	Ace	Ace2	Adam17	Agtr1a	Agtr1a	Agtr2	Angpt1
1	2	3	4	5	6	7	8
Angpt2	Angpt3	Angpt5	Bax	Bel2	Bel211	Naip1	Birc2
9	10	11	12	13	14	15	16
Birc3	Xiap	Birc5	Cxcl5	Casp1	Casp3	Casp6	Col2
17	18	19	20	21	22	23	24
Col20	Col5	Cdh5	Cflar	Chga	Col18a1	Cpb2	Cradd
25	26	27	28	29	30	31	32
Ccr2	Ccr3	Cx3cl1	Cxcl1	Cxcl11	Cxcl2	P64	Cxcl5
33	34	35	36	37	38	39	40
Tymp	Edn1	Edn2	Edn3	Ednra	Ednrb	Enpep	F3
41	42	43	44	45	46	47	48
Fgf1	Fgf2	Fil1	Fil3	Fil4	Fil5	Ozm1	Icam1
49	50	51	52	53	54	55	56
Icam2	Ifnb1	Il11	Il15	Il1b	Il3	Il6	Il7
57	58	59	60	61	62	63	64
Itga5	Itgav	Itgb1	Itgb3	Kdr	Klt	Mmp14	Mmp1a
65	66	67	68	69	70	71	72
Mmp2	Mmp9	Nos2	Nos3	Nppb	Npr1	Ocln	Pdgfra
73	74	75	76	77	78	79	80
Pdgfrb	Pecam1	Pgf	Plat	Plau	Plg	Ptgs1	Ptgs2
81	82	83	84	85	86	87	88
Rhob	Ripk1	Sele	Sell	Selp	Selpg	Serpine1	Sod1
89	90	91	92	93	94	95	96
Tek	Tfpi	Tfpi2	Tgfb1	Tgfb2	Thbd	Thbs1	Timp1
97	98	99	100	101	102	103	104
Tnf	Tnfai3	Tnfai1b	Fas	Tnfai10	Fas1	Vcam1	Vegfa
105	106	107	108	109	110	111	112
Vwf	Xdh	PUC18	Blank	Blank	AS1R2	AS1R1	AS1
113	114	115	116	117	118	119	120
Rps27a	B2m	Hsp90ab1	Hsp90ab1	Ppia	Ppia	BAS2C	BAS2C
121	122	123	124	125	126	127	128

Figura 5b – Cilindro contendo membrana de *microarray*

Cada membrana de *microarray* é condicionada em um cilindro, utilizado de continente durante todo o procedimento de hibridação e lavagem. As membranas eram retiradas apenas no momento da revelação.

Tabela 1 – Lista de genes do microarray adotado no estudo

Posição	GeneBank	Símbolo	Descrição	GO Term
1	NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Oxidoreductase activity;Mitochondrion; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) activity;Glucose metabolism;Glycolysis;Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity;
2	NM_009598	Ace	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	Hydrolase activity;Integral to membrane; Proteolysis and peptidolysis;Zinc ion binding;Membrane;Extracellular space;Metallopeptidase activity;Carboxypeptidase activity;Peptidyl-dipeptidase A activity;
3	NM_027286	Ace2	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2	Integral to membrane;Proteolysis and peptidolysis;Membrane;Extracellular space;Carboxypeptidase activity;Peptidyl-dipeptidase A activity;
4	NM_009615	Adam17	A disintegrin and metallopeptidase domain 17	Plasma membrane;Hydrolase activity; Integral to membrane;Proteolysis and peptidolysis;Zinc ion binding;Receptor activity;Extracellular matrix;Extracellular space;Metalloendopeptidase activity;Metallopeptidase activity;
5	NM_007428	Agt	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	Extracellular space;Serine-type endopeptidase inhibitor activity;Regulation of blood pressure;
6	NM_177322	Agtr1a	Angiotensin II receptor, type 1a	Plasma membrane;Integral to membrane; G-protein coupled receptor protein signaling pathway;Endosome;Rhodopsin-like receptor activity;Angiotensin type II receptor activity;G-protein coupled receptor activity;Regulation of blood pressure;Ureteric bud branching;Excretion;

7	NM_007429	Agtr2	Angiotensin II receptor, type 2	Integral to membrane;G-protein coupled receptor protein signaling pathway;Rhodopsin-like receptor activity; Angiotensin type II receptor activity;G-protein coupled receptor activity;Purinergic nucleotide receptor activity, G-protein coupled;
8	NM_009640	Angpt1	Angiopoietin 1	Extracellular space;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway;Vascular endothelial growth factor receptor binding;Angiogenesis;Endoderm development;
9	NM_007426	Angpt2	Angiopoietin 2	Extracellular space;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway; Vascular endothelial growth factor receptor binding;Angiogenesis;Endoderm development;
10	NM_013913	Angptl3	Angiopoietin-like 3	Extracellular;Extracellular space;
11	NM_009673	Anxa5	Annexin A5	Calcium ion binding; Blood coagulation;Calcium-dependent phospholipid binding;
12	NM_007527	Bax	Bcl2-associated X protein	Integral to membrane;Protein binding;Apoptotic mitochondrial changes;Induction of apoptosis;Regulation of apoptosis; Apoptosis;Induction of apoptosis by extracellular signals;Mitochondrial outer membrane;Cytosol;Response to wounding;Induction of apoptosis by intracellular signals; Caspase activation via cytochrome c;Release of cytochrome c from mitochondria;Response to DNA damage stimulus; Protein homooligomerization activity;Insertion of proteins into mitochondrial membranes during the induction of apoptosis;Negative regulation of fibroblast proliferation; Nuclear fragmentation;Regulation of caspase activation;
13	NM_009741	Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	Integral to membrane;Protein binding;Regulation of apoptosis;Apoptosis; Anti-apoptosis;Mitochondrion;Cytosol;Membrane;

14	NM_009743	Bcl2l1	Bcl2-like 1	Integral to membrane;Protein binding;Regulation of apoptosis;Apoptosis;Anti-apoptosis;Mitochondrion;Membrane;Response to radiation;Negative regulation of apoptosis;
15	NM_008670	Naip1	NLR family, apoptosis inhibitory protein 1	Apoptosis;
16	NM_007465	Birc2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	Protein binding;Regulation of apoptosis;Apoptosis;Anti-apoptosis;Zinc ion binding;Ubiquitin-protein ligase activity;Protein ubiquitination;Ubiquitin ligase complex;Intracellular;
17	NM_007464	Birc3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	Protein binding;Regulation of apoptosis;Apoptosis;Anti-apoptosis;Zinc ion binding;Ubiquitin-protein ligase activity;Protein ubiquitination;Ubiquitin ligase complex;Intracellular;
18	NM_009688	Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis	Apoptosis;Anti-apoptosis;Zinc ion binding;Ubiquitin-protein ligase activity;Protein ubiquitination;Ubiquitin ligase complex;Intracellular;Inhibition of caspase activation;
19	NM_009689	Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	Cytoplasm;Apoptosis;Anti-apoptosis;Intracellular;Cysteine protease inhibitor activity;
20	NM_007551	Cxcr5	Chemochine (C-X-C motif) receptor 5	Integral to membrane;G-protein coupled receptor protein signaling pathway;Receptor activity;Integral to plasma membrane;Rhodopsin-like receptor activity;Lymph gland development;B-cell activation;C-X-C chemokine receptor activity;Angiotensin type II receptor activity;G-protein coupled receptor activity;Purinergic nucleotide receptor activity, G-protein coupled;
21	NM_009807	Casp1	Caspase 1	Hydrolase activity;Extracellular;Proteolysis and peptidolysis;Protein binding;Cytoplasm;Induction of apoptosis;Regulation of apoptosis;Caspase activity;Cysteine-type peptidase activity;Intracellular;Response to hypoxia;Protein processing;

22	NM_009810	Casp3	Caspase 3	Hydrolase activity;Proteolysis and peptidolysis;Cytoplasm;Negative regulation of cell cycle;Induction of apoptosis;Apoptosis;Induction of apoptosis via death domain receptors;Caspase activity;Cysteine-type peptidase activity;Response to wounding;Cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity;Peptidase activity;Negative regulation of cyclin dependent protein kinase activity;B-cell homeostasis;Cell fate commitment;Induction of apoptosis by oxidative stress;T-cell homeostasis;Keratinocyte differentiation;Negative regulation of B-cell proliferation;Negative regulation of activated T-cell proliferation;
23	NM_009811	Casp6	Caspase 6	Hydrolase activity;Proteolysis and peptidolysis;Induction of apoptosis;Regulation of apoptosis;Apoptosis;Caspase activity;Cysteine-type peptidase activity;
24	NM_011333	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	Signal transduction;Extracellular;Immune response;Protein binding; Inflammatory response;Extracellular space;Chemokine activity;Chemotaxis;Cytokine activity;G-protein-coupled receptor binding;
25	NM_016960	Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	Signal transduction;Extracellular; Immune response;Protein binding;Inflammatory response;Extracellular space;Chemokine activity;Chemotaxis;Cytokine activity;
26	NM_013653	Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	Signal transduction;Extracellular; Immune response;Inflammatory response;Extracellular space;Chemokine activity;Chemotaxis;Cytokine activity;
27	NM_009868	Cdh5	Cadherin 5	Integral to membrane;Calcium ion binding; Cell adhesion;Protein binding;Homophilic cell adhesion;Membrane;Extracellular space;
28	NM_009805	Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Proteolysis and peptidolysis;Protein binding;Induction of apoptosis;Regulation of apoptosis;Apoptosis;Caspase activity;
29	NM_007693	Chga	Chromogranin A	Calcium ion binding;Extracellular space;

30	NM_009929	Col18a1	Collagen, type XVIII, alpha 1	Structural molecule activity;Cell adhesion;Protein binding;Cytoplasm; Positive regulation of cell proliferation;Development;Membrane;Extracellular space;Transmembrane receptor activity;Extracellular matrix structural constituent;Angiogenesis;Positive regulation of apoptosis;Phosphate transport;Collagen;Positive regulation of cell migration;Basement membrane;Extracellular matrix structural constituent conferring tensile strength;Extracellular matrix (sensu Metazoa);Endothelial cell morphogenesis;
31	NM_019775	Cpb2	Carboxypeptidase B2 (plasma)	Proteolysis and peptidolysis;Extracellular space;Carboxypeptidase activity; Carboxypeptidase A activity;
32	NM_009950	Cradd	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	Signal transduction;Protein binding; Regulation of apoptosis;Apoptosis;Intracellular;
33	NM_009969	Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Extracellular;Immune response;Extracellular space; Growth factor activity;Cytokine and chemokine mediated signaling pathway;Cytokine activity;Granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor binding;Dendritic cell differentiation;
34	NM_009971	Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	Extracellular;Immune response; Extracellular space;Growth factor activity;Cytokine activity;
35	NM_009142	Cx3cl1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	Integral to membrane;Cell adhesion; Signal transduction;Extracellular;Immune response;Protein binding;Membrane;Chemokine activity;Cytokine activity;
36	NM_008176	Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Extracellular;Immune response;Cell growth and/or maintenance;Regulation of cell cycle;Inflammatory response; Intracellular;Extracellular space;Growth factor activity;Chemokine activity;Cytokine activity;
37	NM_019494	Cxcl11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	Extracellular;Immune response;Inflammatory response; Extracellular space;Chemokine activity;Chemotaxis;Cytokine activity;

38	NM_009140	Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Signal transduction; Extracellular; Immune response; Inflammatory response; Chemokine activity; Chemotaxis; Cytokine activity;
39	NM_019932	Pf4	Platelet factor 4	Extracellular; Immune response; Extracellular space; Heparin binding; Chemokine activity; Chemotaxis; Cytokine activity;
40	NM_009141	Cxcl5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	Signal transduction; Extracellular; Immune response; Inflammatory response; Extracellular space; Chemokine activity; Chemotaxis; Cytokine activity;
41	NM_138302	Tymp	Thymidine phosphorylase	Transferase activity; Metabolism; Organogenesis; Chemotaxis; Transferase activity, transferring glycosyl groups; Phosphorylase activity; Pyrimidine base metabolism;
42	NM_010104	Edn1	Endothelin 1	Protein binding; G-protein coupled receptor protein signaling pathway; Extracellular space; Glucose transport; Regulation of blood pressure; Respiratory gaseous exchange; Pathogenesis; Regulation of pH; Dorsal/ventral pattern formation; Extracellular region; Regulation of vasoconstriction;
43	NM_007902	Edn2	Endothelin 2	Extracellular space; Regulation of blood pressure; Pathogenesis; Extracellular region; Regulation of vasoconstriction;
44	NM_007903	Edn3	Endothelin 3	Extracellular space; Regulation of blood pressure; Pathogenesis; Extracellular region; Regulation of vasoconstriction; Melanocyte cell differentiation;
45	NM_010332	Ednra	Endothelin receptor type A	Integral to membrane; Protein binding; G-protein coupled receptor protein signaling pathway; Integral to plasma membrane; Rhodopsin-like receptor activity; Glucose transport; G-protein coupled receptor activity; Respiratory gaseous exchange; Endothelin receptor activity; NOT protein-tyrosine kinase activity;

46	NM_007904	Ednrb	Endothelin receptor type B	Integral to membrane;Protein binding;G-protein coupled receptor protein signaling pathway;Receptor activity;Posterior midgut development;Extracellular space;Rhodopsin-like receptor activity;G-protein coupled receptor activity;Regulation of blood pressure;Neuropeptide Y receptor activity;Endothelin receptor activity;Regulation of pH;Endothelin-B receptor activity;Peripheral nervous system development;Melanocyte cell differentiation;Neural crest cell migration;
47	NM_007934	Enpep	Glutamyl aminopeptidase	Plasma membrane;Hydrolase activity;Integral to membrane;Cell proliferation;Aminopeptidase activity; Proteolysis and peptidolysis;Zinc ion binding;Cell migration;Angiogenesis;Metallopeptidase activity;Peptidase activity;Membrane alanyl aminopeptidase activity;Glutamyl aminopeptidase activity;
48	NM_010171	F3	Coagulation factor III	Integral to membrane;Membrane;Extracellular space; Blood coagulation;Hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor activity;
49	NM_010197	Fgf1	Fibroblast growth factor 1	Cell proliferation;Signal transduction; Regulation of cell cycle;Heparin binding;Growth factor activity;Angiogenesis;Fibroblast growth factor receptor binding;
50	NM_008006	Fgf2	Fibroblast growth factor 2	Cell proliferation;Signal transduction;Protein binding; Regulation of cell cycle;Extracellular space;Heparin binding;Growth factor activity;Angiogenesis;Positive regulation of cell differentiation;Regulation of retinal programmed cell death;Glial cell differentiation;Fibroblast growth factor receptor binding;

51	NM_010228	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Integral to membrane;Protein serine/threonine kinase activity;Protein-tyrosine kinase activity;Receptor activity;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity;Membrane;Protein kinase activity;Extracellular space;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway;Kinase activity;Vascular endothelial growth factor receptor activity;Angiogenesis;Patterning of blood vessels;
52	NM_010229	Flt3	FMS-like tyrosine kinase 3	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Integral to membrane;Protein binding;Protein serine/threonine kinase activity;Protein-tyrosine kinase activity;Receptor activity;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity;Membrane;Protein kinase activity;Extracellular space;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway;Kinase activity;Lymphocyte cell differentiation;
53	NM_008029	Flt4	FMS-like tyrosine kinase 4	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Integral to membrane;Protein binding;Protein serine/threonine kinase activity;Protein-tyrosine kinase activity;Receptor activity;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity;Membrane;Protein kinase activity;Extracellular space;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway;Vascular endothelial growth factor receptor activity;
54	NM_010233	Fn1	Fibronectin 1	Cell adhesion;Extracellular;Protein binding;Oxidoreductase activity;Extracellular space;Heparin binding;Acute-phase response;Metabolism;Cell-substrate junction assembly;Wound healing;Extracellular matrix (sensu Metazoa);

55	NM_013542	Gzmb	Granzyme B	Hydrolase activity;Proteolysis and peptidolysis;Apoptosis; Extracellular space;Chymotrypsin activity;Trypsin activity;Cytolysis;Serine-type endopeptidase activity;Granzyme B activity;
56	NM_010493	Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	Plasma membrane;Integral to membrane;Cell adhesion; Protein binding;Membrane;Cell-cell adhesion;Defense response;
57	NM_010494	Icam2	Intercellular adhesion molecule 2	Integral to membrane;Cell adhesion;Protein binding; Membrane;Cell-cell adhesion;Integral to plasma membrane;Uropod;
58	NM_010510	Ifnb1	Interferon beta 1, fibroblast	Extracellular;Extracellular space;Defense response; Cytokine activity;Hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor binding;
59	NM_008350	Il11	Interleukin 11	Extracellular space;Growth factor activity; Cytokine activity;
60	NM_008357	Il15	Interleukin 15	Extracellular;Immune response;Cytokine activity; Lymph gland development;Hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor binding;Regulation of T-cell differentiation;Positive regulation of T-cell proliferation;NK T-cell proliferation;Extrathymic T-cell selection;Positive regulation of immune response;Regulation of antiviral response by host;
61	NM_008361	Il1b	Interleukin 1 beta	Cell proliferation;Extracellular;Immune response; Regulation of cell cycle;Inflammatory response;Signal transducer activity;Growth factor activity;Interleukin-1 receptor binding;Cytokine and chemokine mediated signaling pathway;Cytokine activity;Neutrophil chemotaxis;Positive regulation of interleukin-6 biosynthesis;Positive regulation of chemokine biosynthesis;
62	NM_010556	Il3	Interleukin 3	Extracellular;Immune response;Extracellular space; Growth factor activity;Cytokine activity;Interleukin-3 receptor binding;

63	NM_031168	Il6	Interleukin 6	Extracellular;Immune response;Protein binding; Extracellular space;Acute-phase response;Growth factor activity;Cytokine activity;Interleukin-6 receptor binding;Negative regulation of chemokine biosynthesis;Programmed cell death, neutrophils;
64	NM_008371	Il7	Interleukin 7	Extracellular;Immune response;Growth factor activity; Positive regulation of T-cell differentiation;Cytokine activity;Interleukin-7 receptor binding;Hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor binding;Bone resorption;Positive regulation of B-cell proliferation;
65	NM_010577	Itga5	Integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	Integral to membrane;Cell adhesion;Protein binding; Receptor activity;Cell-matrix adhesion;Extracellular space;Integrin-mediated signaling pathway;Integrin complex;Cell-substrate junction assembly;Synaptosome;Memory;
66	NM_008402	Itgav	Integrin alpha V	Integral to membrane;Cell adhesion;Protein binding; Receptor activity;Cell-matrix adhesion;Integrin-mediated signaling pathway;Integrin complex;Angiogenesis;Blood vessel development;
67	NM_010578	Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	Plasma membrane;Integral to membrane;Cell adhesion;Protein binding;Oxidoreductase activity;Regulation of cell cycle;Receptor activity;Cell-matrix adhesion;G1/S transition of mitotic cell cycle;Extracellular space;Metabolism;Integrin-mediated signaling pathway;Integrin complex;Synaptosome;
68	NM_016780	Itgb3	Integrin beta 3	Integral to membrane;Cell adhesion;Protein binding; Oxidoreductase activity;Receptor activity;Cell-matrix adhesion;Extracellular space;Metabolism;Integrin-mediated signaling pathway;Integrin complex;Cell-substrate junction assembly;External side of plasma membrane;

69	NM_010612	Kdr	Kinase insert domain protein receptor	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Integral to membrane;Protein serine/threonine kinase activity; Protein-tyrosine kinase activity;Receptor activity;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity;Membrane;Protein kinase activity;Extracellular space;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway;Kinase activity;Vascular endothelial growth factor receptor activity;Angiogenesis;Cell fate commitment;Endothelial cell differentiation;
70	NM_021099	Kit	Kit oncogene	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Protein kinase cascade;Integral to membrane; Cell proliferation;Protein binding;Protein serine/threonine kinase activity;Protein-tyrosine kinase activity;Germ cell development;Receptor activity;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity;Membrane;Protein kinase activity;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway;Chemotaxis;Cell differentiation;Cytokine and chemokine mediated signaling pathway;Response to radiation;Hemopoiesis;Autophosphorylation;External side of plasma membrane;Phosphorylation;Peptidyl-tyrosine phosphorylation;Stem cell factor receptor activity;Cellular physiological process;
71	NM_008608	Mmp14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	Hydrolase activity;Integral to membrane;Proteolysis and peptidolysis;Zinc ion binding;Collagen catabolism; Extracellular space;Metalloendopeptidase activity;Metalloproteinase activity;Extracellular matrix (sensu Metazoa);
72	NM_032006	Mmp1a	Matrix metalloproteinase 1a (interstitial collagenase)	Collagenase activity;

73	NM_008610	Mmp2	Matrix metalloproteinase 2	Hydrolase activity;Calcium ion binding;Proteolysis and peptidolysis;Zinc ion binding;Collagen catabolism; Extracellular matrix;Extracellular space;Gelatinase A activity;Metalloendopeptidase activity;Metalloproteinase activity;Extracellular matrix (sensu Metazoa);
74	NM_013599	Mmp9	Matrix metalloproteinase 9	Hydrolase activity;Proteolysis and peptidolysis; Zinc ion binding;Collagen catabolism;Extracellular space;Metalloendopeptidase activity;Metalloproteinase activity;Gelatinase B activity;Extracellular matrix (sensu Metazoa);
75	NM_010927	Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible	Electron transporter activity;Oxidoreductase activity; Nitric oxide biosynthesis;Electron transport;Superoxide metabolism;Calmodulin binding;Nitric-oxide synthase activity;NOT ovulation (sensu Mammalia);Defense response to bacteria;FMN binding;
76	NM_008713	Nos3	Nitric oxide synthase 3, endothelial cell	Calcium ion binding;Electron transporter activity; Oxidoreductase activity;Nitric oxide biosynthesis;Electron transport;Calmodulin binding;Nitric-oxide synthase activity;Learning;Ovulation (sensu Mammalia);
77	NM_008726	Nppb	Natriuretic peptide precursor type B	Extracellular;Extracellular space;Hormone activity;
78	NM_008727	Npr1	Natriuretic peptide receptor 1	ATP binding;Protein amino acid phosphorylation;Integral to membrane;Protein serine/threonine kinase activity; Intracellular signaling cascade;Protein-tyrosine kinase activity;Receptor activity;Membrane;Protein kinase activity;Extracellular space;Transport;Binding;Lyase activity;Mitochondrial inner membrane;Peptide receptor activity, G-protein coupled;Guanylate cyclase activity;cGMP biosynthesis;NOT regulation of blood pressure;
79	NM_008756	Ocln	Occludin	Plasma membrane;Integral to membrane; Structural molecule activity;Protein binding;Membrane;Tight junction;

80	NM_011058	Pdgfra	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Integral to membrane;Protein serine/threonine kinase activity;Protein-tyrosine kinase activity;Receptor activity;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity;Membrane;Protein kinase activity;Extracellular space;Organogenesis;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway;Vascular endothelial growth factor receptor activity;Male genitalia morphogenesis;Platelet-derived growth factor binding;
81	NM_008809	Pdgfrb	Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Integral to membrane;Signal transduction;Protein serine/threonine kinase activity;Protein-tyrosine kinase activity;Signal transducer activity;Receptor activity;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity;Membrane;Protein kinase activity;Extracellular space;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway;Kinase activity;Vascular endothelial growth factor receptor activity;Regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation;
82	NM_008816	Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	Plasma membrane;Integral to membrane;Cell adhesion;Protein binding;Rho protein signal transduction;Extracellular space;Regulation of cell migration;Wound healing;Lipid raft;
83	NM_008827	Pgf	Placental growth factor	Cell proliferation;Cell growth and/or maintenance;Regulation of cell cycle;Membrane;Extracellular space;Growth factor activity;Angiogenesis;Ureteric bud branching;
84	NM_008872	Plat	Plasminogen activator, tissue	Hydrolase activity;Proteolysis and peptidolysis;Extracellular space;Chymotrypsin activity;Trypsin activity;Plasminogen activator activity;Serine-type endopeptidase activity;Extracellular region;Platelet-derived growth factor receptor signaling pathway;

85	NM_008873	Plau	Plasminogen activator, urokinase	Hydrolase activity;Proteolysis and peptidolysis; Extracellular space;Chymotrypsin activity;Trypsin activity;Plasminogen activator activity;Serine-type endopeptidase activity;
86	NM_008877	Plg	Plasminogen	Hydrolase activity;Calcium ion binding;Extracellular; Proteolysis and peptidolysis;Induction of apoptosis;Apoptosis;Extracellular space;Hormone activity;Blood coagulation;Chymotrypsin activity;Trypsin activity;Negative regulation of angiogenesis;Serine-type endopeptidase activity;Myogenesis;Tissue regeneration;Thrombin activity;Negative regulation of blood coagulation;Plasmin activity;Muscle maintenance;
87	NM_008968	Ptgis	Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	Integral to membrane;Oxidoreductase activity; Extracellular space;Electron transport;Endoplasmic reticulum;Isomerase activity;Prostaglandin biosynthesis;Monooxygenase activity;Prostaglandin-I synthase activity;
88	NM_011198	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Cytoplasm;Oxidoreductase activity;Peroxidase activity; Membrane;Extracellular space;Oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen;Prostaglandin-endoperoxide synthase activity;Prostaglandin biosynthesis;Regulation of blood pressure;NOT nucleus;
89	NM_007483	Rhob	Ras homolog gene family, member B	GTP binding;GTPase activity;Protein transport;Small GTPase mediated signal transduction;Cell adhesion;Nucleus;Protein binding; Rho protein signal transduction;Negative regulation of cell cycle;Apoptosis;Membrane;Cell cycle;Angiogenesis;Transport;Cellular physiological process;

90	NM_009068	Ripk1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation; Signal transduction;Protein binding;Protein serine/threonine kinase activity;Protein-tyrosine kinase activity;Apoptosis;Protein kinase activity;
91	NM_011345	Sele	Selectin, endothelial cell	Integral to membrane;Cell adhesion;Protein binding; Membrane;Extracellular space;Sugar binding;Heterophilic cell adhesion;
92	NM_011346	Sell	Selectin, lymphocyte	Integral to membrane;Cell adhesion;Protein binding; Membrane;Extracellular space;Defense response;Sugar binding;Heterophilic cell adhesion;External side of plasma membrane;
93	NM_011347	Selp	Selectin, platelet	Integral to membrane;Cell adhesion;Protein binding; Inflammatory response;Membrane;Extracellular space;Sugar binding;
94	NM_009151	SelpIg	Selectin, platelet (p-selectin) ligand	Integral to membrane;Cell adhesion;Protein binding; Extracellular space;Sugar binding;
95	NM_008871	Serpine1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	Protein binding;Extracellular space;Serine-type endopeptidase inhibitor activity; Plasminogen activator activity;Regulation of angiogenesis;
96	NM_011434	Sod1	Superoxide dismutase 1, soluble	Cytoplasm;Oxidoreductase activity;Response to oxidative stress; Mitochondrion;Antioxidant activity;Copper, zinc superoxide dismutase activity;Metal ion binding;Superoxide metabolism;Removal of superoxide radicals;Activation of MAPK;DNA fragmentation;
97	NM_013690	Tek	Endothelial-specific receptor tyrosine kinase	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Integral to membrane;Structural molecule activity; Protein serine/threonine kinase activity;Protein-tyrosine kinase activity;Receptor activity;Cell-cell adhesion;Cell-matrix adhesion;Protein kinase activity;Extracellular space;Kinase activity;Regulation of angiogenesis;Regulation of cell migration;

98	NM_011576	Tfpi	Tissue factor pathway inhibitor	Extracellular space;Blood coagulation;Serine-type endopeptidase inhibitor activity; Protease inhibitor activity;Extracellular region;
99	NM_009364	Tfpi2	Tissue factor pathway inhibitor 2	Extracellular space;Blood coagulation;Serine-type endopeptidase inhibitor activity; Protease inhibitor activity;Extracellular region;
100	NM_011577	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	Protein amino acid phosphorylation;Cell proliferation;Protein binding;Negative regulation of cell proliferation; Regulation of cell cycle;Inflammatory response;Extracellular matrix;Extracellular space;Organogenesis;Growth factor activity;Skeletal development;Defense response;Regulation of cell proliferation;Necrosis;Transforming growth factor beta receptor signaling pathway;Transforming growth factor beta receptor binding;Cell growth;Lymph gland development;Growth;Myogenesis;Regulation of myogenesis;Regulation of protein-nucleus import;
101	NM_009367	Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2	Cell proliferation;Regulation of cell cycle;Extracellular space; Growth factor activity;Transforming growth factor beta receptor binding;Cell growth;Growth;Extracellular matrix organization and biogenesis;
102	NM_009378	Thbd	Thrombomodulin	Plasma membrane;Integral to membrane;Calcium ion binding; Receptor activity;Membrane;Extracellular space;Transmembrane receptor activity;Blood coagulation;Negative regulation of coagulation;Sugar binding;Pregnancy;Embryonic development;
103	NM_011580	Thbs1	Thrombospondin 1	Calcium ion binding;Structural molecule activity; Cell adhesion;Extracellular;Protein binding;Extracellular space;Heparin binding;Negative regulation of angiogenesis;
104	NM_011593	Timp1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Extracellular space;Metalloendopeptidase inhibitor activity; Basement membrane;Extracellular matrix (sensu Metazoa);

105	NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor	Plasma membrane;Cell proliferation;Immune response; Cell growth and/or maintenance;Humoral immune response;Inflammatory response;Positive regulation of cell proliferation;Induction of apoptosis via death domain receptors;Signal transducer activity;Development;Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade;Integral to plasma membrane;Organogenesis;Tumor necrosis factor receptor binding;Defense response;Secretory granule;Regulation of cell proliferation;Cytokine and chemokine mediated signaling pathway;Cellular defense response;Lymph gland development;Cellular extravasation;Positive regulation of osteoclast differentiation;Programmed cell death, transformed cells;Regulation of osteoclast differentiation;
106	NM_009397	Tnfaip3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	Hydrolase activity;DNA binding;Nucleus;Protein binding; Cytoplasm;Apoptosis;Zinc ion binding;Cysteine-type peptidase activity;
107	NM_008764	Tnfrsf11b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	Signal transduction;Protein binding;Apoptosis; Receptor activity;Extracellular matrix;Extracellular space;Negative regulation of odontogenesis (sensu Vertebrata);
108	NM_007987	Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	Integral to membrane;Signal transduction;Immune response; Apoptosis;Induction of apoptosis via death domain receptors;Receptor activity;Membrane;Transmembrane receptor activity;Programmed cell death, transformed cells;Programmed cell death, inflammatory cells;External side of plasma membrane;Programmed cell death, activated T-cells;
109	NM_009425	Tnfsf10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Integral to membrane;Immune response;Protein binding;Apoptosis;Membrane;Extracellular space; Tumor necrosis factor receptor binding;Cytokine activity;
110	NM_010177	Fasl	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	Integral to membrane;Signal transduction;Extracellular; Immune response;Apoptosis;Membrane;Tumor necrosis factor receptor binding;Cytokine activity;

111	NM_011693	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	Plasma membrane;Integral to membrane;Cell adhesion;Protein binding;Membrane;Cell-cell adhesion;Extracellular space;
112	NM_009505	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	Cell proliferation;Cell growth and/or maintenance;Anti-apoptosis;Regulation of cell cycle;Mesoderm development;Membrane;Extracellular space;Heparin binding;Growth factor activity;Angiogenesis;
113	NM_011708	Vwf	Von Willebrand factor homolog	Cell adhesion;Protein binding;Extracellular space;Hemostasis;Blood coagulation;Extracellular matrix (sensu Metazoa);
114	NM_011723	Xdh	Xanthine dehydrogenase	Electron transporter activity;Oxidoreductase activity;Electron transport;Molybdenum ion binding;Xanthine dehydrogenase activity;Xanthine oxidase activity;Lactation;Regulation of epithelial cell differentiation;
115	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	
116				
117				
118	SA_00005	AS1R2	Artificial Sequence 1 Related 2 (80% identity)(48/60)	
119	SA_00004	AS1R1	Artificial Sequence 1 Related 1 (90% identity)(54/60)	
120	SA_00003	AS1	Artificial Sequence 1	
121	NM_024277	Rps27a	Ribosomal protein S27a	Intracellular;Protein biosynthesis;Ribosome;
122	NM_009735	B2m	Beta-2 microglobulin	Plasma membrane;Integral to plasma membrane;Extracellular space;Defense response;Cellular defense response;Antigen processing, endogenous antigen via MHC class I;MHC class I receptor activity;Antigen presentation, endogenous antigen;

123	NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	ATP binding;Protein binding;Mitochondrion;Response to heat; Protein folding;Unfolded protein binding;Response to unfolded protein;ATP binding;Protein binding;Mitochondrion;Response to heat;Protein folding;Unfolded protein binding;Response to unfolded protein;
124	NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	ATP binding;Protein binding;Mitochondrion;Response to heat; Protein folding;Unfolded protein binding;Response to unfolded protein;ATP binding;Protein binding;Mitochondrion;Response to heat;Protein folding;Unfolded protein binding;Response to unfolded protein;
125	NM_008907	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A	Cytosol;Protein folding;Isomerase activity; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity;Cytosol;Protein folding;Isomerase activity;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity;
126	NM_008907	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A	Cytosol;Protein folding;Isomerase activity; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity;Cytosol;Protein folding;Isomerase activity;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity;
127	SA_00007	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence	
128	SA_00007	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence	

3.12 Amplificação do RNA e produção de cRNA marcado

Uma vez obtidos os RNA totais das amostras de pulmão e coração foi necessário sintetizar, de maneira a respeitar a complexidade do transcrito, moléculas de RNA complementar (cRNA), também conhecidos como cRNAs alvos. Os cRNAs então seriam capturados por complementaridade pelas sondas imobilizadas na membrana do *microarray*. Para isso, foi necessário primeiro transcrever reversamente para DNA complementar (cDNA) cada espécie de RNA mensageiro (mRNA) que compõe o RNA total das amostras e usar o cDNA como molde para síntese de cRNA. Como diversas moléculas de cRNA podem ser sintetizadas a partir de um mesmo molde de cDNA, a síntese de cRNA permite que o sinal correspondente a cada espécie de mRNA seja amplificado. Finalmente, os cRNAs produzidos eram marcados com biotina por causa da inclusão de UTP (uridina trifosfato) biotinilado na reação, o que permite a detecção dos cRNAs capturados pelas sondas imobilizadas na membrana. Tanto a transcrição reversa como a amplificação do RNA foram realizadas com a utilização de um *kit* comercial (TrueLabeling-AMP 2.0 synthesis kit - SABioscience, Frederick, MD) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Entre 0,1 e 3,0 µg de RNA total foram reversamente transcritos por uma mistura enzimática proprietária do *kit* (G2 cDNA Synthesis Enzyme Mix) em 20 µl de tampão de reação na presença de inibidor de RNase, utilizando como iniciador (em inglês, *primer*) oligo dT que alberga um sítio promotor T7 em sua extremidade 5'. A transcrição reversa foi feita a 42 °C por 50 minutos num termociclador. A inclusão de sítio T7 na sequência do

iniciador permite que o cDNA resultante seja utilizado na síntese de cRNA em reação catalisada por T7 RNA polimerase. Após a inativação térmica da transcriptase reversa (75 °C por 5 min), o produto da reação foi submetido à amplificação mediada pela T7 RNA polimerase. Esta etapa foi realizada em um tampão de 40 µl suplementado por 0,5 mM (final) de UTP biotilado durante uma noite (um mínimo de 16 horas de incubação) a 37 °C. Ao contrário da PCR, que amplifica de maneira exponencial o DNA, a amplificação do RNA produzida pela T7 RNA polimerase é linear. Dessa maneira, o conjunto de cRNA produzido reflete a complexidade do conjunto de transcritos apresentados originalmente pelas amostras biológicas. A marcação com biotina permite que os cRNAs sejam detectados posteriormente por enzimas (fostatase alcalina, no caso deste trabalho) marcadas com estreptavidina.

3.13 Pré-hibridização e hibridização das membranas de *microarray*

Antes da hibridização com cRNA marcado, as membranas de *microarray* eram umedecidas dentro dos cilindros de plástico em que são acondicionadas durante 5 min com 5 ml de água Milli-Q (Figura 5 b). Em seguida, a água Milli-Q era substituída por 2 ml de solução de hibridação (GEAhyb do kit comercial Oligo GEArray System, Superarray Inc., Frederick, MD, USA), previamente aquecida a 60 °C, e os cilindros com as membranas colocados dentro de grandes cilindros em um forno de hibridação, a 60 °C, e mantidos em rotação circular a uma velocidade de 5 rpm por 2 horas. Após

essa incubação inicial, a solução utilizada na pré-hibridação era descartada e 2 a 4 µg de cRNA de cada amostra, diluídos em 750 µl de solução de hibridização, eram incubados junto de cada membrana. Assim, a hibridação das membranas com os cRNAs-alvo ocorria a 60 °C durante pelo menos uma noite ($\geq$ 16 horas) com a mesma velocidade de rotação.

3.14 Lavagem das membranas e detecção dos cRNAs marcados com biotina

Após uma noite de hibridação, as membranas eram lavadas 60 °C para remoção das sequências-alvo não hibridizadas. A primeira lavagem era realizada com solução 2X SSC, 1% SDS (0,3M NaCl, 0,015M citrato de sódio e 1% dodecil sulfato de sódio) por 15 minutos a 25 rpm. A segunda lavagem era realizada com 0,1X SSC, 0,5% SDS (0,015M NaCl, 0,75 µM citrato de sódio e 0,5% SDS) em mesmas condições. Depois da lavagem, as membranas eram tratadas com 2 ml de solução de bloqueio (GEAblocking Solution Oligo GEArray System, Superarray Inc., Frederick, MD, USA) por 40 minutos com rotação contínua a 25 rpm. Em seguida, cada membrana era incubada com estreptavidina conjugada a fosfatase alcalina na proporção de 1:8000 por 10 minutos a 25 rpm. A estreptavidina apresenta alta afinidade natural pela biotina ligando-se, portanto, a UTP biotinilado incorporado no cRNA. Por fim, a membrana era incubada por 5 minutos com um substrato quimioluminescente da fosfatase alcalina que, ao ser degradado, produz luminescência, cujo sinal foi detectado por câmara CCD (Syngene, modelo G:boxiChemi).

As imagens obtidas com CCD foram convertidas em figuras de formato TIFF 8 bits. Com auxílio de programa apropriado e específico da plataforma de *microarray* adotada (GEMArray Expression Analysis Suite 2.0 – www.geasuite.sabiosciences.com), a intensidade da luminescência foi digitalizada e convertida em um valor numérico proporcional à expressão de cada gene.

3.15 Análise dos dados de expressão

3.15.1 Normalização dos dados

Os dados brutos derivados de experimentos de *microarray* estão sujeitos a interferências que podem afetar as intensidades medidas do sinal, sem corresponder a diferenças reais na expressão gênica. Para corrigir estas distorções, recorre-se ao processo de normalização. O objetivo deste processo é ajustar os valores de expressão de todos os genes dos experimentos de tal forma que genes que não são diferencialmente expressos apresentem valores equivalentes de expressão. É possível normalizar os dados de *microarray* aplicando um mesmo fator de correção para todos os genes representados. Este fator de correção pode ser definido através de genes constitutivos (chamados de “housekeepings”) ou pela mediana da expressão de todos os genes de uma determinada membrana. A normalização por genes constitutivos apresenta sérias limitações, pois é sabido que eles têm variação considerável na magnitude de sua expressão. Outros métodos de normalização, como a regressão linear dos sinais de expressão do array-experimento no array-controle, a regressão não-linear

por Lowess (regressão polinomial ponderada localmente, do inglês: *Locally Weighted Polynomial Regression*) e a normalização quantílica são também utilizados em experimentos de *microarray*. Todos estes métodos partem do pressuposto de que a maior parte dos genes dos experimentos não são diferencialmente expressos e que o número de genes hiper-expressos numa célula é praticamente igual ao número de genes hipo-expressos. Estas suposições são aplicáveis quando a plataforma de *microarray* é de alta densidade, ou seja, tem representatividade genômica. Na situação em que a membrana é desenhada para estudar apenas um grupo de genes de interesse, como é o caso da plataforma utilizada neste trabalho, estas pressuposições não são satisfeitas e portanto, os métodos convencionais de normalização de *microarray* não se aplicam⁸⁵.

Pelas razões apresentadas, foi escolhido um método baseado na lei de Zipf⁸⁶ que estabelece que a magnitude de uma medida de intensidade (γ) é inversamente proporcional ao posto (Y) daquele ponto dado no conjunto considerado. Dessa maneira, pode-se representar essa relação da seguinte maneira:

$$\gamma \propto Y^c$$

onde c é um coeficiente próximo de -1 e, no caso de análise de perfil de expressão genômica, γ seria a medida da intensidade de expressão gênica e Y o posto desta medida dentro de todas as medidas consideradas no perfil⁸⁶. Esta é uma lei empírica, derivada da lingüística, que pode ser aplicada em diversos fenômenos naturais. A sua aplicabilidade à análise de dados

genômicos já foi demonstrada utilizando os dados de perfil de expressão disponíveis em bancos de dados públicos⁸⁷.

Após a extração do sinal e a remoção do sinal de fundo com a utilização do *software* proprietário do fabricante, a mediana da expressão de cada gene sobre todos os *microarrays* foi obtida. A partir destas medianas, foi feita uma regressão na qual o logaritmo neperiano da mediana das intensidades (γ_{med}) de expressão de cada gene sobre todos os *arrays* é considerado a variável dependente e o logaritmo neperiano do posto da mediana correspondente (Y_{med}), a variável independente. Dessa maneira, tem-se a seguinte equação que descreve esta relação:

$$\ln(\gamma^{\wedge}_{med}) = a_{med} + b_{med}\ln(Y_{med})$$

Em seguida, este mesmo modelo de regressão foi aplicado a cada um dos *arrays* individualmente utilizando os mesmos postos (Y_{med}) considerados para obtenção da curva-referência:

$$\ln(\gamma^{\wedge}_k) = a_k + b_k\ln(Y_{med})$$

O termo $\gamma^{\wedge}_k$ na equação acima corresponde ao valor esperado da intensidade do gene no k-ésimo *array*.

Finalmente, aplica-se a diferença entre a intensidade esperada da expressão gênica no k-ésimo *array* e aquela obtida na curva-referência como fator normalizador de acordo com a equação exponencial abaixo:

$$\gamma'_k = \exp(\ln(\gamma_k)(\ln(\gamma^{\wedge}_{med})/\ln(\gamma^{\wedge}_k))$$

3.15.2 Análise estatística

A normalidade da distribuição das medidas de intensidade de expressão gênica foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para a comparação entre grupos de genes que apresentaram uma distribuição normal, aplicou-se o teste t de Student; caso contrário, o teste de Wilcoxon foi utilizado. O cálculo do erro corrigido para múltiplas comparações foi feito baseado na taxa de falso descobrimento (FDR – *False Discovery Rate*) descrito originalmente por Hochberg e Benjamini⁸⁸.

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Análise do material particulado

A composição e a concentração de cada elemento do MP_{2,5} extraído estão descritas na Tabela 2. Em geral, as concentrações de enxofre, brometo, cobalto e manganês em São Paulo são maiores que as relatadas em outros locais⁵⁵. Mesmo assim, é difícil atribuir a um determinado componente a responsabilidade de efeitos prejudiciais do MP_{2,5}^{89, 90}.

4.2 Animais e rendimento das amostras

Em experimentos iniciais, o rendimento celular e a quantidade de RNA obtidos, tanto de pulmão quanto de coração, foram abaixo dos limites inferiores mínimos para análises subseqüentes. Optou-se, então, em utilizar 3 animais para cada amostra por grupo. Esta foi a quantidade máxima de animais por grupo passível de ser manipulada sem comprometer os tempos do experimento. Foram operados 106 animais, dos quais, 2 do grupo controle morreram minutos após a instilação traqueal comparado com 8 do grupo exposto. No total, 48 animais foram utilizados em cada grupo.

Como esperado, o rendimento médio de células totais obtidas pela digestão de pulmão foi significativamente maior do que de coração (Figura 6). Mais células pulmonares apresentaram-se como viáveis (82% ± 8%) do que as provenientes do coração (75% ± 6%), $p = 0,03$. Tendo em vista esta baixa celularidade obtida pela digestão do coração, optou-se por

evitar o isolamento de células endoteliais cardíacas e utilizar os ventrículos inteiros para extração de RNA total (ver Materiais e Métodos).

Tabela 2 – Composição e concentração dos elementos de MP_{2,5} extraídos dos filtros de polycarbonato

ELEMENTO	ng/cm ²	ELEMENTO	ng/cm ²
Al	160.6	Ni	27.9
As	2.4	Pb	37.3
Ba	6.2	Sb	4.6
Ca	268.8	Ti	15.5
Co	1.0	V	1.8
Cr	5.8	Zn	144.9
Cu	37.6	Rb	3.1
Fe	309.8	S	1141.8
K	497.9	Sc	1.0
Mg	89.5	Si	385.2
Mn	35.7	W	1.7
Na	699.6		

Massa total = 6,023 mg. Área do filtro: 7,340 cm²

Figura 6 – Rendimento médio de células totais provenientes de pulmão e coração

Nota-se que o rendimento celular de tecido pulmonar foi significativamente maior que do cardíaco após dissociação com collagenase.

4.3 Parâmetros hematológicos

Não houve diferença entre os grupos exposto e controle na contagem de eritrócitos, neutrófilos, linfócitos ou plaquetas. A Tabela 3 mostra os resultados dos parâmetros hematológicos dos dois grupos. Quando comparados a valores normais de camundongos, apenas o número de plaquetas está aumentado nos dois grupos (normal = 160 a 410 mil/mm³)

Tabela 3 – Parâmetros hematológicos dos animais

	GRUPO CONTROLE		GRUPO EXPOSTO	
	Média	D.P.	Média	D.P.
Hemoglobina (%)	14.1	1.4	14.2	1.1
Eritrócitos (mi/mm ³)	9.1	0.6	9.7	0.4
Leucócitos (%)	4.4	1.1	3.8	0.5
Neutrófilos (%)	18.8	11.4	20.7	8.6
Linfócitos (%)	79.3	11.4	76.5	9.3
Plaquetas (mil/mm ³)	911.6	240.8	915.2	99.2

Sangue coletado da veia cava inferior no momento do sacrifício, 12 a 18 horas após a instilação traqueal. Não houve diferença significativa entre os dois grupos, mas ambos apresentaram aumento do número de plaquetas em relação ao valor de referência para camundongos (texto).

4.4 Análise global de expressão de endotélio pulmonar

Para gerar dados quantitativos de expressão gênica é necessário que os RNAs utilizados sejam de alta qualidade. Por esta razão, optou-se em usar os RNAs cujos RINs (explicado na seção Materiais e Métodos) foram iguais ou superiores a 7,0 e que após a amplificação e purificação, tivesse massa total de pelo menos 2 µg. Considerando, ainda, que algumas sondas não foram adequadamente marcadas e as membranas não emitiram luminescência após a hibridação, 4 membranas do grupo controle e 5 do grupo exposto foram eleitas para análise comparativa de expressão; todas produziram sinais luminescentes semelhantes àquela apresentada na Figura 7. Os valores de expressão gênica foram extraídos das imagens digitalizadas considerando como *background* o valor mínimo de cada membrana. Após a normalização, os coeficientes de concordância entre as membranas foram relativamente altos nos dois grupos, variando de 0,7295 a 0,9143. Este dado demonstra que, a despeito dos interferentes e da variabilidade biológica inerentes ao sistema experimental, os resultados obtidos de expressão gênica são bem reprodutíveis.

Figura 7 – Resultado típico de um experimento de *microarray*

Após a hibridação, lavagem e marcação $2^{\text{ária}}$ de moléculas-alvo com estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina, os cRNAs ligados às sondas foram detectadas com o uso de substrato quimioluminescente e o sinal luminoso capturado com o uso de câmara CCD. Esquerda: Imagem de membrana hibridizada capturada pela CCD. Direita: Os valores de expressão extraídos a partir da imagem digitalizada mediante o uso de software proprietário do fabricante (<http://www.geasuite.sabiosciences.com>). Cada célula da tabela corresponde à expressão de um gene representado.

Quando a concordância entre as membranas de um mesmo grupo é avaliada pela inspeção visual de gráficos de dispersão, é possível detectar padrões distintos para membranas do grupo controle e do grupo exposto. De maneira geral, os pontos de um gráfico de dispersão produzido pela comparação das amostras do grupo controle tendem a se agrupar em torno da bissetriz do ângulo formado pelos eixos do gráfico (Figura 8a). Isso indica que o perfil de expressão gênica apresentado pelas amostras do grupo controle é bastante semelhante. As membranas do grupo exposto, por sua vez, apresentam um desvio mais visível quando comparados aos pares (Figura 8b), o que mostra que o estímulo com $MP_{2,5}$ produz uma variabilidade maior do que o SF no perfil de expressão gênica do endotélio pulmonar.

Figura 8a – Dispersão dos valores de expressão de endotélio pulmonar de controles

Observa-se que, quando os valores normalizados e log-transformados de cada amostra são comparados com outra do mesmo grupo controle, a maioria dos genes tem valores de expressão semelhante, pois se distribuem linearmente ao longo da bissetriz. CP1 a 4: amostras 1 a 4 do grupo Controle Pulmão.

Figura 8b – Dispersão dos valores de expressão de endotélio pulmonar de expostos

As expressões gênicas do grupo exposto são mais divergentes entre si, pois se observa que a distribuição dos valores de expressão, quando analisados amostra por amostra, não é linear na maioria das comparações. EP1 a 5: amostras 1 a 5 do grupo Exposto Pulmão.

4.5 Inferência comparativa das expressões gênicas

O uso de testes estatísticos univariados (teste t ou teste de Wilcoxon) identificou 13 genes diferencialmente expressos (Tabela 4) considerando um erro alfa $\leq 0,05$. Desses, 5 genes foram hiper-regulados pelo MP (Itgb1, Cxcl1, Tnf, Ecgf1 e Tnfaip3) e 8 genes foram hipo-expressos (Enpep, Pdgfra, Gzmb, Birc2, Npr1, Angpt1, Cxcl5 e Il7). Quando os valores de p (erro alfa) foram ajustados para múltiplas comparações, utilizando método de controle de FDR, apenas 1 gene (Enpep) pôde ser identificado como diferencialmente expresso (p ajustado = 0,0361).

Analisando as categorias funcionais a que esses 13 genes pertencem, percebe-se uma diversidade considerável nas funções em que eles estão envolvidos. Estes genes puderam ser agrupados em 10 das 21 vias moleculares representadas no *microarray*: sinalização de VEGF, genes envolvidos na apoptose, crescimento de célula endotelial, moléculas de adesão, atividade de citocinas, resposta a estresse, anti-apoptose, regulação da pressão arterial, atividade da trombina e genes envolvidos em angiogênese. As categorias funcionais mais representadas entre esses 13 genes são aquelas relacionadas à resposta ao estresse, à atividade de citocina e ao crescimento de células endoteliais. Os dados de classificação funcional dos genes sugerem que a exposição ao MP modula no endotélio pulmonar a expressão principalmente de genes envolvidos em resposta de células endoteliais à lesão e a ativação de células endoteliais.

Tabela 4 – Genes diferencialmente expressos entre endotélios pulmonares de expostos e controles

ID	NOME	SÍMBOLO	t	p	FDR
47	Glutamyl aminopeptidase	Enpep	6.48	0.0003	0.0361
80	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Pdgfra	3.65	0.0082	0.4322
55	Granzyme B	Gzmb	3.57	0.0092	0.3234
67	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	Itgb1	-3.18	0.0154	0.4093
36	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	-2.87	0.0241	0.5108
16	Baculoviral IAP repeat-containing 2	Birc2	2.80	0.0264	0.4670
105	Tumor necrosis factor	Tnf	-2.52	0.0401	0.6073
78	Natriuretic peptide receptor 1	Npr1	2.45	0.0444	0.5883
41	Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)	Ecgf1	-2.40	0.0473	0.5571
8	Angiopoietin 1	Angpt1	2.37	0.0494	0.5239
106	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	Tnfaip3	-2.37	0.0497	0.4788
ID	NOME	SÍMBOLO	Wilcoxon	p	FDR
40	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	Cxcl5	20	0.0159	0.2222
64	Interleukin 7	Il7	19	0.0317	0.2222

Genes de endotélio pulmonar diferencialmente expressos encontrados pela análise de inferência entre os grupos controle e exposto. Foi considerado estatisticamente significativo o gene cujo $p \leq 0,05$. Na coluna do FDR, *False Discovery Rate*, estão representados os valores de p ajustados para múltiplas comparações. ID: número que identifica a posição do gene na membrana.

Com o intuito de verificar a capacidade que os genes identificados por testes univariados têm de descrever a resposta molecular do endotélio pulmonar à exposição ao MP_{2,5}, lançamos mão da análise de componente principal (PCA; do inglês, *Principal Component Analysis*). Esta ferramenta estatística tem como finalidade reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados que apresenta um grande número de variáveis correlatas enquanto a maior parte das variações é mantida, o que facilita a visualização da relação entre as variáveis. Esta técnica é útil na detecção de grupos de genes que apresentam padrões de expressão semelhantes em todo conjunto de amostras ou na identificação de grupos de espécimes que compartilham padrões de semelhança⁹¹. Utilizando os 13 genes diferencialmente expressos, PCA foi realizada considerando ou os genes como variáveis (Figura 9a) ou as membranas (Figura 9b). Quando a análise foi realizada considerando os genes como variáveis, a variabilidade das amostras quanto à expressão gênica pôde ser descrita em 9 componentes principais. Os dois primeiros foram responsáveis por 77,1% das variabilidades entre as amostras, o que significa que muito das variações dos dados de *microarray* pode ser apreciado considerando apenas estes dois componentes. Ao se representar os dados em um gráfico *biplot*, que mostra simultaneamente a relação das amostras (pontos) e a dos genes (vetores), percebe-se nitidamente a separação das amostras em dois grupos distintos de acordo com a exposição ou não ao MP_{2,5} (Figura 9a). Neste tipo de representação, o módulo de cada vetor representa sua variância e a posição relativa dos pontos indica a distância entre as amostras. A partição

das amostras pela presença ou não de exposição pode ser visualizada também quando os *microarrays* são tratados como variáveis. Nesta segunda situação, as amostras, agora representadas como vetores, formam dois feixes que mantêm um ângulo prontamente visível no *biplot* (Figura 9b). A robustez da separação dos *microarrays* em 2 grupos distintos sugere que a exposição ao MP produz uma resposta biológica consistente que pode ser descrita adequadamente pela expressão dos 13 genes encontrados pela análise de inferência comparativa. Em adição à análise gráfica, PCA fornece também informações matemáticas a respeito da contribuição de cada gene na variabilidade apresentada pelas amostras. Isso é expresso como peso de cada componente principal. O primeiro componente principal é a média ponderada das variáveis e o coeficiente correspondente a cada variável é o peso que ela representa na determinação da variabilidade das amostras. A variável (o gene) que apresentou maior peso no primeiro componente principal foi o *Tnf*. Isto indica que este é o gene que mais influi na variabilidade do perfil de expressão gênica entre os grupos controle e exposto. Pela mesma razão, *Ecgf1* é o gene que menos contribui para variabilidade encontrada nas amostras. O segundo componente principal apresenta o contraste entre diferentes tipos de informação que pode ser apreciado pelo sinal dos coeficientes das variáveis. Os coeficientes dos genes *Ecgf1*, *Tnfaip3*, *Cxcl5* e *Il7* apresentam sinal positivo no segundo componente principal ao passo que os coeficientes de todos outros apresentam sinal negativo. Este dado indica que aqueles quatro formam um grupo de genes corregulados (são variáveis do mesmo tipo) em oposição a

outro grupo formado pelos 9 últimos. Dessa maneira, PCA revelou numericamente relações entre os genes antes não óbvias pela análise puramente biológica.

Figura 9a – Representação da análise de componente principal (PCA) utilizando os 13 genes diferencialmente expressos como variáveis

Os genes estão representados em vetores (em vermelho), numerados conforme sua localização na membrana (número de identificação – ver Tabela 4) e as membranas estão distribuídas ao longo do plano, nomeadas de CP1 a CP4 (controle pulmão) e EP1 a EP5 (exposto pulmão). PC: componente principal. Observa-se que as membranas CP estão à esquerda do plano e as EP à direita. Os 13 genes, portanto, foram capazes de distinguir os dois grupos entre si.

Figura 9b – Representação da análise de componente principal (PCA) utilizando os 13 membranas como variáveis

Nesta análise, os vetores (em vermelho) são as membranas e os números, os genes distribuídos pelo *biplot*. Esta perspectiva também reforça o fato de que os genes diferencialmente expressos separam as membranas em dois grupos, concordantes com expostos e controles.

4.6 Análise global de expressão de coração

As membranas do coração apresentaram, em geral, um sinal forte de genes constitutivos, principalmente Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gadph), e de precursor de peptídeo natriurético (Nppb), localizado no meio da membrana (Figura 10). No entanto, houve uma marcação muito fraca nos outros pontos, aproximando seus valores de expressão aos de locais em branco na membrana. Desta forma, não foi possível realizar análises subseqüentes dos níveis de transcrição gênica em coração.

Figura 10 – Exemplo de uma imagem obtida de amostra cardíaca (esquerda) e seus valores de expressão (direita)

58735.48	1187.26	194.8	418.44	61.52	87.49	66.98	29.39
973.32	360.89	704.1	200.95	41.69	62.2	156.52	60.15
263.15	191.38	153.11	101.84	55.36	53.31	24.61	32.13
159.94	212.57	120.98	50.58	36.91	64.93	6.84	51.95
180.45	767.27	157.89	115.51	59.47	49.21	56.05	7.52
151.74	176.35	146.27	77.24	131.23	82.7	37.59	24.61
155.84	126.45	271.8	65.62	62.2	72.45	95.01	20.51
530.86	139.44	98.43	66.3	77.24	203.26	31.44	25.29
176.35	184.55	197.53	121.66	153.11	51.95	118.33	10
621.52	277.51	252.22	509.57	6009.4	390.28	50.58	211.35
194.12	432.69	223.51	161.31	214.62	90.91	249.29	26.66
154.47	146.95	148.32	171.56	138.75	60.15	166.33	31.44
354.5	119.61	118.93	125.08	86.12	52.63	42.38	8.89
151.74	122.35	71.09	115.51	59.47	36.23	315.78	86.29
110.73	165.41	118.25	97.06	88.86	55.36	20.51	74.50
1816.55	4365.43	4434.36	3944.70	6890.06	6168.94	1552.64	10831.25

O sinal mais forte da membrana (primeiro gene no topo à esquerda) representa Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gadph), um gene contitutivo. Outros genes marcados são as seqüências-controle da membrana (fileira de baixo) e o precursor de peptídeo natriurético (Nppb), produzido por células ventriculares.

5 DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A associação epidemiológica entre $MP_{2,5}$ e eventos cardiopulmonares está bem estabelecida, mas os estudos que revelam os mecanismos fisiopatológicos desta relação ainda são escassos. Até o presente momento, este trabalho foi o primeiro a utilizar *microarray* de baixa densidade (“boutique”), específico para biologia endotelial, a fim de avaliar os efeitos de $MP_{2,5}$ sobre endotélio pulmonar e coração. A vantagem desta tecnologia é que ela permite a avaliação de vários genes ao mesmo tempo, sob uma determinada condição, com resultados mais dirigidos que os obtidos por *microarray* s de alta densidade. A análise de transcrição de genes envolvidos em várias vias celulares em paralelo permite, ainda, ampliar as hipóteses fisiopatogênicas moleculares e abre caminho para novos estudos confirmatórios em curto intervalo de tempo.

Um aspecto diferencial do método utilizado no trabalho foi obter RNA apenas do endotélio pulmonar, mas dispensando a cultura celular, ou seja, contemplando as interações do endotélio com outros tipos celulares *in vivo* antes da análise de expressão gênica. A cultura de célula endotelial, apesar de ser um procedimento rotineiro nos estudos de biologia endotelial está sujeito a artefatos tais como alterações de expressão gênica inerentes à cultura de células. De fato, Alfaro-Moreno et al. compararam os efeitos de MP_{10} em mono, bi e tric culturas de macrófagos, mastócitos e pneumócitos, com e sem endotélio associado, e mostraram que as respostas moleculares, como expressão de citocinas inflamatórias, têm comportamentos

divergentes nas diferentes situações⁹². Neste aspecto, o modelo aqui utilizado elimina este tipo de erro.

A instilação intratraqueal foi a forma encontrada para garantir a exposição pulmonar uniformemente em todos os animais. Em experimentos iniciais realizados com instilação nasal, parte da suspensão de MP ou de SF era freqüentemente vista na cavidade oral durante a aplicação. Além disso, nenhum desconforto respiratório era observado durante o procedimento. A baixa eficácia da exposição com instilação nasal foi confirmada ao se instilar azul de metileno na narina de alguns camundongos: em 1 a 2 horas, nenhuma marcação foi observada no pulmão, em contraste com o intestino grosso, que teve sua mucosa tingida de azul (experimentos pilotos não descritos). Em acordo com estes achados, Leong et al. observaram que apenas 10% do conteúdo de uma instilação traqueal atinge o pulmão via instilação nasal em ratos⁹³. Outra vantagem da instilação traqueal é evitar o efeito protetor da fisiologia e anatomia das vias aéreas superiores⁹⁴. Para cumprir o objetivo deste trabalho, que é uma prova de conceito da ação de MP_{2,5} sobre o endotélio pulmonar, a não interferência das vias aéreas superiores era fundamental para evitar perda de dose, mais um fator de confusão e variabilidade dos resultados. Neste contexto ainda, a nebulização nasal seria também desvantajosa, assim como a nebulização traqueal, cuja eficiência é de 60% em relação à instilação traqueal⁹³. Em relação à quantidade de MP_{2,5} instilada (17,7 µg), ela pode ser considerada quase 4 vezes maior que um camundongo inalaria do ambiente se exposto à região de coleta dos filtros, considerando que a carga acumulada de

partículas suspensas no ar em 24 horas no centro de São Paulo, ajustada para o volume corrente (0,2 ml) e a frequência respiratória do animal (100 incursões por minuto), é calculada em aproximadamente 4 μg ⁹⁵.

Apesar dos cuidados para evitar ação da RNase, muitas amostras de RNA, tanto de endotélio pulmonar quanto de coração, ficaram degradadas. Dado o pequeno rendimento de RNA deste método, a adição de um preservativo com ação inibidora da RNase foi essencial para manter a integridade do RNA. A qualidade do material extraído e amplificado é fundamental para obter resultados confiáveis e consistentes na hibridização da membrana de *microarray*. Estas dificuldades impuseram limitação ao número final de amostras viáveis para hibridização. Além disso, a massa obtida após amplificação e purificação do RNA também era da ordem de dezenas de ng/ μl , o que impediu a realização de réplicas. Com isto, apenas nove membranas hibridizadas com RNA proveniente de endotélio pulmonar puderam ser utilizadas. Considerando um erro alfa de 0,05, este número de amostras provê um poder de 60% da comparação entre os grupos controle e exposto, um erro beta aceitável para estudos com *microarray* que resultou em dados consistentes e uma resposta biológica coerente.

Em relação às amostras de coração, é possível que o excesso de RNA de dois genes provenientes de miócitos em relação ao de células endoteliais tenha seqüestrado UTP biotinilado e marcado mais fortemente os dois genes de forte expressão endógena nas células musculares ventriculares: *Gadph* e o hormônio *Nppb*. Isto ocorreu nos dois grupos. Uma análise exploratória não mostrou diferença significativa de *Nppb* entre as

expostos e controles, mas como a fluorescência emitida da maioria dos genes da membrana foi muito baixa, optou-se em não realizar uma análise de inferência, pois ela incorreria em resultados não confiáveis. Uma solução para este problema, ainda evitando a cultura celular, seria aumentar o número de animais por amostra para posterior isolamento endotelial e/ou aumentar a oferta de UTP biotinilado durante a etapa de amplificação, sabendo do risco de saturação do sinal nos dois genes citados.

Os genes cuja expressão no endotélio pulmonar foi diferencialmente modulada pelo MP_{2,5} pertencem a uma variedade de categorias funcionais. O fato de eles representarem metade das categorias contempladas (10 das 21 representadas) pela plataforma utilizada no presente estudo é indicativo da extensão e complexidade da resposta do endotélio pulmonar a este insulto. O exame da lista dos genes diferencialmente expressos permite delinear um padrão: 1) a grande maioria (9/13) dos genes são moléculas secretadas ou apresentadas na superfície das células; 2) a maioria dos genes estão envolvidos ou na ativação endotelial (sinalização de VEGF, crescimento de célula endotelial, moléculas de adesão, atividade de citocinas) ou na resposta endotelial à lesão (apoptose, resposta a estresse, anti-apoptose). Estas informações nos permitem concluir que o endotélio pulmonar responde ao insulto causado pelo MP_{2,5} modificando a expressão de genes envolvidos em resposta de células endoteliais à lesão e a ativação de células endoteliais e que as consequências desta resposta não estão limitadas à circulação pulmonar. Além disso, é interessante notar que um número significativo (5/13) de

genes detectados participa da sinalização de VEGF, da angiogênese e de crescimento celular. Este fato, aliado à modulação de genes envolvidos em regulação da apoptose, sugere que remodelamento vascular seja uma resposta da circulação pulmonar à injúria causada pelo MP_{2,5}.

Este trabalho foi o primeiro a demonstrar aumento de expressão de mRNA de TNF e Cxcl1 em endotélio pulmonar, sob a ação isolada de MP_{2,5}, 12 a 18 horas após o estímulo. Diferentes marcadores inflamatórios em diferentes protocolos de exposição a poluentes foram recentemente descritos, mas ainda há controvérsias quanto ao tempo de permanência da inflamação pulmonar e sob ação de quais poluentes ela ocorre. Happo et al., por exemplo, instilaram MP_{2,5} e MP₁₀ em camundongos e avaliaram de forma comparativa a resposta inflamatória ao longo do tempo. Eles observaram aumento nos níveis de TNF-alfa, IL-6 e KC (equivalente a Cxcl1) em LBA em 4 horas, mas não em 12 ou 24 horas após exposição⁵². Esta discrepância em relação aos achados do presente trabalho pode ser atribuída ao fato de as citocinas se adsorverem às partículas instiladas e, portanto, o resultado ser um falso-negativo, como relataram Mantecca et al.⁵⁴. Neste aspecto, a quantificação da transcrição gênica aqui avaliada estaria imune a tal interferência. Em linha com a atividade pró-inflamatória pulmonar encontrada neste estudo, Courtois et al. observaram, após 24 horas de exposição a MP urbano, aumento da liberação de TNF-alfa e de IL-8 de endotélio pulmonar bovino⁹⁶, assim como Montiel-Dávalos et al. notaram ativação de células endoteliais de veia umbilical humana e aumento do número de moléculas de adesão⁹⁷ após exposição aguda a MP_{2,5},

corroborando, assim, o efeito pró-inflamatório de MP_{2,5} sobre o endotélio pulmonar.

Em relação aos efeitos inflamatórios sistêmicos, a metodologia utilizada não permitiu obter resultados significativos das amostras cardíacas. Quanto aos parâmetros hematológicos, não houve diferença no número de leucócitos circulantes ou de plaquetas entre os dois grupos. O próprio ato cirúrgico e a instilação pulmonar, duas fontes de agressão capazes de provocar neutrofilia, poderiam mascarar a diferença esperada entre os grupos, mas quando se compara os valores obtidos com os de referência para camundongos, não houve diferença significativa. Interessantemente, no entanto, o número de plaquetas foi quase duas vezes maior que o valor de normalidade nos dois grupos⁹⁸. Na literatura, existem resultados contraditórios dos parâmetros hematológicos sob efeito de MP. Rivero et al., por exemplo, encontraram em ratos diminuição de número de neutrófilos circulantes após instilação de 100 µg de MP_{2,5}, mas aumento de linfócitos com 500 µg de MP_{2,5}⁵⁵. Em humanos, Salvi et al. observaram aumento de leucócitos e plaquetas circulantes em indivíduos normais expostos a partículas de exaustão de diesel³⁸, mas Ghio et al, expuseram voluntários saudáveis a MP em concentrações diferentes e encontraram parâmetros hematológicos normais⁵⁶. Dadas as discordâncias, seria necessário um número maior de estudos para confirmar as alterações hematológicas decorrentes de MP_{2,5}.

Além da resposta endotelial no sentido pró-inflamatório, um achado surpreendente do atual trabalho foi o número de genes

diferencialmente expressos que estão envolvidos no tônus e na remodelação vascular. Enpep, glutamil-aminopeptidase ou aminopeptidase A é uma enzima responsável por metabolizar angiotensina II (AgII) em AgIII, que por sua vez, é convertida em AgIV pela aminopeptidase B. Em situação de hipo-expressão da Enpep no endotélio pulmonar, como identificado no presente modelo, mais AgII torna-se disponível na circulação sangüínea, desequilibrando a balança do tônus vascular a favor da vasoconstrição. Além disso, a AgIV tem um efeito vasoprotetor descrito em células endoteliais de artéria pulmonar ao aumentar a expressão de eNOS⁹⁹. A menor oferta de AgIV, portanto, potencializaria a vasoconstrição. Seu papel na biologia endotelial é tão impactante que mesmo os ateromas mais avançados respondem à proteção vascular conferida pela AgIV mediada por óxido nítrico¹⁰⁰, o que significa que sua falta representaria uma agressão contínua ao sistema vascular. Desta forma, a degradação da AgII pela Enpep serve como uma etapa moduladora, dos níveis de Ag II e da pressão arterial / tônus vascular¹⁰¹. Em acordo com as evidências epidemiológicas de aumento da mortalidade cardíaca após exposição aguda a MP, principalmente em cardiopatas, o pico hipertensivo causado por aumento de AgII poderia ser o desencadeador de infarto de miocárdio por aumento de pós-carga e conseqüente maior consumo de oxigênio.

Outro papel recentemente descrito da AgII é o de ser pró-aterogênica, pois ela induz a expressão de fatores de crescimento via receptores AT1, inicia proliferação celular, estimula migração, ativa sinais pró-inflamatórios e aumenta o estresse oxidativo¹⁰⁰. Isto explicaria em

grande parte o fato de o MP ser um fator de risco cardiovascular cronicamente¹⁰². Camundongos transgênicos com hiper-expressão de receptores AT1, por exemplo, apresentam acentuada hipertrofia celular e remodelamento cardíaco, com aumento dos níveis do fator natriurético atrial, mesmo sem sobrecarga vascular¹⁰³. Alguns trabalhos avaliaram a associação de AgII na sinalização de receptor AT1 com poluentes, seja MP_{2,5}¹⁰⁴, UFP¹⁰⁵ ou cigarro¹⁰⁶. Em nenhum destes experimentos, no entanto, foi avaliado o nível de transcrição de Enpep ou o grau de sua atividade no endotélio pulmonar. O resultado do atual trabalho contribui para elaboração de uma nova hipótese complementar da ação de MP_{2,5}, em que a hipo-expressão de Enpep aumentaria a oferta de AgII e estaria associada à disfunção endotelial relacionada ao MP_{2,5}.

O resultado deste trabalho também mostrou hipo-expressão de Granzyme B, uma serina-protease que, quando hipoexpressa, tem funções complementares à AgII. A primeira está relacionada à trombogênese: GrB atrasa agregação plaquetária e inibe adesão de plaquetas, além de inibir a exposição do vWf sob condições normais (estáticas). Quando vWf tem sua conformação alterada, GrB processa grandes multímeros de vWf liberados de células endoteliais ativas. Desta forma, ele modula a coagulação durante a inflamação¹⁰⁷. Em situação de hipoexpressão, portanto, GrB favorece formação de trombos. A segunda função normal de GrB é a indução apoptose de células endoteliais, sem ter ação quimiotática¹⁰⁸. Granzymes têm atividade proteolítica pericelular, clivando a fibronectina e retirando a

estrutura de sustentação celular induzindo, assim, à apoptose¹⁰⁹. Neste contexto, a hipo-expressão de GrB favorece o remodelamento vascular.

Dentre os resultados obtidos, estão ainda envolvidos diretamente em remodelamento vascular e angiogênese *Tymp*, *Angpt1* e *Birc2*. De forma indireta, as próprias citocinas encontradas diferencialmente expressas também têm um papel na angiogênese (*Cxcl5*) e regulação de apoptose (*TNF*, *TNFAip3*).

Neste trabalho, chama a atenção que a resposta aguda a $MP_{2,5}$ inclui vários genes deste processo biológico, que pode ser um mecanismo pelo qual o sistema cardiovascular é atingido e ao qual é mais sensível do que ao mecanismo pró-inflamatório.

Não foi o objetivo deste trabalho identificar quais elementos do $MP_{2,5}$ causam os efeitos endoteliais pulmonares ou cardíacos. Sabe-se que a toxicidade do $MP_{2,5}$ está primariamente ligada ao número das partículas encontradas, ao tamanho, área de superfície e composição química¹¹⁰.

Algumas potenciais limitações deste trabalho podem ser apontadas. A primeira é o baixo número de membranas, que apesar de diminuir o poder do estudo, não invalida os resultados. De fato, a tecnologia de *microarray* é melhor aplicada como um método de triagem e de elaboração de novas hipóteses patogênicas e, portanto, uma análise muito restritiva e conservadora poderia descartar resultados biologicamente significativos. Outra necessidade não preenchida neste trabalho é a validação dos resultados com análise proteica. A forma mais adequada para validar os níveis de expressão de RNA dos genes identificados como

diferencialmente expressos seria avaliando a presença e atividade das respectivas proteínas. O passo seguinte, portanto, é elaborar um modelo em que a hipótese de que fatores de remodelamento vascular e vasoconstritores são os maiores responsáveis pelos eventos cardíacos agudos da exposição ao MP. Um exemplo de modelo animal seria utilizar camundongos geneticamente modificados e avaliar o impacto da variação do nível sérico de AgII e atividade da Enpep no endotélio pulmonar e cardíaco e a susceptibilidade destes animais aos efeitos deletérios do MP. Apesar do pequeno número de amostras e da não validação proética, os resultados obtidos são coerentes com a atividade biológica e com resultados recentes da literatura. Além disso, o trabalho foi capaz de propor um novo mecanismo celular de efeito do MP_{2,5} sobre o pulmão e o sistema cardiovascular.

6 CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- 1) O estudo da expressão gênica de células endoteliais pulmonares por *microarray* identificou 10 categorias funcionais (ontológicas) das 21 representadas na membrana atuantes na resposta ao MP_{2,5}.
- 2) As categorias funcionais mais representaas são as envolvidas em atividade de citocina, resposta ao estresse e crescimento endotelial
- 3) A hipo-expressão de Enpep e Npr1 sugere uma participação da regulação hemodinâmica extraneural do efeito agudo do MP_{2,5}.
- 4) No modelo experimental utilizado, MP_{2,5} altera expressão de genes que medeiam a sinalização por VEGF e a expressão de genes envolvidos da regulação de apoptose, dois processos envolvidos no remodelamento vascular.
- 5) Os resultados encontrados não suportam a hipótese de que há processo inflamatório sistêmico significativo após exposição aguda ao MP_{2,5}.

7 REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Pénard-Morand C, Annesi-Maesano I. Air pollution: from sources of emissions to health effects. *Breathe*. [Review]. 2004;1(2):10.
2. Pope CA, 3rd. Air pollution and health - good news and bad. *N Engl J Med*. 2004 Sep 9;351(11):1132-4.
3. Available from: <http://www.fluoridealert.org/meuse.htm>.
4. Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environmental health perspectives*. 2001 Aug;109 Suppl 4:523-7.
5. Bell ML, Davis DL, Fletcher T. A retrospective assessment of mortality from the London smog episode of 1952: the role of influenza and pollution. *Environ Health Perspect*. 2004 Jan;112(1):6-8.
6. Available from: <http://www.depweb.state.pa.us/heritage/cwp/view.asp?a=3&Q=533403&MP=1>.
7. Bell ML, Davis DL. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environ Health Perspect*. 2001 Jun;109 Suppl 3:389-94.
8. Pope CA, 3rd, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, et al. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995 Mar;151(3 Pt 1):669-74.

9. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama*. 2002 Mar 6;287(9):1132-41.
10. Krewski D, Jerrett M, Burnett RT, Ma R, Hughes E, Shi Y, et al. Extended follow-up and spatial analysis of the American Cancer Society study linking particulate air pollution and mortality. *Res Rep Health Eff Inst*. 2009 May(140):5-114; discussion 5-36.
11. Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clin Sci (Lond)*. 2008 Sep;115(6):175-87.
12. Brook RD. Why physicians who treat hypertension should know more about air pollution. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)*. 2007 Aug;9(8):629-35.
13. Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, et al. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21):2655-71.
14. Dominici F, McDermott A, Zeger SL, Samet JM. Airborne particulate matter and mortality: timescale effects in four US cities. *American journal of epidemiology*. 2003 Jun 15;157(12):1055-65.
15. Samet JM, Dominici F, McDermott A, Zeger SL. New problems for an old design: time series analyses of air pollution and health. *Epidemiology*. 2003 Jan;14(1):11-2.
16. Glantz SA. Air pollution as a cause of heart disease. Time for action. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Mar 20;39(6):943-5.

17. Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Jun 12;103(23):2810-5.
18. Pope CA, 3rd. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environmental health perspectives*. 2000 Aug;108 Suppl 4:713-23.
19. Samet JM, Dominici F, Currier FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med*. 2000 Dec 14;343(24):1742-9.
20. World Health Organization W. WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Global update 2005 2006.
21. RESOLUÇÃO CONAMA nº 3, de 28 de junho de 1990.
22. Schlesinger RB. The health impact of common inorganic components of fine particulate matter (PM_{2.5}) in ambient air: a critical review. *Inhal Toxicol*. 2007 Aug;19(10):811-32.
23. World Health Organization W. Reducing Risks, Promoting Health Life2002.
24. Abrahamowicz M, Schopflocher T, Leffondre K, du Berger R, Krewski D. Flexible modeling of exposure-response relationship between long-term average levels of particulate air pollution and mortality in the American Cancer Society study. *J Toxicol Environ Health A*. 2003 Aug 22-Oct 10;66(16-19):1625-54.
25. Bates DV, Baker-Anderson M, Sizto R. Asthma attack periodicity: a study of hospital emergency visits in Vancouver. *Environmental research*. 1990 Feb;51(1):51-70.

26. Anderson HR, Limb ES, Bland JM, Ponce de Leon A, Strachan DP, Bower JS. Health effects of an air pollution episode in London, December 1991. *Thorax*. 1995 Nov;50(11):1188-93.
27. Anderson HR, Spix C, Medina S, Schouten JP, Castellsague J, Rossi G, et al. Air pollution and daily admissions for chronic obstructive pulmonary disease in 6 European cities: results from the APHEA project. *Eur Respir J*. 1997 May;10(5):1064-71.
28. Schwartz J. Air pollution and hospital admissions for respiratory disease. *Epidemiology*. 1996 Jan;7(1):20-8.
29. Kelly FJ, Dunster C, Mudway I. Air pollution and the elderly: oxidant/antioxidant issues worth consideration. *Eur Respir J Suppl*. 2003 May;40:70s-5s.
30. Sunyer J, Ballester F, Tertre AL, Atkinson R, Ayres JG, Forastiere F, et al. The association of daily sulfur dioxide air pollution levels with hospital admissions for cardiovascular diseases in Europe (The Aphea-II study). *Eur Heart J*. 2003 Apr;24(8):752-60.
31. Lin CA, Amador Pereira LA, de Souza Conceicao GM, Kishi HS, Milani R, Jr., Ferreira Braga AL, et al. Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits. *Environmental research*. 2003 May;92(1):57-63.
32. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet*. 2002 Oct 19;360(9341):1233-42.
33. Burnett RT, Dales R, Krewski D, Vincent R, Dann T, Brook JR. Associations between ambient particulate sulfate and admissions to Ontario hospitals for cardiac

- and respiratory diseases. *American journal of epidemiology*. 1995 Jul 1;142(1):15-22.
34. Dominici F, McDermott A, Zeger SL, Samet JM. National maps of the effects of particulate matter on mortality: exploring geographical variation. *Environmental health perspectives*. 2003 Jan;111(1):39-44.
35. Peters A, Liu E, Verrier RL, Schwartz J, Gold DR, Mittleman M, et al. Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology*. 2000 Jan;11(1):11-7.
36. Lux RL, Pope CA, 3rd. Air pollution effects on ventricular repolarization. *Res Rep Health Eff Inst*. 2009 May(141):3-20; discussion 1-8.
37. Izzotti A, Parodi S, Quaglia A, Fare C, Vercelli M. The relationship between urban airborne pollution and short-term mortality: quantitative and qualitative aspects. *Eur J Epidemiol*. 2000;16(11):1027-34.
38. Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST, et al. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999 Mar;159(3):702-9.
39. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, et al. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. 2004 Jan 6;109(1):71-7.
40. Katsouyanni K, Touloumi G, Spix C, Schwartz J, Balducci F, Medina S, et al. Short-term effects of ambient sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities: results from time series data from the APHEA project. *Air Pollution and Health: a European Approach*. *Bmj*. 1997 Jun 7;314(7095):1658-63.

41. Stone PH, Godleski JJ. First steps toward understanding the pathophysiologic link between air pollution and cardiac mortality. *Am Heart J.* 1999 Nov;138(5 Pt 1):804-7.
42. Rodriguez Ferreira Rivero DH, Sassaki C, Lorenzi-Filho G, Nascimento Saldiva PH. PM(2.5) induces acute electrocardiographic alterations in healthy rats. *Environ Res.* 2005 Oct;99(2):262-6.
43. Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet.* 1995 Jan 21;345(8943):176-8.
44. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nemery B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2001 Nov 1;164(9):1665-8.
45. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, et al. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation.* 2002 Jan 29;105(4):411-4.
46. Wiebert P, Sanchez-Crespo A, Falk R, Philipson K, Lundin A, Larsson S, et al. No significant translocation of inhaled 35-nm carbon particles to the circulation in humans. *Inhal Toxicol.* 2006 Sep;18(10):741-7.
47. Wiebert P, Sanchez-Crespo A, Seitz J, Falk R, Philipson K, Kreyling WG, et al. Negligible clearance of ultrafine particles retained in healthy and affected human lungs. *Eur Respir J.* 2006 Aug;28(2):286-90.
48. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007 Oct;7(10):803-15.

49. Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, et al. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jun 15;165(12):1610-7.
50. Dybdahl M, Risom L, Bornholdt J, Autrup H, Loft S, Wallin H. Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles in vitro and in vivo. *Mutat Res*. 2004 Aug 8;562(1-2):119-31.
51. Bouthillier L, Vincent R, Goegan P, Adamson IY, Bjarnason S, Stewart M, et al. Acute effects of inhaled urban particles and ozone: lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1. *Am J Pathol*. 1998 Dec;153(6):1873-84.
52. Happonen MS, Hirvonen MR, Halinen AI, Jalava PI, Pennanen AS, Sillanpää M, et al. Chemical compositions responsible for inflammation and tissue damage in the mouse lung by coarse and fine particulate samples from contrasting air pollution in Europe. *Inhal Toxicol*. 2008 Nov;20(14):1215-31.
53. Bachoual R, Boczkowski J, Goven D, Amara N, Tabet L, On D, et al. Biological effects of particles from the Paris subway system. *Chem Res Toxicol*. 2007 Oct;20(10):1426-33.
54. Mantecchia P, Sancini G, Moschini E, Farina F, Gualtieri M, Rohr A, et al. Lung toxicity induced by intratracheal instillation of size-fractionated tire particles. *Toxicol Lett*. 2009 Sep 28;189(3):206-14.
55. Rivero DH, Soares SR, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, et al. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of São Paulo, Brazil. *Toxicol Sci*. 2005 Jun;85(2):898-905.

56. Ghio AJ, Kim C, Devlin RB. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000 Sep;162(3 Pt 1):981-8.
57. Aris RM, Christian D, Hearne PQ, Kerr K, Finkbeiner WE, Balmes JR. Ozone-induced airway inflammation in human subjects as determined by airway lavage and biopsy. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Nov;148(5):1363-72.
58. Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med*. 2003 Aug;60(8):612-6.
59. Brown DM, Stone V, Findlay P, MacNee W, Donaldson K. Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med*. 2000 Oct;57(10):685-91.
60. Bai Y, Suzuki AK, Sagai M. The cytotoxic effects of diesel exhaust particles on human pulmonary artery endothelial cells in vitro: role of active oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2001 Mar 1;30(5):555-62.
61. Luz PLd, Laurindo FRM, Chagas ACP. Endotélio - Doenças Cardiovasculares. 1a. ed. Editora A, editor2003.
62. Li J, Ma Z, Tang ZL, Stevens T, Pitt B, Li S. CpG DNA-mediated immune response in pulmonary endothelial cells. *American journal of physiology*. 2004 Sep;287(3):L552-8.
63. Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GG, Gonzalez-Flecha B. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environmental health perspectives*. 2002 Aug;110(8):749-55.

64. Chuang KJ, Chan CC, Su TC, Lee CT, Tang CS. The effect of urban air pollution on inflammation, oxidative stress, coagulation, and autonomic dysfunction in young adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Aug 15;176(4):370-6.
65. Routledge HC, Ayres JG. Air pollution and the heart. *Occup Med (Lond)*. 2005 Sep;55(6):439-47.
66. Batalha JR, Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, et al. Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environmental health perspectives*. 2002 Dec;110(12):1191-7.
67. Brook RD, Brook JR, Urch B, Vincent R, Rajagopalan S, Silverman F. Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. *Circulation*. 2002 Apr 2;105(13):1534-6.
68. Campen MJ, Babu NS, Helms GA, Pett S, Wernly J, Mehran R, et al. Nonparticulate components of diesel exhaust promote constriction in coronary arteries from ApoE^{-/-} mice. *Toxicol Sci*. 2005 Nov;88(1):95-102.
69. Utell MJ, Frampton MW, Zareba W, Devlin RB, Cascio WE. Cardiovascular effects associated with air pollution: potential mechanisms and methods of testing. *Inhal Toxicol*. 2002 Dec;14(12):1231-47.
70. Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol*. 2000 May;67(5):591-602.
71. Gerszten RE, Mach F, Sauty A, Rosenzweig A, Luster AD. Chemokines, leukocytes, and atherosclerosis. *J Lab Clin Med*. 2000 Aug;136(2):87-92.
72. Tornqvist H, Mills NL, Gonzalez M, Miller MR, Robinson SD, Megson IL, et al. Persistent endothelial dysfunction in humans after diesel exhaust inhalation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Aug 15;176(4):395-400.

73. Tamagawa E, Bai N, Morimoto K, Gray C, Mui T, Yatera K, et al. Particulate matter exposure induces persistent lung inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Jul;295(1):L79-85.
74. Bai N, Khazaei M, van Eeden SF, Laher I. The pharmacology of particulate matter air pollution-induced cardiovascular dysfunction. *Pharmacol Ther*. 2007 Jan;113(1):16-29.
75. Hirano S, Furuyama A, Koike E, Kobayashi T. Oxidative-stress potency of organic extracts of diesel exhaust and urban fine particles in rat heart microvessel endothelial cells. *Toxicology*. 2003 May 3;187(2-3):161-70.
76. Tzeng HP, Yang RS, Ueng TH, Lin-Shiau SY, Liu SH. Motorcycle exhaust particulates enhance vasoconstriction in organ culture of rat aortas and involve reactive oxygen species. *Toxicol Sci*. 2003 Sep;75(1):66-73.
77. Laden F, Schwartz J, Speizer FE, Dockery DW. Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006 Mar 15;173(6):667-72.
78. Oliveira RCd. Efeito da composição do material particulado fino, PM_{2,5} e "residual oil fly ash" (ROFA), como determinante do potencial mutagênico e tóxico celular: um estudo em bioensaios vegetais e animais. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.
79. Lam CW, James JT, Latch JN, Hamilton RF, Jr., Holian A. Pulmonary toxicity of simulated lunar and Martian dusts in mice: II. Biomarkers of acute responses after intratracheal instillation. *Inhal Toxicol*. 2002 Sep;14(9):917-28.

80. Borges VM, Lopes MF, Falcao H, Leite-Junior JH, Rocco PR, Davidson WF, et al. Apoptosis underlies immunopathogenic mechanisms in acute silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Jul;27(1):78-84.
81. Vascular Research Division DoP, Brigham and Women's Hospital, Harvard University. Available from: http://vrd.bwh.harvard.edu/core_facilities/mlec.html.
82. Guide WTD. Available from: <http://www.worthington-biochem.com/tissuedissociation/default.html>.
83. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
84. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7:3.
85. Xiong H, Zhang D, Martyniuk CJ, Trudeau VL, Xia X. Using generalized procrustes analysis (GPA) for normalization of cDNA microarray data. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:25.
86. Lu T, Costello CM, Croucher PJ, Hasler R, Deuschl G, Schreiber S. Can Zipf's law be adapted to normalize microarrays? *BMC Bioinformatics*. 2005;6:37.
87. Furusawa C, Kaneko K. Zipf's law in gene expression. *Phys Rev Lett*. 2003 Feb 28;90(8):088102.
88. Hochberg Y, Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med*. 1990 Jul;9(7):811-8.

89. Harrison RM, Yin J. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *Sci Total Environ.* 2000 Apr 17;249(1-3):85-101.
90. Kappos AD, Bruckmann P, Eikmann T, Englert N, Heinrich U, Hoppe P, et al. Health effects of particles in ambient air. *Int J Hyg Environ Health.* 2004 Sep;207(4):399-407.
91. Deshmukh SR, Purohit SG. Microarray data – Statistical Analysis Using R. Oxford, UK: Alpha Science 2007.
92. Alfaro-Moreno E, Nawrot TS, Vanaudenaerde BM, Hoylaerts MF, Vanoirbeek JA, Nemery B, et al. Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM₁₀. *Eur Respir J.* 2008 Nov;32(5):1184-94.
93. Leong BK, Coombs JK, Sabaitis CP, Rop DA, Aaron CS. Quantitative morphometric analysis of pulmonary deposition of aerosol particles inhaled via intratracheal nebulization, intratracheal instillation or nose-only inhalation in rats. *J Appl Toxicol.* 1998 Mar-Apr;18(2):149-60.
94. Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, et al. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicol Sci.* 2000 May;55(1):24-35.
95. Mazzoli-Rocha F, Magalhaes CB, Malm O, Saldiva PH, Zin WA, Faffe DS. Comparative respiratory toxicity of particles produced by traffic and sugar cane burning. *Environ Res.* 2008 Sep;108(1):35-41.
96. Courtois A, Andujar P, Ladeiro Y, Baudrimont I, Delannoy E, Leblais V, et al. Impairment of NO-dependent relaxation in intralobar pulmonary arteries:

comparison of urban particulate matter and manufactured nanoparticles. *Environ Health Perspect.* 2008 Oct;116(10):1294-9.

97. Montiel-Davalos A, Alfaro-Moreno E, Lopez-Marure R. PM2.5 and PM10 induce the expression of adhesion molecules and the adhesion of monocytic cells to human umbilical vein endothelial cells. *Inhal Toxicol.* 2007;19 Suppl 1:91-8.

98. Research Animal Resources UoM. Available from: <http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>.

99. Patel JM, Martens JR, Li YD, Gelband CH, Raizada MK, Block ER. Angiotensin IV receptor-mediated activation of lung endothelial NOS is associated with vasorelaxation. *Am J Physiol.* 1998 Dec;275(6 Pt 1):L1061-8.

100. Vinh A, Widdop RE, Chai SY, Gaspari TA. Angiotensin IV-evoked vasoprotection is conserved in advanced atheroma. *Atherosclerosis.* 2008 Sep;200(1):37-44.

101. Mizutani S, Ishii M, Hattori A, Nomura S, Numaguchi Y, Tsujimoto M, et al. New insights into the importance of aminopeptidase A in hypertension. *Heart Fail Rev.* 2008 Sep;13(3):273-84.

102. Ainscough JF, Drinkhill MJ, Sedo A, Turner NA, Brooke DA, Balmforth AJ, et al. Angiotensin II type-1 receptor activation in the adult heart causes blood pressure-independent hypertrophy and cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2009 Feb 15;81(3):592-600.

103. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 18;97(2):931-6.

104. Ying Z, Yue P, Xu X, Zhong M, Sun Q, Mikolaj M, et al. Air pollution and cardiac remodeling: a role for RhoA/Rho-kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 May;296(5):H1540-50.
105. Li Z, Carter JD, Dailey LA, Huang YC. Pollutant particles produce vasoconstriction and enhance MAPK signaling via angiotensin type I receptor. *Environ Health Perspect*. 2005 Aug;113(8):1009-14.
106. Vikman P, Xu CB, Edvinsson L. Lipid-soluble cigarette smoking particles induce expression of inflammatory and extracellular-matrix-related genes in rat cerebral arteries. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5(1):333-41.
107. Buzza MS, Dyson JM, Choi H, Gardiner EE, Andrews RK, Kaiserman D, et al. Antihemostatic activity of human granzyme B mediated by cleavage of von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 2008 Aug 15;283(33):22498-504.
108. Choy JC, Cruz RP, Kerjner A, Geisbrecht J, Sawchuk T, Fraser SA, et al. Granzyme B induces endothelial cell apoptosis and contributes to the development of transplant vascular disease. *Am J Transplant*. 2005 Mar;5(3):494-9.
109. Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Dec;23(12):2146-54.
110. Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, Boon NA, MacNee W, Cassee FR, et al. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009 Jan;6(1):36-44.

CAPÍTULO II

Comparison of lung microvascular endothelial cells with other endothelia gene expression response to inflammatory cytokine challenge

Alameddine: MD; Lin: MD, PhD

ABSTRACT

Objective: Endothelial cells form a heterogeneous layer that lines all vascular beds, and their diverse phenotypes reflect the need for specific organ response to external stimuli. We aimed to investigate main gene expression profile differences between different endothelial cell types. **Methods and Results:** We reanalyzed gene expression profile of high throughput microarray data generated by cultured pulmonary endothelial cells exposed to inflammatory cytokines versus other exposed endothelial cell lines, namely, aortic, colonic, dermal and iliac artery endothelial cells. Analyses were performed using principle component analysis and gene functional annotations. We identified that pulmonary microvascular endothelial cells present distinct pattern of expression profile in response to cytokines as compared to other territories. **Conclusions:** Pulmonary endothelial cells have a unique pattern of response as compared to other vascular beds.

Keywords: endothelial cell; microarray; inflammation; gene expression; cytokine

Endothelial cells (ECs) modulate several aspects of vascular biology: vascular tone and diameter, blood fluidity, tissue fluid homeostasis, and host-defense reactions. Although there are features common to endothelium of all vascular territories, considerable morphological and functional heterogeneity exist. Capillary endothelial cells, for example, may exhibit a “continuous” non-fenestrated phenotype (most of tissue), a “continuous” fenestrated pattern (renal glomerulus) or a discontinuous/sinusoidal shape (liver and spleen) (1). These configurations display different permeability to macromolecules, water and small solutes. Beside the complexity of inter-endothelial junctions and permeability differences, other morphological features further enhance endothelial diversity, such as the luminal proteins that comprise the endothelial surface layer, its size and orientation to blood flow (2). Thus, endothelial cells are capable of assuming territory-specific phenotypes that allow them to match particular demands of a tissue. Lung microcirculation is unique in the sense that it functions in a high flow/low pressure/low resistance regimen. Its structural arrangement, moreover, is responsible for a prolonged transit time of neutrophils through its vascular bed as compared to other territories (3).

During inflammation, endothelial cells play a key role in recruiting leukocytes and in modulating vascular changes. In this situation, adhesion molecules are expressed on the surface of activated endothelial cells and chemical mediators of inflammation induce vascular leakage of plasma proteins (4). As endothelium-regulated functions, both leukocyte homing and induced vascular leakage also exhibit site heterogeneity and tissue-specific variations. Despite of the well-

known mechanisms of defense of the lungs to prevent aggressors from reaching its distal parts, alveoli are much likely to be challenged by harmful stimuli, however, it is noteworthy that, in healthy individuals, such frequent challenges do not evoke clinically relevant episodes of inflammation-induced vascular leakage in pulmonary microcirculation. Therefore, it can be expected that lung microvascular ECs present a distinctive pattern of inflammatory responses. In fact, unlike most of circulatory beds, the preferred site in which leukocyte transmigration takes place in lung circulation is the pulmonary capillary one (5). Furthermore, leukocyte recruitment in pulmonary capillaries is dependent on ICAM but not E or P-selectin (6, 7). In line with these differences, cultured rat pulmonary microvascular ECs are less permeable to solutes than pulmonary arterial ECs (8). These unique features of pulmonary microcirculation lend support to the concept that lung microcirculation present a distinctive inflammatory response. In fact, conditions which result in increased pulmonary endothelial permeability and increased leukocyte transmigration seriously jeopardize gas-exchange and lead to respiratory distress. It is highly probable, therefore, that such conditions be prevented by all means.

Little is known about the molecular mechanism underneath these distinctive properties of lung microcirculation or the molecular pathways that underlie the endothelial activation of pulmonary territory. A better understanding of either process might shed light to important clinical problems such as lung disorders that arise during systemic inflammatory syndromes.

Microarray is the platform of choice for experiments that are aimed to unravel molecular pathways involved in biological processes. Public repositories for

microarray data has enabled researchers to perform *in silico* experiments in order to probe relevant biological questions (9). Our goal in this study was to analyze the molecular responses of endothelial cells using publicly available microarray data. We hypothesized that pulmonary microvascular endothelial cells manifest a different response to inflammatory cytokine challenge as compared to other endothelia. Our results underscore previously unreported properties of inflammatory response in lung microcirculation.

METHODS

Two-channel microarray data presented in a previously published paper (10) were obtained from the public microarray data repository Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). This data series (GSE569) was obtained by hybridizing labeled cDNA from five different primary human EC lines - lung, colon and dermal cells representing microcirculation, and aorta and iliac artery cells representing macrocirculation), stimulated by IFN γ (100 ng/ml) , TNF α (10 ng/ml) and IL-4 (10 ng/ml) for 18 hours, against respective controls (unchallenged ECs from each one of the territories) into a proprietary cDNA microarray platform (GeneAlbum microarray, Incyte Genomics; (10)). Overall, the set includes a combination of five different cultures ECs with three inflammatory cytokines, totalizing 15 samples.

Data set was lowess and quantile-normalized (11,12). We filtered the data set using an arbitrarily defined threshold for gene expression variances of 0.85. This procedure generated a sublist of 5600 genes that was used in subsequent analyses.

Principal component analysis was performed based on singular value decomposition of the data matrix (11, 13).

Core molecular signatures of EC activation for each one of the represented vascular territories were produced by looking for genes manifesting consistent patterns of expression independently of the cytokine stimulus. For this purpose, we used the same approach adopted elsewhere for the identification of a death-

from cancer signature (14) which is based on the determination of Pearson's correlation coefficients in each represented vascular bed. Several cycles of calculation of subsequent r were performed until we were able to optimize the final correlation coefficient by selecting genes responsible for $r \geq 0.95$. The three highly concordant lists from each vascular bed were intersected to generate a final list named "core response group". All analyses were implemented using R software (<http://www.r-project.org>).

Gene functional classification was performed using DAVID Resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) (15, 16). Human genome was the background against which the enrichment scores were calculated. Gene ontology (GO) annotation was performed in GeneTools (<http://www.genetools.microarray.ntnu.no/adb/index.php>).

Additionally, we sought to compare the up and downregulated genes for each cytokine-challenged sample. We considered being upregulated genes with expression values higher than the 90th percentile and the downregulated, below the 10th, and submitted to functional annotation in DAVID system.

RESULTS

Due to small number of biological replicates, attempts to detect differentially expressed genes (either territory- or cytokine-wise) by using univariate statistical tests was not mathematically sound. Therefore, we examined the global relationship of different arrays with respect to each other by applying principal component analysis (PCA) (11). In order to visualize the samples in a space describing the overall gene expression profiles, the scores of each major principal component were used as coordinates and analyzed using plot of scores. PCA was performed using genes as variables.

Cultured endothelial cells from microcirculation of human lungs present a strikingly distinct pattern of expression when challenged with inflammatory cytokines as compared to other organs. The first 4 principal components represented 70% of total variability of the data, and thus retained enough information regarding the distribution of arrays. Bidimensional plots of PC scores clearly showed two distinct groups, where lungs were separately clustered from the other samples (Figure 1). This grouping was consistent in all projections.

Once PCA had categorized lung expression profiles as a distinct group, we decided to test whether the expression responses of lung microvascular ECs to cytokine exposure overlapped significantly. Thus, we generated a list of “core cytokine response” genes, which comprised genes displaying concordant patterns of expression for each vascular bed. Each list represented the core molecular signature of EC activation by cytokines for each one of the studied territory. After generating a list for each possible cytokine pairs (three lists for

each territory), the final list of genes belonging to core cytokine response of each vascular bed was distilled by seeking the intersection of each triplet of gene lists (see Methods). There are two consequences of this analytical approach: first, the more significantly two expression profiles overlap, the less cycles are needed to run our algorithm before Pearson's correlation coefficient (r) reaches a critical threshold (arbitrarily set as greater than 0.95), and second, the size of "core cytokine response" gene list of a territory varies directly with the degree of overlap of its responses to the cytokines used in this study. These two consequences can be used to compare the degree of similarities in the response of different vascular bed to cytokines.

The similarity among the three cytokine-challenged lung samples is much higher than among other ECs. Pearson's correlation coefficient for pairs of lung expression profile was higher than similar pairs from any territories before the removal of any gene from the list (Table 1). In lung microcirculation, IL-4-treated expression profile correlated similarly with either IFN γ - or TNF α -treated expression profile (0.659 and 0.637, respectively). The less similar pair of lung expression profile was the one formed by IFN γ - and TNF α -treated ECs (initial global $r=0.533$), even though its value was not as low as for other territory samples. Besides, while four rounds were needed to generate partial gene lists for any one of the non-pulmonary expression profiles, only three rounds of calculations were required for lung capillary ECs. In this way, lung ECs yielded the largest core response gene list, followed by aortic ECs. Iliac and colonic ECs generated gene lists of similar sizes, and the smallest gene list was obtained

from dermal microcirculation. These findings suggest that expression patterns elicited by IFN γ , IL-4 and TNF α in lung microcirculation demonstrate more overlap amongst them than cytokine-treated expression patterns obtained from other territories.

The degree of similarity demonstrated by expression profiles of cytokine-treated lung ECs could also be evaluated when expression profiles were compared in a cytokine-wise fashion (Table 2). If lung ECs were omitted, IFN γ treatment evoked the most concordant gene expression across different vascular beds as correlation coefficient (r) of inter-territorial pairs varied from 0.592 to 0.695 (Table 2) suggesting that response to this cytokine is relatively conserved across different vascular beds. Expression profiles of IL-4-treated ECs exhibited the lowest correlation across different vascular beds. Irrespectively to the stimulating cytokine, ECs from lung microcirculation correlated poorly to ECs from other territories in opposition to their good intra-territorial correlation (Table 2).

Once molecular signatures to cytokine-treated ECs were identified for each vascular bed, we investigated the functional significance embedded in such gene lists. For this purpose, we performed two annotation analyses. In the first of them, lists were uploaded to DAVID site and categorized into functionally related groups (functional classification analysis) sorted by enrichment scores.

Core cytokine response gene set of pulmonary microcirculation contains more numerous and diverse clusters. When the lists of functionally related gene groups are compared, one can easily see that much more gene from pulmonary

microcirculation core response gene set were categorized into functional groups than genes from core response set of other territories (Table 3). One might hypothesize that such a result was a natural effect of gene list size. However, this is probably not the case because colon and iliac ECs showed distinctive gene grouping pattern despite of similar size of their core response gene list. In fact, core response gene list of colon circulation failed to generate any functional group (Table 3). Moreover, the smallest list of all (dermal microcirculation) was able to yield two functional groups. Thus, grouping pattern of each core response list bears functional significance.

Although there were very few genes in common to more than one list, when gene classification was performed, all sites (except for colon) had enriched clusters for regulation of transcription and/or protein kinase activities. In contrast to the remaining territories, annotation of lung core response genes revealed other groups enriched in response to stimulation by cytokines that include ion transport across cell membrane, oxidoreductase activity, cell-matrix interaction and protein metabolism. Tyrosine protein kinase receptors promote cellular growth via Ras signaling pathway and activation of transcription factors. Serine/threonine kinase proteins are also involved in response to external stimuli and promotion of cellular growth and proliferation. Therefore, these genes underlie the phenotypical changes displayed by ECs when they are exposed to cytokines.

In the second analysis, core lists were uploaded to GeneTools website in order to depict functional differences between treated pulmonary microvascular ECs and ECs from the remaining organs (17). All lists, then, were comparatively

annotated by a standardized classification system – gene ontology (GO) – to identify which biological processes were enriched in activated pulmonary cells but not in the others. Figure 2 represents the categories with a statistical significance when core gene list for pulmonary cells were compared to the remainders.

Microvascular pulmonary endothelial cells present diverse enriched GO biological process categories as compared to other cells. The vascular bed against which lung microcirculation showed more differentially enriched GO terms (20 GO terms) was dermal microcirculation (Figure 2C). In opposition, the territory toward which lung microcirculation exhibited less differentially enriched GOs was the aortic (Figure 2A). Therefore, although detectable differences between lung and aorta core response genes exist, mostly in genes related to metabolism, there are considerable functional similarities between the molecular response of lung and aorta ECs to inflammatory cytokines. There was no single GO that was consistently enriched in lung ECs when the core response from these cells was compared to other territory's core response (Figure 2). However, GO term “fatty acid metabolic process” was enriched against colonic, iliac and aortic endothelia (Figure 2 A,B,D). Comparison of lung ECs with their dermal and iliac counterparts shared more overrepresented GO than comparison of lung with other territories (Figure 2 C,D).

Biological processes involved with ion transport (GO: 0006811, 0030001, 0006812, 0050801, 0006873) were represented more extensively than others. These GOs were the ones shared by dermal and iliac as well as colonic ECs when they are compared to lung capillary circulation (Figure 2). GOs related with

function of nervous system or synaptic transmission (GO: 0050877, 0019226, 0007268, 0007399) constituted another overrepresented category. Interestingly, most of these GOs were enriched in comparisons of lung with dermal and iliac ECs. Thus, functions related to polarization/depolarization of cell membrane are features that distinguish the response of lung capillary ECs to cytokines stimulation from the response of dermal and iliac ECs to these same cytokines. A functional annotation of the up and down-regulated genes for each cytokine-challenged samples could offer insights of differences and similarities among territories upon cytokine exposure. Only the first ten clusters of each list were considered in this analysis.

The majority of the down-regulated clusters were related to genes that encode proteins involved in mRNA processing and phosphatases (IFN γ challenged cells), proteins involved in matrix assembly (IL-4 challenged cells), and microtubule proteins (TNF α challenged cells). Few differences between pulmonary ECs and the remainders could be pointed out, such as the down-regulation of nuclear proteins in lung ECs exposed to IFN γ , the enriched group of ankyrin repeat-containing proteins in the same territory exposed to IL-4, and the EGF-like domain contain proteins down-regulated in pulmonary cells exposed to TNF α .

As for the up-regulated annotation, genes that encode MHC class complex and glycoprotein-mediated signaling were the most enriched group in pulmonary microvascular ECs exposed to IFN γ . In contrast, the same group was less enriched in other EC lines and absent in the first ten clusters of dermal ECs.

IFN γ also up-regulated genes that encode chemokine ligands in all ECs. Interestingly, however, this cluster was much more enriched in aortic cells and less in pulmonary and iliac artery cells. The most consistent group as for enrichment hierarchy was the one related to complement activation, which occurred in the first three more enriched clusters across all territories. Unique features seen in pulmonary stimulated ECs were the highly enriched groups of up-regulated genes associated with ion transport (channel activity) and cell-cell signaling (synaptic vesicles), and the absence of the cluster associated with ATP-dependent DNA/RNA helicase activity, which was present across all other vascular beds among the first five enriched groups.

IL-4 challenge provided fewer similarities among the ECs than IFN γ did. Nuclear proteins of yet uncertain functions represented one of the most up-regulated enriched groups in all but lung sample. The latter, once more, presented unique groups within the first ten analyzed, such as the most enriched one composed of transmembrane proteins related with transport and signal transduction, and the cell-cell signaling (synaptic vesicles) group.

Finally, TNF α was able to induce in all ECs the up-regulation of chemokine ligands, which formed the very most enriched group in all territories. Also, genes that encode MHC class complex and glycoprotein-mediated signaling were up-regulated in all ECs and belonged to the first two enriched groups, except for the dermal sample, that had a lower enrichment score in favor to genes that encode proteins involved in lysosomal proteolysis and peptidases. Once more, complement activation was up-regulated across all vascular beds. Uniquely in

the pulmonary microvascular cells, a group composed by proteins involved in cell-cell communication (synaptic transmission) was induced by $\text{TNF}\alpha$.

DISCUSSION

In this study, we re-analyzed previously published microarray data to investigate molecular pathways specifically associated with the response of pulmonary microcirculation ECs to inflammatory cytokines (IFN γ , IL-4 and TNF α). Our results indicate that, unlike non-pulmonary endothelia, lung microcirculation responds in a convergent way to these cytokines by showing a significant intra-territorial concordance. This distinct molecular feature might underlie the unique properties of lung microcirculatory ECs both basally and during inflammatory response.

There are a few limitations of our study that one should bear in mind. The original microarray data were collected using cultured human ECs from several territories treated with cytokines for 18 hours. Although cell culture allows precise control of experimental conditions and has been instrumental for the accumulation of our knowledge about endothelium biology, it does not fully replicate the environment in which the ECs function. Also, an 18-hour continuous exposure was chosen in the sake of stability of cell response (10). This is not necessarily the most accurate recapitulation of cytokine stimulus during inflammation. In addition, the fact microarray data was produced elsewhere prevented us of increasing biological replicates and has limited our ability to detect gene expression information by statistic tests.

In spite of above mentioned limitations, we believe that our results are relevant and our analytical approach brought useful insights to the biology of lung endothelium, since studies on comparative gene expression profile of lung

microcirculation in response to inflammatory cytokines are scarce. The validity of our results can be illustrated by the fact that our re-analysis detected up-regulation of genes that are consistent with reports in literature on gene expression elicited by these cytokines (18). For example, $\text{IFN}\gamma$ is known to induce expression of class II MHC antigens; it augments the levels of class I MHC and amplifies the action of $\text{TNF}\alpha$ in ECs.

Moreover, a very interesting finding in the up-regulated analysis was the occurrence of enriched groups composed of cell-cell signaling related to synaptic transmission in lung microvascular cells under the influence of the three cytokines. There are some recent studies suggesting that similar factors that influence neuronal development also guide migration of ECs reproducing embryonic pattern of development (19). Whether these characteristics are reactivated due to an inflammatory stimulus is still unknown.

When core lists were functionally clustered, either in DAVID or in GeneTools system, groups related to ion transport and cell communication were considerably more represented in pulmonary ECs. Ion transport is the mechanism found by neuronal and muscle cells to change membrane potential and propagate electrical signals. In ECs, however, ion transport is used to promote downstream signals and to control cellular permeability and promote cell-cell communication (20, 21). Transmembrane glycoproteins, in turn, comprise molecules responsible for attaching the cell to extracellular matrix or to neighboring cells; they also act as receptors to transmit outside-in and inside-out signals. In this way, they play a crucial role in cell-cell adhesion, cellular motility

and cell-matrix interaction (20). These findings highly suggest that pulmonary microvascular ECs differentiate from the other here studied ECs in the respect to cell-cell and cell-matrix interaction.

There are some aspects concerning the expression profile of non-pulmonary ECs that deserve consideration. While the microarray data are obtained from ECs representing both arterial macro (aorta and iliac) and microcirculation (colon, dermal, and lung), no consistent pattern could be ascribed to the original flow regimen ECs were designed to function. In fact, differential phenotype features between macro and microvascular ECs are highly dependent on the composition of the endothelial surface layer and the shear stress that those cells are submitted to. Both of these factors could not be addressed in this study. Finally, depending on the challenging cytokine, there were pairs of ECs showing considerable correlation. However, there was no pair of ECs that displayed significantly higher correlation than others. These findings could be attributed either to a result of built-in cell specificity (due to different origin of these ECs or epigenetic programming) or to an artifact introduced by experimental conditions (e.g. cell culture parameters).

In conclusion, we believe that the most prominent aspect of our results is the distinct behavior of lung microcirculatory ECs in face of cytokine challenge. While results from PCA supports the previous concept of uniqueness of inflammatory response in pulmonary microcirculation, the comparison of correlation coefficients and the search for overlap in gene expression profile pointed out the similarity of lung ECs response to different cytokines. These results uncovered another aspect of uniqueness of lung microcirculation in

addition to its distinctive properties in leukocyte homing and trans-endothelial permeability.

Figure 1 – Graphical display of principal component analysis of endothelial gene expression pattern. The variances of each principle component (PC) are depicted in the bar chart (A). Bidimensional plots where scores of first PC (pc1) were plotted against scores from PCS 2 (B), 3 (C) and 4 (D) are shown. Notice that lung samples (m, n and o) form a separated set from the remainders.

Letters 'a','b','c','d','e','f','g','h','i','j','k','l','m','n','o' represent aorta- $\text{IFN}\gamma$, aorta-IL4, aorta- $\text{TNF}\alpha$, colon- $\text{IFN}\gamma$, colon-IL4, colon- $\text{TNF}\alpha$, dermal- $\text{IFN}\gamma$, dermal-IL4, dermal- $\text{TNF}\alpha$, iliac- $\text{IFN}\gamma$, iliac-IL4, iliac- $\text{TNF}\alpha$, lung- $\text{IFN}\gamma$, lung-IL4, and lung- $\text{TNF}\alpha$, respectively.

Table 1 –Pearson’s correlation coefficients obtained before (round 1) and after each round of computation for identification of each territory’s core molecular response signature.

PEARSON	AORTA			COLON			ILIAC		
ROUNDS OF CALCULATION	IFN γ x IL4	IFN γ x TNF	IL4 x TNF	IFN γ x IL4	IFN γ x TNF	IL4 x TNF	IFN γ x IL4	IFN γ x TNF	IL4 x TNF
1	0.301	0.384	0.448	0.312	0.449	0.342	0.168	0.362	0.348
2	0.802	0.809	0.864	0.813	0.838	0.802	0.664	0.801	0.775
3	0.948	0.943	0.963	0.946	0.950	0.937	0.889	0.933	0.927
4	0.985	0.982	0.987	0.983	0.984	0.980	0.964	0.979	0.977

PEARSON	DERMA			LUNG		
ROUNDS OF CALCULATION	IFN γ x IL4	IFN γ x TNF	IL4 x TNF	IFN γ x IL4	IFN γ x TNF	IL4 x TNF
1	0.270	0.362	0.322	0.659	0.533	0.637
2	0.772	0.790	0.774	0.906	0.881	0.921
3	0.928	0.935	0.924	0.970	0.965	0.978
4	0.978	0.979	0.974			

Table 2 –Correlation of expression profile from cytokine-stimulated ECs.

	AO IFN γ	AO IL4	AO TNF α	CO IFN γ	CO IL4	CO TNF α	DE IFN γ	DE IL4	DE TNF α	IL IFN γ	IL IL4	IL TNF α	LU IFN γ	LU IL4	LU TNF α
AO IFN γ	1.00	0.301	0.384	0.592	0.092	0.295	0.618	0.302	0.269	0.649	0.009	0.295	0.337	0.140	0.170
AO IL4		1.000	0.448	0.144	0.341	0.190	0.190	0.429	0.245	0.183	0.160	0.110	0.154	0.219	0.154
AO TNF α			1.000	0.180	0.093	0.472	0.310	0.294	0.531	0.312	0.005	0.395	0.089	0.046	0.264
CO IFN γ				1.000	0.312	0.449	0.695	0.180	0.307	0.600	0.187	0.366	0.308	0.070	0.172
CO IL4					1.000	0.342	0.214	0.310	0.235	0.167	0.320	0.129	0.074	0.100	0.125
CO TNF α						1.000	0.383	0.204	0.665	0.346	0.174	0.535	0.143	0.069	0.379
DE IFN γ							1.000	0.270	0.362	0.655	0.128	0.390	0.255	-0.003	0.089
DE IL4								1.000	0.322	0.271	0.073	0.055	0.037	0.118	0.061
DE TNF α									1.000	0.278	0.091	0.504	0.114	0.082	0.389
IL IFN γ										1.000	0.168	0.362	0.170	-0.003	0.078
IL IL4											1.000	0.348	0.023	-0.056	-0.006
IL TNF α												1.000	0.160	-0.039	0.303
LU IFN γ													1.000	0.659	0.533
LU IL4														1.000	0.637
LU TNF α															1.00

Pearson's correlation coefficients were calculated for all possible pairs of cytokine-stimulated endothelial cells (ECs) using all genes that passed the variance filter. Comparisons of cytokine-treated ECs are color-coded in which yellow represents pairs of IFN γ -stimulated and green, pairs of TNF α -challenged ECs. For comparative purpose, the three possible within-territory pairs of lung ECs are highlighted in purple. AO, CO, DE, IL, and LU represent samples of aorta, colon, dermal, iliac and lung, respectively.

Table 3 – Functional gene grouping of core response lists.

GENE GROUPS	AORTA N=112	COLON N=59	DERMAL N=40	ILIAC N=57	LUNG N=249
1	mRNA processing	none	tyrosine-kinase activity	cell-surface signal transduction	cation channel transport
2	protein Ser/ Thr kinase		regulation of transcription DNA-dependent	regulation of transcription	oxidoreductase activity
3	regulation of transcription DNA-dependent				transmembrane signal transduction proteins
4					protein glycosilation
5					transmembrane proteins
6					ser/thr kinase
7					ATPase activity
8					ribosomal protein / synthesis
9					ubiquitin cycle
10					regulation of transcription

N: total genes present in the list of each sample. Gene groups are classified in order of enrichment scores.

Figure 2 – Enriched GO terms (Level 3 biological process) in molecular signature of pulmonary endothelial cells detected by comparison of with signatures of the other territories. Only the GO terms that presented $p\text{-value} < 0.05$ were plotted. From top to bottom, microvascular pulmonary ECs are compared with aorta (A), colon (B), dermal (C) and iliac (D) ECs, respectively.

A. GO BIOLOGICAL PROCESS CATEGORIES ENRICHED IN LUNG VS AORTA ECs

B. GO BIOLOGICAL PROCESS CATEGORIES ENRICHED IN LUNG VS COLON ECs

C. GO BIOLOGICAL PROCESS CATEGORIES ENRICHED IN LUNG VS DERMAL ECs

D. GO BIOLOGICAL PROCESS CATEGORIES ENRICHED IN LUNG VS ILIAC ECs

REFERENCES

1. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research* 2007;100(2):158-173.
2. Ghitescu L, Robert M. Diversity in unity: The biochemical composition of the endothelial cell surface varies between the vascular beds. *Microscopy research and technique* 2002;57(5):381-389.
3. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: li. Representative vascular beds. *Circulation research* 2007;100(2):174-190.
4. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007;7(10):803-815.
5. Burns AR, Smith CW, Walker DC. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiological reviews* 2003;83(2):309-336.
6. Nishio K, Suzuki Y, Aoki T, Suzuki K, Miyata A, Sato N, Naoki K, Kudo H, Tsumura H, Serizawa H, et al. Differential contribution of various adhesion molecules to leukocyte kinetics in pulmonary microvessels of hyperoxia-exposed rat lungs. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998;157(2):599-609.
7. Basit A, Reutershan J, Morris MA, Solga M, Rose CE, Jr., Ley K. Icam-1 and lfa-1 play critical roles in lps-induced neutrophil recruitment into the alveolar space. *American journal of physiology* 2006;291(2):L200-207.

8. Kelly JJ, Moore TM, Babal P, Diwan AH, Stevens T, Thompson WJ. Pulmonary microvascular and macrovascular endothelial cells: Differential regulation of Ca^{2+} and permeability. *The American journal of physiology* 1998;274(5 Pt 1):L810-819.
9. Stoeckert CJ, Jr., Causton HC, Ball CA. Microarray databases: Standards and ontologies. *Nature genetics* 2002;32 Suppl:469-473.
10. Sana TR, Janatpour MJ, Sathe M, McEvoy LM, McClanahan TK. Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines. *Cytokine* 2005;29(6):256-269.
11. Deshmukh SR, Purohit SG. Microarray data: Statistical analysis using R. Alpha Science International Ltd.; 2007.
12. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2003;19(2):185-193.
13. Venables WN, Ripley BD. Modern applied statistics with S. Springer; 2002.
14. Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *The Journal of clinical investigation* 2005;115(6):1503-1521.

15. Sherman BT, Huang da W, Tan Q, Guo Y, Bour S, Liu D, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA. David knowledgebase: A gene-centered database integrating heterogeneous gene annotation resources to facilitate high-throughput gene functional analysis. *BMC bioinformatics* 2007;8:426.
16. Huang da W, Sherman BT, Tan Q, Collins JR, Alvord WG, Roayaei J, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA. The david gene functional classification tool: A novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome biology* 2007;8(9):R183.
17. Beisvag V, Junge FK, Bergum H, Jolsum L, Lydersen S, Gunther CC, Ramampiaro H, Langaas M, Sandvik AK, Laegreid A. Genetools--application for functional annotation and statistical hypothesis testing. *BMC bioinformatics* 2006;7:470.
18. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *Faseb J* 1992;6(8):2591-2599.
19. Weinstein BM. Vessels and nerves: Marching to the same tune. *Cell* 2005;120(3):299-302.
20. Gebb S, Stevens T. On lung endothelial cell heterogeneity. *Microvascular research* 2004;68(1):1-12.

21. Stevens T, Creighton J, Thompson WJ. Control of camp in lung endothelial cell phenotypes. Implications for control of barrier function. *The American journal of physiology* 1999;277(1 Pt 1):L119-126.