

**ALESSANDRA PAES SUPPA**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES REGULATÓRIOS  
DE HIPÓXIA DURANTE A INFLAMAÇÃO PULMONAR  
PRODUZIDA PELA ISQUEMIA E REPERFUSÃO  
INTESTINAL EM CAMUNDONGOS  
AIRMAX E AIRMIN**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
Interunidades em Biotecnologia  
USP/Instituto Butantan/ IPT, para  
obtenção do Título de Mestre em  
Biotecnologia.

**São Paulo**

**2009**

**ALESSANDRA PAES SUPPA**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES REGULATÓRIOS  
DE HIPÓXIA DURANTE A INFLAMAÇÃO PULMONAR  
PRODUZIDA PELA ISQUEMIA E REPERFUSÃO  
INTESTINAL EM CAMUNDONGOS  
AIRMAX E AIRMIN**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
Interunidades em Biotecnologia  
USP/Instituto Butantan/ IPT, para  
obtenção do Título de Mestre em  
Biotecnologia.

Área de concentração:  
Biotecnologia

Orientador:  
Orlando Garcia Ribeiro Filho

**São Paulo**

**2009**

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

© reprodução total

Suppa, Alessandra Paes.

Estudo da expressão de genes regulatórios de hipóxia durante inflamação pulmonar produzida pela isquemia e reperfusão intestinal em camundongos AIRmax AIRmin. / Alessandra Paes Suppa. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Orlando Garcia Ribeiro Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunogenética.

Versão do título para o inglês: Study of hypoxia regulatory genes expression during lung inflammation produced by intestinal ischemia-reperfusion in AIRmax and AIRmin mice.

Descritores: 1. Isquemia 2. Expressão Gênica 3. Síndrome do desconforto respiratório agudo 4. Fator indutor de Hipóxia -1 $\alpha$  5. Resposta inflamatória aguda 6. Camundongos I. Ribeiro Filho, Orlando Garcia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB0189/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Alessandra Paes Suppa.

Título da Dissertação: Estudo da expressão de genes regulatórios de hipóxia durante inflamação pulmonar produzida pela isquemia reperusão intestinal em camundongos AIRmax eAIRmin.

Orientador(a): Orlando Garcia Ribeiro Filho.

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

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição.....

Examinador(a): Assinatura:.....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan com apoio financeiro da FAPESP sob o processo n.º 06/53014-5.

Dedico,  
àqueles que em um momento sequer deixaram de  
estar ao meu lado, mesmo que em pensamento...

À minha FAMÍLIA...  
Aos meus pais Ângela e Gabriel,  
aos meus irmãos Vanessa e Gabriel Augusto  
e ao meu namorado Paulo.

## AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador Orlando Garcia Ribeiro Filho que é um exemplo de dedicação, profissionalismo e competência. Seu carinho, incentivo e confiança proporcionaram o meu amadurecimento pessoal e crescimento científico, determinantes para conclusão deste trabalho e para o início de uma carreira científica.

Ao Dr. Wothan Tavares de Lima, pela indispensável e prazerosa colaboração neste trabalho

Aos ilustres pesquisadores do Laboratório de Imunogenética: Dra. Olga Ibañez, Dr. Marcelo de Franco, Dra. Wafa Cabrera, Dra Nancy Starobinas, Dr. José Ricardo Jensen, Dra. Solange Massa, Dra. Solange Carbonare e Dra. Milene de Franco.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Imunogenética: Layra, Débora, Jana, muito obrigada pela força e companheirismo nos desafios de cada dia. À, Prícillia (Prini), Francisca, Tatiane, Cristiano, Jussara, Luciana, Andrea Borrego, Andrea Arruda, Patrícia, Simoní, Thalita, Camila e Vinícius, por todos os momentos que passamos juntos.

A Tatiana Victoni, pela ajuda no início do mestrado.

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

Aos funcionários do biotério do Laboratório de Imunogenética: Celso dos Santos, Joel Faustino de Camargo, Luiz Carlos Hilário, Marinalva dos Santos Silva, Sergio Branco de Miranda, pelo cuidado com os animais.

À Maria José de J. Carvalho, supervisora do serviço de atendimento ao usuário da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela boa vontade e paciência na correção da formatação desta dissertação.

À funcionária do Laboratório de Virologia Luzia, pela força e alegria contagiante.

Aos meus avós queridos: Pedrina, Nelson, Maria e Giuseppe, pelo exemplo de vida.

Ao meu pai Gabriel e irmãos, Vanessa (Vanessão) e Gabriel Augusto (Gutinho), amo vocês!

Ao Paulo Wolf, por todos os momentos que passamos e passaremos juntos. TE AMO!

Ao Senhor Walter Wolf, pelo apoio e carinho.

À minha mãe, por sempre estar ao meu lado, por acreditar nos meus objetivos, e principalmente pelo seu amor infinito...



*“O homem que diz “dou”  
Não dá!  
Porque quem dá mesmo  
Não diz!  
O homem que diz “vou”  
Não vai!  
Porque quando foi  
Já não quis!  
O homem que diz “sou”  
Não é!  
Porque quem é mesmo “é”  
Não sou!  
O homem que diz “tou”  
Não tá  
Porque ninguém tá  
Quando quer...”*

Vinicius de Moraes / Baden Powell  
*“Canto de Ossanha”*

## RESUMO

SUPPA, A. P. **Estudo da expressão dos genes regulatórios de hipóxia durante a inflamação pulmonar produzida pela isquemia e reperfusão intestinal em camundongos AIRmax e AIRmin.** 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Homeostase dos níveis de oxigênio é essencial para a sobrevivência e desenvolvimento fisiológico dos organismos. A falta de aporte de oxigênio aos tecidos é um fator comum na morbidade e mortalidade para várias situações clínicas graves como na Síndrome do desconforto Respiratório agudo (ARDS). Para retomada da homeostase as células mielóides exercem suas funções especializadas nas áreas de hipóxia. O grupo de proteínas responsáveis pela adaptação das células mielóides inclui os produtos do gene HIF-1 $\alpha$  (Fator Indutor de Hipóxia 1 $\alpha$ ). O HIF-1 $\alpha$  é um fator de transcrição que responde às mudanças de oxigênio e induz a transcrição dos genes como *Vhl*, *Vegf* e genes codificadores de citocinas pró ou anti-inflamatórias. O objetivo deste estudo foi caracterizar os mecanismos celulares e moleculares operantes no estado de hipóxia em resposta a reação inflamatória aguda no pulmão induzida, sistemicamente, pela isquemia e reperfusão (I/R) intestinal em duas linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) Resposta Inflamatória Aguda. A lesão pulmonar foi avaliada pela atividade da MPO, infiltrado celular no parênquima pulmonar, expressão de CD11b e CD62L na medula óssea, sangue e nas células do pulmão. A expressão dos genes operantes em hipóxia foi avaliada por PCR em Tempo Real. Observamos um maior infiltrado neutrofílico no pulmão dos camundongos AIRmax quando comparado aos AIRmin, estes com nível equivalente aos grupos controles. As análises das moléculas de adesão mostraram uma maior expressão de CD62L no pulmão e na medula dos AIRmax I/R. Uma alta expressão de *Hif-1 $\alpha$* , *Vhl*, *Il-1 $\beta$*  e *Il-6* foi observada no pulmão dos AIRmax I/R. Por outro lado, os camundongos AIRmin apresentaram uma baixa expressão destes genes. Podemos concluir que os camundongos AIRmax apresentam uma alta reação inflamatória aguda em resposta a I/R intestinal. Os altos níveis de expressão dos genes envolvidos em situações de hipóxia *Hif-1 $\alpha$* , *Vhl* e os genes codificadores das citocinas pró inflamatórias *Il-1 $\beta$*  e *Il-6* mostraram-se relacionados com a alta resposta inflamatória aguda nos camundongos AIRmax após a indução de I/R. A diferença de inflamação observada entre as linhagens AIRmax e AIRmin após indução da I/R está de acordo com o fenótipo de seleção, indicando compartilhamento de genes reguladores destes dois fenômenos inflamatórios e propondo estas linhagens como modelo para o estudo do gene *Hif-1 $\alpha$*  como regulador da Resposta Inflamatória Aguda.

**Palavras-chave:** Isquemia. Expressão Gênica. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. Fator Indutor de Hipóxia1  $\alpha$ . Inflamação Aguda. Camundongo.

## ABSTRACT

SUPPA, A.P. **Study of hypoxia regulatory genes expression during lung inflammation produced by intestinal ischemia-reperfusion in AIRmax and AIRmin mice.** 90 p. Master thesis (Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Oxygen homeostasis is essential for survival and physiologic development of organisms. Lack of oxygen to tissue is a common underlying factor in morbidity and mortality for numerous serious medical conditions such as the acute respiratory distress syndrome (ARDS). For recovery of homeostasis the myeloid cells exert their functions in specialized areas of hypoxia. The group of proteins responsible for adaptation of myeloid cells in hypoxia includes the products of the *Hif-1 $\alpha$*  gene. Hypoxia-inducible factor is a transcription factor which responds to changes in oxygen and induces the transcription of the genes such as *Vhl*, *Vegf* and pro or anti-inflammatory cytokines-encoding genes. The aim of this study was to characterize the cellular and molecular mechanisms operating in hypoxia state induced by intestinal I/R on lung inflammatory reaction in two lines of mice genetically selected for maximal (AIRmax) or minimal (AIRmin) Acute Inflammatory Response. Lung injury was evaluated by MPO activity, cellular infiltration in the lung parenchyma, CD11b and CD62L expression on bone marrow (BM), blood and lung cells and hypoxia genes expressions by Real Time PCR. We observed an intense neutrophily in the AIRmax lung and a low infiltrate in AIRmin mice with equivalent levels compared to the control groups. Adhesion molecules analyze showed higher expression of CD62L in lung and BM of AIRmax I/R than AIRmin I/R or control groups. A high expression of *Hif-1 $\alpha$* , *Vhl*, *Il-1 $\beta$*  and *Il-6* was observed in AIRmax I/R mice. Conversely, AIRmin I/R mice presented low expression of these genes. In conclusions AIRmax mice present higher acute inflammatory reaction after I/R than AIRmin mice characterized by massive neutrophil infiltration. High levels of expression of genes involved in situations of hypoxia *Hif-1 $\alpha$*  and *Vhl*, and genes encoding the inflammatory cytokines *IL-1 $\beta$*  and *IL-6* showed related to high acute inflammatory response from AIRmax mice after I/R induction. This interline difference is according to selection phenotypes indicating these lines as a model for the study of *Hif* regulation in the inflammatory response.

**Key words:** Ischemia. Gene Expression. Acute Respiratory Distress Syndrome. Hypoxia Inducible Factor -1  $\alpha$ . Acute Inflammation Reaction. Mice.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A<sub>450</sub>:</b>	Absorbância 450nm
<b>ADP:</b>	Adenosina Difosfato
<b>Ahr:</b>	Receptor de Hidrocarbonetos Aromáticos ( <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i> )
<b>AIR:</b>	Resposta Inflamatória aguda
<b>AIRmax:</b>	Resposta Inflamatória Aguda Máxia
<b>AIRmin:</b>	Resposta Inflamatória Aguda Mínima
<b>ALI</b>	Injúria aguda do pulmão
<b>AMP:</b>	Adenosina monofosfato
<b>ARDS:</b>	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
<b>ARNT:</b>	Translocador Nuclear de Hidrocarbonetos Aromáticos ( <i>Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator</i> )
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>bHLH:</b>	Básico-leice -alça -hélice ( <i>Basic- helix -loop-helix</i> )
<b>CBP/p300:</b>	Co- activators Binding Protein/p300
<b>cM:</b>	CentiMorgan
<b>cT:</b>	Cycle Threshold
<b>DMBA:</b>	7,12-dimetilbenzantraceno
<b>DO:</b>	Densidade óptica
<b>F0:</b>	População inicial
<b>F1:</b>	Híbridos interlinhagem
<b>F2:</b>	Segregantes interlinhagens
<b>FiO<sub>2</sub>:</b>	Fração inspirada de O <sub>2</sub>
<b>GM-CSF:</b>	Fator estimulador de crescimento granulócito-macrófago
<b>HE:</b>	Hematoxilina -Eosina
<b>HIF-1:</b>	Fator Indutor de Hipóxia 1
<b>HPH:</b>	HIF prolil hidroxilase
<b>HREs:</b>	Elementos Responsivos de Hipóxia
<b>IL-1<math>\beta</math>:</b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL-6:</b>	Interleucina 6
<b>IL-10:</b>	Interleucina 10

<b>I/R:</b>	Isquemia e Reperfusão
<b>LTB<sub>4</sub>:</b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>MAPK:</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MGI:</b>	<i>Mouse Genomic Informatics</i>
<b>MPO:</b>	Mieloperoxidase
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	Fator Nuclear $\kappa$ B
<b>ODD</b>	Domínio de degradação dependente de oxigênio
<b>PAF:</b>	Fator ativador de plaqueta
<b>PAHs:</b>	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
<b>PAS:</b>	<i>Period aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator single-minded</i>
<b>PBS:</b>	Salina tamponada com fosfatos
<b>PCR:</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PHD:</b>	Proil Hidroxilase
<b>PI3K:</b>	Fosfatidilinositol 3- kinase
<b>pO<sub>2</sub>:</b>	Pressão parcial de O <sub>2</sub>
<b>TAD-C</b>	Domínio de transativação C terminal
<b>TAD-N</b>	Domínio de transativação N terminal
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	Fator de crescimento tumoral $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
<b>UTI:</b>	Unidade de tratamento intensivo
<b>VEGF:</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular
<b>VHL:</b>	von Hippel -Lindau

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b>	Processo de lesão durante a isquemia e reperfusão. ....	<b>22</b>
<b>Figura 2:</b>	Representação esquemática do HIF-1 $\alpha$ e seus domínios funcionais. ....	<b>26</b>
<b>Figura 3:</b>	Regulação pós - transcricional do Hif-1 $\alpha$ . ....	<b>27</b>
<b>Figura 4:</b>	Fatores de crescimento sintetizam HIF-1 $\alpha$ , independente do nível de O <sub>2</sub> via PI3K ou MAPK. ....	<b>28</b>
<b>Figura 5:</b>	Divergência entre as linhagens AIR quanto ao número médio de leucócitos infiltrantes e extravasamento protéico no sítio de injeção do Biogel. ....	<b>30</b>
<b>Figura 6:</b>	Atividade de MPO pulmonar em camundongos AIRmax e AIRmin após 1 hora ( <b>A</b> ) e 4 horas( <b>B</b> ) do início da reperfusão. ....	<b>46</b>
<b>Figura 7:</b>	Avaliação do nível de inflamação por meio da contagem das células do pulmão de AIRmax e AIRmin extraídas pelo tratamento com colagenase após isquemia seguida de 1 e 4 horas de reperfusão, bem como dos animais controles falso-operado e basal. ....	<b>48</b>
<b>Figura 8:</b>	Correlação entre neutrófilos do pulmão e MPO das linhagens AIRmax e AIRmin após I/R. ....	<b>49</b>
<b>Figura 9:</b>	Atividade de MPO por célula (neutrófilos) infiltrada no pulmão dos animais AIRmax e AIRmin submetidos a I/R. ..	<b>49</b>
<b>Figura 10:</b>	Cortes histológicos (5 $\mu$ m) de pulmão de camundongos AIRmax (A) e AIRmin (B) dos três grupos experimentais: I/R, falso-operado e basal. ....	<b>51</b>
<b>Figura 11:</b>	Células totais do LBA de camundongos machos AIRmax e AIRmin submetidos a I/R e animais controles falso-operados e basais. ....	<b>53</b>
<b>Figura 12:</b>	Constituição celular do LBA de camundongos AIRmax (A) e AIRmin (B) dos grupos I/R, Sham e Basal.	<b>53</b>
<b>Figura 13:</b>	Avaliação dos leucócitos totais da medula óssea ( <b>A</b> ), sangue total ( <b>B</b> ) e neutrófilos do sangue ( <b>C</b> ) nas linhagens AIRmax e AIRmin após 4 horas de reperfusão. ....	<b>55</b>
<b>Figura 14:</b>	Número absoluto de células mononucleares ( <b>A</b> ) e de hemácias	

(B) presentes no sangue periférico dos camundongos AIRmax e AIRmin submetidos a I/R, nos controles falso-operados e nos basais. ....	56
<b>Figura 15:</b> Citogramas representativos das células da circulação e medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin submetidos a I/R intestinal e controles falso operado e basal (os números nos quadrante representam a porcentagem da população duplo-positiva) (A). Número absoluto de células GR1+/CD11b+ da circulação (B) medula óssea (C) dos três grupos analisados. ....	58
<b>Figura 16:</b> Histograma representativo da expressão das moléculas de adesão CD11b (A) e CD62L (B) nas células da medula óssea, do sangue periférico e do parênquima pulmonar. ....	60
<b>Figura 17:</b> Curvas de sobrevivência dos camundongos AIRmax, AIRmin e BALB/c submetidos a I/R e falso operados. Os animais foram observados durante 15 após a cirurgia e a mortalidade foi registrada diariamente. ....	62
<b>Figura 18:</b> Expressão relativa dos genes <i>Hif-1<math>\alpha</math></i> , <i>Vhl</i> , <i>Arnt</i> a partir do RNAm obtido do pulmão de camundongos I/R, falso operados e basais após 1e 4 horas de reperusão. ....	65
<b>Figura 19:</b> Expressão relativa dos genes <i>Il-1<math>\beta</math></i> , <i>Il-6</i> e <i>Tgf-<math>\beta</math></i> a partir do RNAm obtido do pulmão de camundongos I/R, falso operados e basais após 1e 4 horas de reperusão. ....	66
<b>Figura 20:</b> Expressão relativa dos genes <i>Vegf-<math>\alpha</math></i> e <i>Mpo</i> a partir do RNAm obtido do pulmão de camundongos I/R, falso operados e basais após 1e 4 horas de reperusão. ....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela1:</b> Causas comuns e menos comuns de lesão pulmonar direta e indireta. ....	<b>23</b>
--	-----------



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Camundongos .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Indução da Isquemia e Reperfusão Intestinal (I/R).....</b>	<b>37</b>
<b>3.3 Avaliação da Reação Inflamatória Aguda no Pulmão após I/R intestinal.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.2 Extração das células do pulmão por collagenase .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.3 Análise Histológica .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4 Avaliação do Lavado Bronco-Alveolar (LBA) .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5 Avaliação dos leucócitos circulantes e da Medula Óssea .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.1 Contagem em câmara hemocitométrica de Malassez.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.2 Citometria de Fluxo .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6 Análise de sobrevivência após I/R intestinal .....</b>	<b>40</b>
<b>3.7 Expressão Gênica por PCR em Tempo Real (Real Time PCR) .....</b>	<b>41</b>
<b>3.7.1 Extração de RNA total .....</b>	<b>41</b>
<b>3.7.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) .....</b>	<b>41</b>
<b>3.7.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-Time PCR) .</b>	<b>42</b>
<b>3.7.4 Cálculo da expressão relativa .....</b>	<b>43</b>
<b>3.8 Análise Estatística .....</b>	<b>43</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Avaliação da Reação Inflamatória Aguda no Pulmão após I/R intestinal em camundongos AIRmax e AIRmin .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.1 Determinação da atividade da MPO no pulmão .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2 Determinação do número de células no parênquima pulmonar após extração por collagenase .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.3 Análise histológica do parênquima pulmonar .....</b>	<b>50</b>

<b>4.2 Lavado Bronco Alveolar (LBA) .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3 Caracterização dos leucócitos circulantes e da medula óssea após 4 horas de I/R. ....</b>	<b>54</b>
<b>4.3.1 <i>Análise morfológica das populações leucocitárias e hemácias da medula óssea e sangue periférico</i> .....</b>	<b>54</b>
<b>4.3.2 <i>Identificação das populações celulares por citometria de fluxo por meio da dupla marcação GR1/CD11b na medula óssea e circulação</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>4.4 Avaliação da expressão de moléculas de adesão do tipo L-Selectina (CD62L) e <math>\beta</math>-integrina (CD11b) nas células da medula óssea, sangue e parênquima pulmonar .....</b>	<b>59</b>
<b>4.5 Análise de sobrevivência dos camundongos AIRmax e AIRmin após indução de Isquemia intestinal seguida da Reperfusão .....</b>	<b>61</b>
<b>4.6 Expressão Gênica por PCR em Tempo Real (Real Time PCR) .....</b>	<b>63</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>

# Introdução

---

## 1 INTRODUÇÃO

A diminuição da oferta de sangue para os tecidos implica na formação de áreas com baixo nível de oxigênio, caracterizando o estado de hipóxia. Em tecidos saudáveis a tensão de oxigênio (ou pressão parcial de O<sub>2</sub>) encontra-se geralmente entre 20 e 70 mm Hg. A pressão de oxigênio no sangue dos capilares pulmonares é de 40 mm Hg, entretanto uma perfusão inadequada de O<sub>2</sub> pode gerar áreas de hipóxia, onde a tensão de O<sub>2</sub> pode chegar a menos que 10 mm Hg (LEWIS *et al.*, 1999). Esta condição afeta profundamente as propriedades celulares como: produção de citocinas, expressão de receptores para quimiocinas, adesão, migração e sobrevivência das células. Neste contexto, a viabilidade celular pode ser comprometida levando à perda de função e integridade do organismo (LEWIS *et al.*, 1999; CARDEN e GRANGER, 2000).

Em situações clínicas, como inflamações, infecções, trauma oclusivo arterial, parada cardíaca, trombose, embolia, vasoespasmo, tumores, transplantes e em cirurgias com o uso de oclusores vasculares, são inúmeras as oportunidades para a indução de hipoxia tissular pela falta de oxigênio. Essa deficiência do aporte sangüíneo (isquemia) é conseqüência da diminuição da luz das artérias, arteríolas, vênulas e capilares (WELBOURN *et al.*, 1991; SOYDAN *et al.*, 2009). Após a restituição do fluxo sanguíneo (reperfusão), metabólitos produzidos em situação de isquemia geram radicais livres altamente reativos que acentuam a lesão tecidual local ou sistêmica (LEWIS *et al.*, 1999; CARDEN e GRANGER, 2000; DE PERROT *et al.*, 2003; ROLO *et al.*, 2009; NILAKANTAN *et al.*, 2009).

As células do endotélio vascular são particularmente vulneráveis aos efeitos deletérios da isquemia (hipóxia) e reperfusão (reoxigenação). Neste contexto a carência de oxigênio provoca alterações diretas nas mitocôndrias, o que ocasiona a diminuição da fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, diminuição dos níveis de ATP (adenosina trifosfato). Na tentativa de diminuir os efeitos da hipóxia, o tecido isquêmico utiliza vias alternativas e anaeróbias, visando a produção de ATP, para gerar o metabolismo mínimo capaz de manter a homeostase celular. No entanto, o estoque de ATP continua sendo consumido e degradado à ADP (adenosina difosfato), à AMP (adenosina monofosfato), em seguida em inosina e hipoxantina. A

---

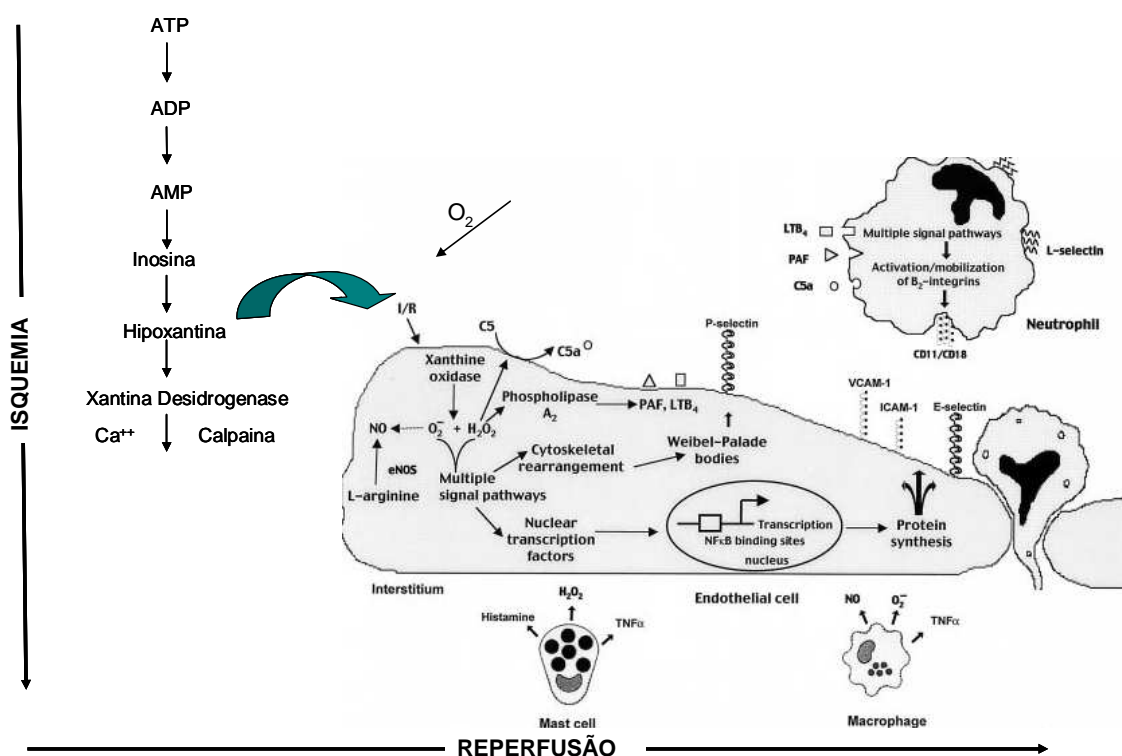
queda dos níveis de ATP compromete totalmente o sistema de produção protéica celular e a bomba de sódio/potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), o que culmina em edema celular. Paralelamente ocorre o acúmulo de  $\text{Ca}^{++}$  no citosol, provocando a ativação de proteases, levando à formação da enzima xantina desidrogenase (CARDEN e GRANGER, 2000; DE PERROT *et al.*, 2003; ROLO *et al.*, 2009; NILAKANTAN *et al.*, 2009).

Após a restituição do fluxo sanguíneo (reperfusão) são produzidas substâncias tóxicas e precursores de radicais livres (PORTUGAL-COHEN e KOHEN, 2009). A hipoxantina resultante da degradação de ATP é convertida em xantina pela ação da enzima xantina oxigenase e posteriormente em ácido úrico tendo como subprodutos o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O ânion superóxido promove a liberação de íons metálicos ( $\text{F}_2^{++}$ ), que reagem com  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando o radical hidroxila (OH). Ocorre então a peroxidação dos ácidos graxos da membrana. A produção elevada de oxidantes resulta na ativação de fatores quimiotáticos, como fragmentos do complemento (C5a), fator de ativação de plaquetas (PAF) e leucotrieno  $\text{B}_4$ ( $\text{LTB}_4$ ) (CARDEN e GRANGER, 2000; LAMMERS *et al.*, 2003).

Os oxidantes também podem promover a expressão inicial de P-selectinas nas células endoteliais, estas responsáveis pelo rolamento dos leucócitos. A adesão firme dos leucócitos, que é mediada pelas  $\beta 2$  integrinas (CD11/CD18) é induzida pela ativação do complemento, PAF e  $\text{LTB}_4$  com os seus respectivos receptores durante o rolamento dos leucócitos. Paralelamente os oxidantes medeiam a expressão das moléculas de adesão por meio da ativação do fator de transcrição nuclear (NF $\kappa$ B). A resposta inflamatória após a isquemia/reperfusão (I/R) é amplificada pela liberação de mediadores pelos macrófagos e mastócitos que residem próximo às vênulas. Neste contexto, os radicais livres, acumulados durante a I/R, ativam e atraem indiretamente neutrófilos para os tecidos injuriados. Neutrófilos ativados secretam enzimas proteolíticas, como a mieloperoxidase e a elastase e ainda liberam radicais livres acentuando a lesão tecidual (**Figura 1**) (CARDEN e GRANGER, 2000; DE PERROT *et al.*, 2003; TANG *et al.*, 2008).

Alguns órgãos como coração, cérebro, intestino, rim fígado e pulmão são particularmente sensíveis a situações de hipóxia. O pulmão é considerado um órgão alvo associado à resposta inflamatória sistêmica, gerada pela isquemia e reperfusão

intestinal. Neste contexto, a lesão pulmonar aguda (ALI- *Acute Lung Injury*), que em sua forma mais severa determina a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (ARDS- *Acute Respiratory Distress Syndrome*) pode levar à falência múltipla de órgãos (PARKS *et al.*, 1982; HUDSON e STEINBERG, 1999; HALLDORSSON *et al.*, 2000; van SOEREN *et al.*, 2000; SCHWARZ e ALBERT, 2004; SHERIDAN *et al.*, 2008)



**Figura 1:** Processo de lesão durante a isquemia e reperfusão. Modificado de CARDEN e GRANGER, 2000.

Devido a diversas causas (**Tabela 1**), a ARDS acomete cerca de 15% dos pacientes de uma Unidade de Tratamento Intensivo (UTI). A incidência atual desta doença ainda não é totalmente conhecida, entretanto estudos relatam uma incidência que varia de 1,5 a 8,3 pacientes para cada 100.000 habitantes (GALHARDO e MARTINEZ, 2003; SHERIDAN *et al.*, 2008).

A ARDS pode ser descrita como um processo inflamatório do parênquima pulmonar caracterizado principalmente por uma situação de hipoxemia grave acompanhada do acúmulo de neutrófilos e monócitos, além de um infiltrado

eritrocítico e de extravasamento de proteínas plasmáticas. Pode ser diagnosticada clinicamente por meio da relação entre pressão arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio ( $PaO_2/FiO_2$ ) menor ou igual a 200mm Hg e uma pressão oclusiva arterial pulmonar equivalente a 18 mm Hg (SCHWARZ e ALBERT, 2004; SHERIDAN *et al.*, 2008). A população celular mais representativa no infiltrado consiste de neutrófilos. De fato, o recrutamento de neutrófilos para os locais de injúria tecidual é evento crítico para a defesa do hospedeiro contra estímulos lesivos e para a reparação de tecidos (JANUSZ e DOHERTY, 1992). Admite-se que os neutrófilos possam causar danos ao tecido pulmonar devido à liberação de proteases e de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (GRISHAM *et al.*, 1986; CARDEN e GRANGER, 2000).

**Tabela 1.** Causas de Lesão Pulmonar Direta e Indireta.

<b>Lesão Pulmonar Direta</b>	<b>Lesão Pulmonar Indireta</b>
<u>Causas comuns</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pneumonias</li> <li>➤ Aspiração de conteúdo gástrico</li> </ul>	<u>Causas comuns</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sépsis</li> <li>➤ Trauma grave</li> </ul>
<u>Causas menos comuns</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Contusão pulmonar</li> <li>➤ Embolias</li> <li>➤ Lesão por inalação</li> <li>➤ Edema de reperfusão pós-transplante pulmonar</li> <li>➤ Afogamento</li> </ul>	<u>Causas menos comuns</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Circulação extracorpórea</li> <li>➤ Toxicidade por drogas</li> <li>➤ Pancreatite aguda</li> <li>➤ Hemotransusão</li> <li>➤ Queimaduras graves</li> <li>➤ Múltiplas fraturas</li> <li>➤ Pós-transplante de medula óssea</li> <li>➤ Causa neurogênica</li> </ul>

Modificado de Galhardo e Martinez, 2003.

Mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos,

fragmentos do complemento, neuropeptídeos e fatores de crescimento, ocupam lugar de destaque na modulação desta reação (BERNARD *et al.*, 1999; PERROT, *et al.*, 2003). As células recrutadas para o pulmão, ao liberarem amplo espectro de mediadores inflamatórios e de enzimas, desencadeiam a reação inflamatória pulmonar propriamente dita (WHEELER *et al.*, 1998; WIN, 2001; WAGNER *et al.*, 2002).

Além disso, existem estudos indicando aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio pulmonar, durante a isquemia, como eventos fundamentais para o recrutamento e ativação de neutrófilos (VEDDER *et al.*, 1988; KOIKE *et al.*, 1992; FONTES, 1995; AGRAWAL *et al.*, 1996; HASLETON e ROBERTS, 1999; CARDEN e GRANGER, 2000; DE PERROT *et al.*, 2003).

Moléculas de adesão como as P-selectinas, ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) e CD18 (cadeia  $\beta$  da  $\beta$ 2- integrina), bloqueadas durante a reperfusão, podem reduzir a injúria no pulmão (CONDLIFFE *et al.*, 1996; MINAMIYA *et al.*, 1998, HUGHES, *et al.*, 2007). O bloqueio das E-selectinas e L-selectinas também pode ser benéfico após algumas horas de reperfusão quando os neutrófilos apresentam um papel preponderante na indução da injúria (REIGNIER *et al.*, 1997). Portanto, é razoável supor que a interação leucócito-endotélio, durante o processo de isquemia e reperfusão seja relevante para que a inflamação pulmonar se estabeleça.

Experimentalmente, o protocolo de indução da reação inflamatória pulmonar em camundongos provocada por isquemia/reperfusão consiste na obstrução da artéria mesentérica durante 45 minutos seguida da liberação do fluxo sanguíneo. Como consequência, ocorre uma reação do tecido pulmonar à falta de oxigênio, produzindo uma reação inflamatória aguda, caracterizada pela presença maciça de células inflamatórias do tipo mielóide e proteínas plasmáticas.

Na tentativa de manter a integridade do tecido, é de importância vital que as células mielóides exerçam suas funções especializadas nas áreas lesionadas, onde o aporte de oxigênio e de nutrientes seja baixo. Assim, é necessário que ocorra a produção de ATP por meio da glicólise anaeróbica para que as funções celulares não sejam comprometidas. Os neutrófilos e outras células mielóides utilizam, portanto, desta via metabólica para se adaptarem às condições anaeróbicas adversas (BORREGAARD e HERLIN, 1982; SEMENZA, 2007; NILAKANTAN *et al.*, 2009).



---

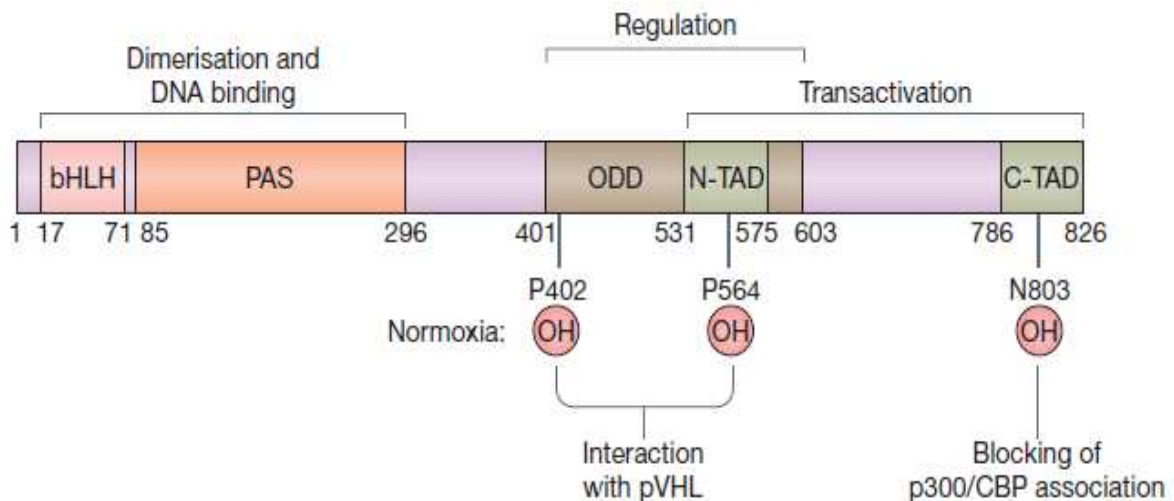
Tendo em vista a capacidade das células de mamíferos de responderem às modificações na tensão de oxigênio no ambiente, genes específicos são expressos para manter a homeostase tecidual. O grupo de proteínas que realiza esta função compreende o complexo gênico do *Hif-1α* (do inglês: *Hypoxia Inducible Factor, subunit 1alfa*), como VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e *Vhl* (von Hippel Lindau), assim como os genes alvos de citocinas clássicas pró- ou anti-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  (SEMENZA, 2000; LEE *et al.*, 2004; PAPANDREOU, *et al.*, 2005; DEHNE BRUNE, 2009).

O HIF-1 é um fator de transcrição, responsável pela regulação dos elementos responsivos à hipóxia (*Hipoxia Responsive Elementes* –HREs), composto por duas subunidades, HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ . As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  pertencem à família de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (*basic helix-loop-helix* -bHLH) o qual apresentam dois domínios PAS (*Period Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Single Minded- Per/Arnt/Sim*), designados PAS-A e PAS-B. Os domínios bHLH e PAS são requeridos para a formar o heterodímero entre as subunidades (JIANG *et al.*, 2007). Estes domínios são proteínas regulatórias importantes nos ritmos circadianos, no metabolismo de xenobióticos e na resposta à hipóxia (LEE *et al.*, 2004; DEHNE e BRUNE, 2009; SEMENZA, 2008; KIZAKA-KONDOH, *et al.* 2009; LEE *et al.*, 2009).

Modificações pós-transcricionais regulam a atividade do HIF-1 $\alpha$ , aumentando a estabilidade da proteína e a sua capacidade de transativação. A subunidade  $\alpha$  contém os domínios TAD-N e TAD-C (do inglês: transactivation domain N e C terminal) que se estendem pelo domínio de inibição (SEMENZA, 2008; KIZAKA-KONDOH, *et al.*, 2009). Sob condições de hipóxia, o domínio TAD-N justapõe-se ao domínio de degradação oxigênio-dependente (ODD), mantendo a estabilidade da proteína, em seguida, o domínio TAD-C interage com o co-ativador p300/CBP, independentemente da estabilidade da proteína, promovendo a ativação total da proteína HIF (**Figura 2**) (LEE *et al.*, 2004; SEMENZA, 2008; KIZAKA-KONDOH, *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2009).

Neste contexto, sob condições de hipoxemia, a hidroxilação dependente de O<sub>2</sub> do HIF-1 $\alpha$  é reduzida, estabilizando a proteína e permitindo sua dimerização com o ARNT (do inglês: Aryl Receptor Nuclear Translocator), formando um complexo transcricional ativo. O componente central da complexa regulação da expressão de

HIF-1 $\alpha$  é o produto da expressão do gene supressor de tumor *vhl*, que codifica a proteína von Hippel-Lindau (MAXWELL *et al.*, 1999; SEMENZA, 2008; KIZAKA-KONDOH, *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2009).

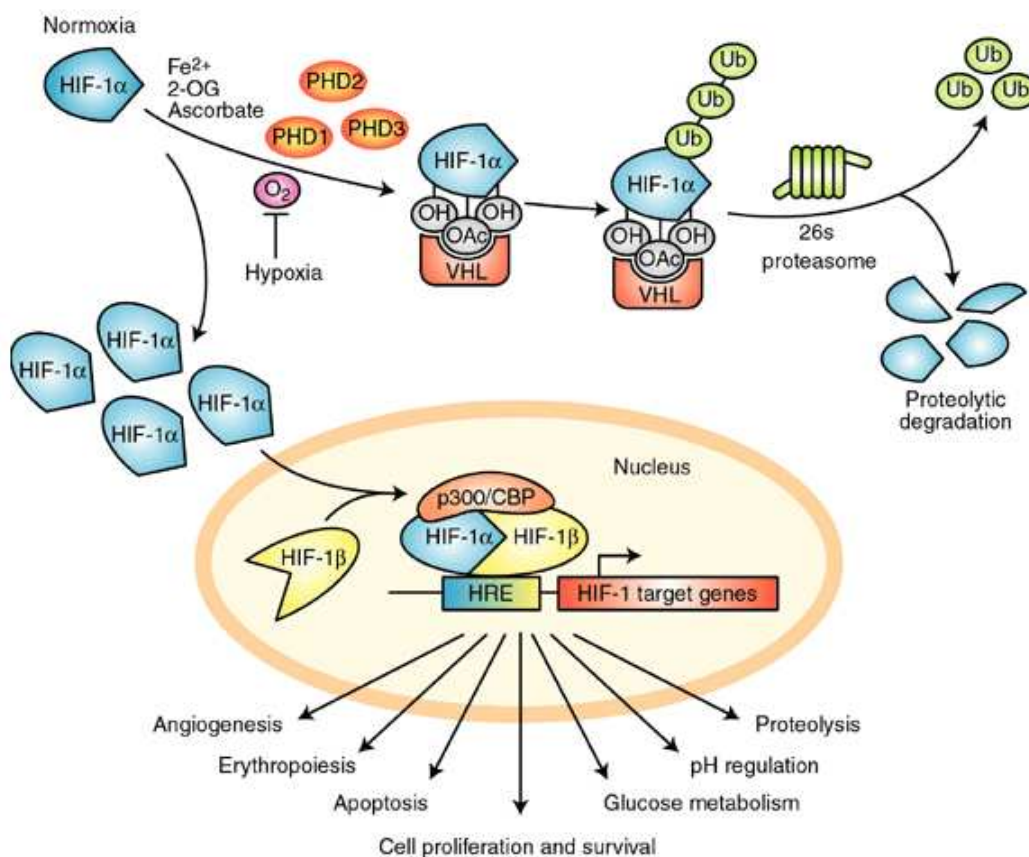


**Figura 2:** Representação esquemática do HIF-1 $\alpha$  e seus domínios funcionais (FONTE: POON EVON *et al.*, 2009).

Em condições de normóxia, a estabilidade da proteína HIF-1 $\alpha$  é regulada pela hidroxilação dependente de O<sub>2</sub>. A associação do HIF-1 $\alpha$  com a proteína VHL é iniciada pela modificação pós-transcricional dada pela hidroxilação de resíduos de prolina, mediados pela prolil hidroxilase (PHD) ou HIF prolil hidroxilase (HPH). A hidroxilação destes resíduos proporciona a associação do HIF-1 $\alpha$  com a proteína VHL. Nesse momento a proteína VHL atua como substrato de reconhecimento do complexo ubiquitina ligase E3, levando à rápida degradação do HIF-1 $\alpha$  (**Figura 3**) (LEE *et al.*, 2004; SEMENZA, 2008; KIZAKA-KONDOH *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2009).

Vários estudos foram desenvolvidos no sentido de elucidar o papel do HIF-1 $\alpha$  na modulação das reações inflamatórias. Para tanto, camundongos knock-out dos genes *Hif-1 $\alpha$*  e *Vhl*, estes envolvidos na regulação do infiltrado celular em sítios de hipóxia, foram desenvolvidos e submetidos a condições adversas de oxigênio. A

deleção do gene *Vhl* causou uma hiperinflamação, em modelo de inflamação aguda, além de aumentar a produção de lactato e edema. (CRAMER *et al.*, 2003). Já camundongos knockout para o *Hif-1 $\alpha$*  apresentaram inibição da formação de edema, e diminuição de células inflamatórias (CRAMER *et al.*, 2003).

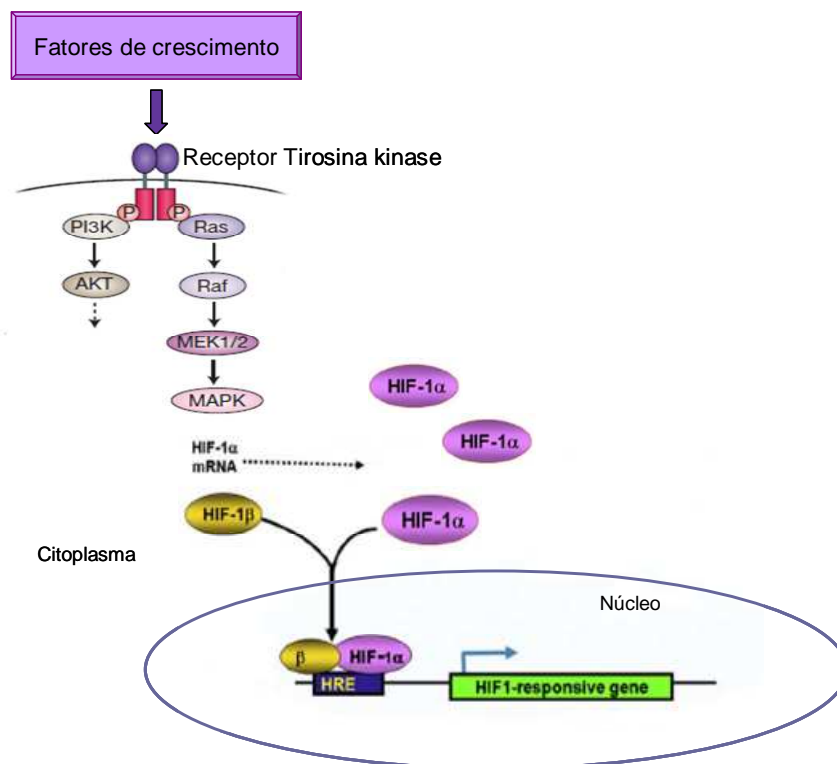


**Figura 3:** Regulação pós - transcricional do Hif-1 $\alpha$  (CAROLL e ASHCROOFT, 2006).

Além da condição de hipóxia, outros estímulos produzidos por, citocinas, hormônios de crescimento de transformação (TGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e insulina são capazes de induzir o acúmulo como também a tradução de HIF-1 $\alpha$  em condições normais de oxigênio (HELLWING-BURGEL *et al.*, 2003; MCMAHON *et al.*, 2006). Provavelmente os fatores de crescimento se ligam ao receptor tirosina kinase, ativando as vias PI3K (fosfatidilinositol 3-kinase) e MAPK, (do inglês:

Mitogen Activated Protein kinase) (HELLWING-BURGEL *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2004; MCMAHON *et al.*, 2006) (**Figura 4**).

O grupo de pesquisadores do laboratório de Imunogenética estuda há vários anos o controle genético da imunidade inata, especificamente da reação inflamatória aguda, por meio de experimentos de seleção genética artificial objetivando a produção de linhagens de camundongos com características fenotípicas opostas. Assim, é possível estudar nestas linhagens fenótipos complexos, multifatoriais, relacionados com a intensidade da reação inflamatória aguda.

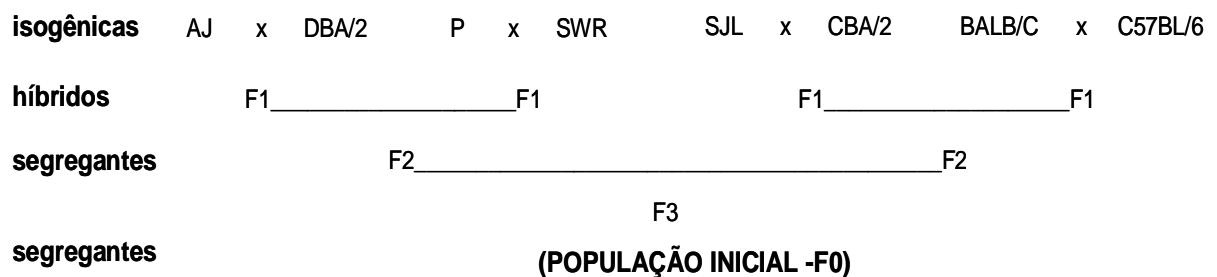


**Figura 4:** Fatores de crescimento sintetizam HIF-1 $\alpha$ , independente do nível de O<sub>2</sub> via PI3K ou MAPK.

Portanto, é de interesse estudar os mecanismos envolvidos no controle da resposta a injúria e geração espontânea de inflamação em condições de hipóxia por meio da utilização destes animais geneticamente selecionados para a resposta inflamatória aguda, um enfoque complementar que poderá contribuir para a compreensão da inflamação aguda pulmonar decorrente de I/R intestinal.

O modelo animal que foi utilizado no presente estudo consiste então de duas linhagens de camundongos que diferem grandemente na capacidade de desenvolver resposta inflamatória aguda (AIR Acute Inflammatory Response) em resposta à inoculação s.c. de Biogel (agente flogístico quimicamente inerte e não imunogênico) e que apresentam também diferenças marcantes na susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções e tumores (ARAÚJO *et al.*, 1998; BIOZZI *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2005).

Estas linhagens de alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) reatividade inflamatória aguda foram obtidas por Seleção Genética Bidirecional a partir de uma população geneticamente heterogênea (F0) constituída por cruzamentos equilibrados entre oito linhagens isogênicas (A/J, BALB/cJ, C57BL/6J, CBA/J, DBA/2J, P/J, SJL/J e SWR/J), de acordo com o esquema abaixo:

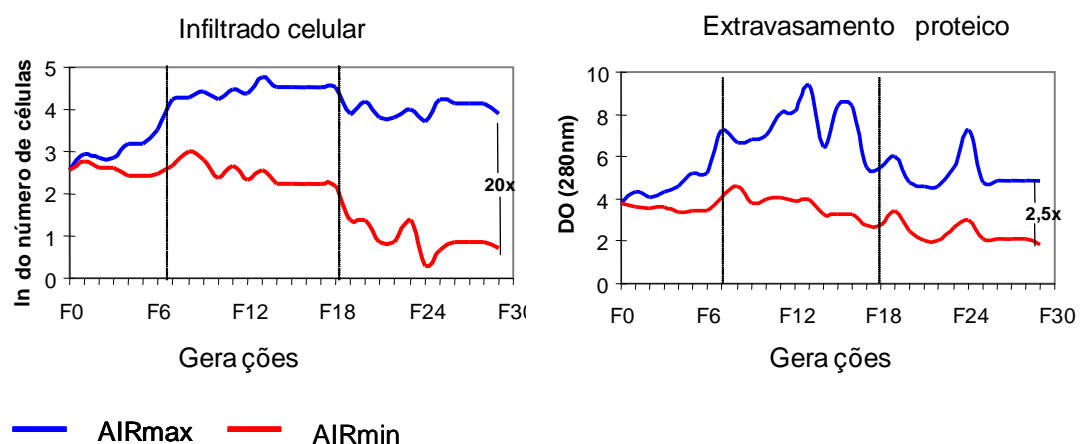


Cada camundongo da F0 apresentava a combinação aleatória de 12,5% do pool dos genes das linhagens isogênicas parentais. A partir desta população F0, foram selecionados aqueles animais que apresentaram alta ou baixa reatividade inflamatória aguda (AIR), segundo o número de leucócitos infiltrados e o teor de proteínas extravasadas em resposta à injeção subcutânea de Biogel (STIFFEL *et al.*, 1990; IBAÑEZ *et al.*, 1992; RIBEIRO FILHO, 1994).

Os acasalamentos dos animais escolhidos nos extremos de resposta máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) foram repetidos em gerações consecutivas, até ser atingido o limite máximo de separação entre as duas linhagens. Ao redor da vigésima geração de acasalamentos seletivos, observou-se a conservação dos fenótipos extremos nas gerações posteriores, indicando que os genes relacionados aos caracteres selecionadores fixaram-se em homozigose em cada linhagem, mantendo-se, entretanto, um fundo genético heterogêneo (**figura 5**) (RIBEIRO,

1994; BIOZZI *et al.*, 1998).

Durante o processo seletivo houve aumento progressivo da diferença fenotípica entre as duas linhagens AIR indicando que este caráter é quantitativamente regulado pela interação aditiva de vários genes que segregam independentemente e cujos alelos de efeito de máxima ou de mínima reatividade inflamatória foram acumulados progressivamente durante o processo de seleção. Por métodos de genética quantitativa foi estimada a participação de 7 a 12 loci gênicos independentes (IBAÑEZ *et al.*, 1992; BIOZZI *et al.*, 1998).



**Figura 5:** Divergência entre as linhagens AIR quanto ao número médio de leucócitos infiltrantes e extravasamento protéico no sítio de injeção do Biogel (Modificado de BIOZZI *et al.*, 1998).

A diferença fenotípica entre as duas linhagens deu-se, sobretudo, no número médio de leucócitos migrantes ao sítio de injeção do Biogel, tendo como células predominantes neutrófilos. Essa diferença foi aproximadamente de 20 vezes nos camundongos AIRmax. Em comparação aos AIRmin Atualmente, a divergência quanto ao número de células presentes no exudato estendeu-se a 25 vezes. Este maior número de neutrófilos encontrado no exsudato dos camundongos AIRmax tratados com Biogel é decorrente da convergência de três fatores: maior capacidade da medula óssea em produzir neutrófilos maduros; maior produção de fatores quimiotáticos pelas células residentes ou infiltrantes e maior resistência a apoptose das células do exsudato (RIBEIRO *et al.*, 2003).

---

Esta diferença interlinhagens estendeu-se a outros agentes inflamatórios não relacionados entre si ou com Biogel, como zymozan, carragenina (VASQUEZ-BRAVO, 1996) e veneno de *Bothrops jararaca* (CARNEIRO *et al.*, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2008) e de *Lonomia obliqua* (RAMOS *et al.*, 2004). Estes compostos induziram também afluxo leucocitário e formação de edema pronunciados nos camundongos AIRmax. No que concerne a doenças inflamatórias, estas linhagens diferem na susceptibilidade ao desenvolvimento de artrite autoimune desencadeada por pristane (VIGAR *et al.*, 2000) e na inflamação alérgica à ovalbumina no tecido subcutâneo e pulmonar sendo maiores as reações nos animais AIRmax (CAMPOS, 2001).

As alterações genéticas decorrentes do processo seletivo também interferiram na resistência ou susceptibilidade destas linhagens à tumorigênese e a infecções por patógenos intracelulares (BIOZZI *et al.*, 1998; ARAÚJO *et al.*, 1998).

A resposta imune específica dos camundongos AIRmax e AIRmin parece não ter sido afetada pelo processo seletivo, uma vez que estas linhagens produzem níveis equivalentes de anticorpos contra antígenos naturais complexos (eritrócitos, proteínas heterólogas e bactérias inativadas). Igualmente, as reações de hipersensibilidade tardia a eritrócitos ou a *Salmonella* Typhimurium foram idênticas nas duas linhagens. Por outro lado, camundongos AIRmax são significativamente mais resistentes a infecções por patógenos intracelulares do que os AIRmin. Os AIRmax diferenciam-se dos AIRmin na ordem de 1000, 100 e 50 vezes as doses letais para 50% dos animais (DLs50) para *Salmonella* TYPHIMURIUM, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, respectivamente. Esta maior resistência dos AIRmax está diretamente relacionada à sua habilidade em controlar o crescimento bacteriano no baço, à resposta inflamatória local e à produção de citocinas (ARAÚJO *et al.*, 1998).

No mesmo sentido, os camundongos AIRmax, que apresentam uma reação inflamatória intensa, mostraram-se resistentes à carcinogênese química de pele, no protocolo em duas etapas induzida por agentes químicos como o 9,10-dimetilbenzoantraceno (DMBA) como iniciador, seguida de promoção por 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), enquanto os AIRmin, que produzem reação inflamatória menos intensa, são sensíveis (BIOZZI *et al.*, 1998).

Na carcinogênese pulmonar induzida pela uretana (MARIA *et al.*, 2003) e no

desenvolvimento de metástases após implantes de melanomas (MARIA *et al.*, 2001), os animais AIRmax mostram-se sempre mais resistentes. Uma associação genética entre o grau da resposta inflamatória aguda e a susceptibilidade ou resistência à carcinogênese de pele e de pulmão foi observada em experimentos independentes de co-segregação destas características, realizados em populações de segregantes F2 entre AIRmax e AIRmin (BIOZZI *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2005). No caso da tumorigênese pulmonar pela uretana, foi demonstrado a fixação diferencial, respectivamente em AIRmax e AIRmin, dos alelos de resistência e susceptibilidade do locus *Pas1*, situado na região distal do cromossomo 6, principal fator genético atuante neste tipo de tumor. Os resultados apontaram para a importância de genes modificadores da AIR na carcinogênese (MARIA *et al.*, 2003).

A elucidação dos mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela diferenciação das linhagens AIRmax e AIRmin na carcinogênese, relacionados à resposta inflamatória e à imunidade específica vem sendo objeto de investigação central da linha de pesquisa do nosso laboratório.

Recentemente, foi observado um maior potencial proliferativo das células da medula óssea oriundas dos animais AIRmax *in vitro* em relação aos animais AIRmin após adição de GM-CSF associado ou não ao ácido retinóico. Neste mesmo modelo, foram observados maiores níveis de expressão de genes envolvidos nos estágios iniciais de mielopoese, refletindo nas diferenças quantitativas e qualitativas de proteínas provavelmente envolvidas no processo de hematopoese operantes nestas linhagens (COSTA, 2008).

Com o objetivo de caracterizar a participação do complexo regulatório gênico do HIF-1 $\alpha$  no controle das reações inflamatórias agudas, nos propusermos a estudar a expressão dos genes moduladores de hipóxia, *Hif-1 $\alpha$* , *Vegf*, *Vhl*, bem como os genes codificantes para as citocinas regulatórias, *Il-1*, *Il-6*, *IL-10*, *Tgf- $\beta$* , *Tnf- $\alpha$* , *Arnt* e *Mpo* em camundongos geneticamente selecionados para a alta ou baixa reatividade inflamatória aguda, submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão da artéria mesentérica.

Geneticamente, é descrito um polimorfismo de SNP (do inglês: single nucleotide polymorphism) no gene HIF-1 $\alpha$  em linhagens isogênicas (MGI: mouse genome informatic), em que a linhagem A/J apresenta a base C enquanto que as linhagens BALB/c, C57Bl/6 e DBA/2 apresentam a base T. Estas quatro linhagens



estudadas contribuíram, cada uma delas, com 12,5% do *pool* gênico da população inicial F0 do processo seletivo de obtenção das linhagens AIRmax e AIRmin.

Um dado experimental importante, obtido em nosso laboratório, refere-se à descrição do polimorfismo genético de microssatélites, da região situada ao redor de 15 e 45cM no cromossomo 12, onde se localiza o gene HIF-1 $\alpha$ . (SIQUEIRA, 2009) Nesta região encontram-se também os genes de susceptibilidade a tumor de pele (*Skf5*), de resistência de adenomas pulmonares (*Par3*) e o gene codificante do receptor de hidrocarbonetos aromáticos (*AHR*), cujos alelos de alta e baixa afinidade estão totalmente fixados em AIRmin e AIRmax, respectivamente (DE SOUZA *et al.*, 2009).

Portanto podemos sugerir que todos estes genes estejam relacionados com a diferença fenotípica apresentada pelas linhagens AIRmax e AIRmin. Nossa hipótese está relacionada com a capacidade das células dos camundongos AIRmax de expressar de maneira exacerbada o gene *Hif-1 $\alpha$* , favorecendo, com isso, a migração das células mielóides para o pulmão em condições adversas de oxigênio, levando a uma intensa reatividade inflamatória e possível lesão tecidual. Por outro lado, a pequena reação inflamatória desenvolvida pelos animais AIRmin é devido à baixa expressão deste gene. Estes dois fenótipos podem ser encontrados em populações humanas cujos indivíduos com sensibilidade no desenvolvimento da ARDS podem ser tratados por terapias que interferem no complexo gênico do *Hif-1 $\alpha$* .

Objetivo

---

## 2 OBJETIVO

Estudar as características fenotípicas e genéticas da reação inflamatória pulmonar induzida por Isquemia e Reperfusão da artéria mesentérica, em camundongos geneticamente selecionados para a alta ou baixa reatividade inflamatória aguda. Este estudo desenvolve-se por meio das seguintes análises:

- ✓ caracterização da reatividade inflamatória aguda, em tempos variados de reperfusão, quanto ao número e tipo celular presente no parênquima pulmonar e no lavado bronco-alveolar .
- ✓ análise da medula óssea e da circulação no que concerne à produção de leucócitos durante o período de reperfusão;
- ✓ avaliação da expressão dos genes moduladores da inflamação no pulmão operantes nas situações adversas de oxigênio, como o *Hif-1 $\alpha$* , *Vegf*, *Vhl*, *Arnt* e os genes codificadores das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF e TGF- $\alpha$ .

# Material e Métodos

---

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Camundongos**

Camundongos AIRmax e AIRmin, machos de 8 a 12 semanas de idade, mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan em condições padrões, recebendo dieta de camundongo Nuvital® e água *ad libitum*. Camundongos Balb/c obtidos do biotério geral de criação do Instituto Butantan. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP.

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

Os animais foram anestesiados com a associação de Quetamina e Xilazina nas doses de 20 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente. Após laparotomia mediana e desviceração, foi realizada a obstrução da artéria mesentérica por 45 minutos com oclusor vascular “Vascu Satt” nº 1001-531 (Scalan Internat, Minn, USA). Durante o período da isquemia, a incisão abdominal foi coberta com um plástico transparente estéril para minimizar perdas de líquido e calor. Após o período isquêmico, 45 minutos, a pinça vascular foi retirada para a restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão). A incisão mediana foi suturada com fio de algodão e foi injetado 1 mL de salina estéril subcutaneamente para re-hidratação. Após tempos variados da reperfusão (1, 4 e 24 horas), os animais foram anestesiados e sacrificados por dessangramento da aorta abdominal e a reação inflamatória no pulmão foi avaliada. Os grupos controles constituíram de animais falso-operados e não manipulados (basais). Os procedimentos realizados após anestesia nos animais falso-operados foram a laparotomia e a deviceração. As análises destes animais foram realizadas de acordo com o tempo de reperfusão estipulado para os animais isquêmicos.

### **3.3 Avaliação da Reação Inflamatória Aguda no Pulmão após I/R intestinal**

#### **3.3.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)**

Para a determinação da atividade de MPO, a cavidade torácica foi exposta e o leito vascular do pulmão imediatamente perfundido com PBS heparinizado (20 U/mL) em fluxo de 10 mL/minuto através do ventrículo esquerdo atingindo a artéria pulmonar. O pulmão foi retirado, lavado em PBS e homogeneizado durante 40 segundos em politron (BRINCKMAN) na presença de 1 mL de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB), a 0,5%, em EDTA (10 mM). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g, durante 10 minutos à 4 °C. A atividade de MPO foi determinada no sobrenadante.

O ensaio de MPO foi conduzido adicionando 10µl da amostra em duplicata em placa de 96 poços e 200 µl de tampão substrato, constituído de: tampão fosfato a 50mM, pH 6.0, peróxido de hidrogênio a 0,1%, orto-dianisidina 1,3% em H<sub>2</sub>O. Após 5 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 50 µl de solução de azida sódica, a 1,3% em H<sub>2</sub>O. Os valores de atividade de MPO foram expressos pelo valor das absorbâncias, obtidas a 450 nm em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments).

#### **3.3.2 Extração das células do pulmão por colagenase**

Após o período de reperfusão, os pulmões dos camundongos foram perfundidos com PBS; em seguida, foram picotados e incubados com 3 mL de colagenase (1 A SIGMA) a 1 mg/mL em placa de Petri, de 35 mm de diâmetro por 45 minutos à 37°C. A atividade da colagenase foi bloqueada com 1 mL de PBS com 20% de SBF (soro bovino fetal). Em seguida o conteúdo de cada placa foi centrifugado a 250 x g, em 10 mL de PBS 20% SBF e o precipitado celular foi ressuspendido em 1 mL de PBS, para a determinação da concentração celular em câmara hemocitométrica de Malassez, utilizando azul de metileno a 1% em ácido acético, para lise das hemácias. Lâminas citológicas foram feitas em cytospin a uma concentração de 5x10<sup>4</sup> células em 300 µl e coradas com Diff Quick, para a determinação das subpopulações celulares.

### **3.3.3 Análise Histológica**

Os pulmões dos camundongos submetidos a I/Ri foram coletados após reperfusão e acondicionados em frascos contendo formol tamponado a 10%. As amostras foram fixadas por 24 horas e em seguida foram processadas. O processo consistiu de uma série de diluições crescente de alcoóis para desidratação, xilol para clarificação e posterior inclusão em parafina. Os cortes apresentaram 5 µm de espessura e foram colocados em estufa a 56 °C para completa fixação dos mesmos e início da desparafinação. O processo terminou com a imersão das lâminas em xilol e uma série de diluições decrescente de alcoóis para re-hidratação. As lâminas foram finalmente coradas por Hematoxilina-Eosina (HE).

### **3.4 Avaliação do Lavado Bronco-Alveolar (LBA)**

O lavado Bronco Alveolar foi obtido de animais previamente anestesiados com Quetamina/Xilazina, por meio da lavagem do pulmão com 1 mL de PBS por via traqueal. Uma aliquota de 10 µl do fluido recolhido foi utilizada para contagem total de células em câmara hemocitométrica de Malassez. Trezentos microlitros foram utilizados em citocentrífuga para a análise diferencial de células infiltradas, após coloração pelo método Diff-Quick.

### **3.5 Avaliações dos leucócitos circulantes e da Medula Óssea**

#### **3.5.1 Contagem em câmara hemocitométrica de Malassez**

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

As células da medula óssea foram obtidas por meio da perfusão dos fêmures com meio RPMI 1640. As suspensões obtidas foram filtradas em nylon para eliminação de tecidos e fragmentos ósseos e as concentrações celulares

determinadas em câmara hemocitométrica de Malassez, caracterizadas morfológicamente, por esfregaços da circulação, e fenotipicamente por marcação com anticorpos específicos, GR1 e CD11b analisados por citometria de fluxo.

### **3.5.2 Citometria de Fluxo**

Células inflamatórias ou da medula óssea, após lise das hemácias (4,15 de cloreto de amônia, 0,84 g bicarbonato de sódio, 1 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0) foram quantificadas e identificadas por citometria de fluxo. Para tanto, alíquotas de 100 µL das suspensões ( $10^7$  células/mL) foram incubadas com anticorpos monoclonais dirigidos contra: granulócitos Ly-6G (GR-1, clone: RB6), contra a cadeia  $\alpha$  da molécula CD11b (clone: Mi/70) e CD62L (clone: MEL-14) marcados com Ficoeritrina (PE) ou Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), dependendo do caso. Esta dupla marcação identifica as populações mielocíticas (neutrófilos ou monócitos/macrófagos). Como Isótipos controles, foram utilizados: IgG2b, de rato (clone: A95-1), marcado com PE ou FITC. Todos os anticorpos foram obtidos da Pharmingen. O registro de 10000 células foi realizado, utilizando FACScalibur e analisado pelo programa Cellquest (Becton-Dickinson).

### **3.6 Análise de sobrevivência após I/R intestinal**

Camundongos machos AIRmax, AIRmin e Balb/c foram submetidos a isquemia por 45 minutos. Após esse período, os camundongos foram tratados por via intramuscular com 30 µL de antibiótico veterinário contendo 3600 UI de benzilpenicilina benzatina, 1800 UI benzilpenicilina procaína, 1800 UI de benzilpenicilina potássica e 1,5 mg de sulfato de estreptomicina base. Para restabelecer o equilíbrio hídrico, foi injetado 1 mL de salina estéril, por via subcutânea em todos os grupos. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, em condições padrões e observados diariamente durante 15 dias com registro diário de mortalidade.



### **3.7 Expressão Gênica por PCR em Tempo Real (Real Time PCR)**

#### **3.7.1 Extração de RNA Total**

Aproximadamente 100 mg do tecido pulmonar de cada animal foi retirado e picotado em 1 mL de Trizol (Invitrogen). As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, ao precipitado foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (MERCK) para cada 1 mL de Trizol. As amostras foram submetidas à agitação pelo vórtex e então centrifugadas por 15 minutos a 12000 x g. O sobrenadante (fase aquosa RNA) foi transferido para outro tubo eppendorf e o RNA foi precipitado em 0,5 mL de álcool isopropílico (MERCK) para cada 1 mL de Trizol. A mistura da solução foi feita por inversão e após a incubação de 10 minutos a temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado de RNA foi lavado por 5 minutos a 7500 x g com 1 mL de etanol a 75% gelado para cada 1 mL de Trizol. Após a secagem, para dissolver o precipitado, foram adicionados 50 µL de água livre de RNase. A concentração de RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro (260/280 nm) e a integridade ou a qualidade das preparações foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE seguida por coloração com brometo de etídeo. O material foi estocado a -70 °C até o processamento para a obtenção de cDNA.

#### **3.7.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)**

A síntese de cDNA foi realizada por transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para cada amostra, foram feitas soluções contendo 100 µg/mL de RNA total, e para cada 10 µL desta solução foi adicionado 1 µL de oligo (dT) 12-18 (50 mM) e 2 µL de água livre de RNase e incubados por 10 minutos à 70 °C. Após o período de incubação foram adicionados a cada tubo, 4 µL de tampão específico para a reação (5 vezes concentrado), 1 µL de dNTP 10 mM (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados) e 1 µL de DTT 0,1 M (dithiothreitol), seguindo-se uma incubação à 42 °C

---

por 2 minutos. Em seguida adicionou-se 1 µL da enzima SuperScript (200 U/mL) (Invitrogen) por tubo, seguindo nova incubação à 42 °C por 50 minutos. A reação foi bloqueada por uma incubação de 15 minutos à -70 °C. Os cDNAs obtidos foram submetidos à Reação de Polimerase em Cadeia.

### **3.7.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-Time PCR)**

Cada amostra de 2 µl do cDNA (diluição 1:2) foi adicionada a uma solução contendo as seqüências sintéticas específicas ou *primers* (1 µL de cada *primer*) (5 µM); 12,5 µL do Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen), e água (8,5 µL) para ajustar o volume final de reação em 25 µL por tubo.

As reações foram incubadas no termociclador PT-200 (MJ Research, Inc. Whatertown, MA, EUA) e submetidas inicialmente a uma fase de ativação da enzima polimerase a 95 °C por 15 min. (“hot start”). A amplificação das seqüências alvo ocorreu em 50 ciclos constituídos de etapas sucessivas de desnaturação (95 °C por 20 segundos), de anelamento (55 °C por 20 segundos) e de extensão (72 °C por 1 min.).

A fluorescência do SYBR Green incorporado ao material dupla fita amplificado a cada ciclo foi detectada na etapa de extensão pelo aparelho Chromo 4 (MJ Research, Inc. Whatertown, MA, EUA).

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

Após a fase de amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase Melting. Nessa fase a temperatura varia de 55 °C a 99 °C e a fluorescência da reação é adquirida a cada 1 °C, registrando-se a temperatura em que ocorreu a dissociação ou desnaturação da dupla fita do material amplificado. Esta temperatura reflete o tamanho do fragmento amplificado e, portanto a especificidade do material amplificado em cada amostra.

### 3.7.4 Cálculo da expressão relativa

A expressão dos genes estudados foi estimada por meio do método comparativo do *Cycle Threshold* (cT). Pequenas variações relativas às diferenças na quantidade do RNA total dos genes alvo foram corrigidas por normalização. Para normalização dos genes alvos foram testados três genes constitutivos sendo eles:  $\beta_2$  microglobulina,  $\beta$ -actina, e Ciclofilina. A expressão do gene alvo foi então, normalizada pelo gene controle endógeno  $\beta_2$  microglobulina, pois sua expressão ocorreu em níveis constantes nas duas linhagens e em seus respectivos grupos experimentais (basal, falso operado e I/R). Um gene constitutivo ideal deve ser aquele, cuja expressão ocorra em níveis constantes em diferentes tecidos do organismo, em todos os estágios do desenvolvimento e não deve ser afetado pelo tratamento experimental (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Pelos valores do *Cycle Threshold* (cT) calcula-se o Delta cT ( $\Delta$ cT) para cada amostra de RNAm, que consiste na diferença entre os cT do gene de interesse e do gene constitutivo ( $\Delta$ cT = cT<sub>(gene alvo)</sub> - cT<sub>(gene endógeno)</sub>). A expressão dos genes entre vários grupos experimentais foi determinada pela comparação entre o  $\Delta$ cT das amostras em diferentes condições experimentais e o  $\Delta$ cT do grupo controle (calibrador):  $\Delta\Delta$ cT =  $\Delta$ cT<sub>(teste)</sub> -  $\Delta$ cT<sub>(calibrador)</sub>; a expressão relativa, portanto, é igual  $2^{-\Delta\Delta$ cT} (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Como calibrador utilizamos o valor da média dos  $\Delta$ cT do animais AIRmin basal para todas as condições.

### 3.8 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média dos valores  $\pm$  erro padrão. A análise de significância entre as médias foi realizada pelo teste paramétrico ANOVA seguido do teste de Tukey Para o experimento de sobrevida foi aplicado o teste de qui-quadrado. Valores para  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

---

---

## 4 RESULTADOS

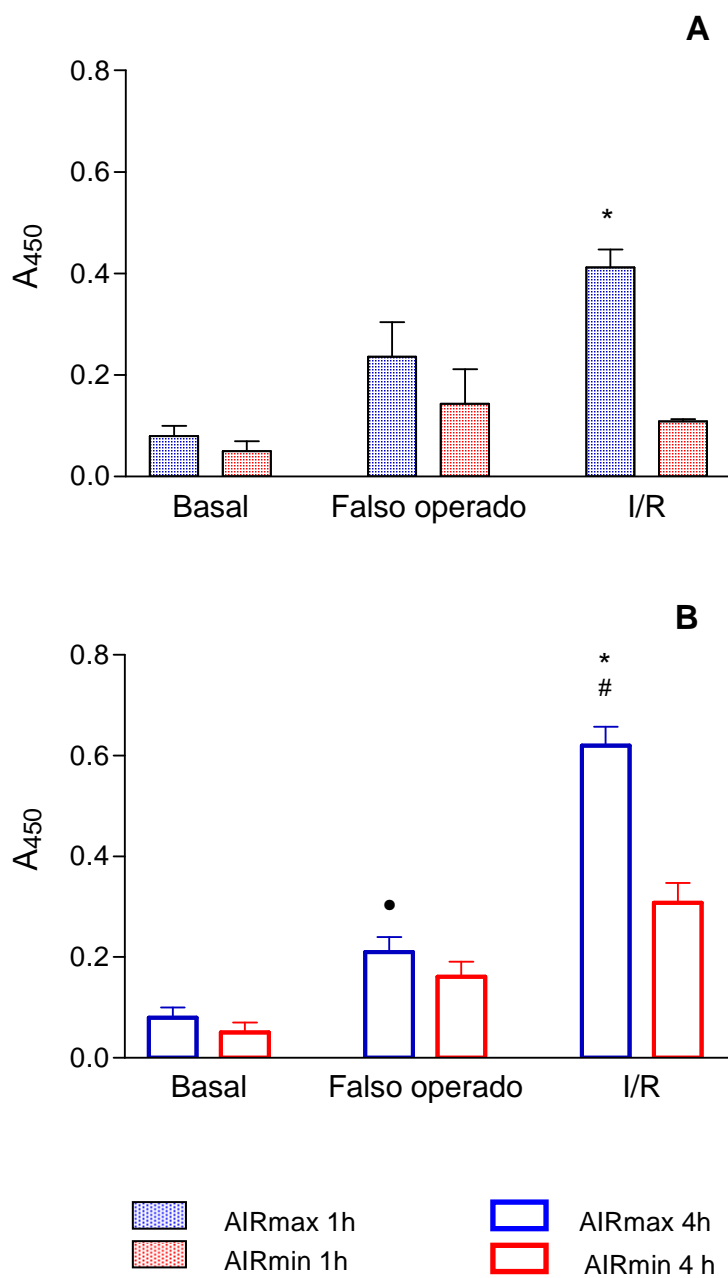
### 4.1 Avaliação da Reação Inflamatória Aguda no Pulmão após I/R intestinal em camundongos AIRmax e AIRmin

#### 4.1.1 Determinação da atividade da MPO no pulmão

Para caracterizar o perfil da resposta inflamatória aguda no pulmão dos camundongos AIRmax e AIRmin, avaliamos o infiltrado inflamatório celular induzido pela isquemia da artéria mesentérica (intestinal) por 45 minutos seguida de 1 (**Figura 6A**) e 4 horas (**Figura 6B**) de reperfusão por meio da medida da atividade da MPO no pulmão. Esta medida caracteriza indiretamente o infiltrado neutrofílico. Como controles foram utilizados animais falso-operados e basais (não manipulados).

Na **figura 6** observamos um aumento progressivo significativo da atividade da MPO nos camundongos AIRmax em relação aos AIRmin, após os respectivos tempos de reperfusão. Este aumento refletiu em uma diferença interlinhagens significativa a favor dos AIRmax, caracterizado por um maior infiltrado neutrofílico. Podemos observar que os índices de densidades óptica tiveram seus níveis mais altos nos animais AIRmax isquêmicos após 4 horas (**Figura 6B**) de reperfusão, reflexo de uma maior resposta inflamatória aguda no pulmão. Os animais falso-operados e basais não apresentaram diferenças interlinhagens quanto à atividade da MPO, entretanto, foram observadas diferenças entre os animais AIRmax submetidos à isquemia e seus respectivos controles.

Animais AIRmax e AIRmin avaliados após 24 horas de reperfusão apresentaram níveis de atividade MPO baixos, com valores de DO inferiores a 0,08 compatível com os índices basais (dados não mostrados).



**Figura 6.** Medida da atividade de MPO pulmonar em camundongos AIRmax e AIRmin após 1 hora (A) e 4 horas (B) do início da reperfusão. \*diferença entre AIRmax e AIRmin, # diferença intralinhagem entre I/R e demais controles; •diferença intralinhagens entre falso operado e Basal.

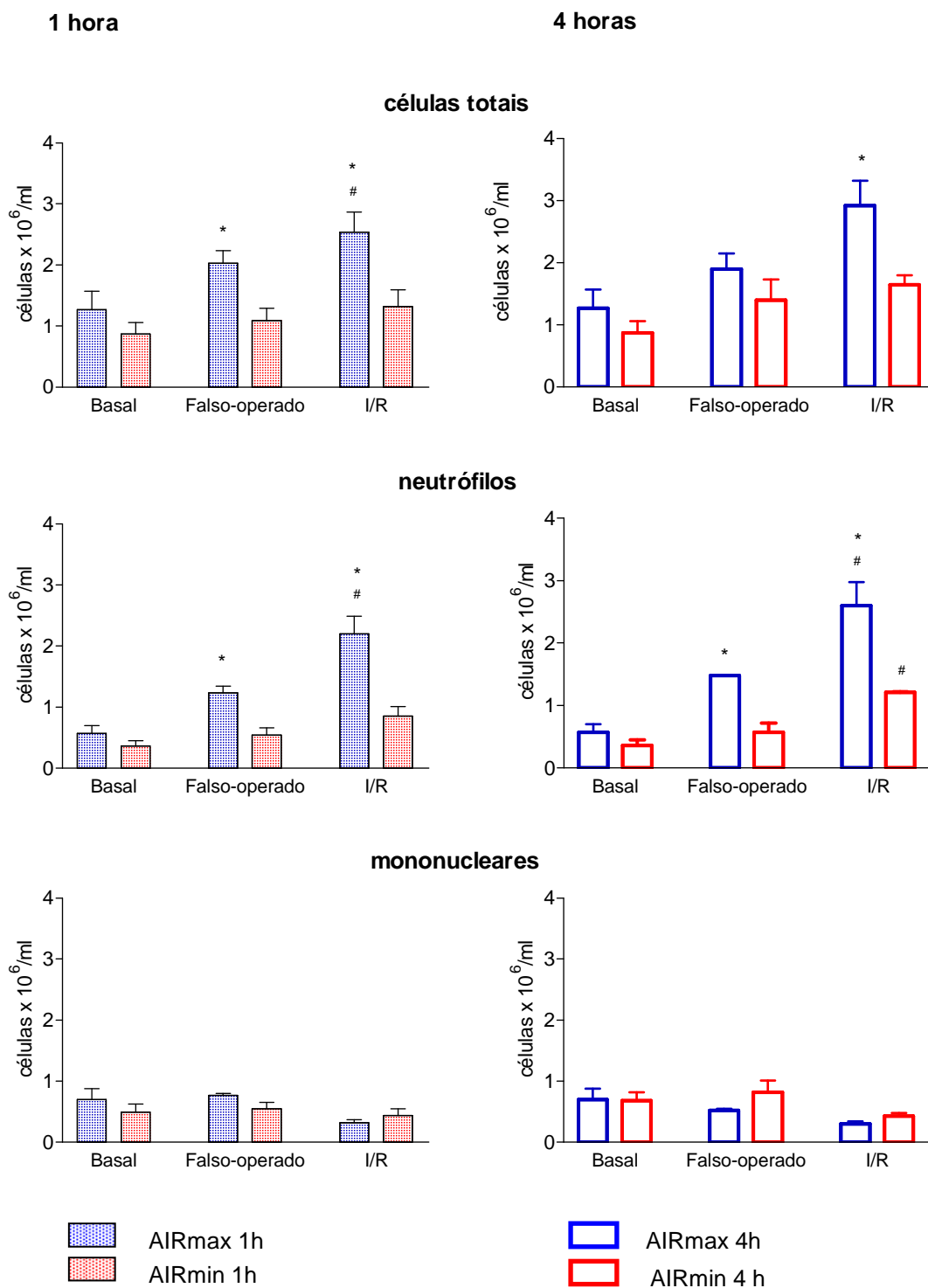
---

#### **4.1.2 Determinação do número de células no parênquima pulmonar após extração por colagenase**

Após o período de reperfusão de uma e quatro horas (**Figura 7**) os pulmões dos camundongos AIRmax e AIRmin foram perfundidos com PBS, retirados e digeridos com colagenase tipo IA (**material e métodos**).

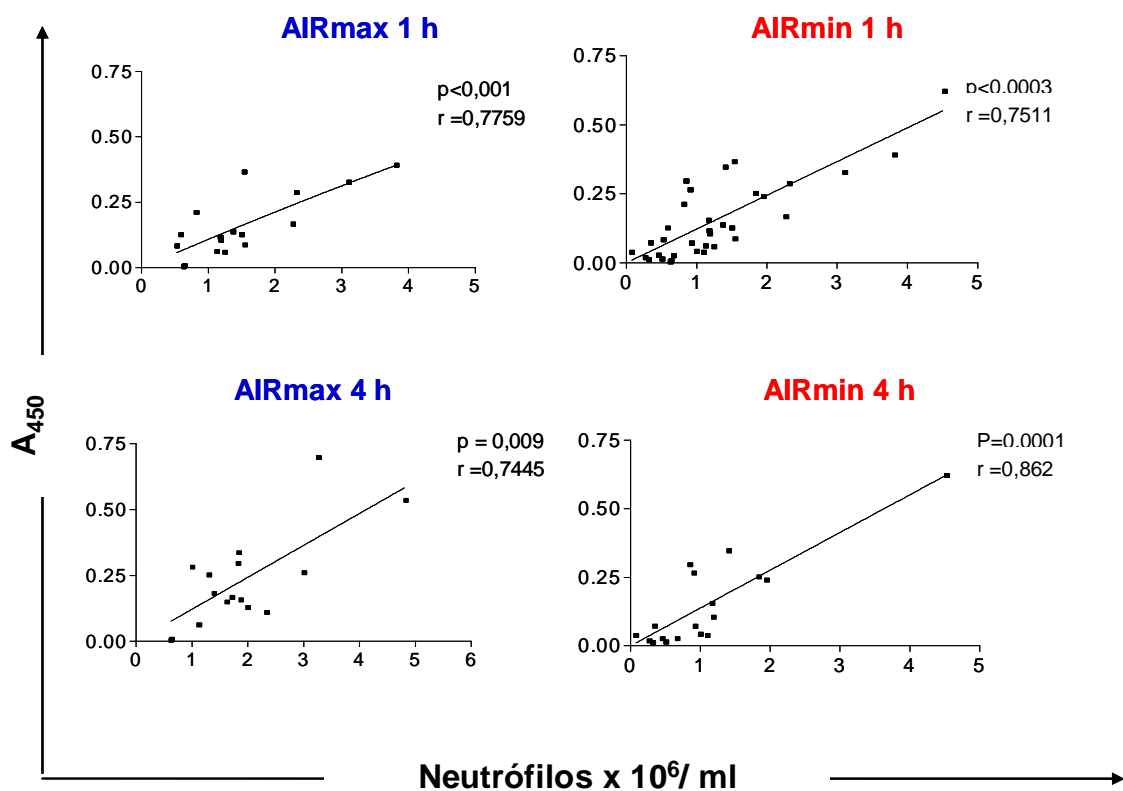
Observamos um aumento significativo no número total de leucócitos nos pulmões dos camundongos AIRmax após 1 e 4 horas da reperfusão. Este aumento no número total de células foi acompanhado pelo aumento progressivo no número absoluto de neutrófilos entre os vários grupos na linhagem AIRmax quando comparado aos animais AIRmin. Quanto ao infiltrado de células mononucleares não foram observadas alterações significantes entre os grupos experimentais nas duas linhagens analisadas (**Figura 7**).

A **figura 8** mostra a correlação entre o número de células totais do pulmão digerido e a atividade de MPO. Após a contagem das células extraídas do pulmão, estas foram centrifugadas a 250x g e o precipitado celular foi submetido ao ensaio de atividade de MPO. A correlação entre o número de neutrófilos (representam cerca de 90% do total) e a atividade de MPO nas células foi positiva e significativa em ambas as linhagens AIRmax e AIRmin e nos dois tempos analisados, 1 e 4 horas após reperfusão. Analisando a atividade desta enzima por célula (neutrófilo) observamos atividades enzimáticas equivalentes em ambas as linhagens (**Figura 9**).

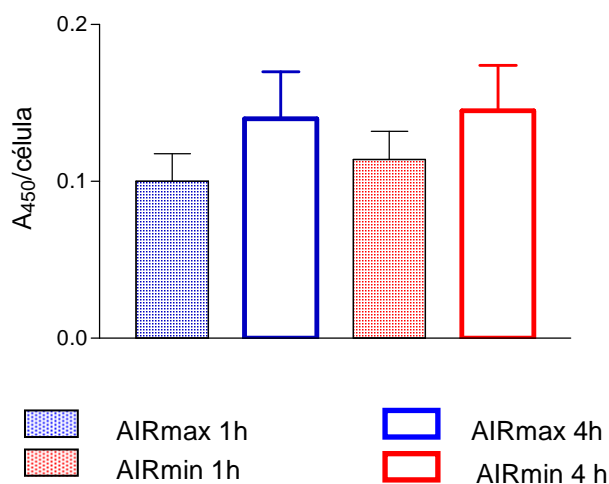


**Figura 7.** Avaliação do nível de inflamação por meio da contagem das células do pulmão de AIRmax e AIRmin extraídas pelo tratamento com colagenase após isquemia seguida de 1 e 4 horas de reperusão, bem como dos animais controles falso-operado e basal. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão do número de células por mL de 8 animais por grupo.  $p < 0,05$ , \* Diferença entre AIRmax e AIRmin e # diferença intralinhagem entre I/R e demais grupos.





**Figura 8.** Correlação entre neutrófilos do pulmão e MPO das linhagens AIRmax e AIRmin após I/R.



**Figura 9.** Atividade de MPO por célula (neutrófilos) infiltrada no pulmão dos animais AIRmax e AIRmin submetidos a I/R. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão de 15 animais por linhagem.  $p < 0,05$ .

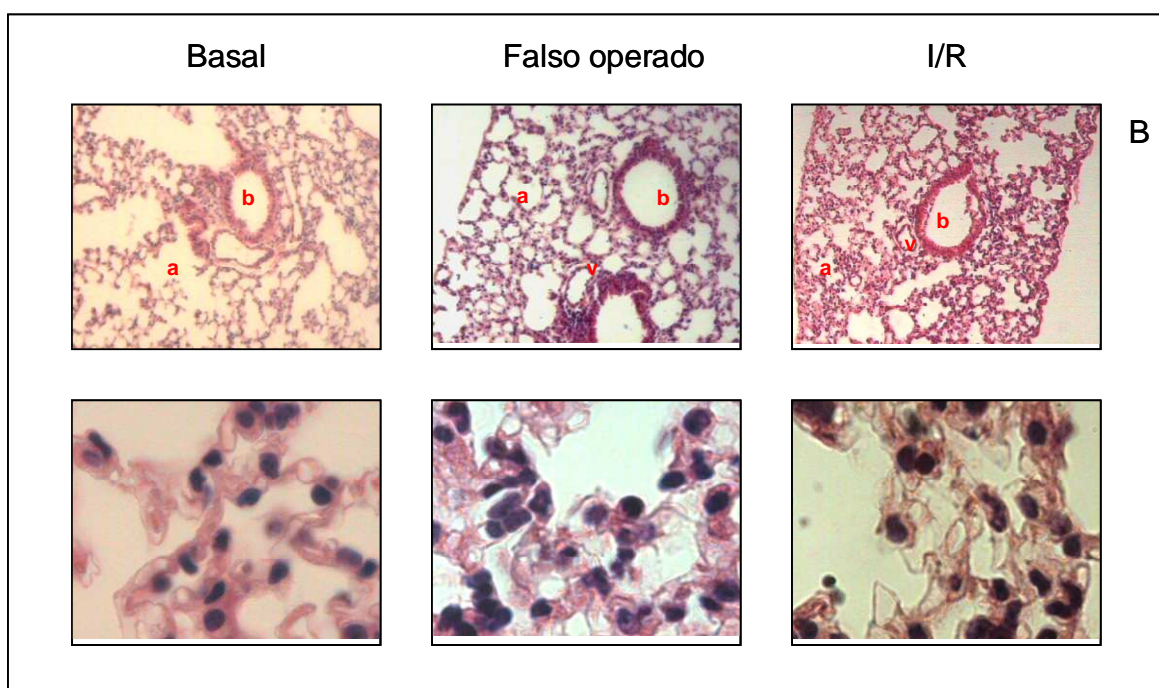
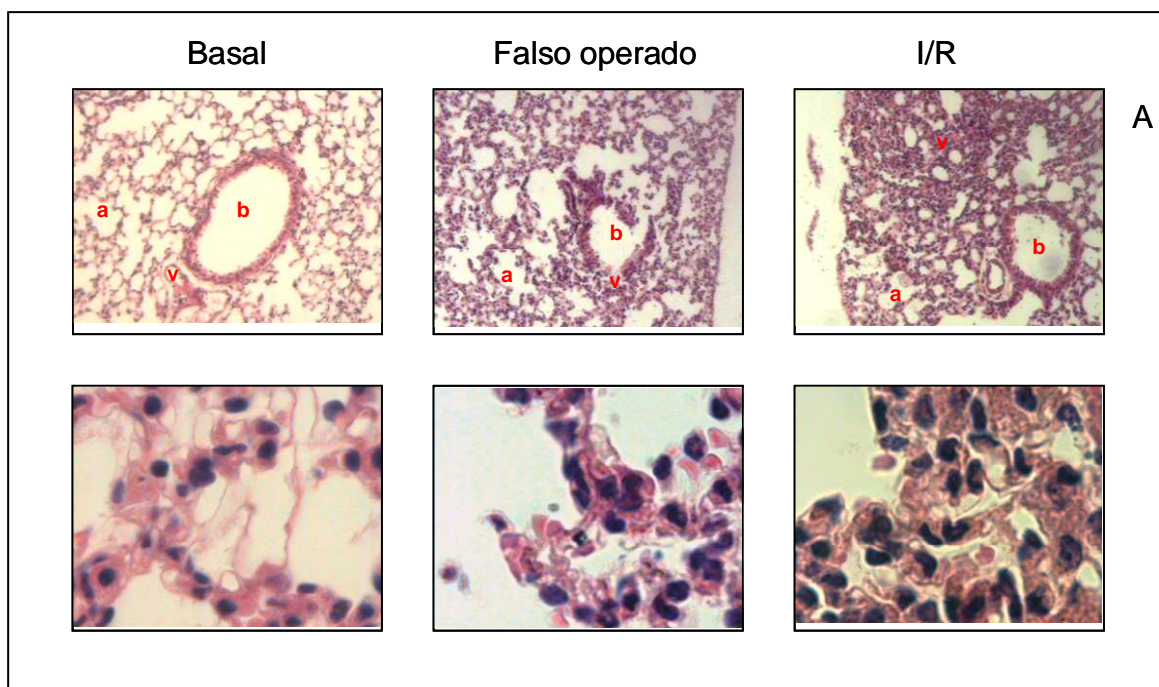
---

#### **4.1.3 Análise histológica do parênquima pulmonar**

Os pulmões dos camundongos AIRmax e AIRmin submetidos por 45 minutos a isquemia e de 4 horas de reperfusão e os camundongos dos grupos falso-operados e Basais, foram perfundidos com 10 mL de PBS pelo ventrículo esquerdo. Em seguida os pulmões foram retirados da cavidade torácica e acondicionados em frascos contendo formol tamponado a 10%. As amostras foram fixadas por 24 horas e, em seguida, foram processadas para histologia de acordo com **Material e Métodos**.

O parênquima pulmonar dos camundongos AIRmax I/R apresentou um infiltrado inflamatório mais intenso com grande percentual de neutrófilos, quando comparados aos parênquimas dos animais AIRmin. A arquitetura do parênquima dos AIRmax I/R foi alterada, devido ao infiltrado celular, com colabação dos alvéolos. Este perfil inflamatório observado confirmou os dados obtidos de MPO e pelo processo de extração de células por tratamento com colagenase. Por outro lado, camundongos AIRmax do grupo falso operado apresentaram arquitetura pulmonar pouco alterada devido ao baixo nível de injúria provocado apenas pelo procedimento cirúrgico (**Figura 10A**).

Camundongos AIRmin submetidos à I/R apresentaram similaridade na arquitetura pulmonar, quando comparados aos animais do grupo falso-operado ambos com um pequeno influxo inflamatório muito inferior ao animais AIRmax e que não alterou as estruturas do pulmão (**Figura 10B**).



**Figura 10.** Cortes histológicos (5 $\mu$ m) de pulmão de camundongos **AIRmax** (A) e **AIRmin** (B) dos três grupos experimentais: I/R, falso-operado e basal. Estruturas como alvéolos (a), vasos (v) e bronquíolos (b) estão representadas. Coloração HE e aumento de 100x e 1000x.

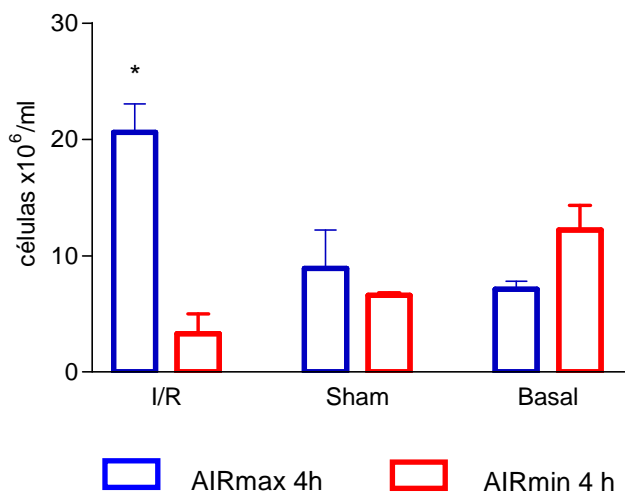
---

## 4.2 Lavado Bronco Alveolar (LBA)

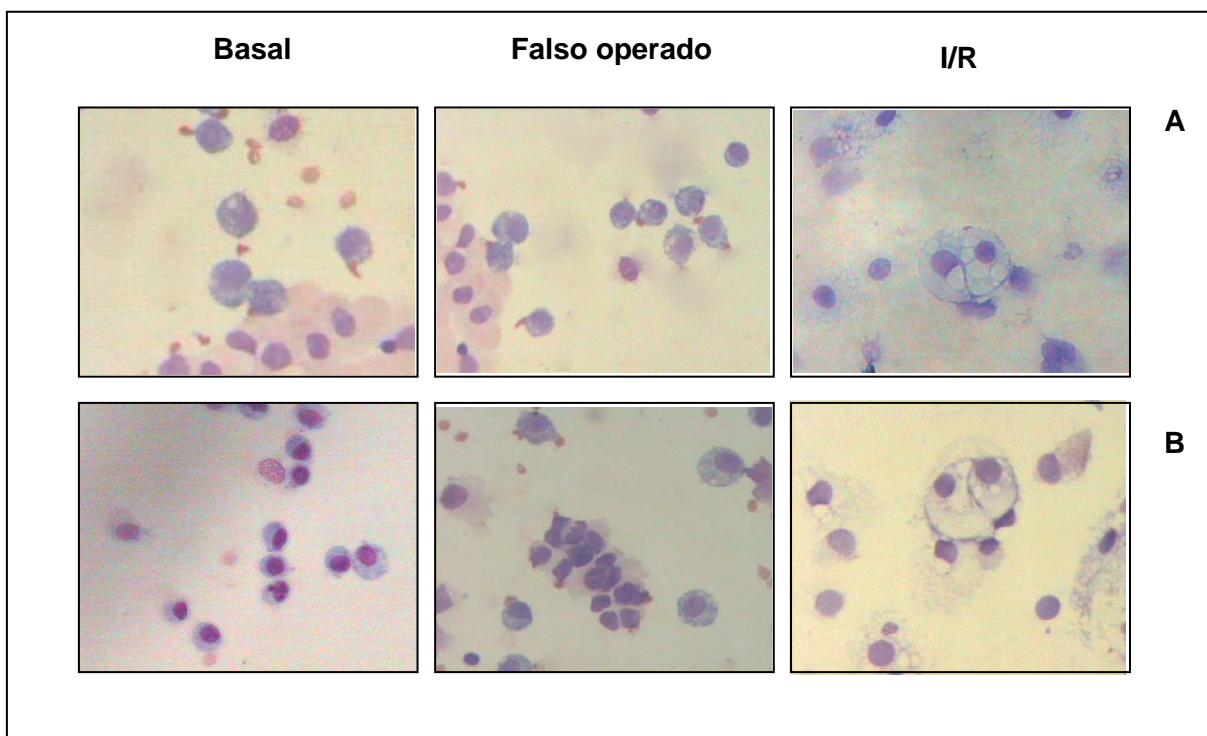
Com o objetivo de avaliar um possível infiltrado celular no compartimento alveolar, analisamos o lavado bronco alveolar após a indução da I/R.

Ao analisar o conteúdo do LBA, foi observada uma diferença interlinhagens significativa na concentração celular total entre os animais AIRmax e AIRmin de aproximadamente 4 vezes a favor da linhagem AIRmax (**Figura 11**).

A contagem diferencial evidenciou a predominância de células mononucleadas, sobretudo macrófagos e/ou células epiteliais. Estas últimas podem ter sido soltas pelo procedimento da lavagem. Os macrófagos dos camundongos AIRmax e AIRmin, após 4 horas da reperfusão apresentaram morfologia diferenciada, sugerindo uma possível ativação destas células já que apresentam tamanho aumentado e citoplasma vacuolizado. Quase não se observou células polimorfonucleadas nestes lavados (**Figura 12**).



**Figura 11.** Células totais do LBA de camundongos machos AIRmax e AIRmin submetidos a I/R e animais controles falso-operados e basais. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão de 6 animais por grupo. \*diferença entre AIRmax e AIRmin.



**Figura 12.** Constituição celular do LBA de camundongos AIRmax (A) e AIRmin (B) dos grupos I/R, Sham e Basal. As lâminas foram coradas por Diff Quik. Aumento de 400X.

---

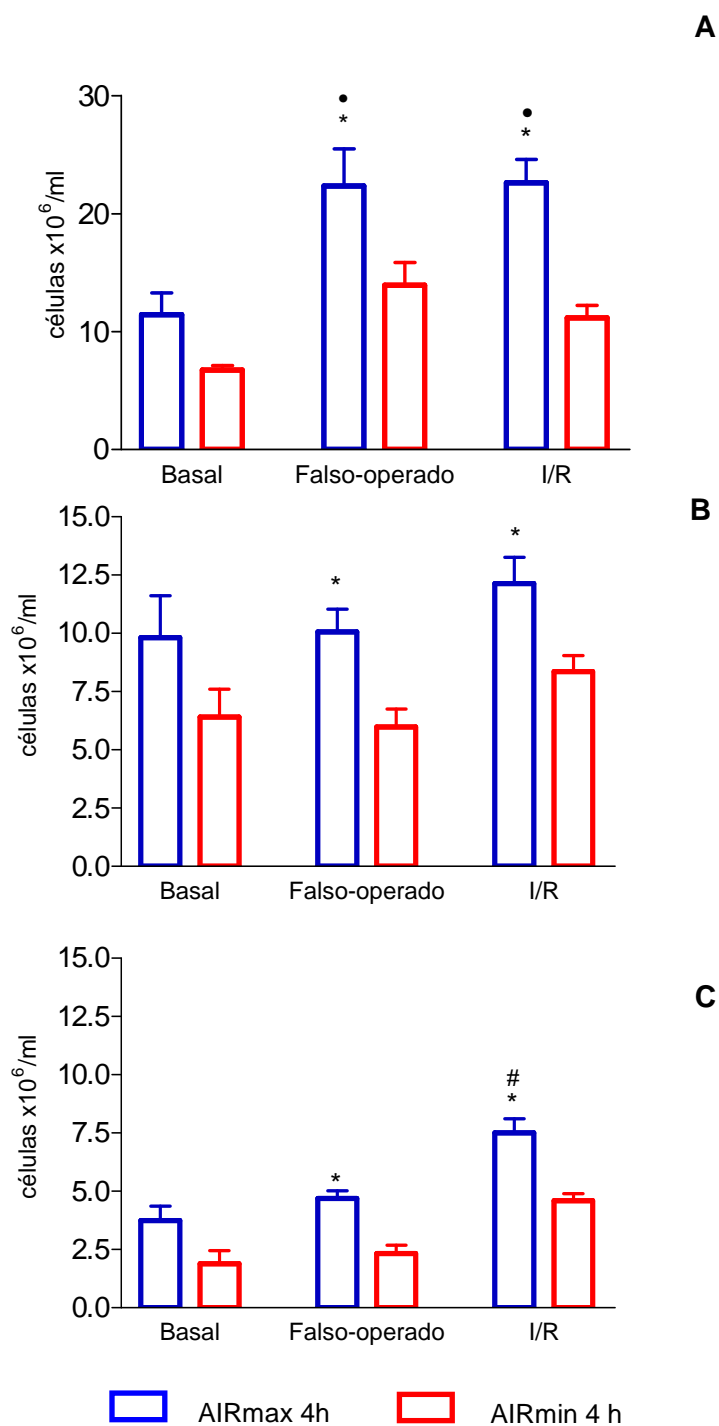
### 4.3 Caracterização dos leucócitos circulantes e da medula óssea após 4 horas de I/R

#### 4.3.1 *Análise morfológica das populações leucocitárias e hemácias da medula óssea e sangue periférico*

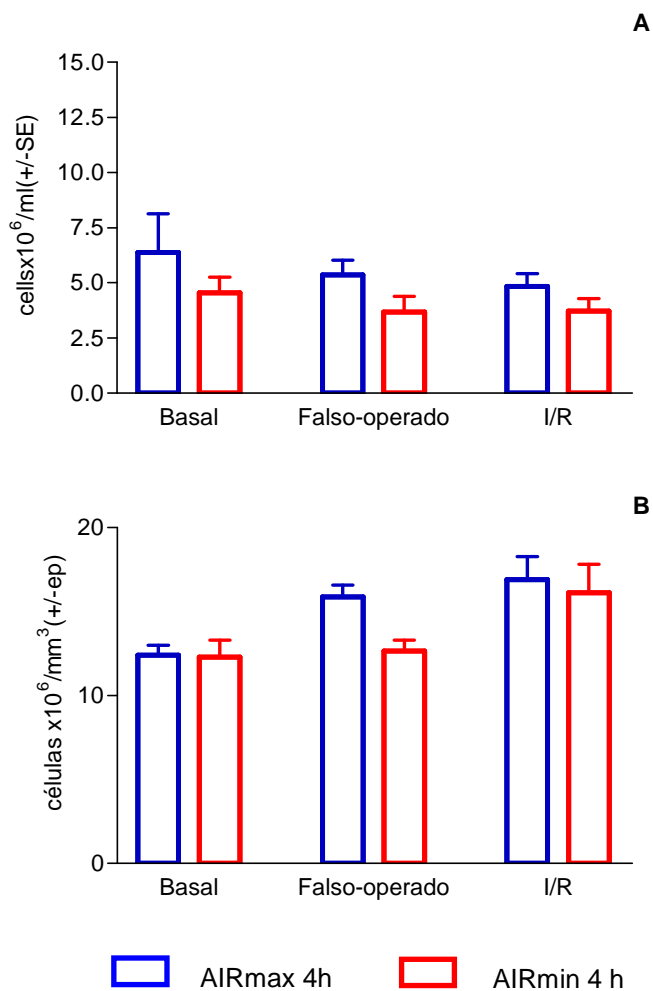
Sabendo que há uma maior resposta no pulmão dos camundongos AIRmax frente a injúria proporcionada pela I/R, observada pelo recrutamento de neutrófilos, analisamos a circulação periférica e a medula óssea. Nosso objetivo neste momento foi o de avaliar o reflexo da injúria proporcionada pela I/R no número células da medula óssea e circulação.

Após 4 horas do início da reperfusão verificamos um aumento significativo no número total de leucócitos na medula óssea nos camundongos AIRmax submetidos à I/R e falso operados. O mesmo efeito não foi observado nos camundongos da linhagem AIRmin. A ativação da medula óssea dada pelo estímulo da I/R nos camundongos AIRmax refletiu no aumento do número de células totais da circulação, sendo a neutrofílica a população que mais sofreu alteração (**Figura 13C**).

Com relação aos outros tipos celulares, não foi observada, entre AIRmax e AIRmin, diferença significativa no número de linfócitos, monócitos ou hemácias nos três grupos analisados: I/R, falso operados ou basal (**Figura 14A**). Por outro lado observou-se um aumento significativo do número de hemácias nos camundongos AIRmax I/R com relação aos basais, provavelmente devido ao estímulo geral da medula óssea (**Figura 14B**).



**Figura 13.** Avaliação dos leucócitos totais da medula óssea (A), sangue total (B) e neutrófilos do sangue (C) nas linhagens AIRmax e AIRmin após 4 horas de reperusão. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão do número de células por mL de 6 animais por grupo \*diferença entre AIRmax e AIRmin, # diferença entre IR e controles, • com relação ao grupo basal,  $p < 0,05$ .



**Figura 14.** Número absoluto de células mononucleares (**A**) e de hemácias (**B**) presentes no sangue periférico dos camundongos AIRmax e AIRmin submetidos a I/R, nos controles falso-operados e nos basais. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão do número de células por mL de 6 animais por grupo.

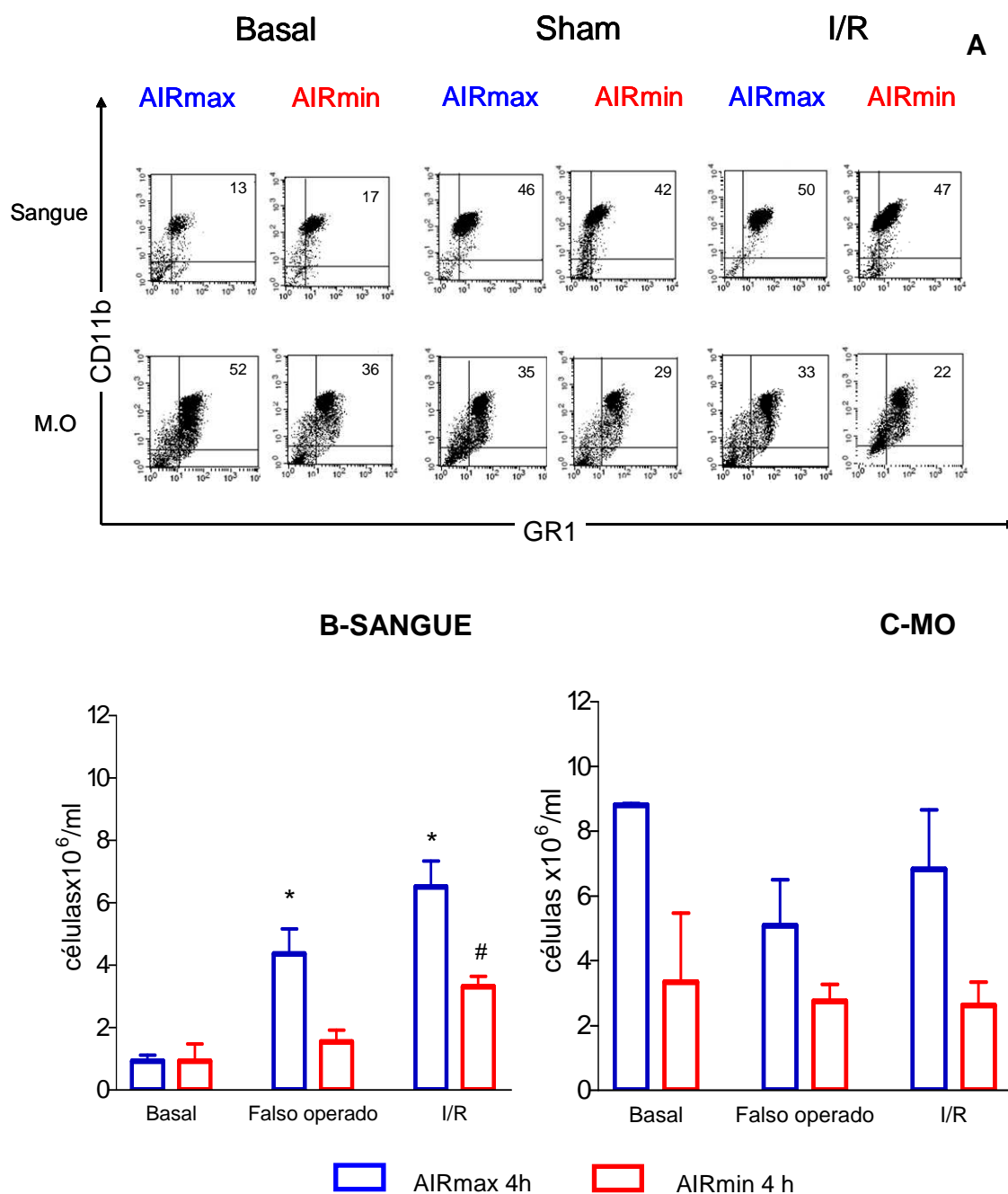


---

#### **4.3.2 Identificação das populações celulares por citometria de fluxo por meio da dupla marcação GR1/CD11b na medula óssea e circulação**

A análise citométrica foi realizada em células da medula óssea e circulação por meio da marcação com anticorpos dirigidos contra as moléculas Ly-6G (GR1), CD11b. Os citogramas representativos das células da circulação e da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin estão representados na **figura 15A**. As células duplamente marcadas estão localizadas no quadrante superior direito e representam basicamente os mielócitos e células diferenciadas em polimorfonucleares cujo fenótipo é GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> (LAGASSE, 1996). Os valores absolutos, calculados a partir das porcentagens, demonstraram o efeito da I/R sobre o número de células circulantes e da medula óssea nos diferentes grupos de AIRmax e AIRmin.

Camundongos AIRmax dos grupos I/R e falso-operados apresentaram, na circulação, número de células superior aos respectivos grupos da linhagem AIRmin (**Figura 15B**). Na medula óssea não foram observadas diferenças significantes em ambas as linhagens referentes à dupla marcação GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> (**Figura 15C**). Estes dados determinados por citometria de fluxo confirmaram aqueles obtidos pela contagem e caracterização morfológica em preparações histológicas das várias suspensões celulares (**Figura 13**).



**Figura 15.** Citogramas representativos das células da circulação e medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin submetidos a I/R intestinal e controles falso operado e basal (os números nos quadrante representam a porcentagem da população duplo-positiva) (A). Número absoluto de células GR1+/CD11b+ da circulação (B) medula óssea (C) dos três grupos analisados. Os resultados estão expressos como média do número absoluto de células  $\pm$  erro padrão. \*diferença entre AIRmax e AIR min, # intralinhagem,  $p < 0,05$ . Resultados representativos de 3 animais para cada grupo. O fenótipo celular foi definido por marcação com os anticorpos GR1 e CD11b.

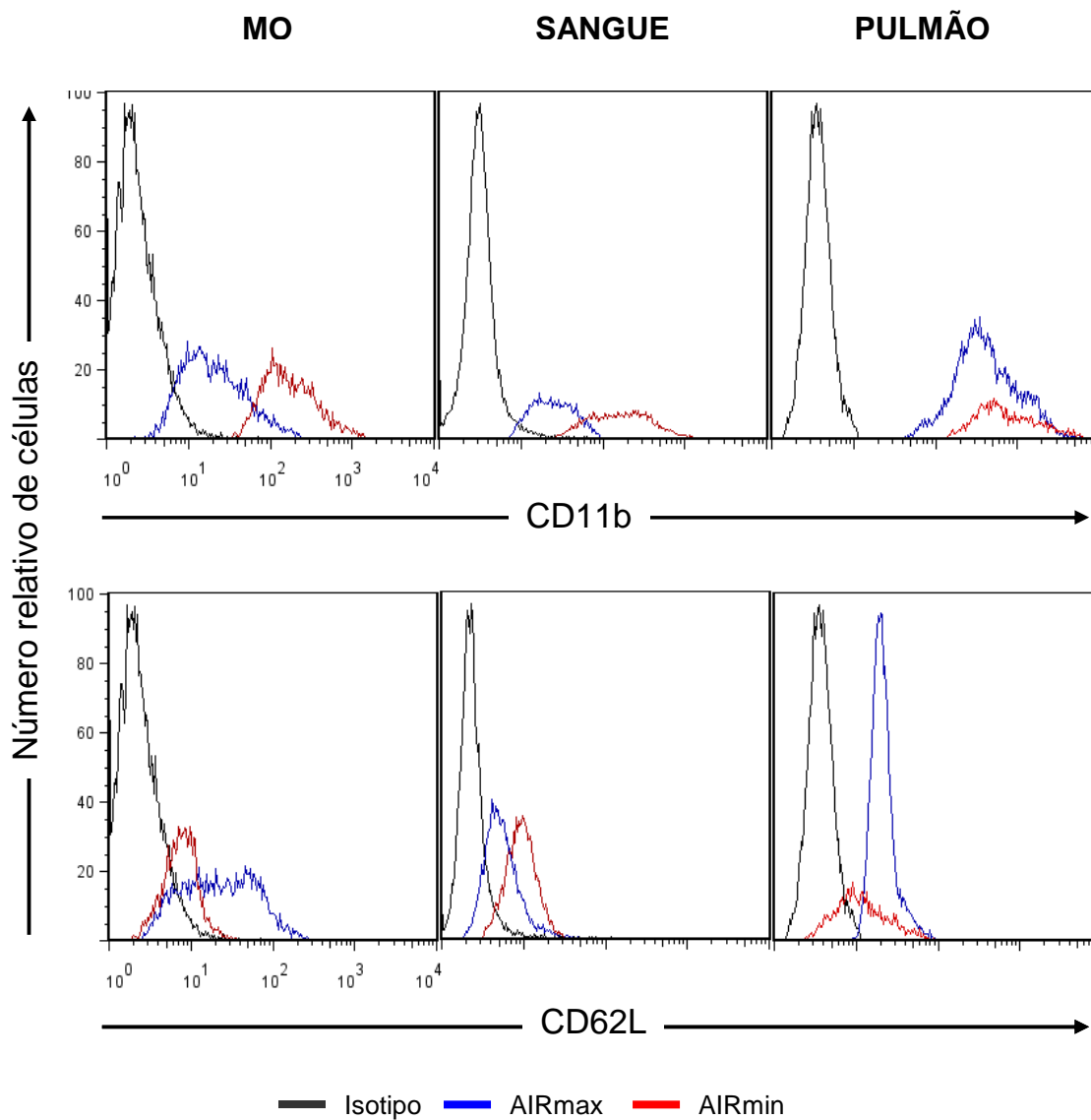
---

#### 4.4. Avaliação da expressão de moléculas de adesão do tipo L-Selectina (CD62L) e $\beta$ -integrina (CD11b) nas células da medula óssea, sangue e parênquima pulmonar

Para avaliar a razão do maior infiltrado celular no pulmão de AIRmax após 4 horas de I/R analisamos, comparativamente nas duas linhagens, a expressão de moléculas de adesão sobre os leucócitos a partir da medula óssea. Assim foi verificada a expressão de L-Selectina (CD62L) e  $\beta$ -Integrina (CD11b), por meio de anticorpos específicos, nos três compartimentos, medula óssea, sangue e parênquima pulmonar.

**Na figura 16**, observamos a expressão das moléculas de adesão CD11b e CD62L nas células da medula óssea, sangue periférico e parênquima pulmonar, completando o caminho destas durante estímulo inflamatório de isquemia e reperfusão. Estas células, oriunda dos três compartimentos, foram duplamente marcadas com anticorpos anti-GR1/CD11b e anti-GR1/CD62L. A análise da expressão da molécula CD11b, em células GR1<sup>+</sup>, demonstrou, primeiramente, que esta molécula tem sua expressão aumentada à medida que migra para o pulmão. Comparando as duas linhagens de camundongos, verificamos que a expressão de CD11b nos AIRmax foi menor do que o observado nos AIRmin, tanto na medula óssea como sangue periférico. Por outro lado, no parênquima pulmonar, a expressão desta molécula foi semelhante em ambas as linhagens, embora os animais AIRmax apresentem um número muito maior de células GR1<sup>+</sup> expressando CD11b.

A expressão da molécula CD62L, também nas células GR1<sup>+</sup>, foi, na maioria das vezes (medula óssea e pulmão), superior nas células migrantes dos camundongos AIRmax. Aparentemente não houve, como para a molécula CD11b, aumento progressivo de expressão nas células migrantes (**Figura 16**).



**Figura 16.** Histograma representativo da expressão das moléculas de adesão CD11b e CD62L nas células da medula óssea, do sangue periférico e do parênquima pulmonar dos camundongos isquêmicos.

---

#### 4.5 Análise de sobrevida dos camundongos AIRmax e AIRmin após indução de Isquemia intestinal seguida da Reperfusão

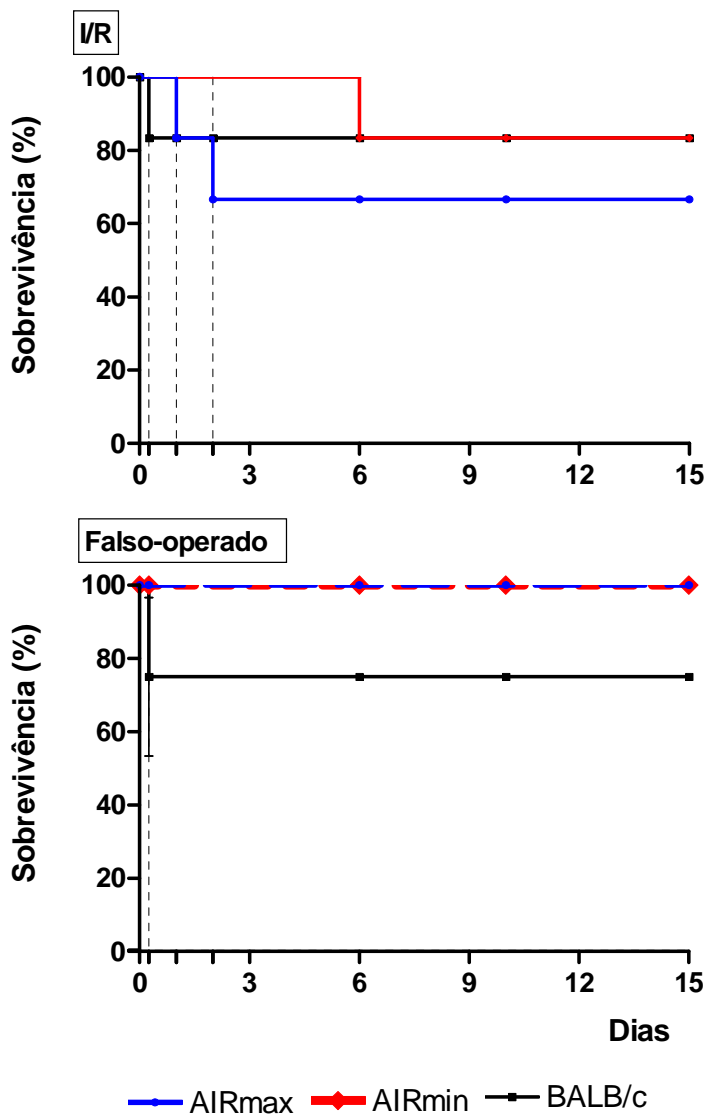
Camundongos AIRmax e AIRmin foram submetidos a isquemia por 45 minutos e após esse período foram tratados por via intra-muscular com 30µl de antibiótico. Para restabelecer o equilíbrio hídrico, foi injetado 1mL de salina estéril por via subcutânea em todos os grupos.

O objetivo do tratamento com o antibiótico foi o de evitar a morte por infecção, o que poderia influenciar nos resultados de sensibilidade ao processo de I/R ou da laparotomia. Seis camundongos submetidos a I/R e quatro falso-operados de cada linhagem, foram observados durante 15 dias após a reperfusão. Como linhagem de referência, utilizamos animais machos BALB/c por ser uma linhagem sensível a infecções.

Na **figura 17** estão representados os resultados de sobrevida dos animais AIRmax, AIRmin e BALB/c após I/R intestinal e falso operados. Verificamos que os animais AIRmin apresentaram 100% de sobrevivência até o sexto dia, passando para 83%. Aproximadamente 33% dos animais AIRmax morreram entre 24 e 48 horas, já 17% dos camundongos BALB/c morreram entre 6 e 12 horas.

Os camundongos falso-operados AIRmax e AIRmin apresentaram 100% de sobrevivência enquanto que os BALB/c apresentaram 87% de sobrevivência decorrente de 1 morte nas primeiras 6 horas da cirurgia.

Se considerarmos que as mortes ocorridas nas primeiras horas pós-cirurgia sejam decorrentes do trauma cirúrgico podemos concluir que os animais AIRmax apresentaram uma sensibilidade ligeiramente superior aos AIRmin e BALB/c após o procedimento de I/R. O teste de qui-quadrado com  $p=0,8436$  não indicou diferença significativa de mortalidade entre as três linhagens analisadas.



**Figura 17.** Curvas de sobrevivência dos camundongos AIRmax, AIRmin e BALB/c submetidos a I/R (6 animais por linhagem) e falso operados (4 animais por linhagem). Os animais foram observados durante 15 dias após a cirurgia e a mortalidade foi registrada diariamente.

#### 4.6 Expressão Gênica por PCR em Tempo Real (Real Time PCR)

Para avaliar a expressão dos genes envolvidos durante as condições de hipóxia no pulmão provocada pelo procedimento de isquemia da artéria mesentérica e posterior reperfusão, foram obtidas amostras de RNAm do tecido pulmonar total de camundongos AIRmax e AIRmin. Seus respectivos cDNAs foram sintetizados para os ensaios de RT-PCR em tempo real. Os genes escolhidos para a realização dos ensaios de expressão foram: *Hif-1 $\alpha$* , *Vhl*, *Vegf $\alpha$* , *Arnt*, *Mpo*, *Tgf- $\beta$* , *Tnf- $\alpha$* , *Il-1*, *Il-6* e *Il-10*.

As **figuras 18, 19 e 20** representam os valores de variação de expressão gênica relativa em  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . As diferenças interlinhagens e intralinhagens encontradas foram resultados de ativação ou supressão gênica, com relação ao perfil do calibrador (AIRmin basal).

Ao avaliar os níveis de expressão de AIRmax e AIRmin nos vários grupos experimentais, observamos um aumento significativo da expressão do gene *Hif-1 $\alpha$*  nos pulmões dos animais AIRmax após 1 e 4 horas de reperfusão. No período de 4 horas após I/R, os animais AIRmax atingiram níveis superiores quando comparados aos valores de 1 hora e quando comparados aos camundongos AIRmin, os quais não apresentaram variação de expressão deste gene entre os grupos analisados (basal, falso operado e I/R), indicando uma baixa expressão desse gene nesta linhagem. No mesmo sentido, o gene supressor de tumor *Vhl*, que codifica a proteína Von Hippel-Lindal (VHL), apresentou uma expressão significativamente maior nos animais AIRmax IR com relação aos animais AIRmin e seus respectivos controles (**Figura 18**). Na mesma figura, observamos que a expressão do gene *Arnt* (ou *Hif-1 $\beta$* ) foi equivalente nas duas linhagens e em todas as situações experimentais.

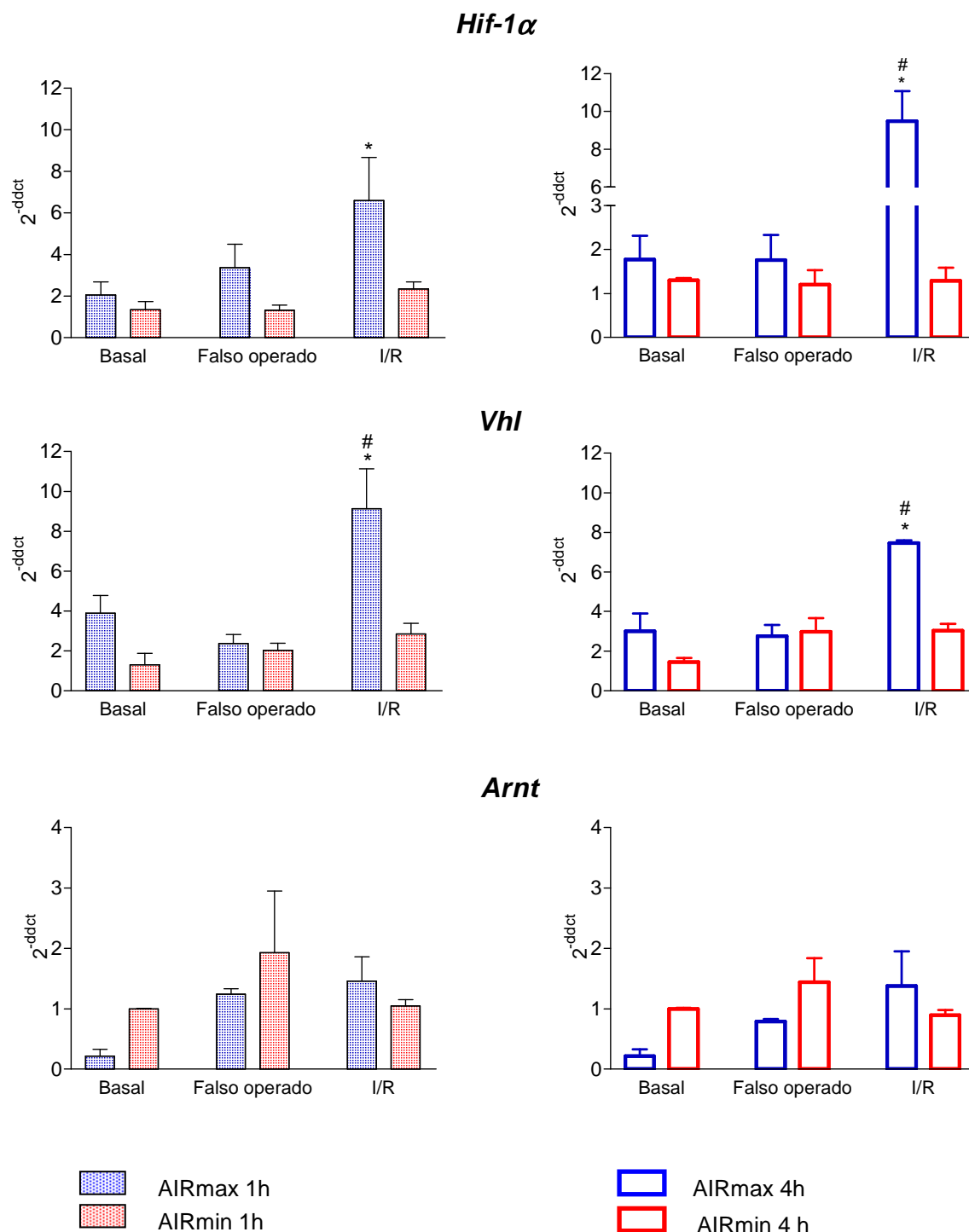
Na análise dos genes codificantes para as citocinas envolvidas na resposta inflamatória aguda: *Il-1 $\beta$* , *Il-6* observa-se uma maior expressão do RNAm nos animais AIRmax I/R quando comparados aos animais AIRmin e seus controles. Já a expressão da citocina multifuncional envolvida na proliferação e diferenciação celular *Tgf- $\beta$* , não sofreu variações significativas nos dois períodos analisados independente da conduta experimental (**Figura 19**)

Não foi detectada a expressão dos genes das citocinas *Il-10* e *Tnf- $\alpha$*  não

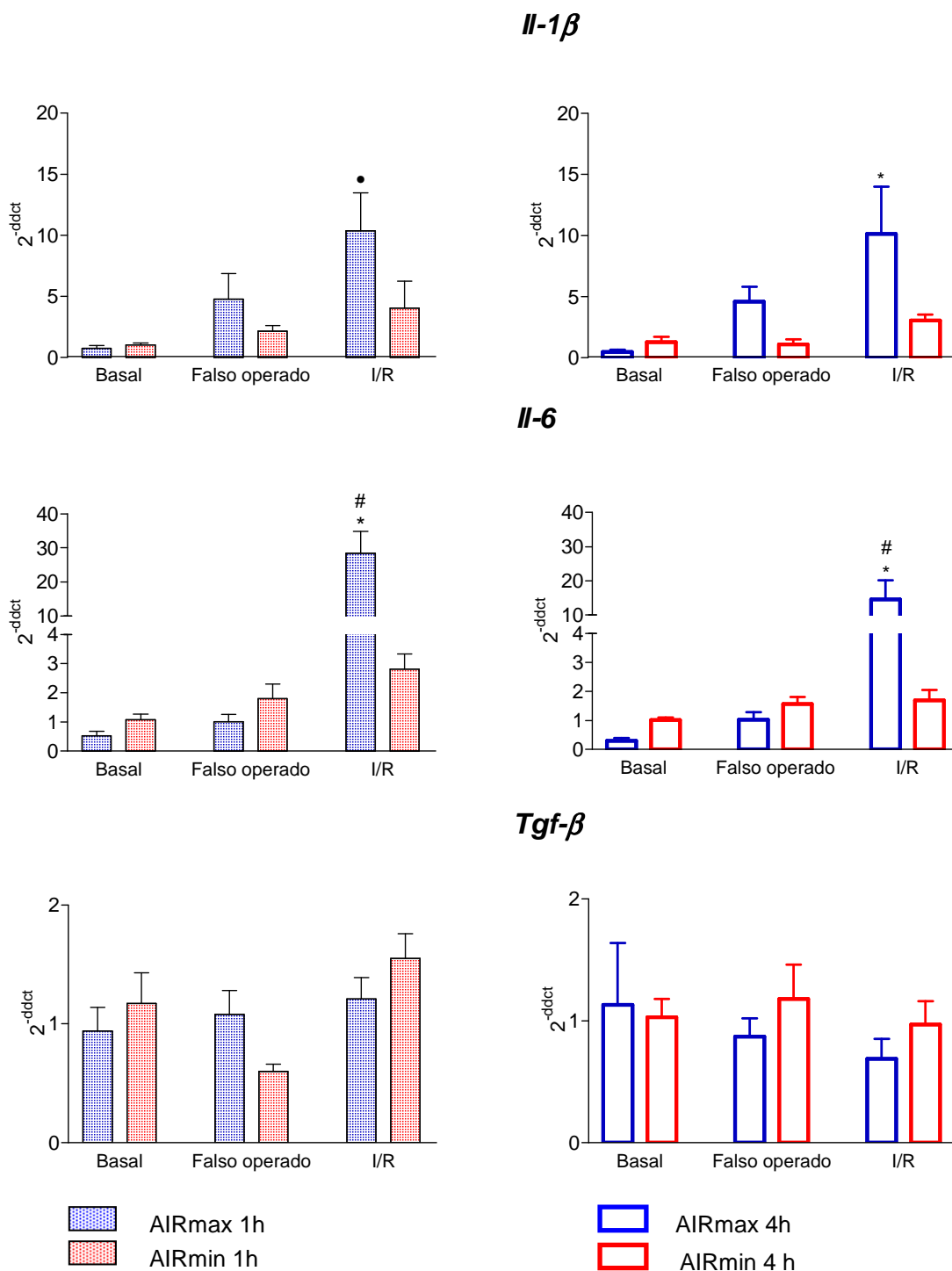
foram detectadas nos tempos de 1 e 4 horas após a reperfusão (dados não mostrados).

O gene *Vegf- $\alpha$*  apresentou-se altamente expresso, nos níveis do gene constitutivo, em ambas as linhagens e nos dois períodos avaliados. No entanto, este gene não apresentou, na sua expressão, diferenças significantes entre as linhagens AIRmax e AIRmin e seus respectivos controles. A *Mpo* apresentou valores de cT elevados o que corresponde a uma baixa expressão. No entanto, os animais AIRmax I/R apresentaram um aumento da expressão deste gene com relação à linhagem AIRmin e seus controles após 4 horas (**Figura 20**).

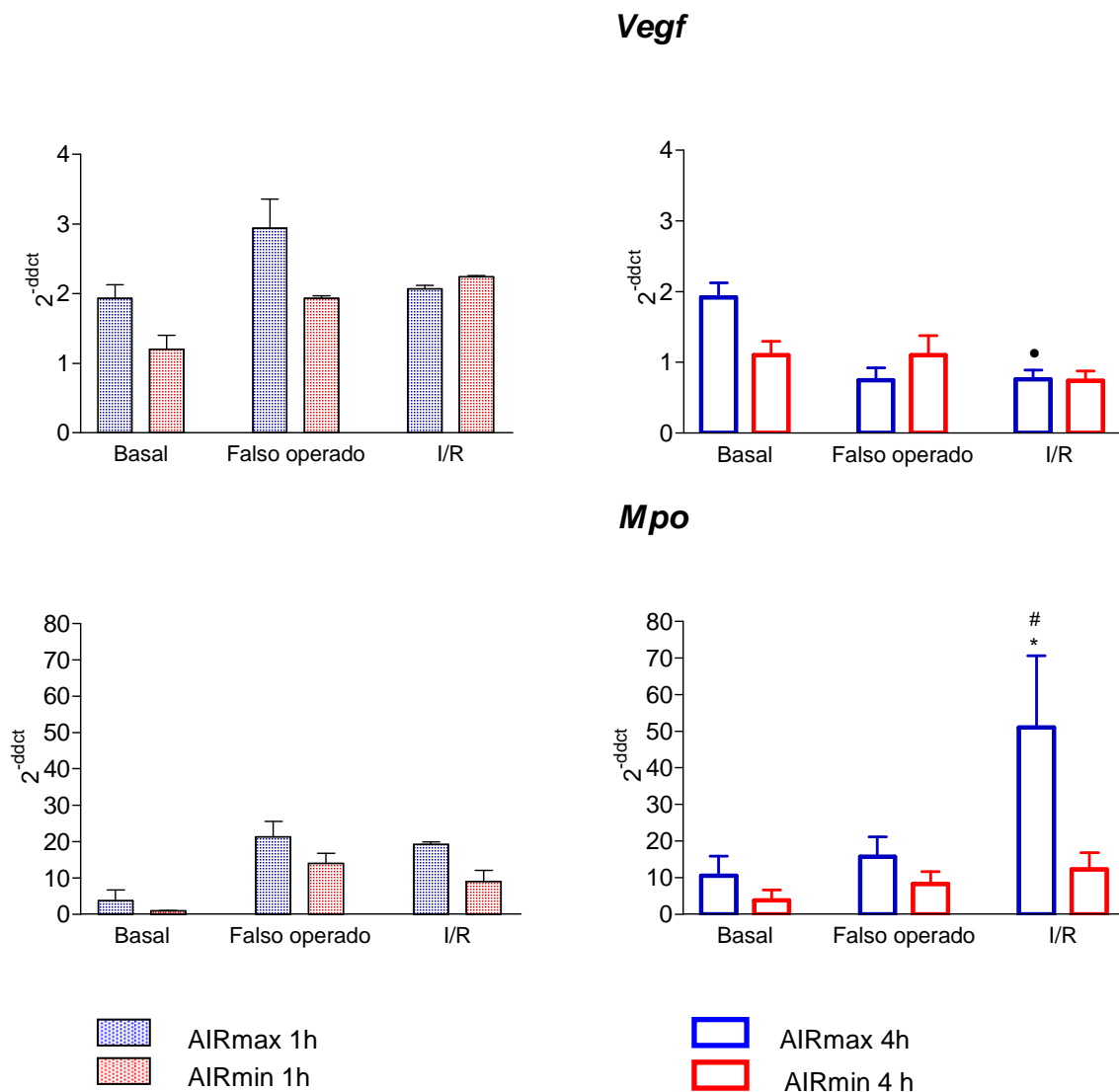




**Figura 18.** Expressão relativa dos genes *Hif-1 $\alpha$* , *Vhl*, *Arnt* a partir do RNAm obtido do pulmão de camundongos I/R, falso operados e basais após 1e 4 horas de reperusão. Os valores foram normalizados pela expressão do RNAm da  *$\beta 2$  microglobulina* e calibrados contra animais AIRmin basais. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão de grupos de 5 animais. \*diferença entre AIRmax e AIR min, # diferença entre I/R e seus controles.  $p < 0,05$ .



**Figura 19.** Expressão relativa dos genes *Il-1 $\beta$* , *Il-6* e *Tgf- $\beta$*  a partir do RNAm obtido do pulmão de camundongos I/R, falso operados e basais após 1e 4 horas de reperusão. Os valores foram normalizados pela expressão do RNAm da  $\beta 2$  *microglobulina* e calibrados contra animais AIRmin basais. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão de grupos de 5 animais. \*diferença entre AIRmax e AIRmin, # diferença entre I/R e seus controles, \* Diferença com relação ao basal.  $p < 0,05$ .



**Figura 20.** Expressão relativa dos genes *Vegf-α* e *Mpo* a partir do RNAm obtido do pulmão de camundongos I/R, falso operados e basais após 1e 4 horas de reperusão. Os valores foram normalizados pela expressão do RNAm da *β2 microglobulina* e calibrados contra animais AIRmin basais. Valores expressos como média ± erro padrão de grupos de 5 animais. \*diferença entre AIRmax e AIRmin, # diferença entre I/R e seus controles, \*diferença com relação ao grupo basal,  $p < 0,05$ .

Discussão

---

## 5 DISCUSSÃO

A inflamação é um evento temporalmente organizado e regulado. O controle do processo inflamatório decorre de um fluxo de informação no qual o organismo necessita detectar se determinado estímulo se associa a injúria, infecção ou a ambos. A proteção do organismo contra injúrias teciduais e infecções é essencial para manter o equilíbrio homeostático do organismo. Portanto compreender os fatores que regulam o aparecimento, manutenção e resolução da inflamação é fundamental para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas eficazes (WALMSLEY *et al.*, 2005).

Estudos em camundongos geneticamente selecionados para a resposta inflamatória aguda vêm demonstrando a participação de uma variedade de genes no seu controle. Experimentos realizados em nosso laboratório evidenciaram polimorfismo entre as linhagens em alguns genes envolvidos na inflamação que modulam algumas características fenotípicas que distinguem AIRmax e AIRmin assim como, a ativação de células da medula óssea e a susceptibilidade a infecções e a processos de carcinogênese na pele, nos pulmões e no intestino (ARAÚJO, *et al.*, 1998; RIBEIRO, *et al.*, 2003; MARIA, *et al.*, 2003; SIQUEIRA, 2009; DE SOUZA, *et al.*, 2009).

Considerando que o controle genético da resposta inflamatória participa da regulação de outros fenótipos em vários órgãos, avaliamos neste trabalho o perfil da inflamação desenvolvida no pulmão em resposta a condições de hipóxia. Para tanto, utilizamos o modelo de isquemia e reperfusão intestinal que consiste em obstrução da artéria mesentérica por 45 minutos e posterior reperfusão. Segundo alguns autores, o processo de isquemia e reperfusão intestinal (I/R) está associado a várias situações clínicas, desde condições cirúrgicas a choques sépticos (ZHAO, *et al.*, 2002; YANG, *et al.*, 2007).

Neste contexto e considerando que as linhagens, AIRmax e AIRmin, apresentam diferenças significativas na sensibilidade a uma variedade de patógenos (ARAÚJO, *et al.*, 1998), verificamos, durante um período prolongado pós-reperfusão, a sobrevivência destes animais comparativamente à linhagem Balb/c de referência. Constatamos, neste experimento, que não houve diferença significativa entre as três linhagens avaliadas na sobrevivência após o procedimento de I/R. Com isso podemos

---

descartar que a inflamação sistêmica instalada seja decorrente de uma eventual septicemia provocada por translocação bacteriana ou por infecção durante a laparotomia, uma vez que nestas condições choques sépticos seria eminentes (WAGNER *et al.*, 2002; DE OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O processo de Isquemia e reperfusão intestinal está associado à inflamação sistêmica, podendo induzir injúria em vários órgãos. O pulmão é um dos importantes órgãos afetados, tornando-se bastante vulnerável aos efeitos das lesões inflamatórias sistêmicas por receber os mediadores inflamatórios liberados na circulação após o débito cardíaco. Camundongos AIRmax e AIRmin, submetidos à isquemia por 45 minutos e analisados após reperfusão de 1 ou 4 horas apresentaram um intenso infiltrado inflamatório no parênquima do pulmão em resposta a estas condições de injúria. Estudos recentes mostraram que a injúria induzida pela I/R intestinal é caracterizada pelo acúmulo predominante de neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular (YANG *et al.*, 2007).

O quadro de inflamação sistêmica foi observado em níveis diferentes nesses animais após o procedimento de I/R ou apenas pelo procedimento cirúrgico de laparotomia. A quantificação da reação inflamatória instalada no pulmão revelou um infiltrado inflamatório mais intenso no parênquima pulmonar dos camundongos AIRmax do que nos AIRmin. Estes resultados foram confirmados em experimentos de atividade da MPO pulmonar que também foi significativamente mais elevada nos AIRmax I/R. Esta medida de atividade da MPO é um procedimento amplamente utilizado para avaliar um infiltrado neutrofílico (CAVRIANI *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2007). Está descrita a existência de polimorfismo do gene da MPO em linhagens isogênicas de camundongos (HEARNE *et al.*, 1991). Esta genotipagem ainda não foi feita nas linhagens AIRmax e AIRmin, entretanto observamos atividade de MPO equivalente por células entre as duas linhagens, sugerindo que a existência de tal polimorfismo, não determinaria a diferença fenotípica entre AIRmax e AIRmin.

Diante do observado no tecido pulmonar dos camundongos AIRmax e AIRmin submetidos à I/R, analisamos as células do lavado bronco alveolar (LBA) para verificar uma eventual relação entre estas células e as infiltradas no tecido parenquimatoso pulmonar. Observamos um aumento significativo no número de células totais no LBA dos animais AIRmax I/R em relação aos AIRmin. Ao analisarmos a morfologia do infiltrado celular constatamos que se trata de

---

macrófagos vacuolizados e de células epiteliais.

A ativação dos macrófagos alveolares pode contribuir para a subsequente infiltração neutrofílica no pulmão (SHARMA *et al.*, 2007). Estes autores demonstraram o papel dos macrófagos e das células epiteliais na promoção da inflamação aguda no modelo de I/R experimental. Macrófagos ativados podem secretar fatores quimiotáticos proporcionando a migração de neutrófilos em procedimento *in vivo* de isquemia e reperfusão pulmonar. Duas fases de reação são descritas: uma que confere a ativação aguda de macrófagos alveolares e a segunda que promove o recrutamento e ativação dos neutrófilos. As citocinas pró-inflamatórias e as quimiocinas, tais como TNF- $\alpha$  (do inglês: Tumor Necrose Factor alpha), KC (Keratinocyte derived chemokine) e MIP-2 (do inglês: Macrophage Inducible Protein -2) são secretadas precocemente pelos macrófagos alveolares no início da reperfusão. Postula-se, portanto, que estes mediadores contribuem para a injúria no pulmão (KRISHNADASAN *et al.*, 2003; NAIDU *et al.*, 2003; SHARMA *et al.*, 2007).

Outros trabalhos, no mesmo sentido, detectaram a presença da anafilotoxina C5a no fluido do LBA (HUBER-LANG *et al.*, 2002). Camundongos Isogênicos C57BL/6 tratados com anticorpo contra o componente C5 apresentaram menor reação inflamatória no pulmão após isquemia intestinal (ZHAO *et al.*, 2002). Este componente do complemento, além de outros fatores, pode contribuir para a diferença de migração neutrofílica entre as linhagens AIRmax e AIRmin, uma vez que o C5a foi encontrado em maior quantidade no exsudato inflamatório produzido por biogel nos AIRmax, (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Entretanto, foi observado, em um estudo preliminar de indução de I/R em camundongos da sublinhagem AIRmax<sup>RR</sup> C5 deficiente (AMANO *et al.*, 2009), um significativo infiltrado inflamatório no pulmão, evidenciado pela atividade de mieloperoxidase neste órgão após 4 horas de reperfusão. Estes animais foram produzidos a partir da linhagem AIRmax com o intuito de estudar a participação do gene *Slc11a1* (*solute carrier family 11a1 member*) na regulação da resposta inflamatória aguda e o seu efeito na artrite induzida por pristane e na infecção por *Salmonella* TYPHIMURIUM. Por genotipagem assistida, foram produzidos camundongos homocigotos para os alelos R (resistência) e S (suscetibilidade) deste gene (BORREGO *et al.*, 2006; PETERS *et al.*, 2007). Os níveis de MPO dos animais

---

da sublinhagem AIRmax<sup>RR</sup> foram equivalentes aos níveis observados na linhagem AIRmax. Uma vez que esta sublinhagem é deficiente no componente do complemento C5, podemos sugerir que a presença deste componente pode ser significativa no recrutamento das células inflamatórias, mas não é determinante para este evento, já que estas linhagens são heterogêneas e apresentam um controle poligênico da reação inflamatória.

Em decorrência da intensa reatividade inflamatória observada nos camundongos AIRmax após I/R, o número de células da circulação e da medula óssea mostrou-se aumentado. Isto é um indicativo de uma ativação diferencial da medula óssea dos animais AIRmax. De fato, os camundongos AIRmax possuem uma capacidade de hematopoese maior do que os AIRmin após estímulo com biogel ou em situações controladas de cultura de células da medula óssea com reflexo na produção neutrofílica (RIBEIRO *et al.*, 2003; COSTA, 2008). Portanto, podemos inferir que a superioridade no número de células da medula óssea da linhagem AIRmax sobre AIRmin, pode ser um dos fatores que contribuem para a resposta inflamatória elevada da linhagem AIRmax após I/R.

Camundongos AIRmin I/R e AIRmax falso operados apresentaram quantidades semelhantes de neutrófilos no sangue, sugerindo que o estímulo proporcionado pela I/R na linhagem AIRmin equivale ao estímulo dado somente pela laparotomia.

A migração dos neutrófilos para o local da injúria observada em inflamações sistêmicas é dependente da regulação da expressão de moléculas de adesão. Estas moléculas são responsáveis pelo rolamento, adesão e diapedese das células inflamatórias. Em processos inflamatórios moléculas como CD11b (MAC-1), CD62L (L-selectina) são rapidamente moduladas nos leucócitos, propiciando a transmigração vascular (CONDLIFFE *et al.*, 1996).

Em nosso estudo, observamos um aumento da expressão de CD11b em células GR-1<sup>+</sup> no pulmão de ambas as linhagens com relação às células da medula óssea e do sangue, com níveis de expressão diferentes entre AIRmax e AIRmin na medula óssea e sangue periférico. Esta expressão diferenciada de CD11b entre as linhagens AIRmax e AIRmin foi alterada no parênquima pulmonar corroborando as observações de Ribeiro e colaboradores em 2003 e Carneiro e colaboradores em 2008, ao avaliar a expressão destas moléculas em sítios inflamatórios induzidos por



---

gel de poliacrilamida e por veneno de *Bothrops jararaca*, respectivamente (RIBEIRO *et al.*, 2003; CARNEIRO *et al.*, 2008).

A expressão da molécula CD62L no parênquima pulmonar dos animais AIRmax pode contribuir para a alta capacidade de migração celular destes animais, uma vez existe uma correlação de infiltrado e expressão desta molécula. Por outro lado, os animais AIRmin não apresentaram aumento de expressão de CD62L no decorrer do curso celular, fato este relacionado com o fenótipo inflamatório desta linhagem.

O aumento da expressão de moléculas de adesão é amplamente descrito em situações de isquemia e reperfusão. A queda dos níveis de ATP e posterior formação de radicais livres são responsáveis por promover uma cascata de eventos proporcionando a expressão destas moléculas (CARDEN e GRANGER, 2000; DE PERROT *et al.*, 2003; TANG *et al.*, 2008). Este fenômeno poderia estar ocorrendo mais acentuadamente nos animais AIRmax submetidos à isquemia.

Após traçar o perfil da inflamação no pulmão induzida pela I/R e verificar a divergência fenotípica entre essas duas linhagens na vigência da inflamação, analisamos a expressão dos genes operantes nesta situação adversa de oxigênio. Os genes estudados referem-se àqueles envolvidos nas situações de hipóxia, como *Hif-1 $\alpha$* , *Vhl*, *Vegf $\alpha$* , *Arnt*, *Mpo*, e aqueles codificantes para citocinas pró- e anti-inflamatórias, *Tgf- $\beta$* , *Tnf- $\alpha$* , *Il-1*, *Il-6* e *Il-10*.

Observamos um aumento dos níveis de expressão do *Hif-1 $\alpha$*  nos animais AIRmax e AIRmin I/R após 1 e 4 horas de reperfusão. Entretanto os animais AIRmax apresentaram um aumento significativo de expressão quando comparados com os AIRmin. Vale ressaltar que após 4 horas de reperfusão obtivemos uma maior divergência no índice de expressão deste gene entre as linhagens, chegando a aproximadamente 6 vezes a favor dos AIRmax. Este resultado está de acordo com o fenótipo observado no pulmão destes animais neste tempo de reperfusão.

Essa resposta é condizente com o perfil da linhagem AIRmax visto a sua potencialidade inflamatória e participação do gene em questão na retomada do equilíbrio da homeostase diante o estado de hipóxia. Segundo Borregaard & Herlin (1982), para manter a integridade do tecido é de importância vital que as células mielóides exerçam suas funções especializadas nas áreas onde o aporte de oxigênio e de nutrientes seja baixo. Um dos principais mediadores da adaptação

---

destas células às condições críticas de falta de oxigênio é o *Hif-1 $\alpha$*  (SEMENZA, 2001a; 2001b).

No mesmo sentido do *Hif-1 $\alpha$* , o gene *Vhl* apresentou-se mais expresso nos animais AIRmax I/R após 1 e 4 horas de reperfusão. A proteína VHL age como reguladora negativa da expressão da proteína HIF-1 $\alpha$ . Em condições de normóxia a estabilidade da proteína HIF-1 $\alpha$  diminui pela hidroxilação dependente de oxigênio proporcionando a associação da proteína VHL com o HIF-1 $\alpha$  e posterior degradação via proteassomo. Uma vez que uma expressão exacerbada e descontrola do *Hif-1 $\alpha$*  pode não ser viável para o animal proporcionando um descontrole da inflamação, a expressão do gene supressor de tumor *Vhl*, responsável pela degradação da proteína HIF é de suma importância para manter os níveis da proteína HIF viáveis para a sobrevivência destes camundongos (CRAMER *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004).

Outra proteína importante em situação adversa de oxigênio é a ARNT ou HIF-1 $\beta$ . Essa proteína dimeriza-se com o HIF-1 $\alpha$  ou com o receptor aryl de hidrocarbonetos (AhR), e inicia a transcrição de seus respectivos genes-alvo. O gene *Arnt* não demonstrou diferença de expressão entre os diversos grupos analisados nas linhagens AIRmax e AIRmin. Segundo alguns autores a subunidade HIF-1 $\beta$  (ARNT) é expressa constitutivamente no núcleo e sua atividade é controlada de forma oxigênio-independente, de modo que níveis de oxigênio podem afetar a estabilidade da proteína HIF-1 $\alpha$ , entretanto a subunidade ARNT não é afetada pela hipóxia, o que explicaria o observado após a reperfusão (STOCKMANN e FANDREY, 2006).

O gene *Vegf- $\alpha$*  foi bastante expresso em ambas as linhagens, entretanto foi observada uma repressão desse gene nos animais I/R e falso operados após 4 horas em relação aos animais basais. De fato, VEGF é uma das principais proteínas produzidas, pelas células progenitoras endoteliais em condições de hipóxia para iniciar o processo de neo-vascularização em resposta ao baixo aporte de oxigênio (SEMENZA, 2003). Nesse sentido era esperada uma expressão aumentada do gene *Vegf* nos animais submetidos a I/R.

Corroborando estes resultados, Mura e colaboradores (2006) ao investigar a resposta precoce do VEGF e seus receptores durante a inflamação aguda do pulmão em camundongos, observaram um aumento da expressão do gene *Vegf* nas

---

células obtidas do lavado bronco alveolar e uma diminuição nas células do pulmão dos animais isquêmicos. Os autores correlacionam positivamente os níveis de RNAm de *Vegf* encontrados no lavado bronco alveolar com a presença de macrófagos e negativamente com os neutrófilos presentes no parênquima pulmonar (MURA *et al.*, 2006).

O gene da *Mpo*, embora tenha valores de cT altos, indicando baixa expressão, apresentou diferenças significantes de expressão entre os animais AIRmax AIRmin submetidos à I/R. Foi observado também uma repressão deste gene no grupo basal de ambas as linhagens, o que era esperado. A baixa expressão de *Mpo* pode ser explicada pelo fato de que este gene seja expresso nos estágios iniciais da diferenciação mielóide, sendo negativamente regulado após ultrapassarem o estágio promielocítico de diferenciação neutrofílica. Neste estágio, a proteína fica armazenada nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e liberadas em situação adversas. De fato, ao analisar as células extraídas do pulmão por colagenase, observamos um grande número de granulócitos indiferenciados, com morfologia de metamielócitos. Estas células indiferenciadas, apesar de estarem regulando negativamente a expressão de MPO, podem ainda estar expressando este gene (BORREGARD, *et al.*, 2003).

A magnitude da inflamação sistêmica gerada em resposta à isquemia e reperfusão depende da ação sinérgica de uma série de mediadores inflamatórios, dentre eles citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos, fragmentos do complemento, neuropeptídeos e fatores de crescimento (PERROT *et al.*, 2003).

É interessante ressaltar que o microambiente inflamatório está estreitamente relacionado com o controle da regulação de HIF-1 $\alpha$ . Nesse sentido a expressão de mediadores inflamatórios pode favorecer a tradução e o acúmulo desta proteína (MC MAHON *et al.*, 2006; DEHNE e BRUNE, 2009).

As citocinas avaliadas por expressão gênica neste trabalho são secretadas principalmente por macrófagos. Estes, segundo autores, estão envolvidos na fase precoce após indução da I/R (PERROT *et al.*, 2003; SHARMA *et al.*, 2007). Neste contexto, citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ou IL-10 são secretadas precocemente pelos macrófagos alveolares na fase de isquemia (*cold ischemic time*- fase de hipotermia) e logo após a reperfusão.

Em nosso modelo de isquemia e reperfusão nós não conseguimos detectar a

---

expressão de *TNF- $\alpha$*  e IL-10 nos tempos analisados (1h e 4 h). Não está claro se diferentes estímulos podem agir nos macrófagos para induzir a produção de uma citocina reguladora como IL-10 ou efectoras como TNF e IL-1, IL-6 ou se os mesmos estímulos desencadeiam a produção de todas essas citocinas, mas em cinéticas diferentes (SHARMA *et al.*, 2007).

O  $TNF\alpha$  é uma citocina pró inflamatória que tem como função estimular as células do endotélio vascular a expressarem moléculas de adesão. Estimulam também, os macrófagos a secretarem quimiocinas que acentuam a afinidade das integrinas leucocitárias por seus ligantes e induzem a quimiotaxia de leucócitos. A citocina anti-inflamatória IL-10 inibe macrófagos e células dendríticas ativadas, é produzida principalmente por macrófagos ativados atuando como regulador de *feedback* negativo para estas células (PERROT *et al.*, 2003; SHARMA *et al.*, 2007).

Camundongos AIRmax submetidos a I/R apresentaram níveis de mRNA das citocinas *Il-1 $\beta$*  e *Il-6* elevados quando comparados as animais AIRmin mensurados após a indução de isquemia e reperfusão. Um resultado semelhante a este foi observado nestas linhagens após indução da resposta inflamatória local por injeção intramuscular do veneno de *Bothrops jararaca* (CARNEIRO *et al.*, 2008). Contudo podemos sugerir que a elevada expressão destas duas citocinas contribuiu para o perfil inflamatório observado nesta linhagem.

Os efeitos biológicos da IL-1 $\beta$  são semelhantes ao do TNF. Produzida principalmente por fagócitos mononucleares, a IL-1 $\beta$  pode ser sintetizada por outras células como, neutrófilos, células epiteliais e endoteliais. A IL-6 também é sintetizada por fagócitos mononucleares além de células do endotélio vascular, e outras células em resposta a microorganismos e a outras citocinas especialmente IL-1 e TNF.

O fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) é produzido por células inflamatórias como neutrófilos, eosinófilos e células estruturais como as células epiteliais e fibroblastos. Considerado um importante fator fibrinogênico o TGF-  $\beta$  pode funcionar como outras citocinas pró ou anti- inflamatórias (JIANG *et al.*; 2007).

Segundo Ambalavanan e colaboradores em 2008 a condição de hipóxia gera um sinal inicial para expressão de *Tgf- $\beta$* . Estudos recentes em progressão de tumor apontam para a contribuição do TGF-  $\beta$  para o acúmulo de HIF-1 $\alpha$  em condições de normóxia. Foi demonstrado que TGF- $\beta$ 1 atenua a proli hidroxilação do HIF no domínio de degradação (ODDD) e como conseqüência ocorre um acúmulo do HIF-

1 $\alpha$  no citoplasma (MCMAHON *et al.*, 2006; AMBALAVANAN, 2008). Em nosso modelo nós não observamos diferenças significantes nos níveis de mRNA do gene TGF-  $\beta$  entre as linhagens AIRmax e AIRmin e os seus respectivos controles nos tempos avaliados.

Em nosso estudo, avaliamos o perfil celular e a expressão dos genes envolvidos no processo inflamatório no pulmão induzidos pela isquemia e reperfusão da artéria mesentérica. Observamos uma expressão diferencial dos genes envolvidos em condições adversas de oxigênio como também a expressão de genes codificadores de mediadores inflamatórios que determinam a resposta inflamatória nas linhagens AIRmax e AIRmin. Foi observada uma correlação positiva entre a capacidade inflamatória destas linhagens e os genes envolvidos em hipóxia. Com isso, podemos sugerir que os genes responsáveis pela regulação da reatividade inflamatória interfiram ou modulem as reações ou a expressão de genes envolvidos em situações de hipóxia neste modelo experimental. Em vista destes resultados, podemos considerar estas linhagens como sendo um modelo para o estudo genético ou funcional dos mecanismos reguladores na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo.

Conclusões

---

---

## 6 CONCLUSÕES

O procedimento de isquemia e reperfusão intestinal induziu uma resposta inflamatória aguda no parênquima pulmonar com maior intensidade nos camundongos AIRmax do que nos AIRmin, caracterizada por um maciço infiltrado neutrofílico e alteração da arquitetura normal dos pulmões.

A maior capacidade dos camundongos AIRmax em produzir alta reatividade inflamatória no pulmão, pode ser decorrente, ao menos parcialmente, de uma maior capacidade da medula óssea em produzir neutrófilos após injúria.

Altos níveis de expressão dos genes envolvidos em situações de hipóxia *Hif-1 $\alpha$* , *Vhl* e os genes codificadores das citocinas pró inflamatórias *Il-1 $\beta$*  and *Il-6* mostraram-se relacionados com a alta resposta inflamatória aguda nos camundongos AIRmax após a indução de I/R.

A diferença de inflamação observada entre as linhagens AIRmax e AIRmin após indução da I/R está de acordo com o fenótipo de seleção, indicando compartilhamento de genes reguladores destes dois fenômenos inflamatórios ou da co-segregação de diferentes genes.

## Referências

---



## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, D. K.; KAVANAUGH, A. F. Cell adhesion molecules in allergic disease. In: Towley, R.G.; Agrawal, D. K. **Immunopharmacol. Allergic Dis.**, v. 1, p.99-118,1996.

AMANO, M.T.; CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O.G.; CABRERA, W. K.; DE FRANCO, M.; IBÁÑEZ, O.M.; ISAAC, L.; STAROBINAS,N. A new modelo f outbred genetically selected mice which present a strong acute inflammatory response in the absence of complement C5. **Inflamm. Res.**, v. 58, p. 204-9, 2009.

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

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

BERNARD, G. R. Research in sepsis and acute respiratory distress syndrome: are we changing course? **Crit. Care Med.**, v. 27, p. 434-6, 1999.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAUJO, L. M.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. K.; SANT'ANNA, O. A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBÁÑEZ, O .M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v.19, p. 37-246, 1998.

BORREGAARD, N.; HERLIN, T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. **J. Clin. Invest.**, v. 70, p. 550-7, 1982.

BORREGO, A.; PETERS, L. C.; JENSEN, J. R; RIBEIRO,O. G.; CABRERA, W. H. K.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBÁÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate Scl11a1 gene(Formerly Nramp1) effects in selected mouse line. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 2766-2771, 2006.

---

CAMPOS, A.R. **Inflamação alérgica no pulmão e no tecido subcutâneo em camundongos selecionados a reatividade inflamatória aguda.** Dissertação (Mestrado) - Departamento de Imunologia Instituto de Ciências Biomédicas, Universidades de São Paulo, São Paulo, 2001.

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

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

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H. K.; VORRARO, F.; DE FRANCO, M.; IBAÑEZ, O. M.; STAROBINAS, N. Bothrops jararaca venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. **Toxicon**, v. 52, p.619-27, 2008.

CARROLL, V.A.; ASHCROFT, M. Targeting the molecular basis for tumor hypoxia. **Expert Rev. Mol. Med.**, v. 7, p. 1-16, 2005.

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

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

COSTA, L. L. M. A. **Mielopoesse em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda.** Dissertação (Mestrado) - Departamento de Imunologia Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

---

v. 315, n.11, p.1791-7, 2009.

DE OLIVEIRA, M. A.; LEMOS, D. S.; DINIZ, S. O.; COELHO, J. V.; CARDOSO, V. N. Prevention of bacterial translocation using glutamine: a new strategy of investigation **Nutrition**, v.4, p. 419-24, 2006.

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

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

FONTES, B. **Isquemia/reperfusão intestinal-sequestro pulmonar e hepático do neutrófilo ativado**. 54 p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

GALHARDO F. L. P; MARTINEZ J. A. B. Síndrome do desconforto respiratório agudo. **Med.**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 248-256, 2003.

GRISHAM, M. B.; HERNANDEZ, L. A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. 567-74, 1986.

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

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

HEARNE, C. M.; MCALEER, M. A.; LOVE, J. M.; AITMAN, T. J.; CORNALL, R. J.; GHOSH, S.; KNIGHT, A. M.; PRINS, J. B.; TODD, J. A. Additional microsatellite markers for mouse genome mapping. **Mamm. Genome**, v.1, p. 273-82. 1991.

HELLWING-BURGEL, T.; STIEHL, D. P.; WAGNER, A. E.; METZEN, E.; JELKMANN, W. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 25, n. 6, p. 297-310,

---

2005.

HUBER-LANG, M.; YOUNKIN, E. M.; SARMA, J. V.; RIEDEMANN, N.; MCGUIRE, S. R.; LU K .T; KUNKEL, R.; YOUNGER, G.; ZETOUNE, F. S.; WARD, P. A. Generation of C5a by phagocytic cells. **Am. J. Pathol.**, v. 161, p. 1849-1859, 2002.

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

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

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

JANUSZ, M. J; DOHERTY, N. S. Degradation of cartilage matrix proteoglycan by human minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 2555-2563, 1992.

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

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

KOIKE, K.; MOORE, E. E.; MOORE, F. A.; CARL, V. S.; PITMAN, J. M.; BANERJEE, A. Phospholipase A2 Inhibition decouples lung injury from gut ischemia-reperfusion. **Surgery**, v.112. p.173-180, 1992.

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

---

LAGASSE, E.; WAISSMAN, I. L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. **J. Immunol. Methods**, v.197, p. 139-150, 1996.

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

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

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

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

MARIA, D. A.; RIBEIRO, O. G.; PIZZOCARO, K. F.; DE FRANDO, M.; CABRERA, W. H. K.; STAROBINAS, N.; GALLOIS, V.; SIQUEIRA, M.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M. Resistance to melanoma metastases in mice selected for high acute inflammatory response. **Carcinogenesis**, v. 22, n.2, p. 337-342, 2001.

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

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

MCMAHON, S.; CHARBONNEAU, M.; GRANDMONT, S.; RICHARD, D. E.; DUBOIS, C. M. Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces Hypoxia-inducible Factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. **J. Biological Chemistry**, v. 281, n. 34, p. 24171-24181, 2006.

MINAMIYA, Y.; MOTOYAMA, S.; KITAMURA, M.; SAITO, S.; TERADA, K.; OGAWA, J. The requirement of intercellular adhesion molecule-1 for neutrophil respiratory burst in the pulmonary circulation of rats infused with endotoxin. **Am. J. Respir. Crit.**

---

Care Med., v. 158, n.2, p. 635-42, 1998.

**MOUSE GENOMIC INFORMATICS.** Disponível em:  
<<http://www.informatics.jax.org>>. Acesso em: 22 out. 2008.

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

NAIDU, B. V.; KRISHNADASAN, B.; FARIVA, R A. S.; WOOLLEY, S. M.; THOMAS, R.; VAN ROOIJEN, N.; VERRIER, E. D.; MULLIGAN, M. S. Early activation of the alveolar macrophage is critical to the development of lung ischemia-reperfusion injury. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 126, n.1, p.200-207, 2003.

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

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

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

PETERS, L. C.; JENSEN, J. R; BORREGO, A.; CABRERA, W. H. K.; BAKER, N.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO, O. G.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO ,M. Slc11a1 (Formerly NRAMP1) gene modulates both acute inflammatory reactions and pristane-induced arthritis in mice. **Genes Immun.**, v. 8, p. 51-56, 2007.

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

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

---

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

RAMOS, A. T.; GONÇALVES, L. R. C.; RIBEIRO, O. G.; ROCHA CAMPOS, A. C.; SANT'ANNA, O. A.; Effects of *Lanomia oblique* (lepidoptera, saturniidae) toxin on clotting, inflammatory and antibody responsiveness in genetically selected line of mice. **Toxicon**, v. 43, p. 761-768, 2004.

REIGNIER, J.; SELLA, H.; LEMOINE, R.; LUBINEAU, A.; MAZMANIAN, G. M.; DETRUI, H.; CHAPELIER, A.; HERVÉ, P. Prevention of ischemia-reperfusion lung injury by sulfated Lewis(a) pentasaccharide. **J. Appl. Physiol.**, v. 82, n. 4, p.1058-1063, 1997.

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

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

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

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PERALTA, C.; ROSELLO-CATAFAU, J.; PALMEIRA, C. M. Prevention of I/R injury in fatty livers by ischemic preconditioning is associated with increased mitochondrial tolerance: the key role of ATPsynthase and mitochondrial permeability transition. **Transpl. Int.**, v. 22, n. 11, p.1081-1090, 2009.

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

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

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor-1: oxygen homeostasis and disease

---

pathophysiology. **Trends Mol. Med.**, v. 7, p. 345-350, 2001b.

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

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

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

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

SHERIDAN, M.; DONNELLY, M.; BAILIE, R.; POWER, M.; SEIGNE, P.; AUSTIN, S.; MARSH, B.; MOTHERWAY, C.; SCULLY, M.; FAGAN, C.; BENSON, P.; MCAULEY, D.; TRINDER, J.; BATES, J.; BAILIE, K. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in Ireland: a prospective audit of epidemiology and management. **Crit. Care**, v. 12, n.1, p. 30, 2008.

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

SIMPSON, R.; ALON, R.; KOBZIK, L.; VALERI, R.; SHEPRO, D.; HETCHTMAN, H. B. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia. **Ann. Surg.**, v. 4; p. 444-53, 1993.

SOYDAN, G.; CEKIÇ, E. G.; TUNCER, M. Endothelial Dysfunction in the Mesenteric Artery and Disturbed Nonadrenergic Noncholinergic Relaxation of the Ileum due to Intestinal Ischemia-Reperfusion Can Be Prevented by Sildenafil. **Pharmacology**, v. 84, n. 2, p.61-67, 2009.

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



---

STOCKMANN, C.; FANDREY, J. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 33, n.10, p. 968-79; 2006.

VAN SOEREN, M. H.; DIEHL-JONES, W. L.; MAYKOT, R. J.; HADDARA, W. M. Pathophysiology and implications for treatment of acute respiratory distress syndrome. **AACN Clin. Issues**, v. 11, n.2, p. 179-197, 2000.

VASQUEZ- BRAVO, Y. A. **Aspectos da resposta inflamatória aguda em linhagens de camundongos com reatividade máxima e mínima obtidas por seleção bidirecional.** Tese (Doutorado) - Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

VEDDER, N. B.; WINN, R. K.; RICE, C. L.; CHI, E. Y.; ARFORS, K. E; HARLAN, J. M. A monoclonal antibody to the adherence-promoting leukocytes glycoprotein, CD18, reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits. **J. Clin. Invest.**, v. 81,p. 939-944, 1988.

VIGAR, N. D.; CABRERA, W. H. K.; ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; OGATA, T. R. P.; SIQUEIRA, M.; IBÁÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Pristane – induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. **Eur. J. immunol.**, v. 30, p. 431-437, 2000.

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

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

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

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

WIN, N.; MONTGOMERY, J.; SAGE, D.; STREET, M.; DUNCAN, J.; LUCAS, G. Role of interleukin-18 in the development of acute pulmonary injury induced by

intestinal ischemia/reperfusion and its possible mechanism. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 22, n. 2, p.253-260, 2007.

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

YANG, Y. J.; CHEN, S. H.; GE, X. R. Role of interleukin-18 in the development of acute pulmonary injury induced by intestinal ischemia/reperfusion and its possible mechanism. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 22, n. 2, p.253-260, 2007.