

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES PELA PENTRAXINA 3

MARIANA MORATO MARQUES

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de mestre em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Adriana Abalen Martins Dias

Co-orientador: Dr. Luiz Fernando Lima Reis

São Paulo

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Marques, Mariana Morato

Modulação da expressão de genes pela pentraxina 3. / Mariana Morato
Marques – São Paulo, 2007.
153p.

Dissertação (Mestrado) - Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Adriana Abalen Martins Dias

Descritores: 1. EXPRESSÃO GÊNICA. 2. MACRÓFAGOS. 3. TNF. 4. INFLAMAÇÃO/imunologia. 5. PROTEÍNAS DE FASE AGUDA. 6. PENTRAXINA. 7. PTX3.

*"As palavras proferidas pelo coração não têm língua que as articule.
Retém-nas um nó na garganta e só nos olhos é que se pode ler."*

José Saramago

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Áurea e Ronaldo e
ao meu irmão Bruno, pelo amor e apoio incondicional

Ao meu amor Gabriel
pelo carinho constante, pela alegria e compreensão

AGRADECIMENTOS

“...porque a vida é mutirão de todos, por todos remexida e temperada”

João Guimarães Rosa

Gostaria de agradecer a todos que participaram deste trabalho. De forma especial gostaria de agradecer:

À minha orientadora Dra. Adriana Abalen Martins Dias, por ter me iniciado na pesquisa científica com a dedicação e o rigor necessários; pela confiança, pela amizade e por todos os ensinamentos científicos e pessoais ao longo desses anos;

Ao meu co-orientador, Dr. Luiz Fernando Lima Reis, pela oportunidade, paciência e bom humor;

Ao Dr. Alex Fiorini pela ajuda paciente e eficiente nas padronizações das hibridizações dos *microarrays*, sem a qual este trabalho não estaria concluído;

À Dra. Helena Brentani e à equipe do Laboratório de Bioinformática do Hospital do Câncer, principalmente Luiz Paulo, Diogo, Eduardo e César, pelas análises dos dados de microarray;

À Dra. Anamaria Camargo e ao Ricardo Moura pelas orientações nos experimentos de Real Time PCR;

À Graziela e Sarah pela ajuda nos experimentos, pelo companheirismo, amizade, e, principalmente, por ajudar a ver a vida com mais simplicidade nas horas difíceis;

Ao amigos e colegas do LABRI, Ana Pagotto, Anna Coló, Bianca, Waleska, Chamberlein, Nair, Tatiana, Aline, Letícia, Vivian, Vladmir, Susana, Patrícia pelo apoio e pelas conversas sempre tão animadas e alegres;

À Juliana, que ao longo destes anos tornou-se uma verdadeira amiga, obrigada pela ajuda, pelas conversas, pela amizade!

À equipe do Biotério do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, Wanderley, Éder e Oraci, pela ajuda nos experimentos com animais;

À equipe da biblioteca da Fundação Antônio Prudente, Suely, pela ajuda na formatação do trabalho, Rose e Francyne, pela eficiência e gentileza na disponibilização e busca dos artigos;

À pós-graduação e ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - diretores, docentes e funcionários, pela oportunidade de trabalhar nestas instituições e ter usufruído de toda infra-estrutura que viabilizou a realização deste trabalho;

À FAPESP pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto;

À minha família e aos meus amigos pelo incentivo, carinho e conforto;

Aos meus pais, Áurea e Ronaldo, por me ensinarem a viver em busca de um ideal, pelo amor incondicional e por tornarem meus sonhos possíveis;

Ao meu amor Gabriel, pelo prazer de viver ao seu lado, pelo apoio silencioso e gentil, pelo amor puro, desinteressado, por me passar tranquilidade.

RESUMO

Marques MM. **Modulação da expressão de genes pela pentraxina 3.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Introdução: PTX3 é uma proteína de fase aguda produzida por monócitos/macrófagos, células dendríticas, endoteliais, de músculo liso, neutrófilos e fibroblastos em resposta à sinais pró-inflamatórios primários e agonistas de receptores do tipo Toll. PTX3 tem um papel preponderante na modulação da resposta inflamatória *in vivo*, entretanto seus mecanismos de ação ainda não foram elucidados. O objetivo deste estudo foi a identificação de alvos moleculares da ação de PTX3. **Métodos:** Utilizamos a tecnologia de microarrays de cDNAs (plataforma do ILPC/SP contendo 4.608 cDNAs humanos) e de oligonucleotídeos (array do FCCC com 16.128 oligos murinos) para estudar o perfil de genes modulados por PTX3 (10 µg/ml por 3h) em fibroblastos humanos (GM637) e macrófagos murinos (residentes (RES) e recrutados por tioglicolato (TIO)), respectivamente. **Resultados:** Nos fibroblastos GM637 foram identificados 37 genes modulados por PTX3 com $p < 0,05$ (*t-Student*) e razão de expressão (RE) $> 1,3$. A expressão de alguns desses genes foi validada por QPCR, entretanto todos os valores de RE encontrados pelas duas metodologias foram $< 1,55$. Da análise empregando macrófagos RES, 239 genes regulados por PTX3 com $p < 0,05$ (*t-Student*) foram detectados dos quais 36 com RE $> 1,8$ (31 induzidos e 5 inibidos). Dentre esses, genes relacionados ao transporte de íons (*Kcnn2*, *Cacna1c*), endocitose (*Amph*) e regulação da pressão sanguínea (*Edn1*). Nos macrófagos TIO foram identificados 687 genes modulados por PTX3 com $p < 0,05$ (*t-Student*), dos quais 28 apresentaram RE $> 1,8$ e incluem elementos envolvidos na atividade hormonal (*Prl*), peptidase (*Corin*), transporte mediado por vesículas (*Vamp3*) e circulação sanguínea (*Pon1*). Da comparação do perfil de expressão entre TIO e RES 792 genes com $p < 0,05$ (*t-Student*) foram identificados dos quais 34 com RE $> 3,0$. Foram encontrados elementos envolvidos com endocitose (*Ly75*), resposta à hipóxia (*Hif1a*), metabolismo de lipídeos (*Lpl*, *Lip*, *Aadacl1*), adesão celular (*Icam2*, *Alcam*), citocina (*Il1b*). **Conclusões:** O caldo tioglicolato se

mostrou um potente modulador da expressão gênica em macrófagos, regulando a expressão de inúmeros genes relacionados à resposta imune. PTX3 é uma proteína pleiotrópica envolvida na imunidade inata e inflamação não apenas como um receptor de reconhecimento de padrões (PRR), mas também como importante modulador da expressão gênica. **Suporte financeiro:** FAPESP

SUMMARY

Marques MM. [Modulation of gene expression by PTX3]. São Paulo; 2007.
[Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Introduction: PTX3 is a secreted glycoprotein produced by monocytes/macrophages, dendritic, endothelial, smooth muscle cells and fibroblasts in response to pro-inflammatory signals and microbial moieties. Our previous studies showed that PTX3 has a key role in modulating inflammatory response *in vivo* and the identification of the PTX3 molecular targets is essential for the understanding of its action. The aim of this study is to identify genes modulated by PTX3. **Methods:** We used cDNA (a ILPC-SP platform containing 4.608 human sequences) and oligo microarray (a FCCC biochip containing 16.128 murine oligos) to identify genes modulated by PTX3 (10 μ g/ml for 3h) in human fibroblasts (GM637) and murine macrophages (resident (RES) and thioglycollate elicited (TIO)), respectively. **Results:** We identified 37 genes modulated by PTX3 with $p < 0,05$ (*t-Student*) and fold change $> 1,3$, in GM637 human fibroblasts. From the comparison between resident macrophages (RESC) and resident macrophages treated with PTX3 239 differently expressed genes were identified with $p < 0,05$ (*t-Student*) and 36 genes with fold change $> 1,8$ (31 up and 5 down modulated by PTX3). Some of the identified genes are elements related to endocytosis (*Amph*), regulation of blood pressure (*Edn1*) and ion transport (*Kcnn2*, *Cacna1c*). A total of 687 genes with $p < 0,05$ (*t-Student*) were modulated by PTX3 in TIO elicited macrophages, among them 28 genes with fold change $> 1,8$. We found elements involved in peptidase activity (*Corin*), hormone activity (*Prl*), vesicle-mediated transport (*Vamp3*) and blood circulation (*Pon1*) between the PTX3 modulated genes in TIO macrophages. After the comparison between TIO X RES macrophages 792 genes with $p < 0,05$ (*t-Student*), and 34 genes with fold change $> 3,0$ were detected. Some of these genes are related to endocytosis (*Ly75*), response to hypoxia (*Hif1a*), lipid metabolic process (*Lpl*, *Lip*, *Aadacl1*), cell adhesion (*Icam2*, *Alcam*) and cytokine (*Il1b*). **Conclusion:** Thioglycollate broth is a potent modulator of gene expression in peritoneal

macrophages, regulating genes with pivotal role in innate immune response. Both human fibroblasts and murine peritoneal macrophages are responsive to PTX3. PTX3 is a pleiotropic protein involved in the innate immune response and inflammation not only as a soluble pattern recognition receptor (PRR) but also as a modulator of the gene expression. **Supported by:** FAPESP

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática das pentraxinas	4
Figura 2	Produção e Função de PTX3 no local da inflamação	22
Figura 3	Estratégia experimental adotada na análise da expressão gênica modulada por PTX3 em fibroblastos humanos (GM637)	27
Figura 4	Diagrama da estratégia experimental adotada na análise da expressão gênica modulada por rhPTX3 em macrófagos murinos residentes	28
Figura 5	Diagrama da estratégia experimental adotada na análise da expressão gênica modulada por rhPTX3 em macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato	29
Figura 6	Resumo das comparações possíveis de serem realizadas utilizando o banco de dados de expressão gênica dos macrófagos peritoneais murinos	30
Figura 7	Padronização das reações de Real Time PCR para o gene BCAP31	56
Figura 8	Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio de RNA total extraído de fibroblastos humanos (GM637) tratados ou não com PTX3	58
Figura 9	Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio de RNA amplificado (aRNA) proveniente de RNA total de fibroblastos tratados ou não com PTX3	59
Figura 10	Exemplo da normalização dos dados obtidos para lâmina <i>main</i> - a amostra controle 4 (marcada com Alexa 555) e referência (marcada com Alexa 647)	61
Figura 11	Exemplo da normalização dos dados obtidos para a lâmina <i>swap</i> – a amostra controle 4 (marcada com Alexa 647) e referência (marcada com Alexa 555)	62
Figura 12	Representação gráfica tipo MM-plot para a amostra Controle 4 (razão lâmina <i>main</i> X razão lâmina <i>swap</i>)	63

Figura 13	Agrupamento hierárquico dos 37 genes com $p < 0,05$ e razão de expressão $> 1,3$ identificados como diferencialmente expressos em fibroblastos humanos (GM637)	66
Figura 14	Exemplo de distribuição gaussiana de alguns dos genes modulados por rhPTX3 em fibroblastos humanos	68
Figura 15	Controle da qualidade do cDNA sintetizado a partir de RNA total de amostras de fibroblastos humanos tratados ou não com PTX3	70
Figura 16	Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio de RNA total extraído de macrófagos residentes peritoneais murinos tratados ou não com rhPTX3	74
Figura 17	Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio de RNA total extraído de macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato	75
Figura 18	Fracionamento eletroforético do RNA de macrófagos peritoneais murinos após o primeiro ciclo de amplificação	77
Figura 19	Fracionamento eletroforético do RNA de macrófagos peritoneais murinos após o segundo ciclo de amplificação	77
Figura 20	Exemplo da normalização dos dados obtidos para uma das lâminas do experimento onde a amostra REST3 (<i>main</i>)	79
Figura 21	Exemplo da normalização dos dados obtidos para uma das lâminas do experimento onde a amostra REST3 (<i>swap</i>)	80
Figura 22	Representação gráfica tipo MM-plot (razão lâmina main X razão lâmina swap) para a amostra REST3	81
Figura 23	Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos macrófagos peritoneais residentes tratados ou não com PTX3	84
Figura 24	Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato tratados ou não com PTX3	87

Figura 25	Cluster hierárquico dos 34 genes com $p < 0,05$ e $\text{fold} > 3,0$, encontrados como diferencialmente expressos da comparação entre macrófagos peritoneais murinos residentes e recrutados por tioglicolato	91
Figura 26	Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio de RNA total extraído de macrófagos peritoneais murinos	93
Figura 27	Controle da qualidade do cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído de macrófagos peritoneais murinos residentes e recrutados por tioglicolato.	94
Figura 28	Validação dos genes encontrados como diferencialmente expressos em macrófagos recrutados por tioglicolato	97
Figura 29	Diagrama do modelo da ANOVA 2 X 2 utilizado para identificação dos genes diferencialmente expressos em resposta à rhPTX3 em macrófagos peritoneais murinos	98
Figura 30	Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em macrófagos peritoneais residentes tratados ou não com rhPTX3 (REST e RESC) ou recrutados por tioglicolato tratados ou não com PTX3 (TIOT e TIOC)	102
Figura 31	Representação gráfica do Cluster 8 gerado pelo Self Organizing Map (SOM)	103
Figura 32	Representação gráfica do Cluster 9 gerado pelo Self Organizing Map (SOM)	104
Figura 33	Análise da razão de expressão relativa (REST/RESC) de genes inflamatórios por Real Time PCR em macrófagos residentes peritoneais murinos tratados ou não com PTX3	107
Figura 34	Diagrama da atuação de PTX3 na modulação da expressão de genes em fibroblastos humanos (GM637) e em macrófagos peritoneais murinos	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Seqüência dos iniciadores desenhados para validação por Real Time PCR – fibroblastos humanos (GM637).	50
Tabela 2	Seqüência dos iniciadores desenhados para validação por Real Time PCR genes murinos diferencialmente expressos em resposta à tioglicolato.	51
Tabela 3	Seqüência dos iniciadores desenhados para análise de expressão por QPCR de alguns dos mediadores inflamatórios modulados em macrófagos estimulados por PTX3.	52
Tabela 4	Lista dos identificados como diferencialmente expressos em resposta à rhPTX3 em fibroblastos humanos (GM637) considerando $p < 0,05$ (<i>t-Student</i>) e razão de expressão (PTX3/CONT) $> 1,3$.	65
Tabela 5	Genes identificados como diferencialmente expressos da comparação entre fibroblastos tratados ou não com PTX3 com os respectivos módulos funcionais aos quais são relacionados no banco de dados do KEGG (Kyoto Enciclopédia of Genes and Genomes).	66
Tabela 6	Genes selecionados para serem validados por Real –Time PCR em fibroblastos humanos tratados ou não com PTX3 levando em consideração $p < 0,05$, razão de expressão $> 1,3$ e BER $< 0,3$.	69
Tabela 7	Comparação da Razão de expressão obtida por microarray e por Real Time PCR para alguns dos genes selecionados como diferencialmente expressos em reposta à rhPTX3 em fibroblastos humanos.	72
Tabela 8	Lista da razão de expressão (REST/RESC), GeneID e descrição dos genes modulados em reposta à rhPTX3 em macrófagos residentes peritoneais murinos.	83
Tabela 9	Lista da razão de expressão (TIOT/TIOC), GeneID e descrição dos genes modulados em reposta à rhPTX3 em macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato.	86
Tabela 10	Genes modulados negativamente em macrófagos recrutados por tioglicolato.	89
Tabela 11	Genes modulados positivamente em macrófagos recrutados por	90

tioglicolato.

Tabela 12	Genes regulados positivamente em macrófagos recrutados por tioglicolato selecionados para validação por Real Time PCR.	92
Tabela 13	Genes regulados negativamente em macrófagos recrutados por tioglicolato selecionados para validação por Real Time PCR.	92
Tabela 14	Comparação da Razão de expressão relativa (RE) obtida por microarray e por Real Time PCR (QPCR) para alguns dos genes identificados como diferencialmente expressos em resposta a tioglicolato.	96
Tabela 15	Clusters obtidos à partir da lista dos 285 genes que apresentaram significância estatística pelo Two-way ANOVA, agrupados expressão de acordo com a técnica de SOM (self organizing maps) onde as amostras se segregaram de acordo com o perfil de expressão de cada um dos grupos (RESC, REST, TIOC e TIOT).	101
Tabela 16	Genes candidatos a serem modulados diferencialmente pela combinação de tioglicolato e PTX3 em macrófagos peritoneais murinos.	105

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Aadac11</i>	Arylacetamide deacetylase-like 1
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazole-propionic acid
Ang-1	Angiopoietina 1
ANOVA	Analysis of variance
ANP	Atrial natriuretic peptide
ARDS	Síndrome da Angústia respiratória aguda
aRNA	RNA amplificado
BER	Bayes Error Rate
BSA	Albumina de soro bovina
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CI	(24:1 v/v) Clorofórmio: álcool isoamílico
CLP	Procedimento de ligadura e perfuração do ceco
CO₂	Dióxido de Carbono
CRP	<i>C reactive protein</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diaminotetraacético
ET1	Endotelina 1 (endothelin -1)
ETOH	Etanol
FCCC	Fox Chase Cancer Center
FGF2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GXM	Glucuronoxylomannan
<i>Hif-1α</i>	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

HSL	Lipase sensível a hormônio
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IL	Interleucina
ILPC	Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
Kcnn2	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2
KCNT2	<i>Sodium-activated potassium channel gated by voltage</i>
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LOWESS	<i>Locally Weighted Scatter-plot Smoothing</i>
LPIV	Lesão Pulmonar Induzida pelo Ventilador
LPS	Lipopolissacarídeo
Ly75	Lymphocyte antigen 75
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
NETs	Neutrophil extracellular traps,
NK	Natural killers
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
NPI	Neuronal pentraxin 1
NPII	Neuronal pentraxin 2
NPR	Neuronal pentraxin receptor
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Phosphate-buffered saline
PCI	Fenol; clorofórmio; álcool isoamílico (25:24:1)
PCR	Polimerase Chain Reaction
PKC	Proteína-quinase C
PLC,	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PPRs	Pattern recognition receptors
PRL	Prolactina

PTX3	Pentraxina 3
rhPTX3	Proteína PTX3 recombinante humana
RNA	Ácido Riboxinucléico
rNTP	Riboxinucleotídeo
RPMI	Meio de Cultura do Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction
SAP	Serum amyloid P
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SK	Potassium small conductance calcium-activated channel
SMC	Smooth Muscle Cells
SOM	Self Organizing Map
SSC	NaCl 3M; Citrato de sódio 0,3M pH 7,0
TAE	Tris, Acetato EDTA
TF	Tissue Factor
TLR	Toll like receptors
TNF	Tumor necrosis factor
TSG6	TNF stimulated gene-6
TSG-14	TNF stimulated gene-14
<i>Vamp3</i>	Vesicle-associated membrane protein 3
VM	Ventilação mecânica
WT	Wild type
Zy	Zymosan

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	As pentraxinas	1
1.2	A pentraxina 3 PTX3	6
1.2.1	Estrutura do gene da proteína	6
1.2.2	Fontes celulares e regulação da expressão	7
1.2.3	Ligantes de PTX3	11
1.2.3.1	Ligação à Clq	11
1.2.3.2	Ligação à células apoptóticas	12
1.2.3.3	Ligação direta a patógenos	13
1.2.3.4	Outros ligantes	14
1.2.4	Papel de PTX3 na inflamação	15
1.2.5	Papel de PTX3 na imunidade inata	18
1.2.6	Mecanismos pelos quais PTX3 pode exercer suas funções	20
1.3	Justificativa e relevância	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	27
3.1	Parte 1 (referente ao estudo com fibroblastos humanos)	27
3.2	Parte 2 (referente ao estudo com macrófagos residentes peritoneais murinos)	28
3.3	Parte 3 (referente ao estudo com macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato)	29
3.4	Resumo das comparações realizadas no estudo com macrófagos murinos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Animais	31

4.2	Recuperação de macrófagos residentes da cavidade peritoneal	31
4.3	Recuperação de macrófagos recrutados para a cavidade peritoneal por Tioglicolato	32
4.4	Fibroblastos humanos	32
4.5	Tratamento com PTX3	33
4.6	Extração de RNA	33
4.7	Amplificação e marcação do RNA	34
4.7.1	Amplificação e marcação de RNA proveniente de cultura de fibroblastos humanos	34
4.7.2	Amplificação e marcação de RNA proveniente de cultura macrófagos peritoneais murinos	37
4.8	Preparação do RNA referência	39
4.9	Hibridização	40
4.9.1	Plataforma 4.8K ILPC (usada para investigação dos genes em fibroblastos humanos)	40
4.9.2	Plataforma mouse_v3. 0.2 (usada no estudo dos genes em macrófagos murinos)	42
4.10	Digitalização das imagens e quantificação	44
4.11	Análise da qualidade das hibridizações	44
4.12	Análises estatísticas	45
4.13	Real time PCR	46
4.13.1	Síntese de Cdna	47
4.13.2	Controle da qualidade do cDNA	47
4.13.3	Desenho de iniciadores específicos	48
4.13.4	Padronização das reações de Real Time PCR utilizando os iniciadores específicos selecionados	52
4.13.5	Reações de Real Time PCR específicas para os genes de interesse e cálculo da expressão gênica diferencial	54
5	RESULTADOS	57
5.1	Parte1 – Referente ao estudo com fibroblastos humanos	57
5.1.1	Cultura de fibroblastos, extração do RNA, amplificação e síntese de	

cDNAs marcados:	57
5.1.2 Análise da qualidade das hibridizações das lâminas 4.8K	59
5.1.3 Análises estatísticas	63
5.1.4 Seleção de genes diferencialmente expressos para serem validados por Real Time PCR	67
5.1.5 Validação dos genes por Real Time PCR	69
5.1.5.1 Síntese de cDNA	69
5.1.5.2 Desenho de iniciadores específicos e padronização das reações de Real Time PCR utilizando os iniciadores específicos selecionados	70
5.1.5.3 Reações de Real Time PCR específicas para os genes de interesse e cálculo da expressão gênica diferencial	71
5.2 Parte 2 – Referente ao estudo com macrófagos murinos	72
5.2.1 Recuperação, cultura e tratamento de macrófagos peritoneais com rhPTX3	72
5.2.2 Extração do RNA total e Amplificação	73
5.2.3 Análise da qualidade das hibridizações	74
5.2.4 Identificação de genes diferencialmente expressos em resposta rhPTX3 em macrófagos peritoneais residentes	81
5.2.5 Identificação de genes diferencialmente expressos em resposta rhPTX3 em macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato	84
5.2.6 Identificação dos genes diferencialmente expressos em macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato.	88
5.2.6.1 Seleção de genes diferencialmente expressos para serem validados por Real Time PCR	92
5.2.6.2 Obtenção de novas amostras para validação dos genes por Real Time PCR	93
5.2.6.3 Padronização das reações de Real Time PCR utilizando os iniciadores específicos selecionados	94
5.2.6.4 Reações de Real Time PCR específicas para os genes de interesse e cálculo da expressão gênica diferencial	95
5.2.7 Identificação de genes diferencialmente expressos em resposta ao efeito da combinação de tioglicolato e rhPTX3 na modulação de genes	

	em macrófagos peritoneais murinos.	97
5.2.8	Avaliação do padrão de expressão de mediadores inflamatórios em macrófagos residentes peritoneais murinos tratados ou não com rhPTX3 por Real Time PCR	106
6	DISCUSSÃO	108
7	CONCLUSÕES	134
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138

ANEXOS

Anexo 1 Padronização do protocolo de hibridização das plataformas provenientes do FCCC

Anexo 2 Lista dos 285 genes com os respectivos p valores (Tabela 1) e razão de expressão (Tabela 2) encontrados para cada comparação

Anexo 3 Lista dos 131 genes com $p < 0,05$ na comparação TIOT X RESC com os respectivos p valores (Tabela 3) e razão de expressão (Tabela 4) encontrados para cada comparação.

1 INTRODUÇÃO

1.1 AS PENTRAXINAS

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra patógenos e exerce um papel fundamental na ativação e orquestração da resposta imune adaptativa para manutenção da integridade e reparo dos tecidos (GORDON 2002). Mecanismos de defesa inatos incluem o reconhecimento de patógenos e de tecidos danificados mediado por receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors*, PPRs) celulares e humorais. Esses receptores são capazes de reconhecer estruturas altamente conservadas presentes nos microrganismos conhecidas como PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Os PPRs celulares pertencem a diferentes grupos estruturais e funcionais, que incluem receptores do tipo Toll (*Toll like receptors*, TLR), receptores de varredura ou *scavengers*, receptores de lecitinas, receptores do tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) entre outros. Os PPRs humorais também apresentam diversidade estrutural e funcional e dentre eles estão as colectinas (*lecitina ligadora de manose*, proteína surfactante A e D), ficolinas, componentes do complemento e as pentraxinas (LEE e KIM 2007).

As pentraxinas constituem uma superfamília de proteínas altamente conservadas caracterizadas pela organização estrutural composta de 5 subunidades idênticas ligadas não covalentemente em simetria radial pentamérica (OSMAND et al. 1977) e pelo domínio conservado chamado de assinatura da família HxCxS/TWxS (onde x representa qualquer aminoácido). Os principais representantes

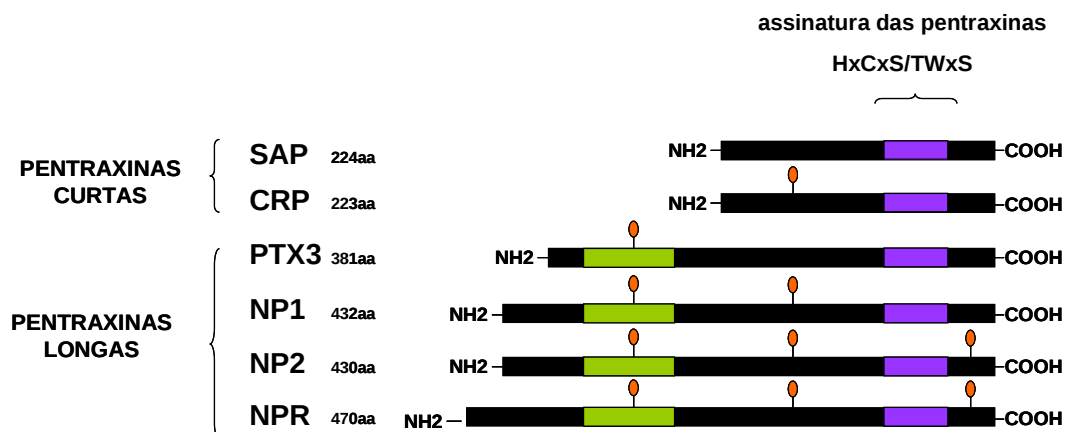
das pentraxinas são as proteínas de fase aguda: proteína C reativa (*C reactive protein*, CRP) e o componente soro amilóide P (*serum amyloid P*, SAP). Uma proteína de fase aguda é aquela cuja concentração no plasma aumenta (proteína de fase aguda positiva) ou diminui (proteína de fase aguda negativa) pelo menos 25% durante o processo inflamatório (GRUYS et al. 2005). Os níveis plasmáticos de CRP em indivíduos saudáveis são menores que 3mg/l e de SAP é 30-50mg/l. Durante uma resposta de fase aguda esses níveis podem aumentar até 1000 vezes, principalmente devido à produção destas proteínas pelo fígado. Tanto CRP quanto SAP exercem funções fundamentais na imunidade inata, na regulação da resistência a micróbios e na clarificação de debris celulares e componentes da matrix extracelular (MANTOVANI et al. 2008).

A superfamília das pentraxinas pode ser dividida em duas subfamílias: a das pentraxinas curtas ou clássicas, representada por CRP e SAP e a das pentraxinas longas, cujo protótipo é PTX3. Dentre as pentraxinas longas, um subgrupo caracterizado pela propriedade de ligação ao veneno de cobra (taipoxina) é denominado de pentraxinas neuronais e inclui a pentraxina neuronal 1 (*neuronal pentraxin 1*, NPI) também chamada de NPTX1 (SCHLIMGEN et al. 1995), pentraxina neuronal 2 (*neuronal pentraxin 2*, NP2) também chamada de NPTX2 ou NARP (HSU e PERIN 1995) e o receptor de pentraxina neuronal (*neuronal pentraxin receptor*, NPR) (DODDS et al. 1997). As pentraxinas longas têm em comum um domínio conservado característico (PTX) na porção carboxi-terminal que é homólogo ao encontrado nas pentraxinas curtas CRP e SAP e novos domínios amino-terminais que adquiriram talvez por fusão dessas novas extremidades às pentraxinas originais (GOODMAN et al. 1996) (Figura 1).

A identidade da sequência de aminoácidos desta subfamília é relativamente maior no domínio carboxi-terminal e varia de 28% entre PTX3 e NP1 a 68% entre NP1 e NP2. Já no domínio amino-terminal uma menor similaridade é encontrada (aproximadamente 10% entre PTX3 e NP1).

Várias funções têm sido atribuídas às pentraxinas neuronais. Uma vez que NP1 se liga a taipoxina, neurotoxina envolvida no bloqueio na produção de acetilcolina, acredita-se que esta pentraxina neuronal exerça papel importante na sinapse neuronal. NP1 também é produzida em resposta à apoptose induzida pela baixa concentração de K^+ em células granulares do cerebelo e durante a injúria induzida por isquemia e hipóxia no cérebro de neonatais. Nucleotídeos anti-sense para NP1 protegem as células neuronais contra morte induzida por hipóxia ou pelo AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazole-propionic acid*), análogo do glutamato. Foi reportado que os domínios de pentraxina se associam com receptores de glutamato do tipo AMPA e que as pentraxinas neuronais 1 e 2 juntas tem efeito aditivo na atividade sinaptogênica. Animais nocautes para NP1 exibem fenótipo normal, o que pode refletir a redundância das pentraxinas neuronais (revisado por GARLANDA et al. 2005).

Apesar de não ser considerada uma pentraxina neuronal, PTX3 pode também ser expresso em células neuronais e astrócitos expostos a agentes infecciosos, citocinas inflamatórias, sepse, encefalomielite e convulsões. Foi demonstrado que PTX3 exerce papel neuroprotetor em modelo utilizando animais nocautes para esta proteína submetidos à neurodegeneração induzida durante convulsões. Ainda não foi estabelecido se PTX3 é capaz de formar heterocomplexos com pentraxinas neuronais e regular suas funções. (GARLANDA et al. 2005).



Legenda: A figura mostra o alinhamento entre os membros da família das pentraxinas. São ilustrados os protótipos das pentraxinas curtas (CRP e SAP) e as pentraxinas longas identificadas. Em roxo é representada a região da sequência de aminoácidos (aa) considerada assinatura da família (HxCxS/TWxS, onde x representa qualquer aminoácido). A região destacada em verde é aquela onde se concentra fraca homologia entre as pentraxinas longas. Em laranja são mostrados os prováveis sítios de glicosilação.

Fonte: GOODMAN et al. (1996).

Figura 1 - Representação esquemática das pentraxinas.

Apesar da semelhança com as pentraxinas clássicas, PTX3 tem o dobro do tamanho e um padrão de expressão diferente. Ao contrário do que é visto para CRP, SAP e outras proteínas de fase aguda, as células hepáticas não são o principal sítio de produção. Outras diferenças podem ser destacadas entre estas pentraxinas, tais como a organização gênica (os genes de CRP e SAP são compostos por 2 éxons), a localização cromossômica (os genes das pentraxinas clássicas estão localizados no cromossomo 1) e os ligantes reconhecidos. Diferentemente de CRP e SAP, PTX3 se liga ao componente C1q do sistema complemento de maneira independente de Ca^{2+} , e não reconhece alguns ligantes reconhecidos pelas pentraxinas clássicas de maneira dependente de Ca^{2+} tais como fosfoetanolamina (*phosphoethanolamine*, PE), fosfocolina (*phosphocoline*, PC), fibronectina, e colágenos do tipo IV (revisado por

MANTOVANI et al. 2008).

PTX3 foi a primeira pentraxina longa a ser identificada, inicialmente conhecida como TSG-14 (*TNF stimulated gene-14*), foi originalmente detectada como expressa diferencialmente em fibroblastos humanos tratados com TNF (LEE et al. 1990) e, posteriormente em células endoteliais humanas tratadas com IL1B (BREVIARIO et al. 1992), duas citocinas pró-inflamatórias.

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina de amplo espectro de ação que foi descrita originalmente como mediadora dos processos de necrose hemorrágica induzida por endotoxina em camundongos (CARSWELL et al. 1975). Posteriormente, foi verificado que o TNF também era o fator sérico que leva a caquexia (BEUTLER et al. 1985). Logo após a clonagem e expressão de TNF como proteína recombinante ficou demonstrado que este possui várias outras funções além da atividade anti-tumoral. Sabe-se hoje que TNF é o principal mediador do choque séptico em infecções por germes gram-negativos, possui atividade mitogênica em células fibroblásticas e, por si só, ou através da indução de outras citocinas pode modular as células componentes do sistema imune (OLD 1988). Existem dois tipos de receptores para TNF (TNFR1 e TNFR2) que são encontrados em praticamente todos os tipos de células somáticas. O engajamento do TNF, na forma de um trímero, a estes receptores, dispara uma cascata de sinalização que culmina na modulação da expressão de uma série de genes, dentre eles PTX3, que são os reais efetores das ações biológicas atribuídas ao TNF.

A Interleucina 1 β (IL1B) é também um mediador da resposta inflamatória do hospedeiro cujas funções se sobrepõem àquelas descritas para o TNF sendo uma das diferenças entre as duas citocinas o fato da interleucina por si só não ser capaz de

desencadear o choque séptico e não induzir apoptose. A principal fonte de produção de IL1B são os fagócitos mononucleares e seus receptores (IL1R1 e IL1R2) estão presentes em praticamente todos os tipos celulares. O engajamento deste receptor dispara vias de sinalização levando à modulação de genes efetores da resposta associada à IL1B os quais estão envolvidos na regulação da indução das moléculas de adesão das células endoteliais, estimulação da produção de quimiocinas pelas células endoteliais e pelos macrófagos, proliferação de fibroblastos, febre e estimulação da síntese de proteínas de fase aguda (MANTOVANI et al. 1998).

1.2 A PENTRAXINA 3 (PTX3)

1.2.1 Estrutura do Gene e da Proteína

O gene humano *PTX3* (número de acesso no GenBank: X63613) é de cópia única, formado por três éxons e dois introns, localizado no cromossomo 3 banda q25. O primeiro e o segundo éxons codificam para um peptídeo sinal e para uma porção protéica inédita, respectivamente, o terceiro éxon é aquele que detém a identidade das pentraxinas (BREVIARIO et al. 1992). O promotor de *PTX3* contém sítios para os fatores de transcrição: PU1, AP1, NFkB, SP1 e IL6, sendo que NFkB é essencial para a indução por TNF e IL1B (ALTMAYER et al. 1995; BASILE et al. 1997). O gene *Ptx3* murino (número de acesso no GenBank: X83601) é altamente conservado em relação ao humano, mostra uma organização éxon/intron similar ao gene humano, e também está localizado no cromossomo 3 (INTRONA et al. 1996). Recentemente, HAN et al. (2005) reportaram que o bloqueio da via de NFkB em células epiteliais alveolares tratadas com TNF, não resultou em diminuição da expressão de *PTX3*. O

bloqueio significativo da expressão de *PTX3* induzida por TNF nesse tipo celular foi feito utilizando inibidores da via JNK e foi demonstrado, por técnica de RNA de interferência, que as duas isoformas, JNK1 e JNK2, participam da regulação da expressão de *PTX3* induzida por TNF. Os autores sugerem que as vias de sinalização que regulam a expressão de *PTX3* podem variar de acordo com o tipo celular (HAN et al. 2005).

Tanto o gene humano quanto o gene murino codificam para uma glicoproteína secretada de 381 aminoácidos, também chamada de *PTX3*. Dois domínios foram identificados: o domínio C-terminal com 203 aminoácidos que contém a assinatura da família das pentraxinas (HxCxS/TWxS, onde x representa qualquer aminoácido) e o domínio N-terminal de 178 aminoácidos que codifica para uma porção protéica não relacionada a nenhuma outra proteína ou pentraxina conhecida (INTRONA et al. 1996). Através de eletroforese em gel em sob condições não desnaturantes verificou-se que os protômeros de *PTX3* formam multímeros de massa molecular de aproximadamente 440kDa, correspondentes a decâmeros (BOTTAZZI et al. 1997). A porção C-terminal de *PTX3* mostrou homologia com as pentraxinas clássicas CRP e SAP (57% de aminoácidos conservados). O alinhamento da sequência predita da proteína *PTX3* humana e murina evidenciou que 312 dos 381 aminoácidos são idênticos (82%) e 39 foram substituídos por aminoácidos com resíduos similares (total de similaridade de 92%) (INTRONA et al. 1996).

1.2.2 Fontes celulares e Regulação da Expressão

Diferentemente das pentraxinas clássicas (CRP e SAP) que são produzidas no fígado principalmente em resposta a IL-6, *PTX3* é produzida por diversos tipos

celulares em resposta a estímulos pró-inflamatórios primários como TNF, IL1B, LDL oxidado e motivos microbianos (ex. LPS, lipoarabinomanana). Dentre os tipos celulares produtores de PTX3 estão fibroblastos, células endoteliais, condrócitos, sinoviócitos, fagócitos mononucleares, miócitos normais, células do epitélio renal e alveolar, células de músculo liso (SMC), neutrófilos, adipócitos e células dendríticas, principal fonte celular conhecida de PTX3 (LEE et al. 1990; BREVIARIO et al. 1992; ALLES et al. 1994; INTRONA et al. 1996; VOURET-CRAVIARI et al. 1997; POLENTARUTTI et al. 2000; VARANI et al. 2002; ABDERRAHIM-FERKOUNE et al. 2003; KLOUCHE et al. 2004; LATINI et al. 2004; NAUTA et al. 2005; HAN et al. 2005; CAMOZZI et al. 2005; JAILLON et al. 2007; IMAMURA et al. 2007). As diversas fontes celulares de PTX3 evidenciam o papel desta proteína no local da inflamação ou infecção, complementando a ação das pentraxinas clássicas (CRP e SAP) que se destacam pela ação sistêmica. Em estudo recente foi demonstrado que PTX3 é estocado em grânulos específicos de neutrófilos e secretado prontamente em resposta a estímulos microbianos ou fatores pró-inflamatórios (JAILLON et al. 2007). Parte da proteína PTX3 estocada pode se localizar nas redes extracelulares dos neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*, NETs) compostas por componentes nucleares e substâncias microbidas, que constituem importante mecanismo de defesa contra patógenos invasores. Os neutrófilos que não produzem PTX3 apresentam deficiência no reconhecimento, fagocitose e atividade microbida contra as conídias do fungo *Aspergillus fumigatus* (JAILLON et al. 2007).

A modulação da expressão de PTX3 por citocinas é um fenômeno finamente regulado e que varia dependendo do tipo celular envolvido. As principais citocinas indutoras de PTX3 são TNF e IL1B enquanto que IL6, principal indutora de CRP e

SAP, não é eficaz na indução de PTX3 (ALLES et al. 1994). GOODMAN et al. (2000), mostraram em macrófagos peritoneais murinos que a expressão de PTX3 em decorrência do tratamento com LPS foi parcialmente inibida por IFNG, que comumente tem efeito sinérgico com LPS. A interleucina 10 (IL10), que induz uma fraca expressão de PTX3 em monócitos e células dendríticas, apresentou forte sinergismo com LPS no aumento significativo da produção de PTX3 nessas células. Essa indução de PTX3 por IL10 pode estar associada com o envolvimento dessa proteína em processos deposição de matriz extracelular, reparo e remodelamento de tecidos. Em linfócitos T e B e em células natural killers (NK) níveis de mRNA para *PTX3* são indetectáveis. RNA mensageiro para pentraxina 3 também pode ser induzido em macrófagos derivados de monócitos, macrófagos associados a tumor e a linhagens celulares de mielomonocíticas (HL-60, U-937 e THP-1) (ALLES et al. 1994).

A produção de PTX3 também pode ser induzida por uma grande variedade de motivos microbianos (BREVIARIO et al. 1992; ALLES et al. 1994, VOURET-CRAVIARI et al. 1997; POLENTARUTTI et al. 2000; DINIZ et al. 2004; IMAMURA et al. 2007). Padrões moleculares associados a patógenos (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) podem ativar seus respectivos receptores do tipo TLR e desencadear a produção de PTX3. As células dendríticas são a principal fonte celular de PTX3, constituem um tipo celular heterogêneo e, de forma geral, diferentes agonistas de TLR podem estimular a produção de PTX3 em células dendríticas de origem mielóide e monocítica, mas não de origem plasmocitóide (DONI et al. 2003).

In vivo, a injeção de LPS em camundongos leva a um grande aumento sérico

de Ptx3 (LEE et al. 1994; INTRONA et al. 1996) sendo os principais sítios de produção desta proteína o coração e o músculo esquelético. PERI et al. (2000), demonstraram que PTX3 é expresso em cardiomiócitos normais e hipertrofiados. Enquanto em humanos a expressão desta proteína em cardiomiócitos é constitutiva, em camundongos é observada em decorrência da indução por LPS (INTRONA et al. 1996; PERI et al. 2000).

Diferentemente de outras pentraxinas longas conhecidas, PTX3 só é produzida no sistema nervoso central em resposta a doenças infecciosas, autoimunes ou episódios convulsivos (POLENTARUTTI et al. 2000; RAVIZZA et al. 2001). PTX3 é também sintetizada no ovário durante o período pré-ovulatório sendo a produção da proteína confinada às células do cumulus e células da granulosa dos folículos. Nestas circunstâncias, a expressão de PTX3 é modulada por estímulos hormonais (FSH ou HCG) e não inflamatórios (POPOVICI et al. 2007).

PTX3 também é expresso em células epiteliais renais e alveolares. HAN et al. (2004), mostraram que células epiteliais alveolares são capazes de produzir PTX3 em resposta a TNF, LPS e distensão cíclica (DOS SANTOS et al. 2004). A pentraxina 3 é expressa e produzida por células epiteliais do túbulo renal e em condições pró-inflamatórias, como aquelas decorrentes da estimulação por IL17 e CD40L, a produção de PTX3 é significativamente induzida (NAUTA et al. 2005).

1.2.3 Ligantes de PTX3

1.2.3.1 Ligação à C1q

O primeiro ligante reconhecido e caracterizado para PTX3 foi o componente C1q do sistema complemento (BOTTAZZI et al. 1997; NAUTA et al. 2003). Diferentemente das pentraxinas clássicas, PTX3 interage com C1q de maneira independente de cálcio. A interação de PTX3 com C1q *in vitro* induz a ativação da via clássica do sistema complemento (demonstrado por um aumento da deposição de C3 e C4) enquanto que a ligação de PTX3 a C1q na fase fluida inibe a ativação do complemento devido à competição por sítios importantes de interação com imunoglobulinas (NAUTA et al. 2003). O sistema do complemento participa na defesa do hospedeiro contra infecções microbianas através da lise direta pelo complexo de ataque a membrana C5b-C9, opsonização por ligantes C3b e iC3b, e ativação e quimiotaxia de neutrófilos por peptídeos C3a e C5a.

Recentemente foi demonstrado que PTX3 amplifica a resposta inflamatória ao KpOmpA da bactéria *Klebsiella pneumoniae* através da ativação da cascata do complemento. Nesse experimento foram utilizados inibidores do complemento (inibidor de C1 esterase e receptor solúvel para C1-sCR1) para demonstrar que na presença destes inibidores o efeito de PTX3, de aumentar a resposta inflamatória a KpOmpA, é drasticamente reduzido (COTENA et al. 2007).

Portanto, parece haver um dualismo relacionado à ação de PTX3 na resposta imune inata: um efeito protetor por promover uma clarificação segura de materiais autógenos danificados, amplificar a imunidade inata contra patógenos e conferir proteção contra uma ativação indesejada do sistema complemento e um efeito deletério relacionado à exacerbação da resposta inflamatória e do dano tecidual

mediado pela ativação do sistema complemento em situações de injúrias teciduais agudas, como as decorrentes do procedimento de isquemia e reperfusão (SOUZA et al. 2002).

1.2.3.2 Ligação à células apoptóticas

A clarificação eficiente de células apoptóticas é necessária para manutenção da homeostase tecidual em circunstâncias normais e patológicas. *In vivo*, as células em processo de apoptose são reconhecidas e engolfadas por fagócitos e células vizinhas que atuam como fagócitos semi-profissionais. O processo de remoção de células apoptóticas envolve diversos componentes da imunidade inata e adaptativa, entre eles: proteínas do complemento, fagócitos, células apresentadoras de antígenos e opsoninas (REN e SAVILL 1998). A morte celular programada induz a expressão de uma série de moléculas de superfície que são reconhecidas pelos fagócitos (HART et al. 1996). Fatores solúveis podem se ligar às células apoptóticas podendo representar novos ligantes ou mascarar os sinais identificados pelos fagócitos (REN e SAVILL 1998). Em 2000, ROVERE et al. demonstraram que PTX3 é capaz de se ligar especificamente às células apoptóticas, de maneira saturável e dose dependente, e inibir a remoção destas por células dendríticas humanas. Mecanismos inibitórios da fagocitose de células apoptóticas são importantes para manutenção da homeostase tecidual já que a atividade fagocítica descontrolada de células mortas pode desencadear injúria tecidual e reações auto-imunes (DE ALMEIDA e LINDEN 2005). Isso sugere que PTX3 possa seqüestrar remanescentes celulares de células apresentadoras de antígenos e possivelmente contribuir para prevenir reações autoimunes nos tecidos inflamados.

Em 2006, BARUAH et al. demonstraram que PTX3 é capaz de limitar a fagocitose de células apoptóticas mediada pelo componente C1q do sistema complemento. Ligantes de TLR estimulam a produção de PTX3 e de C1q por células dendríticas imaturas. Ambas as moléculas podem se ligar às células apoptóticas através de domínios de membrana diferentes. O componente C1q aumenta a fagocitose de células apoptóticas por células dendríticas, mas em presença de PTX3 esse mecanismo é inibido. Isso ocorre porque PTX3 se liga a C1q na fase fluida e diminui a deposição de C1q nas células apoptóticas e a ativação do sistema complemento. O sítio de ligação de PTX3 nestas células e a consequência desse mecanismo inibitório ainda não foram determinados.

Aumento dos níveis de PTX3 foi observado para algumas doenças de caráter autoimune como artrite reumatóide (LUCHETTI et al. 2000), vasculite de pequenos vasos (FAZZINI et al. 2001; VAN ROSSUM et al. 2006), pré-eclâmpsia (ROVERE-QUERINI et al. 2006; CETIN et al. 2006) e escleroderma (LUCHETTI et al. 2004). No entanto, nenhum desses estudos esclarece se a participação de PTX3 é benéfica ou deletéria para o desenvolvimento da doença tampouco seus mecanismos de ação biológica.

1.2.3.3 Ligação direta a patógenos

PTX3 é capaz de se ligar a diversos patógenos como *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Paracoccidioides brasilienses* além de um componente da parede de *Saccharomyces cerevisiae*, o Zymosan, e o componente de membrana externa de *K. pneumoniae*, KOmpA (GARLANDA et al. 2002; DINIZ et al. 2004; JEANNIN et al. 2005).

1.2.3.4 Outros ligantes

O componente da matriz extracelular TNFAIP6 (*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6*) também é reconhecido por PTX3. A ligação PTX3-TNFAIP6 parece ser essencial para inclusão do ácido hialurônico na matriz extracelular, fundamental para formação da matriz que protege o oócito durante a extrusão. Esse evento tem sido relacionado com o fenótipo de subfertilidade observado nas fêmeas que têm o gene de *Ptx3* deletado (VARANI et al. 2002; SALUSTRI et al. 2004).

Além destes ligantes, RUSNATI et al. (2004), demonstraram que PTX3 se liga ao fator de crescimento de fibroblasto (FGF2) com alta afinidade e seletividade. FGF2 induz a angiogênese *in vivo* e modula a neovascularização, a cicatrização de feridas, inflamação, arteriosclerose e crescimento tumoral. Estudos pré-clínicos demonstraram que antagonistas de FGF2 inibem o crescimento do tumor e a vascularização. A interação PTX3/FGF2 impede a ligação deste fator de crescimento aos seus receptores promovendo uma inibição dos receptores celulares que poderiam sinalizar a angiogênese.

Recentemente, foi reportado que PTX3 se liga a espermatozóides, em particular à região subacrossomal das células imóveis. Esse estudo mostrou que PTX3 é expresso no aparelho reprodutivo masculino e seus níveis de expressão podem ser correlacionados com a porcentagem de espermatozóides normais (DONI et al. 2007).

1.2.4 Papel de Ptx3 na Inflamação

Os níveis plasmáticos de PTX3 são baixos em condições normais (25ng/ml em murinos e <2ng/ml em humanos), mas aumentam rapidamente (6-8h) e drasticamente (200-800ng/ml) em condições de choque endotóxico e sepse. Níveis aumentados de PTX3 também foram identificados em diversas doenças, tais como falência renal crônica (MALAPONTE et al. 2007), artrite reumatóide (LUCHETTI et al. 2000), aterosclerose (ROLPH et al. 2002; SAVCHENKO et al. 2007), infertilidade (VARANI et al. 2002; SALUSTRI et al. 2004; ZHANG et al. 2005), escleroderma (FAZZINI et al. 2001; LUCHETTI et al. 2004), infarto agudo do miocárdio (MULLER et al. 2001; LATINI et al. 2004; KUNES et al. 2007; KOTOOKA et al. 2007; SUZUKI et al. 2008), glomerulonefrite (BUSSOLATI et al. 2003) e doença de Bowel (KATO et al. 2007).

PERI et al. (2000) observaram, em coorte de 37 pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM), níveis aumentados de PTX3 aproximadamente 7 horas após o infarto. Tradicionalmente, a proteína C reativa é utilizada como marcador de IAM uma vez que seus níveis refletem a resposta de fase aguda e a injúria tecidual no miocárdio, no entanto, os níveis séricos de CRP só podem ser detectados de 24 a 48 horas após os primeiros sintomas de IAM. Os níveis plasmáticos de PTX3 aumentados em decorrência de IAM ocorrem independentemente da extensão da necrose do tecido do miocárdio ou da gravidade da falência cardíaca. Consequentemente, PTX3 apresenta um potencial uso como marcador precoce de IAM. O mesmo grupo mostrou que PTX3 também tem valor prognóstico para predizer o risco de morte nos três meses posteriores ao evento. Dentre os 724 pacientes com IAM, aqueles que exibiram níveis plasmáticos de PTX3 maiores que

10,73 ng/ml apresentaram um risco de morte 3 vezes maior do que os pacientes nos quais os níveis plasmáticos de PTX3 não atingiram 5,49 ng/ml. O valor prognóstico da pentraxina 3 foi superior em acurácia aos valores prognósticos obtidos pelos marcadores tradicionalmente usados, incluindo a proteína C reativa (LATINI et al. 2004).

Com o intuito de investigar a função fisiológica de PTX3 e seu papel na resposta inflamatória orquestrada *in vivo*, nosso grupo gerou animais geneticamente modificados que expressam quantidades aumentadas da proteína PTX3. Estes animais transgênicos se mostraram mais resistentes aos efeitos deletérios da administração sistêmica de LPS, bem como à infecção polimicrobiana desencadeada pelo procedimento de ligadura e perfuração do ceco (CLP) (DIAS et al. 2001). Observamos também que os macrófagos peritoneais isolados dos animais transgênicos produziram quantidades aumentadas de óxido nítrico em resposta à estimulação concomitante por IFN γ e TNF ou IFN γ e LPS, além de se mostrarem melhores fagócitos de fungos e bactérias do que os macrófagos derivados dos animais do tipo selvagem (WT) (DIAS et al. 2001; DINIZ et al. 2004). Entretanto, quando submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) da artéria mesentérica superior, os animais transgênicos apresentaram maior susceptibilidade morrendo mais precocemente do que os animais WT (SOUZA et al. 2002). Foi observado que nestes animais os níveis séricos de TNF eram elevados e que a administração sistêmica de um receptor solúvel para esta citocina era capaz de resgatar esses animais da morte, indicando que o TNF estava envolvido no agravamento das lesões e na letalidade observada em decorrência da I/R intestinal. Além do TNF, a citocina IL1 β e as quimiocinas CCL2 e CXCL1 também apresentavam níveis mais aumentados nos

animais transgênicos para PTX3 em comparação com os camundongos WT submetidos ao mesmo procedimento de I/R (SOUZA et al. 2002).

Os fenótipos observados nos animais transgênicos para PTX3 mostraram, pela primeira vez, a importância desta proteína na regulação da resposta inflamatória *in vivo* e evidenciaram que esta regulação se dá, pelo menos, em parte, pela modulação da expressão de TNF e IL1B produzidos tanto no local da inflamação quanto sistemicamente o que criaria uma alça de amplificação da resposta inflamatória.

Recentemente foi demonstrado que PTX3 pode exercer um papel importante na lesão pulmonar induzida pelo ventilador (OKUTANI et al. 2007; REAL et al. 2007). A ventilação mecânica (VM) é uma modalidade terapêutica indispensável no tratamento de insuficiência respiratória que pode causar uma lesão pulmonar conhecida como Lesão Pulmonar Induzida pelo Ventilador (LPIV), em decorrência de um processo inflamatório agudo no parênquima pulmonar. Nosso grupo observou que os camundongos transgênicos, capazes de produzir cópias extras da proteína PTX3, desenvolvem LPIV em cerca de metade do tempo necessário quando comparados ao seu controle do tipo selvagem; foi visto que essa lesão pulmonar foi acompanhada de uma maior expressão de TNF, o que pode estar relacionado com a ocorrência mais rápida da lesão nesse grupo. Camundongos nocautes para PTX3 desenvolveram LPIV em tempo semelhante ao seu respectivo controle de mesmo background genético, mostrando que PTX3, apesar de ser um dos mediadores desta lesão não é essencial para o desenvolvimento da mesma. Nestes animais foi observado um maior aumento na expressão de IL6, e menor aumento na expressão de IL1B e IL10 em comparação aos animais controle WT, o que pode ser pelo menos

em parte, um dos mecanismos compensatórios através do qual a LPIV é induzida da mesma forma que nos animais Wt mesmo na ausência de PTX3 (REAL et al. 2007).

1.2.5 Papel de Ptx3 na Imunidade Inata

Foi observado por GARLANDA et al. (2002), a capacidade de PTX3 em facilitar o reconhecimento da conídia de *Aspergillus fumigatus* pelos macrófagos e também a propriedade desta proteína de se ligar diretamente a fagócitos mononucleares e células dendríticas tanto em humanos quanto em camundongos. Esses dados apontam para PTX3 como sendo um receptor secretado capaz de reconhecer motivos comumente encontrados em patógenos que têm papel não redundante na resistência a certos tipos de agentes microbianos. A susceptibilidade de animais nocautes para PTX3 ao *Aspergillus fumigatus* está associada a uma resposta adaptativa do tipo I deficiente, que pode ser restaurada através de tratamento com PTX3 recombinante (GARLANDA et al. 2002). GAZIANO et al. 2004, mostraram recentemente que PTX3 tem potencial terapêutico, tanto sozinho quanto em combinação com anti-fúngicos, no tratamento de infecções por *A. fumigatus*. Nesse trabalho, os animais foram infectados por *A. fumigatus* e observou-se que animais tratados somente com PTX3 apresentaram completa resistência à infecção e, que o efeito protetor de PTX3 foi similar ou superior aos antifúngicos normalmente utilizados no tratamento deste tipo de infecção. A proteção conferida por PTX3 à aspergilose parece estar associada a uma modulação do nível de citocinas relacionadas com o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 (GAZIANO et al. 2004), dado sugestivo de que PTX3 atuaria como modulador da expressão gênica.

DINIZ et al. (2004), mostraram que os macrófagos provenientes de animais

transgênicos para PTX3 (Tg) expressam maiores níveis de mRNA para *Ptx3* do que os macrófagos provenientes dos animais do tipo selvagem após a estimulação com Zymosan (Zy). Macrófagos dos animais transgênicos se mostraram melhores fagócitos de partículas de Zymosan e de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). No caso de *P. brasiliensis* o aumento da atividade microbicida foi acompanhado de maior produção de óxido nítrico nos macrófagos provenientes dos animais transgênicos para PTX3. Esses macrófagos também expressam maiores níveis basais de mRNA para TLR6 e maiores níveis de Dectina 1 quando estimulados com Zy em comparação com os macrófagos dos animais do tipo selvagem. Nesse trabalho foi demonstrado que PTX3 pode agir como uma opsonina em ensaio no qual a adição da proteína PTX3 humana recombinante em cultura, ao se ligar a partículas de Zy e de *P. brasiliensis*, levou a um aumento do índice de fagocitose equiparável ao índice fagocítico dos macrófagos dos animais Tg (DINIZ et al. 2004).

Foi observado que PTX3 exerce duplo efeito na infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae* nos animais que expressam níveis aumentados de PTX3. Em resposta a um alto número de bactérias *K. pneumoniae*, o aumento de expressão de *Ptx3* esteve associada com maior letalidade, aumento de óxido nítrico no soro, incapacidade dos neutrófilos de migrar para o tecido pulmonar e maior disseminação de bactéria no sangue. Já em resposta a um menor número de partículas infectantes, a expressão aumentada de *Ptx3* esteve associada à proteção dos animais, com aumento da produção de TNF, maior influxo de neutrófilos no pulmão e maior fagocitose da bactéria pelos neutrófilos que migraram. Esse trabalho evidenciou que PTX3 exerce papel importante no controle de infecção por bactérias e seu papel depende da intensidade e severidade da infecção (SOARES et al. 2006).

BOZZA et al. (2006), mostraram que PTX3 se liga a citomegalovírus humano e murino e reduz a carga viral e o potencial infeccioso do vírus em células em cultura. O citomegalovírus é um patógeno oportunista e a reativação da sua forma latente após transplante alogênico é causa de morbidade e mortalidade e predisposição a complicações severas, incluindo a superinfecção por *Aspergillus sp.* O tratamento com a proteína PTX3 recombinante protege os animais de infecção primária pelo citomegalovírus murino através da indução de Irf3 (Interferon Regulatory Factor 3) por via independente de Tlr9/Myd88 e promoção da via Ifng/Ill12.

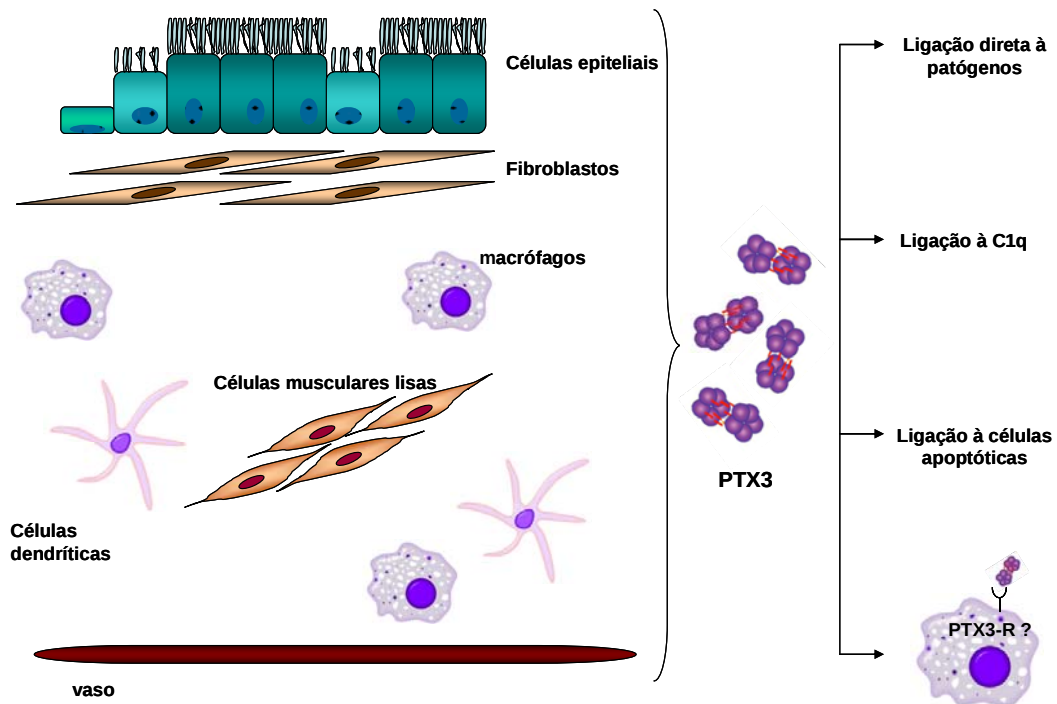
1.2.6 Mecanismos pelos quais PTX3 pode Exercer suas Funções

Os estudos reportados até agora permitem supor os possíveis mecanismos de ação de PTX3. A atuação da pentraxina 3 tem sido atribuída à ligação direta a patógenos, à ligação a células apoptóticas e à ligação ao componente C1q do sistema complemento. Alguns autores (MANTOVANI et al. 2003; GARLANDA et al. 2005) sugerem que outro mecanismo pelo qual PTX3 atua é através da ligação a um receptor celular (Figura 2), entretanto esse receptor nunca foi identificado e não há nenhuma evidência na literatura de que PTX3, diretamente, induz a expressão de citocinas e outros mediadores inflamatórios.

NAPOLEONE et al. (2004), demonstraram que PTX3 é capaz de aumentar significativamente a expressão e atividade do fator tecidual (*Tissue Factor*, TF) em monócitos previamente estimulados com LPS. Acredita-se que esse aumento de expressão esteja relacionado à fosforilação e degradação de NFKBIA e conseqüente liberação de NFkB para o núcleo, ativando a expressão de TF.

DIAS et al. (2001), mostraram que macrófagos provenientes de animais geneticamente modificados que expressam mais PTX3, produzem quantidades aumentadas de óxido nítrico em resposta à coestimulação por IFNG/TNF ou IFNG/LPS.

Outra evidência de que esta proteína possa agir através de um receptor, vem do fato que os animais transgênicos para PTX3 quando submetidos aos modelos de inflamação (detalhado no item 1.4) apresentaram uma significativa alteração nos níveis de citocinas e quimiocinas, entre elas TNF e IL1B. Além disso, os estudos realizados durante o período em que fiz parte do Programa de Formação de Pesquisador de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq Bolsa 800030/2003-6) empregando a metodologia de RT-PCR sob condições não saturantes, indicaram que PTX3 parece agir nos macrófagos peritoneais murinos regulando positivamente a expressão de *Nos2* e também do receptor *Tlr6* e, negativamente, a expressão de *Il4* (MARQUES 2005).



Legenda: PTX3 pode ser produzido por diversos tipos celulares, tais como células epiteliais, endoteliais, células dendríticas, células musculares lisas, fibroblastos e macrófagos. Seletivamente, PTX3 se liga a determinados patógenos (fungos, bactérias e vírus), se liga ao componente C1q do sistema complemento, e à células apoptóticas. PTX3 deve aumentar a produção de citocinas e óxido nítrico nos macrófagos estimulados com citocinas pró-inflamatórias através de um receptor ainda não identificado (PTX3-R?).

Fonte: HE et al. (2007)

Figura 2 - Produção e Função de PTX3 no local da inflamação.

1.3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Os dados reportados até agora na literatura não são suficientes para o conhecimento dos mecanismos pelos quais PTX3 age regulando a resposta inflamatória e modulando a expressão de TNF, IL1B e outros mediadores inflamatórios no processo da resposta inflamatória.

A imunidade inata além de ser a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos tem papel fundamental na ativação e orientação do sistema imune adaptativo e assim, na manutenção da integridade e reparo de tecidos. Embora os dados reportados na literatura evidenciem a importante participação de PTX3 na imunidade inata, na modulação da resposta inflamatória *in vivo* e na gênese de diversas doenças falência renal crônica (MALAPONTE et al. 2007), artrite reumatóide (LUCHETTI et al. 2000), aterosclerose (ROLPH et al. 2002; SAVCHENKO et al. 2007), infertilidade (VARANI et al. 2002; SALUSTRI et al. 2004; ZHANG et al. 2005), escleroderma (FAZZINI et al. 2001; LUCHETTI et al. 2004), infarto agudo do miocárdio (MULLER et al. 2001; LATINI et al. 2004; KUNES et al. 2007; KOTOOKA et al. 2007; SUZUKI et al. 2008), glomerulonefrite (BUSSOLATI et al. 2003) e doença de Bowel (KATO et al. 2007), eles não esclarecem as vias pelas quais esses fenômenos ocorrem.

Nesse sentido, o presente projeto se propôs a empregar uma abordagem em larga escala, baseada em microarrays de cDNAs e oligonucleotídeos, para buscar a identificação de possíveis genes modulados por PTX3. A utilização desta abordagem foi fundamentada, em parte, pelos resultados preliminares obtidos utilizando a metodologia de RT-PCR sob condições não saturantes nos quais mostramos que

PTX3 age nos macrófagos peritoneais murinos regulando positivamente a expressão de *Nos2* e também do receptor *Tlr6* e, negativamente, a expressão de *Il4*. (MARQUES 2005) e também em outras evidências indiretas reportadas por nós e outros pesquisadores sugestivas de que PTX3 possa modular a expressão gênica.

Esperamos que a identificação de genes modulados por PTX3 possa contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos de ação não só desta proteína, mas também de importantes citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL1B. Além disso, os resultados do nosso estudo poderão fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando minimizar as lesões teciduais decorrentes de processos inflamatórios bem como o uso de PTX3 como agente antimicrobiano e antitumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar genes cuja expressão seja regulada por PTX3 em macrófagos peritoneais murinos e em fibroblastos humanos (GM 637).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

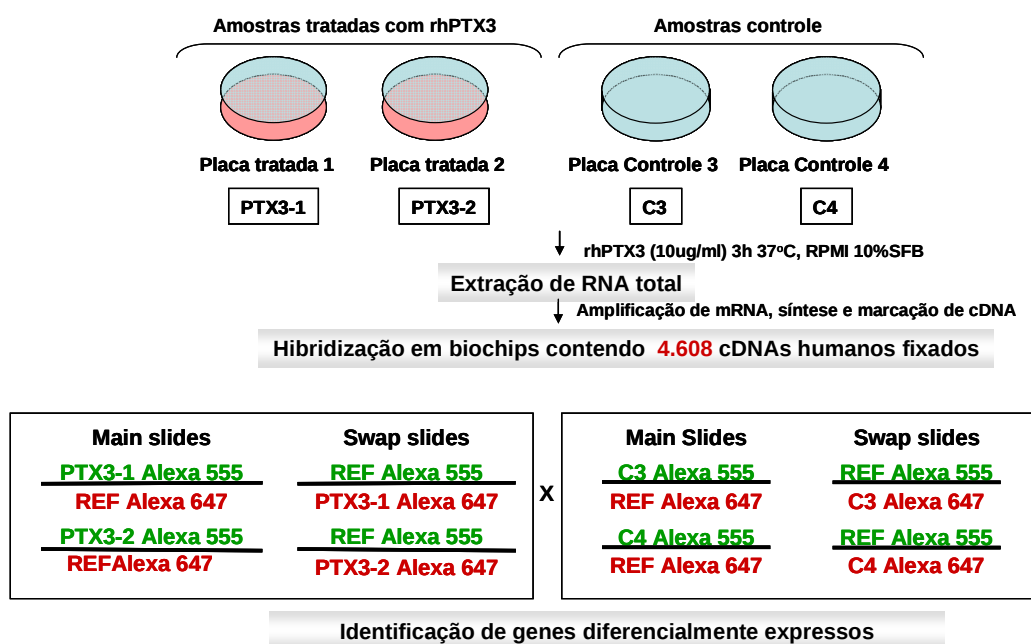
- Estabelecer o perfil de expressão gênica, por cDNA microarray de fibroblastos humanos diplóides da linhagem GM637 tratados ou não com PTX3;
- Identificar os genes diferencialmente expressos a partir da comparação do perfil de expressão gênica observado para fibroblastos humanos (GM637) tratados com a proteína recombinante humana PTX3 (rhPTX3) com aquele obtido para fibroblastos humanos (GM637) não tratados com a proteína;
- Estabelecer o perfil de expressão gênica, por microarray de oligonucleotídeos de macrófagos peritoneais murinos residentes e recrutados por tioglicolato tratados ou não com PTX3;
- Identificar por meio de oligo microarrays genes diferencialmente expressos a partir da comparação do perfil de expressão gênica observado para macrófagos residentes peritoneais murinos tratados com rhPTX3 com aquele obtido para macrófagos residentes não tratados com a proteína;

- Identificar por meio de oligo microarrays genes diferencialmente expressos a partir da comparação do perfil de expressão gênica observado para macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato tratados com rhPTX3 com aquele obtido para macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato não tratados com a proteína;
- Identificar por meio de oligo microarrays genes diferencialmente expressos a partir da comparação do perfil de expressão gênica observado para macrófagos peritoneais elicitados por tioglicolato com aquele obtido para macrófagos peritoneais residentes;
- Identificar por meio de microarrays eventuais genes regulados tanto por PTX3 quanto por Tioglicolato nos quais possa ser observado um efeito aditivo dos tratamentos através da comparação do perfil de expressão gênica observado para macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato tratados com rhPTX3 com aquele obtido para macrófagos residentes peritoneais murinos não tratados com a proteína ou macrófagos elicitados por Tio;
- Validar o padrão de indução ou inibição da expressão de alguns dos genes identificados como diferencialmente expressos por meio da metodologia de Microarray em todas as comparações feitas através de Real Time PCR.

3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

3.1 PARTE 1 (REFERENTE AO ESTUDO COM FIBROBLASTOS HUMANOS)

A Figura 3 ilustra a abordagem experimental utilizando fibroblastos humanos (GM637). Nessa parte do trabalho foram usadas lâminas feitas a partir de clones ORESTES provenientes do Projeto Genoma do Câncer ILPC/FAPESP, contendo 4.608 cDNAs humanos fixados (4.8K).

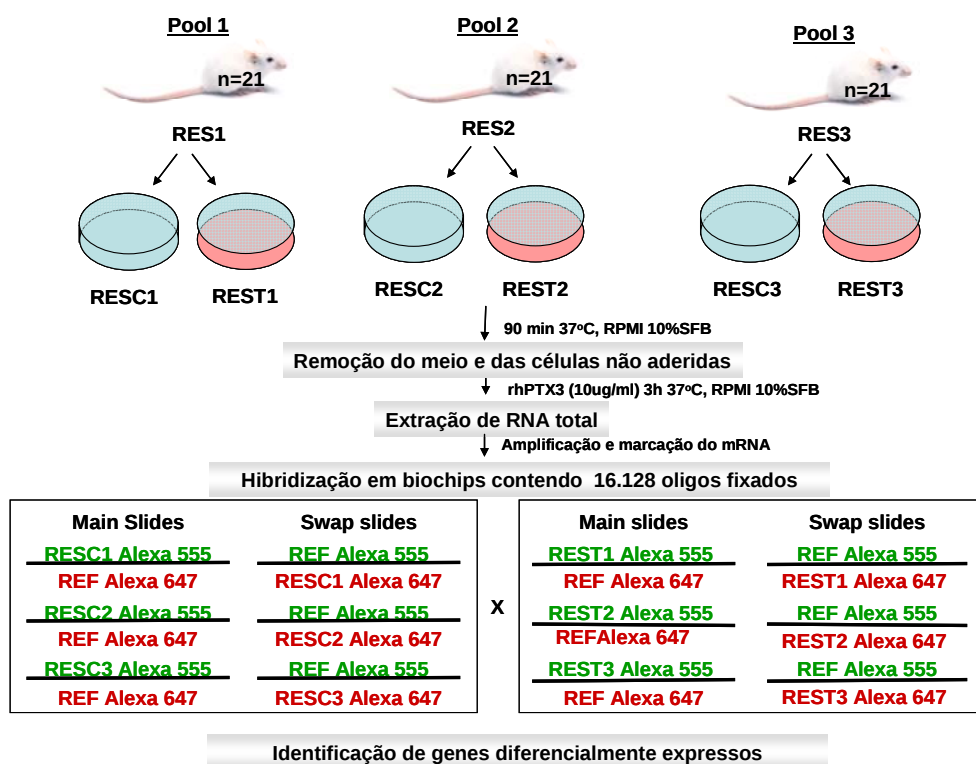


Legenda: As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. Duas placas de cultura de fibroblastos humanos (GM637) foram usadas como controle (C3 e C4) e duas foram tratadas com rhPTX3 (10µg/ml) durante 3 horas (PTX3-1 e PTX3-2). Após esse tempo, o RNA total foi extraído, foi feita a amplificação do mRNA, síntese e marcação do cDNA. Essas amostras foram hibridizadas em duplicata (com inversão dos corantes) em lâminas de vidro contendo 4.608 cDNAs humanos fixados. Foi utilizado RNA universal como referência comum (BD Clontech™ Universal Reference Total RNA - Human) em todas as lâminas. As análises estatísticas foram feitas no sentido de comparar o perfil de expressão gênica de fibroblastos humanos tratados com rhPTX3 com o perfil de expressão de fibroblastos não tratados com a proteína.

Figura 3 - Estratégia experimental adotada para identificação de genes modulados por PTX3 em fibroblastos humanos (GM637).

3.2 PARTE 2 (REFERENTE AO ESTUDO COM MACRÓFAGOS RESIDENTES PERITONEAIS MURINOS)

A Figura 4 resume os procedimentos experimentais da parte do estudo empregando macrófagos residentes peritoneais murinos. Nessa parte do trabalho foram empregadas lâminas provenientes do Fox Chase Cancer Center (mouse_v3.0.2) contendo 16.128 oligonucleotídeos correspondentes a seqüências de genes murinos fixados.

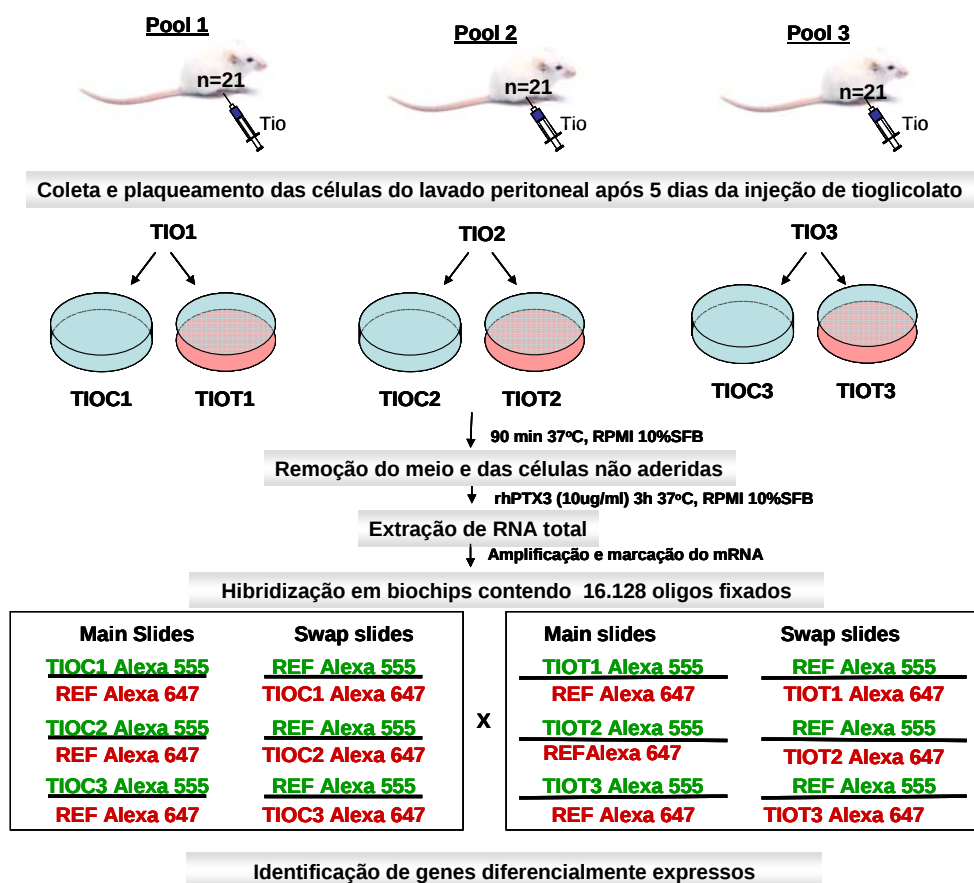


Legenda: Foram feitos 3 pools de macrófagos peritoneais murinos, cada pool composto de células provenientes de 21 camundongos CD1 WT. Para cada pool, foram feitas quatro placas de cultura, duas controle e duas tratadas com rhPTX3 (10µg/ml) durante 3 horas. O RNA total dos três pools diferentes de macrófagos peritoneais residentes foi extraído e submetido a amplificação por dois ciclos. Cada RNA amplificado foi marcado com o fluoróforo Alexa (555 e 647) e hibridizado contra um RNA referência comum, composto de um pool de RNAs de pulmão, coração, rim, músculo esquelético e cérebro obtidos de 2 camundongos diferentes da linhagem CD1, em lâminas de vidro provenientes do Fox Chase Cancer Center contendo 16.128 oligonucleotídeos fixados. Todas as amostras foram hibridizadas em duplicata, fazendo a inversão dos corantes *main* e *swap*. As análises estatísticas foram feitas pelo método *t-Student* no sentido de identificar os genes diferencialmente expressos em resposta a rhPTX3.

Figura 4 - Diagrama da estratégia experimental adotada na análise da expressão gênica modulada por rhPTX3 em macrófagos murinos residentes.

3.3 PARTE 3 (REFERENTE AO ESTUDO COM MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS RECRUTADOS POR TIOGLICOLATO)

A Figura 5 resume os procedimentos experimentais da parte do estudo empregando macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato. Nessa parte do trabalho foram empregadas plataformas provenientes do Fox Chase Cancer Center (mouse_v3.0.2) contendo 16.128 oligonucleotídeos fixados correspondentes à seqüências de genes murinos.

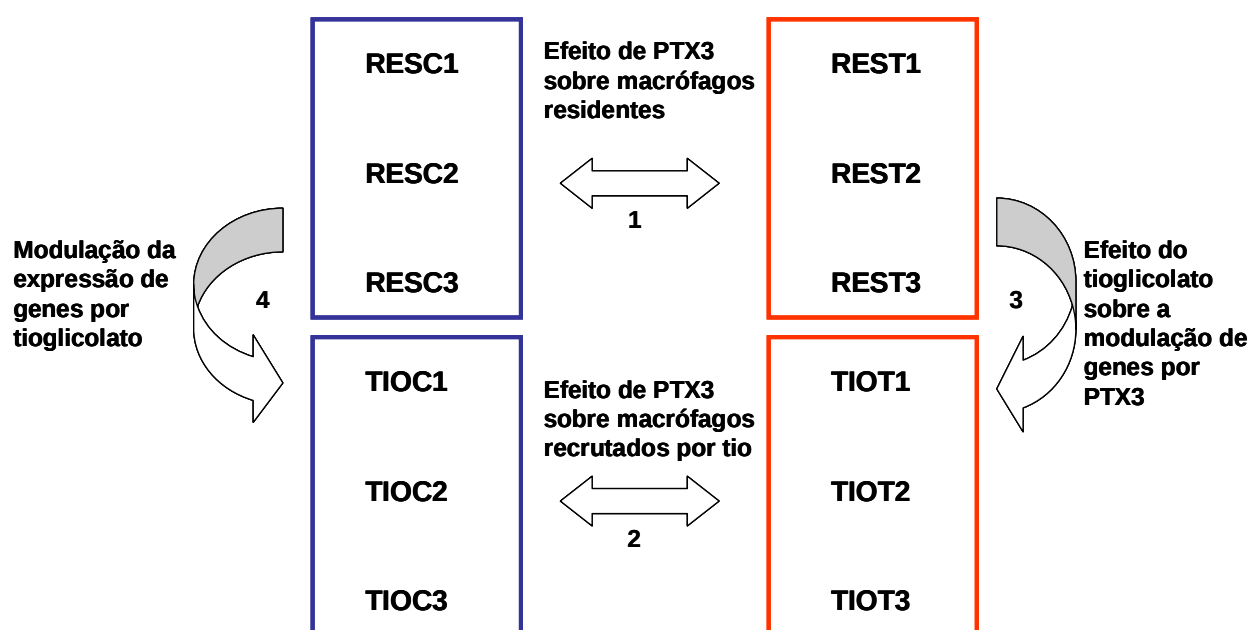


Legenda: Foram feitos 3 pools de macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato; cada pool foi feito a partir da lavagem peritoneal com PBS gelado de 5 animais após cinco dias da injeção de 2ml caldo tioglicolato. Para cada pool foram feitas duas placas de cultura, uma controle e uma tratada com rhPTX3 (10µg/ml) durante 3 horas. O RNA total dos três pools diferentes de macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato foi extraído e submetido a amplificação por dois ciclos. Cada RNA amplificado foi marcado com o fluoróforo Alexa (555 e 647) e hibridizado contra um RNA referência comum composto de um pool de RNAs de pulmão, coração, rim, músculo esquelético e cérebro obtidos de 2 camundongos diferentes da linhagem CD1. Todas as amostras foram hibridizadas em duplicata, fazendo a inversão dos corantes *main* e *swap* em lâminas de vidro provenientes do FCCC. As análises estatísticas foram feitas no sentido de identificar os genes diferencialmente expressos em resposta a rhPTX3.

Figura 5 - Diagrama da estratégia experimental adotada para identificação de genes modulados por rhPTX3 em macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato.

3.4 RESUMO DAS COMPARAÇÕES REALIZADAS NO ESTUDO COM MACRÓFAGOS MURINOS

Nosso banco de dados sobre perfil de expressão gênica de macrófagos peritoneais murinos permitiram diferentes comparações entre estes grupos do estudo esquematicamente representadas na Figura 6.



Legenda: 1. Comparação do perfil de expressão gênica de macrófagos residentes peritoneais tratados (REST1, REST2, REST3) ou não com rhPTX3 (RESC1, RESC2, RESC3), que permite a identificação de genes modulados por PTX3 em macrófagos residentes peritoneais murinos. 2. Comparação do perfil de expressão gênica de macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato tratados (TIOT1, TIOT2, TIOT3) ou não com rhPTX3 (TIOC1, TIOC2, TIOC3), que permite a identificação de genes modulados por rhPTX3 em macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato. 3. Comparação do perfil de expressão gênica de macrófagos residentes peritoneais tratados (REST1, REST2, REST3) com o perfil de expressão gênica de macrófagos peritoneais tratados com rhPTX3 (TIOT1, TIOT2, TIOT3), que permite avaliar o efeito de tioglicolato nos genes modulados por rhPTX3. 4. Comparação do perfil de expressão gênica de macrófagos residentes peritoneais (RESC1, RESC2, RESC3) com perfil de expressão gênica de macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato (TIOC1, TIOC2, TIOC3), que permite caracterizar molecularmente a população de macrófagos recrutada por tioglicolato.

Figura 6 - Resumo das comparações possíveis de serem realizadas utilizando o banco de dados de expressão gênica dos macrófagos peritoneais murinos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos de 6 a 8 semanas de idade, não isogênicos da linhagem CD1 mantidos em microisoladores no biotério do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC) em ambiente limpo com temperatura controlada, ar filtrado e recebendo ração esterilizada e água acidificada esterilizada à vontade. Os animais foram mantidos em regime de luminosidade composto de 12horas de luz e 12horas de escuro.

Os procedimentos experimentais com animais adotados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antônio Prudente (processo número nº 009/006).

4.2 RECUPERAÇÃO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES DA CAVIDADE PERITONEAL

As células peritoneais residentes foram recuperadas por lavagem da cavidade peritoneal com 5 ml de PBS (*phosphate-buffered saline*) gelado. O conteúdo recuperado foi centrifugado a 106 x g a 4°C por 10 minutos e lavado mais duas vezes com PBS gelado. As células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade avaliada utilizando Azul de Tripán (Sigma®). As células recuperadas foram incubadas em placas de cultura contendo meio RPMI (GibcoBRL 31800022)

suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB)(Cultilab) inativado, L-glutamina (2mM) (Sigma) e garamicina (40mg/ml) (Schering-Plough) por 90 minutos a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após este tempo, o meio foi substituído para remoção das células não aderidas.

4.3 RECUPERAÇÃO DE MACRÓFAGOS RECRUTADOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL POR TIOGLICOLATO

Os camundongos foram injetados, intraperitonealmente, com 2ml de caldo tioglicolato (“Bacto, Thioglycollate Medium W/O Indicator” - do Laboratório DIFCO LTDA cat#0430-17) utilizando agulha de 24G e seringa de 5ml cinco dias antes da recuperação das células peritoneais que foi feita da mesma forma descrita para macrófagos residentes.

4.4 FIBROBLASTOS HUMANOS

Utilizamos fibroblastos humanos da linhagem GM637 que são células originalmente isoladas no Institute for Medical Research, Camden, NJ (KUCHERLAPATI et al. 1978) da pele de mulheres aparentemente normais e transformadas com o antígeno de SV40. A linhagem que utilizamos foi proveniente do banco de células do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC). Nos nossos experimentos, as células foram incubadas em placas de cultura contendo meio DMEM (GibcoBLR 31600034) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB)(Cultilab) inativado, L-glutamina (2mM) (Sigma) e garamicina (40µg/ml)

(Schering-Plough) a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células foram contadas e a viabilidade avaliada utilizando Azul de Tripán.

4.5 TRATAMENTO COM PTX3

Tanto os macrófagos murinos quanto os fibroblatos humanos foram tratados em cultura por 3 horas com a proteína PTX3 recombinante humana (rhPTX3) na concentração de 10µg/ml. Esta proteína nos foi gentilmente cedida pelo Dr. Alberto Mantovani (Mario Negri Institute for Pharmacological Research, Milan – Italy) e foi produzida em células CHO e purificada por imunoafinidade sob condições livres de contaminação com endotoxina (GARLANDA et al. 2002). O grau de pureza da proteína PTX3 foi avaliado por SDS-PAGE e a contaminação por LPS pelo ensaio de coagulação do lisado de amebócitos de *Limulus* utilizando o kit LAL da Bio-Whittaker e também pela capacidade de induzir IL-6 em cultura de monócitos (RIVIECCIO et al. 2007).

4.6 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total das culturas de células foi extraído utilizando o Reagente TRIZOL (Invitrogen) e seguindo as especificações do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada empregando-se espectofotometria (NanoDrop, NanoDrop Technologies) no comprimento de onda 260nm. A estimativa de pureza do RNA obtido foi feita pela determinação da razão entre a absorbância de 260nm e 280nm (que mede a contaminação da amostra com proteínas) e da razão 260/230 para

estimativas da quantidade de sal nas amostras. Em ambos os casos o RNA era considerado de boa qualidade quando a razão era superior a 1,8.

A integridade do RNA obtido foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE corado com brometo de etídio. Eram consideradas de boa qualidade as amostras nas quais as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S eram visualizados e a intensidade da banda superior era maior que a inferior.

4.7 AMPLIFICAÇÃO E MARCAÇÃO DO RNA

A amplificação do RNA total das amostras de fibroblastos humanos e de macrófagos peritoneais murinos foi feita com base no protocolo sugerido por GOMES et al. (2003).

4.7.1 Amplificação e marcação de RNA proveniente de cultura de fibroblastos humanos

O RNA total de fibroblastos humanos foi submetido a 1 ciclo de amplificação. Resumidamente, o RNA total foi reversamente transcrito utilizando o iniciador oligodT (24)-T7 que contém a sequência do promotor da RNA-polimerase T7 na extremidade 5'. RNA total (3µg) foi misturado com 0,5µg do iniciador oligodT (24)-T7 e o volume final foi ajustado para 10µl com água com DEPC (água deionizada tratada dietileno-piromcarbonato). A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos para desnaturação do RNA e rapidamente colocada no gelo. A transcrição reversa foi realizada pela adição de 4µl de tampão de primeira fita 5X (Promega), 4,8µl de MgCl₂ 25mM (Promega), 0,5µl de RNAsin (40U/µl) (Promega), 2,0µl de

dNPT 10mM e 1,0µl de IMPROM II RT (Promega). A reação ocorreu a 42°C por 90 minutos.

A síntese da segunda fita de DNA foi realizada pela adição de 16,9µl de água DEPC, 10,0µl de tampão de segunda fita 5X (100mM Tris pH6,9, 23mM MgCl₂, 450mM LCL, 0,75 mM β-NAD, 50mM (NH₄)SO₄, 1,0µl de dNPT 10mM, 0,3µl de RNase H (2U/µl, Gibco), 0,5 µl de DNA ligase de *E.coli* (10U/µl, Invitrogen), 1,3µl de DNA-polimerase I de *E.coli* (10U/µl, Promega). A mistura foi mantida à 16°C por 2 horas. Em seguida foi adicionado 1,0µl de T4 DNA-Polimerase (5U/µl, Invitrogen) e a reação incubada por 10 minutos à 16°C.

Para purificação do cDNA adicionou-se 102µl de água DEPC e 152µl de fenol tamponado: clorofórmio:isopropanol (25:24:1), seguido de agitação e centrifugação à 20.000g por 5 minutos. Transferiu-se a fase aquosa para um tubo limpo e desprezou-se o restante. Para precipitação do cDNA, adicionamos 1,0µl de acrilamida (5mg/ml, Ambion), 0,5vol. de NH₄AC 7,5M e 2,5vol. de etanol 100% à fase aquosa e mantivemos a mistura à -20°C por 1 hora. As amostras foram centrifugadas a 20.000g, à 4°C, por 30 minutos. Após o descarte do sobrenadante foram lavadas três vezes com 1,5ml de etanol 75%, secadas ao ar e ressuspensas em 10µl de água DEPC.

Para transcrição *in vitro* empregou-se reagentes do kit RiboMax (Promega) e para cada 10µl de cDNA adicionou-se 7,5µl de rNTP 25mM, 5µl de tampão 5X e 5µl de Enzyme Mix (inibidor de RNase e polimerase do fago T7). A reação ocorreu à 37°C por 6 horas e o RNA amplificado (aRNA) foi extraído com Trizol[®], seguindo as especificações do fabricante, e precipitado com 500µl de isopropanol para cada

1ml de Trizol[®]; a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 20.000g, à 4°C por 15 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, secado ao ar e ressuspensionado em 11µl de água DEPC. A eficiência de amplificação e a qualidade do aRNA foram avaliados por análise espectrofotométrica ($Abs_{260/280}$, $Abs_{260/230}$) e eletroforese em gel de agarose, respectivamente.

O RNA amplificado foi marcado de forma indireta de acordo com o protocolo sugerido por COX e SINGER em 2004. Resumidamente, 3,0µg de aRNAs diluídos em 10,4µl de água DEPC foram adicionados a 3,0µl de hexâmeros randômicos a 5,0µg/µl (dN6; Amersham Pharmacia Biotech); 2,0µl de mix RNA controle, totalizando 15,4µl de reação que foi aquecido a 70°C por 10 minutos e resfriado em gelo por 5 minutos. A transcrição reversa e randômica foi realizada ao adicionarmos 8,0µl de tampão de primeira fita 5X (Improm-II[™] Reverse Transcription System, Promega); 9,6µl de MgCl₂ a 25,0mM; 4µl de dNTPs-aminoallyl dUTP composto por 5,0mM de dATP, dCTP, dGTP e 2nM dTTP(Clontech) e 3,0mM de aminoallyl-dUTP (Sigma); 1,0µl de RNAsin a 40U/µl (Promega) e 2,0µl de RTase (Promega). A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos e 42°C por 2 horas; e os aRNAs restantes foram degradados por adição de 20,0µl de solução alcalina (EDTA a 0,25M e NaOH a 1,0M) durante 20 minutos a 75°C. Para ajuste do pH do produto anterior adicionamos 20,0µl de HCl a 1,0M. A seguir precipitamos esta mistura a 300µl de isopropanol acrescido de 400µl de acetato de amônio a 7,5M, 200ng de acrilamida linear e 2,0µl de glicogênio a 20,0µg/µl, por 20 minutos à temperatura ambiente.

Essa metodologia possibilitou a incorporação enzimática da molécula de aa-dUTP à molécula de cDNA, que após precipitação e lavagens em etanol a 75% (v/v), foi então solubilizada em solução de bicarbonato de sódio a 0,065M pH9,0 e fracionada em duas distintas reações de acoplamento relativas à incorporação química das moléculas fluorescentes Alexa555 e Alexa647 (Molecular Probes – Invitrogen). Após incorporação dos corantes à temperatura ambiente por 90 minutos, no escuro, purificamos o cDNA marcado em coluna *QI Aquick PCR Purification* (Qiagen).

4.7.2 Amplificação e marcação de RNA proveniente de cultura macrófagos peritoneais murinos

A amplificação do RNA total das amostras de macrófagos peritoneais murinos foi realizada em dois ciclos. O primeiro ciclo de amplificação foi realizado como descrito no item 4.7.1.

Para o segundo ciclo de amplificação, 1,0µg de aRNA foi concentrado no speed-vac (Labconco) para volume final de 6,7µl, adicionou-se 1,0µl de hexâmeros randômicos (dN6 2,0µg/µl), a mistura foi desnaturada à 70°C por 10 minutos e depois deixada a temperatura ambiente por 2 minutos. Repetiu-se as mesmas etapas anteriormente descritas para síntese de cDNA no primeiro ciclo de amplificação. Para transcrição *in vitro*, usaram-se reagentes do kit RiboMax (Promega) e para cada 4,47µl de cDNA adicionou-se 0,95µl de rATP 100mM, 0,95µl de rCTP 100mM, 0,95µl de rTTP 100mM, 0,48µl de rATP 100mM, 0,95µl de aminoallyl rUTP 50mM, 2,5µl de tampão de reação 5X e 1,25µl de Enzyme Mix (inibidor de RNase e polimerase do fago T7). A reação ocorreu a 37°C por 6 horas e deste ponto em

diante foram repetidos os mesmos passos da primeira fase de amplificação. As amostras foram submetidas à análise espectrofotométrica ($Abs_{260/280}$, $Abs_{260/230}$) e aquelas com razão $Abs_{260/289}$ variando entre 0,22 – 0,32 foram consideradas com boa incorporação de aminoallyl rUTP.

A marcação dos RNAs para hibridização foi realizada através de uma reação de acoplamento químico dos corantes Alexa555 (RNA da amostra da lâmina *main* e RNA referência da lâmina *swap*), ou Alexa647 (RNA da referência da lâmina *main* e RNA da amostra da lâmina *swap*) aos aRNAs com os quais foram incorporados oligonucleotídeos ligados à um radical aminoallyl. Misturou-se 4,0µl de aRNA (10µg) a 1,0µl de tampão de acoplamento (0,5M NaHCO₃ pH9,0) e 5µl de corante (Alexa555 ou Alexa647) dissolvido em DMSO (Sigma). Cada frasco de corante foi dissolvido em 10µl de DMSO e dividido em 2 alíquotas de 5µl, imediatamente antes do uso. Desta forma, para cada amostra estudada foram feitas quatro marcações: para realização do *main*, a amostra marcada com fluoróforo Alexa555 e a referência marcada com o fluoróforo Alexa647, e para realização do *swap*, amostra marcada com Alexa647 e referência marcada com Alexa555. A mistura foi homogeneizada e centrifugada rapidamente e deixada à temperatura ambiente por 90 minutos no escuro. O RNA marcado foi purificado empregando-se os reagentes do kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante para limpeza de RNA, com acréscimo da repetição de uma lavagem da coluna com etanol 80%. As amostras foram quantificadas empregando-se 1,0µl da solução através de espectrofotômetro (NanoDrop Technologies), sob os comprimentos de onda específicos para cada fluoróforo (555nm e 647nm).

4.8 PREPARAÇÃO DO RNA REFERÊNCIA

Todas as amostras foram hibridizadas contra um RNA referência comum de ampla representação gênica visando comparar diferentes amostras e favorecer a detecção de um maior número de *spots*, sem perder o valor estatístico nas análises dos nossos dados.

Na parte do estudo referente às células humanas foi usado como RNA de referência o RNA BD Clontech™ Universal Reference Total RNA – Human (CAT# 636538), este RNA representa uma coleção de RNAs de diferentes tecidos, apresentando ampla representação gênica. Este RNA foi submetido a 1 ciclo de amplificação e foi marcado conforme descrito no item 4.7.1.

Nos experimentos utilizando macrófagos peritoneais murinos foi usado como RNA de referência um pool de RNAs obtidos de órgãos de 2 camundongos diferentes. Para confecção do RNA referência foram coletados o cérebro, coração, músculo esquelético, pulmão e rim de 2 camundongos fêmeas da linhagem CD1 WT. O RNA total de cada órgão foi extraído individualmente usando o reagente Trizol® de acordo com as especificações do fabricante. Após a extração foi feita a quantificação e a verificação da qualidade do RNA total extraído como descrito no item 4.6. Com os RNA de boa qualidade foi feito um pool estoque com 75µg de RNA para ser utilizado como referência. Os procedimentos empregados na amplificação e marcação do RNA referência estão descritos no item 4.7.2.

4.9 HIBRIDIZAÇÃO

Os experimentos de microarray foram feitos em duas etapas: na primeira etapa foi feita a marcação das amostras provenientes de RNAs extraídos a partir de células tratadas ou não com PTX3, e, na segunda etapa, foi feita a hibridização destas amostras marcadas nas lâminas de vidro. Para cada amostra (controle e tratada com PTX3) foram hibridizadas duas lâminas. Em uma das lâminas, a amostra foi marcada com Alexa 555 e o RNA referência com Alexa 647 (lâmina *main*) e na outra lâmina a mesma amostra foi marcada com Alexa 647 e o RNA referência com Alexa 555 (lâmina *swap*) como mostrado nos esquemas das Figuras 1, 2 e 3. Todas as amostras foram hibridizadas junto com um RNA referência comum preparado conforme descrito no item 4.8.

Todos os procedimentos experimentais relacionados aos arrays, incluindo hibridização, aquisição de imagens e análise de dados foram realizados sob a supervisão do Dr. Alex Fiorini de Carvalho no Laboratório de Genômica Funcional do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer de São Paulo, coordenado pelo Dr. Luiz Fernando Lima Reis.

Como foram empregadas duas plataformas diferentes, descreveremos a seguir, separadamente, os procedimentos referentes a cada uma delas.

4.9.1 Plataforma 4.8K ILPC (usada para investigação dos genes em fibroblastos humanos)

No estudo referente às células humanas foram utilizadas as lâminas provenientes do Laboratório de Genômica Funcional do Instituto Ludwig de

Pesquisa para o Câncer (ILPC), que contêm 4.608 cDNAs humanos cujos clones são provenientes do Projeto Genoma do Câncer ILPC/FAPESP.

As etapas de pré-hibridização e lavagem das lâminas foram realizadas conforme descrito por GOMES et al. em 2003. Todas as amostras foram hibridizadas em duplicata, com inversão dos corantes entre a amostra e o referência.

Resumidamente, as lâminas de *cDNA microarray* foram pré-hibridizadas em 23,0 ml de solução contendo 5X de SSC; 5X de Denhardt's (Ficoll 400 0,05g/ml; polivinilpirolidona 0,05g/ml, albumina de soro bovino 0,05g/ml); 0,10% de SDS, e 1% de albumina bovina (BSA) por pelo menos 12 horas a 42°C. Após a pré-hibridização, as lâminas foram lavadas em água MilliQ pH 7.0 a 42°C por alguns segundos, e centrifugadas a 2.160g por 2 minutos. para secagem. Para enfim, serem montadas na estação de hibridização (*Genomic Solutions*).

Paralelamente, os cDNAs marcados (amostra e referência) foram reunidos em um único tubo, ao qual adicionamos 2,0µl de DNA polyA a 1,0µg/µl (Amersham Bioscience) e 2,0µl de *Human Cot-1 DNA*[®] a 1,0 mg/ml (Invitrogen). A seguir, reduzimos o volume final para 8,0µl e adicionamos 50µl de tampão de hibridização (2X de SSC, 0,20% de SDS e 10X Denhardt's); 40µl de formamida e 2,0µl de esperma de salmão a 5,0µg/µl. Mantivemos esta solução sob agitação a 500rpm a 45°C. Os cDNAs marcados em 100µl de tampão de hibridização foram aquecidos a 95°C por 5 minutos e mantidos a 70°C até sua aplicação sobre a lâmina.

A reação de hibridização ocorreu sob as seguintes condições: 70°C por 5 minutos; 55°C por 45 minutos e a 42°C por pelo menos 20 horas.

Uma vez hibridizadas, as lâminas foram submetidas às seguintes lavagens: uma vez em solução de SSC2X pH7.0 (filtrado e pré-aquecido a 42°C) por 10

minutos à temperatura ambiente; duas vezes em solução de SSC 0,1X e SDS 0,10% pH7,0 (filtrado e pré-aquecido a 42°C) por 10 minutos à temperatura ambiente; e finalmente, duas vezes em solução de SSC 0,1X pH7,0 (filtrado e pré-aquecido a 42°C) por 10 minutos à temperatura ambiente. Enfim lavadas, seguimos para centrifugação a 2.140g por 2 minutos para secagem. Já devidamente lavadas e secadas, realizamos o processo de digitalização das lâminas e aquisição das imagens.

4.9.2 Plataforma mouse_v3.0.2 (usada no estudo dos genes em macrófagos murinos)

No estudo referente às células murinas foram empregadas neste trabalho lâminas de vidro com cobertura Ultra Gaps, que têm uma cobertura uniforme de Gamma Amino Propil Silano, provenientes do Fox Chase Cancer Center nas quais 16.128 oligonucleotídeos provenientes de seqüências murinas encontram-se fixados. O acoplamento do fluoróforo na amostra foi feito com o corante Alexa (Invitrogen), porém, diretamente no RNA amplificado em 2 ciclos na presença de aminoallyl rUTP(Sigma). A incorporação do corante na amostra foi verificada por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop (NanoDrop Technologies) sob os comprimentos de onda específicos para cada um dos fluoróforos (555nm e 647nm). .

O protocolo para hibridização destas lâminas precisou ser otimizado uma vez que aquele sugerido pelo fabricante não se mostrou eficiente. Foram testados o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Genômica Funcional do ILPC-São Paulo, o protocolo de Church e Gilbert, o protocolo sugerido pelo Fox Chase Cancer Center para câmara úmida e o protocolo sugerido pela Corning para uso nas lâminas Ultra

Gaps. Cada etapa destes protocolos testados encontra-se descrita detalhadamente no item ANEXOS (Anexo 1). O protocolo final padronizado e utilizado neste projeto é descrito a seguir.

As lâminas de *oligo microarray* foram pré-hibridizadas a 42°C por aproximadamente 3 horas em solução contendo 5X de SSC (NaCl 3M, citrato de sódio hidratado 0,3M); 5X de Denhardt's (Ficoll 400 0,05g/ml; polivinilpirolidona 0,05g/ml, albumina de soro bovino 0,05g/ml); 0,10% de SDS (Sigma), e 1% de albumina bovina (BSA).

Para hibridização foram usados 7,0µg de aRNA marcado com fluoróforo dos quais 3,5µg eram da amostra e 3,5µg da referência, enquanto que a solução de hibridização continha 5X Denhardt's, 25% de formamida (Sigma), 5X SSC, 0,1%SDS, 0,1mg/ml de esperma de salmão (GE Health Care), 0,1mg/ml de Poly A (GE Health Care) em volume final de 100µl. A hibridização foi feita na estação de hibridização Gene Tac (Genomic Solutions) à 42°C por aproximadamente 16 horas.

As lâminas foram retiradas do cassete de hibridização em um recipiente contendo solução 2XSSC / 0,1% SDS à 42°C, e suas etiquetas de identificação foram “esfregadas” manualmente para retirada de possíveis partículas e cola que poderiam grudar nela. Depois as lâminas foram acomodadas horizontalmente dentro de um suporte de outro recipiente contendo a mesma solução, porém nova, onde foram lavadas por 5 minutos a 42°C. Em seguida foram lavadas por duas vezes de 5 minutos cada numa solução contendo 0,1X SSC e 0,1% de SDS à temperatura ambiente. Depois foram submetidas a 5 lavagens de 1minuto cada, à temperatura ambiente, numa solução de 0,1X SSC. A secagem foi feita na centrífuga a aproximadamente 2.140g por 5 minutos com a lâmina na posição vertical com a

etiqueta de identificação voltada para a base. Uma vez lavadas e secadas, prosseguimos com a digitalização das lâminas e aquisição das imagens.

4.10 DIGITALIZAÇÃO DAS IMAGENS E QUANTIFICAÇÃO

Os sinais gerados foram capturados por scanner confocal a laser (*ScanArrayTM Express Microarray Acquisition System – Packard Bioscience Biochip Technologies*), usando-se uma resolução de 10 microns e sensibilidade de captação PMT de 60% para ambos os canais no caso das lâminas 4.8k e PMT 60% para o canal 1 (Alexa555) e 70% para o canal 2 (Alexa647) no caso das lâminas mouse_v3.0.2. Cada hibridização gerou uma tabela de dados para cada canal correspondente aos corantes Alexa555 e Alexa647.

A quantificação das intensidades dos *spots* e *background* médio local de todas as lâminas foram feitas aplicando-se o método Histograma do *software ScanArray Express - Packard Bioscience Biochip Technologies*, conforme sugerido por GOMES et al. em 2003. Os valores de intensidade R e G referem-se à incorporação dos corantes Alexa647 (*RED*) e Alexa555 (*GREEN*).

4.11 ANÁLISE DA QUALIDADE DAS HIBRIDIZAÇÕES

A análise da qualidade das hibridizações dos resultados das hibridizações dos microarrays foi feita pelo Laboratório de Bioinformática da Fundação Antônio Prudente – Hospital AC Camargo. Para normalização dos dados, ajustando variações sistemáticas não-lineares, ambas do tipo intensidade dependente, principalmente para

spots de baixa intensidade, foi empregado o método de regressão linear localmente ponderada LOWESS (*Locally Weighted Scatter-plot Smoothing*). Primeiramente, representações gráficas do tipo *scatter-plot* foram geradas para cada lâmina, individualmente (gráficos *MA-plot*). Nos gráficos do tipo *MA-plot*, M representa a razão entre a intensidade R (Red) e G (Green) em $\log_2$ ($M = \log_2 R/G$) e A representa a média da soma das intensidades R e G, também em $\log_2$ ($A = 1/2 \log_2 RG$).

Para determinação da reprodutibilidade do nosso experimento em que hibridizações em duplicata foram feitas (*main* e *swap*), determinamos o Índice de Correlação de Pearson, que permite verificar se existe correlação linear entre os dados e apresentamos a distribuição dos pontos em um gráfico de dispersão denominado MM-plot.

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos resultados das hibridizações dos microarrays foram feitas em colaboração com a Dra Helena Brentani do Laboratório de Bioinformática da Fundação Antônio Prudente – Hospital AC Camargo. Esta análise teve como objetivo a identificação dos genes diferencialmente expressos nas duas condições de tratamento.

Para identificação de genes modulados por PTX3 em fibroblastos humanos (GM637) utilizamos o teste *t de Student* através do sistema *on line* PowerArray (http://www.lbhc.hcancer.org.br/power_array/) considerando as lâminas dos grupos em comparação como independentes (*main* e *swap*).

As análises para identificação de genes modulados por PTX3 em macrófagos residentes (REST X RESC) e em macrófagos recrutados por tioglicolato (TIOT X TIOC) e as análises para identificação dos genes modulados por tioglicolato (TIOC X RESC) foram realizadas pelo teste *t de student* através do sistema *on line* PowerArray (http://www.lbhc.hcancer.org.br/power_array/) considerando as lâminas dos grupos em comparação como independentes (*main* e *swap*).

As análises para identificação de genes modulados pelo efeito combinado de PTX3 e tioglicolato foram realizadas através do teste estatístico de two-way ANOVA utilizando a média (*main* e *swap*) dos elementos presentes em todas as lâminas (RESC1, C2 e C3 *main* e *swap*, REST1, T2 e T3 *main* e *swap*, TIOC1, C2 e C3 *main* e *swap* e TIOT1, T2 e T3 *main* e *swap*).

4.13 REAL TIME PCR

Para analisar a expressão dos genes encontrados como diferencialmente expressos em resposta a PTX3 em fibroblastos humanos por Real Time PCR foi realizada a síntese de cDNA a partir do mesmo RNA total utilizado nos experimentos de microarray. As duas amostras controle (C3 e C4) e as duas amostras tratadas com rhPTX3 (PTX3-1 e PTX3-2) foram submetidas à transcrição reversa.

A análise da expressão de mediadores inflamatórios e dos genes encontrados como diferencialmente expressos em resposta à PTX3 por microarray em macrófagos murinos foi feita por Real Time PCR a partir de RNA total extraído de cinco pools de macrófagos peritoneais murinos tratados ou não com a proteína, diferentes daqueles usados nos experimentos de microarray.

Para analisar a expressão dos genes encontrados como diferencialmente expressos em resposta a tioglicolato por Real Time PCR realizamos a síntese do cDNA a partir de seis pools de macrófagos residentes e seis pools de macrófagos recrutados por tioglicolato, diferentes daqueles usados nos experimentos de microarray.

4.13.1 Síntese de cDNA

O RNA total de células tratadas ou não com PTX3 foram submetidos à transcrição reversa. Dois microgramas de RNA total, 1µl de oligodT (500µg/ml) e H₂O DEPC qsp. 5µl foram misturados, incubados a 70°C por 10 minutos e em seguida a reação foi mantida no gelo. Em seguida, foram adicionados à reação 4,3µl de H₂O DEPC, 4,0µl de tampão Improm 5X, 3,2µl de MgCl₂ (25mM), 2,0µl de dNTP mix (10mM), 0,5µl de RNasin (40U/µl) e 1,0µl da enzima Improm RT (Promega) e a reação foi incubada a 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

4.13.2 Controle da qualidade do cDNA

Para controle da qualidade do cDNA sintetizado, foram feitas amplificações por PCR do gene constitutivo GAPDH e o produto amplificado foi analisado pelo fracionamento eletroforético do *amplicom* em gel de agarose 1%. As reações, em volume total de 25µl, foram feitas sob as seguintes concentrações de reagentes: 2,5µl de 10X PCR Buffer (1X); 0,75µl de MgCl₂ (50mM); 0,25µl de dNTP mix (25mM de cada); 0,125µl da enzima Taq polimerase (GIBCO 5U/µl); 1 µl de cada iniciador (10 pmol/µl) (Forward: TTGTGGAAGGGCTCATGACCA, Reverse:

CGTATTCATTGTCATACCAGG); 2 µl de cDNA molde; H₂O tratada com DEPC q.s.p 25 µl. Os parâmetros estabelecidos para as reações de PCR foram os seguintes: 95°C/5 minutos -1 ciclo; 95°C/30s, 55°C/45s, 72°C/1 minuto – 35 ciclos; 72°C/10 minutos –1 ciclo. O produto amplificado foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

4.13.3 Desenho de iniciadores específicos

A sequência ORESTES dos cDNAs fixados na lâmina 4.8k do ILPC foi obtida no banco de dados do Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/index.cgi>), com o Geo Acession GPL1930.

A sequência dos genes correspondentes aos oligonucleotídeos imobilizados na lâmina foi obtida no banco de dados do NCBI (*Entrez Gene*) a partir do GeneID indicado no mapeamento da plataforma mouse_v3.0.2. Quando o gene apresentava mais de 1 transcrito foi feita uma análise por BLAT (*BLAST-like alignment tool*), alinhando a sequência do oligonucleotídeo ao genoma para verificar os éxons ideais para o desenho dos iniciadores.

Após a identificação de cada sequência, iniciadores específicos para cada gene selecionado foram desenhados com o auxílio do programa *Primer Express* versão 3.0 (*Applied Biosystems*). Os parâmetros estabelecidos no software *Primer Express* para o desenho dos iniciadores foram: amplificar fragmentos com tamanho entre 50 e 150pb, apresentar conteúdo CG entre 30 e 80%, apresentar temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C e não possuir capacidade de anelamento entre si ou de formar estrutura secundária estável. Além desses parâmetros, os primers foram desenhados em éxons diferentes, para evitar a amplificação a partir do transcrito e do

DNA genômico de *amplicons* de mesmo tamanho; região de anelamento na extremidade 3' do gene para evitar artefatos gerados durante a síntese de cDNA e para garantir amplificação de cDNAs sintetizados de mRNA de todos os tamanhos e maior representatividade uma vez que foi usado oligo dT na RT.

As seqüências dos iniciadores utilizados para analisar a expressão em fibroblastos humanos (GM637) estão representados na Tabela 1. Na Tabela 2 são mostradas as seqüências dos iniciadores desenhados para análise da expressão em resposta à tioglicolato e na Tabela 3, as seqüência dos iniciadores desenhados para análise de expressão por QPCR de alguns dos mediadores inflamatórios modulados em macrófagos estimulados por PTX3.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores desenhados para validação por Real Time PCR – fibroblastos humanos (GM637).

Gene	Orestes	Iniciadores		Amplicon (pb)
<i>KIAA0893</i>	CM1-AN0080-521-D08	Fw	TTGGCACAACATTTTCATGGAA	65
		Rv	ACGACCACTGGGATCTACAGCTA	
<i>PIP3-E</i>	PM0-HN0073-008-G05	Fw	TCCACAAAATCCGAACATTGAA	68
		Rv	CTGGTTAATCATGGCCAGATCA	
<i>USP16</i>	QV0-CT0386-120-A04	Fw	ACCGCAAATAGTCATCTCTCTAATCTT	77
		Rv	TGCCCTTTTGATTCCATTTC	
<i>MDM2</i>	QV0-BT0847-410-G07	Fw	TGAAGAAGGACAAGAAGTCTCAGATG	71
		Rv	TCTCCCCTGCCTGATACACAGT	
<i>MTR</i>	MR1-HN0069-013-H11	Fw	TGGAGACTCGCAGACATCGA	65
		Rv	GGTGCCATTGCTAATGATTCTGT	
<i>KIAA1040</i>	CM0-GN0111-569-D04	Fw	GCTTAACAAGGGCTCAATACATTCT	75
		Rv	TCCTCTCTCAAACGAATATCAATCTC	
<i>ZDHHC6</i>	PM3-HT0344-001-B02	Fw	AAACAAAAGCAGATAAGAGAGTCAGAA	74
		Rv	GGGCAGCAGGCACCACTATA	
<i>BCAP31</i>	RC0-CN0028-012-D10	Fw	GGCCTCACCAAGGAGTACGA	77
		Rv	TTGTCCATGGGACCATCTACTG	
<i>H326</i>	QV1-BT0182-520-C10	Fw	GGGCCCAGTATGTTAAGAGATACAA	71
		Rv	GCCATAGAAAATTGACGCCTTTT	
<i>INADL</i>	PM3-HT0909-018-E07	Fw	GCCGCACGGACACAGAA	58
		Rv	GTTGCCCGTTAATGCTGACA	
<i>MRE11A</i>	MR3-CT0531-001-C07	Fw	TTTTCTTACCACTTCAAAGACAGATC	66
		Rv	TGGGACATGATTTTGCTGGAT	
<i>PTTG1IP</i>	RC2-BN0332-011-E03	Fw	TGAAGACAAGACATGATGAAATCAGA	90
		Rv	GAGCGCTTTAGTTGTTTCAAATCT	
<i>SEC24C</i>	CM1-GN0160-498-A04	Fw	TCTTCTTCTACCCTCGGCTCTTAC	66
		Rv	CTGGTGGTTTCGGTAGTACTCTCAA	
<i>TRPC4AP</i>	QV3-DT0012-021-H05	Fw	TCCCTGGACCGATTGAAAA	66
		Rv	CAGGCGGCATTCAGACAGTA	

Tabela 2- Sequência dos iniciadores desenhados para validação por Real Time PCR- genes murinos diferencialmente expressos em resposta à tioglicolato

Gene	Gene ID	Iniciadores	Amplicon (pb)
<i>Aadac11</i>	320024	Fw CGGCCCTGGGACAACA Rv GCCTGCAGTTTGTAGCTTATTCTTC	61
<i>Eif4g1</i>	208643	Fw CAGGCCCTTGTAAGTACCTTAGA Rv TCCTCATCATATAGAGCATCAAAGAAC	74
<i>Dusp11</i>	72102	Fw AGAGCTCACCGTACTCACTCAGAA Rv GACAAGGCCTCTCTGGTAAACACT	65
<i>Ly75</i>	17076	Fw TGCAAGAGCTGTCTGCAAAATT Rv GGCAAACAGGATGGCTATGC	64
<i>Gclc</i>	14629	Fw CACCCGATGCAGTATTCTGAACTAC Rv CACCTGGCAACAGTCATTAGTTCT	78
<i>Hif1a</i>	15251	Fw AATGGAACGGAGCAAAAGACTATT Rv TGCCCCAGCAGTCTGCAT	65
<i>Icam2</i>	15896	Fw CCGCAGCATCTCGGAGTAC Rv GACCATTGTTGTCTCTGCAT	64
<i>Polr3a</i>	218832	Fw TGCCTACTTTGGGCAGAAAGA Rv CGGGATTCCCATGATGATG	64
<i>Efnb2</i>	13642	Fw AGTCCCTTTGTGAAGCCAAATC Rv ATGCCCCGCGCTGTT	57
<i>Rpl36a</i>	19982	Fw TGGTGGGCAGACTAAGCCTATT Rv CCAGTCTCAGCACAATCTTCTTTG	68
<i>Rps24</i>	20088	Fw ATGTTGGTGCTGGCAAAAAGT Rv CAAGTCACCGCAGATCTACTCCTT	67
<i>Furin</i>	18550	Fw CAGCGGCAACCAGAATGAG Rv CCTGTGTGAGATTCTGTGCACTTC	68
<i>Il1b</i>	16176	Fw TCCACCTCAATGGACAGAATATCA Rv GGTTCTCCTTGTACAAAGCTCATG	67

Tabela 3 – Sequência dos iniciadores desenhados para análise de expressão por QPCR de alguns dos mediadores inflamatórios modulados em macrófagos estimulados por PTX3.

Gene	GeneID	Iniciadores	Amplicon (pb)
<i>Il18</i>	16173	Fw CTCAAACCTTCCAAATCACTTCCT	72
		Rv GTTGACGCAAGAGTCTTCTGACA	
<i>inos</i>	18126	Fw GCTGCCCGGCAAACC	55
		Rv GGCCAGCTGCTTTTGCA	
<i>MyD88</i>	17874	Fw TTTGTCCCTGCCCTGAAGAT	69
		Rv GGCTCCGCATCAGTCTCATC	
<i>Il6</i>	16193	Fw CAGAGATACAAAGAAATGATGGATGCT	83
		Rv CAGAAGACCAGAGGAAATTTCAATA	
<i>Ifng</i>	15978	Fw AAGGCGAAAAAGGATGCATTC	63
		Rv CTGGACCTGTGGGTGTTGAC	
<i>Mcp1</i>	20296	Fw CAGGTGTCCCAAAGAAGCTGTAG	63
		Rv GGGTCAGCACAGACCTCTCTCT	
<i>Il4</i>	16189	Fw GACTCTTTCGGGCTTTTCGA	67
		Rv GTGGACTTGGACTCATTCATGGT	
<i>Tnf</i>	21926	Fw CCACGCTCTTCTGTCTACTGAACTT	78
		Rv TGAGAGGGAGGCCATTTGG	
<i>Tgfb</i>	21803	Fw GGAGCCTGGACACACAGTACAG	59
		Rv GCCCGGGTTGTGTTGGT	
<i>Kc</i>	21898	Fw TCCAAAAGATGCTAAAAGGTGTCC	90
		Rv TGTCAGAAGCCAGCGTTCAC	
<i>Tlr4</i>	21898	Fw TCAGAACTTCAGTGGCTGGATTT	66
		Rv ATGCCATGCCTTGTCTTCAAT	
<i>Tlr2</i>	24088	Fw GCATCACCGGTCAGAAAACA	69
		Rv CTCGTAGCATCCTCTGAGATTGA	
<i>Il1b</i>	16176	Fw TCCACCTCAATGGACAGAATATCA	67
		Rv GGTTCTCCTTGTACAAAGCTCATG	
<i>Tlr6</i>	21899	Fw TGGTACCGTCAGTGCTGGAA	83
		Rv AGAGGCTATCCCAGAGGGACTT	

4.13.4 Padronização das reações de Real Time PCR utilizando os iniciadores específicos selecionados

Para quantificação do produto gerado durante as reações de Real Time PCR foi utilizado o corante SYBR[®] Green Dye (Applied Biosystems). Esse reagente tem afinidade pela dupla fita de DNA e, quando ligado à dupla fita, emite uma fluorescência cerca de 100 vezes maior, permitindo quantificar em tempo real a amplificação do DNA.

As reações foram realizadas em volume final de 20µl, utilizando 5µl de cDNA diluído 50 vezes a partir do volume final da síntese de cDNA (~10ng), 5µl de iniciadores com concentração variando entre 0,4 e 1,6µM, de acordo com o gene, e 10µl de *2X Master Mix SYBR® Green* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em termociclador ABI Prism® 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos (etapa de ativação da enzima AmpErase®, um controle do fabricante contra eventuais contaminações com produto amplificado), 95°C por 10 minutos (etapa de ativação da enzima DNA polimerase TaqGold), e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (etapa de desnaturação) e 60°C por 1 minuto (etapa de anelamento dos iniciadores e extensão do amplicon). No final da reação, a especificidade da reação foi avaliada através da curva de dissociação do produto amplificado e, quando necessário, através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com prata do produto amplificado.

Os resultados obtidos foram analisados com o programa 7300 System SDS Software. O programa gera um gráfico de intensidade de fluorescência em função do número de ciclos de amplificação. Um limiar (*threshold*) é definido manualmente, onde a intensidade de fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (background) e a curva encontra-se na fase logarítima de amplificação. O ciclo da reação onde a fluorescência da amostra intercepta o *threshold* é chamado Ct (cycle threshod), e a comparação da expressão gênica de diferentes amostras é feita através da comparação entre os Cts. Amostras com Cts maiores apresentam menores quantidades do gene alvo no cDNA molde inicial na reação.

A primeira etapa da padronização das reações de Real Time PCR consistiu em determinar a concentração ideal de iniciadores nas reações, para isso, foram

utilizadas diferentes concentrações de iniciadores em concentração fixa de cDNA molde. Foi escolhida a menor concentração que obtivesse maior fluorescência, sem formação de dímeros e variação no Ct (Figura 7A).

A segunda etapa de padronização das reações de Real Time PCR consistiu em determinar a eficiência de amplificação do *amplicon* para cada par de iniciadores. Para isso, foram feitas reações utilizando como molde cinco diluições seriadas de cDNA (Figura 7B). Foi construída uma curva-padrão, da média dos Cts obtidos para cada concentração em função do logaritmo da concentração de cDNA. O coeficiente angular da reta obtida (a , em $y=ax+b$) (Figura 7C) foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação dos iniciadores, obtida através da fórmula:

$$ef = 10^{-1/a}$$

(ef = eficiência, a = coeficiente angular da reta). Foram aceitos valores de eficiência entre 1,7 e 2,3.

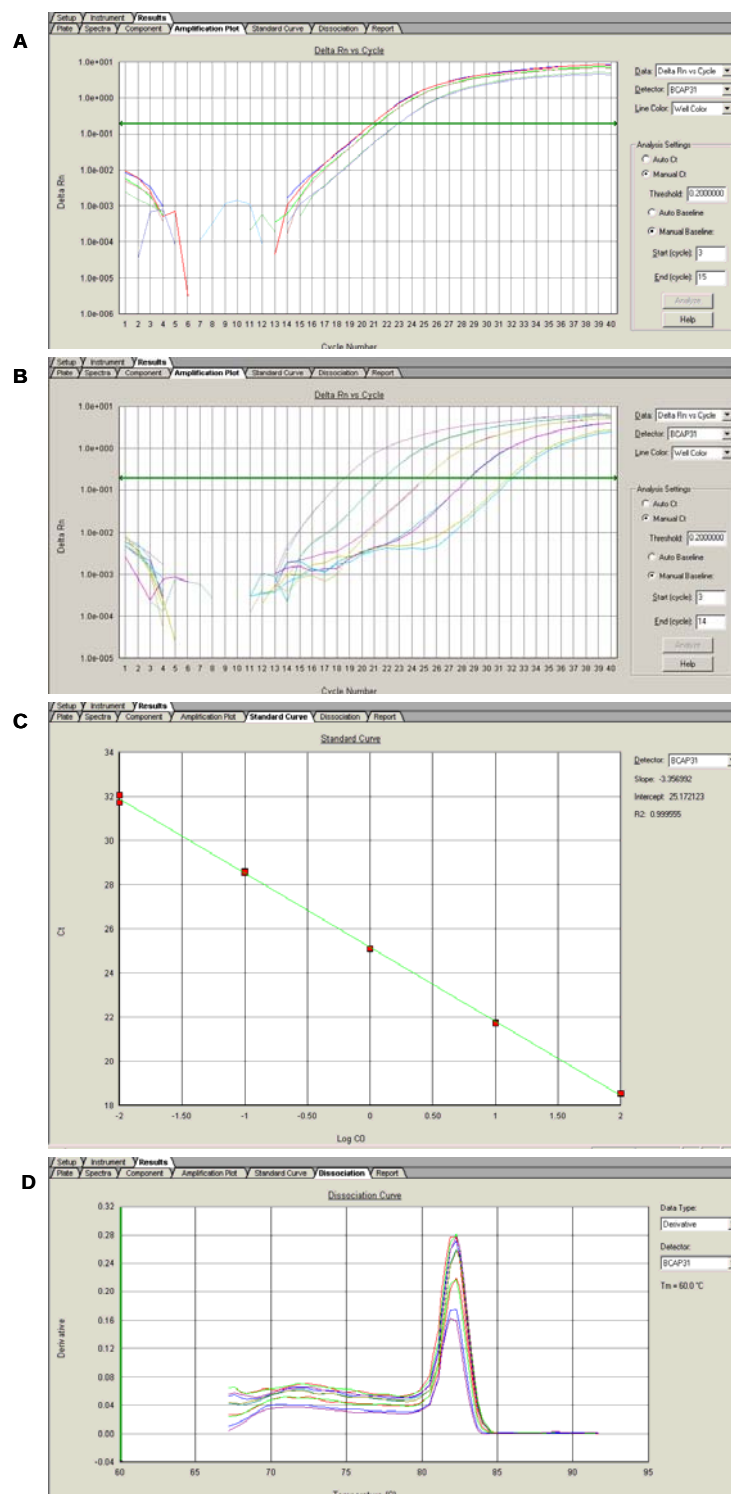
4.13.5 Reações de Real Time PCR específicas para os genes de interesse e cálculo da expressão gênica diferencial

O valores de Ct obtidos pelo programa 7300 System SDS (*Applied Biosystems*) foram usados para o cálculo da diferença de expressão gênica entre as amostras a serem comparadas. A diferença entre os valores de Ct (ΔCt) entre as amostras, após normalização com genes de expressão estável, reflete sua expressão diferencial. Todas as reações foram realizadas em duplicata e foram consideradas aceitáveis reações cujo desvio padrão entre as duplicatas foi menor que 0,05. Utilizamos como normalizador o gene HPRT1 (*foward*: TGGATATGCCCTTGACTATAATGAGT, *reverse*: GGCTTTTCCAGTTTCACTAATGACA)

que se mostrou um bom controle endógeno por ter apresentado baixa variação entre as amostras.

O cálculo da expressão diferencial relativa (razão de expressão) foi feito segundo PFAFFL (2001), utilizando a fórmula:

$$\text{razão} = \frac{Ef_{\text{gene alvo}}^{(\text{Ct alvo controle} - \text{Ct alvo tratado})}}{Ef_{\text{controle endógeno}}^{(\text{Ct endógeno controle} - \text{Ct endógeno tratado})}}$$



Legenda: **Painel A:** Diferentes concentrações de iniciadores em concentração fixa de cDNA. **Painel B:** Diferentes diluições seriadas de cDNA molde. **Painel C:** Curva-padrão obtida para as reações realizadas em B. **Painel D:** Curva de dissociação utilizada para avaliar a especificidade da reação e a possível formação de dímeros de *primers*.

Figura 7 – Padronização das reações de Real Time PCR para o gene BCAP31.

5 RESULTADOS

5.1 PARTE I – REFERENTE AO ESTUDO COM FIBROBLASTOS HUMANOS

5.1.1 Cultura de fibroblastos, extração do RNA, amplificação e síntese de cDNAs marcados:

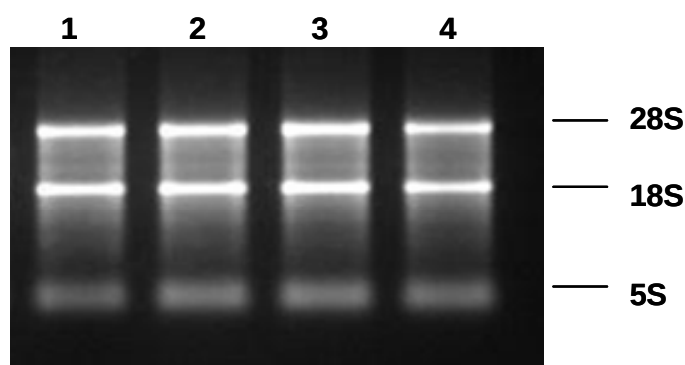
Os fibroblastos humanos da linhagem GM637 foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino até atingirem aproximadamente 80 a 90% de confluência em placas de 9cm de diâmetro. O meio foi então substituído por um novo e em duas das quatro placas foi acrescentada a rhPTX3 (10µg/ml). As placas foram incubadas por 3 horas e, em seguida foi feita a extração do RNA total utilizando o reagente Trizol, seguindo o protocolo descrito em material e métodos. Na Figura 8 é mostrado o fracionamento eletroforético de 1µg de cada um dos RNAs. Como pode ser observado na figura, a intensidade e a definição das bandas correspondente aos RNAs ribossomais 28 e 18S (com a banda correspondente ao 28S com a intensidade maior que a de 18S) atestam a qualidade do RNA obtido. O rendimento da extração de RNA de fibroblastos humanos (GM637) variou de 30,2 a 40,1 µg/placa.

Três microgramas de RNA total foram submetidos a 1 ciclo de amplificação como detalhadamente descrito no item 4.7.1. Na eletroforese mostrada na Figura 9, observa-se o perfil do RNA amplificado (aRNA) nas quatro amostras utilizadas no projeto. Como pode ser observado na figura, o perfil dos aRNAs obtidos com a

amplificação indicou a obtenção de transcritos cujos tamanhos variaram, em média, de aproximadamente, 3400 a 500 bases com pico de predominância no tamanho de 1500 bases. Esse perfil indica uma boa eficiência do processo de amplificação e uma boa representatividade de transcritos, uma vez que a maioria dos mRNA encontrados nas células tem o tamanho médio de 1500 bases. O rendimento médio obtido com 1 ciclo de amplificação do RNA foi de 8,3 vezes.

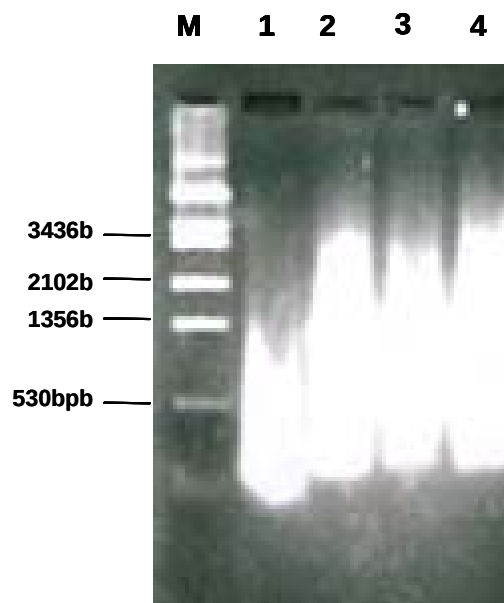
A transcrição reversa para obtenção de cDNAs marcados foi feita utilizando aRNAs em presença de amino allyl dUTP e o acoplamento utilizando o corante Alexa, DMSO e tampão de acoplamento seguindo protocolo descrito em material e métodos.

O RNA universal utilizado como referência comum (BD Clontech™ Universal Reference Total RNA - Human) foi submetido aos mesmos procedimentos de amplificação e marcação dos RNAs das amostras.



Legenda: Canaletas 1 e 2: RNA total extraído de fibroblastos controle. Canaletas 3 e 4: RNA total extraído de fibroblastos tratados com PTX3 (10µg/ml por 3h).

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio de RNA total extraído de fibroblastos humanos (GM637) tratados ou não com PTX3.



Legenda: Canaletas 1 e 2: Amostras de aRNA provenientes de fibroblastos tratados com PTX3. Canaletas 3 e 4: amostras de aRNA provenientes de fibroblastos controle. M: Pel Hind III

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio de RNA amplificado (aRNA) proveniente de RNA total de fibroblastos tratados ou não com PTX3.

5.1.2 Análise da qualidade das hibridizações das lâminas 4.8K

Após as hibridizações das sondas marcadas nas plataformas 4.8K seguindo o protocolo descrito no item **4.9.1**, foi feita uma etapa de aquisição de imagens conforme especificado em **4.10**.

A análise da qualidade das lâminas hibridizadas foi realizada pelo Laboratório de Bioinformática do Hospital do Câncer AC Camargo. Para normalização dos dados, ajustando variações sistemáticas lineares e não-lineares ambas do tipo intensidade dependentes, principalmente para *spots* de baixa intensidade, foi empregado o método de regressão linear localmente ponderada LOWESS (*Locally Weighted Scatter-plot Smoothing*).

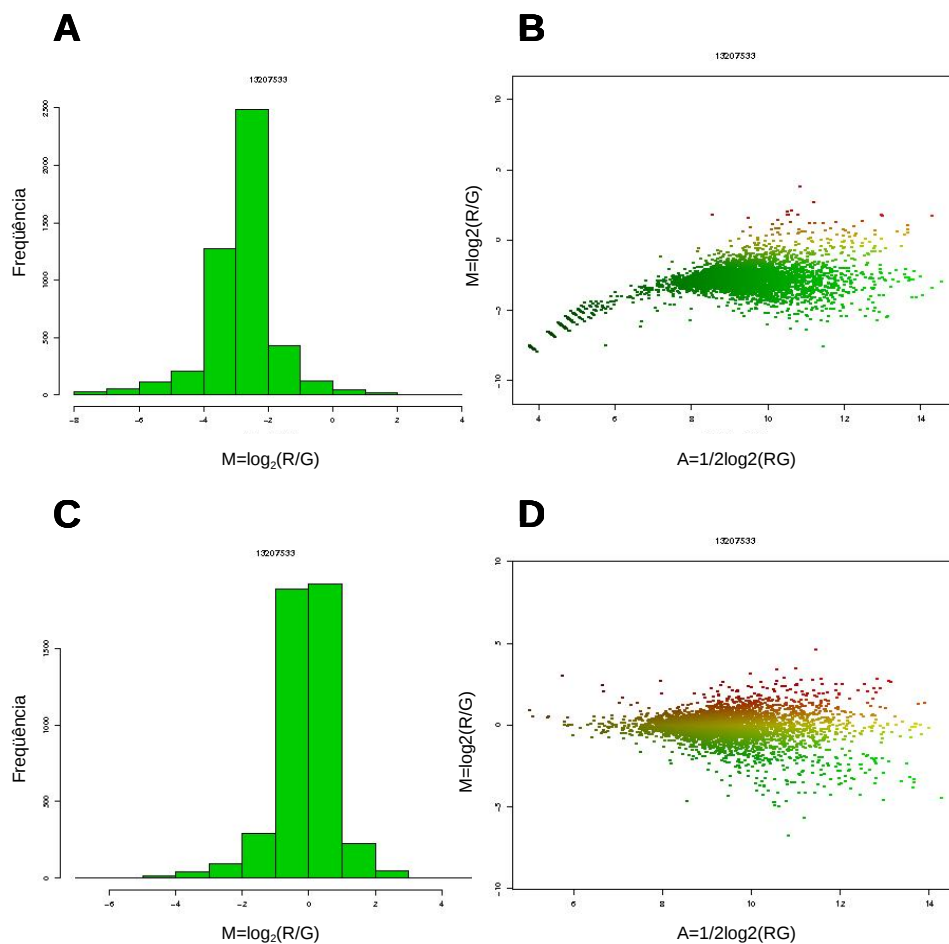
Primeiramente, representações gráficas tipo *scatter-plot* foram geradas para cada lâmina, individualmente (gráficos *MA-plot* - Figura 10 (*main*) e 11 (*swap*)). Nos

gráficos tipo *MA-plot*, M representa a diferença entre a intensidade R e G, em $\log_2$ ($M = \log_2 R/G$) e A (intensidade total), a média entre as intensidades R e G, também em $\log_2$ ($A = \frac{1}{2} \log_2 RG$). Os valores de intensidade R e G referem-se à incorporação dos corantes Alexa 647 (RED) e Alexa 555 (GREEN).

Na Figura 10 são mostrados os dados obtidos à partir da hibridização dos arrays com a amostra Controle 4 (C4) marcada com Alexa 555 contra o aRNA de referência marcado com Alexa 647, ou seja, a lâmina que denominada de “main”. Já na Figura 11 são mostrados os dados obtidos da lâmina “swap” para a mesma amostra, ou seja, agora a amostra foi marcada com Alexa 647 e o referência com o fluoróforo Alexa 555. A análise apresentada visou avaliar a influência da intensidade do sinal *versus* as razões de expressão de cada gene (razão x média de intensidade).

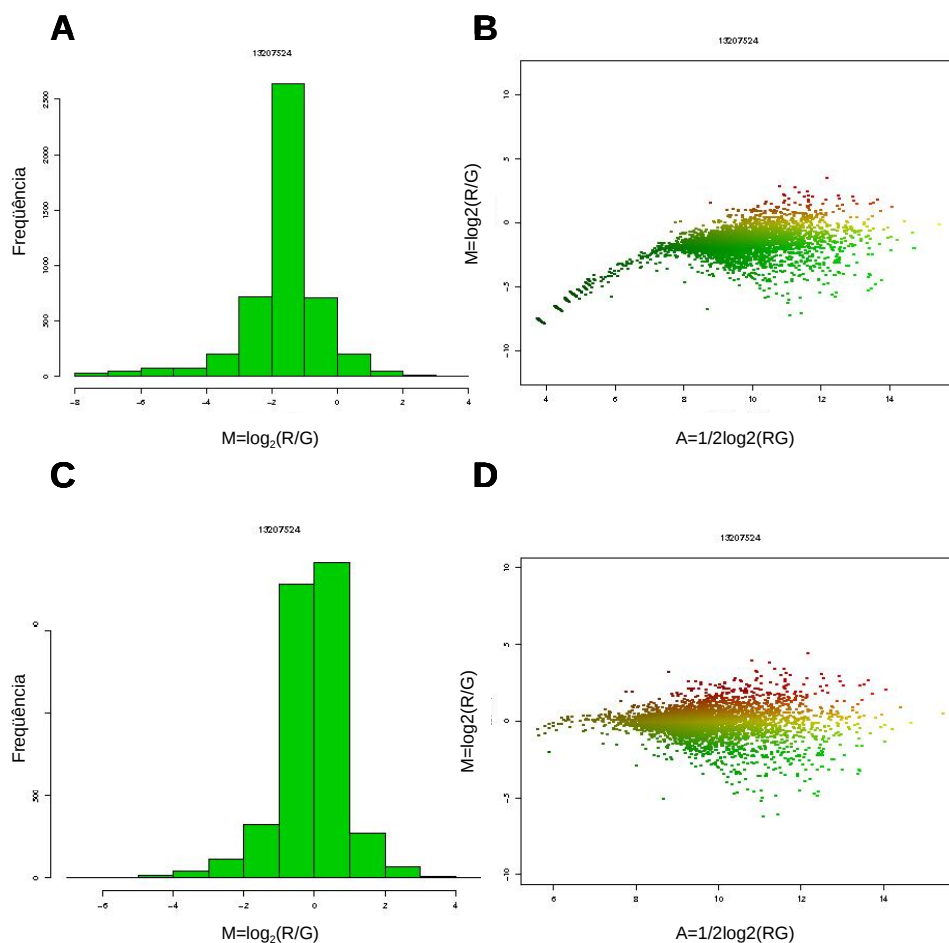
Quando se realizam hibridizações em duplicata (main e swap), torna-se necessário determinar a reprodutibilidade do experimento. Nesse sentido, calcula-se o Índice de Correlação de Pearson, que permite verificar se existe correlação linear entre os dados. Quanto mais próximo de 1 for este coeficiente, maior a similaridade entre os experimentos realizados. Representações gráficas tipo *MM-plot* foram geradas para cada amostra (razão main x razão swap – Figura 12). Todas as lâminas apresentaram um bom índice de correlação sendo que, após normalização, o menor índice obtido foi de 0,8537 e o maior de 0,9013.

As Figuras 10, 11 e 12 são referentes à lâmina hibridizada com a amostra controle 4 e são representativas das demais lâminas hibridizadas com outras amostras (PTX3-1, PTX3-2, C3).



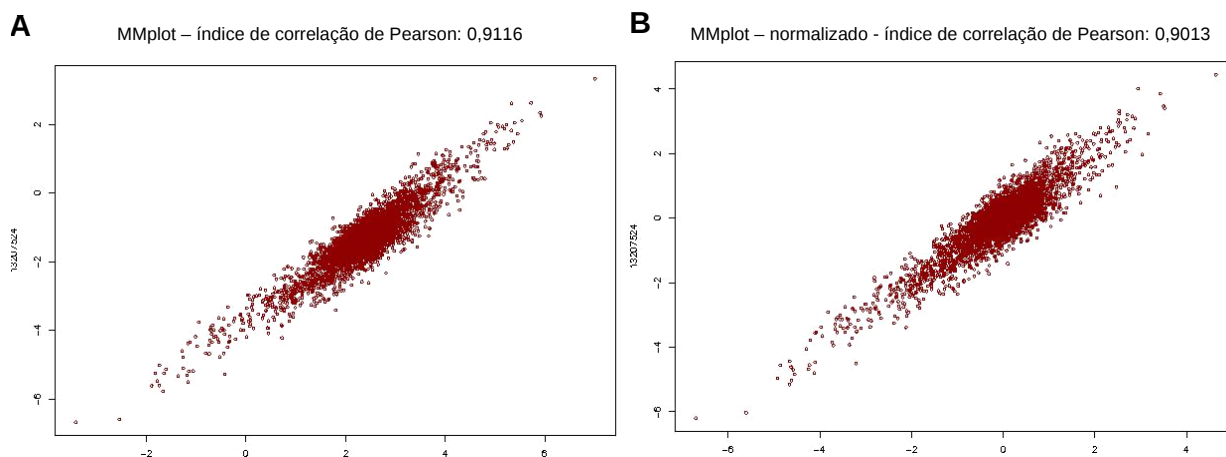
Legenda: Utilizou-se para normalização o método de regressão não linear de LOWESS. A) Frequência da razão dos dados não normalizados; B) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados não normalizados; C) Frequência da razão dos dados após sua normalização; D) Gráfico do tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados normalizados.

Figura 10 - Exemplo da normalização dos dados obtidos para lâmina *main* - a amostra controle 4 (marcada com Alexa 555) e referência (marcada com Alexa 647).



Legenda: Utilizou-se para normalização o método de regressão não linear de LOWESS. A) Frequência da razão dos dados não normalizados; B) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados não normalizados; C) Frequência da razão dos dados após sua normalização; D) Gráfico do tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados normalizados.

Figura 11 - Exemplo da normalização dos dados obtidos para a lâmina *swap* – a amostra controle 4 (marcada com Alexa 647) e referência (marcada com Alexa 555).



Legenda: A) Índice de correlação das razões não normalizadas B) Índice de correlação das razões normalizadas.

Figura 12 - Representação gráfica tipo *MM-plot* para a amostra Controle 4 (razão lâmina main X razão lâmina swap).

5.1.3 Análises estatísticas

Após a verificação da qualidade das lâminas hibridizadas e normalização dos dados, as análises estatísticas foram feitas no sentido de comparar o perfil de expressão gênica de fibroblastos humanos tratados com rhPTX3 com aquele de fibroblastos não tratados. Todas as análises foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Bioinformática do Hospital do Câncer através do sistema *on line* PowerArray (http://www.lbhc.hcancer.org.br/power_array/).

Cada lâmina foi considerada independentemente de forma que obtivemos oito dados para cada gene, quatro dados provenientes das lâminas tratadas com PTX3 e quatro dados das lâminas não tratadas com a proteína. Foi calculada a média dos grupos (tratados com PTX3 e não tratados) e foram selecionados os genes que apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$ no teste *t de Student*). Dessa forma, foram encontrados 143 genes diferencialmente expressos, sendo 62

modulados positivamente e 81 negativamente por PTX3. Dentre estes genes, selecionamos aqueles com tamanho da diferença (razão tratado/controle) maior que 1,3, e dessa forma, encontramos 37 genes diferencialmente expressos (Tabela 4), 22 genes regulados negativamente e 15 genes regulados positivamente por PTX3. Os dados destes genes foram utilizados na construção de um cluster hierárquico (Figura 13), representando de forma mais ilustrativa a diferença no padrão de expressão entre as culturas controle e aquelas tratadas com PTX3 utilizando os critérios adotados ($p\text{-valor} < 0.05$ e razão de expressão > 1.3).

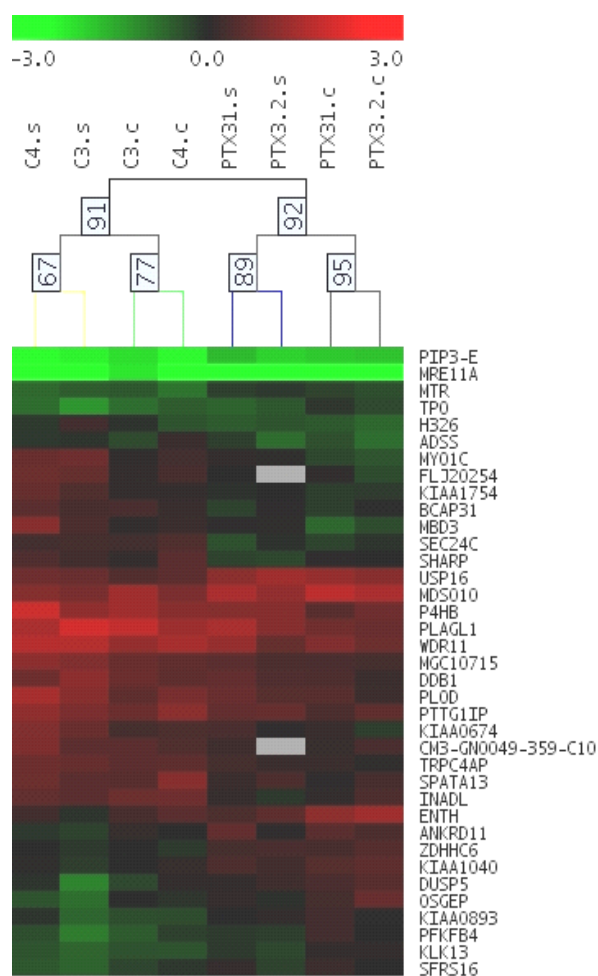
A lista de genes diferencialmente expressos foi submetida à análise no banco de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Como pode ser observado na Tabela 5, dentre os genes identificados como diferencialmente expressos aplicando os critérios descritos, há elementos envolvidos comunicação intercelular, metabolismo de açúcares e aminoácidos e em importantes via de sinalização, como MAPK e JAK-STAT.

Tabela 4 - Lista dos identificados como diferencialmente expressos em resposta à rhPTX3 em fibroblastos humanos (GM637) considerando $p < 0,05$ (*t-Student*) e razão de expressão (PTX3/CONT) $> 1,3$.

Gene Name	pvalor	razão PTX3/ controle	Descrição
MRE11A	0,000	-1,55	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A
MBD3	0,000	-1,54	methyl-CpG binding domain protein 3
PLAGL1	0,030	-1,52	pleiomorphic adenoma gene-like 1
MYO1C	0,039	-1,49	myosin IC
WDR11	0,021	-1,45	WD repeat domain 11
INADL	0,026	-1,44	InaD-like protein
FLJ20254	0,028	-1,44	hypothetical protein FLJ20254
P4HB	0,006	-1,44	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase
PLOD	0,029	-1,43	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase
SEC24C	0,002	-1,41	SEC24 related gene family, member C
KIAA0674	0,028	-1,41	KIAA0674 protein
SPATA13	0,019	-1,38	spermatogenesis associated 13
MGC10715	0,000	-1,37	novel C2H2 type zinc finger protein
TRPC4AP	0,008	-1,37	transient receptor potential cation channel, subfamily C
SHARP	0,005	-1,35	SMART/HDAC1 associated repressor protein
BCAP31	0,020	-1,35	B-cell receptor-associated protein 31
H326	0,025	-1,34	H326
ADSS	0,025	-1,33	adenylosuccinate synthase
KIAA1754	0,000	-1,33	KIAA1754
PTTG1IP	0,015	-1,32	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein
AL390214	0,000	-1,31	cDNA DKFZp564O2423
DDB1	0,034	-1,30	damage-specific DNA binding protein 1
MTR	0,000	1,30	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase
SFRS16	0,036	1,32	splicing factor, arginine/serine-rich 16
MDS010	0,037	1,32	chromosome 3 open reading frame 9
ZDHHC6	0,008	1,32	zinc finger, DHHC domain containing 6
KLK13	0,008	1,32	kallikrein 13
KIAA1040	0,001	1,33	KIAA1040 protein
TPO	0,030	1,34	thyroid peroxidase
KIAA0893	0,000	1,34	KIAA0893 protein
ANKRD11	0,026	1,35	ankyrin repeat domain 11
PFKFB4	0,005	1,39	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4
PIP3-E	0,019	1,41	phosphoinositide-binding protein PIP3-E
USP16	0,000	1,48	ubiquitin specific protease 16
OSGEP	0,038	1,48	O-sialoglycoprotein endopeptidase
DUSP5	0,029	1,51	dual specificity phosphatase 5
ENTH	0,036	1,51	enthoprotin

Tabela 5 - Genes identificados como diferencialmente expressos da comparação entre fibroblastos tratados ou não com PTX3 com os respectivos módulos funcionais aos quais são relacionados no banco de dados do KEGG (Kyoto Enciclopédia of Genes and Genomes).

Gene Name	Módulo funcional no KEGG
INADL	Tight junction
PFKFB4	Fructose and mannose metabolism
DUSP-5	MAPK signaling pathway
ADSS	Purine metabolism, Alanine and aspartate metabolism
MTR	Methionine metabolism, One carbon pool by folate
TPO	Tyrosine metabolism, Cytokine-cytokine receptor interaction, Jak-STAT signaling pathway

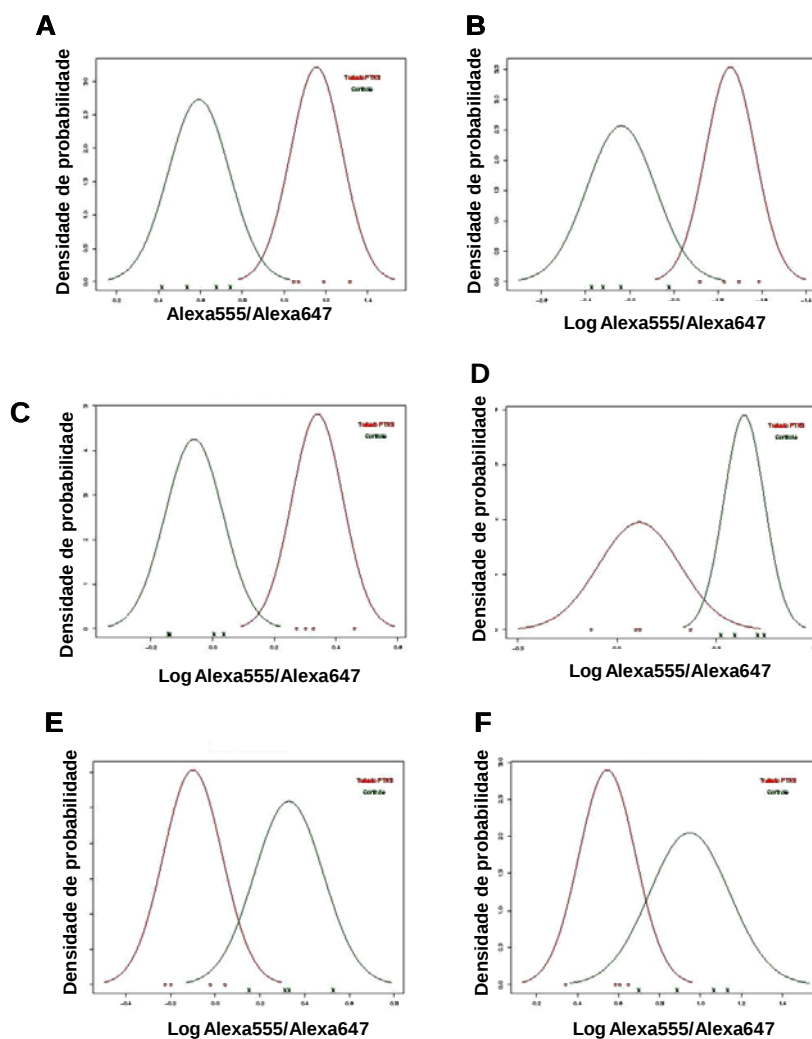


Legenda: Foram agrupados os genes identificados como diferencialmente expressos da análise entre as culturas de fibroblastos humanos controle (C4.c, C4.s, C3.c, C3.s) e tratadas com PTX3 (10µg/ml por 3 horas) (PTX31.c, PTX31.s, PTX3.2.c, PTX3.2.s). Na escala de cores o vermelho representa os maiores valores de expressão enquanto que verde representa uma menor expressão gênica.

Figura 13 - Agrupamento hierárquico dos 37 genes com $p < 0,05$ e razão de expressão $> 1,3$ identificados como diferencialmente expressos em fibroblastos humanos (GM637).

5.1.4 Seleção de genes diferencialmente expressos para serem validados por Real Time PCR

Como os valores de razão de expressão encontrados foram baixos (variando de -1,54 a 1,50), resolvemos incluir, além do $p\text{-valor} < 0,05$ e razão de expressão $> 1,3$, mais um critério para seleção dos genes para validação por Real Time PCR: o BER. Esse parâmetro baseia-se na distribuição gaussiana dos genes, que reflete o comportamento de um determinado gene nos dois grupos de estudo (tratado ou não com PTX3). Quanto mais separadas estiverem as duas curvas gaussianas, mais consistente é a diferença de expressão entre os grupos. O parâmetro BER (Bayes Error Rate) mede a intersecção entre as curvas, desta forma, estabelecemos arbitrariamente que seriam considerados como satisfatórios valores de BER de até 0,3, ou seja, até 30% de sobreposição entre as curvas. Os genes modulados por PTX3 em fibroblastos humanos (GM637) selecionados para serem validados por Real-Time PCR estão representados na Tabela 6. A Figura 14 mostra exemplos de distribuição gaussiana de alguns dos genes selecionados para validação experimental por Real Time PCR.



Legenda: Os quatro valores de intensidade obtidos para cada gene em cada uma das condições (tratado ou não com PTX3) foram utilizados para construção de curvas de distribuição gaussiana. Painei A: gene USP16, Painei B: gene PIP3-E, Painei C: gene ZDHHC6, Painei D: gene INADL, Painei E: gene BCAP31, Painei F: gene PTTG1IP. Em verde dados provenientes das amostras controle; em vermelho: dados provenientes das amostras tratadas com rhPTX3. Todos estes genes apresentam uma boa distribuição gaussiana.

Figura 14 - Exemplo de distribuição gaussiana de alguns dos genes modulados por rhPTX3 em fibroblastos humanos.

Tabela 6 – Genes selecionados para serem validados por Real –Time PCR em fibroblastos humanos tratados ou não com PTX3 levando em consideração $p < 0,05$, razão de expressão $> 1,3$ e BER $< 0,3$.

Gene Name	razão PTX3/controle	pvalor	BER	Descrição
MRE11A	-1,55	0,000	0,19	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A
INADL	-1,44	0,020	0,07	InaD-like
SEC24C	-1,41	0,000	0,03	SEC24 related gene family, member C
TRPC4AP	-1,36	0,000	0,02	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein
BCAP31	-1,34	0,020	0,13	B-cell receptor-associated protein 31
H326	-1,33	0,020	0,20	H326
PTTG1IP	-1,32	0,010	0,22	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein
MTR	1,30	0,000	0,12	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase
ZDHHC6	1,32	0,000	0,02	zinc finger, DHHC-type containing 6
KIAA1040	1,33	0,000	0,13	KIAA1040 protein
KIAA0893	1,34	0,000	0,20	WD repeat domain 47
PIP3-E	1,41	0,020	0,06	phosphoinositide-binding protein PIP3-E
USP16	1,47	0,000	0,03	ubiquitin specific peptidase 16
MDM2	1,54	0,050	0,25	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein

Legenda: p valor (*t-Student*) $< 0,05$ e BER=Bayes Error Rate

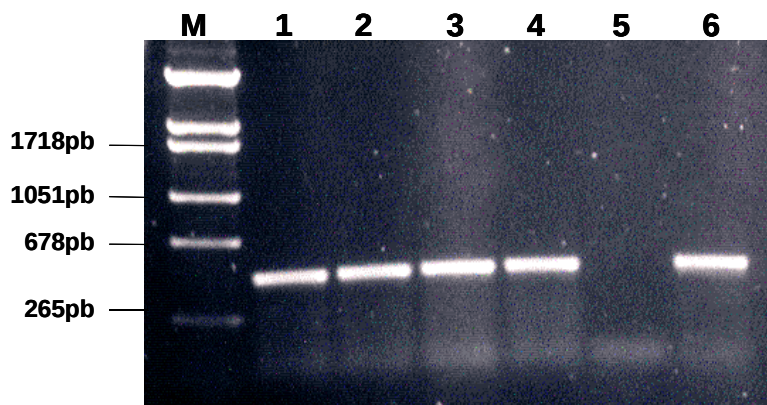
5.1.5 Validação dos genes por Real Time PCR

5.1.5.1 Síntese de cDNA

A validação dos achados dos experimentos de microarray por Real Time PCR foi realizada usando as mesmas amostras utilizadas nos experimentos de microarray, provenientes de 2 placas de fibroblastos humanos tratados com PTX3 (PTX3-1 e PTX3-2) e 2 placas de fibroblastos não tratados (C3 e C4).

As amostras foram submetidas à transcrição reversa e a qualidade do cDNA foi avaliada por reação de PCR para GAPDH seguida do fracionamento eletroforético do produto amplificado (Figura 15), seguindo a metodologia descrita em Material e Métodos. Como pode ser observado na Figura 15, de todas as amostras

bandas do tamanho esperado foram amplificadas tendo sido, portanto considerada de boa qualidade as reações de síntese de cDNA em todas as amostras.



Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1% de produto de PCR usando iniciadores específicos para GAPDH e como molde, cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de cultura de fibroblastos humanos (GM637) tratados (canaletas 3, 4) ou não com rhPTX3 (canaletas 1, 2). Canaleta 5: controle negativo da reação (sem cDNA molde). Canaleta 6: controle positivo da reação, usando como molde plasmídeo pGEM-Teasy contendo o gene alvo GAPDH inserido.

Figura 15 - Controle da qualidade da síntese de cDNA a partir do RNA total das amostras de fibroblastos humanos tratados ou não com PTX3.

5.1.5.2 Desenho de iniciadores específicos e padronização das reações de Real Time PCR utilizando os iniciadores específicos selecionados

O desenho de iniciadores específicos para os genes selecionados foi feito conforme descrito em material e métodos. A sequência dos iniciadores, o número de acesso e o número de pares de base amplificadas para cada par de iniciadores são apresentados na Tabela 2.

As reações de Real Time PCR para padronização dos iniciadores desenhados foram padronizadas conforme descrito no item 4.12.4. Resumidamente, a primeira etapa da padronização das reações de Real Time PCR consistiu em determinar a concentração ideal de iniciadores nas reações e a segunda etapa consistiu em determinar a eficiência de amplificação do *amplicon* para cada par de iniciadores.

Dos 13 genes selecionados para serem validados, o gene PIP3-E apresentou problemas no estabelecimento da curva-padrão e foi excluído da análise.

5.1.5.3 Reações de Real Time PCR específicas para os genes de interesse e cálculo da expressão gênica diferencial

Os valores de Ct foram usados para o cálculo da diferença de expressão gênica entre as amostras de macrófagos peritoneais murinos residentes e elicitados por tioglicolato seguindo metodologia descrita em 4.12.5. A diferença entre os valores de Ct (ΔCt) entre as amostras, após normalização com genes de expressão estável, reflete sua expressão diferencial. Os valores de razão de expressão obtidos por Real time PCR são mostrados na Tabela 7 e em comparação com os achados nos arrays.

Como pode ser observado na Tabela 7, se considerarmos o mesmo sinal (positivo ou negativo) como critério de concordância entre as duas metodologias, aproximadamente 70% dos genes foram validados, dentre estes foi encontrado um coeficiente de correlação de 0,96 entre os valores de razão de expressão analisados por QPCR e microarray.

Tabela 7 – Comparação da Razão de expressão obtida por microarray e por Real Time PCR para alguns dos genes selecionados como diferencialmente expressos em reposta à rhPTX3 em fibroblastos humanos.

Gene Name	Razão PTX3/controle microarray	Razão PTX3/controle Real Time PCR
USP16	1,47	1,20
KIAA0893	1,34	1,06
KIAA1040	1,33	1,66
ZDHHC6	1,31	-1,03
MTR	1,30	1,14
MDM2	1,55	1,26
MRE11A	-1,55	-1,02
INADL	-1,44	1,09
SEC24C	-1,41	1,06
TRPC4AP	-1,36	-1,01
BCAP31	-1,34	-1,23
PTTG1IP	-1,32	-1,08
H326	-1,34	1,93

5.2 PARTE II – REFERENTE AO ESTUDO COM MACRÓFAGOS

MURINOS

5.2.1 Recuperação, cultura e tratamento de macrófagos peritoneais com rhPTX3

Foram feitos 3 pools das amostras de células recuperadas de cada grupo de camundongos, tanto dos recrutados por caldo tioglicolato como dos residentes. Cada pool de macrófagos peritoneais residentes foi recuperado da cavidade peritoneal de 21 camundongos machos da linhagem CD1; enquanto que para a recuperação das células peritoneais recrutadas por caldo tioglicolato, cada pool foi extraído da cavidade peritoneal de 7 camundongos machos também da linhagem CD1 que

havia recebido 5 dias antes uma injeção intraperitoneal de 2mL de caldo tioglicolato.

Empregando esta metodologia recuperamos, em média, 8×10^6 células residentes peritoneais/animal das quais, estimamos que aproximadamente a metade eram macrófagos. A quantidade de células recuperadas da cavidade peritoneal de camundongos estimulados por caldo tioglicolato foi, em média, 1,85 vezes maior em relação à população de células recuperadas de camundongos não estimulados por caldo tioglicolato, pois este meio de cultura tem um efeito significativo no recrutamento de células para o peritônio. Para a população de macrófagos recrutados por tioglicolato foram recuperadas, em média, $14,7 \times 10^6$ células /animal das quais estimamos que $7,38 \times 10^6$ seriam macrófagos.

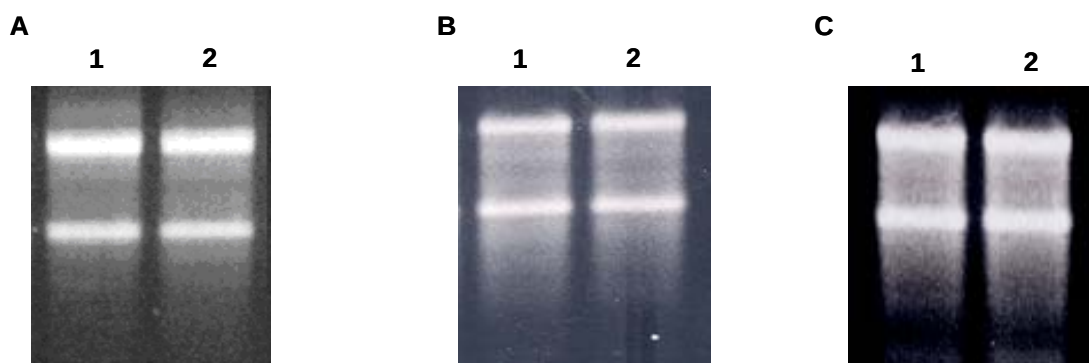
Esta avaliação do número relativo de macrófagos foi baseada em experimentos prévios realizados em nosso laboratório visando caracterizar a população de células presentes na cavidade peritoneal de camundongos CD1. Foram feitos ensaios empregando marcadores específicos para moléculas de superfície e, por análise em FACScan (B&D), foi verificado que, aproximadamente, 50% das células residentes recuperadas do peritônio são macrófagos e esta é a população que preferencialmente se adere à placa de cultura após incubação de 1,5 a 3 horas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂.

Tanto os macrófagos residentes quanto recrutados foram plaqueados em placas de cultura de 9cm de diâmetro contendo meio RPMI numa densidade média de $1,5 \times 10^7$ macrófagos por placa e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 90 minutos. Após esse tempo, o meio foi substituído para remoção das células não aderidas, permanecendo predominantemente uma população de macrófagos.

Para cada pool macrófagos peritoneais foram feitas duas placas de cultura, uma controle e uma tratada com rhPTX3. As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e expostas ou não à rhPTX3 na concentração de 10µg/ml durante 3h.

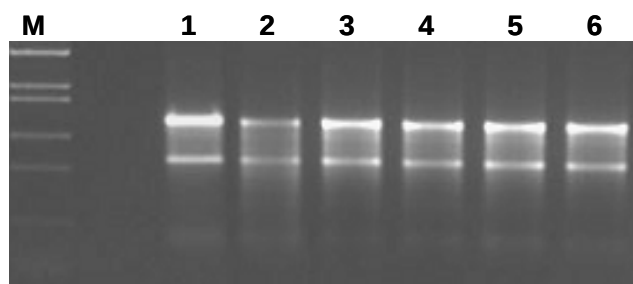
5.2.2 Extração do RNA total e Amplificação

O RNA total das amostras foi extraído pelo método do Trizol e nas Figuras 16 e 17 é mostrado o fracionamento eletroforético de 1µg de cada um dos RNAs provenientes de cada pool de macrófagos peritoneais residentes e de macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato, respectivamente. Como pode ser observado, a definição e a intensidade das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28 e 18S atestam a qualidade do RNA obtido. Foram considerados de boa qualidade RNAs cuja banda 28S apresentasse intensidade igual ou maior do que a de 18S.



Legenda: Cada painel representa o RNA total extraído de um pool de macrófagos residentes, sendo que na canaleta 1 foi fracionado o RNA da cultura controle daquele pool e nas canaletas numeradas como 2 o RNA da placa de cultura tratada com rhPTX3 (10µg/ml por 3h). **Painel A** Macrófagos residentes do pool 1: RESC1 (canaleta 1), REST1 (canaleta 2). **Painel B** Macrófagos residentes do pool 2: RESC2 (canaleta 1), REST2 (canaleta 2). **Painel C** Macrófagos residentes do pool 3: RESC3 (canaleta 1), REST3 (canaleta 2).

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio de RNA total extraído de macrófagos residentes peritoneais murinos tratados ou não com rhPTX3.



Legenda: Canaletas 1, 2, 3: RNA total extraído de cultura de macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato (TIOC1, TIOC2 e TIOC3). Canaletas 4,5 e 6: RNA total extraído de cultura de macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato tratadas com rhPTX3 (10µg/ml por 3h) (TIOT1, TIOT2 e TIOT3).

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio de RNA total extraído de macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato.

Na plataforma que utilizamos proveniente do Fox Chase Cancer Center, os oligonucleotídeos fixados encontram-se no sentido *sense*. Portanto precisávamos gerar sondas no sentido *antisense*. Por isso optamos por usar sondas de aRNA e não de cDNA, uma vez que no processo de amplificação os RNAs gerados são *antisense*.

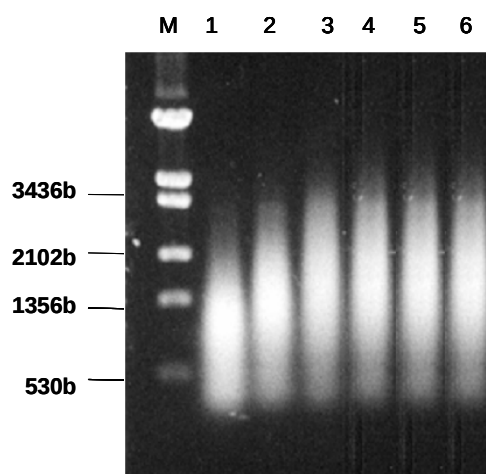
Foram utilizados 3µg de RNA total de cada amostra os quais foram submetidos a 2 ciclos de amplificação. O procedimento empregado foi realizado com base no protocolo sugerido por GOMES et al. (2003) e padronizado no Laboratório de Genômica Funcional do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

Como pode ser observado na Figura 18, o perfil dos aRNAs obtidos após o primeiro ciclo de amplificação indicou a obtenção de transcritos cujos tamanhos variaram, em média, de aproximadamente 3400 a 500 bases com pico de predominância no tamanho de 1500 bases. Esse perfil indica uma boa eficiência do

processo de amplificação, garantindo uma boa representatividade de transcritos uma vez que a maioria dos mRNA encontrados nas células tem o tamanho médio de 1500 bases. Tanto para as amostras de RNA total de macrófagos residentes quanto de recrutados por tioglicolato, o rendimento médio do primeiro ciclo de amplificação do RNA foi de 7,5 vezes.

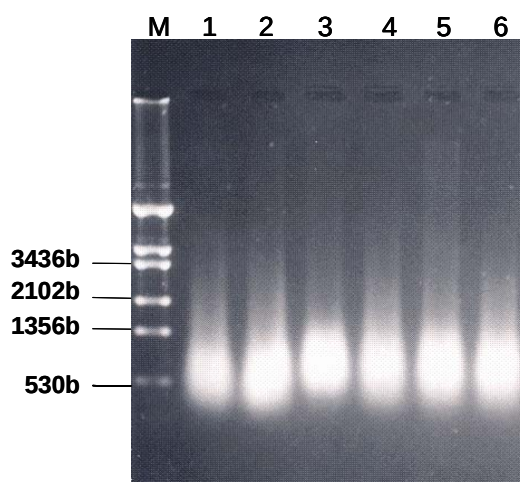
O perfil eletroforético dos RNAs de macrófagos residentes e recrutados por tioglicolato após o segundo ciclo de amplificação é mostrado na Figura 19. É esperado que ocorra uma alteração no perfil de expressão obtido em comparação com o primeiro ciclo com tendência a ocorrer uma redução do tamanho das bandas. O padrão eletroforético obtido após o segundo ciclo de amplificação dos RNAs mostrou a presença de bandas que variaram entre 400 e 1000 bases o que indica boa eficiência do processo de amplificação e ainda alta representatividade de transcritos.

Após a transcrição *in vitro*, a quantificação do aRNA e a incorporação do aminoallyl rUTP foi avaliada por espectrofotometria utilizando-se o equipamento NanoDrop (NanoDrop Technologies). O comprimento de onda a 260nm quantifica o RNA presente na amostra, enquanto que sob o comprimento de onda a 289nm é quantificado o rUTP. A razão dos comprimentos de onda 289/260 nos permite saber se a incorporação desse rNTP foi adequada (ideal entre 0.22 e 0.32). Com o protocolo de amplificação que padronizamos, todos os aRNAs tiveram boa incorporação de rUTPaminoallyl. O RNA referência foi submetido ao mesmo procedimento de extração e amplificação descrito para as demais amostras.



Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de etídio de 1 μ g de aRNA após o primeiro ciclo de amplificação. M: marcador molecular Pel Hind III. Canaleta 1 a 6: RESC1, RESC2, RESC3, TIOC1, TIOC2 e TIOC3, respectivamente.

Figura 18 – Fracionamento eletroforético do RNA de macrófagos peritoneais murinos após o primeiro ciclo de amplificação



Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de etídio de 1mg de aRNA após o segundo ciclo de amplificação. M: marcador molecular Pel Hind III. Canaleta 1 a 6: RESC1, RESC2, RESC3, TIOC1, TIOC2 e TIOC3, respectivamente.

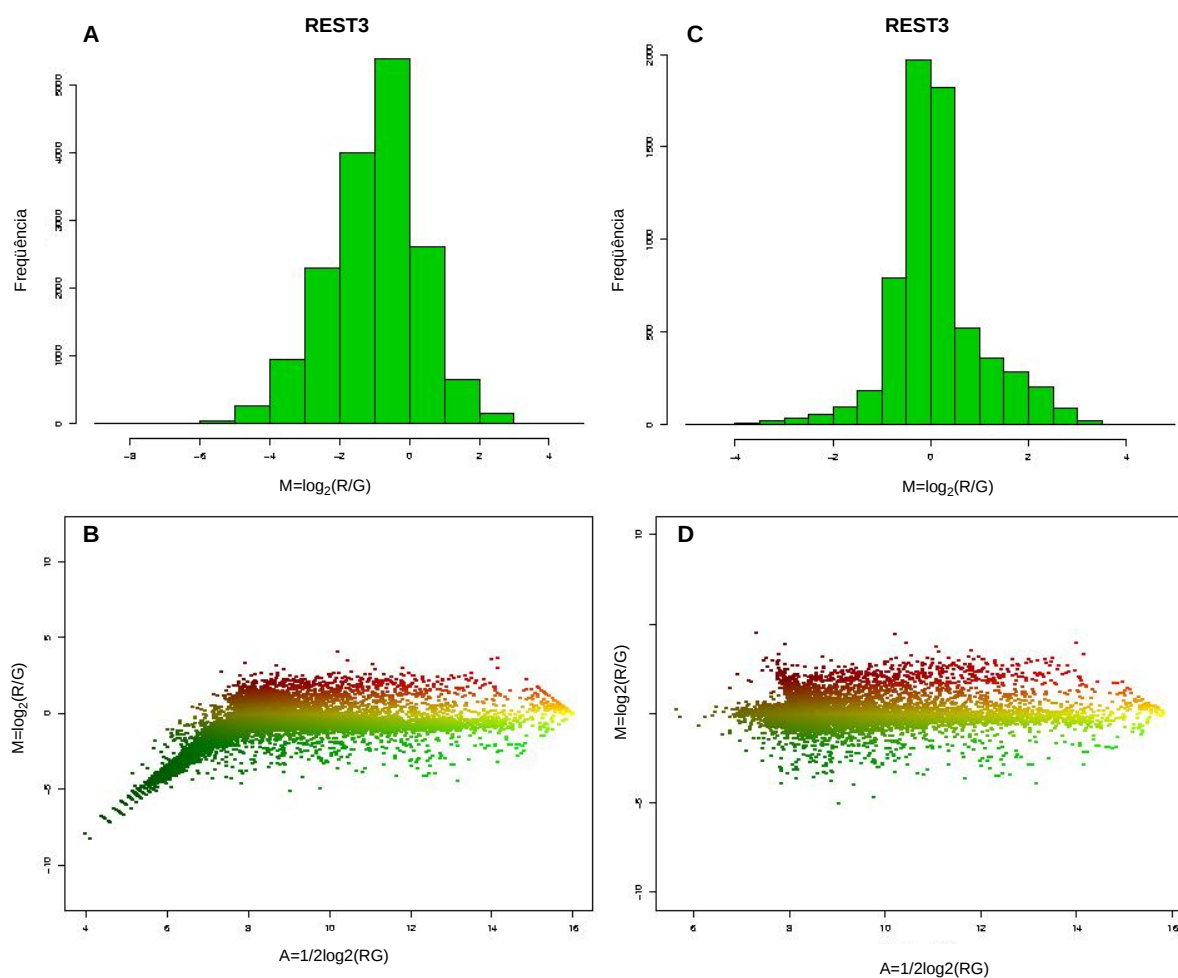
Figura 19 – Fracionamento eletroforético do RNA de macrófagos peritoneais murinos após o segundo ciclo de amplificação

5.2.3 Análise da qualidade das hibridizações

Após a hibridização das lâminas e aquisição das imagens, como descrito em material e métodos, foi realizada uma etapa de análise da qualidade das hibridizações.

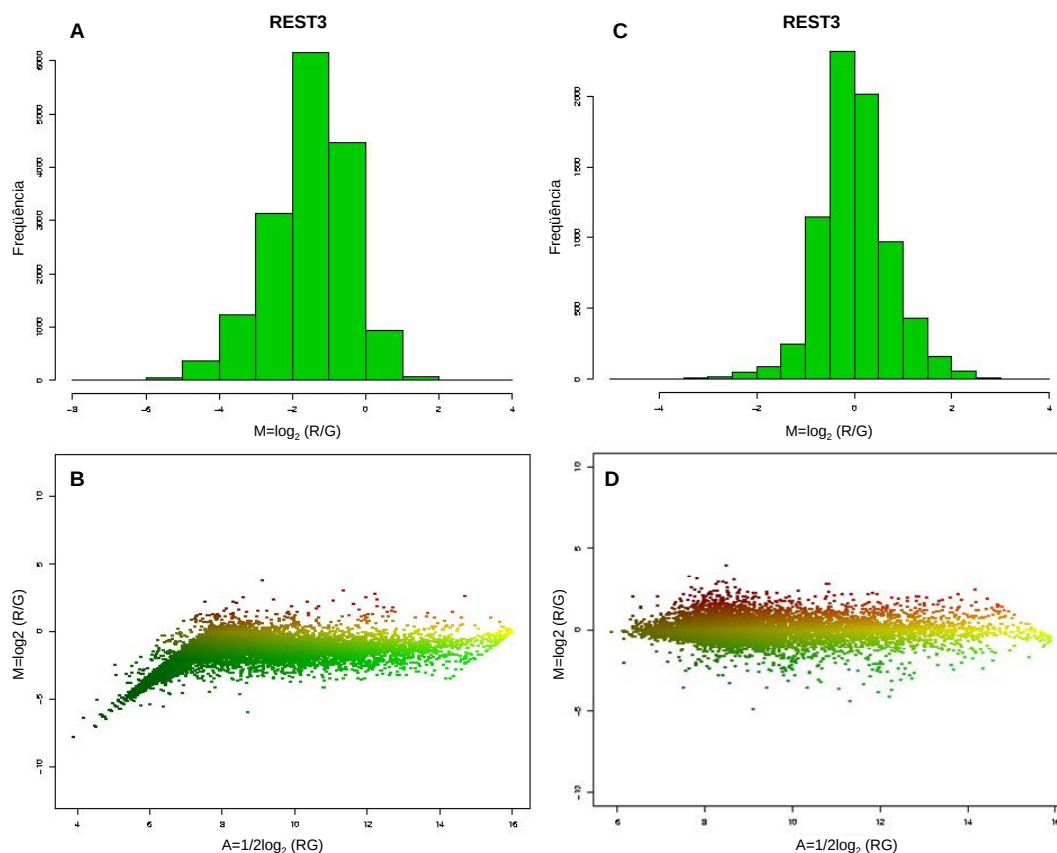
Inicialmente, foi feita uma pré-análise das lâminas pelo Laboratório de Bioinformática do Hospital do AC Camargo. Para normalização dos dados, ajustando variações sistemáticas lineares e não lineares, ambas do tipo intensidade dependentes, principalmente para spots de baixa intensidade, foi empregado o método de regressão linear localmente ponderada LOWESS (Locally Weighted Scatter-plot Smoothing). Primeiramente, representações gráficas tipo *scatter-plot* foram geradas para cada lâmina, individualmente (gráficos *MA-plot* - Figuras 18 e 19). Nos gráficos tipo *MA-plot*, M representa a diferença entre a intensidade R e G, em $\log_2 (M = \log_2 R/G)$ e A (intensidade total), a média entre as intensidades R e G, também em $\log_2 (A = \frac{1}{2} \log_2 RG)$. Os valores de intensidade R e G referem-se à incorporação dos corantes Alexa 647 (RED) e Alexa 555 (GREEN).

Na Figura 20 são mostrados os dados obtidos à partir da hibridização dos arrays com a amostra REST3 (macrófagos peritoneais residentes tratados com rhPTX3) marcada com Alexa 555 contra o aRNA de referência marcado com Alexa 647, ou seja, a lâmina denominada de *main*. Já na Figura 21 são mostrados os dados obtidos da lâmina *swap* para a mesma amostra, ou seja, agora a amostra foi marcada com Alexa 647 e o referência com o fluoróforo Alexa 555. A análise apresentada visou avaliar a influência da intensidade do sinal *versus* as razões de expressão de cada gene (razão x média de intensidade).



Legenda: Utilizou-se para normalização o método de LOWESS. A) Frequência da razão dos dados não normalizados; B) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados não normalizados; C) Frequência da razão dos dados após sua normalização; D) Gráfico do tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados normalizados.

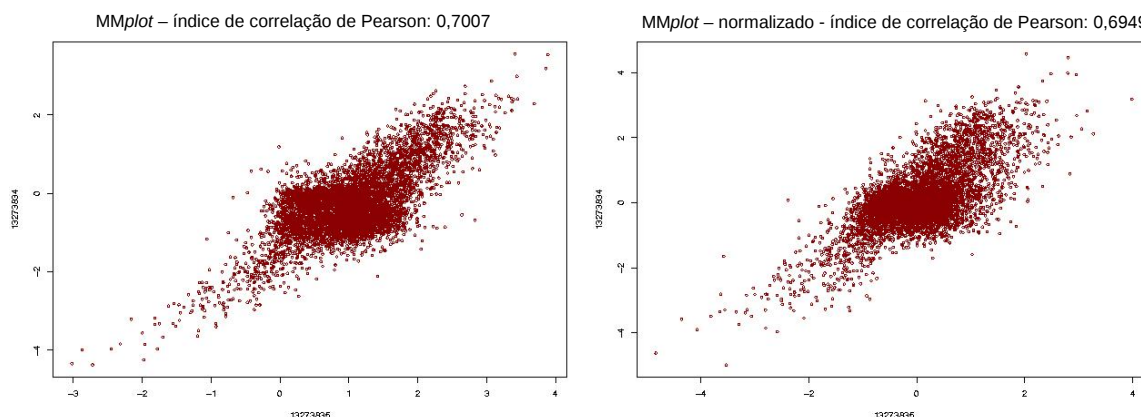
Figura 20 - Exemplo da normalização dos dados obtidos para uma das lâminas do experimento onde a amostra REST3 (macrófagos peritoneais residentes tratados com rhPTX3) foi marcada com Alexa 555 e a referência com Alexa 647 (Lâmina *main*).



Legenda: Utilizou-se para normalização o método de LOWESS. A) Frequência da razão dos dados não normalizados; B) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados não normalizados; C) Frequência da razão dos dados após sua normalização; D) Gráfico do tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados normalizados.

Figura 21 - Exemplo da normalização dos dados obtidos para uma das lâminas do experimento onde a amostra REST3 (macrófagos peritoneais residentes tratados com rhPTX3) foi marcada com Alexa 647 e a referência com Alexa 555 (Lâmina *swap*).

Para determinação da reprodutibilidade do nosso experimento em que hibridizações em duplicata (*main* e *swap*) foram feitas, foi calculado o Índice de Correlação de Pearson, que permite verificar se existe correlação linear entre os dados. Quanto mais próximo de 1 for este coeficiente, maior a similaridade entre os experimentos realizados. Os coeficientes de Pearson obtidos para este grupo de lâminas variou de 0,43 a 0,69. Estes baixos valores podem ser reflexo da baixa qualidade da plataforma empregada. Na Figura 22 são apresentadas as representações gráficas tipo *MM-plot* geradas para a amostra usada como exemplo, REST3.



Legenda: Na análise da qualidade dos dados obtidos foi calculado o Índice de Correlação de Pearson entre a lâmina *main* e a *swap* de cada uma das amostras do experimento. Neste gráfico é mostrada a representação gráfica, por *MM-plot*, referente à amostra REST3 onde M representa a diferença entre a intensidade R e G, em $\log_2$ ($M = \log_2 R/G$).

Figura 22 - Representação gráfica tipo *MM-plot* (razão lâmina *main* X razão lâmina *swap*) para a amostra REST3.

5.2.4 Identificação de genes diferencialmente expressos em resposta rhPTX3 em macrófagos peritoneais residentes

A análise dos dados gerados foi realizada em colaboração com o Laboratório de Bioinformática do Hospital do Câncer através do sistema *on line* PowerArray (http://www.lbhc.hcancer.org.br/power_array/) no sentido de comparar os dados provenientes de macrófagos peritoneais residentes tratados com PTX3 com os dados

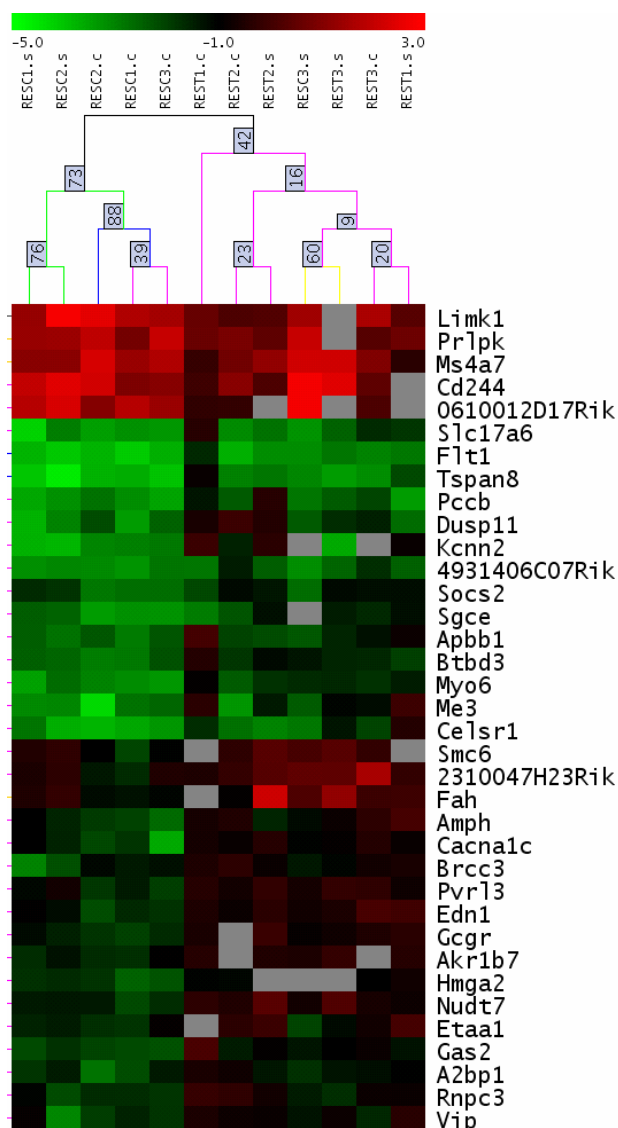
provenientes de macrófagos peritoneais residentes controle, não tratados com a PTX3. Dentro deste propósito, foram comparados, para cada gene, seis pontos provenientes das lâminas *main* e *swap* de cada um dos grupos estudados (REST1, REST2, REST3 e RESC1, RESC2, RESC3). Os parâmetros avaliados foram o p valor pareado calculado pelo método *t de Student* e a razão de expressão (REST/RESC). Desta forma, foram identificados 239 genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$) em resposta a PTX3 em macrófagos peritoneais residentes. Dentre estes genes, usando como critério uma diferença de 1,8 vezes no valor da razão de expressão foram encontrados 36 genes diferencialmente expressos: 5 modulados negativamente e 31 modulados positivamente em resposta a PTX3. Estes genes foram agrupados por ordem crescente do valor da razão de expressão entre REST/RESC e são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Lista da razão de expressão (REST/RESC), GeneID e descrição dos genes modulados em resposta à rhPTX3 em macrófagos residentes peritoneais murinos.

Gene Symbol	Razão		Gene ID	Descrição
	REST/RESC	pvalor		
<i>0610012D17Rik</i>	-3,814	0,034	66061	RIKEN cDNA 0610012D17 gene
<i>Limk1</i>	-2,426	0,047	16885	LIM-domain containing, protein kinase
<i>Cd244</i>	-2,090	0,036	18106	CD244 natural killer cell receptor 2B4
<i>Prlpk</i>	-1,990	0,022	66392	prolactin-like protein K
<i>Ms4a7</i>	-1,803	0,042	109225	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7
<i>Smc6</i>	1,802	0,018	67241	structural maintenance of chromosomes 6
<i>A2bp1</i>	1,803	0,048	268859	ataxin 2 binding protein 1
<i>4931406C07Rik</i>	1,816	0,005	70984	RIKEN cDNA 4931406C07 gene
<i>Pvrl3</i>	1,818	0,011	58998	poliovirus receptor-related 3
<i>2310047H23Rik</i>	1,860	0,032	69672	RIKEN cDNA 2310047H23 gene
<i>Flt1</i>	1,867	0,048	14254	FMS-like tyrosine kinase 1
<i>Rnpc3</i>	1,868	0,031	67225	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 3
<i>Vip</i>	1,915	0,024	22353	vasoactive intestinal polypeptide
<i>Akr1b7</i>	1,933	0,026	11997	aldo-keto reductase family 1, member B7
<i>Btbd3</i>	1,954	0,049	228662	BTB (POZ) domain containing 3
<i>Hmga2</i>	2,035	0,007	15364	high mobility group AT-hook 2
<i>Socs2</i>	2,043	0,008	216233	suppressor of cytokine signaling 2
<i>Gcgr</i>	2,069	0,014	14527	glucagon receptor
<i>Brcc3</i>	2,078	0,019	210766	BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3
<i>Edn1</i>	2,080	0,007	13614	endothelin 1
<i>Gas2</i>	2,082	0,013	14453	growth arrest specific 2
<i>Amph</i>	2,136	0,024	218038	amphiphysin
<i>Etaa1</i>	2,192	0,013	68145	Ewing's tumor-associated antigen 1
<i>Fah</i>	2,212	0,046	14085	fumarylacetoacetate hydrolase
<i>Sgce</i>	2,253	0,007	20392	sarcoglycan, epsilon
<i>Cacna1c</i>	2,256	0,048	12288	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit
<i>Pccb</i>	2,256	0,041	66904	propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide
<i>Nudt7</i>	2,283	0,002	67528	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 7
<i>Myo6</i>	2,339	0,017	17920	myosin VI
<i>Apbb1</i>	2,350	0,026	11785	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1
<i>Tspan8</i>	2,430	0,035	216350	tetraspanin 8
<i>Slc17a6</i>	2,557	0,031	140919	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter)
<i>Celsr1</i>	2,739	0,002	12614	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1
<i>Dusp11</i>	3,258	0,006	72102	dual specificity phosphatase 11 (RNA/RNP complex 1-interacting)
<i>Me3</i>	3,505	0,002	109264	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial
<i>Kcnn2</i>	4,013	0,007	140492	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel

Legenda: Os genes foram identificados pelo teste *t-Student* ($p < 0,05$) e razão de expressão (REST/RESC) $> 1,8$

Estes 36 genes foram usados na construção de um cluster hierárquico mostrado na Figura 23. Nesta representação gráfica, a escala de cores é representativa da razão da intensidade das amostras sobre o referênci em $\log_2$, variando de -3 a +3. Este conjunto de genes possibilitou uma boa separação das amostras em relação ao tipo de tratamento a que foram submetidas.



Legenda: As amostras foram agrupadas segundo a distância de correlação entre os 36 genes selecionados com razão de expressão maior que 1,5 e pvalor pareado $< 0,05$ teste *t de Student*.

Figura 23 - Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos macrófagos peritoneais residentes tratados ou não com PTX3.

5.2.5 Identificação de genes diferencialmente expressos em resposta rhPTX3 em macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato

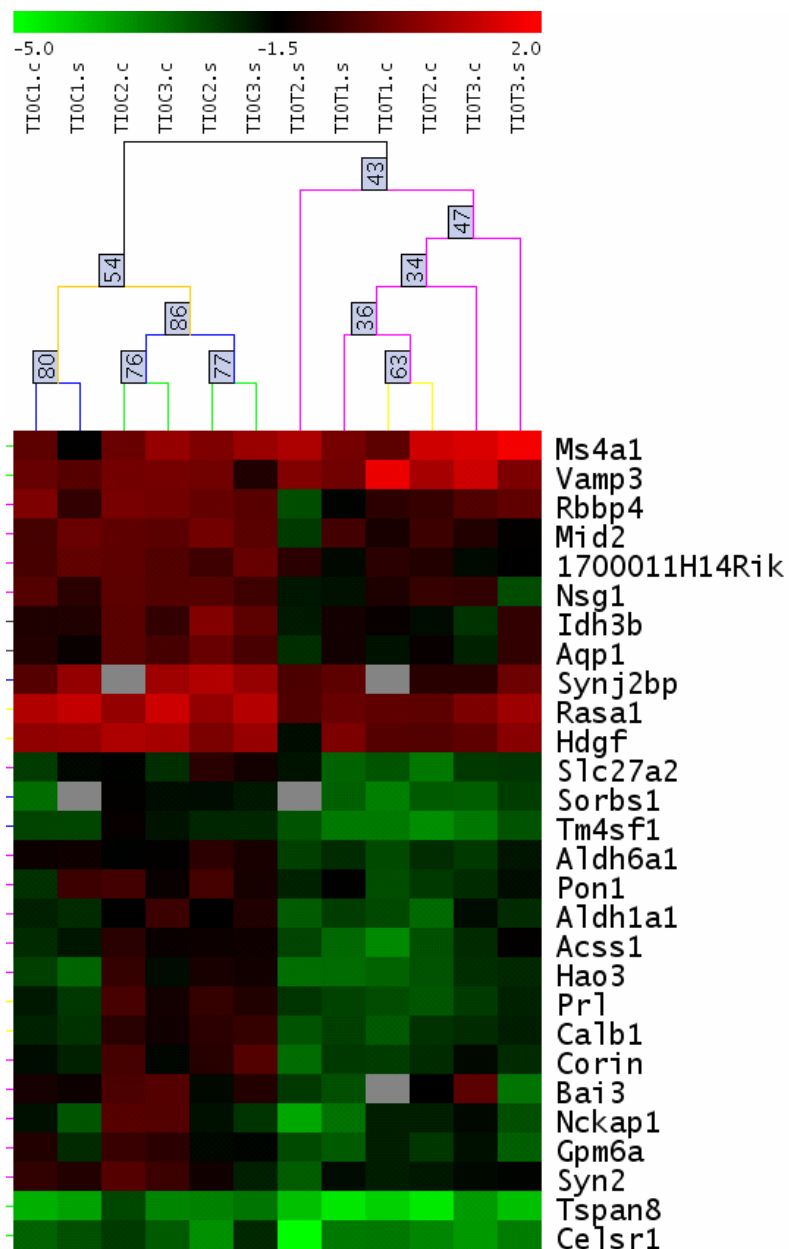
A análise dos dados gerados foram realizada no sentido de comparar os dados provenientes de macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato tratados com PTX3 (TIOT) com os dados provenientes de macrófagos recrutados por tioglicolato não tratados com a proteína (TIOC). Dentro deste propósito, foram comparados, para cada gene, seis pontos provenientes das lâminas *main* e *swap* de cada um dos grupos estudados (TIOT1, TIOT2, TIOT3 e TIOC1, TIOC2, TIOC3). Os parâmetros avaliados foram o p valor pareado calculado pelo método *t de student* e a razão de expressão (TIOT/TIOC). Desta forma, foram identificados 687 genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$) em resposta a PTX3 em macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato. Dentre estes genes, usando como critério uma diferença de 1,8 vezes no valor da razão de expressão foram encontrados 28 genes diferencialmente expressos, sendo 26 modulados negativamente e 2 positivamente em macrófagos recrutados por tioglicolato tratados com PTX3. Estes genes foram agrupados por ordem crescente do valor da razão de expressão entre TIOT/TIOC e são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Lista da razão de expressão (TIOT/TIOC), GeneID e descrição dos genes modulados em resposta à rhPTX3 em macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato.

Gene symbol	Razão		Gene ID	Descrição
	TIOT/TIO	pvalor		
<i>Prl</i>	-2,109	0,012	19109	prolactin
<i>Corin</i>	-2,058	0,026	53419	corin
<i>Tm4sf1</i>	-2,006	0,008	17112	transmembrane 4 superfamily member 1
<i>Acss1</i>	-2,002	0,005	68738	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1
<i>Gpm6a</i>	-2,002	0,001	234267	glycoprotein m6a
<i>Calb1</i>	-1,984	0,006	12307	calbindin-28K
<i>Idh3b</i>	-1,980	0,025	170718	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta
<i>Nsg1</i>	-1,965	0,009	18196	neuron specific gene family member 1
<i>Mid2</i>	-1,962	0,021	23947	midline 2
<i>Nckap1</i>	-1,957	0,027	50884	NCK-associated protein 1
<i>Synj2bp</i>	-1,945	0,024	24071	synaptojanin 2 binding protein
<i>Bai3</i>	-1,932	0,048	210933	brain-specific angiogenesis inhibitor 3
<i>Pon1</i>	-1,917	0,006	18979	paraoxonase 1
<i>Tspan8</i>	-1,915	0,018	216350	tetraspanin 8
<i>Aldh6a1</i>	-1,908	0,001	104776	aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1
<i>Hao3</i>	-1,887	0,031	56185	hydroxyacid oxidase (glycolate oxidase) 3
<i>Rbbp4</i>	-1,887	0,045	19646	retinoblastoma binding protein 4
<i>Aldh1a1</i>	-1,883	0,004	11668	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1
<i>Aqp1</i>	-1,877	0,035	11826	aquaporin 1
<i>1700011H14Rik</i>	-1,876	0,008	67082	RIKEN cDNA 1700011H14 gene
<i>Celsr1</i>	-1,870	0,004	12614	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1
<i>Rasa1</i>	-1,841	0,001	218397	RAS p21 protein activator 1
<i>Syn2</i>	-1,838	0,028	20965	synapsin II
<i>Hdgf</i>	-1,837	0,017	15191	hepatoma-derived growth factor
<i>Slc27a2</i>	-1,812	0,012	26458	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2
<i>Sorbs1</i>	-1,806	0,048	20411	sorbin and SH3 domain containing 1
<i>Vamp3</i>	1,875	0,014	22319	vesicle-associated membrane protein 3
<i>Ms4a1</i>	1,932	0,010	12482	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1

Legenda: Os genes foram identificados pelo teste *t-Student* ($p < 0,05$) e razão de expressão (TIOT/TIOC) $> 1,8$

Os 28 genes mostrados na Tabela 9 foram usados na construção de um cluster hierárquico mostrado na Figura 24. Nesta representação gráfica, a escala de cores é representativa da razão da intensidade das amostras sobre o referência em $\log_2$, variando de -3 a +3. Este conjunto de genes possibilitou uma boa separação das amostras em relação ao tipo de tratamento a que foram submetidas.



Legenda: As amostras foram agrupadas segundo a distância de correlação entre os 28 genes selecionados com razão de expressão maior que 1,8 e pvalor pareado $<0,05$ (*teste t de Student*).

Figura 24 - Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato tratados ou não com PTX3.

5.2.6 Identificação dos genes diferencialmente expressos em macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato

Conforme esquematicamente representado no item 3.4 deste relatório, o banco de dados gerado permitiu caracterizar e comparar o perfil de expressão gênica de macrófagos residentes (RES) e recrutados por tioglicolato (TIO). Essa comparação é relevante na área de imunologia uma vez que o caldo tioglicolato tem sido muito empregado em estudos *in vitro* utilizando macrófagos como agente que, quando injetado na cavidade peritoneal, leva ao recrutamento para a mesma de grande número de células (COHN 1978; SPITALNY 1981; DAVIES e GORDON 2005). Entretanto, o uso do tioglicolato é muitas vezes questionado pelo fato de os macrófagos assim recuperados apresentarem algumas características que os distinguem da população residente e atingirem o estado de ativação mais facilmente e apesar de alguns dados reportados na literatura apontarem algumas diferenças morfológicas e fisiológicas entre macrófagos residentes e macrófagos recrutados por tioglicolato (JOHNSTON et al. 1978; LEIJH et al. 1984; TURCHYN et al. 2007), nenhuma abordagem mais complexa visando caracterizar os genes modulados por esse agente recrutante foi adotada até hoje.

Nesse sentido, a análise dos dados gerados foi realizada visando comparar o perfil de expressão dos macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato (TIOC) com os de macrófagos peritoneais residentes (RESC). Foram comparados, para cada gene, seis pontos provenientes das lâminas *main* e *swap* de cada um dos grupos estudados (TIOT1, TIOT2, TIOT3 e TIOC1, TIOC2, TIOC3). Os parâmetros avaliados foram o p valor pareado calculado pelo método *t de Student* e a razão de expressão (TIOT/TIOC). Desta forma, identificamos 792 genes diferencialmente

expressos ($p < 0,05$). Dentre estes genes, usando como critério uma diferença de 3 vezes no valor da razão de expressão foram encontrados 34 genes diferencialmente expressos, 16 regulados negativamente (Tabela 10) e 18 genes regulados positivamente por tioglicolato (Tabela 11). Os dados mostrados nas Tabelas 10 e 11 foram utilizados na construção de um cluster hierárquico (Figura 25), representando de forma mais ilustrativa a diferença no padrão de expressão entre macrófagos recrutados por tioglicolato e macrófagos residentes utilizando os critérios adotados ($p\text{-valor} < 0,05$ e razão de expressão $> 3,0$).

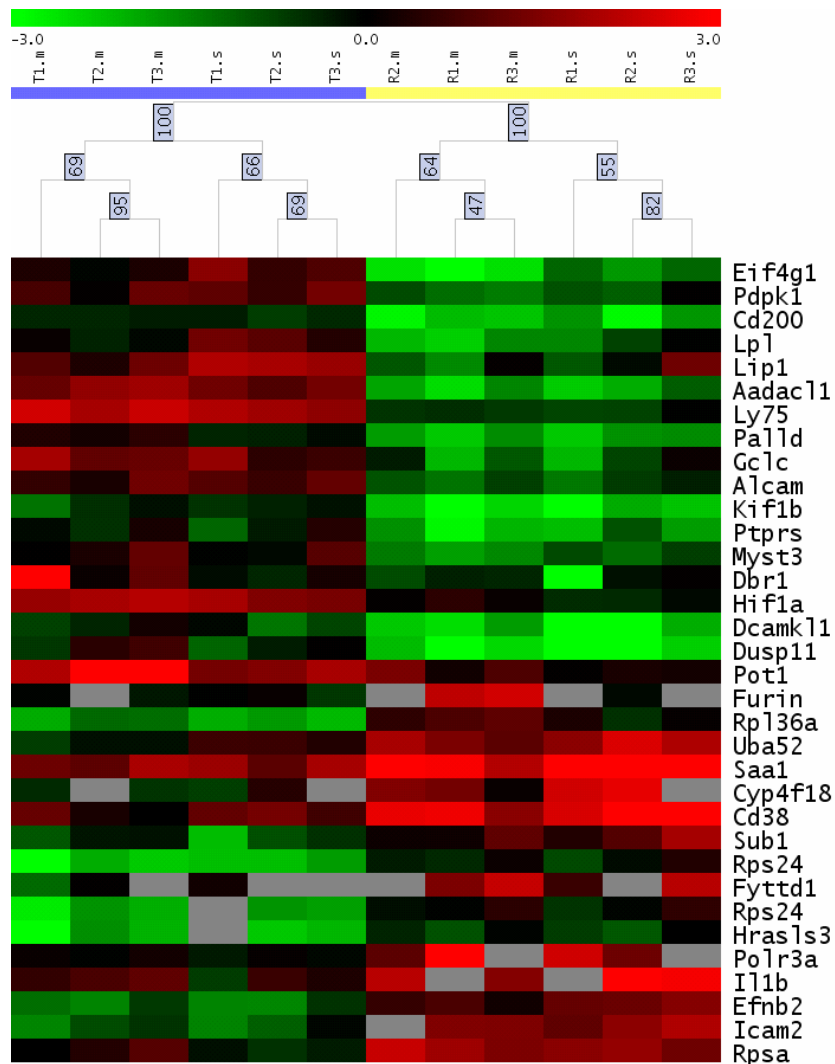
Tabela 10 – Genes modulados negativamente pelo caldo tioglicolato em macrófagos peritoneais murinos.

Gene	Razão			
Symbol	Tio/Res	pvalor	Gene ID	Descrição
<i>Icam2</i>	-5,60	0,001	15896	intercellular adhesion molecule 2
<i>Polr3a</i>	-4,39	0,003	218832	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide A
<i>Efnb2</i>	-4,36	0,001	13642	ephrin B2
<i>Rpl36a</i>	-4,35	0,003	19982	ribosomal protein L36a
<i>Rps24</i>	-4,12	0,003	20088	ribosomal protein S24
<i>Rps24</i>	-4,06	0,003	20088	ribosomal protein S24
<i>Il1b</i>	-3,95	0,003	16176	interleukin 1 beta
<i>Cd38</i>	-3,90	0,003	12494	CD38 antigen
<i>Fyttd1</i>	-3,84	0,019	69823	forty-two-three domain containing 1
<i>Cyp4f18</i>	-3,82	0,019	72054	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 18
<i>Hrasls3</i>	-3,24	0,001	225845	HRAS like suppressor 3
<i>Furin</i>	-3,20	0,027	18550	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)
<i>Saa1</i>	-3,12	0,003	20208	serum amyloid A 1
<i>Sub1</i>	-3,11	0,003	20024	SUB1 homolog (S. cerevisia
<i>Uba52</i>	-3,11	0,003	22186	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1
<i>Rpsa</i>	-3,10	0,003	16785	ribosomal protein SA

Tabela 11 – Genes modulados positivamente pelo caldo tioglicolato em macrófagos peritoneais murinos.

Gene	Razão		Gene ID	
Symbol	Tio/Res	pvalor		Descrição
<i>Aadac11</i>	9,64	0,003	320024	arylacetamide deacetylase-like 1
<i>Eif4g1</i>	6,65	0,002	208643	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1
<i>Dusp11</i>	6,59	0,003	72102	dual specificity phosphatase 11 (RNA/RNP complex 1-interacting)
<i>Ly75</i>	6,04	0,003	17076	lymphocyte antigen 75
<i>Gclc</i>	4,67	0,003	14629	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
<i>Dcamkl1</i>	4,47	0,001	13175	double cortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like 1
<i>Kif1b</i>	3,89	0,003	16561	kinesin family member 1B
<i>Palld</i>	3,78	0,003	72333	palladin, cytoskeletal associated protein
<i>Hif1a</i>	3,55	0,003	15251	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
<i>Cd200</i>	3,49	0,003	17470	Cd200 antigen
<i>Lpl</i>	3,47	0,002	16956	lipoprotein lipase
<i>Lip1</i>	3,43	0,007	16889	lysosomal acid lipase 1
<i>Pdpk1</i>	3,43	0,003	18607	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
<i>Alcam</i>	3,35	0,003	11658	activated leukocyte cell adhesion molecule
<i>Ptprs</i>	3,20	0,002	19280	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S
<i>Myst3</i>	3,16	0,003	244349	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3
<i>Pot1</i>	3,12	0,001	101185	protection of telomeres 1
<i>Dbr1</i>	3,00	0,032	83703	debranching enzyme homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)

Legenda: Lista da razão de expressão (TIOC/RESC), GeneID e descrição dos genes modulados em reposta à tioglicolato em macrófagos peritoneais murinos. Os genes foram identificados pelo teste *t-Student* ($p < 0,05$) e razão de expressão (TIOC/RESC) $> 1,8$



Legenda: T1.m, T1.s, T2.m, T2.s, T3.m, T3.s representam as amostras provenientes de cultura de macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato e R1.m, R1.s, R2.m, R2.s, R3.m, R3.s, as amostras provenientes de cultura de macrófagos peritoneais residentes. controle. Vermelho representa uma maior expressão enquanto que verde representa uma menor expressão gênica.

Figura 25 - Cluster hierárquico dos 34 genes com $p < 0,05$ e $\text{fold} > 3,0$, encontrados como diferencialmente expressos da comparação entre macrófagos peritoneais murinos residentes e recrutados por tioglicolato.

5.2.6.1 Seleção de genes diferencialmente expressos para serem validados por Real Time PCR

Selecionamos para validar por Real Time PCR 13 genes que apresentaram valor de p menor que 0,05 e razão de expressão maior que 3,0 resultantes da comparação entre as amostras provenientes de macrófagos recrutados por tioglicolato e macrófagos residentes (TIO X RES). Os genes modulados positivamente em macrófagos recrutados por tioglicolato selecionados para serem validados por Real-Time PCR estão representados na Tabela 12 e os negativamente modulados na Tabela 13.

Tabela 12 – Genes regulados positivamente por tioglicolato em macrófagos peritoneais murinos selecionados para validação por Real Time PCR.

Gene	Razão		Gene ID	Descrição
Symbol	Tio/Res	pvalor		
<i>Aadacl1</i>	9,64	0,003	320024	arylacetamide deacetylase-like 1
<i>Eif4g1</i>	6,65	0,002	208643	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1
<i>Dusp11</i>	6,59	0,003	72102	dual specificity phosphatase 11 (RNA/RNP complex 1-interacting)
<i>Ly75</i>	6,04	0,003	17076	lymphocyte antigen 75
<i>Gclc</i>	4,67	0,003	14629	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
<i>Hif1a</i>	3,55	0,003	15251	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit

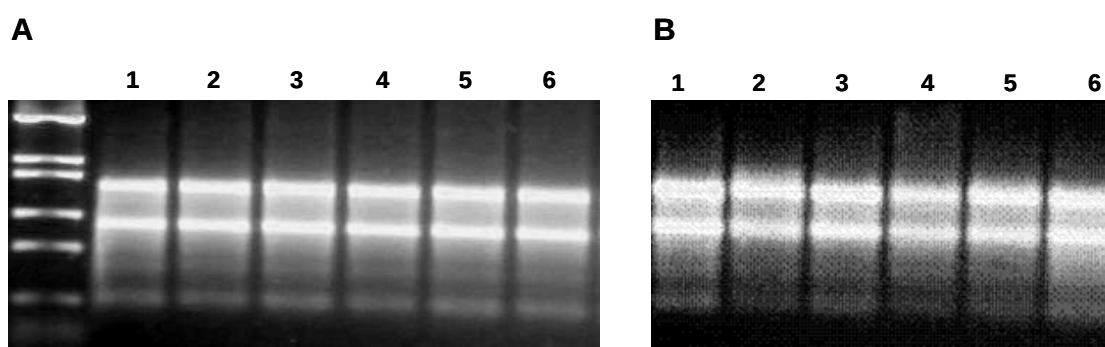
Tabela 13 - Genes regulados negativamente por tioglicolato em macrófagos peritoneais murinos selecionados para validação por Real Time PCR.

Gene	Razão		Gene ID	Descrição
Symbol	Tio/Res	pvalor		
<i>Icam2</i>	-5,60	0,001	15896	intercellular adhesion molecule 2
<i>Polr3a</i>	-4,39	0,003	218832	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide A
<i>Efnb2</i>	-4,36	0,001	13642	ephrin B2
<i>Rpl36a</i>	-4,35	0,003	19982	ribosomal protein L36a
<i>Rps24</i>	-4,12	0,003	20088	ribosomal protein S24
<i>Il1b</i>	-3,95	0,003	16176	interleukin 1 beta

5.2.6.2 Obtenção de novas amostras para validação dos genes por Real Time PCR

A validação dos achados dos experimentos de microarray por Real Time PCR foi realizada usando amostras diferentes daquelas utilizadas nos experimentos de microarray, provenientes de 6 pools independentes de macrófagos peritoneais residentes e de 6 pools independentes de macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato.

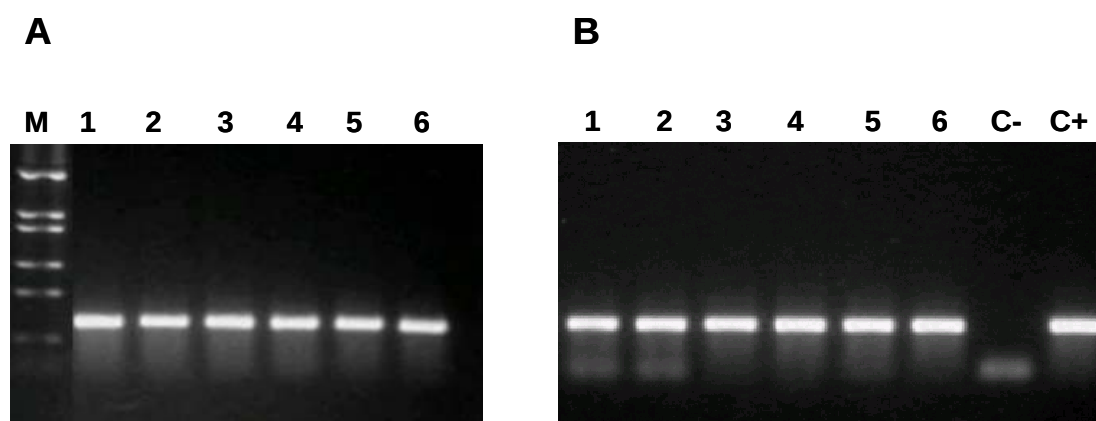
A metodologia de recuperação de macrófagos peritoneais residentes e de macrófagos recrutados por tioglicolato e a extração do RNA total foi realizada como descrito nos itens 4.2 e 4.3. Na Figura 26 é mostrado o fracionamento eletroforético de 1µg de cada um dos RNAs provenientes de cada um desses novos pools. A intensidade das bandas correspondente aos RNAs ribossomais 28 e 18S atestam a qualidade do RNAs obtidos. Foram considerados de boa qualidade RNAs cuja banda correspondente ao RNA ribossomal 28S apresentou intensidade igual ou maior do que a de 18S.



Legenda: **Painel A** Canaletas 1 a 6: RNA total extraído de 6 pools diferentes de macrófagos peritoneais residentes (R1, R2, R3, R4, R5 e R6) **Painel B** Canaletas 1 a 6: RNA total extraído de macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato (T1, T2, T3, T4, T5 e T6)

Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio de RNA total extraído de macrófagos peritoneais murinos residentes e recrutados por tioglicolato.

As seis amostras provenientes de macrófagos recrutados por tioglicolato (T1, T2, T3, T4, T5 e T6) e as seis amostras provenientes de macrófagos residentes (R1, R2, R3, R4, R5 e R6) foram submetidas à transcrição reversa, e a qualidade do cDNA foi avaliada por reação de PCR para GAPDH seguida do fracionamento eletroforético do produto amplificado (Figura 27), seguindo a metodologia descrita em Material e Métodos.



Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1% de produto de PCR usando iniciadores específicos para GAPDH e como molde, cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído das culturas de macrófagos peritoneais murinos residentes (Painel A) e recrutados por tioglicolato (Painel B). **Painel A:** Canaletas 1 a 6: amostras de 6 pools diferentes macrófagos peritoneais residentes (R1, R2, R3, R4, R5 e R6) **Painel B:** Canaletas 1 a 6: amostras de 6 pools diferentes de macrófagos peritoneais recrutados por tioglicolato (T1, T2, T3, T4, T5 e T6); C-: controle negativo da reação (sem cDNA molde); C+: controle positivo da reação, usando como molde o plasmídeo pGEM-Teasy contendo o gene alvo GAPDH inserido.

Figura 27 - Controle da qualidade do cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído de macrófagos peritoneais murinos residentes e recrutados por tioglicolato.

5.2.6.3 Padronização das reações de Real Time PCR utilizando os iniciadores específicos selecionados

O desenho de iniciadores específicos para os genes selecionados foi feito conforme descrito em material e métodos. A sequência dos iniciadores, o número de

acesso da sequência usada como referência e o número de pares de base amplificadas para cada par de iniciadores são apresentados na Tabela 2.

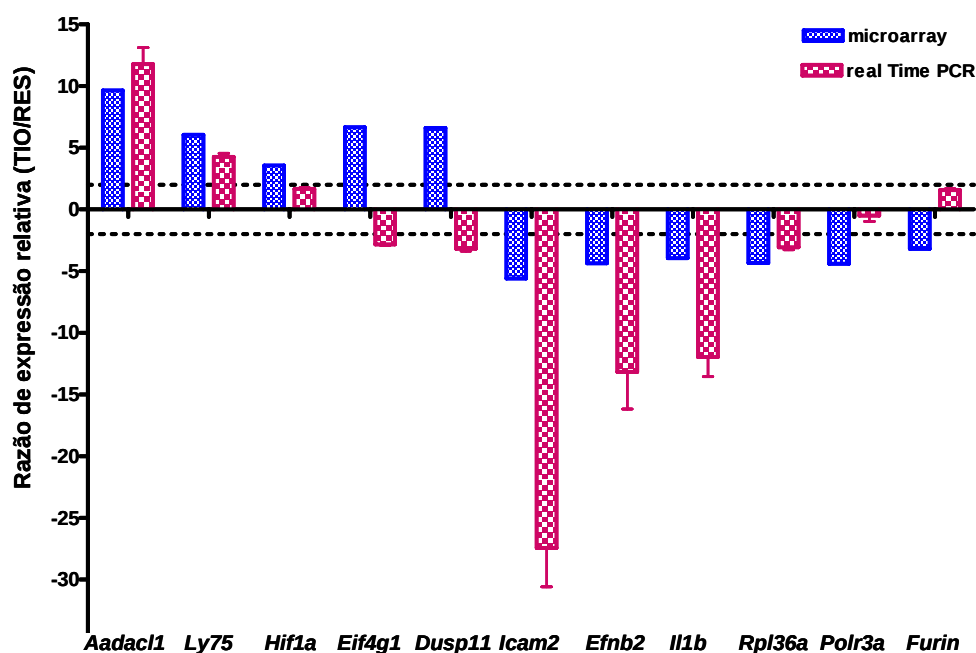
As reações de Real Time PCR para padronização dos iniciadores desenhados foram padronizadas conforme descrito no item **4.12.4**. Dos 13 genes selecionados para serem validados, o gene Rps24 apresentou problemas no estabelecimento da curva-padrão e foi excluído da análise.

5.2.6.4 Reações de Real Time PCR específicas para os genes de interesse e cálculo da expressão gênica diferencial

Os valores de Ct foram usados para o cálculo da diferença de expressão gênica entre as amostras de macrófagos peritoneais murinos residentes e elicitados por tioglicolato seguindo metodologia descrita em **4.12.5**. A diferença entre os valores de Ct (ΔCt) entre as amostras, após normalização com genes de expressão estável, reflete sua expressão diferencial. Os valores de razão de expressão obtidos por Real time PCR são mostrados na Tabela 14 em comparação com os achados nos arrays. Como pode ser observado há correlação entre as duas técnicas para a maioria dos genes analisados. Nos dados da Tabela 14 e no gráfico da Figura 28, notamos que, se considerarmos o mesmo sinal como critério de correlação entre as duas técnicas, 66,6% dos genes podem ser considerados como validados, com uma correlação entre os valores de razão de expressão entre as duas metodologias de 0,79.

Tabela 14 – Comparação da Razão de expressão relativa (RE) obtida por microarray e por Real Time PCR (QPCR) para alguns dos genes identificados como diferencialmente expressos em resposta a tioglicolato.

Gene Symbol	Gene ID	Descrição	RE microarray	RE Q PCR
<i>Icam2</i>	15896	intercellular adhesion molecule 2	-5,60	-25,55
<i>Polr3a</i>	218832	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide A	-4,39	-1,14
<i>Efnb2</i>	13642	ephrin B2	-4,36	-11,03
<i>Rpl36a</i>	19982	ribosomal protein L36a	-4,35	-2,99
<i>Il1b</i>	16176	interleukin 1 beta	-3,95	-10,86
<i>Furin</i>	18550	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)	-3,20	1,57
<i>Hif1a</i>	15251	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	3,55	1,65
<i>Gclc</i>	14629	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	4,67	-2,15
<i>Ly75</i>	17076	lymphocyte antigen 75	6,04	4,24
<i>Dusp11</i>	72102	dual specificity phosphatase 11	6,59	-3,13
<i>Eif4g1</i>	208643	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1	6,65	-2,83
<i>Aadacl1</i>	320024	arylacetamide deacetylase-like 1	9,64	11,77

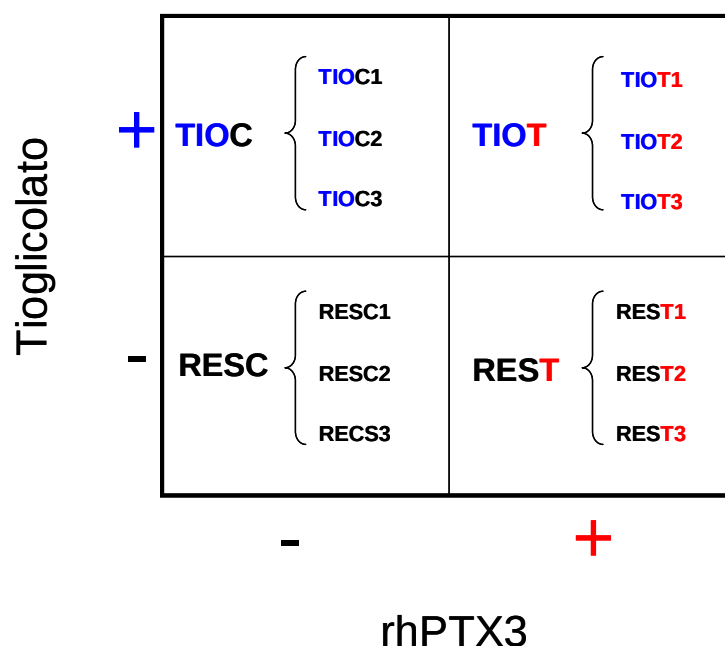


Legenda: Seis novos pools de macrófagos peritoneais residentes e recrutados por tioglicolato foram utilizados para determinação da razão de expressão relativa (TIO/RES) por Real Time PCR. Considerando o mesmo sinal como critério de correlação entre as duas técnicas, 66,6% dos genes foram validados.

Figura 28 - Validação dos genes encontrados como modulados por Tio em macrófagos peritoneais murinos por Real Time PCR.

5.2.7 Identificação de genes diferencialmente expressos em resposta ao efeito da combinação de tioglicolato e rhPTX3 na modulação de genes em macrófagos peritoneais murinos

Para determinação da significância da diferença de expressão dos genes entre as amostras de cultura de macrófagos peritoneais residentes ou elicitados por tioglicolato tratados ou não com rhPTX3 (10µg/ml por 3 horas), foi usado o teste de análise de variância (ANOVA) no modelo 2 a 2 (Two way ANOVA) como esquematicamente representado na Figura 29.



Legenda: Macrófagos peritoneais murinos foram recuperados com ou sem a injeção intraperitoneal de caldo tioglicolato, sendo denominados de macrófagos recrutados por tioglicolato (**TIO**) e macrófagos residentes (**RES**), respectivamente. Macrófagos residentes foram tratados (**REST**) ou não (**RESC**) com rhPTX3 na concentração de 10µg/ml por 3 horas. O mesmo foi feito para os macrófagos recrutados por tioglicolato denominados de **TIOT** e **TIOC**, se tratados ou não com PTX3, respectivamente.

Figura 29 - Diagrama do modelo da ANOVA 2 X 2 utilizado para identificação dos genes diferencialmente expressos em resposta à rhPTX3 em macrófagos peritoneais murinos.

Foram considerados na análise os valores das médias de intensidade de cada spot na sua lâmina *main* e *swap*. Desta forma, foram identificados, por ANOVA, 285 elementos com $p < 0,05$ em pelo menos uma das comparações. Em seguida foi feito o teste de Tukey para identificação através da comparação par a par entre os grupos, aqueles nos quais houve significância da diferença de expressão. A lista dos 285 genes com os respectivos valores de p e a lista com os respectivos valores de razão de expressão encontrados para cada comparação é mostrada em tabela no item ANEXOS (Anexo 2).

Os 285 genes encontrados como significativamente diferencialmente expressos foram usados na construção de um cluster hierárquico não supervisionado

mostrado na Figura 30. Nesta representação gráfica, a escala de cores é representativa da razão da intensidade das amostras sobre a referência em $\log_2$, variando de -3 a +3. Este conjunto de genes possibilitou uma boa separação das amostras em relação ao tipo de tratamento a que foram submetidas. Pelo perfil do cluster também foi possível identificar grupos de genes cujo comportamento em resposta ao tratamento é parecido, ou seja, genes cuja modulação por tioglicolato e rhPTX3 seguem um padrão semelhante.

Com base nesta característica do padrão de modulação sofrido pelos genes, os 285 genes foram agrupados em clusters menores pela abordagem do Self Organizing Map (SOM). O SOM é um algoritmo de clusterização no qual os nós bi-dimensionais de uma grade são iterativamente ajustados para refletir a estrutura global dos dados de expressão. Foram, desta forma, obtidos 9 clusters diferentes, cuja composição de genes é mostrada na Tabela 15. Em cada um destes clusters, portanto, é possível se encontrar genes cujos padrões de expressão variam de forma semelhante nas amostras. Notamos, em todos os clusters, que a diferença no perfil de expressão parece ocorrer principalmente em decorrência da estimulação por tioglicolato e, para a grande maioria dos genes identificados, PTX3 parece não exercer efeito aditivo significativo ao tioglicolato. Por exemplo, nos clusters 8 e 9, mostrados na Figura 31 e 32, encontramos genes claramente diferencialmente expressos nas duas populações de macrófagos (residentes “RESC e REST” e recrutados por tioglicolato “TIOC e TIOT”), mas o padrão de expressão dos genes que compõe os clusters parece não se alterar em resposta ao tratamento combinado de Tio+PTX3.

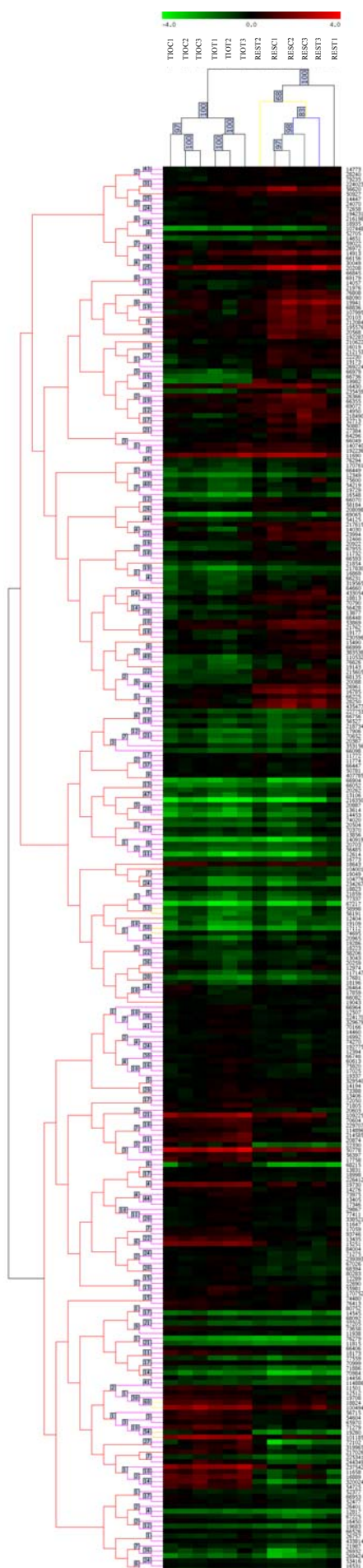
Na tentativa de melhor esclarecer o possível efeito aditivo de PTX3 e tioglicolato realizamos uma análise selecionando, dentre os 285 genes identificados por ANOVA, aqueles que apresentaram $p < 0,05$ na comparação macrófagos elicitados por tioglicolato tratados com PTX3 com macrófagos residentes não tratados (TIOT X RESC). Foram identificados 131 genes dentre os quais estejam os possíveis genes diferencialmente modulados pela combinação de Tio + PTX3.

A lista dos 131 genes selecionados é mostrada no item ANEXOS (Anexo 3). Dos genes listados foram escolhidos alguns candidatos para serem validados por outra abordagem experimental. Foram selecionados genes que só apresentassem $p < 0,05$ para a comparação TIOT x RESC (genes modulados exclusivamente pelo tratamento combinado de TIO + PTX3) e genes modulados tanto por um dos tratamentos isolados quanto pela combinação. Em todos os casos foram escolhidos genes que apresentassem as maiores razões de expressão nas comparações consideradas.

Desta forma, os genes (*Ppp2r5e*, *Phf17*, *Rps5*, *Rpl26*) foram selecionados como modulados apenas pelo estímulo combinado de PTX3 + TIO e os genes (*Dusp11*, *Cc2d1b*, *Rgs1*, *Cdc20*, *Chac1*, *Slco1a4*) como genes modulados tanto por TIO quanto pelo tratamento combinado, no qual parece haver um efeito aditivo da ação de PTX3 quanto associado ao tioglicolato (Tabela 16). Apenas 1 dos 131 genes foi identificado como modulado por PTX3 e também pela combinação. Como a razão de expressão para as comparações com $p < 0,05$ foram menores que 2, esse gene não foi selecionado para validação.

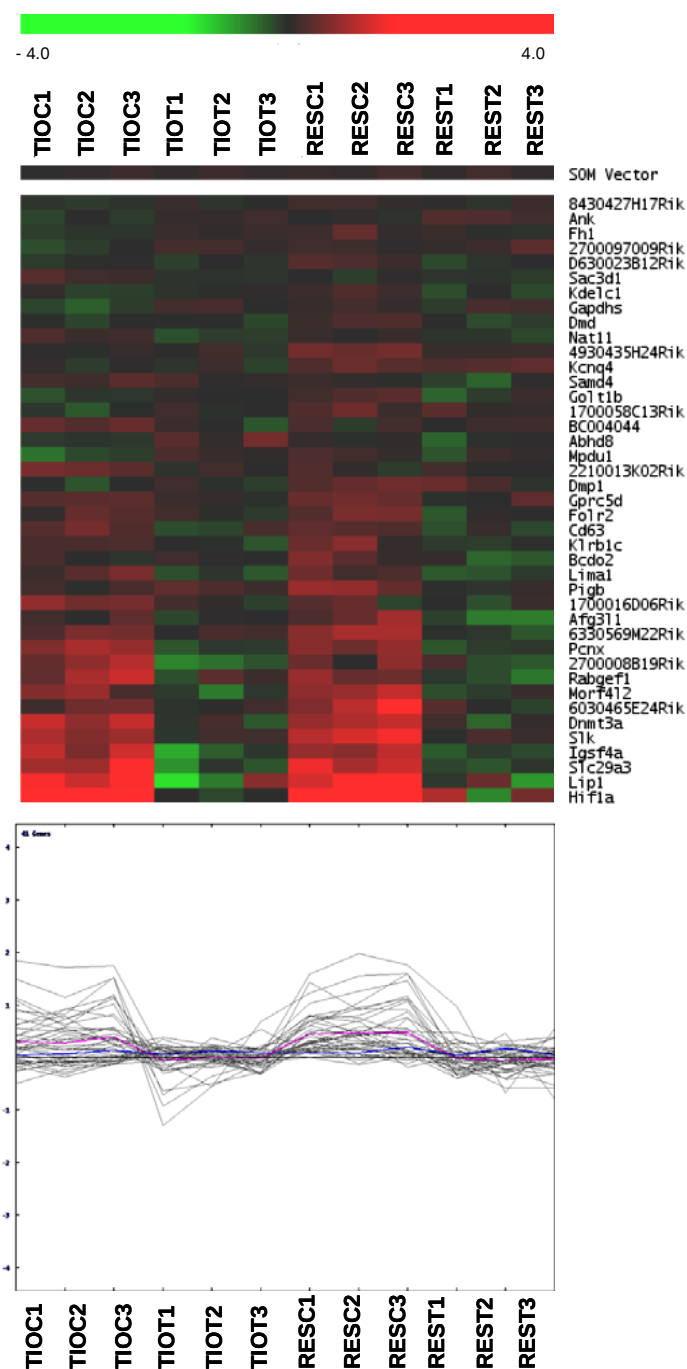
Tabela 15- Clusters obtidos à partir da lista dos 285 genes que apresentaram significância estatística pelo Two-way ANOVA, agrupados de acordo com a técnica de SOM (self organizing maps) onde as amostras se segregaram de acordo com o perfil de expressão de cada um dos grupos (RESC, REST, TIOC e TIOT).

Cluster	Nº de genes	Identidade dos genes que compõem o cluster
1	16	<i>4930510E17Rik, Scin, Numbl, Pts, Syne2, Supt4h1, Mtch2, Mrpl20, Mrps24, Rps24, Sugt1, 0610040D20Rik, Calml4, Adarb1, Gtf2a2, Rpl36a</i>
2	6	<i>Asb5, Polm, Pdzd3, Timm17a, Rag1ap1, Pole4</i>
3	73	<i>Lama2, Rtn1, Epo, Lhx1, Ctnn, A2bp1, Cpne4, Zbtb32, Gas6, Acsml, Stmn3, Tmem144, Nsg1, Magmas, Serpina1d, Timp3, 3830406C13Rik, Hagh, Sult1a1, Mast1, Thoc7, Cd320, Cygb, Chchd6, Msi2, Podxl, Gsn, Cyp2e1, Cbln1, Pvr13, Rnpc3, St14, Syn2, 2310002L09Rik, Sftpa1, Slc2a5, Akr1c21, Lims2, Tro, Slc17a1, Rdh16, 4921531G14Rik, Myl2, Agl, Aldh6a1, Car2, 9030617O03Rik, Prl, Msc, Ppp2r5e, Edn1, Vcl, Sdhc, Apod, Khk, Ptpns, Gpm6a, Coll3a1, Gdap1, Phf17, Unc5a, Chac1, Gas2, Dusp11, 2610510H03Rik, Tm4sf1, 4931406C07Rik, Cyp2d26, Pccb, Slc17a6, Celsr1, 2810055F11Rik, Tspan8</i>
4	23	<i>Rqcd1, Phox2b, Krr1, Rogdi, Mrpl33, Pask, Mxi1, Gprk5, E430002G05Rik, Sfxn1, Vnn3, Top3b, Cs, Ufd1l, Psmb7, Prpf38a, Erh, Psmb5, Eif3s3, 433054, 215605, Btf3, Ewsr1</i>
5	6	<i>2210418G03Rik, Abhd6, Ap3b1, Cnksr1, Lrat, Ap2a2</i>
6	10	<i>Plp1, 1600015H20Rik, Ppp1r1b, Rcn3, Stk39, Eglf7, Tpd521l, Ncbp2, Dpysl4, 4933411K20Rik</i>
7	66	<i>Klhl22, Igh-6, Tmem110, Trpm2, Hsd17b7, Anapc11, EG383538, Diablo, Tcp1l12, Panx3, Spo11, Scd3, 2610015P09Rik, Nsbpl, 1190005P17Rik, Nup93, Edf1, Akr1c13, Edd1, Dpf2, Nasp, Med28, Hps1, Adam8, Sec63, Cct6a, Slc11a1, Pa2g4, Mgea6, Dazap2, Ebna1bp2, Ccdc59, Slpi, H13, Gmpr, Yif1a, Mtap4, LOC212084, Slc25a36, Rpl18a, Dnajb14, Psmd2, Rpl8, Mrpl52, LOC195576, Pfn1, Rps5, Plp2, Cdc20, Rab11a, Ceacam10, Slco1a4, 435477, Rpsa, Stt3a, Guca1a, Clec4n, Ralgds, Rpl26, Pot1a, Osbpl8, Zfand2a, Ms4a7, Alox5ap, Rgs1, Saal</i>
8	41	<i>8430427H17Rik, Ank, Fhl1, 2700097O09Rik, D630023B12Rik, Sac3d1, Kdelc1, Gapdhs, Dmd, Nat11, 4930435H24Rik, Kcnq4, Samd4, Golt1b, 1700058C13Rik, BC004044, Abhd8, Mpdu1, 2210013K02Rik, Dmp1, Gprc5d, Folr2, Cd63, Klrblc, Bcdo2, Lim1, Pigb, 1700016D06Rik, Afg3l1, 6330569M22Rik, Pcnx, 2700008B19Rik, Rabgef1, Morf4l2, 6030465E24Rik, Dnmt3a, Slk, Igsf4a, Slc29a3, Lip1, Hif1a</i>
9	44	<i>2310047C04Rik, Ppm1b, 4933404M02Rik, Usp20, Map3k1, 2210012G02Rik, Kcnma1, Rab33a, 433814, Dkk3, Pou4f3, Zfp28, Jag2, Atp2a2, Akp2, Epcl, Mcam, Ndufs6, Runx1, Mknk1, Rbm35b, Mgst3, Thap4, Angel2, Cabp1, R3hdm1, Fa2h, Cacna1d, Cd5, Lta, 4930511H01Rik, Alad, Kcnh6, 4933437F05Rik, Gata1, Cdca7, Lrp12, Abtb1, Sms, 0610037D15Rik, Ce2d1b, Myst3, Alcam, Aadacl1</i>



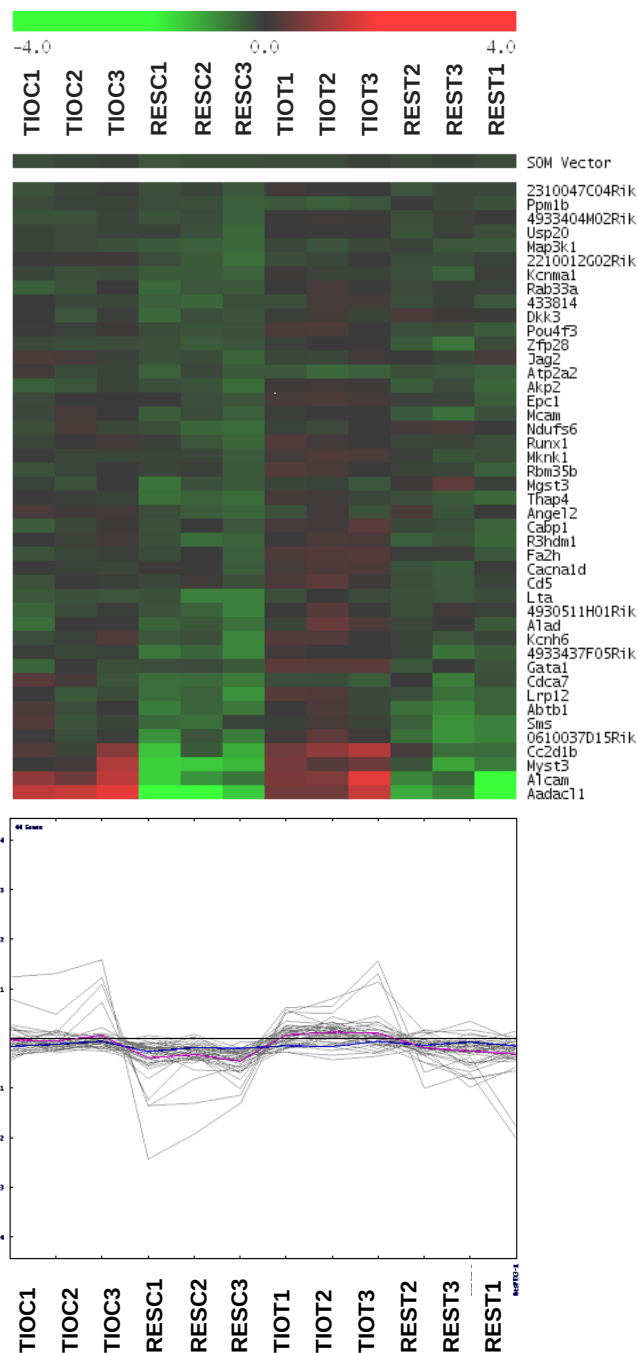
Legenda: As amostras foram agrupadas segundo a distância de correlação entre os 285 genes identificados por ANOVA e os genes segundo a Correlação Linear de Pearson.

Figura 30 - Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em macrófagos peritoneais residentes tratados ou não com rhPTX3 (REST e RESC) ou recrutados por tioglicolato tratados ou não com PTX3 (TIOI e TIOC).



Legenda: A figura mostra os 41 genes agrupados pelo SOM em um nó onde o padrão de expressão é comum nas amostras provenientes de macrófagos recrutados por tioglicolato (TI0C1, TI0C2, TI0C3, TI0T1, TI0T2 e TI0T3) e macrófagos residentes (RESC1, RESC2, RESC3, REST1, REST2 e REST3). No painel inferior as linhas cinzas representam a variação de expressão de cada um dos genes deste cluster, a linha rosa a média de expressão dos componentes do cluster em cada amostra e a azul o SOM vector. O SOM vector representa a localização espacial deste nó.

Figura 31 - Representação gráfica do Cluster 8 gerado pelo Self Organizing Map (SOM).



Legenda: A figura mostra os 44 genes agrupados pelo SOM em um nó onde o padrão de expressão é comum na amostras provenientes de macrófagos recrutados por tioglicolato (TIOC1, TIOC2, TIOC3, TIOT1, TIOT2 e TIOT3) e macrófagos residentes (RESC1, RESC2, RESC3, REST1, REST2 e REST3). No painel inferior as linhas cinzas representam a variação de expressão de cada um dos genes deste cluster, a linha rosa a média de expressão dos componentes do cluster em cada amostra e a azul o SOM vector. O SOM vector representa a localização espacial deste nó.

Figura 32 - Representação gráfica do Cluster 9 gerado pelo Self Organizing Map (SOM).

Tabela 16 - Genes candidatos a serem modulados diferencialmente pela combinação de tioglicolato e PTX3 em macrófagos peritoneais murinos

Gene		TIOC X	REST X	TIOT X	REST X	TIOT X	TIOT X
		RESC	RESC	RESC	TIOC	TIOC	REST
Dusp11	pvalor	0,005	0,054	0,001	0,310	0,562	0,049
	RE	6,590	3,258	10,931	-2,023	1,659	3,355
Ppp2r5e	pvalor	0,054	0,129	0,034	0,926	0,986	0,782
	RE	2,881	2,345	3,226	-1,228	1,120	1,376
Cc2d1b	pvalor	0,031	0,333	0,004	0,375	0,422	0,042
	RE	2,213	1,504	3,183	-1,471	1,438	2,116
Rgs1	pvalor	0,018	0,993	0,001	0,025	0,195	0,002
	RE	1,965	1,047	2,873	-1,878	1,462	2,745
Phf17	pvalor	0,086	0,077	0,042	1,000	0,954	0,971
	RE	1,996	2,036	2,264	1,020	1,134	1,112
Rps5	pvalor	0,097	0,940	0,026	0,212	0,777	0,056
	RE	-1,929	-1,145	-2,427	1,684	-1,259	-2,120
Cdc20	pvalor	0,009	0,597	0,004	0,054	0,895	0,021
	RE	-2,975	-1,371	-3,532	2,170	-1,187	-2,576
Chac1	pvalor	0,011	0,928	0,001	0,026	0,307	0,002
	RE	-2,409	-1,131	-3,543	2,129	-1,471	-3,132
Slco1a4	pvalor	0,023	0,700	0,004	0,108	0,581	0,017
	RE	-2,681	-1,335	-3,785	2,009	-1,412	-2,836
Rpl26	pvalor	0,111	0,983	0,043	0,184	0,901	0,071
	RE	-2,904	-1,158	-3,826	2,509	-1,317	-3,305

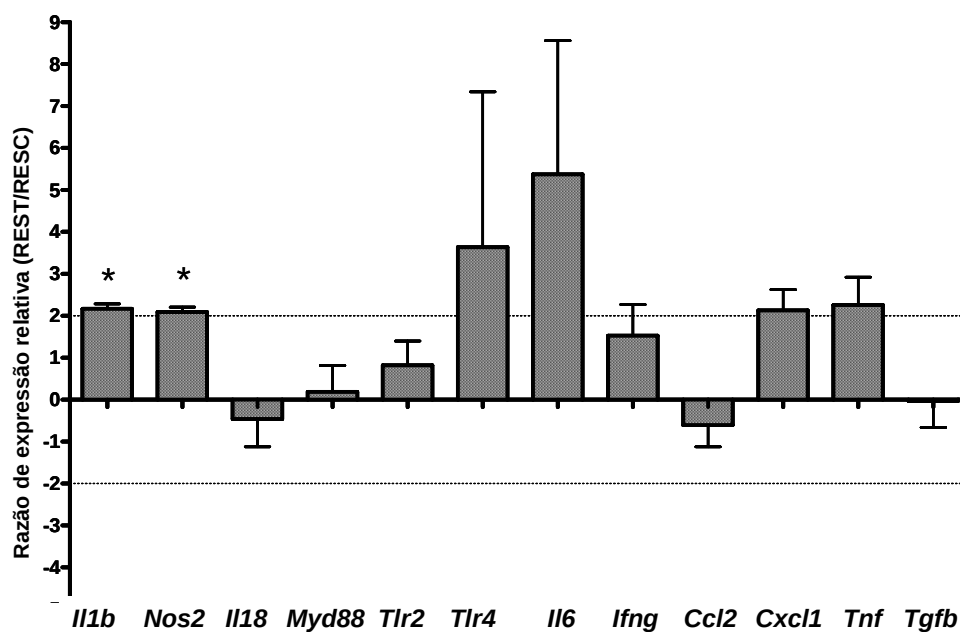
Legenda: Razão de expressão (RE) e pvalor de alguns dos genes candidatos a serem modulados diferencialmente pela combinação de tioglicolato e PTX3 em macrófagos peritoneais murinos em todas as comparações do teste de Tukey aplicado após o ANOVA (TIOC X RESC, REST X RESC, TIOT X RESC, REST X TIOC, TIOT X TIOC e TIOT X REST). Em amarelo pvalor<0,05.

5.2.8 Avaliação do padrão de expressão de mediadores inflamatórios em macrófagos residentes peritoneais murinos tratados ou não com rhPTX3 por Real Time PCR

Paralelamente aos experimentos de microarray, avaliamos a capacidade de PTX3 de modular a expressão de alguns genes que codificam para mediadores inflamatórios pela técnica de Real Time PCR.

Cinco novos pools de macrófagos peritoneais residentes foram coletados, cultivados, tratados ou não com rhPTX3; o RNA total das culturas foi extraído e foi realizada a síntese de cDNA conforme descrito em Material e Métodos. Na Tabela 3 é mostrada a sequência dos iniciadores específicos para os genes: *Nos2*, *Tlr6*, *Il4*, *Tnfa*, *Il1b*, *Il18*, *Il6*, *Tlr4*, *Tlr2*, *Myd88*, *Ccl2* e *Cxcl1*. Estes iniciadores foram desenhados com auxílio do programa Primer Express 3.0 e as reações de Real Time PCR foram devidamente padronizadas e realizadas seguindo a mesma metodologia descrita para utilização dos demais iniciadores utilizados neste estudo.

Como podemos observar na Figura 32 PTX3 é capaz de modular significativamente ($p < 0,05$) a expressão de *Nos2* e *Il1b* em macrófagos residentes peritoneais murinos. Em média, PTX3 aumenta em 2 vezes a expressão destes mediadores inflamatórios nos macrófagos residentes tratados com rhPTX3 (10 μ g/ml por 3h). Apesar de alguns dos demais mediadores analisados apresentarem uma média de diferença de expressão maior que 2, não encontramos diferenças estatisticamente significativas em resposta à pentraxina.



Legenda: Cinco pools de macrófagos peritoneais residentes foram obtidos, plaqueados e tratados ou não com rhPTX3 (10µg/ml) por 3 horas, o RNA total foi extraído e foi feita a síntese de cDNA. As reações de Real Time foram devidamente padronizadas para amplificação de genes específicos que codificam para mediadores inflamatórios. PTX3 induziu significativamente a expressão de *Nos2* e *IL1B* em macrófagos residentes peritoneais murinos.

Figura 33 - Análise da razão de expressão relativa (REST/RESC) de genes inflamatórios por Real Time PCR em macrófagos residentes peritoneais murinos tratados ou não com PTX3.

6 DISCUSSÃO

As pentraxinas longas constituem uma família de proteínas que têm em comum um domínio conservado característico (PTX) na porção carboxi-terminal que é homólogo ao encontrado nas pentraxinas curtas de fase aguda CRP e SAP. A proteína PTX3 consiste de um multímero formado por 10 a 20 subunidades idênticas produzido por fibroblastos, células endoteliais, condrócitos, sinoviócitos, fagócitos mononucleares, miócitos normais, células do epitélio renal e alveolar, células de músculo liso (SMC), neutrófilos, adipócitos e células dendríticas, após a estimulação das mesmas por mediadores inflamatórios tais como TNF, IL1B, lipopolissacarídeo (LPS) e componentes da parede celular de micobactérias e de fungos (LEE et al. 1990; BREVIARIO et al. 1992; ALLES et al. 1994; INTRONA et al. 1996; VOURET-CRAVIARI et al. 1997; POLENTARUTTI et al. 2000; VARANI et al. 2002; ABDERRAHIM-FERKOUNE et al. 2003; KLOUCHE et al. 2004; LATINI et al. 2004; NAUTA et al. 2005; HAN et al. 2005; CAMOZZI et al. 2005; JAILLON et al. 2007; IMAMURA et al. 2007). PTX3 tem sido considerada como um ancestral dos anticorpos, exercendo funções como reconhecimento de patógenos, ativação do sistema complemento, facilitação do reconhecimento de patógenos pelos fagócitos e apresenta papel não redundante contra patógenos específicos (revisado por GARLANDA et al. 2005).

Entretanto, a função de PTX3 parece ser bem mais complexa e outros aspectos desta atividade pleiotrópica incluem o fato desta proteína se ligar a componentes da matriz extracelular como TNFAIP6 (SALUSTRI et al. 2004) e a

fatores de crescimento como FGF2, FGF8 e VEGF (RUSNATI et al. 2004). Além disso, estudos *in vivo* utilizando animais geneticamente modificados mostraram que PTX3 tem papel preponderante na resposta inflamatória em modelos de endotoxemia, CLP, Isquemia e reperfusão e VILI (DIAS et al. 2001; SOUZA et al. 2002; REAL et al. 2007). Foram observados níveis de citocinas e quimiocinas alterados nos animais que expressam quantidades aumentadas de PTX3, especialmente Tnf e Il1b, indicando que essa proteína, de alguma forma, parece modular a expressão de mediadores inflamatórios.

Observamos também, que, após ativação, os macrófagos peritoneais isolados dos animais transgênicos produzem quantidades aumentadas de óxido nítrico, além de se mostrarem melhores fagócitos de fungos e bactérias do que os macrófagos derivados dos animais WT, dado sugestivo de que PTX3 pode agir modulando a expressão gênica (DIAS et al. 2001).

Embora os dados reportados na literatura evidenciem a importante participação de PTX3 na imunidade inata, na modulação da resposta inflamatória *in vivo* e na gênese de diversas doenças (LUCHETTI et al. 2000; FAZZINI et al. 2001; MULLER et al. 2001; ROLPH et al. 2002; VARANI et al. 2002; BUSSOLATI et al. 2003; SALUSTRI et al. 2004; LUCHETTI et al. 2004; LATINI et al. 2004; ZHANG et al. 2005; KUNES et al. 2007; KOTOOKA et al. 2007; MALAPONTE et al. 2007; SAVCHENKO et al. 2007; KATO et al. 2007; SUZUKI et al. 2008), eles não esclarecem as vias pelas quais esses fenômenos ocorrem. A atuação da pentraxina 3 tem sido supostamente atribuída à ligação direta a patógenos, à ligação a células apoptóticas e à ligação ao componente C1q do sistema complemento. Alguns autores entretanto, (MANTOVANI et al. 2003; GARLANDA et al. 2005) sugerem que outro

mecanismo pelo qual PTX3 possa atuar é através da ligação a um receptor celular mas este receptor ainda não foi identificado.

Essa hipótese vem de evidências reportadas por GARLANDA et al. (2002) mostrando a capacidade de PTX3 em facilitar o reconhecimento da conídia de *Aspergillus fumigatus* pelos macrófagos e também a propriedade desta proteína de se ligar a fagócitos mononucleares e células dendríticas tanto em humanos quanto em camundongos. Indícios de que PTX3 poderia agir modulando a expressão de genes é também a presença de níveis mais elevados de várias das citocinas e quimiocinas mensuradas nos camundongos transgênicos para PTX3 em comparação com os animais WT (DIAS et al. 2001; SOUZA et al. 2002; REAL et al. 2007). Além disso, foram encontrados níveis de mRNA aumentados para Dectina-1 em macrófagos provenientes de animais transgênicos para PTX3 estimulados com Zymosan em comparação com macrófagos de animais WT (DINIZ et al. 2004).

Apesar destas evidências experimentais e dos dados que sugerem o engajamento de PTX3 a um possível receptor, este receptor até hoje não foi identificado e não há nenhuma evidência na literatura de que PTX3, direta ou indiretamente, induz a expressão de citocinas e outros mediadores inflamatórios. Neste sentido, utilizando a metodologia de RT-PCR sob condições não saturantes mostramos que PTX3 é capaz de agir nos macrófagos peritoneais murinos regulando positivamente a expressão de *Nos2* e também de *Tlr6* e, negativamente, a expressão de *Il4* (MARQUES 2005). Embora nossos dados não nos permitam concluir se esta modulação ocorre de forma direta ou indireta, são forte argumento a favor de que PTX3 pode ser capaz de disparar uma cascata de sinalização celular regulando a expressão gênica.

Pretendemos buscar através de uma abordagem em larga escala , baseada em microarrays de cDNAs e oligonucleotídeos, a identificação de genes modulados por PTX3 com o intuito de entender melhor os mecanismos moleculares da ação desta pentraxina.

Vários trabalhos na literatura identificaram tipos celulares capazes de produzir PTX3 em resposta a estímulos pro-inflamatórios (LEE et al. 1990; BREVIARIO et al. 1992; ALLES et al. 1994; INTRONA et al 1996; VOURET-CRAVIARI et al. 1997; GOODMAN et al. 2000; KLOUCHE et al. 2004; DINIZ et al. 2004; CAMOZZI et al. 2005; IMAMURA et al. 2007). Dentre estas células estão os fibroblastos e os macrófagos. Embora não necessariamente os mesmos tipos que produzem a citocina sejam capazes de responder à sua ação, elegemos como alvos iniciais dos nossos estudos os fibroblastos e os macrófagos, como dois sistemas independentes para verificar a ação de PTX3.

A escolha da dose e do tempo de tratamento com rhPTX3 adotadas nesse estudo foi baseada nos dados de GARLANDA et al. (2002). Neste trabalho os autores utilizam rhPTX3 numa concentração de 20µg/ml para modular a atividade fagocítica de macrófagos expostos à conídias de *A.fumigatus*. Resolvemos testar, em experimentos preliminares de RT-PCR semi-quantitativa, a dose de 10µg/ml de rhPTX3 or 3 horas e como essa condição de tratamento se mostrou efetiva na modulação de genes (*Il4*, *Tlr6* e *Nos2*), adotamos essa dose para os experimentos de microarray. No trabalho de DINIZ et al. (2004) macrófagos peritoneais murinos são tratados com a proteína humana recombinante humana, a qual se mostrou capaz de levar a uma aumento da fagocitose de partículas de Zymosan por esses fagócitos,

indicando que a proteína humana apresenta atividade em células murinas e que os macrófagos parecem ser responsivos a PTX3.

Os fibroblastos não são apenas células constituintes do tecido conjuntivo que sintetizam fibras estruturais, são células chave no processo de reparo dos tecidos e participam ativamente da resposta imune através da produção de citocinas e quimiocinas que iniciam o recrutamento e favorecem a retenção de células efectoras derivadas da medula óssea no local da infecção ou trauma. Uma vez que esse tipo celular é capaz de produzir PTX3 em resposta a estímulos pró-inflamatórios (ALLES et al. 1994, INTRONA et al. 1996; GOODMAN et al. 2000) e que PTX3 está envolvido do remodelamento de tecidos (GARLANDA et al. 2005), função desempenhada classicamente por fibroblastos, era cabível supor que este tipo celular pudesse ser um dos alvos da ação biológica de PTX3.

Foram encontrados 143 genes com $p\text{-valor} < 0,05$ resultante da comparação entre fibroblastos humanos GM637 tratados ou não com PTX3, com razão de expressão variando de -1,55 a 1,51. Dentre estes genes, selecionamos aqueles com razão de expressão (tratado/controle) maior que 1,3, e dessa forma, encontramos 37 genes (Tabela 1 e 2) que foram submetidos à análise no banco de dados do KEGG (Kyoto Enciclopédia of Genes and Genomes). Como pode ser observado na Tabela 3, dentre os elementos identificados como genes diferencialmente expressos, há genes envolvidos comunicação intercelular, metabolismo de açúcares e aminoácidos e em importantes via de sinalização, como MAPK e JAK-STAT. Esta diversidade de módulos funcionais encontrados pode refletir o caráter pleiotrópico da ação de PTX3.

Alguns dos genes identificados como diferencialmente expressos foram selecionados para validação por QPCR. De acordo com a literatura, a correlação entre os experimentos de microarrays e Real Time PCR é muito variável, de -0,48 a 0,94 (BECKMAN et al. 2004; ETIENNE et al. 2004; LARKIN et al 2004). Trabalho recente de DALLAS et al. (2005), mostrou que ocorre uma diminuição na correlação experimental em genes que apresentam razão de expressão menor ou igual a 1,5 nos experimento de microarray e Real Time PCR, o que foi verificado no nosso set de dados no qual a maior variação de razão de expressão foi 1,55.

O fato da baixa correlação entre as duas metodologias quando a razão de expressão é baixa motivou a realização de estudos visando encontrar um parâmetro para escolha de genes para validação. Raramente essas correlações são apresentadas com análises estatísticas e apenas alguns autores definem o critério utilizado para determinar se a validação dos dados de microarray é aceitável. Alguns autores como, RAJEEVAN et al. (2001), consideram o resultado válido se a razão de expressão obtida for maior ou igual a 2 em ambas as técnicas. Já MOREY et al. (2006), mostraram que genes com razão de expressão maior que 1,4 e p valor menor que 0,0001 apresentam alta correlação em ambas as técnicas (0,905). Geralmente, uma razão de expressão maior ou igual a 2,0 é aceitável para manter a correlação entre as técnicas e quando a razão é menor do que 2,0 os resultados de microarray e de Real Time PCR começam a perder correlação.

Como alguns trabalhos (MOREY et al. 2006) apontam que há correlação com valores de razão de expressão mais baixos, resolvemos validar os genes encontrados como diferencialmente expressos nos experimentos de microarray por Real Time PCR. Na tentativa de buscarmos os melhores candidatos à validação incluímos mais

um critério além do pvalor $<0,05$ e razão de expressão (RE) $>1,3$, o BER (Bayes Error Rate) $<0,3$. Desta forma, 13 candidatos foram eleitos. Essa estratégia parece ter sido boa uma vez que apesar dos RE baixos, aproximadamente 70% dos genes escolhidos foram validados com uma correlação de 0,98 entre os valores de razão de expressão encontrado pelas duas metodologias.

Como mencionado anteriormente, a escolha da dose e do tempo de tratamento com rhPTX3 adotadas nesse estudo foi baseada nos dados que indicam que este esquema de tratamento leva a um aumento da atividade fagocítica em macrófagos murinos (GARLANDA et al. 2002). Entretanto, embora o tratamento por 3h com PTX3 na dose de $10\mu\text{g/ml}$ seja capaz de induzir uma alteração funcional da atividade dos macrófagos, pode ser que a resposta dos fibroblastos ao tratamento ocorra em tempos e condições diferentes da observada para os macrófagos, o que pode, pelo menos em parte justificar as baixas magnitudes dos valores de razão de expressão encontrados nas condições experimentais adotadas. Seria adequado também a realização de uma cinética mais abrangente e a análise de um maior número de linhagens e cultura primária de fibroblastos uma vez que o observado para a linhagem celular GM637 pode não refletir o comportamento de outras linhagens e nem dos fibroblastos primários.

Na segunda parte deste estudo foi feita a investigação da modulação de genes pela pentraxina 3 em macrófagos peritoneais murinos.

Em macrófagos peritoneais murinos residentes tratados ou não com rhPTX3 foram identificados vários genes como diferencialmente expressos, dentre eles elementos envolvidos no transporte de íons (*Kcnn2*, *Cacna1c*), metabolismo de malato (*Me3*), atividade de fosfatase (*Dusp11*), endocitose (*Amph*), regulação da

pressão sanguínea (*Edn1*), transdução de sinal (*Celsr1*, *Gcgr*), transporte de neurotransmissores (*Slc17a6*), regulação de crescimento celular (*Apbb1*, *Socs2*), regulação da transcrição (*Hmga2*), hormônio (*Prlpk*), atividade de proteína quinase (*Limk1*), receptor (*Cd244*, *Celsr1*, *Gcgr*, *Pvrl3*), metabolismo da arginina (*Fah*), metabolismo do glutamato (*Slc17a6*, *Myo6*), resposta a danos no DNA (*Brcc3*), regulação da transcrição (*Hmga2*) e metabolismo de lipídeos (*Akr1b7*, *Pccb*).

Foram identificados 36 elementos com $p\text{-valor} < 0,05$ e razão de expressão $> 1,8$, dos quais 31 foram regulados positivamente e 5 negativamente por PTX3, sendo que 24 destes genes apresentaram razão de expressão maior que 2.

O gene *Kcnn2* (*potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2*) mais conhecido como *Sk2*, foi encontrado 4 vezes mais expresso em macrófagos residentes tratados com PTX3. É reportado na literatura a expressão deste gene ao longo do sistema nervoso central e em vários tecidos periféricos tais como cardíaco, hepático, pulmonar e muscular (WEI et al. 2005). Esse gene codifica para uma proteína integral de membrana que forma um canal de potássio ativado por cálcio independente de voltagem com sítios de ligação para calmodulina. Canais do tipo SK (*potassium small conductance calcium-activated channel*) são considerados importantes mecanismos de sinalização celular, transduzindo mudanças nas concentrações de Ca^{2+} intracelular em alterações no potencial de membrana. Estruturalmente os canais SK são heterodímeros complexos com associação constitutiva à calmodulina que funciona como um sensor intrínseco da concentração de cálcio. A interação entre os canais SK e a calmodulina permite uma rápida resposta fisiológica em decorrência das flutuações de concentração citoplasmática de Ca^{2+} (MAYLIE et al. 2004).

KHANNA et al. (2001) mostraram que SK2 tem um papel importante na explosão respiratória em células de microglia. Nesse estudo, células de microglia de ratos foram desafiadas com PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) para induzir a explosão respiratória e em seguida foram tratadas com inibidores de canal de potássio. Vários inibidores foram capazes de inibir a explosão respiratória, dentre eles a Apamicina, inibidor de SK2. Células da microglia são consideradas macrófagos do sistema nervoso central que primeiro respondem à injúria cerebral. Elas ativam respostas que incluem proliferação, migração para o local da injúria, fagocitose, apresentação de antígenos e produção de citocinas. Uma das principais funções da microglia quando ativada é a produção de espécies reativas de oxigênio através da explosão respiratória induzida pela formação do complexo NADPH oxidase. Esses produtos podem danificar células vizinhas, causando necrose celular, oxidação de DNA, ruptura da membrana e várias doenças têm sido associadas a esses efeitos tais como esclerose múltipla, doença de Alzheimer, traumas na medula espinhal e acidente vascular cerebral (GONZÁLEZ-SCARANO et al. 1999). Dessa forma, a regulação desses canais pode ser uma estratégia terapêutica promissora na tentativa de minimizar o dano cerebral causado pela ativação dessas células.

A expressão de PTX3 é induzida no sistema nervoso central. Por meio de hibridização *in situ* foi mostrado que células da glia são capazes de produzir PTX3 após estimulação com LPS (POLENTARUTTI et al. 2000; CUNNINGHAM et al. 2005). Também foi observada a expressão de PTX3 em cérebro de camundongos infectados com *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (POLENTARUTTI et al. 2000). Nesse sentido, a indução de *Sk2* por PTX3 pode ajudar a entender os

mecanismos da amplificação da resistência inata e dano tecidual no sistema nervoso central.

Interessantemente, DUZHYY et al. (2005) através da metodologia de duplo híbrido de levedura com biblioteca de cDNA de epitélio sensorial de cóclea de embrião de galinha revelaram a associação inédita entre KCNT2 (*Sodium-activated potassium channel gated by voltage*) e uma proteína contendo o domínio das pentrinas (PPTX). Uma análise da sequência protéica revelou que a proteína que interage com este canal de potássio pertence à subfamília das pentraxinas longas e é 53% idêntica a proteína PTX3 murina. KCNT2 co-precipita com PPTX e ambas co-localizam em células sensoriais e ganglionares.

Um dos genes encontrados em nosso estudo como sendo duas vezes mais expresso em macrófagos peritoneais residentes tratados com rhPTX3 foi o gene *Edn1* ou *Et-1* (*endothelin -1*). Esse gene codifica para um peptídeo de 21 aminoácidos também chamado de endotelina 1. EDN1 foi inicialmente descrito como um potente vasoconstritor produzido no endotélio em decorrência de isquemia, injúria ou inflamação. Esse peptídeo exerce suas funções, predominantemente através de mecanismos autócrinos e parácrinos mediados por receptores acoplados à proteína G (ET_A e ET_B). Além das suas propriedades de vasoconstrição, EDN1 age como mitógeno para as células musculares lisas dos vasos, modula a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, e é quimioatraente e modulador da resposta imune celular (WAHL et al. 2005). Endotelina 1 participa da patogênese de diversas doenças, como aterosclerose (SIHVOLA et al. 2002), doenças cardiovasculares (AGAPITOV e HAYNES 2002), hipertensão pulmonar (FAGAN et al. 2001), falência renal (ANGERIO 2006), e sepse (PIECHOTA et al. 2007).

A endotelina 1 também é um mediador inflamatório importante na patogênese da síndrome da Angústia respiratória aguda (ARDS). Estudo recente revelou que a diminuição da expressão de EDN-1, induzida por angiopoietina 1 (Ang-1), se correlaciona com significativa melhora da inflamação pulmonar (redução de 43% do infiltrado inflamatório e de 40% de redução de ruptura alveolar) (MCCARTER et al. 2006). Esse grupo de pesquisadores propõe que a atenuação da inflamação vascular via supressão de EDN1 pode ser uma nova estratégia terapêutica no tratamento da ARDS.

Uma vez que nosso grupo já observou que a superexpressão de PTX3 em animais transgênicos está relacionada com exacerbação da lesão pulmonar induzida pelo ventilador (REAL et al. 2007) e que agora identificamos que a pentraxina 3 é capaz de induzir a expressão do gene *Edn1*, é pertinente supor que este seja um dos mecanismos pelos quais PTX3 amplifica a resposta inflamatória pulmonar. Desta forma seria interessante analisar a expressão de *Edn1* nas amostras de pulmão dos animais transgênicos para PTX3 submetidos à ventilação mecânica e compará-la aos camundongos Wt submetidos ao mesmo tratamento.

É interessante notar que muitas das doenças cuja patogênese envolve a participação da expressão de endotelina 1 são também relatadas como associadas à expressão da pentraxina 3. Dessa forma, este estudo é sugestivo de que a indução da expressão de *Edn1* por PTX3 possa ser um dos mecanismos pelos quais a pentraxina 3 exacerba a lesão tecidual em condições de inflamação aguda.

Células endoteliais são a principal fonte de EDN1, no entanto, a síntese de EDN1 também pode ser detectada em outros tipos celulares, tais como células epiteliais, fibroblastos, células musculares lisas e macrófagos. WAHL et al. (2005)

mostraram que macrófagos murinos produzem endotelina 1 em resposta a estímulos microbianos e SHIMADA et al. (2000) reportaram que EDN1 é capaz de induzir a expressão de ciclooxigenase 2 e prostaglandina E2 em macrófagos peritoneais murinos principalmente através de receptores ET_B. As prostaglandinas causam uma maior permeabilidade capilar e são quimioatraentes, atraindo células inflamatórias para o local da injúria tecidual decorrente de infecção ou inflamação. Interessantemente, em modelos de inflamação utilizando camundongos que expressam níveis mais elevados de PTX3, o aumento do infiltrado inflamatório é frequentemente observado nesses animais (SOUZA et al. 2002; SOARES et al. 2006; OKUTANI et al. 2007).

Outro achado interessante proveniente da comparação do perfil de expressão de macrófagos residentes tratados ou não com PTX3 é que muitos genes encontrados como diferencialmente expressos estão envolvidos com a sinalização pelo íon cálcio (*Kcnn2*, *Slc17a6*, *Myo6*, *Cacna1c*, *Sgce*, *Fah*, *Edn1*). Como segundo mensageiro, o Ca²⁺ regula diversas funções fisiológicas, incluindo contração de músculo cardíaco, liso e esquelético, além da liberação de hormônios e neurotransmissores. O Ca²⁺ também está envolvido na proliferação e sobrevivência celular. A desregulação da homeostase intracelular de cálcio pode levar à perda de mecanismos de controle fisiológicos e também a alterações patológicas do crescimento celular (ZHANG et al. 2005).

O Ca²⁺ pode ser usado como sinal, porque sua concentração no citosol é mantida normalmente em níveis muito baixos (~10⁻⁷M), enquanto é alta no meio extracelular (~10⁻³M) e no lúmen do retículo endoplasmático. Assim, existe um gradiente através da membrana plasmática e da membrana do retículo

endoplasmático tendendo a conduzir o íon para o citosol. Quando um sinal abre temporariamente os canais de Ca^{2+} , o íon migra para o citosol, aumentando de 10 a 20 vezes sua concentração local, estimulando as proteínas celulares que respondem a ele (ex.: PKC - proteína-quinase C, assim chamada porque é dependente de Ca^{2+}). Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (ex. *Cacna1c*) constituem um dos principais tipos de canais de Ca^{2+} que podem mediar essa sinalização. TNF e IL1B utilizam a sinalização via PKC para regulação de diversas funções celulares incluindo a explosão respiratória e atividade fagocítica de macrófagos (LARSEN et al. 2000).

A frequência das oscilações das concentrações intracelulares de Ca^{2+} influencia a resposta celular. A célula percebe a frequência de picos e altera suas respostas através de um mecanismo dependente de proteínas sensíveis ao Ca^{2+} que alteram suas atividades em função da frequência de picos. Uma destas proteínas é a calmodulina, que funciona como um receptor intracelular polivalente para Ca^{2+} , mediando muitos processos mediados pelo íon. Alguns dos genes identificados como diferencialmente expressos, *Kcnn2*, *Myo6* e *Cacna1c*, apresentam sítios de ligação à calmodulina, sugerindo que as proteínas codificadas por esses genes fazem parte da sinalização intracelular de Ca^{2+} .

O aumento intracelular de Ca^{2+} é necessário para estimular respostas fisiológicas e esse aumento é classicamente alcançado pela atuação de hormônios e neurotransmissores sobre receptores presentes na superfície celular. Em células musculares lisas e em glândulas secretórias, ligantes como norepinefrina, acetilcolina, endotelina-1, e angiotensina 2 estimulam receptores acoplados à proteína G para ativar fosfolipase C (PLC, phospholipase C) (ZHANG et al. 2005).

Os macrófagos são considerados as principais células efectoras do sistema imune, são células centrais na imunidade inata e na orquestração da resposta imune adaptativa. As células do sistema fagocítico mononuclear são derivadas de um progenitor comum na medula óssea, mas constituem uma população de células muito heterogênea. Uma vez que atingem a corrente sanguínea, os monócitos adentram todos os compartimentos teciduais do organismo. Populações de macrófagos residentes nos diferentes órgãos (células de Kupffer, macrófagos alveolares, peritoneais, microglia) se adaptam ao microambiente local ao qual estão expostos. Os sinais que são responsáveis pelos fenótipos tecido-específico de macrófagos incluem a expressão e secreção de produtos pelas células vizinhas e também a própria composição da matriz extracelular.

Os macrófagos residentes podem se tornar ativados em resposta a vários estímulos imunes e inflamatórios; o aumento do recrutamento de monócitos e precursores da medula óssea resulta em uma acumulação de macrófagos nos tecidos com capacidade de renovação aumentada e fenótipo alterado. Esses macrófagos são classificados como elicitados ou recrutados por estímulos tais como PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), citocinas ou por agentes inflamatórios estéreis (GORDON 2003). Um agente inflamatório estéril muito utilizado em modelo animal para recrutar macrófagos para a cavidade peritoneal é o caldo tioglicolato.

Assim, como vários dados reportados na literatura citados acima evidenciam o papel de PTX3 na atividade microbicida e fagocítica de macrófagos e os dados de DINIZ et al. (2004) apontam que macrófagos peritoneais murinos respondem ao tratamento com rhPTX3, aumentando a capacidade fagocítica, resolvemos usar esse tipo celular como modelo na investigação de genes modulados por PTX3.

Adicionalmente, como alguns estudos apontam que a modulação da expressão de mediadores inflamatórios por PTX3 pode ocorrer em sinergismo com estímulos pró-inflamatórios ou com PAMPs (NAPOLEONE et al. 2004) optamos também por investigar a modulação de genes em macrófagos previamente recrutados por tioglicolato. HE et al. (2007) sugerem que, se o receptor de PTX3 existe, sua expressão é dependente da ativação das células por esses mediadores pró-inflamatórios e ainda que motivos microbianos e citocinas pró-inflamatórias aumentariam a expressão de PTX3 e de seu respectivo receptor com cinética similar.

O caldo tioglicolato é um dos estímulos mais utilizados em trabalhos experimentais nos quais se deseja recrutar e enriquecer a população de exudatos do peritônio com macrófagos. Este meio de cultura tem a vantagem de recrutar um grande número de células para o sítio de inflamação sem que ocorra a ativação clássica dos macrófagos (COHN 1978; SPITALNY 1981; DAVIES e GORDON 2005). Macrófagos encontrados no exudato inflamatório de cavidades pré-estimuladas por agentes irritantes não apresentam todas as características descritas para macrófagos classicamente ativados (LEIJH et al. 1984). Estes macrófagos possuem atividade secretória elevada de certos mediadores tais como proteinases neutras, mas não liberam significativas quantidades de citocinas ou de radicais livres nem apresentam atividade microbicida ou tumoricida, apesar de atingirem mais facilmente o estado de ativação. Estes macrófagos são conhecidos como macrófagos inflamatórios (MOSSER 2003).

Com o nosso trabalho identificamos vários genes diferencialmente expressos em macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato tratados ou não com rhPTX3, dentre eles elementos envolvidos no metabolismo de ácidos graxos (*Hao3*,

Slc27a2), no desenvolvimento embrionário (*Nckap1*), na secreção de neurotransmissor (*Syn2*), na atividade hormonal (*Prl*), na atividade peptidase (*Corin*), no transporte mediado por vesículas (*Vamp3*), na atividade de receptores (*Celsr1*, *Ms4a1*, *Bai3*), endocitose (*Synj2bp*), na biosíntese de Acetil CoA (*Acss1*), na atividade oxidoreductase (*Idh3b*, *Aldh6a1*, *Hao3*, *Aldh1a1*), na circulação sanguínea (*Pon1*), fator de crescimento (*Hdgf*), na via de sinalização da dopamina (*Nsg1*), no ciclo celular (*Rbbp4*).

Foram identificados 28 elementos com $p\text{-valor} < 0,05$ e razão de expressão $> 1,8$ sendo dois elementos regulados positivamente e 26 negativamente por rhPTX3 em macrófagos recrutados por tioglicolato. Nessa comparação 5 genes apresentaram razão de expressão maior que 2: *Prl*, *Corin*, *Tm4sf1*, *Acss1* e *Gpm6a*.

O gene *Prl* foi identificado como 2,1 vezes menos expresso em macrófagos recrutados por tioglicolato tratados com PTX3. Esse gene codifica para prolactina (*Prl*), um polipeptídeo com atividade hormonal produzido pela adenohipófise. A prolactina pode ser produzida por vários outros tecidos além da pituitária, incluindo células do sistema imune. Um grande número de observações e descobertas nos últimos 20 anos suportam o conceito da importante interação fisiológica entre o sistema imune e o sistema neuro-endócrino (JARA et al. 2006). A comunicação entre o sistema nervoso e o sistema neuroendócrino é possível porque o sistema nervoso e o sistema imune compartilham linguagem bioquímica comum, envolvendo ligantes e receptores, neurotransmissores, neuropeptídeos, fatores de crescimento, citocinas e hormônios neuroendócrinos. Um grande acúmulo de evidências sustenta a idéia de que hormônios secretados pelo sistema neuroendócrino exercem um importante

papel na comunicação e regulação das células do sistema imune (KELLEY et al. 2007). Entre os hormônios, se destaca o papel da prolactina (PRL).

PRL pode ser considerada uma citocina porque interage com receptor específico presente na superfície celular (PRLR), que é funcionalmente similar a receptores de citocinas de células hematopoiéticas. Assim como os receptores de citocinas, PRLR transduz sinal intracelular com ativação de grande variedade de proteínas quinases, que por sua vez desencadeiam cascatas de sinalização que geralmente envolvem a via de Jak/Stat e Ras/Raf/MAPK. A prolactina exerce funções importantes na regulação de repostas imunes celulares tanto em condições fisiológicas quanto em condições patológicas.

MATSUTANI et al. (2005) demonstraram que a administração de prolactina em camundongos nocautes para essa proteína resultou em restauração da resposta imune após a indução do trauma hemorrágico. Em contraste, em modelos de inflamação de indução de sepse, a adição de prolactina exógena resultou em aumento da mortalidade. Dessa forma, a regulação negativa de prolactina por PTX3 pode estar associada ao aumento da sobrevivência de animais transgênicos para PTX3 quando submetidos à endotoxemia bem como a morte precoce destes animais quando submetidos à isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior.

O gene *Corin* também foi identificado como aproximadamente duas vezes menos expresso em macrófagos recrutados por tioglicolato tratados com PTX3 em comparação com macrófagos recrutados não tratados com a proteína. Este gene codifica para uma proteína transmembrana tipo II também chamada de Corin, que é uma serina protease transmembrana expressa principalmente no coração que converte pro-ANP em ANP (*atrial natriuretic peptide*). ANP, também chamado de

fator atrial natriurético, é um hormônio cardíaco que reduz a alta pressão sanguínea através da promoção da excreção de sal, diminuição do volume sanguíneo e relaxamento da pressão do vaso. Está relacionado com doenças vasculares importantes como hipertensão e falência cardíaca congestiva. Nos cardiomiócitos, ANP é sintetizado como precursor, pró-ANP, que é convertido à forma ANP biologicamente ativa por clivagem proteolítica. A ativação de pró-ANP em ANP mediada por Corin exerce um papel importante na regulação da pressão sanguínea; deficiências em ANP e de seus receptores e de Corin levam à hipertensão espontânea (YAN et al. 2000; CHAN et al. 2005).

Além do coração, mRNA para Corin foi detectado no útero de fêmeas grávidas. O significado biológico da expressão aumentada de Corin durante a gravidez não é claro; os níveis plasmáticos de ANP estão significativamente aumentados em mulheres grávidas, em especial aquelas com pré-eclâmpsia (MINEGISHI et al. 1999). É possível que Corin seja induzido no útero durante a gravidez para aumentar a produção de ANP e prevenir a pré-eclâmpsia. Níveis plasmáticos de PTX3 são extremamente aumentados em mulheres com pré-eclâmpsia quando comparados com mulheres com gravidez normal (5.08 ± 1.34 e 0.59 ± 0.07 , respectivamente, $p < 0.001$) (ROVERE-QUERINI et al. 2006). Portanto, nossos achados mostrando que PTX3 inibe a expressão de Corin em macrófagos peritoneais podem ajudar a esclarecer o papel de PTX3 na patogênese desta doença, uma vez que a regulação negativa de Corin por PTX3 pode estar associada à diminuição da conversão de pró-ANP em ANP, levando a uma desregulação da pressão sanguínea no útero de mulheres com pré-eclâmpsia.

Outro achado interessante vem da identificação do gene *Vamp3* (*vesicle-associated membrane protein 3*) como aproximadamente 2 vezes mais expresso em macrófagos recrutados por tioglicolato tratados com PTX3 em comparação com macrófagos recrutados não tratados com a proteína. Esse gene codifica para uma proteína também chamada de Vamp3. Uma das questões intrigantes no estudo do processo de fagocitose é como a área da superfície da membrana plasmática é mantida mesmo com significativa internalização de membrana. A rapidez e a eficiência da internalização de partículas sugerem a mobilização de membranas provenientes de sítios intracelulares. Através da expressão de Vamp3 fusionado com GFP em células fagocíticas, foi demonstrado que endossomos recicláveis positivos para Vamp3 se fundiam na porção polarizada da membrana plasmática, providenciando áreas extras de membrana necessárias para extensão dos pseudópodes. Uma vez que a toxina do tétano inibe a fagocitose e cliva Vamp3 é razoável propor que o processo de fagocitose requer endossomos recicláveis (MELLMAN 2000). Em estudo utilizando animais nocautes para *Vamp3* foi demonstrado que os macrófagos destes animais tiveram uma taxa de internalização de partículas de Zymosan menor do que os macrófagos provenientes dos animais do tipo selvagem. Esse estudo mostrou que Vamp3 não é essencial na maturação de endossomos, mas é essencial para ótima fagocitose de Zymosan após o engajamento desta partícula à receptores de manose e β -glucano (ALLEN et al. 2002).

Esse nosso achado de que PTX3 é capaz de dobrar a expressão de *Vamp3* em macrófagos e o fato da proteína codificada por este gene estar envolvida na ótima fagocitose de Zymosan pode auxiliar na elucidação de um dos mecanismos pelos quais PTX3 é capaz de aumentar a capacidade fagocítica de Zymosan observada nos

macrófagos provenientes de animais que expressam níveis aumentados de PTX3 (DINIZ et al 2004). Esse dado proveniente de nossos estudos com microarrays fornece uma pista para melhor entender o envolvimento de PTX3 no processo de fagocitose. Nesse sentido, outros estudos poderiam ser realizados como, por exemplo, western blot para a proteína Vamp3 de extrato protéico de cultura de macrófagos transgênicos para PTX3, WT e macrófagos WT tratados com PTX3. Ainda poderia ser feito um estudo utilizando RNA de interferência para a proteína Vamp3 e mensuração do índice fagocítico destes macrófagos quando estimulados com Zymosan.

O caldo tioglicolato há muito tempo vem sendo utilizado para obtenção de populações enriquecidas de macrófagos do exudato peritoneal. No entanto, uma das restrições do uso do caldo tioglicolato é relacionada ao fato de que o estímulo é composto de um material muito complexo e heterogêneo dificultando as interpretações a cerca das respostas inflamatórias observadas nos estudos utilizando células recrutadas com esse agente. O caldo tioglicolato utilizado é composto por extrato de levedura, casitona, dextrose, l-cistina, cloreto de sódio, tioglicolato de sódio e agar. Embora algumas das características fenotípicas que diferem os macrófagos recrutados com caldo tioglicolato das células residentes já tenham sido relatadas na literatura, tais como maior produção de íons superóxidos (JOHNSTON et al. 1978), maior capacidade de formar colônias (OGHISO et al. 1992), maior capacidade fagocitária mediada por receptores Fc e do sistema complemento (TRIPATHI et al. 1994), nenhum estudo mais aprofundado foi publicado até hoje mostrando as diferenças no perfil de expressão gênica em resposta ao caldo tioglicolato.

Isso motivou a utilização dos dados do nosso banco sobre o perfil de expressão gênica em macrófagos residentes e recrutados por tioglicolato na identificação dos genes modulados por esse agente (item 3.4).

Dessa forma, identificamos 792 genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$) através da comparação do perfil de expressão gênica dos macrófagos elicitados com tioglicolato e macrófagos residentes. Dentre estes genes, usando como critério uma diferença de 3 vezes no valor da razão de expressão foram encontrados 34 genes diferencialmente expressos, 16 genes regulados negativamente em macrófagos elicitados por tioglicolato (Tabela 10) e 18 genes regulados positivamente nos macrófagos recrutados por tioglicolato (Tabela 11). Nessa análise foi demonstrado que o tioglicolato é um potente modulador da expressão gênica, modulando a expressão de genes envolvidos com a biossíntese de proteínas (*Eif4g1*, *Rps24*, *Rpl36a*, *Uba52*, *Rpsa*), endocitose (*Ly75*), diferenciação celular (*Dcamk1l*), regulação do citoesqueleto de actina (*Palld*), resposta à hipóxia (*Hif1a*), metabolismo de lipídeos (*Lpl*, *Lip*, *Aadac1l*), sinalização da via de mTOR (*Pdpk1*), adesão celular (*Icam2*, *Alcam*), citocina (*Il1b*), receptor (*Ptprs*), metabolismo de glicerofosfolipídeos (*Myst3*), sinalização na via de Ca^{2+} (*Cd38*) e reposta de fase aguda (*Saa*).

O gene *Aadac1l* (*arylacetamide deacetylase-like 1*) foi identificado por microarray como modulado positivamente (razão de expressão=9,64) em macrófagos recrutados por caldo tioglicolato. Na validação por Real Time PCR detectamos, em 6 novos pools de macrófagos, que esse gene está, em média 11,77 vezes mais expressos em macrófagos recrutados por tioglicolato.

Em 2001, TRICKETT et al. caracterizaram genes para *Aada* em camundongos e ratos. Foi notado que o domínio do sítio ativo de *Aada* mostrou considerável homologia com o presente na lipase sensível a hormônio (HSL), e então essa enzima foi classificada como uma lipase. Esse mesmo grupo propõe que *Aada*, também pode funcionar como a lipase durante o processo de secreção de lipoproteínas. Curiosamente, em 1987 GOLDBERG e KHOO mostraram que macrófagos peritoneais espontaneamente secretam lipoproteína lipase em cultura e que essa secreção foi cerca de 10 vezes maior em macrófagos elicitados por tioglicolato. Alterações no metabolismo de lipídeos e lipoproteínas podem ser desencadeadas por processos infecciosos e inflamatórios e envolvem mecanismos moleculares que incluem a regulação da expressão de citocinas e receptores (HASHAM e PILLARISSETTI 2006). Assim, devido à mudança no padrão de expressão do gene *Aadacl1*, acreditamos que o uso de macrófagos elicitados por tioglicolato no estudo de processos infecciosos e inflamatórios pode comprometer a precisão dos resultados encontrados uma vez que é muito provável que estes dados estejam super ou subestimados.

O gene *Hif-1a* (*hypoxia inducible factor 1, alpha subunit*) foi identificado por microarray como modulado positivamente (razão de expressão=3,55) em macrófagos recrutados por caldo tioglicolato. Na validação por Real Time PCR detectamos, em 6 novos pools de macrófagos, que esse gene está, em média, 1,65 vezes mais expressos em macrófagos recrutados por tioglicolato.

Em 1981 COHEN et al. apontaram que macrófagos elicitados por tioglicolato apresentam um vigoroso metabolismo oxidativo; esse estudo mostrou que macrófagos elicitados por tioglicolato consomem aproximadamente 3 vezes mais oxigênio em repouso e durante a fagocitose do que macrófagos residentes. Além disso, a presença de

agentes redutores (tioglicolato de sódio, tioglicolato ácido e L-cistina) no caldo tioglicolato resultam na redução do oxigênio à água. Assim, a própria composição do caldo tioglicolato e o vigoroso metabolismo oxidativo de macrófagos recrutados resultam na formação de um microambiente mais pobre em oxigênio, o que poderia estar relacionado ao aumento de expressão do *Hif-1a* (fator induzido por hipóxia).

O gene *Ly75* (*lymphocyte antigen 75*) foi identificado no nosso estudo como modulado positivamente por tioglicolato (razão de expressão = 6,04) através da técnica de microarray. Na validação por Real Time PCR detectamos, em 6 novos pools de macrófagos, que esse gene está, em média, 4,24 vezes mais expresso em macrófagos recrutados por tioglicolato. Esse gene, também conhecido como *Cd205* ou *Dec-205*, codifica para uma proteína que pertence à família de receptores de manose de macrófagos das lectinas do tipo C. Ao contrário de outros membros da família de receptores de manose de macrófagos, *DEC205* está regulado positivamente na maturação de células dendríticas. Essas moléculas estão envolvidas em uma grande variedade de funções biológicas incluindo a captura e a internalização de ligantes para subsequente processamento e apresentação pelas células dendríticas. KATO et al. (1998) mostraram que a expressão de DEC-205 é maior em células relacionadas com o processamento e a apresentação de antígenos. A super expressão desse gene em macrófagos recrutados por tioglicolato, além de corroborar a idéia de que essas células estão em estágios mais avançados no processo de maturação apontam para a necessidade de cuidado no uso de células recrutadas em estudos de endocitose, processamento e apresentação de antígenos.

Foi reportado que macrófagos elicitados com caldo tioglicolato apresentam maior capacidade de internalizar partículas de GXM (*Glucuronoxylomannan*) do fungo *Cryptococcus neoformans* do que macrófagos residentes (CHANG et al. 2006). O

resultado do experimento de microarray mostrando que macrófagos recrutados com tioglicolato aumentam a expressão do gene *Ly75* ajuda a esclarecer os mecanismos moleculares que servem de base para este fenótipo observado da maior internalização das partículas de fungo por essa subpopulação de macrófagos.

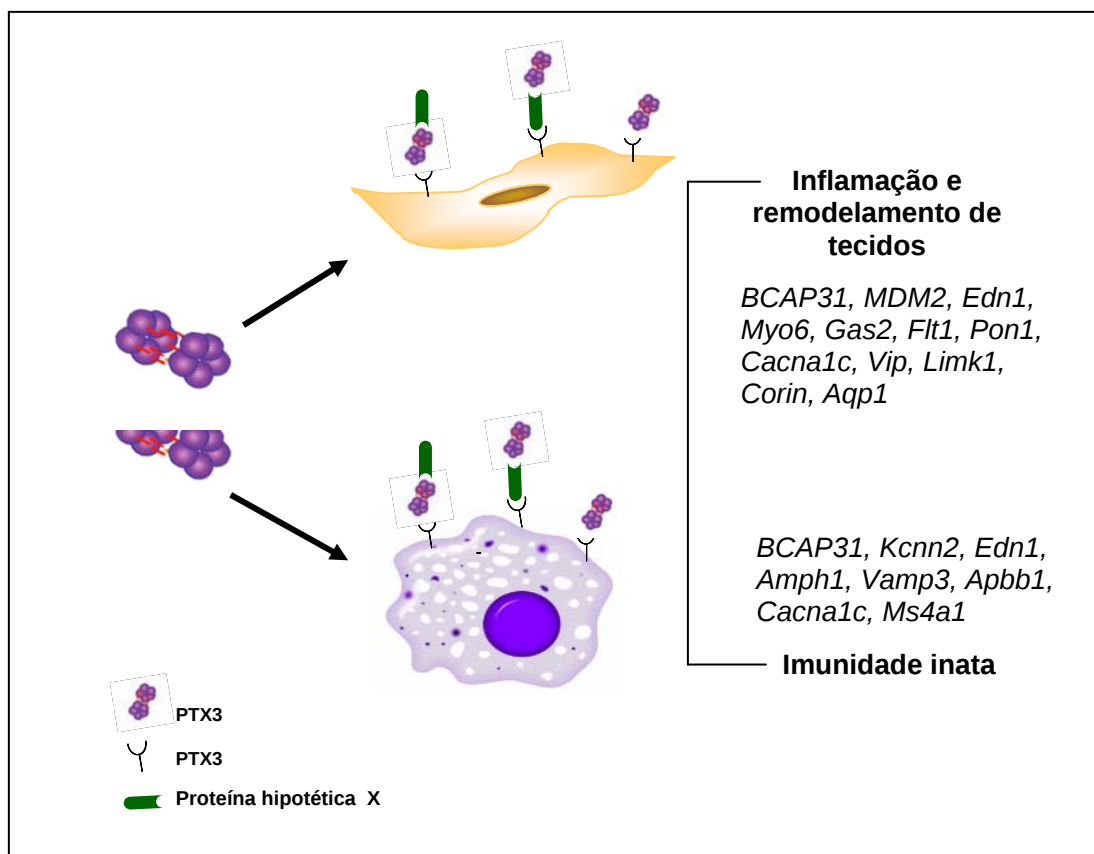
Dessa forma, nossos resultados provenientes da comparação do perfil de expressão gênica de macrófagos recrutados por tioglicolato com o perfil de expressão de macrófagos residentes evidenciam que o tioglicolato é um potente modulador da expressão gênica e auxiliam na compreensão de achados reportados na literatura que mostram resultados divergentes quando se utiliza em estudos macrófagos residentes e recrutados por tioglicolato.

Buscando identificar um possível efeito aditivo entre PTX3 e o caldo tioglicolato realizamos o teste de ANOVA comparando o perfil de expressão de todos os grupos estudados (RES, REST, TIO, TIOT). Foram identificados, assim, 285 elementos com $p < 0,05$ em pelo menos uma das comparações. Em seguida foi aplicado o teste de Tukey para identificação através da comparação par a par entre os grupos, daqueles genes nos quais houve significância da diferença de expressão. Com base no padrão de modulação os 285 genes foram agrupados em clusters menores pela abordagem do Self Organizing Map (SOM). Nessa análise notamos em todos os clusters que que Tio parece causar um maior impacto na modulação da expressão gênica do que o tratamento com PTX3. Na tentativa de melhor evidenciar o efeito aditivo de PTX3 e tioglicolato foi realizada uma análise individualizada selecionando, dentre os 285 genes identificados por ANOVA, aqueles que apresentaram $p < 0,05$ na comparação macrófagos elicitados por tioglicolato tratados com PTX3 versus macrófagos residentes não tratados com PTX3 (TIOT X RESC). Dessa forma, foram selecionados 131 genes candidatos. O perfil de expressão

destes genes em cada uma das comparações foi avaliado individualmente e na Tabela 16 são mostrados os 10 candidatos selecionados e que deverão ser validados de forma independente por outra abordagem experimental.

Os resultados obtidos pela técnica de Real Time PCR mostrando que PTX3 induz a expressão de *Nos2* e *Il1b* (Figura 32) estão de acordo com os dados previamente obtidos pelo grupo que mostraram que os macrófagos peritoneais isolados dos animais transgênicos produzem quantidades aumentadas de óxido nítrico em resposta à estimulação concomitante por Ifng + Tnf ou Ifng + LPS (GOODMAN et al. 2000) e também corroboram os dados obtidos por RT-PCR sob condições não saturantes onde mostramos, em dois experimentos independentes, que PTX3 aumenta a expressão de *Nos2* em macrófagos residentes peritoneais murinos.

Dessa maneira, os resultados obtidos nesse trabalho apontam que além de PTX3 atuar como um receptor solúvel capaz de reconhecer patógenos (GARLANDA et al. 2002), de funcionar como uma opsonina (DINIZ et al. 2004) e de ser um importante integrante da matriz extracelular interagindo com outros elementos tais como Tnfaip6 e IalpaI (SALUSTRI et al. 2004; SCARCHILLI et al. 2007), esta pentraxina também atua na modulação da expressão gênica. Alguns dos genes identificados por nós estão associados a funções já conhecidas atribuídas a PTX3 tais como fagocitose, remodelamento de tecido, vasculogênese, inflamação, como sugerido no diagrama da Figura 34. Muitos dos genes identificados comprovam a importância deste mediador na resposta inflamatória e na resposta imune inata. A variedade dos módulos funcionais aos quais se relacionam os genes identificados atesta a atividade pleiotrópica de PTX3, característica comum à maioria das citocinas e mediadores inflamatórios tais como TNF, IL1B e NOS2.



Legenda: Empregando a metodologia de microarrays vários genes modulados por PTX3 foram identificados em macrófagos peritoneais murinos e em fibroblastos humanos (GM637). Muitos dos genes encontrados estão envolvidos com funções já atribuídas a PTX3 na imunidade inata, na inflamação e remodelamento de tecidos. Nossos dados indicam que uma transdução de sinal é disparada em resposta à PTX3. O tratamento com a pentraxina 3 leva à transdução de sinais intracelulares que poderiam ser desencadeados pela ligação de PTX3 a um receptor de forma direta ou talvez por intermédio de uma segunda proteína, ainda não identificada com a qual PTX3 interagiria.

Figura 34 – Diagrama da atuação de PTX3 na modulação da expressão de genes em fibroblastos humanos (GM637) e em macrófagos peritoneais murinos.

7 CONCLUSÕES

- Foram identificados 143 genes diferencialmente expressos com valor de $p < 0,05$ (teste *t de Student*) a partir da comparação do perfil de expressão de fibroblastos humanos da linhagem GM637 tratados com PTX3 com aquele proveniente de fibroblastos não tratados. A pequena magnitude dos valores de razão de expressão encontrados ($< 1,55$), confirmados também por QPCR, são sugestivos, entretanto de que PTX3 não é um potente modulador da expressão gênica neste tipo celular, pelo menos nas condições experimentais adotadas neste estudo;
- Da comparação do perfil de expressão de macrófagos peritoneais murinos residentes (RES) tratados com PTX3 com aquele proveniente de RES não tratados com a proteína foram identificados 239 genes diferencialmente expressos com $p < 0,05$ (teste *t de Student*). Destes, 36 dos genes apresentaram razão de expressão maior que 1,8 e 24 razão de expressão maior que 2;
- Dentre os genes identificados como diferencialmente expressos em resposta à PTX3 em macrófagos RES estão elementos envolvidos no transporte de íons (*Kcnn2*, *Cacna1c*), metabolismo de malato (*Me3*), atividade de fosfatase (*Dusp11*), endocitose (*Amph*), regulação da pressão sanguínea (*Edn1*), transdução de sinal (*Celsr1*, *Gcgr*), transporte de neurotransmissor (*Slc17a6*), regulação de crescimento celular (*Apbb1*, *Socs2*), regulação da transcrição (*Hmga2*), hormônio (*Prlpk*), atividade de proteína quinase (*Limk1*), receptor (*Cd244*, *Celsr1*, *Gcgr*, *Pvrl3*), metabolismo da arginina (*Fah*), metabolismo

do glutamato (*Slc17a6*, *Myo6*), resposta a danos no DNA (*Brcc3*), regulação da transcrição (*Hmga2*) e metabolismo de lipídeos (*Akr1b7*, *Pccb*);

- Os resultados da análise da expressão de genes modulados por PTX3 nos macrófagos peritoneais residentes sugerem que esta população é um dos alvos da ação biológica desta pentraxina. Os genes encontrados como diferencialmente expressos podem contribuir para o entendimento do mecanismo de ação de PTX3, uma vez que muitos deles estão associados a eventos biológicos sabidamente relacionados à ação de PTX3;
- A partir da comparação do perfil de expressão de macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato tratados com PTX3 (TIOT) com aquele proveniente de TIO não tratados com a proteína (TIOC) foram identificados 687 genes potencialmente diferencialmente expressos com $p < 0,05$ (teste *t de Student*). Desses, 28 genes apresentaram razão de expressão maior que 1,8 e 5 genes razão de expressão maior que 2;
- Dentre os genes identificados como diferencialmente expressos em resposta à PTX3 em macrófagos recrutados por tioglicolato estão elementos envolvidos no metabolismo de ácidos graxos (*Hao3*, *Slc27a2*) no desenvolvimento embrionário (*Nckap1*), na secreção de neurotransmissor (*Syn2*), na atividade de hormonal (*Prl*), na atividade peptidase (*Corin*), no transporte mediado por vesículas (*Vamp3*), receptor (*Celsr1*, *Ms4a1*, *Bai3*), endocitose (*Synj2bp*), na biosíntese de Acetil CoA (*Acss1*), na atividade oxidoreductase (*Idh3b*, *Aldh6a1*, *Hao3*, *Aldh1a1*), na circulação sanguínea (*Pon1*), fator de crescimento (*Hdgf*), na via de sinalização da dopamina (*Nsg1*), no ciclo celular (*Rbbp4*);

- Os resultados da análise da expressão de genes modulados por PTX3 nos macrófagos peritoneais recrutados por Tioglicolato, corroboram os dados da ação de PTX3 sobre os macrófagos residentes e sugerem que esta população também é um dos alvos da ação biológica desta pentraxina. Os genes encontrados como diferencialmente expressos podem contribuir para o entendimento do mecanismo de ação de PTX3, uma vez muitos desses genes estão associados a eventos biológicos sabidamente relacionados à ação pleiotrópica desta pentraxina;
- A partir da comparação do perfil de expressão de macrófagos peritoneais murinos recrutados por tioglicolato (TIOC) com aquele proveniente de macrófagos peritoneais murinos residentes (RESC) foram identificados 792 genes diferencialmente expressos com $p < 0,05$ (teste *t de Student*) dos quais 34 com razão de expressão maior que 3. A diferença de expressão de alguns destes genes foi validada por Real Time PCR com uma taxa de validação de 70% de concordância com os achados do microarray;
- O caldo tioglicolato se mostrou um potente modulador da expressão gênica, alterando a expressão de vários genes, dentre eles elementos envolvidos com a biossíntese de proteínas (*Eif4g1*, *Rps24*, *Rpl36a*, *Uba52*, *Rpsa*), endocitose (*Ly75*), diferenciação celular (*Dcamk1l*), regulação do citoesqueleto de actina (*Palld*), resposta à hipóxia (*Hif1a*), metabolismo de lipídeos (*Lpl*, *Lip*, *Aadacl1*), sinalização da via de mTOR (*Pdpk1*), adesão celular (*Icam2*, *Alcam*), citocina (*Il1b*), receptor (*Ptprs*), metabolismo de glicerofosfolipídeos (*Myst3*), sinalização na via de Ca^{2+} (*Cd38*) e resposta de fase aguda (*Saa*). Essa modulação da expressão de genes por tioglicolato deve ser considerada

na interpretação de resultados utilizando essa sub-população de macrófagos em trabalhos experimentais;

- A análise do efeito aditivo de PTX3 e tioglicolato foi feita através do teste estatístico de ANOVA entre os grupos (RESC, REST, TIOC, TIOT), foram identificados vários genes cuja modulação por tio é alterada quando este agente é administrado junto com PTX3 e muitos genes regulados apenas pelo tratamento combinado PTX3 + TIO.
- Através da análise da expressão gênica de um painel de mediadores inflamatórios por QPCR em cinco novos diferentes pools de macrófagos peritoneais residentes, foi verificado que PTX3 é capaz de regular positivamente a expressão de *iNOs* e *Il1b* nestas células. A expressão desses mediadores inflamatórios é duas vezes maior em RES tratados com PTX3, o que está de acordo com dados anteriores obtidos por RT-PCR semi-quantitativa e os dados que mostram que os macrófagos dos animais que transgênicos para PTX3 produzem quantidades aumentadas de NO em resposta à estimulação concomitante por Ifng e Tnf ou Ifng e LPS;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abderrahim-Ferkoune A, Bezy O, Chiellini C, et al. Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNF α -induced secreted protein of adipose cells. **J Lipid Res** 2003; 44:994-1000.

Agapitov AV, Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst** 2002; 3:1-15.

Allen LA, Yang C, Pessin JE. Rate and extent of phagocytosis in macrophages lacking vamp3. **J Leukoc Biol** 2002; 72:217-21.

Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. **Blood** 1994; 84:3483-93.

Altmeyer A, Klampfer L, Goodman AR, Vilcek J. Promoter structure and transcriptional activation of the murine TSG-14 gene encoding a tumor necrosis factor/interleukin-1-inducible pentraxin protein. **J Biol Chem** 1995; 270:25584-90.

Angerio AD. Endothelin-1-mediated inflammation in acute renal failure. **Crit Care Nurs Q** 2006; 29:152-6.

Baruah P, Dumitriu IE, Peri G, et al. The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells. **J Leukoc Biol** 2006; 80:87-95.

Basile A, Sica A, d'Aniello E, et al. Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF-kappaB in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulation. **J Biol Chem** 1997; 272:8172-8.

Beckman KB, Lee KY, Golden T, Melov S. Gene expression profiling in mitochondrial disease: assessment of microarray accuracy by high-throughput Q-PCR. **Mitochondrion** 2004; 4:453-70.

Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, et al. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature** 1985; 316:552-4.

Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, et al. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. **J Biol Chem** 1997; 272:32817-23.

Bozza S, Bistoni F, Gaziano R, et al. Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. **Blood** 2006; 108:3387-96.

Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. **J Biol Chem** 1992; 267:22190-7.

Bussolati B, Peri G, Salvidio G, Verzola D, Mantovani A, Camussi G. The long pentraxin PTX3 is synthesized in IgA glomerulonephritis and activates mesangial cells. **J Immunol** 2003; 170:1466-72.

Camozzi M, Zacchigna S, Rusnati M, et al. Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2005; 25:1837-42.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1975; 72:3666-70.

Cetin I, Cozzi V, Pasqualini F, et al. Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in preeclampsia and intrauterine growth restriction. **Am J Obstet Gynecol** 2006; 194:1347-53.

Chan JC, Knudson O, Wu F, Morser J, Dole WP, Wu Q. Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005; 102:785-90.

Chang ZL, Netski D, Thorkildson P, Kozel TR. Binding and internalization of glucuronoxylomannan, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*, by murine peritoneal macrophages. **Infect Immun** 2006; 74:144-51.

Cohen MS, Ryan JL, Root RK. The oxidative metabolism of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages: the relationship between oxygen, superoxide and hydrogen peroxide and the effect of monolayer formation. **J Immunol** 1981; 127:1007-11.

Cohn ZA. Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. **J Immunol** 1978; 121:813-6.

Cotena A, Maina V, Sironi M, et al. Complement dependent amplification of the innate response to a cognate microbial ligand by the long pentraxin PTX3. **J Immunol** 2007; 179:6311-7.

Cox WG, Singer VL. Fluorescent DNA hybridization probe preparation using amine modification and reactive dye coupling. **Biotechniques** 2004; 36:114-22.

Cunningham C, Wilcockson DC, Campion S, Lunnon K, Perry VH. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. **J Neurosci** 2005; 25:9275-84.

Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, et al. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? **BMC Genomics** 2005; 6:59.

Davies JQ, Gordon S. Isolation and culture of murine macrophages. **Methods Mol Biol** 2005; 290:91-103.

de Almeida CJ, Linden R. Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance. **Cell Mol Life Sci** 2005; 62:1532-46.

Dias AA, Goodman AR, dos Santos JL, et al. TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. **J Leukoc Biol** 2001; 69:928-36.

Diniz SN, Nomizo R, Cisalpino PS, et al. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. **J Leukoc Biol** 2004; 75:649-56.

Dodds DC, Omeis IA, Cushman SJ, Helms JA, Perin MS. Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49. **J Biol Chem** 1997; 272:21488-94.

Doni A, Peri G, Chieppa M, et al. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. **Eur J Immunol** 2003; 33:2886-93.

Doni A, Paffoni A, Nebuloni M, Ragni G, Pasqualini F, Valentino S, Bonetti S, Mantovani A, Somigliana E, Garlanda C. The long pentraxin 3 is a soluble and cell-associated component of the human semen. **Int J Androl** 2007 Dec 30 [Epub ahead of print].

dos Santos CC, Han B, Andrade CF, Bai X, Uhlig S, Hubmayr R, Tsang M, Lodyga M, Keshavjee S, Slutsky AS, Liu M. DNA microarray analysis of gene expression in alveolar epithelial cells in response to TNF α , LPS, and cyclic stretch. **Physiol Genomics** 2004; 19:331-42.

Duzhy D, Harvey M, Sokolowski B. A secretory-type protein, containing a pentraxin domain, interacts with an A-type K⁺ channel. **J Biol Chem** 2005; 280:15165-72.

Etienne W, Meyer MH, Peppers J, Meyer RA Jr. Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. **Biotechniques** 2004; 36:618-20, 622, 624-6.

Fagan KA, McMurtry IF, Rodman DM. Role of endothelin-1 in lung disease. **Respir Res** 2001; 2:90-101.

Fazzini F, Peri G, Doni A, et al. PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation. **Arthritis Rheum** 2001; 44:2841-50.

Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. **Nature** 2002; 420:182-6.

Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. **Annu Rev Immunol** 2005; 23:337-66.

Gaziano R, Bozza S, Bellocchio S, et al. Anti-Aspergillus fumigatus efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals. **Antimicrob Agents Chemother** 2004; 48:4414-21.

Goldberg DI, Khoo JC. Regulation of lipoprotein lipase secretion by mouse peritoneal macrophages. **Biochem Biophys Res Commun** 1987; 142:1-6.

Gomes LI, Silva RL, Stolf BS, et al. Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. **Anal Biochem** 2003; 321:244-51.

González-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. **Annu Rev Neurosci** 1999; 22:219-40.

Goodman AR, Cardozo T, Abagyan R, Altmeyer A, Wisniewski HG, Vilcek J. Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. **Cytokine Growth Factor Rev** 1996; 7:191-202.

Goodman AR, Levy DE, Reis LF, Vilcek J. Differential regulation of TSG-14 expression in murine fibroblasts and peritoneal macrophages. **J Leukoc Biol** 2000; 67:387-95.

Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell** 2002; 111:927-30.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol** 2003; 3:23-35.

Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. **J Zhejiang Univ Sci B** 2005; 6:1045-56.

Han B, Mura M, Andrade CF, et al. TNF α -induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. **J Immunol** 2005; 175:8303-11.

Hart SP, Haslett C, Dransfield I. Recognition of apoptotic cells by phagocytes. **Experientia** 1996; 52:950-6.

Hasham SN, Pillarisetti S. Vascular lipases, inflammation and atherosclerosis. **Clin Chim Acta** 2006; 372:179-83.

He X, Han B, Liu M. Long pentraxin 3 in pulmonary infection and acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2007; 292:L1039-49.

Hsu YC, Perin MS. Human neuronal pentraxin II (NPTX2): conservation, genomic structure, and chromosomal localization. **Genomics** 1995; 28:220-7.

Imamura M, Kawasaki T, Savchenko AS, et al. Lipopolysaccharide induced expression of pentraxin 3 in human neutrophils and monocyte-derived macrophages. **Cell Immunol** 2007; 248:86-94.

Introna M, Alles VV, Castellano M, et al. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. **Blood** 1996; 87:1862-72.

Jaillon S, Peri G, Delneste Y, et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. **J Exp Med** 2007; 204:793-804.

Jara LJ, Navarro C, Medina G, Vera-Lastra O, Blanco F. Immune-neuroendocrine interactions and autoimmune diseases. **Clin Dev Immunol** 2006; 13:109-23.

Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, et al. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. **Immunity** 2005; 22:551-60.

Johnston RB Jr, Godzik CA, Cohn ZA. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. **J Exp Med** 1978; 148:115-27.

Kato M, Neil TK, Clark GJ, Morris CM, Sorg RV, Hart DN. cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigen-uptake receptor on dendritic cells. **Immunogenetics** 1998; 47:442-50.

Kato S, Ochiai M, Sakurada T, et al. Increased expression of long pentraxin ptx3 in inflammatory bowel diseases. **Dig Dis Sci** 2007 Nov 8 [Epub ahead of print]

Kelley KW, Weigent DA, Kooijman R. Protein hormones and immunity. **Brain Behav Immun** 2007; 21:384-92.

Khanna R, Roy L, Zhu X, Schlichter LC. K⁺ channels and the microglial respiratory burst. **Am J Physiol Cell Physiol** 2001; 280:C796-806.

Klouche M, Peri G, Knabbe C, et al. Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis** 2004; 175:221-8.

Kotooka N, Inoue T, Aoki S, Anan M, Komoda H, Node K. Prognostic value of pentraxin 3 in patients with chronic heart failure. **Int J Cardiol** 2007 Nov 26 [Epub ahead of print]

Kucherlapati R, Hwang SP, Shimizu N, McDougall JK, Botchan MR. Another chromosomal assignment for a simian virus 40 integration site in human cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1978; 75:4460-4.

Kunes P, Lonský V, Mand'ák J, et al. Essential PTX3 biology (not only) for cardiologists and cardiac surgeons. **Acta Medica (Hradec Kralove)** 2007; 50:29-33.

Larkin JE, Frank BC, Gaspard RM, Duka I, Gavras H, Quackenbush J. Cardiac transcriptional response to acute and chronic angiotensin II treatments. **Physiol Genomics** 2004; 18:152-66.

Larsen EC, DiGennaro JA, Saito N, et al. Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. **J Immunol** 2000; 165:2809-17.

Latini R, Maggioni AP, Peri G, et al. Lipid Assessment Trial Italian Network (LATIN) Investigators. Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. **Circulation** 2004; 110:2349-54.

Lee GW, Goodman AR, Lee TH, Vilcek J. Relationship of TSG-14 protein to the pentraxin family of major acute phase proteins. **J Immunol** 1994; 153:3700-7.

Lee MS, Kim YJ. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. **Mol Cells** 2007; 23:1-10.

Lee TH, Lee GW, Ziff EB, Vilcek J. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. **Mol Cell Biol** 1990; 10:1982-8.

Leijh PC, van Zwet TL, ter Kuile MN, van Furth R. Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. **Infect Immun** 1984; 46:448-52.

Luchetti MM, Piccinini G, Mantovani A, et al. Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). **Clin Exp Immunol** 2000; 119:196-202.

Luchetti MM, Sambo P, Majlingová P, et al. Scleroderma fibroblasts constitutively express the long pentraxin PTX3. **Clin Exp Rheumatol** 2004; 22(3 Suppl 33):S66-72.

Malaponte G, Libra M, Bevelacqua Y, et al. Inflammatory status in patients with chronic renal failure: the role of PTX3 and pro-inflammatory cytokines. **Int J Mol Med** 2007; 20:471-81.

Mantovani A, Muzio M, Ghezzi P, Colotta C, Introna M. Regulation of inhibitory pathways of the interleukin-1 system. **Ann N Y Acad Sci** 1998; 840:338-51.

Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B. Pentraxin 3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. **Vaccine** 2003; 21 Suppl 2:S43-7.

Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from c-reactive protein to the long pentraxin PTX3. **J Clin Immunol** 2008; 28:1-13.

Marques MM **Análise da modulação gênica modulada por PTX3**. São Paulo: 2005; [Monografia de Conclusão de Curso-Ciências Biológicas-Universidade de São Paulo].

Matsutani T, Samy TS, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH. Transgenic prolactin-/- mice: effect of trauma-hemorrhage on splenocyte functions. **Am J Physiol Cell Physiol** 2005; 288:C1109-16.

Maylie J, Bond CT, Herson PS, Lee WS, Adelman JP. Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and calmodulin. **J Physiol** 2004; 554:255-61.

McCarter SD, Lai PF, Suen RS, Stewart DJ. Regulation of endothelin-1 by angiopoietin-1: implications for inflammation. **Exp Biol Med (Maywood)** 2006; 231:985-91.

Mellman I. Quo vadis: polarized membrane recycling in motility and phagocytosis. **J Cell Biol** 2000; 149:529-30.

Minegishi T, Nakamura M, Abe K, et al. Adrenomedullin and atrial natriuretic peptide concentrations in normal pregnancy and pre-eclampsia. **Mol Hum Reprod** 1999; 5:767-70.

Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. **Biol Proced Online** 2006; 8:175-93.

Mosser DM. The many faces of macrophage activation. **J Leukoc Biol** 2003; 73:209-12.

Muller B, Peri G, Doni A, et al. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. **Crit Care Med** 2001; 29:1404-7.

Napoleone E, di Santo A, Peri G, et al. The long pentraxin PTX3 up-regulates tissue factor in activated monocytes: another link between inflammation and clotting activation. **J Leukoc Biol** 2004; 76:203-9.

Nauta AJ, Bottazzi B, Mantovani A, et al. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. **Eur J Immunol** 2003; 33:465-73.

Nauta AJ, de Haij S, Bottazzi B, et al. Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. **Kidney Int** 2005; 67:543-53.

Oghiso Y, Yamada Y, Shibata Y. Exudation of proliferative macrophages in local inflammation in the peritoneum. **J Leukoc Biol** 1992; 52:421-4.

Okutani D, Han B, Mura M, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. High-volume ventilation induces pentraxin 3 expression in multiple acute lung injury models in rats. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2007; 292:L144-53.

Old LJ. Tumor necrosis factor. **Sci Am** 1988; 258:59-60, 69-75.

Osmand AP, Friedenson B, Gewurz H, Painter RH, Hofmann T, Shelton E. Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins). **Proc Natl Acad Sci U S A** 1977; 74:739-43.

Peri G, Introna M, Corradi D, et al. PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. **Circulation** 2000; 102:636-41.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Piechota M, Banach M, Irzmanski R, et al. Plasma endothelin-1 levels in septic patients. **J Intensive Care Med** 2007; 22:232-9.

Polentarutti N, Bottazzi B, Di Santo E, et al. Inducible expression of the long pentraxin PTX3 in the central nervous system. **J Neuroimmunol** 2000; 106:87-94.

Popovici RM, Krause MS, Jauckus J, et al. The long pentraxin ptx3 in human endometrium: regulation by steroids and trophoblast products. **Endocrinology** 2007; 149:1136-43

Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. **Methods** 2001; 25:443-51.

Ravizza T, Moneta D, Bottazzi B, et al. Dynamic induction of the long pentraxin PTX3 in the CNS after limbic seizures: evidence for a protective role in seizure-induced neurodegeneration. **Neuroscience** 2001; 105:43-53.

Real JM, Marques MM, Camargo AA, Deheinzelin D, Dias AAM. The role of the acute phase protein PTX3 in the ventilator-induced lung injury [Abstract] **Eur Respir J** 2007; 30(Suppl 51):456s. Available from: <URL:http://www.ersnet.org/ers/lr/browse/default.aspx?id_dossier=71041> [2008 jan 12].

Ren Y, Savill J. Apoptosis: the importance of being eaten. **Cell Death Differ** 1998; 5:563-8.

Rivieccio V, Esposito A, Bellofiore P, et al. High-level expression and efficient purification of recombinant human long pentraxin PTX3 in Chinese hamster ovary cells. **Protein Expr Purif** 2007; 51:49-58.

Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hansson GK. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2002; 22:e10-4.

Rovere P, Peri G, Fazzini F, et al. The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. **Blood** 2000; 96:4300-6.

Rovere-Querini P, Antonacci S, Dell'Antonio G, et al. Plasma and tissue expression of the long pentraxin 3 during normal pregnancy and preeclampsia. **Obstet Gynecol** 2006; 108:148-55.

Rusnati M, Camozzi M, Moroni E, et al. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. **Blood** 2004; 104:92-9.

Salustri A, Garlanda C, Hirsch E, et al. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. **Development** 2004; 131:1577-86. Epub 2004 Mar 3. Erratum in: **Development**. 2004; 131:2235.

Savchenko A, Imamura M, Ohashi R, et al. Expression of pentraxin 3 (PTX3) in human atherosclerotic lesions. **J Pathol** 2007 Dec 17; [Epub ahead of print].

Scarchilli L, Camaioni A, Bottazzi B, et al. PTX3 interacts with inter-alpha-trypsin inhibitor: implications for hyaluronan organization and cumulus oophorus expansion. **J Biol Chem** 2007; 282:30161-70.

Schlimgen AK, Helms JA, Vogel H, Perin MS. Neuronal pentraxin, a secreted protein with homology to acute phase proteins of the immune system. **Neuron** 1995; 14:519-26.

Shimada K, Kita T, Yonetani Y, Suzumura A, Nakashima T. The effect of endothelin-1 on lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase 2 expression in association with prostaglandin E(2). **Eur J Pharmacol** 2000; 388:187-94.

Sihvola RK, Pulkkinen VP, Koskinen PK, Lemström KB. Crosstalk of endothelin-1 and platelet-derived growth factor in cardiac allograft arteriosclerosis. **J Am Coll Cardiol** 2002; 39:710-7.

Soares AC, Souza DG, Pinho V, et al. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. **Microbes Infect** 2006; 8:1321-9.

Souza DG, Soares AC, Pinho V, et al. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **Am J Pathol** 2002; 160:1755-65. Erratum in: **Am J Pathol** 2003; 162:359.

Spitalny GL. Dissociation of bactericidal activity from other functions of activated macrophages in exudates induced by thioglycolate medium. **Infect Immun** 1981; 34:274-84.

Suzuki S, Takeishi Y, Niizeki T, et al. Pentraxin 3, a new marker for vascular inflammation, predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. **Am Heart J** 2008; 155:75-81.

Trickett JJ, Patel DD, Knight BL, Saggerson ED, Gibbons GF, Pease RJ. Characterization of the rodent genes for arylacetamide deacetylase, a putative microsomal lipase, and evidence for transcriptional regulation. **J Biol Chem** 2001; 276:39522-32.

Tripathi AK, Chakrabarty AK, Sengupta P, Saha K. Modulation of Fc and C3b receptor activity of mouse peritoneal macrophages elicited by preformed immune complexes. **Indian J Exp Biol** 1994; 32:149-54.

Turchyn LR, Baginski TJ, Renkiewicz RR, Lesch CA, Mobley JL. Phenotypic and functional analysis of murine resident and induced peritoneal macrophages. **Comp Med** 2007; 57:574-80.

van Rossum AP, Pas HH, Fazzini F, et al. Abundance of the long pentraxin PTX3 at sites of leukocytoclastic lesions in patients with small-vessel vasculitis. **Arthritis Rheum** 2006; 54:986-91.

Varani S, Elvin JA, Yan C, et al. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. **Mol Endocrinol** 2002; 16:1154-67.

Vouret-Craviari V, Matteucci C, Peri G, Poli G, Introna M, Mantovani A. Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. **Infect Immun** 1997; 65:1345-50.

Wahl JR, Goetsch NJ, Young HJ, et al. Murine macrophages produce endothelin-1 after microbial stimulation. **Exp Biol Med (Maywood)** 2005; 230:652-8.

Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000; 97:8525-9.

Zhang X, Jafari N, Barnes RB, Confino E, Milad M, Kazer RR. Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. **Fertil Steril** 2005; 83 Suppl 1:1169-79.

ANEXOS

Anexo 1- Padronização do protocolo de hibridização das plataformas provenientes do FCCC

Apesar da vasta experiência do Laboratório de Genômica Funcional do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer de São Paulo no uso da tecnologia de cDNA microarrays, a plataforma empregada neste estudo, mouse_v3.0.2, proveniente do Instituto Fox Chase Cancer Center (FCCC) onde 16.128 oligonucleotídeos correspondentes à seqüências murinas encontram-se fixados, nunca havia sido utilizada antes neste laboratório. Isso requereu a realização de etapas para padronização do protocolo a ser empregado na hibridização destes arrays.

Ao todo, nas etapas de padronização foram testados e otimizados 3 protocolos diferentes: o proposto pelo FCCC, o de Church e Gilbert (1984) e um terceiro proposto pela Corning para as lâminas com cobertura Ultra Gaps. Para os testes e otimizações foram usados RNAs obtidos de culturas de macrófagos e de tecidos murinos e não aqueles das amostras deste projeto.

Seguindo o protocolo sugerido pelo Fox Chase, as lâminas foram pré hibridizadas a 42°C por 45 min, em câmara úmida, em solução contendo 5X SSC, 0.1% SDS e 1% de BSA. Após a adição dos aRNAs marcados, a hibridização foi feita por, pelo menos, 16 horas, também em câmara úmida, em solução contendo 40% de Formamida, 5X SSC e 0.1% SDS. A utilização da câmara úmida foi sugerida pelo FCCC devido à alta densidade de *spots* na plataforma. Após a hibridização, as lâminas foram lavadas de acordo com o seguinte esquema: (1) uma vez por 10 minutos em solução contendo 1XSSC e 0,2%SDS; (2) 5minutos em solução de 0,1XSSC e 0,2%SDS; (3) 1minuto em 0,1XSSC; (4) 10 segundos em água.

Foi também testado o protocolo de Church e Gilbert onde as lâminas foram pré-hibridizadas por 45 minutos à 60°C, em câmara úmida, em solução composta de 50% de solução fosfato, 7% SDS, 1% BSA e 1mM EDTA. Após este tempo, foram acrescentados os aRNAs marcados com os fluoróforos e as lâminas permaneceram a

60°C por, no mínimo 16 horas. Após este tempo foram feitas duas lavagens de 30 minutos a 65°C na solução contendo 50% fosfato, 1%SDS e 1mM de EDTA.

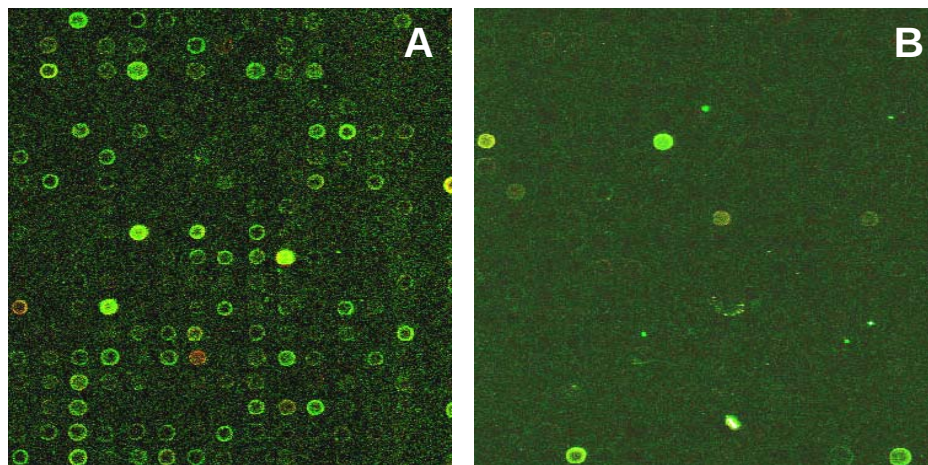
Após as etapas de lavagem de cada um dos protocolos, as lâminas foram centrifugadas à 2.160g por 5 minutos para secagem e as imagens foram geradas e processadas em scanner de laser confocal utilizando o programa ScanArray Express (PerkinElmer).

A figura 1 mostra o resultado obtido das hibridizações- teste em câmara úmida. Os resultados gerados seguindo o protocolo de Church e Gilbert mostraram-se melhores aos do protocolo sugerido pelo Instituto Fox Chase. Mesmo assim, como pode ser observado na figura 3, os resultados obtidos seguindo ambos protocolos não foram satisfatórios. Apesar da qualidade das marcações estarem dentro dos padrões recomendados e o *background* das lâminas não estar ruim, o sinal das hibridizações estava muito baixo.

Com o objetivo de melhorar a hibridização, testamos o protocolo sugerido pela Corning realizando as hibridizações na estação de hibridização e não mais na câmara úmida. De acordo com este protocolo a pré hibridização foi feita em uma solução composta por 5x SSC, 0,1% SDS, 0,5mg/mL BSA a 42° C por 90 minutos. As hibridizações foram feitas à 42° C, na estação de hibridização, por 16 horas, no mínimo. A solução de hibridização continha 25% de formamida, 5X SSC, 0,1% de SDS, 0,1mg/ml de esperma de salmão, PolyA e Cot 1 para um volume final de 100µL. Foram usados 5µg de aRNA total marcado com os fluoróforos em cada hibridização, sendo que destes 2,5µg eram provenientes da amostra e 2,5 µg do aRNA de referência.

As lavagens das lâminas foram feitas conforme o protocolo fornecido pela Corning: (1) uma vez por 5 minutos em solução contendo 2X SSC e 0,1% SDS; (2) duas lavagens de 5 minutos cada em solução contendo 0,1X SSC e 0,1%; (3) cinco lavagens de 1 minuto cada em solução de 0,1X SSC; (4) uma vez em solução contendo 0,01X SSC por 10 segundos.

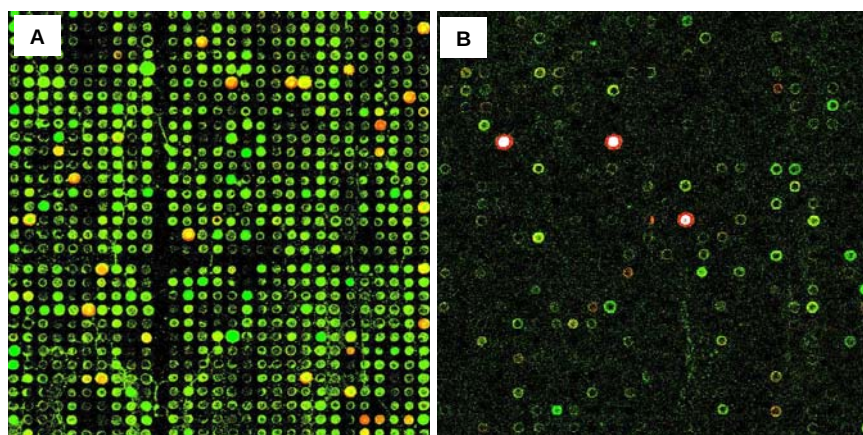
A secagem foi feita por centrifugação a 2.160g em temperatura ambiente por 2 minutos, com as lâminas na posição vertical.



Legenda: As plataformas mouse_v3.0.2 provenientes do FCCC foram hibridizadas de acordo com o protocolo sugerido pelo próprio FCCC e pelo de Church e Gilbert usando aRNAs marcados com Alexa 555 (amostra proveniente de macrófagos murinos) e Alexa 647 (RNA proveniente de tecidos murinos usados como referência). Ambos os protocolos geraram perfis com baixa intensidade de sinal tanto para o background quanto para a leitura dos spots.

Figura 1- Imagens dos arrays após as etapas de hibridização e lavagens usando o protocolo de Church e Gilbert (Imagem A) do e Fox Chase para câmara úmida (imagem B).

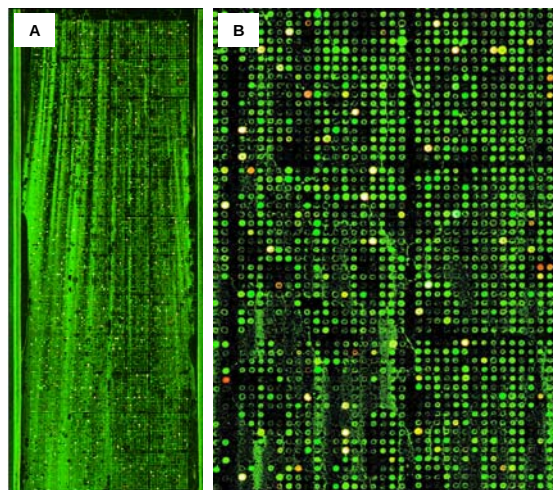
A Figura 2 mostra a imagem obtida das lâminas hibridizadas de acordo com o protocolo da Corning em comparação com uma imagem obtida de lâmina hibridizada seguindo o protocolo anteriormente utilizado de Church e Gilbert para câmara úmida.



Legenda: As plataformas mouse_v3.0.2 provenientes do FCCC foram hibridizadas de acordo com o protocolo sugerido pela Corning para lâminas com cobertura Ultragaps ou pelo de Church e Gilbert usando aRNAs marcados com Alexa 555 (amostra proveniente de macrófagos murinos) e Alexa 647 (RNA proveniente de tecidos murinos usados como referência).

Figura 2 – Imagem das lâminas após hibridização utilizando o protocolo da Corning (painel A) e o sugerido por Church e Gilbert (Painel B).

A utilização do protocolo da Corning conferiu uma melhora significativa na qualidade das imagens como é mostrado na figura 2, entretanto, apesar de o sinal obtido na hibridização dos spots ter sido bom, a qualidade geral da lâmina não foi satisfatória. Como pode ser verificado na imagem do painel A da figura 3, foi freqüente, quando da utilização do protocolo da Corning a presença de manchas de corante que pareciam escorrer do topo da lâmina e que aumentavam drasticamente o *background* em vários *subarrays*, inutilizando grande parte da lâmina. Resolvemos, então, melhorar a etapa de bloqueio das hibridizações inespecíficas nas lâminas. Além disso, suspeitávamos também que algum tipo de “cola” escorria da etiqueta contendo os códigos de barra que foram usadas na identificação da lâmina. Neste sentido, fizemos algumas modificações na solução e no tempo de pré hibridização, na solução de hibridização e na forma de centrifugar e lavar as lâminas após a hibridização.



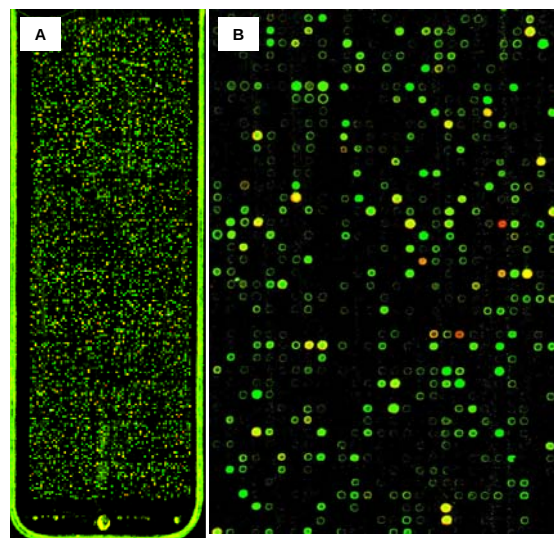
Legenda: As plataformas mouse_v3.0.2 provenientes do FCCC foram hibridizadas de acordo com o protocolo sugerido pela Corning para lâminas com cobertura Ultragaps usando aRNAs marcados com Alexa 555 (amostra proveniente de macrófagos murinos) e Alexa 647 (RNA proveniente de tecidos murinos usados como referência). Painel A: Foto da lâmina inteira onde pode-se notar a presença da mancha inutilizando quase toda a lâmina. Painel B: detalhe de alguns subarrays da lâmina mostrada em A.

Figura 3- Imagem representativa dos arrays após a hibridização com o protocolo da Corning.

O tempo de pré-hibridização foi aumentado de 90 minutos para aproximadamente 16 horas a 42 °C, enquanto que a solução de pré hibridização passou a conter 5X Denhardt's além de 5X SSC, 0,2% SDS e 1% BSA.

À solução de hibridização (25% de formamida, 5x SSC, 0,1% SDS, 0,1 mg/mL de esperma de salmão, Poly A, Cot 1) também acrescentamos 5X de Denhardt's em um volume final de 100µL. A hibridização foi feita na estação de hibridização Gene Tac (Genomic Solutions) a 42 °C por aproximadamente 16 horas sob as mesmas condições mencionadas anteriormente.

A lavagem da lâmina, após a hibridização, teve algumas etapas reduzidas e alteradas. A lâmina passou a ser lavada na posição horizontal, para evitar que a “cola” escorresse da etiqueta, e as lavagens com a segunda solução tiveram seu tempo reduzido enquanto que a última lavagem, com a solução mais estrigente, foi eliminada. A secagem, foi feita na centrífuga com a lâmina na posição vertical com a etiqueta de identificação voltada para a base. Na figura 4 são apresentadas imagens representativas do ganho de qualidade que as alterações feitas no protocolo da Corning promoveram.



Legenda: As plataformas mouse_v3.0.2 provenientes do FCCC foram hibridizadas de acordo com o protocolo sugerido pela Corning introduzindo adaptações para melhor bloqueio das lâminas. Foram usados aRNAs marcados com Alexa 555 (amostra proveniente de macrófagos murinos) e Alexa 647 (RNA proveniente de tecidos murinos usados como referência). Pannel A: Foto da lâmina inteira onde pode-se notar o desaparecimento da mancha apontada na figura5. Pannel B: detalhe de alguns *subarrays* da lâmina mostrada em A evidenciando a ausência de manchas e diminuição do *background*.

Figura 4- Imagem representativa dos arrays após segunda etapa de otimização da hibridização com o protocolo da Corning.

O aumento do tempo de pré-hibridização e a adição do Denhardt's nas soluções reduziu drasticamente o *background*. As alterações incluídas no processo de lavagem e secagem da lâmina após a hibridização pareceram ter evitado o aparecimento da mancha que suspeitávamos estar relacionada à etiqueta de identificação.

Embora este resultado da hibridização obtida tenha sido muito superior ao das hibridizações anteriores os novos procedimentos parecem ter levado a uma redução da intensidade do sinal dos spots. Assim sendo, continuamos a trabalhar um pouco mais na otimização dos protocolos visando obter um aumento do sinal de hibridização.

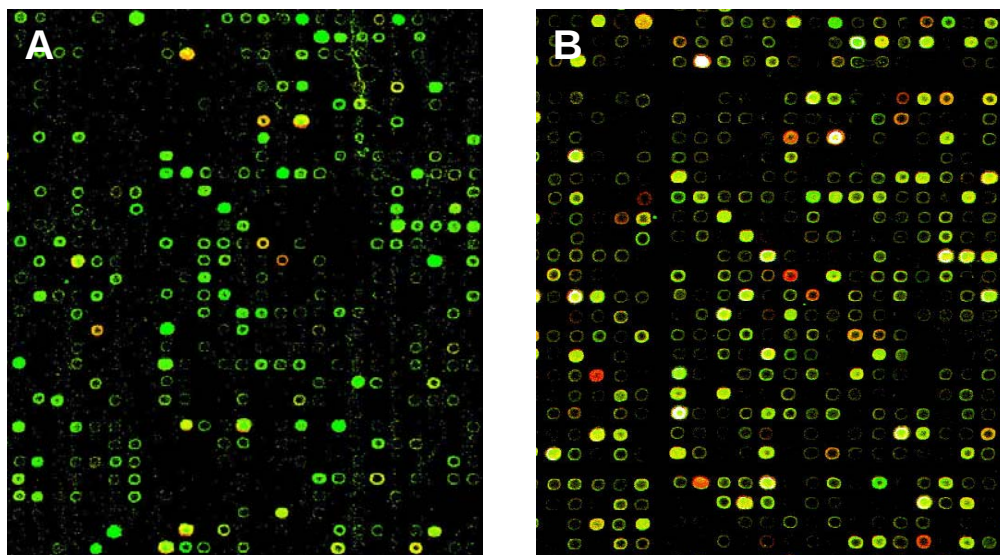
Desta forma, visando recuperar um aumento da intensidade de sinal dos *spots*, foram feitas novas alterações no protocolo. A pré hibridização das lâminas por 16 horas a 42°C, em uma solução contendo 5X Denhardt's, 5X SSC, 0,2%SDS e 1% BSA que havia sido padronizado previamente, foi mantida inalterada. Na hibridização, foi feita uma alteração visando aumentar a quantidade total de aRNA marcado com os fluoróforos de 5µg, usado anteriormente, para 7µg, dos quais 3,5µg eram provenientes da amostra e 3,5µg correspondentes ao aRNA de referência. Não foram feitas alterações referentes ao tipo de solução de hibridização utilizada, tendo sido mantida aquela contendo 5X Denhardt's, 25% de formamida, 5XSSC, 0,1% SDS, 0,1mg/mL de espermatozoides de salmão, PolyA e Cot1 em um volume final de 100µL. Os parâmetros da estação de hibridização Gene Tac (*Genomic Solutions*) também foram mantidos em uma temperatura de 42 °C por aproximadamente 16 horas.

No que se refere ao protocolo de lavagem das lâminas, as mesmas continuaram a ser lavadas na posição horizontal, mas alteramos os tempos e algumas soluções. Anteriormente, a primeira solução de lavagem continha 2X SSC e 0,1% SDS e as lâminas eram lavadas por 5 minutos, uma única vez, nesta solução. A segunda solução, continha 0,1X SSC e 0,1% SDS e lavávamos as lâminas durante 5 minutos duas vezes, enquanto que a terceira e última solução continha 0,1X SSC na qual lavávamos as lâminas por 1 minuto cinco vezes. Para esta lavagem, as lâminas foram retiradas do cassete de hibridização em um recipiente contendo uma solução 2X SSC 0,1% SDS, e suas etiquetas de identificação foram “esfregadas” manualmente para retirada de possíveis partículas e cola que possam grudar nelas. Depois, as lâminas foram acomodadas horizontalmente num suporte dentro de um outro recipiente com essa mesma solução, porém nova, onde

então lavadas por 5 minutos à 42°C. Após essa etapa, as lâminas foram lavadas por duas vezes numa solução contendo 0,1X SSC e 0,1% de SDS por 5 min à temperatura ambiente e, em seguida, submetidas a cinco lavagens de 1 minuto cada em 0,1X SSC.

A secagem, continuou sendo feita na centrífuga com a lâmina na posição vertical com a etiqueta de identificação voltada para a base e a captura da imagem e intensidades dos *spots* foi feita no equipamento *Scan Array*.

Como pode ser verificado na figura 5, quando as lâminas hibridizadas foram submetidas a um protocolo de lavagem menos estrigente, ocorreu um aumento nítido na qualidade, após uma breve análise comparativa das imagens obtidas (Painéis A e B da figura 3), observamos que, a quantidade de *spots* com intensidade de fluorescência maior que o *background* aumentaram e que, aparentemente, a qualidade da intensidade dos sinais melhorou após a lavagem menos rigorosa. Desta forma, optamos por adotar este protocolo menos rigoroso de lavagem nos nossos experimentos.



Legenda: As plataformas mouse_v3.0.2 provenientes do FCCC foram hibridizadas de acordo com o protocolo sugerido pela Corning para lâminas com cobertura Ultragaps usando aRNAs marcados com Alexa 555 (amostra de macrófagos murinos) e Alexa 647 (RNA proveniente de tecidos murinos usados como referência). Painel A: Imagem obtida pelo protocolo anterior mostrado na figura 4 onde um menor número de *spots* e uma baixa intensidade de sinal é visualizada após utilização de protocolo de lavagem muito estrigente. Painel B: Imagem representativa das lâminas obtidas após a etapa final de otimização do protocolo onde foi aumentada a quantidade de aRNAs usada na hibridização e diminuída a estringência das lavagens. Notar o aumento da quantidade de *spots* e da intensidade do sinal dos mesmos.

Figura 5- Imagem comparativa do resultado das modificações no protocolo de hibridização e lavagem do microarray de acordo com o protocolo da Corning.

Anexo 2 - Lista dos 285 genes com os respectivos p valores (Tabela 1) e razão de expressão (Tabela2) encontrados para cada comparação

Tabela 1 - Lista dos 285 genes com os respectivos p valores encontrados para cada comparação (onde RESC = macrófagos residentes controle, REST= macrófagos residentes tratados com rhPTX3, TIOC= macrófagos elicitados por tioglicolato controle, TIOT= macrófagos elicitados por tioglicolato tratados com rhPTX3) após a realização do teste de Tukey. Em cores são mostrados os valores de $p < 0,05$.

LocusLink	Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
54219	<i>Cd320</i>	0,140	0,968	0,005	0,257	0,139	0,009
20259	<i>Scin</i>	0,685	0,179	0,290	0,663	0,062	0,012
16019	<i>Igh-6</i>	0,028	0,086	0,027	0,855	1,000	0,839
66070	<i>0610040D20Rik</i>	0,016	0,959	0,003	0,009	0,511	0,002
12974	<i>Cs</i>	0,347	0,213	0,255	0,980	0,022	0,013
66953	<i>Cdca7</i>	0,047	0,565	0,416	0,298	0,422	0,991
76808	<i>Rpl18a</i>	0,196	0,585	0,023	0,795	0,465	0,144
26464	<i>Vnn3</i>	0,140	0,569	0,233	0,677	0,008	0,036
21859	<i>Timp3</i>	0,697	0,035	0,397	0,163	0,091	0,004
68836	<i>Mrpl52</i>	0,141	0,886	0,015	0,363	0,418	0,039
229707	<i>6330569M22Rik</i>	0,092	0,155	0,001	0,004	0,043	0,000
13877	<i>Erh</i>	0,028	0,830	0,144	0,091	0,656	0,428
208098	<i>Panx3</i>	0,146	0,809	0,026	0,456	0,625	0,091
59022	<i>Edf1</i>	0,038	0,936	0,306	0,085	0,471	0,583
14950	<i>H13</i>	0,005	0,091	0,008	0,194	0,966	0,351
54125	<i>Polm</i>	0,240	0,253	0,043	0,014	0,625	0,003
217830	<i>9030617O03Rik</i>	0,483	0,769	0,016	0,141	0,131	0,005
77337	<i>Akr1c21</i>	0,520	0,026	0,929	0,194	0,256	0,012
27384	<i>Akr1c13</i>	0,003	0,003	0,005	0,998	0,966	0,990
218490	<i>Btf3</i>	0,028	0,927	0,029	0,065	1,000	0,068
66355	<i>Gmpr</i>	0,019	0,579	0,048	0,121	0,908	0,295
53869	<i>Rab11a</i>	0,016	0,501	0,059	0,123	0,785	0,420
66052	<i>Sdhc</i>	0,805	0,158	0,897	0,045	0,996	0,060
66225	<i>1190005P17Rik</i>	0,016	0,351	0,007	0,194	0,896	0,074
110532	<i>Adarb1</i>	0,056	0,978	0,008	0,032	0,500	0,005
13435	<i>Dnmt3a</i>	0,004	1,000	0,005	0,004	0,996	0,005
26932	<i>Ppp2r5e</i>	0,054	0,129	0,034	0,926	0,986	0,782
13614	<i>Edn1</i>	0,440	0,032	0,099	0,004	0,677	0,001
16450	<i>Jaq2</i>	0,041	0,113	0,282	0,889	0,541	0,905
26972	<i>Spo11</i>	0,057	0,913	0,592	0,023	0,330	0,284
64296	<i>Abhd8</i>	0,078	0,045	0,236	0,978	0,852	0,649

19941	<i>Rpl26</i>	0,111	0,983	0,043	0,184	0,901	0,071
52377	<i>Rcn3</i>	0,005	0,100	0,073	0,193	0,260	0,996
14447	<i>Gapdhs</i>	0,034	0,969	0,999	0,063	0,041	0,990
67217	<i>2810055F11Rik</i>	0,864	0,062	0,934	0,182	0,556	0,027
71279	<i>Slc29a3</i>	0,001	0,871	0,001	0,003	0,979	0,002
19109	<i>Prl</i>	0,985	0,655	0,149	0,835	0,093	0,029
14773	<i>Gprk5</i>	0,046	0,921	0,869	0,019	0,134	0,539
69179	<i>Tmem110</i>	0,465	0,167	0,038	0,847	0,310	0,721
28240	<i>Trpm2</i>	0,013	0,995	0,490	0,018	0,102	0,620
20965	<i>Syn2</i>	0,857	0,608	0,015	0,246	0,045	0,003
17906	<i>Myl2</i>	0,264	0,044	0,505	0,592	0,035	0,006
11772	<i>Ap2a2</i>	0,662	0,025	0,345	0,126	0,923	0,290
58206	<i>Zbtb32</i>	0,873	0,481	0,149	0,189	0,395	0,018
215605		0,001	1,000	0,001	0,001	1,000	0,001
66231	<i>Thoc7</i>	0,712	0,257	0,155	0,058	0,576	0,010
23994	<i>Dazap2</i>	0,170	0,978	0,043	0,285	0,767	0,075
LocusLink	Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
22230	<i>Ufd1l</i>	0,005	0,249	0,018	0,075	0,745	0,299
66449	<i>Magmas</i>	0,658	0,415	0,259	0,088	0,834	0,027
54604	<i>Pcnx</i>	0,000	1,000	0,000	0,000	0,669	0,000
19049	<i>Ppp1r1b</i>	0,441	0,984	0,403	0,629	0,048	0,261
217026	<i>2700008B19Rik</i>	0,005	0,473	0,030	0,040	0,575	0,249
216198	<i>Tcp1l12</i>	0,379	0,374	0,927	0,036	0,173	0,692
12817	<i>Col13a1</i>	0,002	0,023	0,003	0,246	0,989	0,362
104776	<i>Aldh6a1</i>	0,925	0,864	0,116	0,998	0,049	0,039
407785	<i>Ndufs6</i>	0,091	0,013	0,111	0,517	0,999	0,444
21762	<i>Psm2</i>	0,034	0,454	0,059	0,289	0,977	0,465
20568	<i>Slpi</i>	0,066	0,902	0,037	0,172	0,975	0,097
16869	<i>Lhx1</i>	0,835	0,729	0,133	0,306	0,397	0,031
24070	<i>Mpdu1</i>	0,059	0,671	0,990	0,286	0,038	0,504
20703	<i>Serpina1d</i>	0,073	0,009	0,948	0,467	0,154	0,018
15251	<i>Hif1a</i>	0,004	0,779	0,004	0,014	1,000	0,014
14057	<i>Sfxn1</i>	0,319	0,954	0,034	0,565	0,417	0,070
26961	<i>Rpl8</i>	0,000	0,777	0,000	0,000	0,722	0,000
18223	<i>Numbl</i>	0,997	0,457	0,038	0,364	0,051	0,005
26366	<i>Ceacam10</i>	0,033	0,061	0,019	0,969	0,976	0,832
64660	<i>Mrps24</i>	0,138	0,813	0,141	0,040	1,000	0,041
114886	<i>Cygb</i>	0,012	0,589	0,047	0,074	0,770	0,280
107995	<i>Cdc20</i>	0,009	0,597	0,004	0,054	0,895	0,021
12614	<i>Celsr1</i>	0,499	0,056	0,963	0,403	0,286	0,029
140740	<i>Sec63</i>	0,047	0,190	0,999	0,758	0,058	0,230

237542	<i>Osbpl8</i>	0,021	1,000	0,006	0,021	0,789	0,006
72658	<i>2700097O09Rik</i>	0,058	0,981	0,968	0,035	0,110	0,842
26401	<i>Map3k1</i>	0,048	0,157	0,068	0,830	0,994	0,931
18935	<i>Phox2b</i>	0,251	0,172	0,840	0,010	0,638	0,054
20103	<i>Rps5</i>	0,097	0,940	0,026	0,212	0,777	0,056
20922	<i>Supt4h1</i>	0,022	0,917	0,046	0,054	0,952	0,113
20504	<i>Slc17a1</i>	0,908	0,071	0,992	0,180	0,787	0,048
11774	<i>Ap3b1</i>	0,884	0,036	0,969	0,100	0,992	0,067
21987	<i>Tpd52l1</i>	0,034	0,078	0,069	0,936	0,958	1,000
192775	<i>Kcnh6</i>	0,144	0,454	0,028	0,806	0,668	0,246
14030	<i>Ewsr1</i>	0,132	0,988	0,010	0,203	0,308	0,015
21854	<i>Timm17a</i>	0,223	0,510	0,552	0,030	0,868	0,087
66999	<i>Med28</i>	0,419	0,998	0,051	0,336	0,449	0,040
12289	<i>Cacna1d</i>	0,984	0,803	0,084	0,612	0,137	0,024
18643	<i>Pfn1</i>	0,464	0,577	0,308	0,082	0,037	0,941
52713	<i>Ccdc59</i>	0,048	0,555	0,074	0,310	0,989	0,446
52705	<i>Krr1</i>	0,505	0,239	0,983	0,032	0,336	0,375
217615	<i>Mgea6</i>	0,691	0,639	0,089	0,171	0,395	0,017
71275	<i>4933437F05Rik</i>	0,015	0,236	0,004	0,272	0,731	0,065
19280	<i>Ptprs</i>	0,009	1,000	0,005	0,008	0,974	0,005
239393	<i>Lrp12</i>	0,123	0,567	0,012	0,630	0,376	0,072
212153	<i>2610015P09Rik</i>	0,056	0,262	0,024	0,688	0,930	0,375
269424	<i>Phf17</i>	0,086	0,077	0,042	1,000	0,954	0,971
70370	<i>1600015H20Rik</i>	0,231	0,005	0,611	0,075	0,833	0,023
67955	<i>Sugt1</i>	0,026	0,998	0,207	0,021	0,492	0,164
76279	<i>Cyp2d26</i>	0,016	0,999	0,620	0,019	0,087	0,696
224023	<i>Klhl22</i>	0,011	0,928	0,267	0,025	0,177	0,540
21976	<i>Top3b</i>	0,304	0,681	0,036	0,871	0,452	0,174
68090	<i>Yif1a</i>	0,296	0,935	0,040	0,571	0,507	0,091
20088	<i>Rps24</i>	0,001	0,736	0,001	0,002	1,000	0,002
LocusLink	Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
12512	<i>Cd63</i>	0,058	0,982	0,102	0,035	0,977	0,061
80752	<i>BC004044</i>	0,044	0,630	0,640	0,240	0,235	1,000
107448	<i>Unc5a</i>	0,301	0,196	0,788	0,014	0,774	0,053
15490	<i>Hsd17b7</i>	0,474	0,614	0,227	0,093	0,928	0,040
53416	<i>Stk39</i>	0,064	0,027	0,009	0,925	0,525	0,852
66748	<i>4933404M02Rik</i>	0,787	0,164	0,009	0,523	0,031	0,225
67225	<i>Rnpc3</i>	0,002	0,015	0,008	0,367	0,593	0,969
66736	<i>4921531G14Rik</i>	0,015	0,715	0,009	0,065	0,977	0,037
11658	<i>Alcam</i>	0,016	1,000	0,012	0,015	0,994	0,011
16992	<i>Lta</i>	0,191	0,127	0,037	0,990	0,657	0,815

14545	<i>Gdap1</i>	0,044	0,512	0,948	0,318	0,094	0,804
58184	<i>Rqcd1</i>	0,107	0,245	0,095	0,007	1,000	0,006
383538	<i>EG383538</i>	0,426	0,583	0,121	0,075	0,772	0,020
56620	<i>Clec4n</i>	0,020	0,402	0,057	0,197	0,864	0,508
14651	<i>Haggh</i>	0,860	0,109	0,998	0,036	0,777	0,139
56715	<i>Rabgef1</i>	0,061	0,466	0,261	0,008	0,723	0,031
18813	<i>Pa2q4</i>	0,000	0,462	0,001	0,002	0,971	0,003
19177	<i>Psmb7</i>	0,075	0,870	0,009	0,216	0,457	0,025
329540	<i>8430427H17Rik</i>	0,514	0,980	0,259	0,332	0,035	0,415
73388	<i>1700058C13Rik</i>	0,486	0,774	0,281	0,144	0,036	0,760
12349	<i>Car2</i>	0,509	0,121	0,034	0,016	0,254	0,001
70652	<i>Tmem144</i>	0,270	0,029	0,975	0,429	0,156	0,017
12507	<i>Cd5</i>	1,000	0,683	0,098	0,731	0,086	0,020
109225	<i>Ms4a7</i>	0,850	0,337	0,416	0,115	0,842	0,036
14194	<i>Fh1</i>	0,199	0,784	0,574	0,604	0,031	0,185
74270	<i>Usp20</i>	0,395	0,781	0,035	0,884	0,347	0,133
56428	<i>Mtch2</i>	0,036	0,661	0,050	0,186	0,995	0,253
68215	<i>2610510H03Rik</i>	0,123	0,854	0,013	0,355	0,415	0,038
320024	<i>Aadacl1</i>	0,000	0,452	0,001	0,001	0,515	0,005
17859	<i>Mxi1</i>	0,185	0,899	0,005	0,439	0,000	0,002
11501	<i>Adam8</i>	0,023	0,920	0,040	0,055	0,976	0,097
17681	<i>Msc</i>	0,478	0,081	0,267	0,556	0,033	0,006
210622	<i>E430002G05Rik</i>	0,026	0,535	0,280	0,182	0,373	0,941
79235	<i>Lrat</i>	0,129	0,986	0,902	0,080	0,049	0,985
74480	<i>Samd4</i>	0,731	0,135	0,959	0,031	0,462	0,261
19173	<i>Psmb5</i>	0,012	0,894	0,053	0,031	0,715	0,142
11815	<i>Apod</i>	0,001	0,984	0,140	0,000	0,012	0,085
65970	<i>Lima1</i>	0,013	0,998	0,017	0,010	0,995	0,014
70166	<i>2210418G03Rik</i>	0,871	1,000	0,087	0,857	0,030	0,092
66156	<i>Anapc11</i>	0,045	0,635	0,535	0,244	0,308	0,998
69065	<i>Chac1</i>	0,011	0,928	0,001	0,026	0,307	0,002
17112	<i>Tm4sf1</i>	0,907	0,697	0,090	0,970	0,035	0,019
20874	<i>Slk</i>	0,003	0,996	0,000	0,005	0,037	0,000
13106	<i>Cyp2e1</i>	0,701	0,178	0,565	0,644	0,146	0,027
50778	<i>Rgs1</i>	0,018	0,993	0,001	0,025	0,195	0,002
19730	<i>Ralqds</i>	0,044	0,685	0,037	0,010	0,999	0,008
20262	<i>Stmn3</i>	0,481	0,017	0,941	0,135	0,786	0,036
224170	<i>2310047C04Rik</i>	0,810	0,996	0,042	0,904	0,148	0,057
433054		0,033	0,996	0,024	0,045	0,995	0,032
225341	<i>Lims2</i>	0,000	0,057	0,000	0,008	0,993	0,012
16889	<i>Lip1</i>	0,029	0,951	0,024	0,060	0,999	0,049

19708	<i>Dpf2</i>	0,032	0,981	0,170	0,054	0,652	0,279
20603	<i>Sms</i>	0,369	0,468	0,295	0,046	0,998	0,036
52477	<i>Angel2</i>	0,035	0,159	0,418	0,710	0,326	0,873
LocusLink	Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
329679	<i>D630023B12Rik</i>	0,954	0,988	0,015	0,837	0,031	0,010
68092	<i>Ncbp2</i>	0,012	0,997	0,542	0,016	0,081	0,649
56527	<i>Mast1</i>	0,021	0,038	0,888	0,969	0,056	0,105
269224	<i>Pask</i>	0,025	0,839	0,020	0,081	0,997	0,062
67026	<i>Thap4</i>	0,004	0,328	0,001	0,042	0,721	0,010
70790	<i>Edd1</i>	0,005	0,498	0,014	0,033	0,825	0,109
68135	<i>Eif3s3</i>	0,001	0,936	0,001	0,001	0,999	0,001
58998	<i>Pvr13</i>	0,570	0,021	0,208	0,138	0,032	0,001
66406	<i>Sac3d1</i>	0,008	0,983	0,953	0,005	0,015	0,818
30049	<i>Scd3</i>	0,014	0,724	0,092	0,060	0,558	0,376
56191	<i>Tro</i>	0,919	0,271	0,395	0,561	0,176	0,027
66082	<i>Abhd6</i>	0,776	0,991	0,127	0,905	0,033	0,085
18173	<i>Slc11a1</i>	0,037	0,786	0,213	0,138	0,611	0,630
18998	<i>Pou4f3</i>	0,071	0,999	0,007	0,059	0,358	0,006
19683	<i>Rdh16</i>	0,000	0,010	0,003	0,074	0,340	0,683
66447	<i>Mgst3</i>	0,237	0,024	0,419	0,409	0,966	0,230
19729	<i>Rag1ap1</i>	0,458	0,988	0,023	0,313	0,196	0,015
22330	<i>Vcl</i>	0,025	0,750	0,010	0,007	0,903	0,003
66049	<i>Rogdi</i>	0,024	0,129	0,210	0,648	0,457	0,984
12394	<i>Runx1</i>	0,134	0,629	0,022	0,600	0,590	0,121
14913	<i>Guca1a</i>	0,011	0,998	0,183	0,009	0,259	0,145
70999	<i>Nat11</i>	0,001	0,766	0,012	0,003	0,250	0,047
27205	<i>Podxl</i>	0,000	0,129	0,961	0,003	0,000	0,065
72050	<i>Kdelc1</i>	0,864	0,491	0,212	0,892	0,072	0,027
75820	<i>4930511H01Rik</i>	0,443	0,141	0,030	0,809	0,262	0,692
20387	<i>Sftpa1</i>	0,595	0,098	0,189	0,513	0,031	0,005
11732	<i>Ank</i>	0,024	0,204	0,304	0,002	0,327	0,015
192236	<i>Hps1</i>	0,003	0,183	0,172	0,069	0,073	1,000
227753	<i>Gsn</i>	0,003	0,072	0,247	0,145	0,041	0,810
353156	<i>Egfl7</i>	0,134	0,061	0,832	0,942	0,041	0,019
13831	<i>Epc1</i>	0,705	0,999	0,050	0,635	0,227	0,042
13405	<i>Dmd</i>	1,000	0,935	0,038	0,908	0,042	0,017
26757	<i>Dpysl4</i>	0,496	0,466	0,044	1,000	0,327	0,351
226412	<i>R3hdm1</i>	0,013	0,999	0,002	0,015	0,443	0,002
66526	<i>2210012G02Rik</i>	0,006	0,141	0,068	0,164	0,324	0,952
60613	<i>Kcnq4</i>	0,993	0,023	0,013	0,034	0,018	0,965
50927	<i>Nasp</i>	0,010	0,525	0,180	0,073	0,244	0,818

433814		0,136	0,471	0,042	0,767	0,835	0,334
66593	<i>Diablo</i>	0,032	1,000	0,282	0,029	0,439	0,260
66964	<i>Golt1b</i>	0,532	0,587	0,303	1,000	0,044	0,051
234267	<i>Gpm6a</i>	0,052	0,226	0,895	0,722	0,020	0,086
76294	<i>Asb5</i>	0,973	0,760	0,148	0,528	0,260	0,037
14276	<i>Folr2</i>	0,334	0,850	0,049	0,114	0,532	0,016
71886	<i>2310002L09Rik</i>	0,019	0,770	0,061	0,072	0,827	0,235
18824	<i>Plp2</i>	0,052	0,973	0,108	0,029	0,953	0,060
66448	<i>Mrpl20</i>	0,008	0,371	0,012	0,081	0,984	0,133
12466	<i>Cct6a</i>	0,023	0,962	0,014	0,045	0,983	0,027
28250	<i>Slco1a4</i>	0,023	0,700	0,004	0,108	0,581	0,017
76413	<i>1700016D06Rik</i>	0,048	0,978	0,813	0,027	0,164	0,598
212084	<i>LOC212084</i>	0,101	0,731	0,048	0,401	0,950	0,206
77411	<i>Rbm35b</i>	0,983	0,990	0,053	0,910	0,088	0,035
17025	<i>Alad</i>	0,582	0,491	0,044	0,998	0,271	0,335
29867	<i>Cabp1</i>	0,998	0,892	0,097	0,823	0,121	0,036
17059	<i>Klrb1c</i>	0,181	0,999	0,032	0,214	0,620	0,038
LocusLink	Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
14460	<i>Gata1</i>	0,997	0,977	0,006	0,997	0,008	0,010
66756	<i>4933411K20Rik</i>	0,021	0,138	0,174	0,556	0,467	0,998
114896	<i>Afq3l1</i>	0,620	0,251	0,066	0,045	0,355	0,004
214585	<i>6030465E24Rik</i>	0,509	1,000	0,013	0,537	0,096	0,014
70604	<i>Dnajb14</i>	0,674	0,759	0,180	0,221	0,676	0,045
195576	<i>LOC195576</i>	0,006	0,581	0,004	0,036	0,978	0,021
93746	<i>Gprc5d</i>	0,085	0,916	0,017	0,206	0,659	0,040
84004	<i>Mcam</i>	0,060	0,945	0,059	0,028	1,000	0,028
194231	<i>Cnksr1</i>	0,169	0,995	0,799	0,121	0,047	0,905
66979	<i>Pole4</i>	0,180	0,961	0,048	0,338	0,780	0,094
20208	<i>Saa1</i>	0,013	0,820	0,081	0,044	0,583	0,268
19982	<i>Rpl36a</i>	0,002	0,994	0,006	0,002	0,883	0,004
12404	<i>Cbln1</i>	0,821	0,174	0,686	0,508	0,267	0,036
74695	<i>4930510E17Rik</i>	0,989	0,433	0,025	0,596	0,016	0,003
16430	<i>Stt3a</i>	0,048	0,478	0,220	0,374	0,708	0,918
192287	<i>Slc25a36</i>	0,016	0,118	0,019	0,511	0,999	0,579
71805	<i>Nup93</i>	0,918	0,437	0,378	0,780	0,166	0,044
235459	<i>Gtf2a2</i>	0,046	0,743	0,103	0,193	0,940	0,396
76626	<i>Msi2</i>	0,173	0,997	0,018	0,130	0,419	0,014
230596	<i>Prpf38a</i>	0,101	0,823	0,044	0,324	0,934	0,150
56485	<i>Slc2a5</i>	0,079	0,016	0,669	0,661	0,016	0,004
13856	<i>Epo</i>	0,990	0,063	0,990	0,096	0,930	0,041
75600	<i>Calml4</i>	0,866	0,402	0,227	0,149	0,562	0,023

218734	3830406C13Rik	0,028	0,080	0,523	0,873	0,203	0,508
66098	Chchd6	0,152	0,150	0,838	1,000	0,047	0,047
22690	Zfp28	0,657	0,781	0,091	0,224	0,430	0,024
19286	Pts	1,000	0,973	0,058	0,987	0,051	0,032
170761	Pdzd3	0,862	0,514	0,108	0,199	0,308	0,015
117147	Acsml	0,074	0,015	0,589	0,661	0,012	0,003
338521	Fa2h	0,989	0,978	0,022	1,000	0,033	0,037
72102	Dusp11	0,005	0,054	0,001	0,310	0,562	0,049
216350	Tspan8	0,638	0,099	0,862	0,475	0,268	0,033
70984	4931406C07Rik	0,002	0,031	0,004	0,189	0,869	0,484
69072	Ebna1bp2	0,021	0,387	0,123	0,217	0,599	0,820
73975	4930435H24Rik	1,000	0,728	0,000	0,760	0,000	0,001
66845	Mrpl33	0,036	0,705	0,366	0,165	0,381	0,913
16548	Khk	0,060	0,970	0,005	0,111	0,283	0,008
100494	Zfand2a	0,020	1,000	0,052	0,020	0,903	0,050
73658	2210013K02Rik	0,023	0,982	0,983	0,039	0,038	1,000
77559	Agl	0,032	0,948	0,879	0,068	0,090	0,997
68394	0610037D15Rik	0,065	0,914	0,008	0,026	0,475	0,004
17346	Mknk1	0,542	0,992	0,006	0,698	0,037	0,008
13043	Ctnn	0,977	0,732	0,035	0,511	0,062	0,009
19337	Rab33a	0,493	0,158	0,019	0,800	0,151	0,478
244349	Myst3	0,002	0,193	0,002	0,044	1,000	0,038
11647	Akp2	0,877	1,000	0,023	0,876	0,064	0,023
18196	Nsq1	0,044	0,113	0,033	0,905	0,001	0,001
11938	Atp2a2	0,131	1,000	0,754	0,139	0,032	0,729
20887	Sult1a1	0,594	0,355	0,447	0,062	0,992	0,042
50781	Dkk3	0,304	0,025	0,089	0,335	0,802	0,803
50887	Nsbp1	0,074	0,215	0,044	0,865	0,982	0,677
19143	St14	0,382	0,748	0,098	0,100	0,741	0,024
319965	Cc2d1b	0,031	0,333	0,004	0,375	0,422	0,042
101185	Pot1a	0,001	0,916	0,001	0,000	0,995	0,000
LocusLink	Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
14453	Gas2	0,445	0,015	0,046	0,002	0,390	0,000
140919	Slc17a6	0,357	0,040	0,490	0,432	0,992	0,311
56397	Morf4l2	0,015	0,855	0,002	0,044	0,403	0,005
14456	Gas6	0,007	0,118	0,272	0,246	0,105	0,923
74020	Cpne4	0,792	0,060	0,354	0,017	0,834	0,006
80283	Abtb1	0,017	1,000	0,015	0,019	0,999	0,016
54725	Iqsf4a	0,002	0,765	0,003	0,005	0,961	0,009
17758	Mtap4	0,642	0,779	0,172	0,215	0,690	0,045
16785	Rpsa	0,000	1,000	0,000	0,000	0,890	0,000

13406	<i>Dmp1</i>	0,883	0,507	0,098	0,209	0,035	0,599
11690	<i>Alox5ap</i>	0,032	0,234	0,422	0,516	0,296	0,962
55981	<i>Pigb</i>	0,707	0,216	0,038	0,717	0,009	0,002
319565	<i>Syne2</i>	0,413	0,439	0,067	0,049	0,554	0,008
170752	<i>Bcdo2</i>	1,000	0,374	0,407	0,409	0,373	0,040
66904	<i>Pccb</i>	0,275	0,030	0,182	0,427	0,989	0,591
435477		0,011	0,791	0,007	0,037	0,982	0,023
104001	<i>Rtn1</i>	0,080	0,780	0,890	0,293	0,030	0,401
16531	<i>Kcnma1</i>	0,195	0,346	0,020	0,969	0,409	0,235
16773	<i>Lama2</i>	0,266	0,048	0,916	0,625	0,558	0,119
18823	<i>Plp1</i>	0,018	0,088	0,144	0,682	0,001	0,003
19043	<i>Ppm1b</i>	0,141	0,221	0,671	0,987	0,028	0,045
268859	<i>A2bp1</i>	0,396	0,008	0,017	0,073	0,169	0,930

Tabela 2 - Lista dos 285 genes com os respectivos valores de razão de expressão encontrados para cada comparação (onde RESC = macrófagos residentes controle, REST= macrófagos residentes tratados com rhPTX3, TIOC= macrófagos elicitados por tioglicolato controle, TIOT= macrófagos elicitados por tioglicolato tratados com rhPTX3) após a realização do teste de Tukey. Em roxo são mostrados os valores de razão de expressão <2,0 e em vermelho os valores >2,0

LocusLink	Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
54219	<i>Cd320</i>	-1,422	-1,066	-2,024	1,334	-1,423	-1,898
20259	<i>Scin</i>	1,130	1,282	-1,233	1,135	-1,393	-1,581
16019	<i>Igh-6</i>	-1,276	-1,210	-1,279	1,055	-1,002	-1,058
66070	<i>0610040D20Rik</i>	-1,863	1,079	-2,329	2,010	-1,251	-2,514
12974	<i>Cs</i>	1,271	1,338	-1,314	1,053	-1,670	-1,758
66953	<i>Cdca7</i>	1,467	1,172	1,212	-1,252	-1,210	1,035
76808	<i>Rpl18a</i>	-1,568	-1,302	-2,135	1,204	-1,362	-1,640
26464	<i>Vnn3</i>	1,331	1,166	-1,274	-1,141	-1,695	-1,486
21859	<i>Timp3</i>	1,163	1,608	-1,257	1,382	-1,463	-2,022
68836	<i>Mrpl52</i>	-1,641	-1,156	-2,276	1,420	-1,386	-1,969
229707	<i>6330569M22Rik</i>	1,248	-1,211	1,628	-1,512	1,304	1,972
13877	<i>Erh</i>	-2,231	-1,206	-1,720	1,849	1,297	-1,425
208098	<i>Panx3</i>	-1,267	-1,091	-1,429	1,162	-1,127	-1,310
59022	<i>Edf1</i>	-1,656	-1,089	-1,322	1,520	1,252	-1,214
14950	<i>H13</i>	-1,872	-1,416	-1,768	1,322	1,059	-1,249
54125	<i>Polm</i>	-1,172	1,168	-1,288	1,369	-1,099	-1,504
217830	<i>9030617O03Rik</i>	-1,301	1,187	-2,028	1,544	-1,559	-2,407
77337	<i>Akr1c21</i>	1,226	1,687	-1,089	1,376	-1,336	-1,838
27384	<i>Akr1c13</i>	-1,725	-1,698	-1,647	1,016	1,047	1,031
218490	<i>Btf3</i>	-2,837	-1,191	-2,806	2,383	1,011	-2,356

66355	<i>Gmpr</i>	-2,354	-1,336	-2,034	1,762	1,157	-1,523
53869	<i>Rab11a</i>	-2,258	-1,344	-1,866	1,680	1,210	-1,389
66052	<i>Sdhc</i>	-1,143	1,423	-1,108	1,627	1,031	-1,577
66225	<i>1190005P17Rik</i>	-1,643	-1,245	-1,790	1,319	-1,090	-1,437
110532	<i>Adarb1</i>	-2,026	1,093	-2,821	2,215	-1,392	-3,084
13435	<i>Dnmt3a</i>	2,073	1,002	2,009	-2,068	-1,032	2,004
26932	<i>Ppp2r5e</i>	2,881	2,345	3,226	-1,228	1,120	1,376
13614	<i>Edn1</i>	-1,388	2,080	-1,758	2,886	-1,267	-3,657
16450	<i>Jag2</i>	1,260	1,199	1,145	-1,051	-1,101	-1,048
26972	<i>Spo11</i>	-1,366	1,067	-1,138	1,457	1,200	-1,214
64296	<i>Abhd8</i>	-1,318	-1,368	-1,221	-1,038	1,080	1,121
19941	<i>Rpl26</i>	-2,904	-1,158	-3,826	2,509	-1,317	-3,305
52377	<i>Rcn3</i>	1,462	1,231	1,253	-1,187	-1,167	1,017
14447	<i>Gapdhs</i>	-1,289	-1,033	-1,011	1,248	1,276	1,022
67217	<i>2810055F11Rik</i>	1,221	2,198	-1,163	1,800	-1,420	-2,555
71279	<i>Slc29a3</i>	2,708	1,134	2,887	-2,387	1,066	2,546
19109	<i>Prl</i>	1,096	1,374	-1,924	1,254	-2,109	-2,644
14773	<i>Gprk5</i>	-1,320	1,055	-1,067	1,393	1,237	-1,125
69179	<i>Tmem110</i>	-1,123	-1,195	-1,296	-1,064	-1,153	-1,084
28240	<i>Trpm2</i>	-1,314	-1,016	-1,102	1,293	1,193	-1,084
20965	<i>Syn2</i>	-1,158	1,264	-2,128	1,464	-1,838	-2,691
17906	<i>Myl2</i>	1,338	1,615	-1,235	1,207	-1,653	-1,995
11772	<i>Ap2a2</i>	1,107	1,383	1,169	1,249	1,056	-1,183
58206	<i>Zbtb32</i>	-1,096	1,201	-1,345	1,317	-1,227	-1,616
215605		-2,797	1,014	-2,830	2,836	-1,012	-2,870
66231	<i>Thoc7</i>	-1,206	1,422	-1,518	1,715	-1,259	-2,158
23994	<i>Dazap2</i>	-1,660	-1,089	-2,053	1,525	-1,236	-1,885
LocusLink	Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
22230	<i>Ufd1l</i>	-1,964	-1,320	-1,710	1,487	1,148	-1,295
66449	<i>Magmas</i>	-1,231	1,336	-1,430	1,645	-1,161	-1,910
54604	<i>Pcnx</i>	1,915	-1,004	1,755	-1,923	-1,092	1,761
19049	<i>Ppp1r1b</i>	1,131	1,028	-1,137	-1,100	-1,286	-1,169
217026	<i>2700008B19Rik</i>	2,285	1,292	1,826	-1,768	-1,251	1,414
216198	<i>Tcp11l2</i>	-1,194	1,195	1,065	1,427	1,272	-1,122
12817	<i>Col13a1</i>	1,547	1,325	1,512	-1,167	-1,023	1,140
104776	<i>Aldh6a1</i>	1,131	1,168	-1,686	1,033	-1,908	-1,970
407785	<i>Ndufs6</i>	1,231	1,370	1,218	1,113	-1,011	-1,125
21762	<i>Psmc2</i>	-1,789	-1,296	-1,674	1,381	1,069	-1,291
20568	<i>Slpi</i>	-1,632	-1,117	-1,744	1,461	-1,069	-1,561
16869	<i>Lhx1</i>	-1,106	1,133	-1,350	1,253	-1,221	-1,530
24070	<i>Mpdu1</i>	-1,336	-1,114	1,029	1,199	1,374	1,146

20703	<i>Serpina1d</i>	1,281	1,457	1,046	1,137	-1,224	-1,392
15251	<i>Hif1a</i>	3,555	1,270	3,572	-2,800	1,005	2,813
14057	<i>Sfxn1</i>	-1,279	-1,070	-1,588	1,195	-1,242	-1,484
26961	<i>Rpl8</i>	-2,520	-1,075	-2,325	2,343	1,084	-2,162
18223	<i>Numbl</i>	-1,016	1,135	-1,320	1,153	-1,298	-1,497
26366	<i>Ceacam10</i>	-1,900	-1,752	-2,045	1,085	-1,076	-1,168
64660	<i>Mrps24</i>	-1,643	1,194	-1,637	1,961	1,004	-1,954
114886	<i>Cygb</i>	1,408	1,111	1,302	-1,267	-1,082	1,172
107995	<i>Cdc20</i>	-2,975	-1,371	-3,532	2,170	-1,187	-2,576
12614	<i>Celsr1</i>	1,604	2,739	-1,166	1,707	-1,870	-3,193
140740	<i>Sec63</i>	-1,600	-1,385	-1,021	1,155	1,567	1,357
237542	<i>Osbpl8</i>	2,919	1,007	3,786	-2,899	1,297	3,760
72658	<i>2700097O09Rik</i>	-1,214	1,024	-1,029	1,243	1,180	-1,053
26401	<i>Map3k1</i>	1,155	1,112	1,142	-1,038	-1,011	1,027
18935	<i>Phox2b</i>	-1,145	1,166	-1,056	1,335	1,083	-1,232
20103	<i>Rps5</i>	-1,929	-1,145	-2,427	1,684	-1,259	-2,120
20922	<i>Supt4h1</i>	-1,838	-1,108	-1,691	1,659	1,087	-1,526
20504	<i>Slc17a1</i>	1,111	1,599	-1,044	1,439	-1,161	-1,670
11774	<i>Ap3b1</i>	1,042	1,216	1,026	1,167	-1,016	-1,186
21987	<i>Tpd52l1</i>	1,559	1,448	1,463	-1,077	-1,065	1,011
192775	<i>Kcnh6</i>	1,298	1,179	1,467	-1,100	1,131	1,244
14030	<i>Ewsr1</i>	-2,068	-1,095	-3,561	1,888	-1,721	-3,251
21854	<i>Timm17a</i>	-1,325	1,210	-1,198	1,604	1,106	-1,449
66999	<i>Med28</i>	-1,407	1,040	-1,954	1,463	-1,389	-2,032
12289	<i>Cacna1d</i>	1,024	-1,062	1,206	-1,087	1,179	1,281
18643	<i>Pfn1</i>	1,216	-1,183	-1,271	-1,438	-1,545	-1,074
52713	<i>Ccdc59</i>	-1,994	-1,337	-1,868	1,492	1,068	-1,397
52705	<i>Krr1</i>	-1,103	1,150	1,024	1,269	1,130	-1,123
217615	<i>Mgea6</i>	-1,221	1,241	-1,647	1,515	-1,349	-2,044
71275	<i>4933437F05Rik</i>	1,385	1,182	1,505	-1,172	1,087	1,274
19280	<i>Ptprs</i>	3,204	-1,015	3,575	-3,251	1,116	3,627
239393	<i>Lrp12</i>	1,327	1,159	1,603	-1,145	1,208	1,383
212153	<i>2610015P09Rik</i>	-1,474	-1,282	-1,587	1,149	-1,077	-1,237
269424	<i>Phf17</i>	1,996	2,036	2,264	1,020	1,134	1,112
70370	<i>1600015H20Rik</i>	1,203	1,553	1,117	1,291	-1,077	-1,390
67955	<i>Sugt1</i>	-1,952	1,032	-1,490	2,013	1,310	-1,537
76279	<i>Cyp2d26</i>	1,522	1,014	1,137	-1,501	-1,338	1,122
224023	<i>Klhl22</i>	-1,194	-1,025	-1,086	1,165	1,100	-1,059
21976	<i>Top3b</i>	-1,391	-1,219	-1,825	1,141	-1,312	-1,498
68090	<i>Yif1a</i>	-1,499	-1,131	-2,038	1,326	-1,360	-1,802
20088	<i>Rps24</i>	-2,083	-1,121	-2,065	1,859	1,009	-1,843

LocusLink	Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
12512	<i>Cd63</i>	1,366	-1,038	1,312	-1,417	-1,041	1,361
80752	<i>BC004044</i>	1,356	1,120	1,118	-1,211	-1,213	-1,002
107448	<i>Unc5a</i>	-1,501	1,612	-1,222	2,420	1,229	-1,969
15490	<i>Hsd17b7</i>	-1,143	1,117	-1,205	1,276	-1,055	-1,346
53416	<i>Stk39</i>	1,200	1,245	1,307	1,038	1,089	1,050
66748	<i>4933404M02Rik</i>	1,044	1,114	1,228	1,067	1,176	1,102
67225	<i>Rnpc3</i>	2,439	1,868	2,001	-1,306	-1,219	1,071
66736	<i>4921531G14Rik</i>	-2,433	-1,262	-2,652	1,928	-1,090	-2,101
11658	<i>Alcam</i>	3,359	-1,023	3,628	-3,434	1,080	3,710
16992	<i>Lta</i>	1,196	1,225	1,314	1,024	1,099	1,073
14545	<i>Gdap1</i>	1,558	1,214	1,075	-1,283	-1,449	-1,129
58184	<i>Rqcd1</i>	-1,170	1,129	-1,176	1,321	-1,005	-1,327
383538	<i>EG383538</i>	-1,178	1,143	-1,300	1,346	-1,104	-1,486
56620	<i>Clec4n</i>	-2,586	-1,501	-2,139	1,723	1,209	-1,425
14651	<i>Hagh</i>	-1,092	1,346	1,020	1,469	1,113	-1,319
56715	<i>Rabgef1</i>	1,669	-1,291	1,399	-2,155	-1,193	1,806
18813	<i>Pa2g4</i>	-2,108	-1,167	-2,018	1,806	1,045	-1,729
19177	<i>Psmb7</i>	-1,581	-1,127	-2,016	1,403	-1,275	-1,788
329540	<i>8430427H17Rik</i>	-1,063	1,016	1,089	1,080	1,158	1,072
73388	<i>1700058C13Rik</i>	-1,140	1,088	1,187	1,240	1,353	1,091
12349	<i>Car2</i>	-1,206	1,397	-1,570	1,685	-1,302	-2,193
70652	<i>Tmem144</i>	1,331	1,676	-1,061	1,260	-1,412	-1,778
12507	<i>Cd5</i>	-1,006	-1,082	1,210	-1,075	1,217	1,309
109225	<i>Ms4a7</i>	1,300	-1,803	1,702	-2,345	1,309	3,068
14194	<i>Fh1</i>	-1,142	-1,058	1,083	1,079	1,237	1,146
74270	<i>Usp20</i>	1,094	1,052	1,205	-1,040	1,101	1,145
56428	<i>Mtch2</i>	-1,783	-1,218	-1,715	1,464	1,039	-1,409
68215	<i>2610510H03Rik</i>	2,909	1,395	5,743	-2,086	1,974	4,118
320024	<i>Aadacl1</i>	9,648	1,565	6,383	-6,163	-1,512	4,077
17859	<i>Mxi1</i>	1,144	1,042	-1,346	-1,098	-1,540	-1,402
11501	<i>Adam8</i>	1,437	1,062	1,382	-1,353	-1,040	1,301
17681	<i>Msc</i>	1,255	1,541	-1,351	1,228	-1,696	-2,083
210622	<i>E430002G05Rik</i>	-1,472	-1,158	-1,228	1,271	1,199	-1,061
79235	<i>Lrat</i>	-1,223	1,027	1,056	1,257	1,291	1,028
74480	<i>Samd4</i>	1,086	-1,217	-1,039	-1,322	-1,128	1,171
19173	<i>Psmb5</i>	-2,457	-1,160	-1,957	2,118	1,255	-1,687
11815	<i>Apod</i>	1,591	-1,025	1,186	-1,630	-1,341	1,216
65970	<i>Lima1</i>	1,475	-1,017	1,443	-1,501	-1,022	1,468
70166	<i>2210418G03Rik</i>	-1,032	1,001	1,125	1,034	1,161	1,123
66156	<i>Anapc11</i>	-1,374	-1,125	-1,145	1,221	1,200	-1,018

69065	<i>Chac1</i>	-2,409	-1,131	-3,543	2,129	-1,471	-3,132
17112	<i>Tm4sf1</i>	1,144	1,249	-1,754	1,093	-2,006	-2,191
20874	<i>Slk</i>	1,632	1,021	2,247	-1,598	1,377	2,200
13106	<i>Cyp2e1</i>	1,251	1,598	-1,315	1,278	-1,646	-2,102
50778	<i>Rgs1</i>	1,965	1,047	2,873	-1,878	1,462	2,745
19730	<i>Ralqds</i>	2,045	-1,276	2,102	-2,611	1,028	2,683
20262	<i>Stmn3</i>	1,194	1,606	1,069	1,345	-1,118	-1,503
224170	<i>2310047C04Rik</i>	1,043	1,010	1,172	-1,033	1,123	1,160
433054		-2,488	-1,057	-2,644	2,354	-1,063	-2,502
225341	<i>Lims2</i>	2,307	1,405	2,241	-1,642	-1,030	1,595
16889	<i>Lip1</i>	3,439	1,197	3,613	-2,874	1,051	3,019
19708	<i>Dpf2</i>	1,452	1,040	1,281	-1,396	-1,134	1,231
20603	<i>Sms</i>	1,235	-1,204	1,262	-1,486	1,022	1,519
52477	<i>Angel2</i>	1,327	1,215	1,142	-1,093	-1,162	-1,064
LocusLink	Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
329679	<i>D630023B12Rik</i>	1,027	-1,017	1,238	-1,045	1,205	1,259
68092	<i>Ncbp2</i>	1,727	1,025	1,195	-1,685	-1,445	1,166
56527	<i>Mast1</i>	1,583	1,501	1,089	-1,054	-1,453	-1,378
269224	<i>Pask</i>	-1,372	-1,074	-1,395	1,278	-1,016	-1,299
67026	<i>Thap4</i>	1,318	1,103	1,395	-1,195	1,058	1,265
70790	<i>Edd1</i>	-2,037	-1,233	-1,801	1,652	1,131	-1,460
68135	<i>Eif3s3</i>	-2,379	1,083	-2,338	2,578	1,018	-2,533
58998	<i>Pvrl3</i>	1,232	1,818	-1,408	1,476	-1,735	-2,561
66406	<i>Sac3d1</i>	1,210	-1,015	1,022	-1,228	-1,184	1,037
30049	<i>Scd3</i>	-1,488	-1,107	-1,306	1,344	1,139	-1,180
56191	<i>Tro</i>	1,151	1,555	-1,452	1,351	-1,672	-2,258
66082	<i>Abhd6</i>	1,066	1,019	-1,186	-1,046	-1,265	-1,209
18173	<i>Slc11a1</i>	1,686	1,154	1,391	-1,461	-1,212	1,205
18998	<i>Pou4f3</i>	1,151	-1,006	1,252	-1,158	1,087	1,259
19683	<i>Rdh16</i>	1,833	1,437	1,578	-1,275	-1,161	1,098
66447	<i>Mgst3</i>	1,203	1,391	1,155	1,157	-1,042	-1,205
19729	<i>Rag1ap1</i>	-1,292	1,055	-1,869	1,363	-1,446	-1,971
22330	<i>Vcl</i>	2,380	-1,267	2,789	-3,015	1,172	3,533
66049	<i>Rogdi</i>	-1,382	-1,246	-1,208	1,109	1,144	1,031
12394	<i>Runx1</i>	1,187	1,087	1,297	-1,091	1,093	1,192
14913	<i>Guca1a</i>	-2,367	1,034	-1,579	2,449	1,499	-1,634
70999	<i>Nat11</i>	1,287	1,040	1,185	-1,237	-1,086	1,140
27205	<i>Podxl</i>	1,399	1,114	-1,021	-1,256	-1,428	-1,137
72050	<i>Kdelc1</i>	-1,048	-1,094	1,141	-1,044	1,196	1,248
75820	<i>4930511H01Rik</i>	1,171	1,281	1,433	1,094	1,223	1,118
20387	<i>Sftpa1</i>	1,212	1,503	-1,400	1,240	-1,697	-2,104

11732	<i>Ank</i>	-1,160	1,092	-1,079	1,267	1,076	-1,177
192236	<i>Hps1</i>	-1,586	-1,221	-1,226	1,299	1,293	-1,004
227753	<i>Gsn</i>	1,856	1,402	1,265	-1,324	-1,467	-1,108
353156	<i>Egfl7</i>	1,363	1,461	-1,110	1,071	-1,514	-1,622
13831	<i>Epc1</i>	1,070	-1,008	1,220	-1,078	1,141	1,230
13405	<i>Dmd</i>	1,005	-1,035	1,223	-1,040	1,217	1,266
26757	<i>Dpysl4</i>	1,234	1,244	1,604	1,008	1,300	1,289
226412	<i>R3hdm1</i>	1,263	1,006	1,379	-1,255	1,092	1,370
66526	<i>2210012G02Rik</i>	1,297	1,142	1,175	-1,136	-1,104	1,028
60613	<i>Kcnq4</i>	1,017	1,271	1,309	1,249	1,287	1,030
50927	<i>Nasp</i>	-1,689	-1,186	-1,318	1,424	1,282	-1,111
433814		1,198	1,116	1,272	-1,073	1,063	1,140
66593	<i>Diablo</i>	-1,387	1,006	-1,198	1,395	1,158	-1,205
66964	<i>Golt1b</i>	-1,128	-1,118	1,177	1,009	1,327	1,316
234267	<i>Gpm6a</i>	1,767	1,461	-1,133	-1,209	-2,002	-1,656
76294	<i>Asb5</i>	-1,032	1,076	-1,198	1,110	-1,161	-1,289
14276	<i>Folr2</i>	1,194	-1,082	1,369	-1,291	1,147	1,480
71886	<i>2310002L09Rik</i>	1,730	1,145	1,535	-1,510	-1,127	1,340
18824	<i>Plp2</i>	1,924	-1,091	1,730	-2,099	-1,112	1,888
66448	<i>Mrpl20</i>	-1,947	-1,285	-1,850	1,515	1,053	-1,440
12466	<i>Cct6a</i>	-1,805	-1,078	-1,910	1,675	-1,058	-1,772
28250	<i>Slco1a4</i>	-2,681	-1,335	-3,785	2,009	-1,412	-2,836
76413	<i>1700016D06Rik</i>	1,491	-1,050	1,115	-1,565	-1,337	1,171
212084	<i>LOC212084</i>	-1,872	-1,273	-2,114	1,470	-1,130	-1,660
77411	<i>Rbm35b</i>	1,025	-1,020	1,241	-1,046	1,211	1,266
17025	<i>Alad</i>	1,167	1,190	1,473	1,020	1,263	1,238
29867	<i>Cabp1</i>	1,014	-1,063	1,265	-1,077	1,248	1,344
17059	<i>Klrb1c</i>	1,258	1,013	1,426	-1,242	1,133	1,408
LocusLink	Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
14460	<i>Gata1</i>	1,016	1,032	1,454	1,015	1,430	1,409
66756	<i>4933411K20Rik</i>	1,940	1,535	1,491	-1,264	-1,302	-1,029
114896	<i>Afg3l1</i>	1,177	-1,307	1,484	-1,538	1,261	1,939
214585	<i>6030465E24Rik</i>	1,282	1,009	2,055	-1,271	1,603	2,037
70604	<i>Dnajb14</i>	1,244	-1,207	1,546	-1,502	1,243	1,866
195576	<i>LOC195576</i>	-2,098	-1,227	-2,230	1,710	-1,063	-1,817
93746	<i>Gprc5d</i>	1,222	1,046	1,328	-1,168	1,087	1,269
84004	<i>Mcam</i>	1,220	-1,036	1,221	-1,264	1,001	1,266
194231	<i>Cnksr1</i>	-1,234	1,022	1,086	1,261	1,339	1,062
66979	<i>Pole4</i>	-1,645	-1,111	-2,022	1,481	-1,229	-1,821
20208	<i>Saa1</i>	-3,125	-1,268	-2,185	2,463	1,430	-1,722
19982	<i>Rpl36a</i>	-4,359	1,070	-3,594	4,665	1,213	-3,847

12404	<i>Cbln1</i>	1,131	1,388	-1,173	1,227	-1,326	-1,628
74695	<i>4930510E17Rik</i>	1,028	1,152	-1,389	1,121	-1,428	-1,600
16430	<i>Stt3a</i>	-2,252	-1,460	-1,714	1,542	1,314	-1,173
192287	<i>Slc25a36</i>	-2,245	-1,681	-2,189	1,335	1,026	-1,302
71805	<i>Nup93</i>	-1,075	-1,197	1,214	-1,114	1,304	1,453
235459	<i>Gtf2a2</i>	-2,599	-1,349	-2,203	1,927	1,180	-1,633
76626	<i>Msi2</i>	-1,506	1,037	-2,006	1,562	-1,332	-2,080
230596	<i>Prpf38a</i>	-1,884	-1,224	-2,160	1,539	-1,147	-1,764
56485	<i>Slc2a5</i>	1,299	1,445	-1,110	1,112	-1,443	-1,604
13856	<i>Epo</i>	1,031	1,361	-1,030	1,320	-1,062	-1,403
75600	<i>Calml4</i>	-1,234	1,574	-1,784	1,942	-1,445	-2,807
218734	<i>3830406C13Rik</i>	1,871	1,642	1,278	-1,139	-1,464	-1,285
66098	<i>Chchd6</i>	1,255	1,256	-1,082	1,001	-1,358	-1,359
22690	<i>Zfp28</i>	1,072	-1,057	1,177	-1,133	1,099	1,245
19286	<i>Pts</i>	1,012	1,056	-1,488	1,043	-1,506	-1,571
170761	<i>Pdzd3</i>	-1,106	1,204	-1,411	1,332	-1,275	-1,699
117147	<i>Acsml</i>	1,411	1,619	-1,165	1,147	-1,643	-1,886
338521	<i>Fa2h</i>	1,022	1,029	1,318	1,006	1,289	1,281
72102	<i>Dusp11</i>	6,590	3,258	10,931	-2,023	1,659	3,355
216350	<i>Tspan8</i>	1,484	2,430	-1,290	1,637	-1,915	-3,135
70984	<i>4931406C07Rik</i>	2,652	1,816	2,334	-1,460	-1,136	1,285
69072	<i>Ebna1bp2</i>	-1,759	-1,282	-1,457	1,372	1,207	-1,137
73975	<i>4930435H24Rik</i>	1,003	1,048	1,382	1,045	1,378	1,319
66845	<i>Mrpl33</i>	-1,365	-1,104	-1,170	1,237	1,166	-1,060
16548	<i>Khk</i>	-1,926	-1,098	-2,915	1,754	-1,513	-2,654
100494	<i>Zfand2a</i>	2,340	-1,006	2,016	-2,354	-1,161	2,028
73658	<i>2210013K02Rik</i>	1,342	1,029	1,029	-1,304	-1,305	-1,001
77559	<i>Agl</i>	2,099	1,119	1,168	-1,875	-1,797	1,043
68394	<i>0610037D15Rik</i>	1,388	-1,073	1,635	-1,488	1,178	1,753
17346	<i>Mknk1</i>	1,072	1,014	1,273	-1,057	1,188	1,255
13043	<i>Ctn</i>	-1,041	1,109	-1,408	1,154	-1,353	-1,561
19337	<i>Rab33a</i>	1,105	1,176	1,302	1,064	1,178	1,108
244349	<i>Myst3</i>	3,170	1,594	3,238	-1,989	1,021	2,031
11647	<i>Akp2</i>	1,051	-1,000	1,286	-1,051	1,224	1,286
18196	<i>Nsg1</i>	1,388	1,298	-1,416	-1,069	-1,965	-1,838
11938	<i>Atp2a2</i>	1,161	1,003	-1,061	-1,157	-1,231	-1,064
20887	<i>Sult1a1</i>	-1,286	1,411	-1,358	1,816	-1,056	-1,917
50781	<i>Dkk3</i>	1,136	1,284	1,208	1,130	1,063	-1,063
50887	<i>Nsbp1</i>	-1,527	-1,366	-1,611	1,118	-1,055	-1,180
19143	<i>St14</i>	-1,501	1,273	-1,917	1,911	-1,277	-2,440
319965	<i>Cc2d1b</i>	2,213	1,504	3,183	-1,471	1,438	2,116

101185	<i>Pot1a</i>	3,129	-1,119	3,261	-3,502	1,042	3,650
LocusLink	Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
14453	<i>Gas2</i>	-1,324	2,082	-1,791	2,758	-1,352	-3,729
140919	<i>Slc17a6</i>	1,636	2,557	1,514	1,563	-1,081	-1,689
56397	<i>Morf4l2</i>	1,740	1,114	2,179	-1,563	1,252	1,956
14456	<i>Gas6</i>	1,652	1,323	1,238	-1,248	-1,335	-1,069
74020	<i>Cpne4</i>	-1,117	1,442	-1,234	1,610	-1,105	-1,780
80283	<i>Abtb1</i>	1,441	1,007	1,458	-1,432	1,012	1,448
54725	<i>Iqsf4a</i>	2,673	1,177	2,467	-2,272	-1,084	2,097
17758	<i>Mtap4</i>	1,244	-1,188	1,523	-1,478	1,225	1,810
16785	<i>Rpsa</i>	-3,103	1,001	-2,804	3,105	1,107	-2,806
13406	<i>Dmp1</i>	-1,077	1,159	1,321	1,249	1,423	1,140
11690	<i>Alox5ap</i>	-2,109	-1,558	-1,408	1,354	1,498	1,107
55981	<i>Pigb</i>	-1,093	-1,193	1,321	-1,091	1,444	1,575
319565	<i>Syne2</i>	-1,266	1,256	-1,541	1,590	-1,217	-1,936
170752	<i>Bcdo2</i>	-1,009	-1,223	1,213	-1,212	1,224	1,483
66904	<i>Pccb</i>	1,565	2,256	1,680	1,441	1,074	-1,343
435477		-2,707	-1,238	-2,944	2,187	-1,088	-2,379
104001	<i>Rtn1</i>	1,268	1,082	-1,061	-1,172	-1,345	-1,147
16531	<i>Kcnma1</i>	1,123	1,097	1,224	-1,023	1,089	1,115
16773	<i>Lama2</i>	1,193	1,331	1,058	1,115	-1,127	-1,257
18823	<i>Plp1</i>	1,223	1,154	-1,133	-1,059	-1,386	-1,308
19043	<i>Ppm1b</i>	1,096	1,083	-1,044	-1,012	-1,144	-1,130
268859	<i>A2bp1</i>	1,123	1,376	1,320	1,226	1,176	-1,042

Anexo 3 – Lista dos 131 genes com $p < 0,05$ na comparação TIOT X RESC os respectivos p valores (Tabela 3) e razão de expressão (Tabela 4) encontrados para cada comparação

Tabela 3 - Lista dos 131 genes com os respectivos p valores encontrados para cada comparação (onde RESC = macrófagos residentes controle, REST= macrófagos residentes tratados com rhPTX3, TIOC= macrófagos elicitados por tioglicolato controle, TIOT= macrófagos elicitados por tioglicolato tratados com rhPTX3) após a realização do teste de Tukey. Em cores são mostrados os valores de $p < 0,05$.

<i>Gene Symbol</i>	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
<i>Dusp11</i>	0,0045	0,0544	0,0010	0,3099	0,5621	0,0487
<i>Aadacl1</i>	0,0002	0,4518	0,0009	0,0010	0,5147	0,0054
<i>2610510H03Rik</i>	0,1234	0,8535	0,0129	0,3552	0,4148	0,0382
<i>Osbp18</i>	0,0206	1,0000	0,0061	0,0213	0,7889	0,0063
<i>Alcam</i>	0,0165	0,9998	0,0117	0,0149	0,9937	0,0107
<i>Lip1</i>	0,0291	0,9514	0,0239	0,0604	0,9989	0,0493
<i>Ptprs</i>	0,0091	0,9999	0,0054	0,0085	0,9735	0,0050
<i>Hif1a</i>	0,0043	0,7789	0,0042	0,0145	1,0000	0,0141
<i>Pot1a</i>	0,0009	0,9156	0,0007	0,0004	0,9951	0,0004
<i>Myst3</i>	0,0025	0,1932	0,0022	0,0437	0,9996	0,0379
<i>Ppp2r5e</i>	0,0545	0,1288	0,0340	0,9258	0,9859	0,7816
<i>Cc2d1b</i>	0,0315	0,3331	0,0039	0,3751	0,4220	0,0416
<i>Slc29a3</i>	0,0015	0,8709	0,0010	0,0035	0,9791	0,0022
<i>Rgs1</i>	0,0176	0,9928	0,0012	0,0253	0,1954	0,0016
<i>Vcl</i>	0,0251	0,7496	0,0102	0,0067	0,9034	0,0029
<i>Igsf4a</i>	0,0016	0,7646	0,0027	0,0049	0,9606	0,0091
<i>4931406C07Rik</i>	0,0018	0,0307	0,0044	0,1887	0,8695	0,4842
<i>Phf17</i>	0,0864	0,0771	0,0420	0,9998	0,9540	0,9714
<i>Slk</i>	0,0035	0,9956	0,0001	0,0046	0,0369	0,0001
<i>Lims2</i>	0,0003	0,0568	0,0004	0,0082	0,9929	0,0116
<i>Morf4l2</i>	0,0148	0,8554	0,0019	0,0440	0,4033	0,0049
<i>Ralgds</i>	0,0437	0,6853	0,0366	0,0095	0,9992	0,0081
<i>6030465E24Rik</i>	0,5091	0,9999	0,0130	0,5368	0,0957	0,0139
<i>Dnmt3a</i>	0,0037	1,0000	0,0049	0,0038	0,9957	0,0050
<i>Rnpc3</i>	0,0018	0,0152	0,0085	0,3670	0,5931	0,9686
<i>2700008B19Rik</i>	0,0054	0,4731	0,0304	0,0397	0,5755	0,2491
<i>Pcnx</i>	0,0001	0,9999	0,0003	0,0001	0,6694	0,0003
<i>0610037D15Rik</i>	0,0649	0,9142	0,0083	0,0263	0,4753	0,0038
<i>6330569M22Rik</i>	0,0920	0,1555	0,0013	0,0038	0,0427	0,0001
<i>Dpysl4</i>	0,4963	0,4664	0,0435	0,9999	0,3265	0,3505

<i>Lrp12</i>	0,1232	0,5666	0,0115	0,6299	0,3760	0,0724
<i>Rdh16</i>	0,0004	0,0103	0,0026	0,0736	0,3400	0,6834
<i>Col13a1</i>	0,0018	0,0235	0,0026	0,2461	0,9893	0,3618
<i>4933437F05Rik</i>	0,0153	0,2361	0,0041	0,2715	0,7309	0,0646
<i>Alad</i>	0,5822	0,4912	0,0442	0,9981	0,2708	0,3349
<i>Kcnh6</i>	0,1441	0,4538	0,0284	0,8063	0,6676	0,2457
<i>Abtb1</i>	0,0174	0,9999	0,0147	0,0191	0,9992	0,0161
<i>Gata1</i>	0,9966	0,9766	0,0062	0,9972	0,0080	0,0103
<i>Lima1</i>	0,0127	0,9976	0,0175	0,0100	0,9949	0,0137
<i>4930511H01Rik</i>	0,4431	0,1408	0,0295	0,8086	0,2619	0,6923
<i>Klr1c</i>	0,1805	0,9992	0,0317	0,2143	0,6197	0,0378
<i>Thap4</i>	0,0038	0,3284	0,0011	0,0417	0,7210	0,0099
Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
<i>Adam8</i>	0,0227	0,9200	0,0400	0,0545	0,9756	0,0970
<i>4930435H24Rik</i>	0,9999	0,7277	0,0004	0,7603	0,0004	0,0011
<i>R3hdm1</i>	0,0133	0,9994	0,0019	0,0155	0,4430	0,0022
<i>Folr2</i>	0,3337	0,8501	0,0490	0,1136	0,5320	0,0162
<i>Gprc5d</i>	0,0848	0,9163	0,0166	0,2058	0,6591	0,0400
<i>Pigb</i>	0,7066	0,2155	0,0377	0,7175	0,0088	0,0024
<i>A2bp1</i>	0,3964	0,0076	0,0166	0,0734	0,1692	0,9302
<i>Fa2h</i>	0,9893	0,9781	0,0216	0,9997	0,0329	0,0371
<i>Lta</i>	0,1909	0,1270	0,0368	0,9903	0,6567	0,8149
<i>Kcnq4</i>	0,9928	0,0235	0,0126	0,0339	0,0180	0,9649
<i>Stk39</i>	0,0641	0,0272	0,0093	0,9253	0,5254	0,8520
<i>Rab33a</i>	0,4931	0,1576	0,0193	0,8003	0,1513	0,4778
<i>Cygb</i>	0,0124	0,5886	0,0467	0,0742	0,7699	0,2804
<i>Runx1</i>	0,1336	0,6292	0,0218	0,5997	0,5904	0,1213
<i>Akp2</i>	0,8767	1,0000	0,0227	0,8757	0,0640	0,0226
<i>Mknk1</i>	0,5416	0,9916	0,0059	0,6984	0,0370	0,0084
433814	0,1358	0,4710	0,0417	0,7670	0,8348	0,3339
<i>Pou4f3</i>	0,0709	0,9993	0,0066	0,0595	0,3578	0,0057
<i>D630023B12Rik</i>	0,9535	0,9878	0,0152	0,8375	0,0307	0,0100
<i>4933404M02Rik</i>	0,7875	0,1643	0,0089	0,5225	0,0311	0,2248
<i>Kcnma1</i>	0,1951	0,3463	0,0198	0,9689	0,4089	0,2353
<i>Dmd</i>	0,9998	0,9354	0,0375	0,9080	0,0422	0,0170
<i>Epc1</i>	0,7053	0,9992	0,0498	0,6353	0,2269	0,0418
<i>Usp20</i>	0,3949	0,7814	0,0351	0,8839	0,3475	0,1329
<i>Nat11</i>	0,0011	0,7656	0,0123	0,0033	0,2501	0,0467
<i>2310047C04Rik</i>	0,8104	0,9961	0,0423	0,9041	0,1477	0,0573
<i>Igh-6</i>	0,0283	0,0862	0,0270	0,8553	1,0000	0,8394
<i>Polm</i>	0,2401	0,2532	0,0432	0,0145	0,6249	0,0031

<i>Tmem110</i>	0,4652	0,1673	0,0378	0,8470	0,3104	0,7213
<i>Numb1</i>	0,9970	0,4573	0,0385	0,3641	0,0508	0,0050
<i>Mxi1</i>	0,1846	0,8985	0,0046	0,4394	0,0004	0,0021
<i>4930510E17Rik</i>	0,9889	0,4329	0,0249	0,5964	0,0163	0,0032
<i>Pask</i>	0,0254	0,8385	0,0196	0,0814	0,9974	0,0622
<i>Ctnn</i>	0,9767	0,7321	0,0353	0,5105	0,0621	0,0087
<i>Nsg1</i>	0,0440	0,1134	0,0334	0,9049	0,0006	0,0013
<i>Panx3</i>	0,1458	0,8086	0,0259	0,4556	0,6253	0,0907
<i>Car2</i>	0,5091	0,1213	0,0341	0,0163	0,2536	0,0014
<i>2610015P09Rik</i>	0,0556	0,2623	0,0242	0,6875	0,9303	0,3750
<i>Sfxn1</i>	0,3190	0,9544	0,0340	0,5649	0,4169	0,0696
<i>Nsbp1</i>	0,0738	0,2154	0,0438	0,8652	0,9816	0,6767
<i>Akr1c13</i>	0,0028	0,0034	0,0049	0,9985	0,9657	0,9898
<i>Supt4h1</i>	0,0224	0,9175	0,0459	0,0542	0,9524	0,1126
<i>Ufd1l</i>	0,0048	0,2492	0,0179	0,0745	0,7451	0,2988
<i>Mtch2</i>	0,0362	0,6607	0,0499	0,1860	0,9954	0,2527
<i>Slpi</i>	0,0664	0,9020	0,0374	0,1720	0,9754	0,0974
<i>H13</i>	0,0046	0,0909	0,0081	0,1945	0,9664	0,3506
<i>1190005P17Rik</i>	0,0165	0,3514	0,0067	0,1935	0,8964	0,0735
Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
<i>Gas2</i>	0,4446	0,0146	0,0464	0,0021	0,3896	0,0004
<i>Edd1</i>	0,0048	0,4979	0,0143	0,0326	0,8247	0,1092
<i>Top3b</i>	0,3040	0,6813	0,0356	0,8713	0,4521	0,1742
<i>Mrpl20</i>	0,0078	0,3715	0,0123	0,0814	0,9839	0,1335
<i>Rag1ap1</i>	0,4580	0,9876	0,0228	0,3134	0,1963	0,0148
<i>Cct6a</i>	0,0231	0,9623	0,0142	0,0447	0,9828	0,0271
<i>Msi2</i>	0,1729	0,9967	0,0180	0,1301	0,4188	0,0137
<i>Psmb7</i>	0,0753	0,8697	0,0091	0,2163	0,4569	0,0251
<i>Pa2q4</i>	0,0003	0,4624	0,0005	0,0017	0,9706	0,0028
<i>Pole4</i>	0,1799	0,9607	0,0475	0,3375	0,7801	0,0940
<i>Cd320</i>	0,1400	0,9681	0,0049	0,2565	0,1394	0,0087
<i>9030617O03Rik</i>	0,4829	0,7685	0,0163	0,1408	0,1307	0,0047
<i>Gmpr</i>	0,0192	0,5787	0,0481	0,1207	0,9077	0,2950
<i>Yif1a</i>	0,2960	0,9351	0,0401	0,5712	0,5067	0,0909
<i>Ceacam10</i>	0,0328	0,0611	0,0189	0,9691	0,9765	0,8316
<i>Dazap2</i>	0,1696	0,9783	0,0432	0,2850	0,7673	0,0750
<i>Rps24</i>	0,0007	0,7362	0,0008	0,0022	0,9998	0,0024
<i>LOC212084</i>	0,1010	0,7308	0,0481	0,4007	0,9504	0,2063
<i>Syn2</i>	0,8573	0,6079	0,0152	0,2464	0,0448	0,0031
<i>Rpl18a</i>	0,1956	0,5847	0,0232	0,7948	0,4648	0,1439
<i>Prpf38a</i>	0,1012	0,8229	0,0444	0,3240	0,9340	0,1496

<i>Slc25a36</i>	0,0159	0,1180	0,0188	0,5106	0,9992	0,5791
<i>LOC195576</i>	0,0063	0,5813	0,0039	0,0359	0,9783	0,0209
<i>Mrpl52</i>	0,1409	0,8863	0,0147	0,3627	0,4177	0,0395
<i>Rpl8</i>	0,0000	0,7772	0,0000	0,0000	0,7217	0,0000
<i>0610040D20Rik</i>	0,0164	0,9587	0,0027	0,0086	0,5108	0,0015
<i>Eif3s3</i>	0,0011	0,9363	0,0013	0,0006	0,9992	0,0007
<i>Rps5</i>	0,0974	0,9404	0,0255	0,2120	0,7772	0,0560
<i>433054</i>	0,0334	0,9964	0,0242	0,0449	0,9952	0,0324
<i>4921531G14Rik</i>	0,0147	0,7152	0,0088	0,0646	0,9774	0,0370
<i>Rpsa</i>	0,0002	1,0000	0,0004	0,0002	0,8902	0,0004
<i>Btf3</i>	0,0276	0,9270	0,0291	0,0646	1,0000	0,0682
<i>Adarb1</i>	0,0560	0,9779	0,0078	0,0323	0,4995	0,0047
<i>215605</i>	0,0007	0,9997	0,0006	0,0006	0,9998	0,0006
<i>Khk</i>	0,0597	0,9699	0,0045	0,1109	0,2833	0,0078
<i>435477</i>	0,0107	0,7907	0,0067	0,0375	0,9821	0,0226
<i>Cdc20</i>	0,0094	0,5972	0,0040	0,0540	0,8951	0,0205
<i>Chac1</i>	0,0114	0,9285	0,0012	0,0255	0,3068	0,0024
<i>Ewsr1</i>	0,1316	0,9884	0,0099	0,2028	0,3078	0,0150
<i>Rpl36a</i>	0,0024	0,9936	0,0057	0,0018	0,8828	0,0041
<i>Slco1a4</i>	0,0233	0,7005	0,0043	0,1084	0,5812	0,0174
<i>Rpl26</i>	0,1115	0,9827	0,0427	0,1839	0,9014	0,0710

Tabela 4 - Lista dos 131 genes com os respectivos valores de razão de expressão encontrados para cada comparação (onde RESC = macrófagos residentes controle, REST= macrófagos residentes tratados com rhPTX3, TIOC= macrófagos elicitados por tioglicolato controle, TIOT= macrófagos elicitados por tioglicolato tratados com rhPTX3) após a realização do teste de Tukey. Em cores são mostrados os valores de razão de expressão maiores que 2.

<i>Gene Symbol</i>	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
<i>Dusp11</i>	6,5898	3,2580	10,9309	-2,0226	1,6588	3,3551
<i>Aadacl1</i>	9,6475	1,5654	6,3827	-6,1629	-1,5115	4,0773
<i>2610510H03Rik</i>	2,9092	1,3948	5,7434	-2,0858	1,9742	4,1179
<i>Osbpl8</i>	2,9185	1,0067	3,7856	-2,8990	1,2971	3,7602
<i>Alcam</i>	3,3589	-1,0225	3,6282	-3,4345	1,0802	3,7099
<i>Lip1</i>	3,4389	1,1967	3,6128	-2,8736	1,0506	3,0190
<i>Ptprs</i>	3,2040	-1,0145	3,5751	-3,2505	1,1158	3,6271
<i>Hif1a</i>	3,5553	1,2697	3,5720	-2,8000	1,0047	2,8132
<i>Pot1a</i>	3,1292	-1,1193	3,2611	-3,5024	1,0422	3,6501
<i>Myst3</i>	3,1697	1,5938	3,2376	-1,9888	1,0214	2,0314
<i>Ppp2r5e</i>	2,8809	2,3452	3,2264	-1,2284	1,1199	1,3757
<i>Cc2d1b</i>	2,2131	1,5041	3,1827	-1,4713	1,4381	2,1159

<i>Slc29a3</i>	2,7076	1,1341	2,8871	-2,3874	1,0663	2,5456
<i>Rgs1</i>	1,9649	1,0465	2,8732	-1,8776	1,4623	2,7455
<i>Vcl</i>	2,3800	-1,2667	2,7888	-3,0147	1,1718	3,5325
<i>Igsf4a</i>	2,6734	1,1765	2,4671	-2,2723	-1,0836	2,0970
<i>4931406C07Rik</i>	2,6519	1,8162	2,3335	-1,4601	-1,1364	1,2848
<i>Phf17</i>	1,9963	2,0361	2,2635	1,0199	1,1338	1,1117
<i>Slk</i>	1,6317	1,0213	2,2465	-1,5976	1,3768	2,1997
<i>Lims2</i>	2,3068	1,4049	2,2407	-1,6421	-1,0295	1,5950
<i>Morf4l2</i>	1,7405	1,1136	2,1786	-1,5629	1,2517	1,9563
<i>Ralgds</i>	2,0451	-1,2765	2,1015	-2,6106	1,0276	2,6826
<i>6030465E24Rik</i>	1,2822	1,0090	2,0552	-1,2708	1,6029	2,0369
<i>Dnmt3a</i>	2,0732	1,0023	2,0089	-2,0683	-1,0320	2,0042
<i>Rnpc3</i>	2,4394	1,8683	2,0007	-1,3056	-1,2193	1,0709
<i>2700008B19Rik</i>	2,2847	1,2921	1,8265	-1,7682	-1,2508	1,4136
<i>Pcnx</i>	1,9154	-1,0039	1,7546	-1,9229	-1,0916	1,7614
<i>0610037D15Rik</i>	1,3876	-1,0726	1,6346	-1,4883	1,1780	1,7533
<i>6330569M22Rik</i>	1,2483	-1,2113	1,6276	-1,5121	1,3039	1,9716
<i>Dpysl4</i>	1,2340	1,2443	1,6042	1,0083	1,3000	1,2892
<i>Lrp12</i>	1,3268	1,1591	1,6034	-1,1447	1,2084	1,3833
<i>Rdh16</i>	1,8326	1,4370	1,5782	-1,2753	-1,1612	1,0983
<i>Col13a1</i>	1,5468	1,3254	1,5116	-1,1670	-1,0233	1,1405
<i>4933437F05Rik</i>	1,3847	1,1818	1,5053	-1,1717	1,0871	1,2737
<i>Alad</i>	1,1668	1,1903	1,4734	1,0201	1,2627	1,2379
<i>Kcnh6</i>	1,2975	1,1794	1,4674	-1,1002	1,1309	1,2443
<i>Abtb1</i>	1,4409	1,0065	1,4579	-1,4316	1,0118	1,4484
<i>Gata1</i>	1,0164	1,0320	1,4537	1,0154	1,4302	1,4086
<i>Lima1</i>	1,4754	-1,0171	1,4434	-1,5007	-1,0222	1,4680
<i>4930511H01Rik</i>	1,1713	1,2814	1,4331	1,0940	1,2235	1,1184
Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOC	TIOT X TIOC	TIOT X REST
<i>Klrb1c</i>	1,2584	1,0129	1,4259	-1,2424	1,1331	1,4078
<i>Thap4</i>	1,3176	1,1026	1,3945	-1,1950	1,0584	1,2647
<i>Adam8</i>	1,4373	1,0624	1,3819	-1,3529	-1,0400	1,3008
<i>4930435H24Rik</i>	1,0027	1,0476	1,3815	1,0447	1,3778	1,3188
<i>R3hdm1</i>	1,2628	1,0065	1,3790	-1,2547	1,0920	1,3701
<i>Folr2</i>	1,1937	-1,0818	1,3686	-1,2913	1,1465	1,4805
<i>Gprc5d</i>	1,2222	1,0464	1,3282	-1,1680	1,0867	1,2693
<i>Pigb</i>	-1,0930	-1,1926	1,3208	-1,0912	1,4436	1,5753
<i>A2bp1</i>	1,1229	1,3762	1,3204	1,2255	1,1758	-1,0423
<i>Fa2h</i>	1,0224	1,0288	1,3179	1,0063	1,2890	1,2809
<i>Lta</i>	1,1963	1,2249	1,3142	1,0239	1,0985	1,0728
<i>Kcnq4</i>	1,0172	1,2710	1,3093	1,2494	1,2871	1,0301

<i>Stk39</i>	1,2001	1,2452	1,3069	1,0376	1,0890	1,0495
<i>Rab33a</i>	1,1054	1,1759	1,3025	1,0638	1,1783	1,1076
<i>Cygb</i>	1,4082	1,1110	1,3017	-1,2675	-1,0818	1,1716
<i>Runx1</i>	1,1868	1,0875	1,2968	-1,0914	1,0926	1,1925
<i>Akp2</i>	1,0509	-1,0002	1,2860	-1,0510	1,2237	1,2862
<i>Mknk1</i>	1,0721	1,0143	1,2731	-1,0570	1,1875	1,2552
<i>433814</i>	1,1975	1,1160	1,2724	-1,0731	1,0625	1,1402
<i>Pou4f3</i>	1,1512	-1,0059	1,2517	-1,1580	1,0873	1,2591
<i>D630023B12Rik</i>	1,0273	-1,0169	1,2380	-1,0447	1,2051	1,2590
<i>4933404M02Rik</i>	1,0438	1,1140	1,2279	1,0672	1,1763	1,1022
<i>Kcnma1</i>	1,1232	1,0975	1,2237	-1,0234	1,0895	1,1150
<i>Dmd</i>	1,0049	-1,0349	1,2235	-1,0400	1,2175	1,2662
<i>Epc1</i>	1,0701	-1,0078	1,2204	-1,0784	1,1405	1,2300
<i>Usp20</i>	1,0944	1,0524	1,2046	-1,0399	1,1007	1,1447
<i>Nat11</i>	1,2869	1,0401	1,1855	-1,2373	-1,0856	1,1397
<i>2310047C04Rik</i>	1,0434	1,0104	1,1718	-1,0327	1,1231	1,1598
<i>Igh-6</i>	-1,2762	-1,2096	-1,2793	1,0551	-1,0024	-1,0576
<i>Polm</i>	-1,1718	1,1682	-1,2877	1,3688	-1,0989	-1,5042
<i>Tmem110</i>	-1,1234	-1,1951	-1,2956	-1,0638	-1,1532	-1,0840
<i>Numb1</i>	-1,0163	1,1347	-1,3196	1,1532	-1,2984	-1,4973
<i>Mxi1</i>	1,1444	1,0418	-1,3462	-1,0985	-1,5405	-1,4024
<i>4930510E17Rik</i>	1,0278	1,1518	-1,3889	1,1206	-1,4275	-1,5997
<i>Pask</i>	-1,3724	-1,0739	-1,3949	1,2779	-1,0164	-1,2989
<i>Ctnn</i>	-1,0406	1,1088	-1,4083	1,1538	-1,3533	-1,5615
<i>Nsq1</i>	1,3880	1,2982	-1,4156	-1,0691	-1,9648	-1,8378
<i>Panx3</i>	-1,2674	-1,0906	-1,4285	1,1621	-1,1271	-1,3099
<i>Car2</i>	-1,2062	1,3967	-1,5701	1,6847	-1,3017	-2,1930
<i>2610015P09Rik</i>	-1,4738	-1,2824	-1,5869	1,1492	-1,0768	-1,2375
<i>Sfxn1</i>	-1,2791	-1,0701	-1,5880	1,1952	-1,2415	-1,4839
<i>Nsbp1</i>	-1,5275	-1,3661	-1,6114	1,1181	-1,0550	-1,1796
<i>Akr1c13</i>	-1,7250	-1,6976	-1,6469	1,0161	1,0474	1,0308
<i>Supt4h1</i>	-1,8377	-1,1078	-1,6907	1,6589	1,0869	-1,5262
<i>Ufd1l</i>	-1,9638	-1,3204	-1,7104	1,4872	1,1482	-1,2953
<i>Mtch2</i>	-1,7832	-1,2178	-1,7155	1,4643	1,0395	-1,4087
<i>Slpi</i>	-1,6318	-1,1173	-1,7443	1,4605	-1,0689	-1,5612
Gene Symbol	TIOC X RESC	REST X RESC	TIOT X RESC	REST X TIOT	TIOT X TIOT	TIOT X REST
<i>H13</i>	-1,8716	-1,4158	-1,7676	1,3220	1,0588	-1,2485
<i>1190005P17Rik</i>	-1,6426	-1,2455	-1,7902	1,3189	-1,0898	-1,4374
<i>Gas2</i>	-1,3245	2,0821	-1,7908	2,7577	-1,3521	-3,7286
<i>Edd1</i>	-2,0369	-1,2332	-1,8011	1,6517	1,1310	-1,4605
<i>Top3b</i>	-1,3911	-1,2188	-1,8252	1,1414	-1,3121	-1,4976

<i>Mrpl20</i>	-1,9475	-1,2853	-1,8502	1,5152	1,0525	-1,4395
<i>Rag1ap1</i>	-1,2920	1,0549	-1,8688	1,3629	-1,4465	-1,9714
<i>Cct6a</i>	-1,8047	-1,0777	-1,9100	1,6747	-1,0583	-1,7723
<i>Msi2</i>	-1,5060	1,0370	-2,0061	1,5618	-1,3321	-2,0804
<i>Psmb7</i>	-1,5808	-1,1271	-2,0156	1,4026	-1,2750	-1,7884
<i>Pa2g4</i>	-2,1084	-1,1671	-2,0179	1,8064	1,0449	-1,7289
<i>Pole4</i>	-1,6450	-1,1108	-2,0225	1,4809	-1,2295	-1,8207
<i>Cd320</i>	-1,4223	-1,0660	-2,0239	1,3342	-1,4230	-1,8985
<i>9030617O03Rik</i>	-1,3012	1,1868	-2,0283	1,5442	-1,5588	-2,4071
<i>Gmpr</i>	-2,3540	-1,3357	-2,0343	1,7624	1,1572	-1,5231
<i>Yif1a</i>	-1,4993	-1,1310	-2,0383	1,3256	-1,3595	-1,8022
<i>Ceacam10</i>	-1,8999	-1,7517	-2,0452	1,0846	-1,0765	-1,1676
<i>Dazap2</i>	-1,6605	-1,0888	-2,0525	1,5251	-1,2361	-1,8851
<i>Rps24</i>	-2,0831	-1,1207	-2,0650	1,8588	1,0088	-1,8426
<i>LOC212084</i>	-1,8717	-1,2734	-2,1142	1,4698	-1,1296	-1,6602
<i>Syn2</i>	-1,1578	1,2643	-2,1281	1,4639	-1,8381	-2,6907
<i>Rpl18a</i>	-1,5678	-1,3017	-2,1354	1,2044	-1,3620	-1,6404
<i>Prpf38a</i>	-1,8839	-1,2245	-2,1604	1,5385	-1,1468	-1,7644
<i>Slc25a36</i>	-2,2448	-1,6815	-2,1888	1,3350	1,0256	-1,3017
<i>LOC195576</i>	-2,0978	-1,2269	-2,2298	1,7098	-1,0629	-1,8174
<i>Mrpl52</i>	-1,6415	-1,1558	-2,2756	1,4203	-1,3863	-1,9689
<i>Rpl8</i>	-2,5199	-1,0753	-2,3250	2,3435	1,0838	-2,1622
<i>0610040D20Rik</i>	-1,8626	1,0793	-2,3292	2,0102	-1,2506	-2,5139
<i>Eif3s3</i>	-2,3791	1,0834	-2,3376	2,5775	1,0177	-2,5326
<i>Rps5</i>	-1,9287	-1,1450	-2,4274	1,6844	-1,2585	-2,1199
<i>433054</i>	-2,4882	-1,0568	-2,6444	2,3544	-1,0628	-2,5022
<i>4921531G14Rik</i>	-2,4329	-1,2621	-2,6520	1,9276	-1,0901	-2,1012
<i>Rpsa</i>	-3,1025	1,0007	-2,8037	3,1047	1,1066	-2,8056
<i>Btf3</i>	-2,8367	-1,1906	-2,8056	2,3826	1,0111	-2,3564
<i>Adarb1</i>	-2,0262	1,0932	-2,8208	2,2150	-1,3922	-3,0837
<i>215605</i>	-2,7967	1,0140	-2,8300	2,8359	-1,0119	-2,8697
<i>Khk</i>	-1,9260	-1,0981	-2,9147	1,7540	-1,5134	-2,6544
<i>435477</i>	-2,7073	-1,2378	-2,9442	2,1871	-1,0875	-2,3785
<i>Cdc20</i>	-2,9750	-1,3712	-3,5324	2,1696	-1,1874	-2,5762
<i>Chac1</i>	-2,4087	-1,1315	-3,5433	2,1289	-1,4710	-3,1316
<i>Ewsr1</i>	-2,0684	-1,0953	-3,5605	1,8884	-1,7214	-3,2508
<i>Rpl36a</i>	-4,3591	1,0702	-3,5942	4,6651	1,2128	-3,8465
<i>Slco1a4</i>	-2,6808	-1,3346	-3,7846	2,0087	-1,4117	-2,8357
<i>Rpl26</i>	-2,9040	-1,1575	-3,8257	2,5088	-1,3174	-3,3051