

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA PTX3
NA LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA
VENTILAÇÃO MECÂNICA**

JULIANA MONTE REAL

**Tese de doutorado apresentada a Fundação
Antônio Prudente para obtenção do Título de
Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Profº. Dr. Daniel Deheinzelin

Co-Orientador: Dra. Adriana Abalen M. Dias

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Real, Juliana Monte

Avaliação do papel da proteína PTX3 na lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica/ Juliana Monte Real – São Paulo, 2009.

114p.

Tese (Doutorado) Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Daniel Deheinzelin

Descritores: 1. LESÃO PULMONAR 2. VENTILAÇÃO MECÂNICA
3. PENTRAXINA 3 (PTX3).

DEDICATÓRIA

aos meus pais,

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de forma direta ou indireta colaboraram com a realização desta tese, mas que acima de tudo, contribuíram não só com a realização deste projeto, mas também com meu amadurecimento profissional e pessoal, experiência que levarei comigo por toda a vida. A começar pelos meus orientadores Dr. Daniel Deheinzelin e Dra. Adriana Abalen, agradeço a confiança, paciência e tudo o que me ensinaram ao longo desses cinco anos.

À Dra. Gisele Gargantini Rezze, agradeço o carinho e a oportunidade desde o dia em que nos conhecemos numa simples consulta médica.

À querida Graziela Spilborghs, agradeço por ter se tornado minha amiga, por toda ajuda experimental, e por sua alegria e sorriso que fizeram toda a diferença no dia a dia do laboratório.

Aos meus queridos amigos Mariana Morato e Vladimir Lima agradeço as incríveis conversas científicas que sempre mantiveram acesa a chama e minha empolgação pela pesquisa.

À amiga Nair Muto agradeço pelo apoio em todos os momentos, pela ajuda e companheirismo nas questões profissionais e pessoais.

À aluna de iniciação científica Marina Matias Baeta, que contribuiu com parte dos experimentos, obrigada pela paciência e colaboração.

À Dra. Elnara Macia Negri pelo ensino e suporte nas análises histológicas e ao Ricardo Moura pelo auxílio na técnica de PCR em tempo real.

Aos bioteristas Wanderley Lourenço Gonçalves, Oraci de Lima Leite e Ederval de Oliveira Machado, agradeço o cuidado com os animais e o bom humor sempre presente.

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis e a Dra. Anamaria Aranha Camargo, muito obrigada pelo suporte e discussões críticas ao trabalho.

Agradeço a assistência dos técnicos Carlos Alberto do Nascimento, Severino da Silva e Suely Nonogaki na confecção de lâminas para histologia, *tissue microarray* e reações de imunohistoquímica.

Aos amigos do laboratório, Fernanda Monma, Letícia Lerner, Aline Pacífico Rodrigues, Sarah Marques, Patrícia Possik, Camila Morais Melo, Anderson Souza, Chamberlein Mendonça, Bianca Barreto, Ana Helena Pagotto, Anna Coló, Aline Siqueira Bossa, Rogério Nazário, obrigada pelo adorável convívio diário, pelas risadas, pela troca de experiências, pela ajuda, pelo carinho.

Às bibliotecárias Suely Francisco e Francyne, obrigada pelos artigos sempre urgentes de última hora e pela ajuda na formatação desta tese.

À pós-graduação, em nome da Ana Kuninari e Luciana Pitombeira, agradeço a atenção e o auxílio prestados.

Em memória ao meu primo João Argolo, agradeço pelo sonho que tínhamos de ser cientistas quando brincávamos ainda crianças...

Por fim, agradeço o incentivo e apoio dos meus pais Sandra e Nicolino que tornaram a realização deste Doutorado possível. O amor de vocês está presente em todos os momentos da minha vida, e é para vocês que dedico essa tese. Muito obrigada.

RESUMO

REAL JM. **Avaliação do papel da proteína PTX3 na lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica.** São Paulo; 2010. [Tese-Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

A ventilação mecânica (VM) é uma terapia indispensável no tratamento da insuficiência respiratória que pode causar como efeito colateral a Lesão Pulmonar Induzida pelo Ventilador (LPIV). Apesar do importante papel da inflamação na patogênese da LPIV, nem todos os mecanismos e vias são claramente conhecidos. O objetivo deste projeto foi investigar a função da proteína Pentraxina 3 (PTX3) na LPIV. Observamos que além de PTX3 ser um dos mediadores inflamatórios envolvidos na LPIV, sua presença em maiores quantidades levou ao desenvolvimento mais rápido da lesão nos animais transgênicos para *Ptx3* em relação aos camundongos sem modificações quando submetidos à VM em alto volume corrente. A mesma ação pró-inflamatória de PTX3 não foi observada em condições de ventilação mecânica protetoras ao pulmão, sugerindo que seu impacto seja maior em LPIV mais severas. A fim de modular negativamente a expressão de PTX3 *in vivo*, investigamos a ação anti-inflamatória da Pentoxifilina na LPIV causada por alto volume corrente. Embora as doses de 50 e 100 mg/kg não tenham retardado o aparecimento da LPIV sua ação ainda deve ser melhor investigada. Nossos dados revelam o importante papel da pentraxina longa PTX3, cuja hiper-expressão acelerou o desenvolvimento da lesão pulmonar nos camundongos submetidos à ventilação mecânica. Os resultados contribuem para um melhor entendimento do processo inflamatório na LPIV e colaboram na elaboração de medidas visando minimizar tais danos.

SUMMARY

Real JM. [**Role of pentraxin 3 in ventilator-induced lung injury**]. São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Mechanical ventilation is an indispensable therapy for respiratory failure that can cause Ventilator-Induced Lung Injury (VILI) as side effect. Although inflammation is known to be involved in the pathogenesis of the ventilator-induced lung injury (VILI), several aspects and mediators of this process are still unknown. This study aimed at investigating the role of the pentraxin 3 (PTX3) in VILI pathogenesis. In addition to be one of the inflammatory mediators in VILI, *Ptx3* over-expression led to a faster development of VILI in *Ptx3*-transgenic mice in comparison with wild-type when submitted to high tidal volume ventilation. The same PTX3 pro-inflammatory action was not observed in a lung protective ventilation strategy, suggesting that its impact may be worse in more severe VILI. In order to down-regulate PTX3 expression *in vivo*, we investigated the Pentoxifylline anti-inflammatory action in VILI caused by high tidal volume ventilation. Although 50 and 100 mg/kg doses did not delayed the onset of VILI, its function deserves further investigation. Our data show the important involvement of the long pentraxin PTX3, which hiper-expression accelerated the lung injury development in mice submitted to mechanical ventilation. The results contribute to a better understanding of the inflammatory process in VILI disclosing the involvement of PTX3 in the pathogenesis of this disorder and its potential usefulness as a target for clinical interventions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho experimental para avaliação de <i>Ptx3</i> em ventilação mecânica protetora e agressiva.....	19
Figura 2	Desenho experimental para estudo da modulação negativa de <i>Ptx3</i>	20
Figura 3	Fotomicrografia esquemática representando os pontos selecionados para confecção do <i>Tissue Microarray</i>	41
Figura 4	Mecânica basal do sistema respiratório nas diferentes linhagens de camundongos estudadas.....	51
Figura 5	Lesão tecidual causada pela ventilação mecânica em alto volume corrente.....	52
Figura 6	Avaliação do edema e infiltrado neutrofílico no pulmão de camundongos submetidos à ventilação mecânica em alto volume corrente.....	54
Figura 7	Cinética de aumento da elastância do sistema respiratório e tempo mediano levado pelas diferentes linhagens de camundongos para desenvolvimento da LPIV.....	56
Figura 8	Perfil de expressão gênica no pulmão em 150% de Elastância Pulmonar.....	58
Figura 9	Análise da expressão de IL1B e TNFA por imunistoquímica em pulmões de camundongos <i>Ptx3^{+/+}</i> e <i>Ptx3^{-/-}</i>	60
Figura 10	Elastância Pulmonar após 20, 40 e 60 min de ventilação mecânica.....	66
Figura 11	Expressão gênica de <i>Ptx3</i> , <i>Il1b</i> e <i>Tnfa</i> após 20, 40 e 60 minutos de ventilação mecânica em alto volume corrente.....	69
Figura 12	Perfil de expressão gênica aos 60 minutos de ventilação mecânica em alto volume corrente.....	70

Figura 13	Análise da expressão de IL1B e TNFA por imunistoquímica em pulmões de camundongos Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 e CD1.....	72
Figura 14	Análise histomorfométrica pulmonar de camundongos submetidos à ventilação mecânica em baixo volume corrente.....	78
Figura 15	Quantificação do edema e do infiltrado neutrofílico pulmonar após ventilação mecânica protetora.....	79
Figura 16	Análise do perfil de expressão gênica após ventilação mecânica protetora.....	80
Figura 17	Tempo necessário para ocorrência de Lesão Pulmonar Induzida pelo Ventilador após tratamento com 50 mg/kg de Pentoxifilina.....	84
Figura 18	Tempo necessário para aumento da elastância pulmonar após 100 mg/kg de pentoxifilina em camundongos transgênicos para <i>Ptx3</i>	87
Figura 19	Níveis protéicos de citocinas após VM em alto volume corrente e tratamento com 100 mg/kg de pentoxifilina.....	88
Figura 20	Concentração de proteínas e citocinas no lavado broncoalveolar após VM e tratamento com 100 mg/kg de pentoxifilina em camundongos transgênicos para <i>Ptx3</i>	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Seqüência dos iniciadores desenhados para avaliação da expressão gênica no pulmão por PCR em tempo real.....	36
Tabela 2	Concentração de anticorpos e proteína referente ao ponto máximo da curva padrão para os mediadores PTX3, IL1B, TNFA, CCL2 e CXCL1 determinada nos kits adquiridos (R&D Systems) e empregados no ensaio imunoenzimático..	44
Tabela 3	Diluição de amostras de soro e pulmão de camundongos utilizada para detecção dos mediadores inflamatórios de interesse nos experimentos de ELISA.....	46
Tabela 4	Dados e parâmetros ventilatórios dos camundongos transgênicos e respectivos controles do tipo selvagem durante VM até Ers=150%.....	49
Tabela 5	Dados e parâmetros ventilatórios dos camundongos nocautes e respectivos controles do tipo selvagem durante VM até Ers=150%.....	50
Tabela 6	Análise histomorfométrica no pulmão de camundongos submetidos à VM em alto volume corrente até aumento de 50% na elastância pulmonar.....	53
Tabela 7	Avaliação por ELISA da expressão de mediadores inflamatórios em resposta à VM no pulmão de camundongos nocautes e transgênicos para <i>Ptx3</i>	63
Tabela 8	Dados coletados durante a VM por tempos fixos em alto volume corrente de camundongos transgênicos e do tipo selvagem.....	65
Tabela 9	Celularidade e parâmetros morfológicos do pulmão após ventilação mecânica em alto volume corrente por tempos fixos.....	67
Tabela 10	Dados e parâmetros ventilatórios coletados durante 90 minutos de Ventilação Mecânica em baixo volume corrente de camundongos transgênicos e respectivo controle do tipo selvagem.....	75

Tabela 11	Dados e parâmetros ventilatórios coletados durante 90 minutos de ventilação mecânica em baixo volume corrente de camundongos nocautes e respectivo controle do tipo selvagem.....	76
Tabela 12	Expressão protéica pulmonar de mediadores inflamatórios em resposta à VM em baixo volume corrente.....	81
Tabela 13	Dados e parâmetros respiratórios coletados durante ventilação mecânica até 50% de aumento na elastância pulmonar de camundongos transgênicos para <i>Ptx3</i> tratados com pentoxifilina (50 mg/kg) ou Salina.....	83
Tabela 14	Dosagem protéica de IL1B e TNFA em camundongos transgênicos para <i>Ptx3</i> após VM em alto volume corrente e tratamento com 50 mg/kg de pentoxifilina.....	85
Tabela 15	Dados coletados durante a VM em alto volume corrente de animais transgênicos tratados com 100 mg/kg de pentoxifilina.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1	Fator de transcrição abreviado do inglês “activator protein 1”
Asn	Aminoácido asparagina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico, abreviado do inglês “cyclic adenosine monophosphate”
CCL2	Quimiocina abreviada do inglês “chemokine (C-C motif) ligand 2”
CD1	Linhagem de camundongo sem alterações genéticas
cDNA	DNA complementar
CLP	Ligação e perfuração do ceco
Ct	Abreviação em inglês de “cycle threshold”
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal da estrutura primária de uma proteína
CXCL1	Quimiocina abreviada do inglês “chemokine (C-X-C motif) ligand 1”
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
Eest	Elastância Pulmonar Estática
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FGF-2	Abreviação em inglês de “fibroblast growth factor-2”
FR	Frequência respiratória
IHQ	Imunoistoquímica
IL	Interleucina
JNK	Abreviação em inglês de “c-Jun NH2-terminal kinase”
KC	Abreviação em inglês de “Keratinocyte-derived chemokine”
LBA	Lavado broncoalveolar
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPIV	Lesão pulmonar induzida pelo ventilador
LPS	Lipopolissacáride
MAPK	Abreviação em inglês de “mitogen-activated protein kinase”
MCP1	Abreviação em inglês de “monocyte chemoattractant protein-1”
MPO	Mieloperoxidase
NF-IL6	Fator de transcrição abreviado do inglês “nuclear factor-IL6”
NF-κB	Factor nuclear kappa B

NO	Óxido nítrico abreviado do inglês “Nitric Oxide”
Nod	Abreviação em inglês de “nucleotide-binding oligomerization domain”
N-terminal	Extremidade "amino terminal" da estrutura primária de uma proteína
N₂	Nitrogênio
PBS	Abreviação em inglês de “phosphate buffered saline”
PCR	Proteína C-reativa
PDE IV	Abreviação em inglês de “phosphodiesterase IV”
PEEP	Pressão expiratória positiva final, abreviação em inglês de “positive end expiratory pressure”
Ppico	Pressão de pico inspiratória
Pplatô	Pressão de platô estática
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PTOX	Pentoxifilina
PTX3	Pentraxina 3
<i>Ptx3</i>^{-/-}	Animais deletados para o gene <i>Ptx3</i> de “background” misto de C57BL/6 e 129/SvEv
<i>Ptx3</i>^{+/+}	Camundongo sem alterações genéticas de “background” misto de C57BL/6 e 129/SvEv
q.s.p	Quantidade suficiente para (volume)
Reação de PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
RNA_m	RNA mensageiro
RPM	Rotações por minuto
SAP	Proteína soro - amilóide
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
SP-1	Fator de transcrição abreviado do inglês “trans-acting transcription factor 1”
TF	Abreviação em inglês de “Tissue factor”
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1	Camundongo transgênico que carrega duas cópias extras do transgene <i>Ptx3</i> de background CD1
TMA	Abreviação em inglês de “tissue microarray”
TNFA	Fator de necrose tumoral alfa

Toll-R	Receptor tipo Toll
Two-way anova	Análise de variância com dois fatores
VM	Ventilação mecânica
V_T	Volume corrente, abreviado do inglês “tidal volume”
Wt	Abreviação em inglês de “wild-type”
x g	Unidade de força centrífuga relativa à força gravitacional da Terra

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Ventilação Mecânica.....	1
1.2	Lesão Pulmonar Induzida pelo Ventilador.....	2
1.3	Sistema Imune Inato.....	5
1.4	Pentraxinas.....	6
1.5	Pentraxina 3.....	6
1.6	Pentraxina 3 e o Pulmão.....	9
1.7	Pentoxifilina.....	12
2	JUSTIFICATIVA E RELEVANCIA.....	16
3	OBJETIVOS.....	17
3.1	Objetivo Geral.....	17
3.2	Objetivos Específicos.....	17
4	RESUMO DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	19
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1	Camundongos.....	21
5.2	Ventilação Mecânica.....	22
5.2.1	Análise da Elastância Estática do Sistema Respiratório.....	23
5.2.2	Tratamento com Pentoxifilina.....	25
5.3	Coleta das Amostras.....	25
5.3.1	Coleta do Sangue.....	25
5.3.2	Coleta dos Pulmões.....	26
5.3.3	Lavado Broncoalveolar.....	26
5.4	Animais Controle.....	27
5.5	Avaliação da Lesão Tecidual.....	28
5.5.1	Análise Histomorfométrica.....	28
5.5.2	Avaliação da Permeabilidade Vascular.....	29
5.5.3	Avaliação do Infiltrado Neutrófilico no Pulmão.....	30

5.6	Avaliação da Expressão Gênica no Pulmão.....	33
5.6.1	Extração de RNA.....	33
5.6.2	Síntese de cDNA.....	34
5.6.3	Desenho de Iniciadores Específicos.....	35
5.6.4	Padronização das Reações de PCR em Tempo Real.....	36
5.6.5	Cálculo da Expressão Gênica Diferencial.....	38
5.7	Avaliação da Expressão Protéica.....	39
5.7.1	Imunohistoquímica.....	40
5.7.1.1	Confecção do <i>Tissue Microarray</i>	40
5.7.1.2	Protocolo de Imunoistoquímica.....	42
5.7.1.3	Análise das Reações de Imunoistoquímica.....	43
5.7.2	Ensaio Imunoenzimático.....	43
5.7.2.1	Extração de Proteínas do Pulmão.....	44
5.7.2.2	Protocolo de ELISA.....	45
5.8	Análises Estatísticas.....	46
6	RESULTADOS.....	48
6.1	Ventilação Mecânica em Alto Volume Corrente Até Aumento de 50% na Elastância Pulmonar em Camundongos Geneticamente Modificados para <i>Ptx3</i>	48
6.1.1	Caracterização da Lesão Pulmonar Induzida pela Ventilação Mecânica em Alto Volume Corrente.....	50
6.1.2	Impacto da Expressão de <i>Ptx3</i> no Tempo Necessário para Lesão Pulmonar Induzida pelo Ventilador.....	55
6.1.3	Mudanças no Perfil de Expressão Gênica Pulmonar Após Ventilação Mecânica em Alto Volume Corrente.....	56
6.1.4	Análise dos Níveis Protéicos de IL1B e TNFA em Camundongos Nocautes para <i>Ptx3</i> (<i>Ptx3^{-/-}</i>) e do Tipo Selvagem (<i>Ptx3^{+/+}</i>).....	59
6.1.5	Perfil de Expressão Protéica de Mediadores Inflamatórios no Pulmão em 150% de Elastância Pulmonar após Ventilação Mecânica em Alto Volume Corrente Avaliada por ELISA.....	61
6.1.6	Análise da LPIV em Alto Volume Corrente por Tempos Inferiores ao Necessário para Aumento de 50% na Elastância Pulmonar.....	64
6.1.6.1	Avaliação da Lesão Pulmonar em Tempos Precoces de VM em Alto Volume Corrente.....	66

6.1.7	Análise dos Níveis Protéicos de IL1B e TNFA em Camundongos Transgênicos para <i>Ptx3</i> e do Tipo Selvagem.....	70
6.2	Papel de <i>Ptx3</i> em Estratégia de Ventilação Mecânica Protetora ao Pulmão Utilizando Baixo Volume Corrente.....	73
6.2.1	Avaliação da Lesão Pulmonar Induzida pela Ventilação Mecânica em Baixo Volume Corrente.....	77
6.2.2	Perfil de Expressão Gênica após Ventilação Mecânica em Baixo Volume Corrente.....	79
6.2.3	Expressão Protéica de Mediadores Inflamatórios em Resposta à VM em Baixo Volume Corrente.....	81
6.3	Impacto do Tratamento com Pentoxifilina.....	81
7	DISCUSSÃO.....	90
8	CONCLUSÕES.....	104
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

ANEXO

- Anexo 1** Padronização das reações de imunoistoquímica para PTX3 em amostras murinas.
- Anexo 2** Padronização do ELISA para detecção de PTX3 em amostras de pulmão murinas.
- Anexo 3** Padronização de Western blot para detecção de PTX3 em amostras de pulmão murinas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 VENTILAÇÃO MECÂNICA

A ventilação mecânica (VM) é a principal abordagem terapêutica utilizada no tratamento da insuficiência respiratória aguda que consiste na manutenção artificial da ventilação e oxigenação até que os pacientes sejam capazes de reassumir essa função. Os pacientes que necessitam de VM apresentam um conjunto de sintomas chamado de Lesão Pulmonar Aguda (LPA) ou Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA), que podem ocorrer em consequência de doenças de diversas etiologias, incluindo lesões diretas ao pulmão como pneumonia, inalação tóxica e contusão pulmonar, ou por mecanismos indiretos, como a sepsis, pancreatite e múltiplas transfusões (KOBZIK 2000) entre outros.

A LPA/SARA é caracterizada principalmente por inflamação difusa na membrana alvéolo-capilar (WARE e MATTHAY 2000) e são definidas por: 1) hipoxemia, 2) infiltrado pulmonar bilateral em radiografia de tórax e 3) aumento da elastância pulmonar do sistema respiratório, sendo que a LPA é considerada a forma menos severa da SARA com menor grau de hipoxemia (CRIMI e SLUTSKY 2004). Estima-se que a incidência da LPA/SARA ao ano seja de 79 casos para cada 100 mil habitantes nos Estados Unidos, com uma elevada taxa de mortalidade de 38% (RUBENFELD et al. 2005).

Embora a VM seja uma ferramenta indispensável no tratamento de pacientes com LPA e SARA, hoje está bem estabelecido que essa terapia é capaz de exacerbar ou mesmo causar lesão pulmonar, chamada de Lesão Pulmonar Induzida pelo Ventilador (LPIV), sendo que o desfecho da LPA/SARA é diretamente afetada pela VM. A utilização de menores volumes correntes (V_T), mimetizando a ventilação espontânea normal, diminuiu significativamente a mortalidade de pacientes com SARA (AMATO et al. 1998). Na ausência de uma lesão pulmonar estabelecida, estratégias convencionais de VM empregando volume corrente de 10-12 ml/kg são freqüentemente usadas (CHECKLEY et al. 2008), enquanto que na SARA recomenda-se o uso de 6 ml/kg (AMATO et al. 2007). A dificuldade de se estabelecer uma estratégia de VM que não seja lesiva ao pulmão deve-se ao fato de que as lesões pulmonares na LPA/SARA não são homogêneas. Isso significa que entregar um volume corrente “normal” (baseado no peso do paciente) pode atingir somente regiões mais saudáveis, resultando numa hiperinsulflação regional, promovendo assim a LPIV (MACINTYRE 2005; SLUTSKY 2005).

1.2 LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELO VENTILADOR

Os mecanismos pelos quais a VM pode causar LPIV são: 1) Volutrauma: altos volumes gerados pelo ventilador causam hiperdistensão dos alvéolos podendo induzir a injúria; 2) Atelectrauma: ventilação em baixo volume corrente pode levar a repetido colapamento e reabertura das

unidades pulmonares, causando ruptura da monocamada de surfactante afetando a permeabilidade alvéolo-capilar; 3) Biotrauma: injúria bioquímica provocada por mediadores inflamatórios que são liberados na perda da integridade celular (MACINTYRE 2005; SLUTSKY 2005).

Outro mecanismo importante na LPIV é a mecanotransdução. Mesmo na ausência de ruptura celular/tecidual, as alterações mecânicas são percebidas pelo citoesqueleto, pelos receptores transmembrana como as integrinas ou ainda por canais de íons, que disparam uma cascata de sinalização levando a vários processos intracelulares. Quando submetidas ao estresse mecânico, a transcrição de genes em resposta a mecanotransdução que iniciam nas células alveolares é sinalizada principalmente pela via de MAPK (“mitogen-activated protein kinase”), resultando na produção mediadores como TNFA, IL1B, IL6, IL8 e IL10 (HALBERTSMA et al. 2005).

As características morfológicas, fisiológicas e radiológicas da LPIV são indistinguíveis das lesões observadas na LPA/SARA (CRIMI e SLUTSKY 2004). Às agressões mecânicas sofridas pelos alvéolos resultantes do uso do ventilador (distensão exagerada, alteração dos surfactantes) seguem-se o desenvolvimento de uma resposta inflamatória local aguda e a liberação dos mediadores inflamatórios que predisõem os pacientes ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica que culmina, muitas vezes, na síndrome da falência múltipla de órgãos e morte (TREMBLAY et al. 1997).

Uma complexa rede de citocinas e outras substâncias inflamatórias têm importante papel como moléculas que iniciam, amplificam e mantêm a resposta inflamatória na LPIV/SARA. Estes agentes são produzidos não apenas pelas células inflamatórias, mas também por fibroblastos e células epiteliais alveolares e bronquiolares do pulmão (CRIMI e SLUTSKY 2004). Duas das mais importantes citocinas envolvidas na LPIV/SARA são TNFA e IL1B, produzidas pelos macrófagos e neutrófilos. Estas citocinas iniciam e amplificam a cascata inflamatória estimulando as células epiteliais, endoteliais e fibroblastos a produzirem outras citocinas e também recrutando neutrófilos, eosinófilos e outras células inflamatórias para o local da lesão. Outras citocinas como IL2, IL4, IL6 e IL8 também estão envolvidas na resposta inflamatória em LPIV/SARA aumentando a permeabilidade vascular e a quimiotaxia de neutrófilos (HEADLEY et al. 1997; VON BETHMANN et al. 1998; CARUSO et al. 2003; CRIMI e SLUTSKY 2004; YOSHIKAWA et al. 2004).

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio liberados pelas células inflamatórias também exacerbam as lesões pulmonares. Estes agentes podem reagir com vários constituintes celulares incluindo lipídeos, proteínas e DNA prejudicando as funções biológicas das células endoteliais e epiteliais por aumentarem a sua permeabilidade, e prejudicarem o transporte de íons sódio além de inibirem a produção de surfactante pelas células epiteliais alveolares do tipo II (CRIMI e SLUTSKY 2004).

Apesar da importante descoberta do papel da inflamação na patogênese da SARA, caracterizada por um desequilíbrio entre a atividade

pró e anti-inflamatória de mediadores inflamatórios e também por alterações no sistema de coagulação, nenhuma terapia tem se mostrado eficiente até hoje. Novos estudos visando entender as interconexões entre as diferentes vias envolvidas na resposta inflamatória se fazem necessários.

1.3 SISTEMA IMUNE INATO

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra patógenos e desempenha um papel chave na ativação e orientação da imunidade adaptativa, como também na manutenção e reparo tecidual (BOTTAZZI et al. 2009). O sistema imune inato é composto por resposta celular e humoral, cujo reconhecimento de patógenos e tecidos danificados é mediado pelos Receptores de Reconhecimento de Padrões (pattern recognition receptors – PRRs). Dentre os PRRs celulares encontram-se, por exemplo, os receptores tipo Toll (“toll-like receptor”) e Nod (“nucleotide-binding oligomerization domain”), localizados em diferentes compartimentos celulares. Já os PRRs humorais pertencem a diferentes famílias moleculares incluindo as colectinas (ex. lectina ligadora de manose, C1q), ficolinas e as pentraxinas, e são encontrados no soro (GARLANDA et al. 2005).

Os mecanismos de ação dos PRRs humorais incluem ativação e regulação da cascata do complemento, aglutinação e neutralização, e opsonização (ABBAS et al. 2003a), fazendo desta forma com que o sistema humoral juntamente com o sistema celular inato regulem as respostas imunes inatas (BOTTAZZI et al. 2009).

1.4 PENTRAXINAS

As pentraxinas constituem uma superfamília de proteínas evolucionariamente conservadas (BOTTAZZI et al. 2009) que recebem esse nome devido a sua organização estrutural distinta composta por cinco subunidades globulares idênticas arranjadas em simetria pentamérica (GOODMAN et al. 1996), composta por 200 aminoácidos na região carboxi-terminal.

As pentraxinas são divididas em duas subfamílias baseado no tamanho: as pentraxinas curtas (25 kDa) e as longas (40-50 kDa) (GOODMAN et al. 1996). A proteína C-reativa (PCR) e a proteína soro - amilóide (SAP) fazem parte da classe das pentraxinas curtas, enquanto que a Pentraxina 3 (PTX3) foi o primeiro membro descoberto da pentraxinas longas (GARLANDA et al. 2005).

1.5 PENTRAXINA 3

O gene PTX3 foi identificado no início dos anos 90 independentemente por LEE et al. (1993) através da hibridização subtrativa de uma biblioteca de cDNA construída a partir de fibroblastos humanos induzidos por TNFA e, posteriormente, por BREVIARIO et al. (1992) em células endoteliais humanas derivadas de cordão umbilical tratadas com IL1B.

O gene *PTX3* humano e murino estão localizados em uma região sintênica no cromossomo 3 (q24-28) e as proteínas codificadas por eles são altamente conservadas: ambas têm 381 aminoácidos sendo 82% idênticos e 92% conservados (GARLANDA et al. 2005). As regiões promotoras dos genes humano e murino de *Ptx3* contém sítios de ligação para AP-1, NF- κ B, Sp1 e NF-IL6 (HE et al. 2007).

Apesar da porção carboxi-terminal da proteína apresentar similaridade com as pentraxinas curtas CRP e SAP, PTX3 foi considerada uma pentraxina longa devido a sua região amino-terminal inédita. A proteína é formada por duas estruturas complexas ligadas covalentemente formando tetrâmeros (BOTTAZZI et al. 2009). Além disso, PTX3 possui um sítio de glicosilação no aminoácido Asn220 na região C-terminal cuja heterogeneidade depende do tipo celular e do estímulo inflamatório que induziu sua expressão (INFORZATO et al. 2006).

PTX3 também difere das pentraxinas curtas por não ser produzido no fígado, nem ter sua produção estimulada por IL6. Uma similaridade funcional entre PTX3 e CRP / SAP é a capacidade de ativar a via clássica da cascata do complemento através da ligação ao componente C1q desta via (BOTTAZZI et al. 1997; NAUTA et al. 2003).

PTX3 é rapidamente produzida por uma grande variedade de tipos celulares como fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais, células da musculatura lisa, adipócitos, fagócitos mononucleares e células dendríticas (GARLANDA et al. 2005; HE et al. 2007). Dentre os estímulos capazes de desencadear a síntese de PTX3 estão sinais inflamatórios primários tais

como IL1B, TNFA, microrganismos e agonistas dos receptores do tipo Toll (GARLANDA et al. 2005).

Os animais transgênicos gerados pelo nosso grupo, que produzem quantidades aumentadas de PTX3 por conterem cópias extras do gene, apresentam uma resistência elevada ao choque endotóxico induzido pela administração de LPS, bem como à infecção experimentalmente induzida pelo procedimento de ligadura e perfuração do ceco (CLP) (DIAS et al. 2001). Nestes animais foram detectados níveis séricos aumentados de citocinas como TNFA e IL1B. Os macrófagos provenientes destes animais possuem capacidade fagocítica aumentada em comparação com os macrófagos do tipo selvagem, além de serem capazes de produzir quantidades mais elevadas de óxido nítrico (NO) quando estimulados (DIAS et al. 2001; DINIZ et al. 2004). Por outro lado, estes mesmos animais são mais vulneráveis à morte em decorrência da isquemia e reperfusão intestinal (SOUZA et al 2002; SOUZA et al 2009). Nesta situação, altos níveis séricos de TNFA foram associados a uma letalidade aumentada. Outros mediadores inflamatórios também foram encontrados mais elevados nos animais em comparação com os camundongos do tipo selvagem, tanto no intestino (IL1B, CXCL1/KC e CCL2/MCP1) quanto no pulmão (CXCL1), quanto no soro (TNFA) (SOUZA et al 2002).

PTX3 está envolvida também em atividades não relacionadas a microrganismos. PTX3 se associa à matriz extracelular que se forma ao redor do oócito antes da ovulação e sua ausência está associada com a infertilidade em camundongos nocautes devido à instabilidade desta matriz

(BOTTAZZI et al. 2009). Além disso, PTX3 interage com outras moléculas ativas causando o seu bloqueio funcional, como é o caso de FGF-2 (fibroblast growth factor-2), onde a atividade angiogênica de FGF-2 é inibida por PTX3 em células endoteliais (CAMOZZI et al. 2006).

1.6 PENTRAXINA 3 E O PULMÃO

Pelo fato de PTX3 ser um receptor solúvel de Reconhecimento de Padrões, já foi demonstrado que essa proteína possui importante papel contra infecções pulmonares bacterianas, fúngicas e virais (HE et al. 2007). Um grupo de pesquisadores mostrou que os animais nocautes para *Ptx3* são mais susceptíveis à aspergilose pulmonar e que os macrófagos derivados destes animais possuem reconhecimento defectivo da conídias do fungo e, conseqüentemente, a capacidade fagocítica prejudicada (GARLANDA et al. 2002).

Um efeito ambíguo de PTX3 foi descrito pelo nosso grupo na infecção bacteriana por *Klebsiella pneumoniae*. A maior expressão de *Ptx3* nos camundongos transgênicos expostos a um pequeno inóculo pulmonar de *K. pneumoniae* conferiu um papel protetor, resultando em maior sobrevivência destes animais. Em contrapartida, quando os mesmos foram desafiados com grandes quantidades da bactéria, uma maior taxa de mortalidade foi observada. Maiores níveis de nitrato no soro, diminuição da migração de neutrófilos para o tecido pulmonar e maior disseminação da infecção para o

sangue foram observados (SOARES et al. 2006). Esses dados sugerem um duplo papel de PTX3 dependendo da quantidade expressa.

Elevados níveis séricos de PTX3 têm sido encontrados em infecções pulmonares em humanos. PTX3 está aumentada em crianças imunocomprometidas com leucemia afetadas por infecções fúngicas pulmonares, nas quais a terapia antifúngica levou a normalização de seus valores (BIAGI et al. 2008). Elevados níveis de PTX3 no plasma também estão presentes em pacientes com tuberculose pulmonar ativa (AZZURRI et al. 2005), e polimorfismos em *PTX3* têm sido associados com maior susceptibilidade à infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (OLESEN et al. 2007).

Em células epiteliais alveolares humanas submetidas ao alongamento mecânico, simulando o que acontece durante a LPIV, uma análise genômica revelou a regulação positiva de vários genes incluindo *PTX3* (DOS SANTOS et al. 2004). Outros pesquisadores mostraram que a expressão de PTX3 nessas condições está associada com a apoptose das células epiteliais alveolares *in vitro* (WU et al. 2009). Quando estimuladas por TNFA, as células epiteliais alveolares humanas induzem a expressão gênica e protéica de PTX3 através da via de sinalização JNK (“c-Jun NH2-terminal kinase”) (HAN et al. 2005).

Recentemente, em modelo experimental com ratos, foi observada uma elevada expressão gênica e protéica de PTX3 em pulmões previamente lesados e submetidos à ventilação mecânica, onde os níveis protéicos de PTX3 foram diretamente relacionados com as propriedades mecânicas do

pulmão (elastância) e inversamente relacionados aos parâmetros de oxigenação (OKUTANI et al. 2007). Na SARA, níveis séricos elevados de PTX3 foram recentemente encontrados em pacientes sob ventilação mecânica e foram correlacionados com a mortalidade e severidade da injúria pulmonar (MAURI et al. 2008). A dosagem e monitoramento de PTX3 no sangue têm sido propostos como um novo marcador para diagnóstico precoce e prognóstico de algumas doenças, como a sepse (MULLER et al. 2001) e o infarto agudo do miocárdio (LATINI et al. 2004).

Em cachorros submetidos à ventilação mecânica foi observado que a expressão gênica de *PTX3* seria maior em regiões dependentes da gravidade quando comparadas a regiões não-dependentes em um mesmo pulmão. Apesar de observado uma razão de expressão baixa ($fold=1,7$), os dados de *microarray* sugerem que a indução de *PTX3* deva estar mais relacionada ao stress de abertura e colapamento do que com a hiperdistensão (SIMON et al. 2006; HE et al. 2007).

Os estudos com PTX3 deixaram claro o papel relevante desta proteína na resposta imune inata a certos tipos de patógenos, além de ser um modulador que representa um mecanismo de amplificação da resposta inflamatória, agindo localmente nos sítios da infecção e da inflamação.

1.7 MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA: PAPEL DA PENTOXIFILINA

Pelo fato de TNFA e IL1B estarem diretamente envolvidos na patofisiologia da LPIV, e por ambos serem capazes de induzir a expressão de PTX3, avaliar agentes farmacológicos que possam atenuar a cascata inflamatória pulmonar induzida pela ventilação mecânica parece ser de suma importância.

A pentoxifilina (PTOX) é um derivado da metilxantina e inibidor não específico das fosfodiesterases, clinicamente usada no tratamento de doenças vasculares oclusivas para melhorar os sintomas da dor, pois aumenta a flexibilidade das hemáceas e melhora o fluxo sanguíneo capilar (BERMEJO MARTIN et al. 2003). Pelo fato da PTOX inibir a fosfodiesterase IV (PDE IV, do inglês “phosphodiesterase IV”), propriedades adicionais já foram observadas para essa droga, uma vez que PDE4 é abundante em quase todas as células inflamatórias do sistema imune e é a principal reguladora do metabolismo de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). Os efeitos anti-inflamatórios da PTOX estão relacionados à diminuição de citocinas como TNFA e a regulação negativa da ativação de NFkappaB (BERMEJO MARTIN et al. 2003; JI et al. 2004). A PTOX também é conhecida pelo seu efeito inibidor sobre a transcrição do RNA mensageiro de TNFA inclusive em macrófagos alveolares humanos (MARQUES et al. 1999).

A principal droga de uso em humanos é o TRENAL (Aventis) cuja recomendação de administração é de 100 mg/kg/h via infusão, com dosagem máxima diária de 1200 mg. A pentoxifilina é rapidamente metabolizada, com meia-vida no plasma de 24 a 48 minutos (SANOFI-AVENTIS 2007), e apresenta baixa toxicidade e efeitos colaterais mínimos associados ao seu uso crônico (dor de cabeça, náusea e desconforto estomacal). Todas essas características somadas ao baixo custo fazem da PTOX uma droga atrativa como opção terapêutica. Adicionalmente às indicações clássicas, a PTOX tem sido estudada no tratamento de várias outras doenças como a malária, choque séptico, asma, entre outras (BERMEJO MARTIN et al. 2003).

Diversos estudos mostraram o efeito da PTOX na diminuição da produção de mediadores inflamatórios. WU et al. (1999) investigaram a cinética de TNFA no soro de ratos Wistar tratados com pentoxifilina (3 mg/kg intravenoso) 30 minutos antes de serem submetidos ao choque séptico induzido pela injeção intravenosa com 10 mg/kg de lipopolissacáride (LPS). O tratamento diminuiu significativamente os níveis de TNFA no soro após 1, 2, 3 e 4 horas. JI et al. (2004) estudaram o efeito de diferentes doses de pentoxifilina (6.25, 12.5, 25, 50, ou 100 mg/kg intravenoso) administrado 1 min após injeção de LPS (5 mg/kg intraperitoneal) na expressão gênica e protéica 4 horas depois no intestino de ratos Wistar. Viram que todas as doses de Pentoxifilina reduziram a produção de *Tnfa*, mas esse efeito foi melhor atingido com 50 mg/kg, tanto na expressão gênica, quanto protéica (JI et al. 2004). Em camundongos CD1, o tratamento com dose única de

pentoxifilina (50 mg/kg intravenoso) 60 minutos antes da administração com LPS (50 mg/kg intraperitoneal, dose letal) ou Ligação e Perfuração do Ceco, reduziu significativamente os níveis séricos de TNFA 90 min após LPS e 120 min após CLP (VILLA et al. 1995).

Em modelos de lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica, OLIVEIRA-JUNIOR et al. (2003) aplicaram 50 mg/kg, intravenosamente, de PTOX (Trental) ou salina seguidos por infusão contínua de 50 mg/kg em ratos Wistar ventilados com 42 ml/kg de volume corrente por 180 minutos. A concentração de TNFA e IL1B no plasma e lavado broncoalveolar diminuíram significativamente, mostrando os benefícios do uso da droga. Já LESSA et al. (2008) avaliaram a eficácia da PTOX (100 mg/kg por 30 min, seguida por 50 mg/kg/h intravenoso) na atenuação da inflamação pulmonar induzida pela VM em ratos Sprague-Dawley quando ventilados com volume corrente de 20 ml/kg por 4 horas. Os resultados mostraram não apenas diminuição das concentrações de TNFA e Tromboxano B2 no lavado broncoalveolar, mas também diminuição do edema e da atividade de mieloperoxidase no pulmão.

Em humanos, a eficácia da PTOX em reduzir os níveis séricos de TNFA também foi avaliada em trinta pacientes com câncer metastático que apresentavam SARA. O tratamento com 100 mg intravenoso (2 vezes ao dia) mais administração oral de 400 mg (3 vezes ao dia) durante 7 dias, aumentou a sobrevida e proporcionou uma melhora clínica durante o período estudado (ARDIZZOIA et al. 1993). Em uma meta-análise, ADHIKARI et al. (2004) revisaram ensaios clínicos randomizados sobre diversos tratamentos

farmacológicos em pacientes com LPA/SARA e concluíram que a farmacoterapia para SARA é extremamente limitada, mas dois pequenos estudos com uso de corticóides ou pentoxifilina pareceram ter um benefício em potencial no tratamento dessas síndromes (ADHIKARI et al. 2004).

2 JUSTIFICATIVA E RELEVANCIA

Até hoje, somente estratégias protetoras que diminuam o trauma mecânico causado pelo ventilador foram efetivas na melhora da sobrevivência de pacientes com SARA (AMATO et al. 1998). O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na LPIV pode apontar para diferentes perspectivas nesse cenário. Apesar de PTX3 ser expresso em resposta à ventilação mecânica (OKUTANI et al. 2007) e ser produzido por células epiteliais e bronquiolares (DOS SANTOS et al. 2004; HE et al. 2007), pouco se sabe a respeito de sua função na LPIV. Neste estudo, buscamos investigar o papel de PTX3 na patogênese da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel de PTX3 na lesão tecidual desencadeada pelo procedimento de ventilação mecânica.

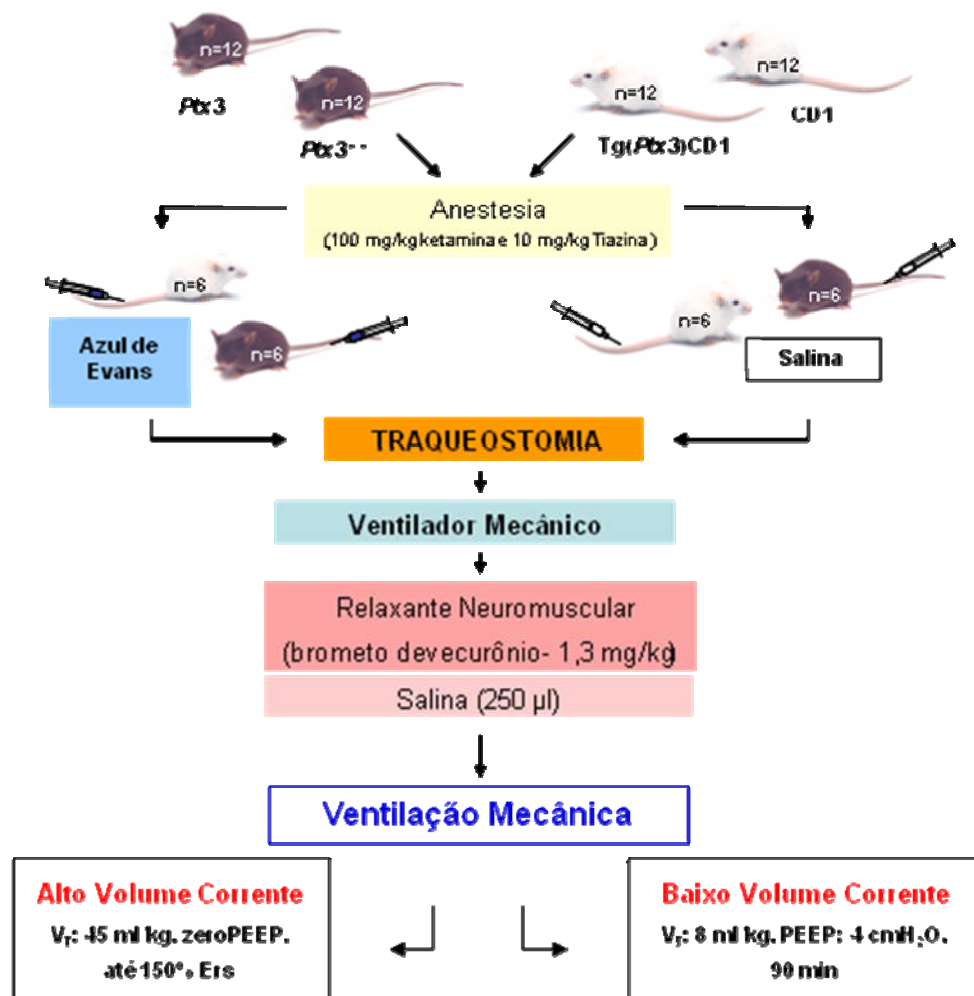
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o impacto da expressão aumentada ou ausência de *Ptx3* no tempo necessário para ocorrência de lesão pulmonar (aumento de 50% na Elastância do Sistema Respiratório) em camundongos transgênicos, nocautes e respectivos controles do tipo selvagem submetidos à ventilação mecânica em alto volume corrente (V_T 45 ml/kg), comparando o dano tecidual e os níveis de expressão gênica e protéica de mediadores inflamatórios;
2. Comparar o dano tecidual e o perfil de expressão gênica em animais transgênicos para *Ptx3* e respectivo controle do tipo selvagem após o procedimento de ventilação mecânica em alto volume corrente (V_T 45 ml/kg, zeroPEEP) por 20, 40 e 60 min;
3. Submeter camundongos transgênicos, nocautes e respectivos controles do tipo selvagem à ventilação mecânica em baixo volume corrente (V_T 8 ml/kg) por 90 minutos e avaliar a injúria pulmonar e o

padrão de expressão gênica e protéica de mediadores inflamatórios nos pulmões;

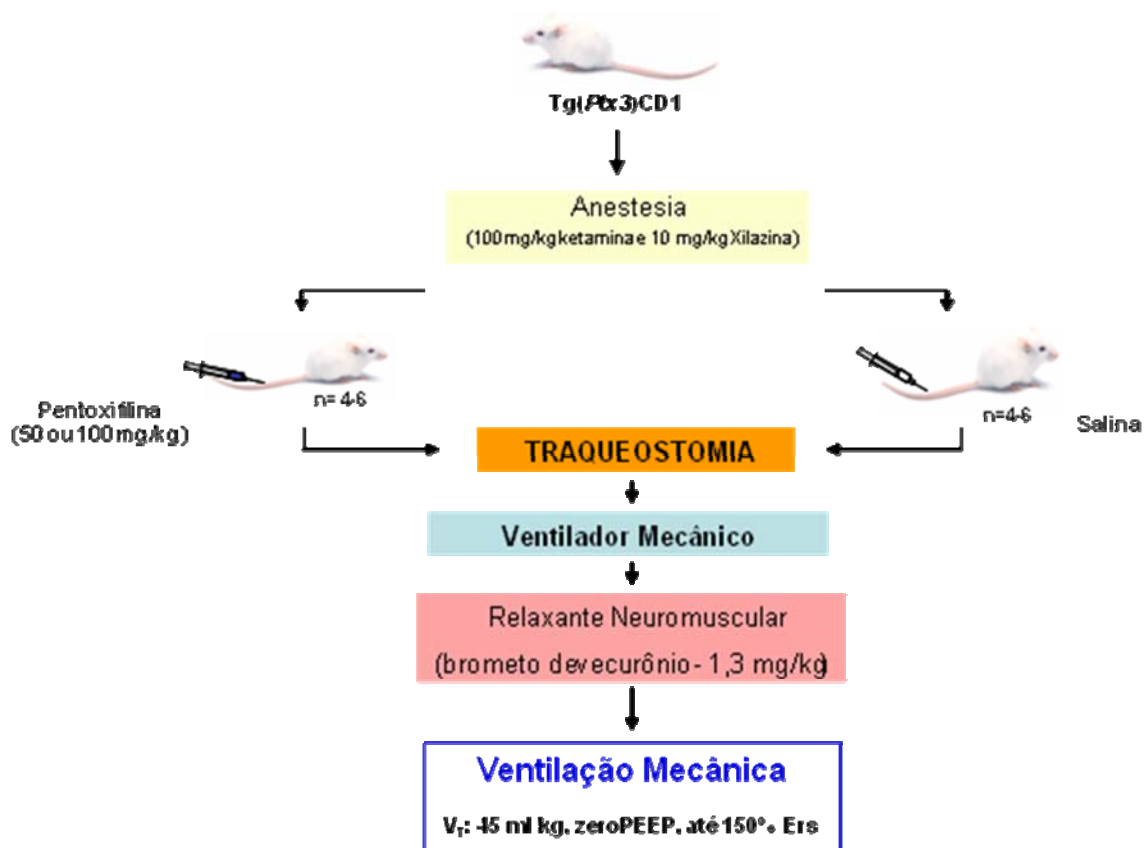
4. Submeter camundongos transgênicos à ventilação mecânica em alto volume corrente (V_T 45 ml/kg) até aumento de 50% na Elastância Pulmonar, tratando-os previamente com 50 ou 100 mg/kg de pentoxifilina ou salina, e avaliar o tempo para desenvolvimento de lesão pulmonar e o padrão de expressão protéica de mediadores inflamatórios no soro, lavado broncoalveolar e pulmões.

4 RESUMO DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



Legenda: Camundongos transgênicos (*Tg(Ptx3)CD1*) e nocautes (*Ptx3^{-/-}*) para *Ptx3* e suas respectivas linhagens controles (*CD1* e *Ptx3^{+/+}*) (n= 12 animais por grupo) foram submetidos à ventilação mecânica em alto volume corrente (V_T) até aumento de 50% na elastância pulmonar ou baixo V_T (8 ml/kg) por 90 minutos. Dentro de cada grupo, seis camundongos foram injetados com o corante Azul de Evans, os quais tiveram o pulmão esquerdo armazenado para avaliação da atividade de mieloperoxidase e análise de expressão protéica, e o pulmão direito reservado para medida do extravasamento do corante. Dos animais que não receberam o corante, o pulmão esquerdo foi reservado para estudos de expressão gênica e o pulmão direito destinado a análise histomorfométrica. Alternativamente, camundongos transgênicos também foram ventilados em alto V_T por 20, 40 ou 60 minutos.

Figura 1 - Desenho experimental para avaliação de *Ptx3* em ventilação mecânica protetora e agressiva.



Legenda: Camundongos transgênicos (Tg(*Ptx3*)CD1) foram tratados com salina ou com inibidor farmacológico da produção de IL1B e TNFA (pentoxifilina). Os animais (n=4-6/grupo) foram tratados previamente à ventilação mecânica com alto volume corrente (45 ml/kg) até aumento de 50% na elastância pulmonar. Ao final do experimento, a traquéia e o brônquio esquerdo foram ocluídos para coleta do lavado broncoalveolar do pulmão direito, que foi congelado em nitrogênio líquido para posterior análise de expressão protéica. O pulmão esquerdo, ainda insuflado, foi colocado em 4 ml de RNA later (AMBION) por 24 a 72 horas e posteriormente dividido em duas partes (superior e inferior). A parte inferior do pulmão esquerdo foi congelada em N₂ e a parte superior foi colocada em formalina e emblocada para estudos futuros.

Figura 2 - Desenho experimental para estudo da modulação negativa de *Ptx3*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CAMUNDONGOS

Foram utilizados animais transgênicos para *Ptx3* (Tg(*Ptx3*)CD1) gerados e caracterizados por DIAS et al. (2001). Brevemente, estes animais foram gerados no “background” CD1 e carregam duas cópias extras do transgene sob controle do próprio promotor de *Ptx3*. Utilizamos nos ensaios animais em heterozigose e como controles animais da linhagem CD1 sem alterações genéticas.

Os animais deletados para *Ptx3* (*Ptx3*^{-/-}) foram gerados e caracterizados por VARANI et al. (2002) e nos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Martin Matzuk da Baylor College of Medicine (Houston, Texas). Em linhas gerais, os animais foram obtidos pela deleção por recombinação homóloga dos éxons 1 e 2 do gene *Ptx3*. Os camundongos *Ptx3*^{-/-} apresentam “background” genético misto de C57BL/6 e 129/SvEv e os animais também de “background” misto foram usados como controle (*Ptx3*^{+/+}).

Foram utilizados camundongos machos, com 6 a 10 semanas de idade, mantidos em micro-isoladores em sala limpa sob regime de 12 horas de luz, no biotério do Instituto Ludwig – São Paulo e recebendo água acidificada e ração autoclavadas *ad libitum*. Todos os procedimentos

experimentais envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Antônio Prudente (processo nº 007/006).

5.2 VENTILAÇÃO MECÂNICA

Os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 100 mg/kg ketamina e 10 mg/kg de xilazina e seis animais, aleatoriamente escolhidos, foram injetados por via intravenosa com 100µl do corante Azul de Evans (2%), enquanto que os outros seis animais receberam 100µl de solução Salina (NaCl 0,9%). Após a administração do anestésico os animais foram mantidos sobre manta aquecida a 42°C durante todos os demais procedimentos. A traqueostomia foi realizada com uma cânula de metal de 16 gauge, conectando o animal ao ventilador mecânico flexiVent (SCIREQ, Montreal, Quebec, Canada). Em seguida, 100µl do relaxante muscular Norcuron (brometo de vecurônio 1,3 mg/kg) foram aplicados intraperitonealmente e 0,25 ml de solução salina subcutâneamente, na região inguinal. Meia dose do anestésico foi reaplicada a cada 45 minutos enquanto que a solução salina foi readministrada uma única vez, 45 minutos após a primeira dose, para manutenção do balanço hemodinâmico (pressão arterial e volume sanguíneo) durante a anestesia geral. Os animais foram inicialmente ventilados com volume corrente de 10 ml/kg, pressão expiratória positiva final (PEEP) de zero (grupo alto V_T) ou 4 cmH₂O (grupo baixo V_T) e frequência respiratória (FR) de 150 ciclos por minuto. Após completa paralisia muscular, foram feitas duas manobras de recrutamento pulmonar,

com aplicação de 30 ml/kg de volume de ar (capacidade máxima pulmonar) para reabertura de possíveis áreas colapsadas. Os valores de Elastância Estática e Complacência Estática foram registrados e os parâmetros ventilatórios alterados para: $V_T= 8$ ml/kg, PEEP=4 cmH₂O, FR= 150 ciclos por minuto (grupo baixo V_T) ou $V_T= 45$ ml/kg, zeroPEEP, FR= 70 ciclos por minuto (grupo alto V_T). Um novo registro da elastância foi tomado (valores basais). Os registros foram tomados a cada 10 minutos até completar 90 minutos de VM (grupo baixo V_T) ou a cada 10 minutos até que o valor da Elastância Estática aumentasse 40% sob os valores basais, quando, então, as medidas passaram a ser registradas a cada 2 minutos até o aumento de 50% (grupo alto V_T). Ao atingir o tempo de VM (90min) ou elastância desejada (150%), a traquéia foi ocluída, o animal desconectado do ventilador mecânico, e o tórax aberto para punção cardíaca e remoção dos pulmões para análise.

Alternativamente, camundongos transgênicos e respectivo controle do tipo selvagem CD1 foram submetidos à ventilação mecânica seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente para o grupo alto volume corrente, porém foram ventilados por 20, 40 ou 60 minutos (n=6 animais/grupo/tempo).

5.2.1 Análise da Elastância Estática do Sistema Respiratório

A elastância (ou complacência) é uma propriedade do sistema respiratório que reflete a sua distensibilidade e é influenciada pelas propriedades elásticas do pulmão (fibras de elastina e colágeno do

parênquima pulmonar) e da parede torácica. É definida pela razão na mudança de pressão pela mudança no volume ($E = \Delta\text{Pressão} / \Delta\text{Volume}$), ou seja, o quanto de pressão é necessário aplicar para que o pulmão distenda um determinado volume (ALTOSE 1980). Durante nossos experimentos, a elastância foi calculada a partir de uma curva pressão-volume, onde o ventilador foi programado para entregar 7 passos de volume inspiratório de ~5,7 ml/kg não ultrapassando 40 ml/kg (equivalente a ~30 cmH₂O de pressão de pico inspiratória num pulmão de camundongo sadio) seguidos por 7 passos de volume expiratório. Com a válvula expiratória fechada, após cada volume de ~5,7 ml/kg aplicado, um sensor mede a pressão do sistema respiratório (pressão de pico inspiratória – Ppico), e é feita uma pausa de 1 segundo, onde a pressão é novamente registrada (pressão de platô estática - Pplatô). A pausa realizada entre cada passo é feita para que o volume de ar seja acomodado nos pulmões (devido à transferência de pequenos volumes de gás de alvéolos com altas pressões para alvéolos com baixas pressões e devido às desigualdades das unidades alveolares e relaxamento de tensão do tecido pulmonar) (LUCANGELO et al. 2005). A elastância estática, usada neste estudo, refere-se à variação de volume considerando a pressão de platô (Pplatô) e reflete portanto, a elasticidade do sistema respiratório, enquanto que a elastância dinâmica refere-se à pressão de pico inspiratória (Ppico) e representa as forças resistivas do sistema respiratório e também do tubo endotraqueal (LUCANGELO et al. 2005).

As medidas obtidas na curva pressão-volume foram usadas para obter o valor da elasticidade pulmonar, calculada através da equação de

Salazar-Knowles (SALAZAR e KNOWLES 1964) pelo flexiVent software (versão 4.02).

5.2.2 Tratamento com Pentoxifilina

Sabendo que a meia-vida média da PTOX em camundongos Swiss sadios injetados intraperitonealmente (ip) com 60 mg/kg é de 6 minutos (MILLER et al. 1998), e que as doses de 50 e 100 mg/kg de PTOX mostraram ser eficazes em reduzir os níveis séricos de TNFA e outros parâmetros inflamatórios em modelos de LPIV, testamos dois esquemas de tratamento: 1) 50 mg/kg + 50 mg/kg/h a cada 10 min ip durante uma hora; 2) 100 mg/kg + 100 mg/kg/h a cada 10 minutos ip.

Somado ao esquema de tratamento, animais transgênicos para *Ptx3* foram ventilados em alto volume corrente até aumento da elastância respiratória em 50%. Como controle foram utilizados os mesmos animais tratados com Salina (n=4-6 animais/grupo).

5.3 COLETA DAS AMOSTRAS

5.3.1 Coleta do sangue

Após atingir aumento de 50% da Elastância Estática Pulmonar ou o tempo de VM desejado, o tórax dos animais foi aberto e o sangue foi coletado por punção cardíaca. Após incubação à 37°C por 15 min para

permitir a coagulação, o sangue foi centrifugado a 425 X g por 10 min à 4°C e o soro armazenado a -70°C.

5.3.2 Coleta dos Pulmões

Os animais que receberam o corante Azul de Evans tiveram o pulmão lavado, via veia pulmonar ou via ventrículo direito, com 10 ml de PBS para remoção do corante intravascular e também do sangue presente no pulmão. O pulmão direito foi armazenado em N₂ e, em seguida, em freezer -80°C enquanto que o pulmão esquerdo foi reservado para quantificação do corante Azul de Evans (descrito detalhadamente no item 5.5.2). Entre os outros seis animais do grupo, que não receberam o corante, o pulmão esquerdo foi congelado em N₂ e armazenado a -80°C para extração de RNA e o direito colocado em formol tamponado (4% Formol em PBS) por 24 horas, e após fixação, emblocado em parafina. Lâminas coradas por hematoxilina e eosina foram confeccionadas e empregadas na análise histomorfométrica.

5.3.3 Lavado Broncoalveolar

Os animais tratados previamente com Pentoxifilina tiveram amostra do Lavado Broncoalveolar (LBA) coletada para dosagem protéica. Uma vez finalizada a coleta do sangue, o brônquio esquerdo foi ocluído e a traquéia, que estava previamente fechada ao final do procedimento da VM, foi novamente aberta para realizar o lavado broncoalveolar no pulmão direito com 15 ml/kg (aproximadamente 0,5ml) de PBS gelado. Após recuperação

do volume, foi realizada centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior análise (WILSON et al. 2003).

5.4 ANIMAIS CONTROLE

Inicialmente, para obtermos amostras sadias de camundongos transgênicos, nocautes e seus respectivos controles do tipo selvagem (n= 6 animais/grupo), que não foram submetidos ao procedimento de ventilação mecânica, animais foram anestesiados pela inalação de Halotano® (Zeneca) e, em seguida foi feita a punção cardíaca. O tórax foi aberto e os pulmões coletados. O pulmão direito foi armazenado em N₂ e freezer -80°C para extração de RNA, enquanto que o pulmão esquerdo foi colocado em formalina para a confecção de lâminas coradas por hematoxilina e eosina.

As amostras utilizadas como controle dos grupos submetidos à VM em estratégia protetora ao pulmão (baixo V_T), foram obtidas de camundongos transgênicos, nocautes e seus respectivos controles do tipo selvagem (n=12 animais/grupo) submetidos aos mesmos procedimentos anestésicos e cirúrgicos do que os animais tratados com pentoxifilina exceto a ventilação mecânica (grupo “sham”). Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma dose de 100 mg/kg ketamina e 10 mg/kg xilazina e, seis animais dentro de cada grupo aleatoriamente escolhidos, foram injetados por via intravenosa com 100µl do corante Azul de Evans (2%), enquanto que os outros seis animais receberam intravenosamente

100µl de solução de NaCl 0,9%. Foi realizada traqueostomia e uma cânula de metal de 16 gauge foi inserida. Após abertura do tórax, uma punção cardíaca foi realizada e o sangue foi processado conforme descrito anteriormente. Os animais que receberam Azul de Evans tiveram o pulmão esquerdo utilizado para medida do extravasamento do corante e o esquerdo armazenado a -80°C para estudos posteriores (análise de expressão protéica e dosagem de Mieloperoxidase). Os outros seis animais do grupo, que não receberam o corante, receberam 1,5 mL de RNA later (AMBION) pela cânula inserida na traquéia para insuflar os pulmões e foram colocados em 4 ml de RNA later (AMBION) por 24 a 72 horas a 4°C. Após esse período, o pulmão direito foi colocado em formalina para confecção das lâminas coradas por hematoxilina e eosina, e o pulmão esquerdo foi congelado em N₂ e armazenado a -80°C para posterior extração de RNA.

5.5 AVALIAÇÃO DA LESÃO TECIDUAL

5.5.1 Análise Histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada em microscópio óptico convencional acoplado a retículo de 100 pontos e 50 retas onde foram avaliados Hiperdistensão Alveolar, Colapso Alveolar, Edema intra-alveolar e Infiltrado Inflamatório pelo método de point counting (SANTOS et al. 2006). Os resultados são expressos como porcentagem de área com hiperdistensão, colapso ou edema (400X) enquanto que o infiltrado inflamatório é apresentado como número de células de núcleo redondo/área

(μm^2) de tecido pulmonar encontrado sob aumento de 1000X (número de células polimorfonucleares ou de núcleo redondo que incidiam dentro do retículo pelo número de pontos que incidiam sobre área de parênquima pulmonar). Os resultados de cada parâmetro representam a média de 10 campos aleatoriamente escolhidos em cada animal observados por um investigador às cegas.

5.5.2 Avaliação da Permeabilidade Vascular

O aumento da permeabilidade vascular, além de ter sido avaliado pela análise histomorfométrica, também foi estimado pela medida do extravasamento do Azul de Evans (SOUZA et al. 2002).

O corante (0,1ml de uma solução a 2%) foi administrado intravenosamente pela veia da cauda dos camundongos, previamente anestesiados, antes dos mesmos serem submetidos à ventilação mecânica. Ao finalizar a VM e a punção cardíaca, os pulmões foram lavados pela veia pulmonar ou ventrículo direito, com 10 ml de PBS para remoção do corante intravascular e também do sangue presente no pulmão. O pulmão esquerdo foi colocado em placa de petri, cortado em pedaços pequenos e colocado para secar em estufa seca a 37°C por 24 horas. Após o cálculo do peso seco do órgão, foi incubado à temperatura ambiente por 24h em 1ml de formamida. A quantidade de Azul de Evans no tecido foi obtida pela comparação da absorbância de uma alíquota da formamida onde o pulmão foi incubado com a de uma curva padrão para Azul de Evans feita sob o

comprimento de onda de 620nm. Os resultados apresentam a quantidade de Azul de Evans (em μg) por 100 mg de tecido.

5.5.3 Avaliação do Infiltrado Leucocitário no Pulmão

O acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar foi estimado pela quantificação da atividade da Mieloperoxidase, enzima que cataliza a formação de espécies reativas oxidantes como o óxido nítrico. Mais de 95% da MPO está presente nos grânulos dos neutrófilos, existindo os restantes 5% nos monócitos circulantes (BOS et al. 1987).

Para ser utilizada como referência nos experimentos, uma curva padrão teve de ser construída a partir de neutrófilos extraídos da cavidade peritoneal de camundongos. Resumidamente, 14 camundongos da linhagem CD1 foram injetados intraperitonealmente com 3 ml de Tioglicolato e após 5 horas foram sacrificados com aprofundamento da anestesia através da inalação de Halotano® (Zeneca). Duas lavagens peritoneais foram feitas utilizando 5 ml de PBS gelado ("Phosphate Buffered Saline": 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, pH 7.2) e centrifugadas à 1.300 rpm por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em 10 ml de PBS gelado seguido novamente pela mesma centrifugação. Esse processo de lavagem das células foi repetido 3 vezes e após a última lavagem, uma alíquota de cada amostra foi retirada para contagem global de leucócitos em câmara de Neubauer. O pellet foi então ressuspendido em 100 μl de Salina EDTA (*Buffer 1*: 0.1M NaCl, 0.02M NaPO₄, 0.015M NaEDTA, pH 4.7) e novamente uma alíquota foi reservada

para contagem diferencial de leucócitos através de um esfregaço corado por Leishman. Foram adicionados 15 ml de NaCl 0.2% gelado, e após a incubação por 30 segundos foram adicionados mais 15 ml de NaCl 1.6% com glucose 5% gelado. A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos após os quais o sobrenadante foi descartado e o sedimento homogeneizado em 1 ml no *Buffer 2* (pH 5.4: 0.05M NaPO₄, 0,5% brometo de hexadeciltrimetil amônio - HTAB). Em seguida as amostras foram submetidas a três ciclos de congelação / descongelação em nitrogênio líquido e centrifugadas a 10.000 g por 15 min à 4° C. O sobrenadante foi então coletado para dosagem da atividade MPO.

Com este protocolo conseguimos obter uma média de 101×10^4 leucócitos cuja população era composta por 84% de células polimorfonucleares em média. Após juntar alíquotas iguais de cada uma das 14 amostras, realizamos um ensaio enzimático da seguinte forma: numa placa de 96 poços (placa de ELISA), foram adicionados amostras puras e diluições de 1:2 em volume de 25 µl. Como branco foram utilizados 25 µl de 0.08M NaPO₄ (pH 5.4). Em seguida, 25 µl de solução TMB (3,3',3,3'-tetramethylbenzidine) foram adicionados e após incubação a 37° C por 5 min, 100 µl de H₂O₂ foram adicionados seguidos por nova incubação a 37° C por 5 min. A absorbância foi lida a 690 nm e utilizando uma regressão com a curva de 4 parâmetros (software SoftMax Pro versão 5.2), conseguimos uma curva padrão composta por 5 pontos com coeficiente de correlação igual a 1. Alíquotas foram congeladas a -80°C para utilização nos ensaios posteriores.

Uma vez construída uma curva padrão satisfatória, as amostras foram então processadas para obtenção da MPO conforme protocolo descrito por SOUZA et al. 2002. O pulmão direito dos animais submetidos à ventilação mecânica foi coletado como descrito no item 5.3.2 e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. O pedaço de pulmão analisado foi pesado e uma suspensão a 5% em Salina EDTA (*Buffer 1*: 0.1M NaCl, 0.02M NaPO₄, 0.015M NaEDTA, pH 4.7) foi realizada, considerando que 1 g de pulmão é igual a 1 ml. A suspensão foi homogeneizada com o auxílio do Polytron (Qiagen) até que uma suspensão homogênea fosse obtida, e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante, rico em hemoglobina, foi descartado e o sedimento dissolvido em 1,5 ml de Salina/EDTA gelada a 4° C. Foram adicionados 15 ml de NaCl 0.2% gelado (para lisar o restante das hemácias), e após a incubação por 30 segundos, foram adicionados mais 15 ml de NaCl 1.6% com glucose 5% gelado. A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi homogeneizado por 30 segundos no Polytron no buffer-2 a 5% (pH 5.4: 0.05M NaPO₄, 0,5% H-TAB), onde uma amostra de 1 ml foi transferida para tubo eppendorf e submetida a três ciclos de congelação / descongelação em nitrogênio líquido. Em seguida, foi centrifugada a 10.000 g por 15 min a 4° C e o sobrenadante coletado para dosagem da atividade MPO.

O ensaio enzimático foi ser realizado numa placa de 96 poços (placa de ELISA), onde foram adicionados os padrões e as amostras em volume de 25 µl. Como branco foram utilizados 25 µl de 0.08M NaPO₄ (pH 5.4). Em

seguida, 25 µl de solução TMB (3,3',3,3'-tetramethylbenzidine) foram adicionados seguidos por incubação a 37° C por 5 min, seguido pela adição de 100 µl de H₂O₂ e nova incubação por 5 min a 37° C. A absorbância foi lida a 690 nm. Os resultados são expressos como número total de neutrófilos em cada 100 mg de tecido pulmonar.

5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NO PULMÃO

5.6.1 Extração de RNA

Após o procedimento de ventilação mecânica, o pulmão foi retirado insuflado e colocado em 4 ml de RNA later (AMBION) por 24 a 72 horas a 4°C. O órgão foi então dividido em pulmão esquerdo e direito. O pulmão esquerdo foi congelado em N₂ e armazenado a -80°C para extração de RNA pelo método Trizol[®] seguindo as instruções do fabricante.

A quantificação do RNA extraído e a estimativa do grau de contaminação por proteínas e sal foram feitas por espectrofotometria nas absorbâncias de 260, 280 e 230 nm, respectivamente no Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). A qualidade do RNA obtido foi verificada através do fracionamento eletroforético de 1 µg de RNA de cada uma das amostras em gel de agarose 1%. Foram considerados RNAs de boa qualidade amostras que apresentavam as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28 e 18S, e nos quais a intensidade da banda 28S era maior ou igual à da banda 18S.

5.6.2 Síntese de cDNA

Alíquotas de 2 µg do RNA foram misturadas a 1µl de iniciadores de oligo dT (0,5µg/µl) e H₂O DEPC q.s.p. 5µl sendo incubados a 70°C por 10min e mantidos em seguida no gelo. 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-II™ RT reverse transcriptase (20 U/µl, Promega, USA). A reação foi incubada a 25°C por 5min, 42°C por 60min e 70°C por 15min. O cDNA obtido (20µl) foi utilizado como molde em reações de PCR a fim de verificar sua integridade. Para tanto, foi realizada uma PCR usando como template 1µl do cDNA, com iniciadores para GAPDH. As reações, em volume total de 25µl, foram feitas sob as seguintes condições: 2,5µl de PCR Buffer (10X); 0,75µl de MgCl₂ (50mM); 0,25µl de dNTP mix (25mM); 0,125µl da enzima Taq polimerase (GIBCO 5U/µl); 1µl de cada iniciador (10pmol/µl) (“Foward” TTGTGGAAGGGCTCATGACCA / “Reverse” CGTATTCATTGTCATACCAGG); 1µl de cDNA; H₂O tratada com DEPC q.s.p 25 µl. Os parâmetros utilizados para as reações de PCR foram: 95°C/5min -1 ciclo; 95°C/30s, 55°C/45s, 72°C/1 min – 35 ciclos; 72°C/10 min –1 ciclo.

O produto amplificado das reações foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio no qual verificamos amplificação e boa correlação na intensidade das bandas entre as amostras.

5.6.3 Desenho de Iniciadores Específicos

Os iniciadores específicos para cada gene selecionado foram desenhados com o auxílio do programa *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems). Os parâmetros considerados no software foram: amplificação de fragmentos com tamanho entre 50 e 150 pares de base (pb), iniciador com conteúdo CG entre 30 e 80% e temperatura de anelamento entre 58⁰C e 60⁰C, que não possuíssem capacidade de anelamento entre si ou de formar estrutura secundária estável. Além desses parâmetros, os iniciadores foram desenhados em éxons diferentes, evitando a possibilidade de amplificação simultânea de DNA genômico de mesmo tamanho do transcrito alvo. Foram escolhidos éxons localizados na extremidade 3' do gene para garantir maior representatividade de todos os transcritos. A seqüência dos iniciadores, o número de acesso e o número de pares de base amplificadas para cada par de iniciadores estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Seqüência dos iniciadores desenhados para avaliação da expressão gênica no pulmão por PCR em tempo real.

Gene	nº de acesso	Iniciadores		Amplicon (pb)	DNA (pb)
<i>Hprt1</i>	NM_013556	Fw	TGGATATGCCCTTGACTATAATGAGT	76	743
		Rv	GGCTTTTCCAGTTTCACTAATGACA		
<i>Ptx3</i>	NM_008987	Fw	GGACAACGAAATAGACAATGGACTT	109	567
		Rv	CGAGTTCTCCAGCATGATGAAC		
<i>Il1b</i>	NM_008361	Fw	TCCACCTCAATGGACAGAATATCA	67	1216
		Rv	GGTTCTCCTTGTACAAAGCTCATG		
<i>Tnfa</i>	NM_013693	Fw	CCACGCTCTTCTGTCTACTGAACTT	78	594
		Rv	CAGCTGCTCCTCCACTTGGT		
<i>Ccl2</i>	NM_011333	Fw	GCTGGAGCATCCACGTGTT	70	815
		Rv	GTGAATGAGTAGCAGCAGGTGAGT		
<i>Cxcl1</i>	NM_008176	Fw	TCCAAAAGATGCTAAAAGGTGTCC	90	809
		Rv	TGTCAGAAGCCAGCGTTCAC		
<i>Il6</i>	NM_031168	Fw	CAGAGATACAAAGAAATGATGGATGCT	83	3142
		Rv	CAGAAGACCAGAGGAAATTTTCAATA		
<i>Il10</i>	NM_010548	Fw	CCCTGGGTGAGAAGCTGAAG	86	1893
		Rv	CACTGCCTTGCTTATTTCACA		

5.6.4 Padronização das reações de PCR em tempo real

As reações foram realizadas em volume final de 20µl, utilizando 5µl de cDNA diluído 50 vezes a partir do volume final da síntese (~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 2min (etapa de ativação da enzima AmpErase[®], um controle do fabricante contra eventuais contaminações com produto amplificado), 95°C por 10min (etapa de ativação da enzima DNA polimerase TaqGold), 40 ciclos de 95°C por 15 seg (etapa de desnaturação) e 60°C por 1min (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 através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com prata.

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 logarítmica de amplificação. O ciclo da reação onde a fluorescência da amostra intercepta o *threshold* é chamado Ct (*cycle threshold*), 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 PCR em tempo real consistiu em determinar a concentração ideal de iniciadores nas reações e para isso, foram utilizadas diferentes concentrações de iniciadores (400nM, 200nM e 100nM) em concentração fixa de cDNA (10ng). Foi escolhida a menor concentração que obtivesse maior fluorescência, sem formação de dímeros e variação no Ct.

A segunda etapa de padronização das reações de PCR em tempo real 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 provenientes a partir de um pool de órgãos de camundongos. 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 $y=ax+b$) 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) (PFAFFL 2001). Foram considerados aceitos valores de eficiência entre 1,70 e 2,30. Dos 10 genes selecionados, 2 genes (*Ccl2* e *Tnfa*) apresentaram amplificação de DNA genômico, observado tanto na curva de dissociação como no gel de acrilamida corado por prata. Para estes genes novos iniciadores foram desenhados (Tabela 1).

5.6.5 Cálculo da Expressão Gênica Diferencial

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 fosse menor que 0,5. A média dos valores de Ct das duplicatas foi considerada para o cálculo da expressão diferencial. Como normalizador das quantidades de cDNA molde, foi amplificado de todas as amostras o transcrito do gene de expressão constitutiva *Hprt* (hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase).

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

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

5.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA

A presença de proteínas inflamatórias foi averiguada pelas técnicas de imunistoquímica e por ensaios imunoenzimáticos que foram padronizadas para utilização neste projeto.

A confecção de lâminas e as reações de imunistoquímica foram feitas com a colaboração do Departamento de Anatomia Patológica Investigativa do Hospital AC Camargo, especialmente dos técnicos Carlos Alberto do Nascimento, Severino da Silva e Suely Nonogaki. As análises de imunistoquímica e reações de ELISA para análise de expressão protéica de PTX3, IL1B e TNFA em amostras ventiladas até 150% elastância pulmonar foram realizadas juntamente com a colaboração da aluna de Iniciação Científica Marina Matias Baeta, matriculada de março/2008 a junho/2009 no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/CNPq (número processo CNPq 101315-2008-2), no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente - Área de Oncologia.

5.7.1 Imunohistoquímica

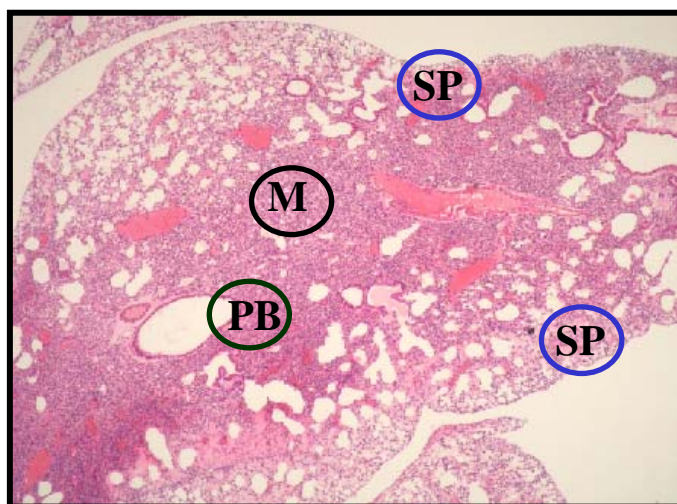
Inicialmente foi realizada uma padronização para encontrar a concentração ideal de anticorpo (Ac) a ser utilizada nas reações, sendo estabelecida a concentração de 15 µg/ml para o anticorpo “Mouse IL1B Polyclonal Ab” (R&D Systems #AF-401-NA) e 13 µg/ml para o “Mouse TNFA Polyclonal Ab” (R&D Systems #AF-410-NA). Reações de imunohistoquímica para detecção de PTX3 também foram feitas, sem sucesso, em amostras de pulmão murinos e estão descritas em detalhes no Anexo 1.

5.7.1.1 Confecção do *Tissue Microarray*

Para analisar as proteínas de interesse foi confeccionado um *tissue microarray* (TMA), uma metodologia que permite reunir mais de 300 amostras em um mesmo bloco, permitindo que a reação de imunohistoquímica seja realizada em uma única lâmina. As amostras empregadas na técnica dizem respeito aos grupos de camundongos transgênicos, nocautes e respectivos controles do tipo selvagem submetidos à VM até 150% de Elastância Pulmonar. Ainda entre os camundongos transgênicos e do tipo selvagem CD1, amostras coletas em tempos inferiores de ventilação mecânica (cinética: 20, 40 e 60 min) também foram adicionados para análise. Também foram considerados os quatro grupos de animais não submetidos ao procedimento de VM, totalizando 84 amostras (n= 6 / grupo).

Pelo fato da lesão pulmonar desenvolvida pelos animais em resposta à ventilação mecânica apresentar-se de forma bastante heterogênea,

escolhemos em cada amostra, quatro pontos provenientes de diferentes áreas de um mesmo lobo pulmonar a fim de obtermos maior representatividade da lesão. Para caracterizar a lesão foram selecionados: 1 ponto da região peribronquiolar, 1 ponto da região mediana e 2 pontos da região subpleural para as lesões pulmonares desenvolvidas em 150% Elastância Pulmonar ou em tempos fixos. Já para as amostras controle, foram selecionados 3 pontos (um de cada região). Cada amostra foi representada com 1 mm de diâmetro no bloco de TMA, totalizando 312 cores (amostras). A Figura 3 ilustra as regiões estudadas.



Legenda: Quatro pontos em diferentes regiões pulmonares foram diretamente selecionados nos blocos parafinados com tecido pulmonar de cada animal submetido ou não à ventilação mecânica até 150% de Elastância Pulmonar ou por tempos fixos de 20, 40 e 60 minutos. As áreas peribronquiolar (PB), mediana (M) e subpleural (SP) do maior lobo do pulmão direito foram destinadas à confecção do TMA a fim de obter maior representatividade da lesão.

Figura 3 - Foto micrografia esquemática representando os pontos selecionados para confecção do Tissue Microarray.

5.7.1.2 Protocolo de Imunoistoquímica

Cortes de 3 μm de espessura do material incluído em parafina foram aplicados em lâminas de vidro cobertas com silano SuperFrost Plus (#EP-SFPLUS) e deixadas por 24 horas em estufa 60°C para desparafinização. Em seguida, foram mergulhadas numa solução tampão citrato 10mM pH 6.0 a fim de não agredir o tecido e colaborar na retirada dos grupos formaldeídos ainda presentes no mesmo. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 3% para evitar que o sistema de revelação por polímeros (HRP) apresentasse reação de fundo com a peroxidase endógena nas etapas seguintes. Em seguida, foi feita uma lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 10 mM pH 7.4 por 5 minutos para que o tecido voltasse à sua qualidade fisiológica.

As lâminas foram incubadas com as diluições testadas dos anticorpos de interesse, em tampão PBS contendo BSA 1% (Sigma, #A9647, EUA) e azida sódica 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após essa fase, uma nova incubação foi realizada com o sistema de detecção SuperPicture (Invitrogen) por 30 min a 37°C. Neste sistema, o anticorpo secundário está ligado a um polímero que contém vários sítios para a peroxidase o que aumenta a sensibilidade e especificidade. Além disso, por se tratar de um sistema onde não há biotina ou estreptavidina, esperamos minimizar eventual “background” resultante à atividade de biotina endógena. A revelação foi feita incubando as lâminas em solução substrato de DAB 60mg (Sigma, d-5637, EUA), 1mL de DMSO, 1mL de H_2O_2 6% e 100mL de PBS, por 5 min a 37°C, ao abrigo da luz. Em seguida, as lâminas foram

contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 min, imersas em água amoniacal (NH_4OH 0,5%) e lavadas com água destilada. Por fim, as lâminas foram desidratadas e montadas em Entellan neu lamínulas (Merck, #1.07961, Alemanha), uma resina que visa proteger a lâmina contra eventuais atritos com a lamínula.

5.7.1.3 Análise das reações de imunoistoquímica

A análise das reações de imunoistoquímica nas lâminas de *tissue microarray* foi feita no equipamento ACIS III® (Dako), disponível no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, o qual escaneia as lâminas para produzir imagens digitais. As imagens foram analisadas no software ACIS III®, o qual transforma as intensidades de cor obtidas nas reações de imunoistoquímica em valores numéricos, diminuindo a subjetividade do observador. Para a identificação dos tipos celulares que estavam expressando a proteína analisada foram considerados, em cada uma das regiões estudadas (peribronquiolar, mediana e subpleural), o compartimento bronquioalveolar, compartimento alveolar e compartimento endotelial. A interpretação dos resultados foi feita com base na intensidade da marcação citoplasmática das citocinas TNFA e IL1B.

5.7.2 Ensaio imunoenzimático

O ensaio imunoenzimático (ELISA) de escolha foi baseado no princípio sanduíche, e seguindo as recomendações do fabricante (R&D Systems), foi realizado em microplaca de 96 poços de fundo chato (Greiner

#675061) cujo formato permite a utilização de menores volumes de reagentes e amostra. Os kits selecionados bem como as concentrações dos anticorpos e concentração máxima de proteína estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração de anticorpos e proteína referente ao ponto máximo da curva padrão para os mediadores PTX3, IL1B, TNFA, CCL2 e CXCL1 determinada nos kits adquiridos (R&D Systems) e empregados no ensaio imunoenzimático.

Kit ELISA / Catálogo	Anticorpo de Captura ($\mu\text{g/ml}$)	Anticorpo de Detecção (ng/ml)	Curva Padrão Proteína (pg/ml)
DuoSet Pentraxin 3 murino (#DY2166)	4	100	14'000
DuoSet IL1B murino (#DY401)	4	600	1'000
DuoSet TNF murino (#DY410)	0,8	200	2'000
DuoSet CXCL1/KC murino (#DY453)	0,2	50	250
DuoSet CCL2/MCP-1 murino (#DY479)	2	200	1'000

5.7.2.1 Extração de proteínas do pulmão

Para avaliação dos mediadores inflamatórios por ELISA foi preciso extrair primeiramente as proteínas do pulmão. Para isso, cada 100mg do órgão foi homogeneizado usando o equipamento Polytron à baixa velocidade em 1 ml de uma solução contendo coquetel inibidor de proteases (Roche #11836153001), diluído em PBS Tween 0,05%. Em seguida, a suspensão foi centrifugada 2 vezes por 10 min à 4°C, sendo a primeira centrifugação à 3.000 x g e a segunda à 10.000 x g. O sobrenadante foi separado e armazenado à -80°C.

5.7.2.2 Protocolo de ELISA

Cada poço da placa de 96 wells (Greiner #675061) foi sensibilizado com 50 µL do Anticorpo Primário Monoclonal de Captura, diluído em PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄ – pH 7,2) seguido por incubação “overnight” à 25°C sob agitação de 75 rpm em Incubadora Refrigerada (Cientec – Modelo CT712R). Para retirar o excesso de Ac não adsorvido, 5 sucessivas lavagens foram feitas com 180 µL de solução de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS), procedimento que foi realizado entre todas as etapas, exceto após a adição do substrato. Em seguida, adicionou-se 150 µL de solução de bloqueio (1% BSA em PBS - reagente diluente R&D#DY995) na concentração recomendada pelo fabricante para cada citocina por no mínimo 2 horas à 25°C. Uma curva padrão foi então construída com 7 pontos através de diluições seriadas da proteína recombinante da citocina de interesse a partir da concentração recomendada e disponível na Tabela 2. Amostras de soro, pulmão e lavado broncoalveolar foram diluídas em reagente diluente (R&D#DY995) e distribuídas em duplicata seguidas por incubação a 25°C overnight sob agitação. O Anticorpo Secundário Policlonal de Detecção diluído em reagente diluente (R&D #DY995) foi então adicionado seguido por 2 horas de incubação à 25°C sob agitação. Após incubação por 20 minutos com Estreptavidina (R&D#DY998) diluída 1:200 à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi revelada com a adição de 50 µl de Substrate Solution (mistura 1:1 v/v de H₂O₂ e tetrametilbenzidina) (R&D#DY999), seguida de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 20

min de incubação foi adicionado 25 µl de solução de parada (H₂SO₄ 2N, R&D#DY994). A leitura foi feita no leitor Spectramax M5 (Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 450nm e 540nm. Os valores de densidade óptica (DO) encontrados na leitura de 450nm foram subtraídos da leitura feita em 540nm, a fim de corrigir quaisquer imperfeições ópticas da placa.

Tabela 3 - Diluição de amostras de soro e pulmão de camundongos utilizada para detecção dos mediadores inflamatórios de interesse nos experimentos de ELISA.

	Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 / CD1		<i>Ptx3</i> ^{-/-} / <i>Ptx3</i> ^{+/+}	
	Pulmão	Soro	Pulmão	Soro
IL1B	1:3	puro	1:3	puro
TNFA	puro	puro	puro	puro
CCL2 (MCP1)	1:2	—	puro	—
CXCL1 (KC)	1:10	—	1:10	—
PTX3	—	puro	—	puro

Para avaliação da expressão de PTX3 no tecido pulmonar, uma extensa tentativa de padronização foi realizada sem resultado satisfatório e está descrita em detalhes no Anexo 2.

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa Prism Graph Pad 4 onde as amostras foram inicialmente caracterizadas quanto a sua normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para amostras com distribuição não-paramétrica e comparação entre apenas dois grupos foi aplicado o teste de Mann-Whitney. No caso de comparações não-paramétricas entre mais de dois grupos para apenas uma variável, foi

empregado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo "Dunn's Multiple Comparison Test". Já para comparações paramétricas entre mais de dois grupos considerando-se duas variáveis foi empregado a análise de variância com dois fatores (two-way anova), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 VENTILAÇÃO MECÂNICA EM ALTO VOLUME CORRENTE ATÉ AUMENTO DE 50% NA ELASTÂNCIA PULMONAR EM CAMUNDONGOS GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA *Ptx3*

Para investigar o papel de *Ptx3* na Lesão Pulmonar Induzida pela Ventilação Mecânica, inicialmente submetemos camundongos transgênicos e nocautes para *Ptx3* e seus respectivos controles do tipo selvagem (n=12/grupo) à ventilação mecânica utilizando alto volume corrente (45 ml/kg). Apesar desse volume não ser utilizado na prática médica, esse valor foi escolhido para que o objetivo de causar uma lesão no pulmão fosse atingido. Durante o experimento, a Elastância Estática do Sistema Respiratório foi monitorada até que se observasse um aumento de 50% em relação ao seu valor basal, tomada ao iniciar a ventilação mecânica em 45 ml/kg. O valor de 50% de elastância foi escolhido com base em dados da literatura que mostraram ser indicativo de grau semelhante de lesão pulmonar em ratos (SIBILLA et al. 2002). As Tabelas 4 e 5 mostram os dados coletados durante o procedimento de ventilação mecânica.

Tabela 4 - Dados e parâmetros ventilatórios dos camundongos transgênicos e respectivos controles do tipo selvagem durante VM até Eest=150%.

Animal	Peso (g)	Res.	Eest.	Res.	Res.	Eest.	Eest.	Tempo p/ 150% Eest (min)	Eest.
		Inicial	Inicial	Inicial	Final	Inicial	Final		Final
		v= 10 ml/kg		v= 45 ml/kg					
Tg 1	33,2	0,55	9,05	0,55	0,89	8,35	15,77	150	189
Tg 2	35,1	0,47	7,9	0,47	0,62	7,7	14,29	90	186
Tg 3	37,2	0,71	8,94	0,71	0,61	8,79	14,02	70	159
Tg 4	37,2	0,4	7,9	0,4	0,49	7,68	16,7	90	217
Tg 5	34,4	0,43	8,84	0,43	0,63	8,47	17,7	70	209
Tg 6	36,4	0,45	8,29	0,45	0,54	7,52	16,98	60	226
Tg 7	34,9	0,66	9,01	0,66	0,48	8,63	13,64	80	158
Tg 8	33,5	1,55	9,48	0,66	2,41	8,88	27,77	70	313
Tg 9	33,8	0,62	9,31	0,62	1,03	9,41	32,71	40	348
Tg 10	35,5	0,73	9,07	0,73	0,56	8,75	19,92	40	228
Tg 11	30,5	0,55	10,87	0,55	0,61	10,76	16,26	60	151
Tg 12	32,3	0,55	10,28	0,55	0,72	9,83	26,21	100	267
WT 1	35,1	0,48	10,42	0,48	1,52	9,14	13,91	154	152
WT 2	33,6	0,47	8,82	0,47	0,53	8,11	12,77	70	157
WT 3	32	0,83	9,75	0,83	1,56	8,52	16,17	150	190
WT 4	31,3	0,98	11,16	0,98	4,77	9,81	24,98	130	255
WT 5	37,2	0,38	8,73	0,38	0,46	7,94	12,43	60	157
WT 6	37,1	0,37	7,85	0,37	0,53	7,07	11,02	50	156
WT 7	35,5	0,47	9,61	0,47	0,39	8,86	13,76	180	155
WT 8	36,7	0,38	8,73	0,38	0,37	8,19	12,51	103	153
WT 9	40,4	0,44	7,83	0,44	0,38	8,12	12,97	96	160
WT 10	39,5	0,63	8,77	0,63	0,56	8,49	13,13	155	155
WT 11	40,3	0,32	7,16	0,32	0,35	6,58	10,53	138	160
WT 12	38,7	0,37	7,58	0,37	0,43	6,88	11,67	130	170

*Em **vermelho**: animais que receberam Salina

Em **azul: animais que receberam Azul de Evans

Res= Resistência (cmH₂O.s/mL)

Eest= Elastância Pulmonar Estática (cmH₂O/mL)

Tabela 5 - Dados e parâmetros ventilatórios dos camundongos nocautes e respectivos controles do tipo selvagem durante VM até Eest=150%.

Animal	Peso (g)	Res.	Eest.	Res.	Res.	Eest.	Eest.	Tempo p/ 150% Eest (min)	Eest.
		Inicial	Inicial	Inicial	Final	Inicial	Final		Final
		v= 10 ml/kg			v= 45 ml/kg				
KO 1	26,4	0,52	11,55	0,52	0,72	10,39	16,37	204	158
KO 2	23	0,6	13,98	0,6	1,28	12,75	31,11	220	244
KO 3	29,7	0,53	12,38	0,53	4,43	11,17	25,54	170	229
KO 4	30,6	0,62	10,56	0,62	0,52	9,48	14,93	170	157
KO 5	21,6	0,66	16,59	0,66	0,97	15,89	26,43	160	166
KO 6	29,3	0,75	10,16	0,75	0,61	9,96	15,04	90	151
KO 7	25,9	0,1	12,14	-0,11	-0,26	10,96	16,76	190	153
KO 8	25,7	0,56	12,2	0,56	0,57	10,36	16,44	180	159
KO 9	24,6	0,42	12,71	0,42	0,78	12,07	18,24	140	151
KO 10	28,3	0,66	14,54	0,66	0,74	12,71	21,02	92	165
KO 11	22,5	0,66	13,29	0,66	0,84	13,8	22,36	110	162
KO 12	21,1	0,7	16,37	0,7	0,88	15,51	34,85	140	225
WT 1	29	0,53	11,4	0,53	0,53	10,15	15,21	100	150
WT 2	23,7	0,61	15,31	0,61	0,81	13,4	22,56	180	168
WT 3	22,1	0,66	14,66	0,66	0,99	14,87	27,08	180	182
WT 4	22,8	0,56	15,8	0,56	0,81	14,07	23,49	200	167
WT 5	27	0,52	13,73	0,52	0,73	12,19	21,01	190	172
WT 6	21,7	0,69	16,7	0,69	2,07	16,01	30,21	200	189
WT 7	28	0,64	12,57	0,64	0,98	11,25	31,69	130	282
WT 8	24,1	0,67	14,8	0,67	1,84	13,44	43,47	130	323
WT 9	31,7	0,52	10,08	0,52	0,52	9,27	15,44	100	167
WT 10	31,9	0,51	10,63	0,51	0,51	9,76	16,95	112	174
WT 11	27,6	0,57	11,31	0,57	0,78	10,96	17,79	100	162
WT 12	25,5	1,03	13,38	1,03	1,03	12,48	22,09	142	177

*Em **vermelho**: animais que receberam Salina

Em **azul: animais que receberam Azul de Evans

Res= Resistência (cmH₂O.s/mL)

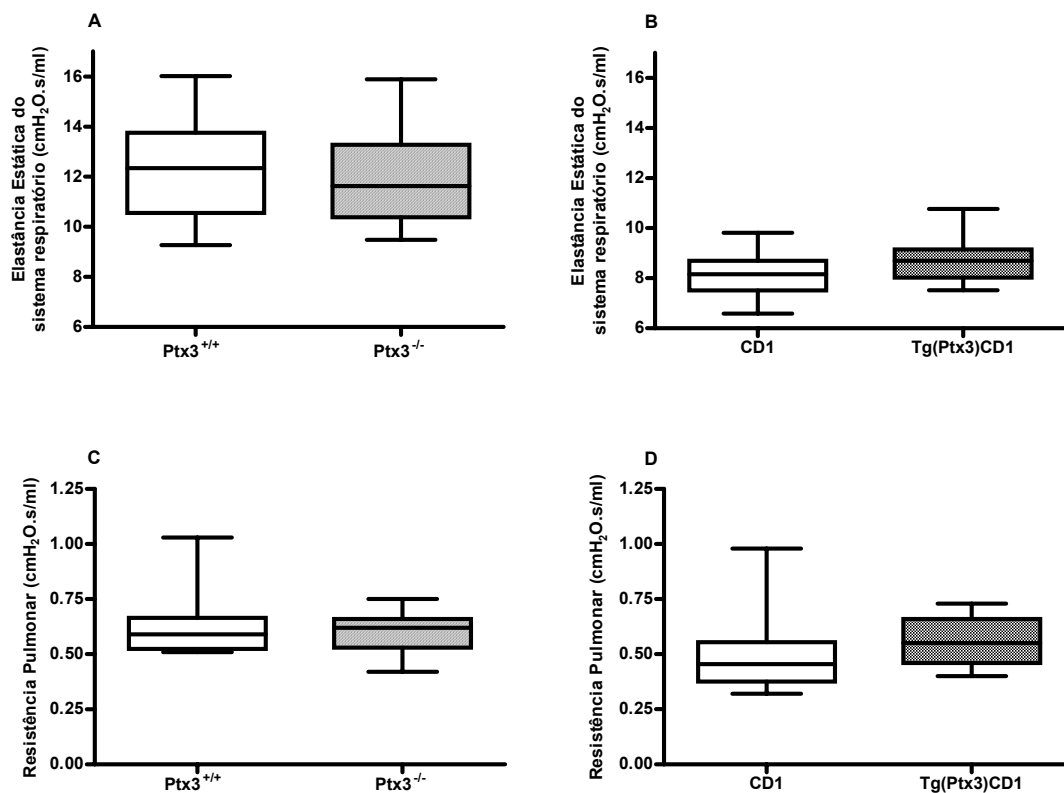
Eest= Elastância Pulmonar Estática (cmH₂O/mL)

6.1.1 Caracterização da Lesão Pulmonar Induzida pela Ventilação

Mecânica em Alto Volume Corrente

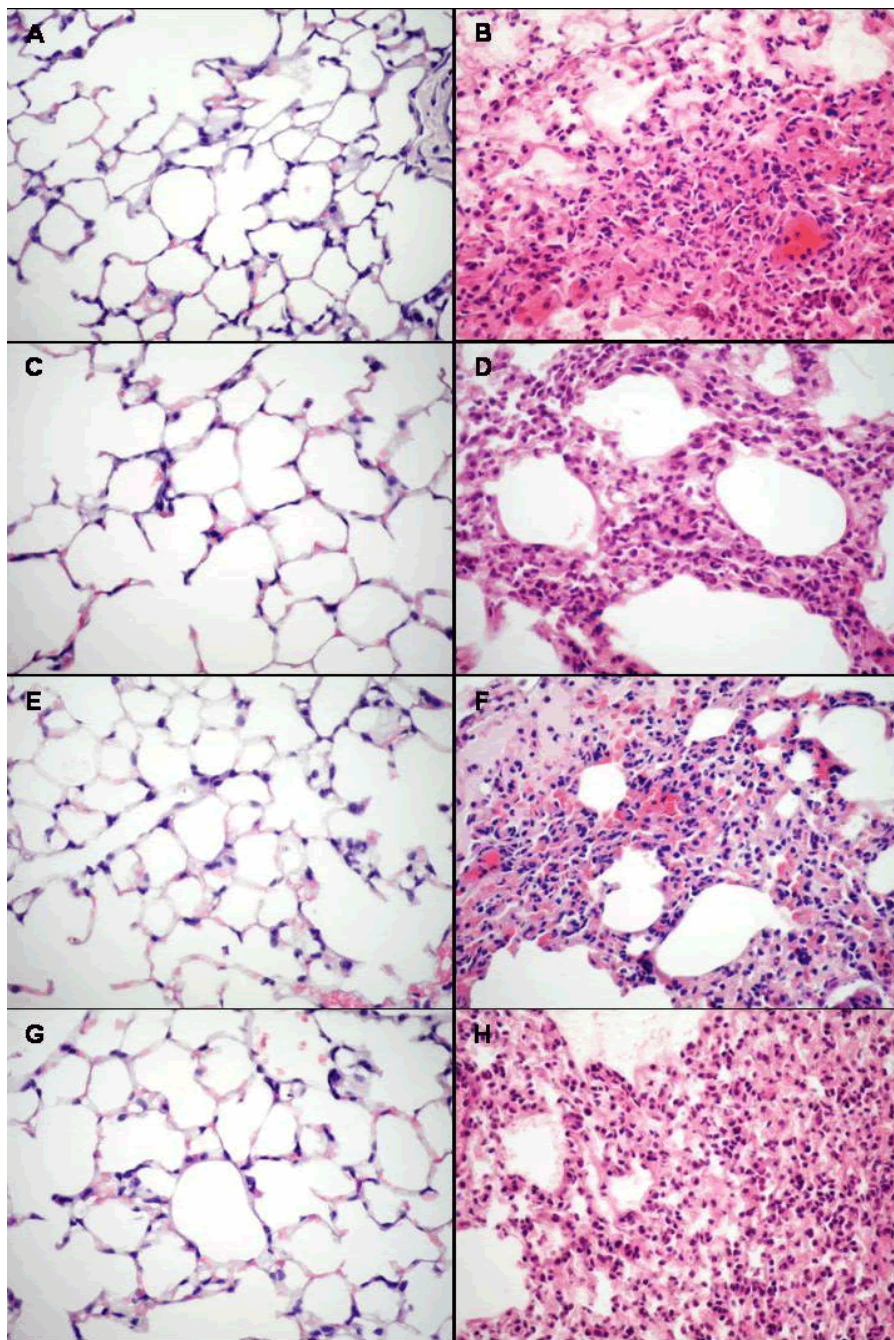
Inicialmente caracterizamos a mecânica pulmonar das diferentes linhagens de camundongos usadas nesse estudo. A Figura 4 mostra que os valores de Elastância e Resistência pulmonar coletados ao iniciar a VM em 45 m/kg são bastante similares. Ao atingir 50% na Elastância Pulmonar, os pulmões foram coletados para análise e a Figura 5 ilustra os pulmões das

diferentes linhagens, antes e após a ventilação mecânica, mostrando que todos os animais desenvolveram lesão induzida pelo ventilador.



Legenda: Para caracterizar as propriedades mecânicas do sistema respiratório, manobras respiratórias foram realizadas ao iniciar a ventilação mecânica em volume corrente de 45 ml/kg em todos animais através do flexiVent software (version 4.02, SCIREQ, Montreal, Canada). Os dados são representativos de 12 animais por grupo. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada ao comparar camundongos nocautes (Painéis A e C) e transgênicos para *Ptx3* (Painéis B e D) com a correspondente linhagem do tipo selvagem (Mann-Whitney).

Figura 4 – Mecânica basal do sistema respiratório nas diferentes linhagens de camundongos.



Legenda: Pulmão de camundongos CD1 (A e B), Tg(*Ptx3*)CD1 (C e D), *Ptx3*^{-/-} (E e F) e *Ptx3*^{+/+} (G e H) não ventilados (painéis lado esquerdo) ou ventilados com volume corrente de 45 ml/kg até aumento de 50% na elastância pulmonar (painéis lado direito). Coloração por hematoxilina eosina, aumento de 40X.

Figura 5 – Lesão tecidual causada pela ventilação mecânica em alto volume corrente.

A avaliação detalhada da análise histomorfométrica revelou que o grau de lesão pulmonar desenvolvido pelos diferentes grupos do estudo foi bastante semelhante e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi percebida entre eles. Assim, como apresentado na Tabela 6, não houve diferença na porcentagem de área com Hiperdistensão, Colapso, Edema intra-alveolar e Infiltrado Inflamatório entre os camundongos transgênicos e sua respectiva linhagem controle. O mesmo também foi observado entre os animais *Ptx3^{+/+}* e *Ptx3^{-/-}*.

Tabela 6 – Análise histomorfométrica no pulmão de camundongos submetidos à VM em alto volume corrente até aumento de 50% na Elastância Pulmonar.

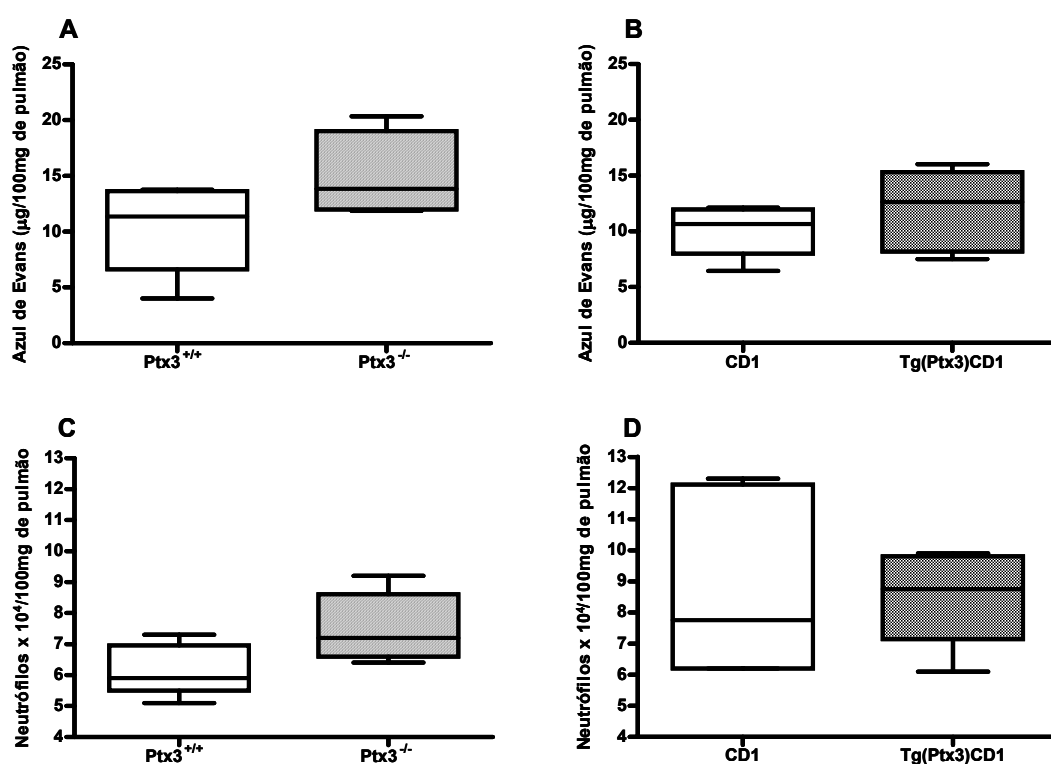
		CD1	Tg(<i>Ptx3</i>)CD1	<i>Ptx3^{+/+}</i>	<i>Ptx3^{-/-}</i>
Hiperdistensão, %	Controle	4 (4 - 6)	6 (4 - 9)	6 (5 - 9)	8 (4 - 9)
	VM	41 (32 - 46) *	35 (25 - 39) *	27 (22 - 34) *	31 (25 - 35) *
Edema alveolar, %	Controle	0	0	0	0
	VM	16 (8 - 19) *	16 (10 - 23) *	7 (4 - 11) *	8 (4 - 10) *
Colapso alveolar, %	Controle	0	0	0	0
	VM	10 (6 - 18) *	17 (12 - 29) *	14 (6 - 24) *	18 (12 - 28) *
Célula Inflamatória/ μm^2	Controle	0,10 (0,07 - 0,14)	0,08 (0,05 - 0,10)	0,09 (0,07 - 0,12)	0,10 (0,07 - 0,11)
	VM	1,44 (1,19 - 1,57) *	1,19 (1,04 - 1,40) *	1,50 (1,41 - 1,65) *	1,44 (1,28 - 1,54) *

Dados representam mediana e intervalo interquartil obtidos de seis animais por grupo na avaliação de 10 campos aleatoriamente escolhidos por animal ventilados com volume corrente de 45 ml/kg até aumento de 50% na Elastância Pulmonar ou controle sem ventilação.

* Estatisticamente diferente do grupo controle ($P < 0,05$, Mann-Whitney).

A permeabilidade vascular e o infiltrado neutrofílico também foram avaliados pela quantificação do corante Azul de Evans e pela dosagem da atividade de Meiloperoxidase no pulmão, e conforme apresentado na Figura 6, semelhantes graus de edema e infiltrado polimorfonuclear foram

encontrados nos animais transgênicos e nocautes quando comparados aos respectivos controles ventilados sob as mesmas condições. Somados aos dados da análise histológica, notamos que todos os animais desenvolveram lesão pulmonar após ventilação mecânica em alto volume corrente e que, ao atingir 150% de elastância pulmonar, o grau de lesão foi bastante similar entre os grupos.

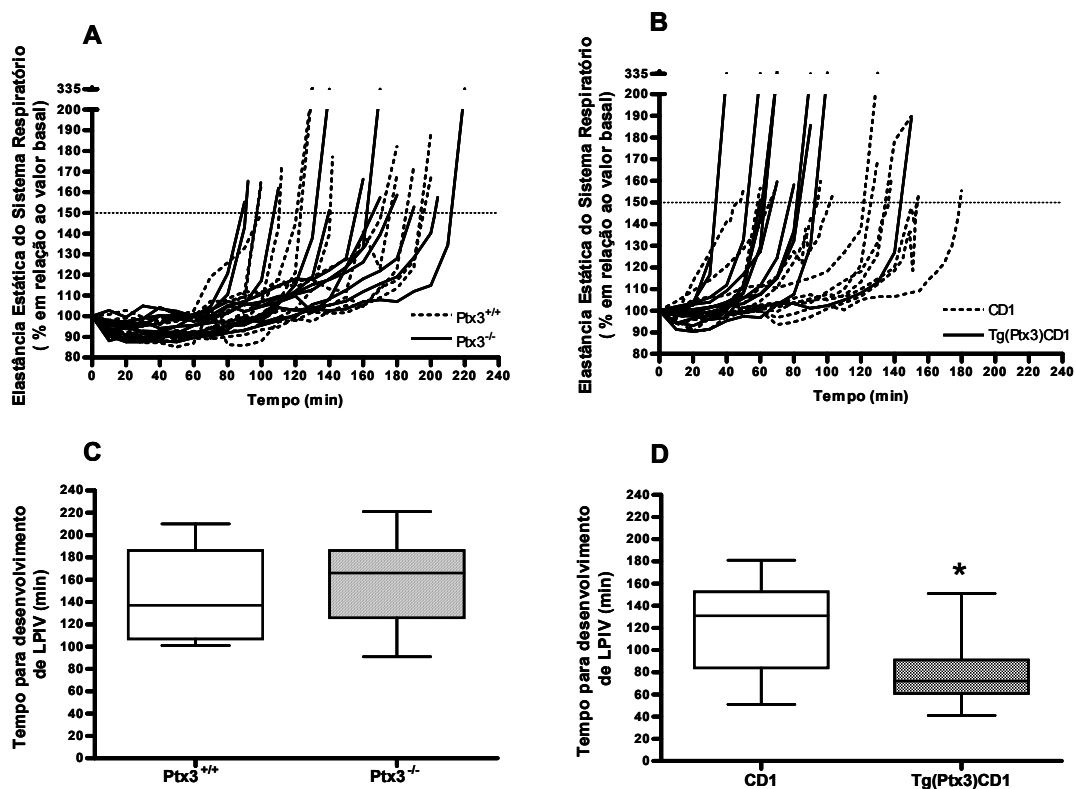


Legenda: Camundongos transgênicos (Tg($Ptx3$)CD1), nocautes ($Ptx3^{-/-}$) e respectivos controles do tipo selvagem ($n=6/\text{grupo}$) foram submetidos a VM com 45 ml/kg de volume corrente até aumento em 50% na elastância pulmonar. As mudanças na permeabilidade vascular (Painéis A e B) e no infiltrado neutrofílico (Painéis C e D) foram avaliadas através da quantificação do extravasamento do corante azul de Evans e da atividade de mieloperoxidase. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na comparação entre os camundongos modificados geneticamente e seus respectivos controles (Mann-Whitney).

Figura 6 – Avaliação do edema e infiltrado neutrofílico no pulmão de camundongos submetidos à ventilação mecânica em alto volume corrente.

6.1.2 Impacto da Expressão de *Ptx3* no Tempo Necessário para Lesão Pulmonar Induzida pelo Ventilador

Uma vez observado que graus semelhantes de lesão pulmonar foram desenvolvidos pelos animais geneticamente modificados para *Ptx3* e seus controles, foi analisado o tempo que cada animal levou para o desenvolvimento desta lesão. As Figuras 7A e 7B mostram os valores de Elastância Pulmonar registrados ao longo do tempo por cada animal durante a ventilação mecânica, e conforme apresentado na Figura 7C, o tempo necessário para desenvolvimento de LPIV foi similar entre os camundongos *Ptx3*^{-/-} e *Ptx3*^{+/+} (156 ± 42 min e 148 ± 41 min, respectivamente). Entretanto, os animais Tg(*Ptx3*)CD1 desenvolveram a lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica mais rapidamente do que os controles CD1 (77 ± 29 min e 118 ± 41 min, respectivamente) (Figura 7D).



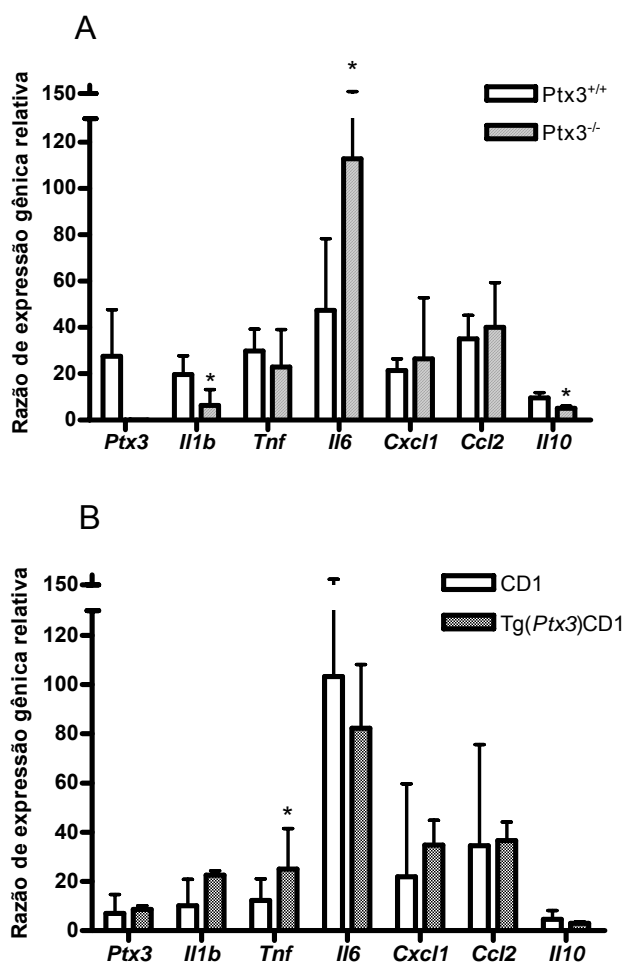
Legenda: CD1, Tg(*Ptx3*)CD1 (Painel A), *Ptx3*^{-/-} e *Ptx3*^{+/+} (Painel B) (n=12 animais/grupo) foram submetidos à VM com volume corrente de 45 ml/kg e os valores de elastância estática do sistema respiratório foram tomados a cada 10 minutos até aumento de 50% sobre o valor basal inicial. A linha sobre os gráficos A e B representam o ponto de Elastância Pulmonar igual a 150%. O tempo necessário para desenvolver LPIV levado pelos nocautes (*Ptx3*^{-/-}) (Painel C), transgênicos (Tg(*Ptx3*)CD1) (Painel D) e seus respectivos controles do tipo selvagem foram analisados. *Significativamente diferente do grupo controle (P=0,0225; Mann-Whitney).

Figura 7 – Cinética de aumento da elastância do sistema respiratório e tempo mediano levado pelas diferentes linhagens de camundongos para desenvolvimento da LPIV.

6.1.3 Mudanças no Perfil de Expressão Gênica Pulmonar Após Ventilação Mecânica em Alto Volume Corrente

O RNA total foi extraído do pulmão esquerdo e as quantidades específicas de RNAs mensageiros (RNAm) foram determinadas por PCR em tempo real. Para cada linhagem de camundongo usada nesse estudo, foram

obtidos um pool de RNAs dos mesmos animais controle não-ventilados que foram usados como referência para estimativa das razões de expressão gênica relativas. As Figuras 8A e 8B mostram que os transcritos dos mediadores inflamatórios estudados aumentaram em resposta a ventilação mecânica em todos os grupos. Entretanto, uma modulação distinta foi observada na presença ou ausência de *Ptx3*. Um maior aumento nos níveis de RNA mensageiro de *Il6* e menor aumento de *Il1b* e *Il10* foi observado nos camundongos nocautes quando comparados aos controles do tipo selvagem (Figura 8A). Por outro lado, os camundongos Tg(*Ptx3*)CD1 apresentaram maior aumento na expressão de *Tnfa* quando comparados ao controle CD1 (Figura 8B).

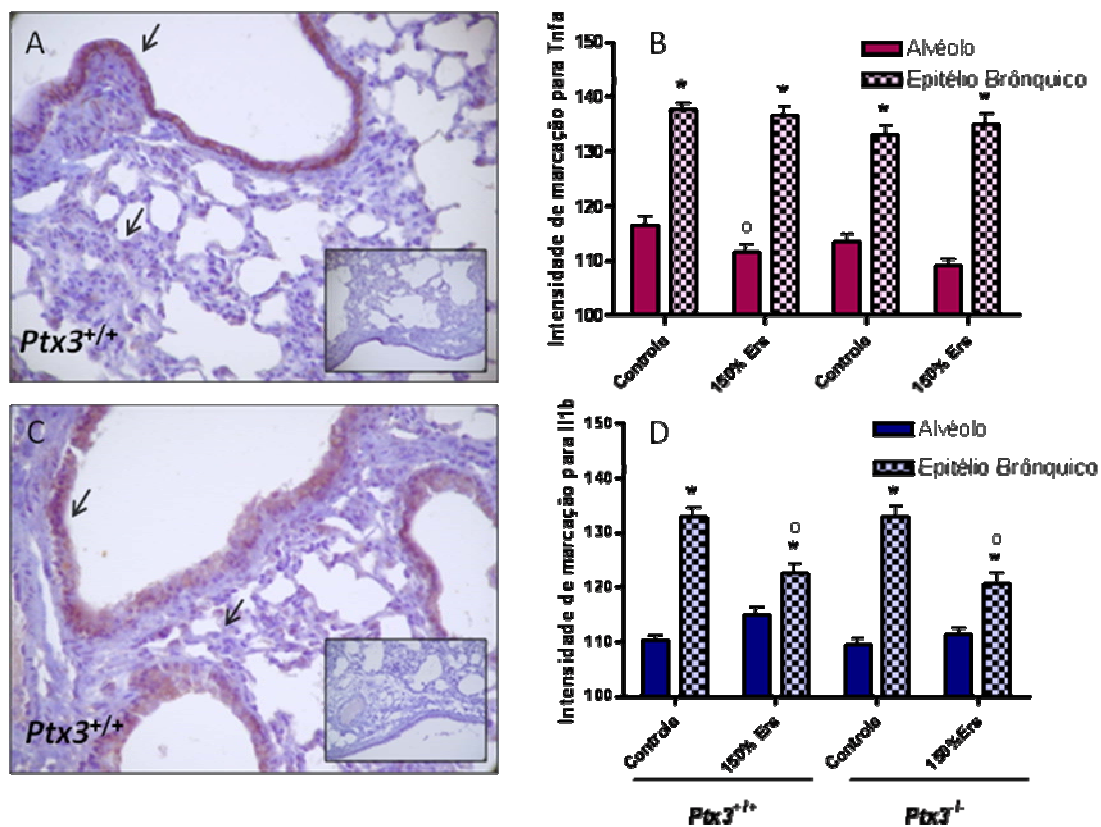


Legenda: Camundongos foram submetidos à ventilação mecânica com volume corrente de 45ml/kg até que a Elastância Pulmonar aumentasse 50% do seu valor inicial. O RNA total do pulmão foi extraído e submetido a PCR em tempo real. Os gráficos mostram a razão de expressão de mediadores inflamatórios no pulmão dos camundongos ventilados *Ptx3*^{-/-} e *Ptx3*^{+/+} (A), e Tg(*Ptx3*)CD1 e CD1 (B), em comparação com os correspondentes animais controle não-ventilados. A amplificação do gene constitutivo *Hprt* foi usada para normalização dos dados. Os valores são apresentados como mediana e intervalo interquartil e as diferenças estatísticas são indicadas (*P<0,05, Mann-Whitney).

Figura 8 – Perfil de expressão gênica no pulmão em 150% de Elastância Pulmonar.

6.1.4 Análise dos Níveis Protéicos de IL1B e TNFA em Camundongos Nocautes para *Ptx3* (*Ptx3*^{-/-}) e do Tipo Selvagem (*Ptx3*^{+/+})

A Figura 9 mostra a avaliação da expressão de IL1B e TNFA, em pulmão de camundongos nocautes e do tipo selvagem ventilados até atingir 150%Eest (n=6/grupo) ou controles não ventilados. No painel A estão os resultados da imunistoquímica para TNFA murino usando o anticorpo (R&D Systems #AF-410-NA) na concentração de 13 µg/mL, podendo ser observada a marcação positiva no citoplasma das células brônquicas e células inflamatórias.



Legenda: Análise da expressão de **IL1B** e **TNFA** por Imunoistoquímica em pulmões de camundongos $Ptx3^{+/+}$ e $Ptx3^{-/-}$ ventilados e não ventilados (n=6/grupo). Foram usados os anticorpos anti-TNFA (AF-410-NA R&D Systems) na concentração de 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Painel A e Gráfico B) e Ac anti-IL1B (AF-401-NA R&D Systems) na concentração de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Painel C e gráfico D). Os inserts mostram os controles negativos (anticorpo primário substituído por BSA) em aumento de 400X. Foi utilizado um *tissue microarray* composto por 24 amostras de pulmões dos camundongos ventilados mecanicamente ou controle não ventilados, onde 2 áreas medianas e 2 periféricas foram representadas. A marcação citoplasmática positiva foi medida através do equipamento ACIS[®] III com base na intensidade da marcação. * $P < 0.05$ da comparação entre Alvéolo e Epitélio Brônquico submetidos às mesmas condições. ^o $P < 0.05$ da comparação do mesmo compartimento pulmonar com camundongos controle não ventilados. Análises foram feitas por two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Figura 9 - Análise da expressão de IL1B e TNFA por Imunoistoquímica em pulmões de camundongos $Ptx3^{+/+}$ e $Ptx3^{-/-}$.

Com relação à expressão de TNFA, o gráfico B mostra que as células do epitélio brônquico expressam mais dessa citocina em comparação com as células do compartimento alveolar tanto para os camundongos nocautes quanto os animais do tipo selvagem, independentemente do tratamento

(ventilado ou não) ($p < 0,001$). Observou-se também que as células do compartimento alveolar dos camundongos *Ptx3*^{+/+} ventilados até 150% Eest expressam menos TNFA quando comparados aos animais controle não ventilados ($p < 0,05$).

O gráfico D mostra que as células brônquicas são as que mais expressam IL1B nos camundongos ventilados e não ventilados ($p < 0,001$). Uma diminuição da expressão no epitélio brônquico de animais ventilados até 150% Eest em relação ao respectivo grupo controle não ventilado ($p < 0,001$) também foi observada.

A análise dos níveis protéicos de IL1B e TNFA em camundongos transgênicos para *Ptx3* (*Tg(Ptx3)CD1*) e do tipo selvagem (CD1 Wt) será descrita mais a seguir (item 6.1.7).

6.1.5 Perfil de Expressão Protéica de Mediadores Inflamatórios no Pulmão em 150% de Elastância Pulmonar após Ventilação Mecânica em Alto Volume Corrente Avaliada por ELISA

A proteína total foi extraída do pulmão direito após lavagem da microcirculação pulmonar para retirada do sangue presente nos capilares. Os pulmões foram pesados e analisados através de ensaio enzimático com anticorpos específicos para camundongos. Na Tabela 7 estão apresentados todos os resultados da dosagem protéica por ELISA de PTX3, IL1B, TNFA, CXCL1 e CCL2 encontrados no pulmão e soro dos animais controle e ventilados mecanicamente até 150% de elastância pulmonar (Eest=150%). Infelizmente o ensaio para PTX3 no pulmão não funcionou porque as

amostras provenientes de animais nocautes apresentavam intensidade forte e tão boa quanto à amostra de pulmão dos outros grupos de animais, evidenciando uma inespecificidade deste kit em particular. Com relação ao soro, o ensaio não foi realizado para os mediadores CXCL1 e CCL2, pois pelo fato de trabalharmos com animais de pequeno porte, as amostras séricas obtidas não renderam volume suficiente para concluir esse objetivo.

Tabela 7 - Avaliação por ELISA da expressão de mediadores inflamatórios em resposta à VM no pulmão de camundongos nocautes e transgênicos para *Ptx3*

	CD1 Wt		Tg(<i>Ptx3</i>)CD1		<i>Ptx3</i> ^{+/+}		<i>Ptx3</i> ^{-/-}	
	Controle	VM	Controle	VM	Controle	VM	Controle	VM
Pulmão								
Il1b	440 (120)	480 (107)	443 (91)	466 (69)	310 (87)	608 (272)*	338 (113)	483 (105)
Tnfa	337 (138)	220 (61)	435 (162)	187 (82)*	84 (41)	82 (38)	139 (57)	101 (30)
Cxcl1	5682 (2129)	6472 (2326)	4831 (857)	6282 (1376)	6100 (2118)	7354 (1385)	6896 (1907)	8623 (1400)
Ccl2	149 (63)	190 (34)	83 (27)	160 (23)*	47 (19)	213 (72)	53 (19)	442 (278)*#
Soro								
Il1b	327 (170)	352 (72)	458 (40)	235 (94)*	584 (180)	667 (307)	338 (215)	332 (231)
Tnfa	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ptx3	44661 (6305)	39422 (10383)	40589 (11184)	37766 (6635)	33612 (4910)	17660 (10568)	nd	nd

Resultados representam a média e desvio padrão de 4 a 6 animais por grupo expressos em pg/100 mg de pulmão ou pg/ml de soro. ND = não detectados ou abaixo do limite de detecção do ensaio. *P<0,05 da comparação com respectivo grupo controle não ventilado. #P<0.05 da comparação entre *Ptx3*^{+/+} e *Ptx3*^{-/-} submetidos à ventilação mecânica. Análises foram feitas usando o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Para as amostras de pulmão, observou-se que camundongos *Ptx3*^{+/+} ventilados até 150% de elastância obtiveram maior expressão de IL1B quando comparados com o respectivo grupo controle não ventilado (P<0,01). Foi visto também que camundongos *Ptx3*^{-/-} apresentaram uma maior expressão de CCL2/MCP1 em relação aos camundongos nocautes controle não ventilados, (P<0,001) e em comparação com camundongos *Ptx3*^{+/+} ventilados (P<0,05). Já os camundongos transgênicos para *Ptx3* apresentaram menor expressão de TNFA e maior expressão de CCL2

(conhecida como “monocyte chemoattractant protein-1/*Mcp1*”) no pulmão quando comparados com o respectivo grupo controle não ventilado ($P < 0,01$). Não foi constatada diferença estatisticamente significativa para a quimiocina CXCL1 (conhecida como “keratinocyte-derived chemokine/*Kc*”).

Com relação às amostras séricas, foi observado que os camundongos Tg(*Ptx3*)CD1 ventilados apresentaram menor expressão de IL1B quando comparados ao respectivo grupo controle não ventilado ($P < 0,01$). Não foram detectados níveis expressivos para TNFA no soro de nenhuma das linhagens de camundongo estudadas. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas para os níveis de PTX3 sérico entre os animais CD1, Tg(*Ptx3*)CD1 e *Ptx3*^{+/+} ventilados ou não. Níveis de PTX3 não foram detectados no soro dos animais nocautes.

6.1.6 Análise da LPIV em Alto Volume Corrente por Tempos Inferiores ao Necessário para Aumento de 50% na Elastância Pulmonar

A fim de melhor investigar o desenvolvimento precoce da LPIV nos animais transgênicos para *Ptx3*, submetemos novamente esses camundongos e seu controle Wt à VM utilizando os mesmos parâmetros (volume corrente= 45 ml/kg, zeroPEEP e frequência respiratória de 70 ciclos/minuto) por tempos fixos de 20, 40 e 60 min. O valor de 150% de Elastância Pulmonar individual de cada animal não foi mais adotado como referência para o término do procedimento de ventilação mecânica. A Tabela 8 mostra os dados coletados durante o experimento.

Tabela 8 - Dados coletados durante a VM por tempos fixos em alto volume corrente de camundongos transgênicos e do tipo selvagem

Animal	Peso (g)	Tempo VM (min)	Res. Inicial	Δ Pres1 Inicial	Eest. Inicial	Res. Inicial	Res. Final	Δ Pres2 Inicial	Δ Pres2 Final	Eest. Inicial	Eest. Final	Eest. Final (%)
			v= 10 ml/kg			v= 45 ml/kg						
Tg 1	32,6	20	0,2	27,23	9,49	0,14	0,11	24,41	20,81	8,86	7,9	89
Tg 2	33,1	20	0,67	31,76	9,85	0,6	0,43	27,24	24,85	8,84	8	90
Tg 3	32,3	20	0,4	30,66	10,2	0,38	0,23	26,91	24	9,47	8,85	93
Tg 4	35,4	20	0,45	30,59	8,17	0,39	0,37	26,03	23,23	7,39	7,01	95
Tg 5	35	20	0,38	32,14	9,45	0,4	0,27	24,59	20,95	7,2	6,99	97
Tg 6	30,5	20	0,44	31	11,6	0,38	0,41	27,85	24,64	10,6	10	94
CD1WT 1	34,8	20	0,53	37,09	9,79	0,46	0,36	31,44	28,23	8,75	8,56	98
CD1WT 2	37	20	1,02	34,74	8,84	0,57	0,35	29,76	25,07	7,91	7,47	94
CD1WT 3	36,5	20	0,43	35,73	8,2	0,35	0,29	33,47	29,26	7,89	7,6	96
CD1WT 4	36,1	20	0,49	34,36	7,95	0,39	0,26	31,52	26,04	7,81	7,22	92
CD1WT 5	32,7	20	0,47	35,24	9,36	0,45	0,36	26,93	24,35	8,66	8,24	95
CD1WT 7	36,4	20	0,13	36,16	7,34	0,15	0,11	28,29	21,3	7,28	6,91	95
Tg 1	33,7	40	0,53	33,13	8,82	0,44	0,3	27,91	23,94	7,87	7,68	98
Tg 2	30,6	40	0,53	37,48	10,8	0,46	0,36	31,37	29,21	9,46	9,57	101
Tg 3	32	40	0,44	32,75	9,22	0,38	0,3	25,75	21,79	7,85	7,45	95
Tg 4	37,2	40	0,45	36,47	8,69	0,41	0,34	32,26	26,83	8,01	7,94	99
Tg 5	36,7	40	0,38	36,15	7,02	0,36	0,29	26,44	21,85	6,68	6,38	96
Tg 6	37,4	40	0,53	35,04	7,65	0,48	0,32	33,53	31,3	7,52	7,66	102
CD1WT 1	38,6	40	0,6	26,95	6,89	0,64	0,34	22,05	21,87	5,82	5,71	98
CD1WT 2	35,7	40	0,64	33,23	8,07	0,55	0,33	28,46	23,15	7,53	6,87	91
CD1WT 4	38,7	40	0,54	29,21	6,93	0,49	0,21	26,31	21,3	6,82	6,05	89
CD1WT 5	36,3	40	0,62	43,04	9,67	0,51	0,41	39,92	35,29	9,29	9,16	99
CD1WT 6	34,8	40	0,48	39,71	10,5	0,45	0,39	35	29,78	9,62	9,31	97
CD1WT 7	32	40	0,97	37,7	9,16	0,85	0,94	32,22	27,48	9,27	8,96	97
Tg 1	31,8	60	0,34	36,5	10,3	0,27	0,13	33,23	31,04	9,44	9,69	103
Tg 2	30,5	60	0,82	47,76	12,6	0,72	0,74	36,76	30,54	9,97	10,4	104
Tg 3	33,7	60	0,52	35,19	9,08	0,36	0,12	30,93	27,67	8,56	8,38	98
Tg 4	32,1	60	0,41	26,66	8,63	0,34	0,38	23,43	22,4	7,94	8	101
Tg 5	30,5	60	0,4	32,11	10,5	0,31	0,16	24,07	24,03	8,91	8,89	100
Tg 6	32,9	60	0,45	35,32	9,38	0,41	0,32	26,57	24,62	8,15	7,75	95
CD1WT 1	29	60	0,58	30,03	11,9	0,49	0,4	27,05	24,8	10,3	10,5	102
CD1WT 2	32,7	60	0,38	33,51	9,28	0,36	0,29	29,86	27,64	8,75	8,48	97
CD1WT 4	38	60	1,29	49,97	9,7	0,84	0,32	33,94	29,36	8,53	8,55	100
CD1WT 5	34	60	0,63	36,29	9,81	0,52	0,36	28,64	26,17	8,82	8,7	99
CD1WT 6	34	60	0,96	28,12	8,3	0,6	0,47	22,26	18,54	7,35	6,85	93
CD1WT 9	34,6	60	0,57	34,95	8,35	0,58	0,68	30,65	23,36	7,82	7,31	93

*Em **vermelho**: animais transgênicos para *Ptx3*

Em **azul: animais do tipo selvagem CD1

Res= Resistência (cmH₂O.s/mL)

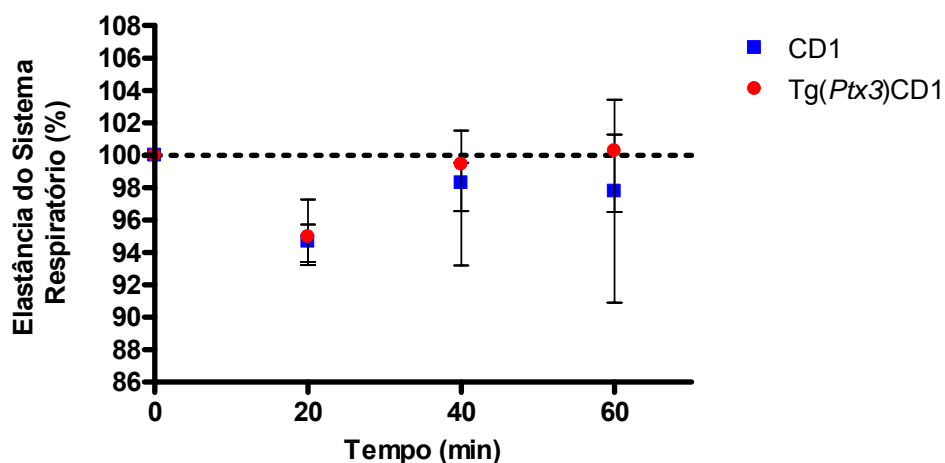
Δ Pres 1 = Pressão – Pressão Inicial em volume corrente de 10 ml/kg (cmH₂O)

Δ Pres 2 = Pressão – Pressão Inicial em volume corrente de 8 ml/kg (cmH₂O)

Eest= Elastância Pulmonar Estática (cmH₂O/mL)

6.1.6.1 Avaliação da Lesão Pulmonar em Tempos Precoces de VM em Alto Volume Corrente

A Figura 10 mostra como se comportou a Elastância Pulmonar dos seis animais de cada grupo aos 20, 40 e 60 min de ventilação mecânica. Nos tempos estudados, não detectamos diferenças significativas no aumento da elastância pulmonar em cada grupo de camundongos, nem mesmo diferença entre os grupos nos tempos determinados.



Legenda: Camundongos transgênicos para *Ptx3* e respectivos controles do tipo selvagem (Wt) foram randomizados para receber 20, 40 ou 60 minutos de ventilação mecânica em volume corrente de 45 ml/kg. O gráfico mostra a mediana e o intervalo interquartil da Elastância do Sistema Respiratório de seis animais por grupo. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos tempos estudados (Mann-Whitney).

Figura 10 - Elastância Pulmonar após 20, 40 e 60 min de ventilação mecânica.

Pela análise histomorfométrica, já aos 20 minutos de VM foram constatadas áreas afetadas com hiperdistensão, colapso, edema e infiltrado inflamatório no tecido pulmonar. Na comparação do grau de lesão entre os

transgênicos e controle Wt, observamos um discreto, porém significativo aumento no infiltrado inflamatório dos Tg(*Ptx3*)CD1, sugerindo um papel de *Ptx3* no recrutamento de células inflamatórias ao tecido danificado em estágios bem precoces de LPIV (Tabela 9).

Tabela 9 - Celularidade e parâmetros morfológicos do pulmão após ventilação mecânica em alto volume corrente por tempos fixos

Grupos	Área com Hiperdistensão, %	Colapso Alveolar, %	Edema intra-alveolar, %	Células Inflamatórias / μm^2
CD1 Controle	4 (4 - 6)	0	0	0.10 (0.07 - 0.14)
CD1 (20 min VM)	39 (35 - 45) *	7 (4 - 10) *	3 (2 - 4) *	0.95 (0.80 - 1.25) *
CD1 (40 min VM)	38 (33 - 44) *	7 (5 - 11) *	3 (2 - 5) *	1.20 (0.90 - 1.60) *
CD1 (60 min VM)	38 (35 - 41) *	10 (6 - 12) *	3 (2 - 4) *	1.55 (1.20 - 1.60) *
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 Controle	6 (4 - 9)	0	0	0.08 (0.05 - 0.10)
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 (20 min VM)	41 (30 - 43) *	9 (5 - 18) *	3 (2 - 5) *	1.40 (1.25 - 1.40) * †
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 (40 min VM)	35 (32 - 38) *	7 (3 - 13) *	3 (3 - 5) *	1.20 (1.10 - 1.35) *
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 (60 min VM)	32 (28 - 38) *	8 (5 - 13) *	3 (2 - 5) *	1.45 (1.30 - 1.65) *

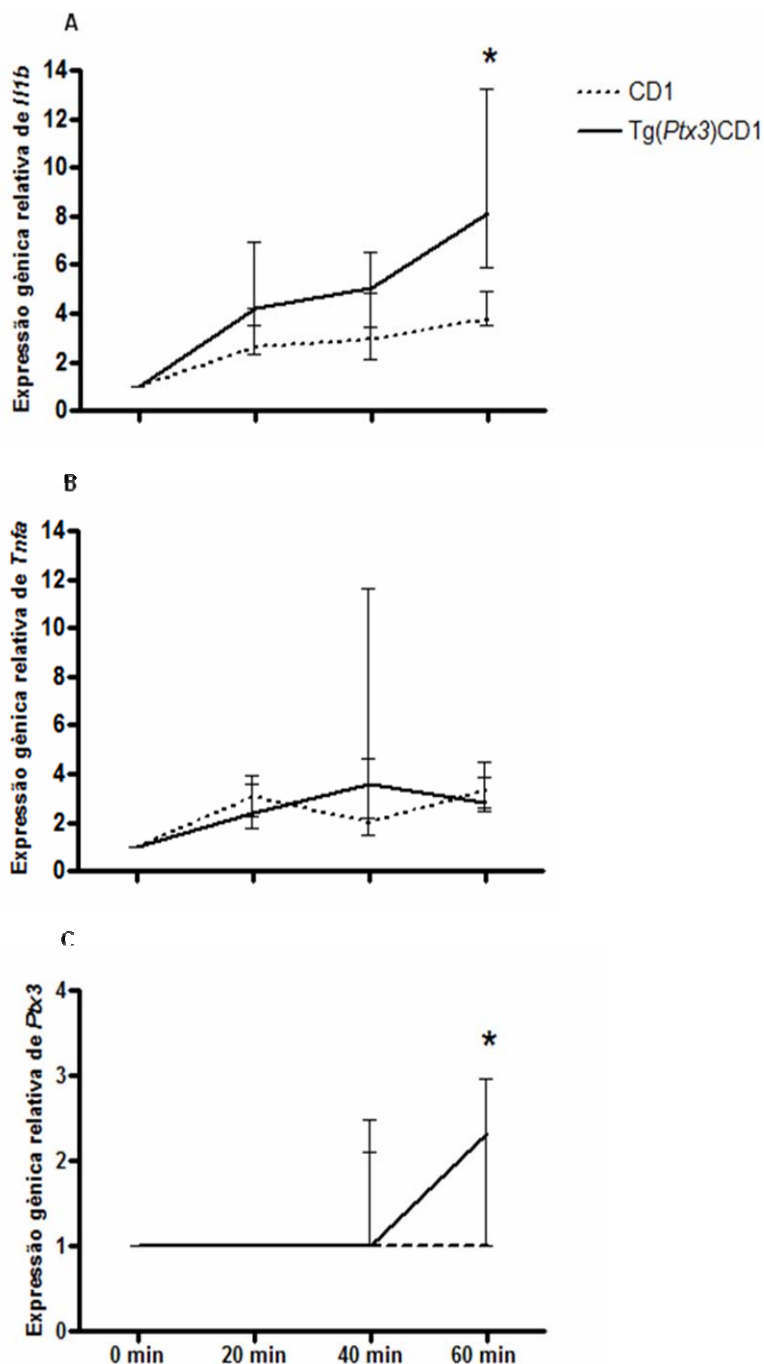
Os valores representam a mediana e o intervalo interquartil de 6 animais em cada grupo. Os dados foram obtidos a partir de 10 campos aleatoriamente escolhidos avaliados em cada amostra. Os camundongos foram submetidos à VM com 45 ml/kg de volume corrente por 20, 40 e 60 minutos. Os animais controle não foram ventilados.

* $P < 0,05$ versus grupo controle não ventilado (Mann-Whitney).

† $P = 0,0087$ versus grupo CD1 20 min VM (Mann-Whitney).

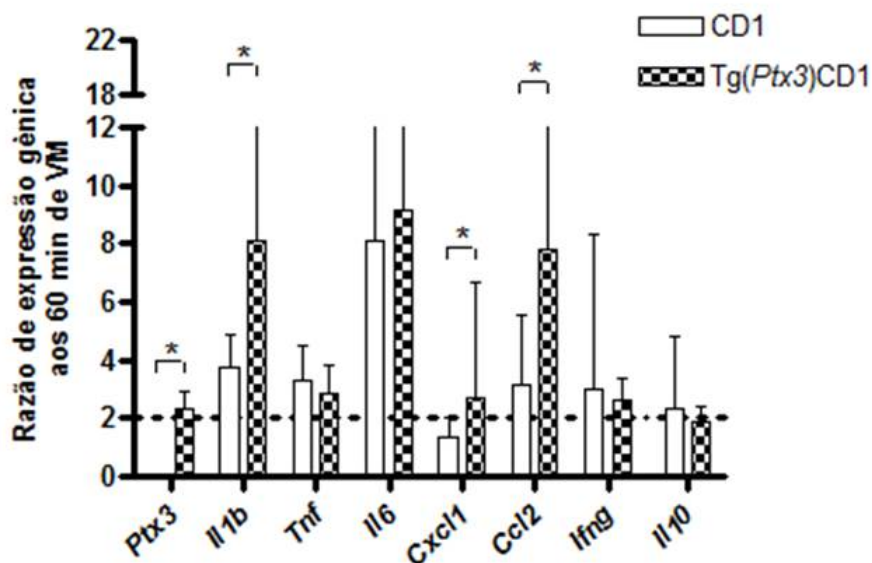
A fim de melhor entender os mecanismos pelo quais os animais transgênicos desenvolveram LPIV mais rapidamente, analisamos como se comportou a expressão de *Ptx3*, *Il1b* e *Tnfa* ao longo do tempo. Comparados aos animais Tg e CD1 não ventilados, podemos observar que *Il1b* e *Tnfa* tiveram sua expressão aumentada tanto nos animais CD1 quanto nos transgênicos após 20 minutos de VM, enquanto que os transcritos de *Ptx3* só puderam ser detectados após 40 minutos. E finalmente aos 60 minutos, a expressão gênica de *Ptx3* e *Il1b* encontra-se aumentada nos animais Tg quando comparados aos CD1 (Figura 11). Além de *Ptx3* e *Il1b*, as

quimiocinas *Cxcl1* e *Ccl2* também foram encontradas em maiores níveis conforme apresenta a Figura 12. Apesar de não termos dados protéicos dosados por ELISA devido à falta de amostras, o aumento da expressão desses mediadores inflamatórios pode justificar, pelo menos em parte, a resposta inflamatória exacerbada observada nos animais transgênicos refletida no aumento precoce de lesão pulmonar (Figura 7). A expressão protéica por imunistoquímica de IL1B e TNFA nessas amostras é descrita a seguir.



Legenda: Camundongos transgênicos para *Ptx3* e controle do tipo selvagem (CD1) foram randomizados para receber 20, 40 ou 60 minutos de ventilação mecânica em volume corrente de 45 ml/kg (n=6 animais/grupo/tempo). Os gráficos mostram o aumento da expressão gênica por PCR em tempo real de *Ptx3* (A), *Il1b* (B), *Tnfa* (C) nos animais transgênicos em relação aos mesmos animais não ventilados (linhas cheias), e o aumento da expressão em animais do tipo selvagem em relação aos mesmos camundongos não submetidos à ventilação mecânica. Ao comparar os grupos ventilados, verificou-se maior aumento nos transcritos de *Ptx3* e *Il1b* aos 60 minutos de VM nos animais transgênicos (* $P < 0,05$, Mann-Whitney).

Figura 11 - Expressão gênica de *Ptx3*, *Il1b* e *Tnfa* após 20, 40 e 60 minutos de ventilação mecânica em alto volume corrente.



Legenda: Camundongos transgênicos para *Ptx3* e CD1 (Wt) receberam 20, 40 ou 60 minutos de VM com volume corrente de 45 ml/kg. Os gráficos mostram a expressão de mediadores inflamatórios nos camundongos do tipo selvagem em relação aos mesmos animais não ventilados (barras vazias) e razão de expressão os animais transgênicos para *Ptx3* em relação aos mesmos camundongos não submetidos à VM. Os dados representam a mediana e intervalo interquartil de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ (Mann-Whitney).

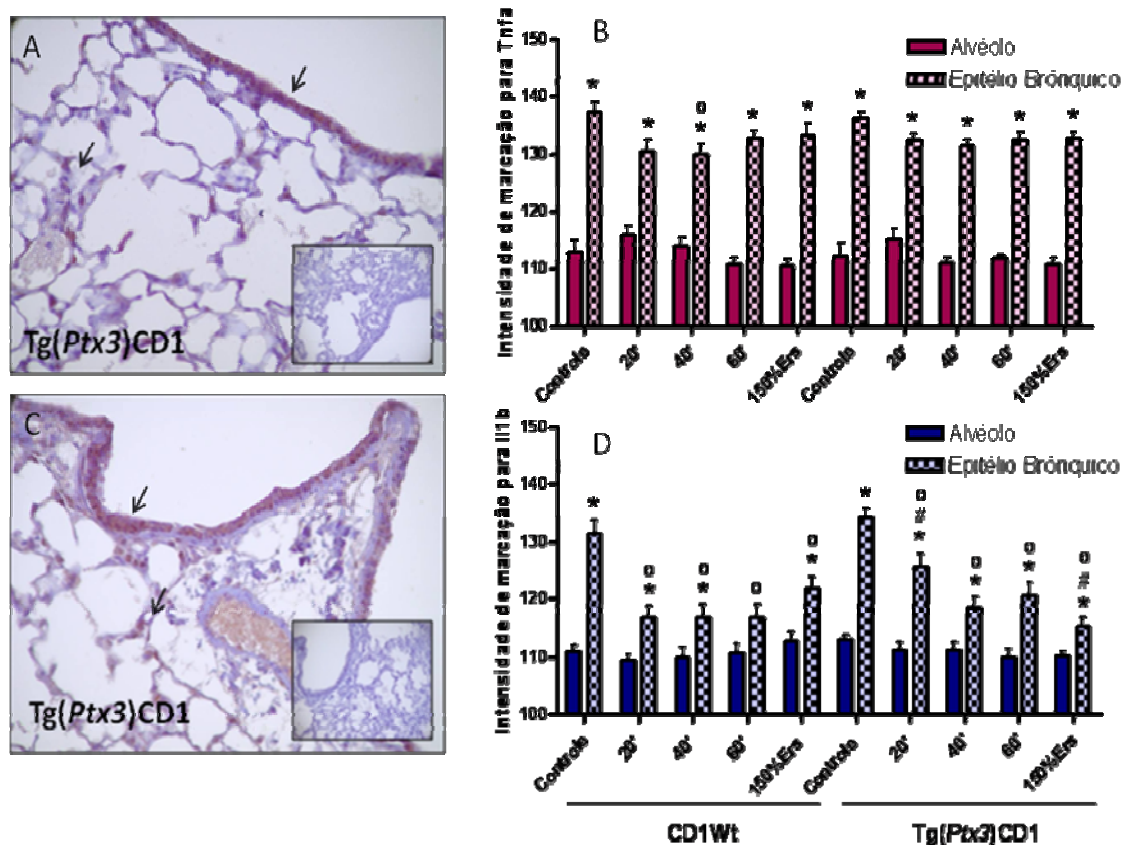
Figura 12 – Perfil de expressão gênica aos 60 minutos de ventilação mecânica em alto volume corrente.

6.1.7 Análise dos Níveis Protéicos de IL1B e TNFA em Camundongos Transgênicos para *Ptx3* e do Tipo Selvagem

A Figura 13 mostra a avaliação da expressão de IL1B e TNFA no pulmão de camundongos Tg(*Ptx3*)CD1 e tipo selvagem CD1 Wt submetidos à VM até 150% de elastância pulmonar ($E_{est}=150\%$) ou ventilados por tempos fixos de 20, 40 e 60 minutos e também dos pulmões controles não ventilados ($n=6$ /grupo). Com base no gráfico B, vimos que as células do epitélio brônquico expressam mais TNFA em comparação com as células do compartimento alveolar ($P < 0,001$), independente da linhagem de

camundongo estudada – transgênico ou tipo selvagem - e do tratamento ao qual foram submetidos. Foi visto também que as células do epitélio brônquico dos camundongos CD1 Wt ventilados por 40 minutos expressaram menos TNFA quando comparadas ao mesmo tipo celular do animal controle não ventilado ($P < 0,05$). Com exceção desta observação, os camundongos ventilados, tanto transgênicos quanto tipo selvagem, não apresentaram diferença de expressão de TNFA quando comparados com seu respectivo grupo controle não ventilado.

O gráfico D mostra que camundongos Tg(*Ptx3*)CD1 e CD1 Wt submetidos à ventilação mecânica, em comparação com respectivos grupos controle não ventilados, têm menor expressão de IL1B nas células do epitélio brônquico ($P < 0,001$), enquanto que não foram observadas alterações de níveis de expressão nos compartimentos alveolares. Seguindo o mesmo padrão de expressão de TNFA, as células brônquicas dos camundongos transgênicos e tipo selvagem submetidos à VM expressaram mais IL1B quando comparadas às células do compartimento alveolar ($P < 0,001$), com exceção do grupo CD1 Wt submetido à ventilação por 40 minutos. Foi visto que, para as células brônquicas, camundongos Tg(*Ptx3*)CD1 ventilados por 20' apresentaram maior expressão de IL1B quando comparados aos camundongos CD1 Wt submetidos ao mesmo tratamento ($P < 0,01$).



Legenda: Análise da expressão de **IL1B** e **TNFA** por Imunoistoquímica em pulmões coletados de camundongos CD1 Wt e Tg(*Ptx3*)CD1 ventilados e não ventilados (n=6/grupo). Foram usados os anticorpos anti-TNFA (R&D Systems #AF-410-NA) na concentração de 13 µg/mL (Painel A e Gráfico B) e Ac anti-IL1B (R&D Systems #AF-401-NA) na concentração de 15 µg/mL (Painel C e gráfico D). Os insertos mostram os controles negativos (anticorpo primário substituído por BSA) no aumento de 400 X. Foi utilizado um *tissue microarray* (TMA) composto por 72 amostras de pulmões dos camundongos ventilados mecanicamente ou controle não ventilados, onde 2 áreas medianas e 2 periféricas foram representadas. A marcação citoplasmática positiva foi medida através do equipamento ACIS® III (Dako's pharmDx™) com base na intensidade da marcação. * P < 0,05 da comparação entre Alvéolo e Epitélio Brônquico submetidos às mesmas condições. # P < 0,05 da comparação Tg(*Ptx3*)CD1 vs CD1 Wt submetidos às mesmas condições. ° P < 0,05 da comparação do mesmo compartimento pulmonar com camundongos controle não ventilados. Análises foram feitas por two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

Figura 13 – Análise da expressão de IL1B e TNFA por Imunoistoquímica em pulmões de camundongos Tg(*Ptx3*)CD1 e CD1.

6.2 PAPEL DE *PTX3* EM ESTRATÉGIA DE VENTILAÇÃO MECÂNICA PROTETORA AO PULMÃO UTILIZANDO BAIXO VOLUME CORRENTE

Os resultados até agora obtidos sugerem um papel relevante para *PTX3* na Lesão Pulmonar Induzida pela Ventilação Mecânica onde os camundongos transgênicos, que carregam cópias extras do gene que codifica para a proteína *PTX3*, desenvolveram a lesão mais rapidamente do que os camundongos do tipo selvagem.

Em nossa primeira abordagem experimental, utilizamos uma estratégia de ventilação mecânica agressiva com volume corrente de 45 ml/kg, uma vez que tínhamos a intenção de causar uma lesão pulmonar. Entretanto, sabendo que *Ptx3* pode desempenhar papéis opostos dependendo do grau e do estímulo da inflamação, nosso objetivo agora foi investigar como *Ptx3* se comporta em uma estratégia de ventilação mecânica minimamente agressiva ao pulmão.

Dentre as estratégias que visam minimizar tais danos encontram-se a diminuição do volume corrente e o monitoramento do pico de pressão nas vias aéreas, que evitam a hiperdistensão e lesão dos alvéolos. A utilização de Pressão Expiratória Positiva Final (“positive end expiratory pressure” - PEEP) é um recurso adjuvante protetor cujo objetivo é manter a Capacidade Residual Funcional nos pulmões (volume de ar que permanece nas vias aéreas ao final da expiração), evitando desta forma o colapso dos alvéolos e lesão pulmonar por atelectasia. Inicialmente tentamos reproduzir

as condições de ventilação mecânica previamente publicadas pelo grupo em modelos de rato, ventilando com volume corrente de 6 ml/kg e utilizando PEEP=12 cmH₂O (de CARVALHO et al. 2007), mas observamos que esses parâmetros não se adequaram ao nosso modelo experimental. Uma possível explicação seria o fato do PEEP aumentar a pressão intratorácica e por isso levar a uma diminuição do retorno venoso e do débito cardíaco, levando a morte. Novos testes com menores valores de PEEP foram realizados e conseguimos estabelecer um modelo de ventilação com Volume Corrente= 8ml/kg, PEEP= 4cmH₂O e Frequência Respiratória= 150 ciclos/minuto. Desta forma, conseguimos manter os animais vivos ao longo do procedimento de ventilação mecânica. As Tabelas 10 e 11 mostram os dados coletados durante a VM de animais transgênicos, nocautes e seus respectivos controles do tipo selvagem.

Como controle foram utilizados animais (n= 12 animais / grupo) que foram submetidos aos mesmos procedimentos anestésicos e cirúrgicos exceto a ventilação mecânica (animais “sham”).

Tabela 10 - Dados e parâmetros ventilatórios coletados durante 90 minutos de Ventilação Mecânica em baixo volume corrente de camundongos transgênicos e respectivo controle do tipo selvagem.

Animal	Peso (g)	Tempo VM (min)	Res.	Δ Pres.1	Eest.	Res.	Res.	Δ Pres.2	Δ Pres.2	Eest.	Eest.	Eest.
			Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Final
v= 10 ml/kg						v= 8 ml/kg						
CD1 1	33	90	0,39	36,19	6,89	0,42	0,40	36,40	36,13	7,09	7,56	106,57
CD1 2	40,7	90	0,36	42,54	6,10	0,35	0,35	42,42	40,82	6,32	5,95	94,18
CD1 3	35,5	90	0,34	35,70	6,75	0,35	0,37	35,47	42,51	6,67	8,57	128,48
CD1 4	40	90	0,37	43,90	6,02	0,36	0,39	44,32	44,69	6,08	6,45	106,08
CD1 5	41,7	90	0,39	49,94	6,25	0,38	0,38	51,00	51,23	6,52	6,74	103,31
CD1 6	39,6	90	0,50	42,97	6,41	0,50	0,52	42,78	43,83	6,34	7,07	111,50
CD1 1	40,2	90	0,41	43,74	6,42	0,39	0,36	43,85	43,61	6,34	6,52	102,76
CD1 2	36,4	90	0,50	42,73	7,24	0,48	0,46	43,90	44,68	7,22	7,92	109,74
CD1 3	42,3	90	0,46	44,03	6,00	0,45	0,44	44,26	43,71	6,03	6,31	104,59
CD1 4	35,4	90	0,34	35,50	6,42	0,36	0,32	34,93	36,83	6,49	6,97	107,43
CD1 5	38,6	90	0,40	40,03	6,53	0,40	0,43	40,09	40,83	6,69	6,89	102,87
CD1 6	36	90	0,39	41,89	6,89	0,39	0,41	42,33	43,97	7,14	8,08	113,15
Tg(Ptx3)CD1 1	36,2	90	0,49	45,85	7,92	0,47	0,48	46,50	47,09	7,58	8,20	108,24
Tg(Ptx3)CD1 2	37,4	90	0,38	38,50	6,71	0,39	0,34	38,20	37,63	6,61	6,66	100,70
Tg(Ptx3)CD1 3	36,4	90	0,39	42,95	7,11	0,37	0,42	43,59	43,39	7,13	7,29	102,22
Tg(Ptx3)CD1 4	32	90	0,39	38,63	7,71	0,43	0,36	38,63	38,79	7,91	8,11	102,53
Tg(Ptx3)CD1 5	34,3	90	0,41	72,82	8,84	0,37	0,42	34,38	37,79	7,22	8,13	112,60
Tg(Ptx3)CD1 6	37,2	90	0,42	45,74	7,13	0,40	0,42	47,20	47,21	7,06	8,14	115,31
Tg(Ptx3)CD1 1	42,3	90	0,35	42,01	5,83	0,34	0,39	42,37	42,54	5,86	5,80	99,00
Tg(Ptx3)CD1 2	41,3	90	0,38	44,81	6,37	0,37	0,38	44,36	44,62	6,34	6,20	97,65
Tg(Ptx3)CD1 3	31,2	90	0,45	48,68	16,79	-1,44	0,42	73,83	52,61	9,91	17,28	174,42
Tg(Ptx3)CD1 4	33,8	90	0,60	41,62	8,77	0,63	0,89	41,42	41,20	8,39	7,74	92,25
Tg(Ptx3)CD1 5	36,6	90	0,38	36,32	6,60	0,39	0,43	35,81	36,93	6,74	6,94	102,97
Tg(Ptx3)CD1 6	33,4	90	0,44	37,25	7,33	0,47	0,46	36,76	38,32	7,44	7,94	106,76

*Em **vermelho**: animais que receberam Salina

Em **azul: animais que receberam Azul de Evans

Res= Resistência (cmH₂O.s/mL)

Δ Pres 1 = Pressão – Pressão Inicial em volume corrente de 10 ml/kg (cmH₂O)

Δ Pres 2 = Pressão – Pressão Inicial em volume corrente de 8 ml/kg (cmH₂O)

Eest= Elastância Pulmonar Estática (cmH₂O/mL)

Tabela 11 - Dados e parâmetros ventilatórios coletados durante 90 minutos de Ventilação Mecânica em baixo volume corrente de camundongos nocautes e respectivo controle do tipo selvagem.

Animal	Peso (g)	Tempo VM (min)	Res.	Δ Pres.1	Eest.	Res.	Res.	Δ Pres.2	Δ Pres.2	Eest.	Eest.	Eest.
			Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Final
v= 10 ml/kg						v= 8 ml/kg						
Ptx3 ^{+/+} 1	29,2	90	0,52	41,10	9,67	0,50	0,47	39,20	38,06	9,43	9,31	99
Ptx3 ^{+/+} 2	24,8	90	0,51	35,96	10,37	0,50	0,49	33,10	33,97	10,27	9,93	97
Ptx3 ^{+/+} 3	28,9	90	0,51	38,72	8,67	0,47	0,48	36,93	36,96	8,32	8,79	106
Ptx3 ^{+/+} 4	23	90	0,63	37,42	11,66	0,63	0,50	35,05	35,13	11,21	9,78	87
Ptx3 ^{+/+} 5	25,7	90	0,51	35,49	9,24	0,50	0,49	32,85	34,13	9,30	9,14	98
Ptx3 ^{+/+} 6	25,5	90	0,59	40,24	11,42	0,57	0,58	38,30	38,29	10,69	10,94	102
Ptx3 ^{+/+} 1	28,8	90	0,46	38,68	9,07	0,43	0,42	36,69	36,44	9,29	8,32	90
Ptx3 ^{+/+} 2	27,4	90	0,53	38,99	11,02	0,50	0,46	38,99	38,96	11,04	10,26	93
Ptx3 ^{+/+} 3	23,9	90	0,56	38,84	12,09	0,54	0,48	35,23	34,91	11,84	10,34	87
Ptx3 ^{+/+} 4	27,4	90	0,55	40,64	10,49	0,51	0,48	38,94	39,50	10,22	9,55	93
Ptx3 ^{+/+} 5	26,5	90	0,60	37,00	10,88	0,57	0,60	35,40	35,17	10,60	10,74	101
Ptx3 ^{+/+} 6	26,3	90	0,47	32,67	9,23	0,47	0,43	30,58	30,46	9,16	9,85	108
Ptx3 ^{-/-} 1	30,2	90	0,44	40,65	8,90	0,44	0,41	39,68	39,55	8,36	8,63	103
Ptx3 ^{-/-} 2	25,7	90	0,48	33,22	10,25	0,48	0,47	32,01	32,08	9,73	8,90	91
Ptx3 ^{-/-} 3	29,1	90	0,45	39,78	8,75	0,44	0,45	37,92	38,73	8,60	8,58	100
Ptx3 ^{-/-} 4	23,8	90	0,52	35,11	11,36	0,51	0,52	32,23	32,19	11,39	9,93	87
Ptx3 ^{-/-} 5	28,7	90	0,50	40,47	9,48	0,48	0,49	38,48	38,36	9,13	8,63	95
Ptx3 ^{-/-} 6	25,5	90	0,65	41,97	11,89	0,60	0,55	40,75	40,83	10,90	11,55	106
Ptx3 ^{-/-} 1	28,6	90	0,47	38,72	8,68	0,44	0,40	36,95	38,07	9,18	10,53	115
Ptx3 ^{-/-} 2	25,8	90	0,50	32,14	9,25	0,51	0,48	31,17	32,31	9,24	8,58	93
Ptx3 ^{-/-} 3	26,7	90	0,45	35,84	9,79	0,45	0,44	34,18	35,07	9,56	9,68	101
Ptx3 ^{-/-} 4	27	90	0,45	32,43	8,55	0,42	0,40	30,70	33,29	8,04	8,01	100
Ptx3 ^{-/-} 5	28,1	90	0,53	38,05	9,83	0,49	0,48	36,11	36,54	9,57	9,94	104
Ptx3 ^{-/-} 6	25	90	0,56	36,89	11,28	0,56	0,53	34,51	35,07	10,46	11,71	112

*Em **vermelho**: animais que receberam Salina

Em **azul: animais que receberam Azul de Evans

Res= Resistência (cmH₂O.s/mL)

Δ Pres 1 = Pressão – Pressão Inicial em volume corrente de 10 ml/kg (cmH₂O)

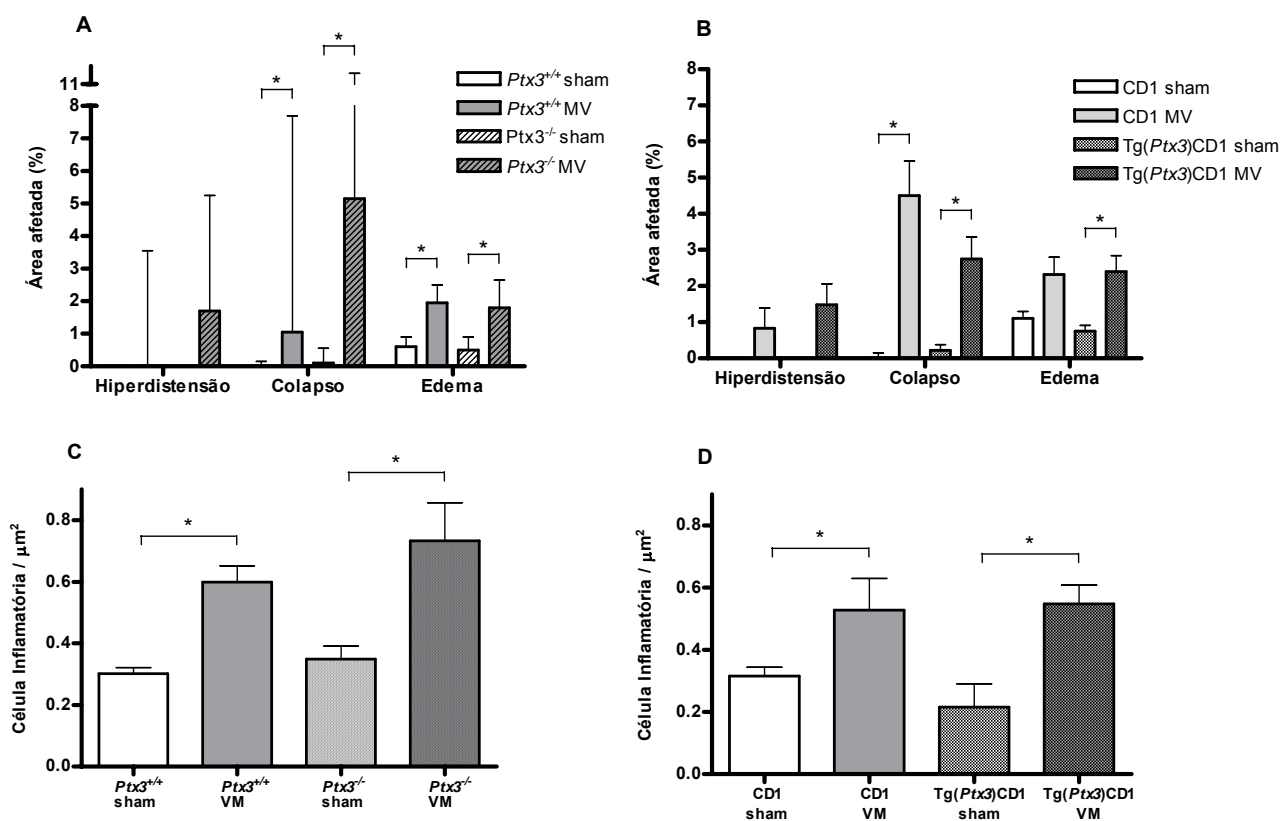
Δ Pres 2 = Pressão – Pressão Inicial em volume corrente de 8 ml/kg (cmH₂O)

Eest= Elastância Pulmonar Estática (cmH₂O/mL)

6.2.1 Avaliação da Lesão Pulmonar Induzida pela Ventilação Mecânica em Baixo Volume Corrente

A análise histomorfométrica (Figura 14) após 90 min de VM em condições minimamente lesivas revelou a existência de áreas afetadas com colapso, edema intra-alveolar e infiltrado inflamatório nos animais ventilados em comparação aos mesmos controles sham. Entretanto, o grau de lesão pulmonar entre os grupos ventilados foi bastante similar.

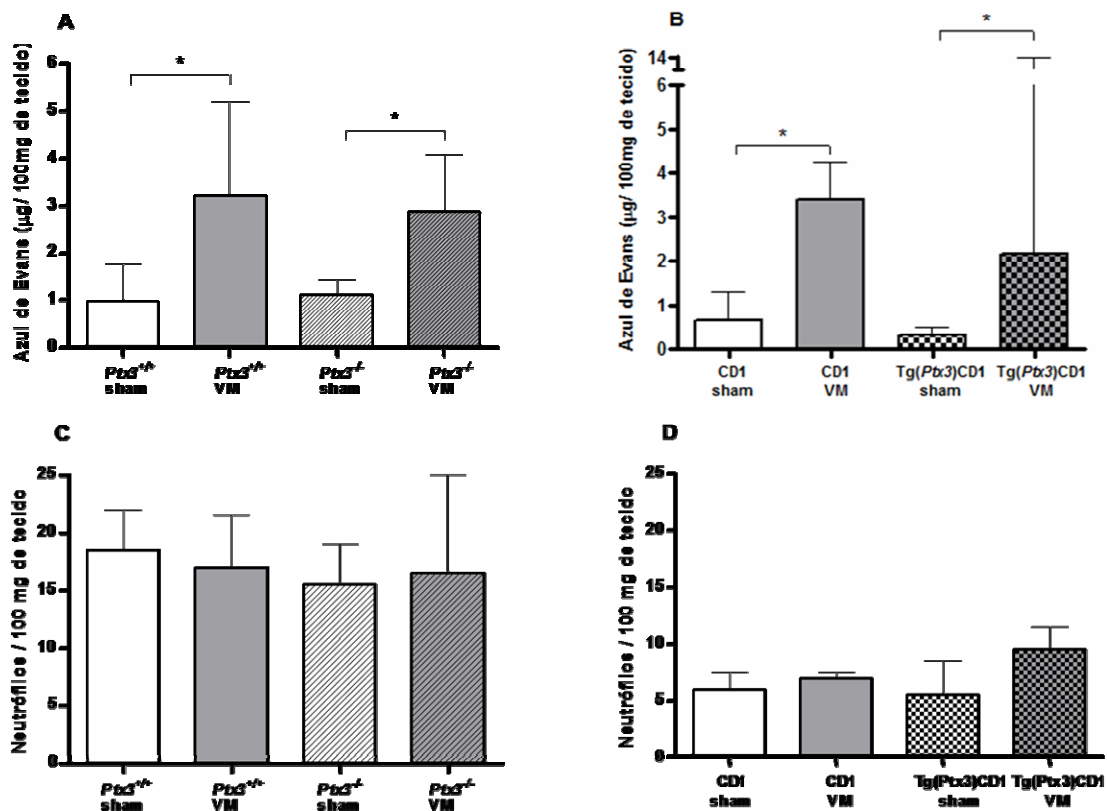
A permeabilidade vascular e o infiltrado neutrofílico, também foram estimados pela medida do extravasamento do Azul de Evans e dosagem de mieloperoxidase, conforme mostra a Figura 15.



Legenda: Camundongos transgênicos (B e D), nocautes (A e D) e respectivo controles do tipo selvagem CD1 foram submetidos à ventilação mecânica em volume corrente de 8 ml/kg por 90 minutos. Os gráficos mostram a porcentagem de área com hiperdistensão, colapso, edema intra-alveolar (A e B), e infiltrado inflamatório (C e D) que apresentaram os grupos submetidos (barras vazias) ou não (barras brancas) à ventilação mecânica (n=6). É possível observar aumento de área afetada com edema, colapso e infiltrado entre os animais ventilados e os controles Sham (n=6/grupo). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos submetidos à VM.

* P<0,05, Mann-Whitney.

Figura 14 – Análise Histomorfométrica pulmonar de camundongos submetidos à ventilação mecânica em baixo volume corrente.



Legenda: Camundongos transgênicos (painéis B e D), nocautes (A e B) e respectivos controle do tipo selvagem foram submetidos à ventilação mecânica em volume corrente de 8 ml/kg por 90 minutos, e os pulmões foram destinados a quantificação do corante Azul de Evans (gráficos A e B) e a dosagem de mieloperoxidase (gráficos C e D). Não foi encontrada diferença significativa entre os camundongos ventilados. Os dados representam os valores de 5 a 6 animais por grupo.

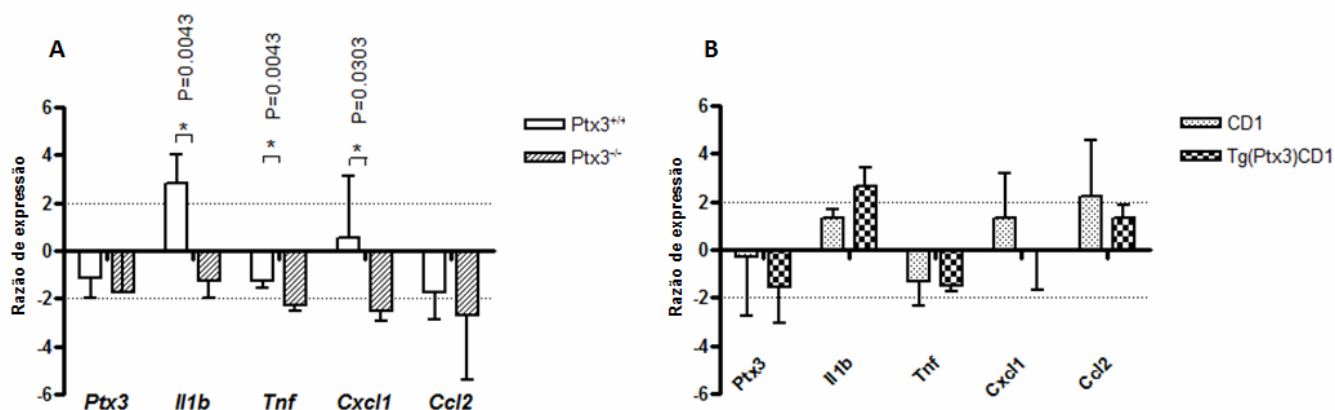
* $P < 0,05$, Mann-Whitney.

Figura 15 – Quantificação do Edema e do infiltrado neutrofílico pulmonar após ventilação mecânica protetora.

6.2.2 Perfil de Expressão Gênica após Ventilação Mecânica em Baixo Volume Corrente

A análise e os valores obtidos do cálculo da expressão diferencial (*fold*) de cada animal transgênico, nocaute e controles do tipo selvagem foi feita em relação aos mesmos grupos controle não-ventilados e são apresentados na Figura 16. Observamos que após ventilação mecânica

protetora, os mediadores inflamatórios estudados não apresentaram diferença de expressão gênica em relação aos pulmões saudios não ventilados. Deve-se ressaltar que não consideramos significativos razões de expressão (*folds*) maiores ou menores do que 2 devido a possíveis limitações e erros da técnica de PCR em tempo real. Entretanto, podemos notar que o aumento da expressão de *Il1b* no pulmão dos camundongos *Ptx3*^{+/-} foi maior do que o aumento encontrado nos animais nocautes. Esse resultado vai de encontro aos dados prévios de expressão gênica e protéica obtidos após VM até 150% de elastância pulmonar, sugerindo mais uma vez que *Ptx3* amplifica a produção de *Il1b*.



Legenda: Camundongos foram submetidos à ventilação mecânica por 90 minutos com volume corrente = 8ml/kg e PEEP=4 cmH₂O e o RNA do pulmão foi extraído para análise por PCR em tempo real. Os gráficos mostram a razão de expressão relativa de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos ventilados no pulmão dos camundongos nocautes e do tipo selvagem (A), e no pulmão dos transgênicos e CD1 do tipo selvagem (B), em comparação com os correspondentes grupos de controle não-ventilados. A amplificação do gene *Hprt1* foi usada para normalização dos dados. Os valores representam a mediana e intervalo interquartil de 5 a 6 animais por grupo e as diferenças significativas são indicadas (*P<0,05, Mann-Whitney).

Figura 16 – Análise do perfil de expressão gênica após ventilação mecânica protetora.

6.2.3 Expressão Protéica de Mediadores Inflamatórios em Resposta à VM em Baixo Volume Corrente

As concentrações de IL1B, TNFA, CXCL1 e CCL2 foram avaliadas por ELISA no pulmão de camundongos (n= 5-6 / grupo) transgênicos, nocautes e respectivas linhagens do tipo selvagem após 90 minutos de ventilação mecânica protetora. A Tabela 12 mostra mais uma vez maiores níveis de IL1B no pulmão dos animais nocautes ventilados em relação ao controle do tipo selvagem também ventilado.

Tabela 12 - Expressão protéica pulmonar de mediadores inflamatórios em resposta à VM em baixo volume corrente.

		IL1B	TNFA	CXCL1	CCL2
CD1	Controle	629 (279)	666 (378)	51774 (21385)	120 (54)
	VM	507 (166)	326 (92)	30356 (6024)	119 (65)
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1	Controle	561 (177)	670 (251)	50951 (11416)	132 (37)
	VM	460 (197)	435 (201)	34549 (18567)	86 (37)
<i>Ptx3</i> ^{+/+}	Controle	484 (100)	464 (109)	41074 (11293)	87 (26)
	VM	571 (80)	501 (132)	45264 (17739)	77 (15)
<i>Ptx3</i> ^{-/-}	Controle	670 (238)	650 (262)	57718 (17316)	135 (54)
	VM	343 (100) [†]	354 (75) [*]	45587(15261)	83 (76)

Resultados representam a média e desvio padrão de 5 a 6 animais por grupo expressos em pg/100 mg de tecido pulmonar. ^{*}P<0,05 da comparação com respectivo grupo controle não ventilado. [†]P<0.05 da comparação entre *Ptx3*^{-/-} e *Ptx3*^{+/+} submetidos à ventilação mecânica. Análises feitas pelo teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

6.3 IMPACTO DO TRATAMENTO COM PENTOXIFILINA

Um dos braços desse projeto buscou estudar o impacto de inibidores farmacológicos de TNFA e IL1B em animais modificados geneticamente

para *Ptx3*, uma vez que esses mediadores inflamatórios são capazes de induzir a expressão de PTX3. A imunomodulação da LPIV relacionada à expressão de *Ptx3* foi testada através do uso da Pentoxifilina. A hipótese seria que os animais transgênicos tratados com PTOX levariam mais tempo para o aparecimento da lesão quando comparados aos mesmos tratados apenas com salina.

Inicialmente, investigamos a ação anti-inflamatória da PTOX na dose de 50 mg/kg + 50 mg/kg/h a cada 10min por 1 hora, em camundongos transgênicos submetidos à ventilação mecânica agressiva (volume corrente= 45ml/kg e _{zero}PEEP). Os registros da elastância do sistema respiratório foram feitos a cada 10 minutos até observarmos aumento de 50% no seu valor basal. A Tabela 13 mostra os principais dados coletados durante o experimento.

Tabela 13 - Dados e parâmetros respiratórios coletados durante Ventilação Mecânica até 50% de aumento na elastância pulmonar de camundongos transgênicos para *Ptx3* tratados com Pentoxifilina (50 mg/kg) ou Salina.

Animal	Peso (g)	Res.	Δ Pres.1	Eest.	Res.	Res.	Δ Pres.2	Δ Pres.2	Eest.	Eest.	Eest.	Tempo VM (min)
		Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Final (%)	
		v= 10 ml/kg			v= 45 ml/kg							
Salina												
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 1	37.5	0.38	28.44	8.21	0.33	0.4	24	38.19	7.22	11.43	158	180
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 2	41	0.42	41.73	7.15	0.34	1.48	38.56	63.15	7.16	15.71	160	100
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 3	46.7	0.37	35.56	7.32	0.34	0.85	35.54	60.19	7.33	11.02	156	170
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 4	39.2	0.49	24.6	6.16	0.46	0.6	21.76	32.14	5.86	13.53	195	180
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 5	39.3	0.4	31.4	7.04	0.34	1.82	28.09	38.27	6.51	11.61	176	120
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 6	33.5	0.53	26.09	7.95	0.35	0.78	21.11	40.05	6.86	11.82	167	130
Pentoxifilina												
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 1	36.2	0.47	27.43	7.26	0.4	0.63	22.4	31.95	6.45	10.51	177	140
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 2	40.2	0.37	28.96	7.69	0.3	0.75	26.38	36.82	7.09	11.4	161	200
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 3	40.6	0.48	40.01	7.8	0.42	3.73	37.26	58.83	7.58	19.11	151	100
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 4	43.8	0.47	34.24	6.41	0.42	3.61	32.92	47.04	6.44	10.96	177	110
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 5	42	0.46	38.51	6.98	0.4	0.52	35.49	51.39	6.59	11.52	173	100
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 6	41.8	0.39	38.13	6.66	0.37	0.92	37.19	54.76	6.25	18.8	183	70

*Em azul: animais controle Transgênicos para PTX3 tratados com Salina

*Em vermelho: animais Transgênicos para PTX3 tratados com 50 mg/kg Pentoxifilina

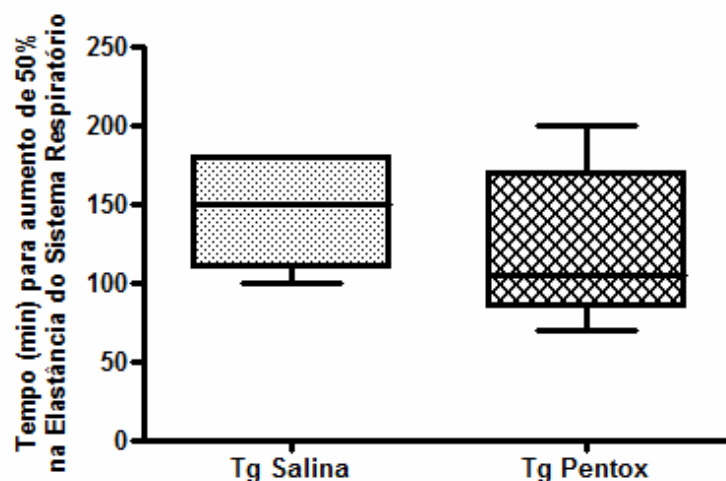
Res= Resistência (cmH₂O.s/mL)

Δ Pres 1= Pressão - Pressão Inicial em volume corrente = 10 ml/kg (cmH₂O)

Δ Pres 2= Pressão - Pressão Inicial em volume corrente = 45 ml/kg (cmH₂O)

Eest= Elastância Estática (cmH₂O/mL)

O tempo médio que o grupo tratado com 50 mg/kg de pentoxifilina levou para aumentar 50% no valor inicial da Elastância Pulmonar foi de 147 \pm 34 min enquanto que o grupo salina levou em média 120 \pm 45 min. Aplicando o teste de Mann-Whitney, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 17).



Legenda: Camundongos transgênicos para *Ptx3* foram tratados com Pentoxifilina (50mg/kg mais 8,3mg/kg/10min por 1 hora) ou Salina e submetidos à ventilação mecânica com volume corrente de 45 ml/kg até que a elastância atingisse 150%. O gráfico mostra o tempo que cada grupo levou para atingir o valor de 150% de Elastância Pulmonar. O tempo que os grupos levaram não foi estatisticamente diferente ($p=0,3095$, Mann-Whitney). Os valores são representativos de 6 animais por grupo.

Figura 17 – Tempo necessário para ocorrência de Lesão Pulmonar Induzida pelo Ventilador após tratamento com 50 mg/kg de Pentoxifilina.

Da mesma forma, os níveis protéicos de IL1B e TNFA nas amostras de soro, pulmão e Lavado Broncoalveolar foram iguais, indicando que o tratamento anti-inflamatório testado não foi eficaz (Tabela 14).

Tabela 14 - Dosagem protéica de IL1B e TNFA em camundongos transgênicos para *Ptx3* após VM em alto volume corrente e tratamento com 50 mg/kg de Pentoxifilina.

		IL1B	TNFA	
Tg(<i>Ptx3</i>)CD1	Salina	Soro (pg/ml)	573 (155)	n/d
		Pulmão (pg/mg proteína total)	2027 (263)	864 (198)
		LBA (pg/ mg proteína total)	1200 (514)	277 (182)
	PTOX 50 mg/kg	Soro (pg/ml)	786 (420)	n/d
		Pulmão (pg/mg proteína total)	1985 (770)	936 (384)
		LBA (pg/ mg proteína total)	1080 (659)	598 (738)

Resultados representam a média e desvio padrão de 5 a 6 animais por grupo expressos em pg/ml de soro ou pg/mg de proteína total no pulmão e lavado broncoalveolar. *ND* = não detectado ou abaixo do limite de detecção do ensaio. Nenhuma diferença estatisticamente foi encontrada após análise pelo teste two-way ANOVA.

Ainda numa tentativa de observar o efeito anti-inflamatório da pentoxifilina, repetimos o experimento aumentando a dose para 100 mg/kg ip antes dos procedimentos cirúrgicos, seguidos por 100 mg/kg/h ip a cada 10 minutos durante todo o procedimento da VM ($V_T=45$ ml/kg), até observamos aumento de 50% na Elastância Pulmonar. Os dados coletados são apresentados na tabela a seguir (Tabela 15).

Tabela 15 - Dados coletados durante a VM em alto volume corrente de animais transgênicos tratados com 100 mg/kg de Pentoxifilina.

Animal	Peso (g)	Res.	Δ Pres.1	Eest.	Res.	Res.	Δ Pres.2	Δ Pres.2	Eest.	Eest.	Eest.	Tempo VM (min)
		Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Final (%)	
		v= 10 ml/kg				v= 45 ml/kg						
Salina												
Tg(Ptx3)CD1 1	34	0,53	39,71	9,74	0,4	0,63	31,29	48,96	8,85	18,53	209	90
Tg(Ptx3)CD1 2	31,6	0,58	37,72	9,67	0,49	0,77	29,11	41,62	8,76	20,99	240	80
Tg(Ptx3)CD1 3	28,8	0,49	33,9	11,06	0,43	2,08	28,54	43,17	9,11	28,67	315	60
Tg(Ptx3)CD1 4	30	0,51	33,32	9,91	0,42	0,66	26,98	40,44	8,9	16,4	184	130
Pentoxifilina												
Tg(Ptx3)CD1 1	34,50	0,36	27,73	8,25	0,33	0,42	22,85	34,15	7,36	13,56	184	90
Tg(Ptx3)CD1 2	39,30	0,37	37,00	7,15	0,32	0,48	34,96	44,29	6,93	15,63	226	70
Tg(Ptx3)CD1 3	44,90	0,21	36,32	6,37	0,21	2,14	33,77	62,40	6,25	18,55	297	70
Tg(Ptx3)CD1 4	33,20	0,48	33,63	8,98	0,39	2,69	27,39	45,13	8,04	19,43	242	90

*Em azul: animais controle Transgênicos para PTX3 tratados com Salina

*Em vermelho: animais Transgênicos para PTX3 tratados com 100 mg/kg Pentoxifilina

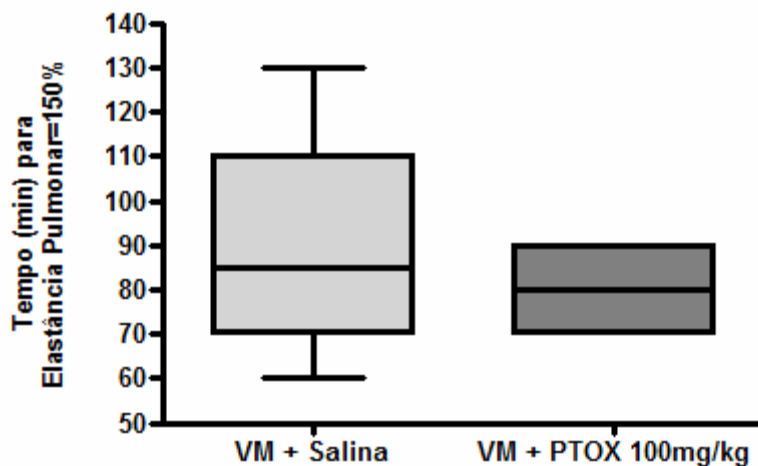
Res= Resistência (cmH₂O.s/mL)

Δ Pres 1= Pressão - Pressão Inicial em volume corrente = 10 ml/kg (cmH₂O)

Δ Pres 2= Pressão - Pressão Inicial em volume corrente = 45 ml/kg (cmH₂O)

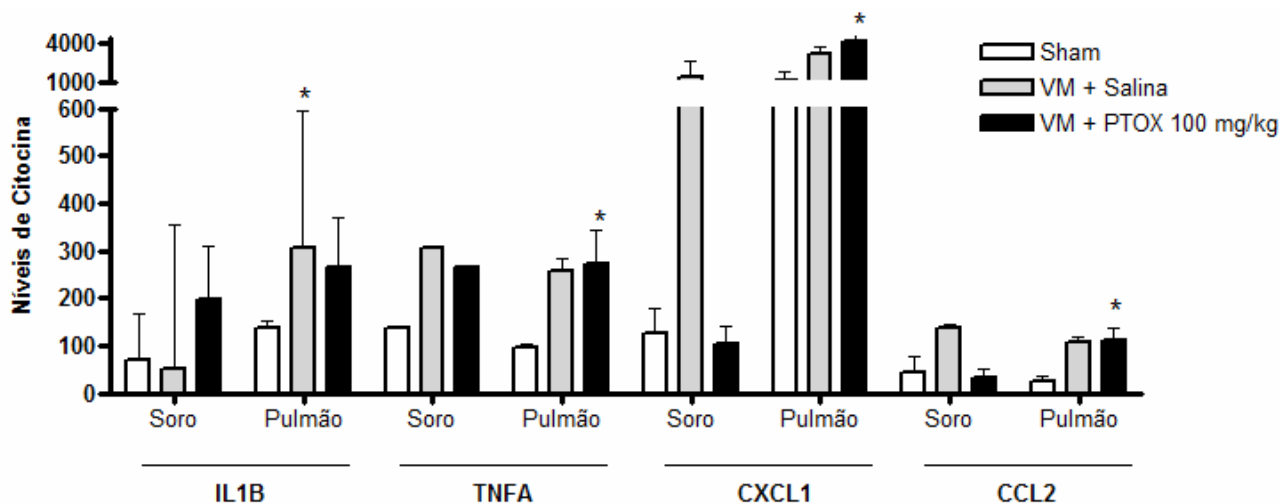
Eest= Elastância Estática (cmH₂O/mL)

Observamos que o tratamento na dose de 100 mg/kg nos camundongos transgênicos (n=4/grupo) não aumentou o tempo para aparecimento da LPIV (80 ± 11 min) quando comparado ao grupo controle salina (90 ± 29 min) (Figura 18). No entanto, a nível protéico, é possível notar uma tendência na redução dos níveis protéicos séricos de TNFA, CXCL1 e CCL2 (Figura 19).



Legenda: Camundongos transgênicos para *Ptx3* foram tratados com Pentoxifilina (100mg/kg + 100 mg/kg/h) ou Salina intraperitonealmente e submetidos à ventilação mecânica com volume corrente de 45 ml/kg até que a elastância atingisse 150%. O gráfico mostra o tempo que cada grupo levou para atingir o valor de 150% de Elastância Pulmonar. O tempo que os grupos levaram não foi estatisticamente diferente ($p=0,8857$, Mann-Whitney). Os valores são representativos de 4 animais por grupo.

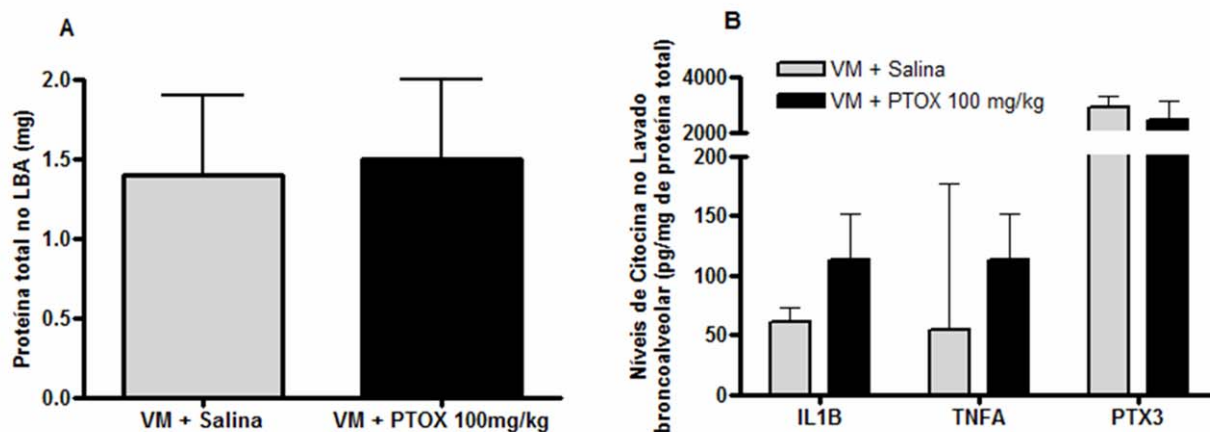
Figura 18 – Tempo necessário para aumento da Elastância Pulmonar após 100 mg/kg de Pentoxifilina em camundongos transgênicos para *Ptx3*.



Legenda: Camundongos transgênicos para *Ptx3* foram tratados com Pentoxifilina (100mg/kg + 100 mg/kg/h) ou Salina intraperitonealmente. O gráfico mostra mediana e intervalo de citocinas dosadas por ELISA no Soro (pg/ml) e Pulmão (pg/mg proteína total) de 3 a 4 animais por grupo após VM com $V_T=45$ ml/kg até aumento de 50% na elastância pulmonar. * $P<0,05$ em comparação com grupo Sham ("Dunn's Multiple Comparison Test", $P<0,05$ Kruskal-Wallis).

Figura 19 – Níveis protéicos de citocinas após VM em alto volume corrente e tratamento com 100 mg/kg de Pentoxifilina.

A quantidade de proteína total dosada por Bradford no lavado broncoalveolar dos animais tratados ou não com pentoxifilina foi similar (Figura 20A). Observamos a presença de PTX3 em níveis bastante altos, mas uma diferença significativa não pode ser percebida entre os grupos tratados com PTOX 100 mg/kg ou salina (Figura 20B).



Legenda: Camundongos transgênicos para *Ptx3* foram tratados com Pentoxifilina (100mg/kg + 100 mg/kg/h) ou Salina intraperitonealmente e ventilados até 150% de elastância pulmonar com 45 ml/kg de volume corrente. Os gráficos mostram a mediana e intervalo de 3 a 4 animais / grupo da dosagem de proteína total encontrada pelo método de Bradford (gráfico A), e de citocinas (gráfico B) por ELISA no lavado broncoalveolar. Nenhum valor estatisticamente significativo foi encontrado pelo teste de Mann-Whitney.

Figura 20 – Concentração de proteínas e citocinas no lavado broncoalveolar após VM e tratamento com 100 mg/kg de Pentoxifilina em camundongos transgênicos para *Ptx3*.

7 DISCUSSÃO

O desenvolvimento da lesão pulmonar induzida pelo ventilador têm impacto significativo na resolução de pacientes com SARA (AMATO et al. 1998) e apesar da inflamação ser considerada como um fator importante na patogênese da LPIV, nem todos os mecanismos envolvidos nesta lesão são devidamente conhecidos. Apesar da proteína PTX3 ser expressa em resposta à VM (OKUTANI et al. 2007) e ser produzida por células epiteliais alveolares e bronquiolares em resposta a TNFA (DOS SANTOS et al. 2004; HE et al. 2007), pouco se sabe a respeito do seu papel na LPIV. Usando camundongos transgênicos e nocautes para *Ptx3*, nós mostramos pela primeira vez o impacto dessa pentraxina no dano ao tecido pulmonar revelando seu papel na patogênese da LPIV.

Neste estudo, observamos em todos os animais que as mudanças histopatológicas promovidas pela ventilação mecânica foram acompanhadas por alterações no perfil de expressão gênica de *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Cxcl1* e *Ccl2* no tecido pulmonar. Apesar de esses mediadores serem bem caracterizados na LPIV (TREMBLAY et al. 1997; HALBERTSMA et al. 2005; FRANK et al. 2006), vimos que a VM aumentou também a expressão dos transcritos de *Ptx3* no pulmão. Isso vai de encontro a trabalhos recentemente publicados que mostraram a relação dos níveis de PTX3 com o grau da lesão pulmonar em ratos submetidos à VM em alto volume corrente (OKUTANI et al. 2007). Em pacientes com SARA que receberam suporte ventilatório, a maior

quantidade sérica de PTX3 foi o único fator que correlacionou com a mortalidade (n=21 pacientes), apontando para o potencial dessa proteína como um marcador de severidade de lesão pulmonar (MAURI et al. 2008).

Um achado importante observado é o desenvolvimento mais rápido da lesão pulmonar em resposta à VM em alto volume corrente pelos camundongos que super expressam *Ptx3*. Consistente com esse dado, estudos preliminares do nosso grupo revelaram o impacto crítico de *Ptx3* na resposta inflamatória, apresentando funções distintas dependendo da natureza do insulto e da quantidade de *Ptx3* expressa. Enquanto a produção de *Ptx3* foi vantajosa e reduziu a mortalidade em consequência de choque endotóxico ou ligação e perfuração do ceco (DIAS et al. 2001), por outro lado, sua produção aumentada foi extremamente deletéria em um modelo de isquemia e reperfusão intestinal, aumentando o dano tecidual e a mortalidade em camundongos (SOUZA et al. 2002; SOUZA et al. 2009). O sistema imune inato possui mecanismos para defender o hospedeiro contra patógenos e também para curar os tecidos lesados, mas a magnitude do processo inflamatório é bastante crucial, uma vez que respostas excessivas estão associadas à morbidade e mortalidade de muitas doenças.

A análise da expressão gênica revelou maior aumento de RNAm de *Tnfa* nos camundongos transgênicos (que desenvolveram a LPIV mais rápido) quando comparados aos controles do tipo selvagem, mesmo quando ambos apresentaram o mesmo grau de lesão pulmonar. A nível protéico, essa diferença não foi confirmada. Nos camundongos transgênicos também observamos que IL1B (soro) e TNFA (pulmão) diminuíram significativamente

em relação aos mesmos animais controle não ventilados, enquanto que CCL2/MCP1 aumentou no pulmão após a VM. Esse mesmo perfil de expressão protéica foi observado no pulmão de ratos submetidos à VM ($V_T=42$ ou 7 ml/kg) por 2 horas (RICARD et al. 2001). O grupo concluiu que a VM não foi suficiente para liberação de TNFA ou IL1B, cujos níveis eram menores nos animais ventilados com alto volume em comparação com os ratos ventilados em baixo volume corrente, usados como grupo controle no estudo. Além disso, esse mesmo grupo observou que independentemente do volume corrente usado na estratégia de ventilação, houve um aumento da produção de MIP-2 (monocyte chemotatic protein-1).

Os RNAs de *Tnfa* e *Il1b* foram encontrados aumentados logo aos 20 minutos e antecederam a expressão de *Ptx3*, detectado somente após 40 min de VM, mostrando que a resposta inflamatória inicial desencadeada pela VM precede a expressão gênica de *Ptx3*. Em 60 minutos, *Il1b*, *Ptx3*, *Cxcl1* e *Ccl2* estavam presentes em maior quantidade no pulmão dos camundongos transgênicos quando comparados ao controle CD1, apesar de ambos terem apresentado mesmo grau de lesão pulmonar. A maior expressão de *Ptx3* também esteve associada com recrutamento precoce de células inflamatórias no pulmão aos 20 minutos de VM.

O rápido acúmulo de neutrófilos é uma característica presente na patogênese da LPIV (CHOUDHURY et al. 2004), e *Cxcl1*, um potente quimioatraente de neutrófilos, já foi descrita como importante citocina envolvida no seqüestro dessas células inflamatórias. Em camundongos ventilados com alto volume corrente, o bloqueio do seu receptor CCR2 não

só diminuiu o infiltrado neutrofílico, como também o grau da lesão pulmonar (BELPERIO et al. 2002). Além do aumento precoce de *Cxcl1*, a maior expressão de *Ptx3* também esteve relacionada com maior expressão do RNAm da quimiocina ligante 2 (*Ccl2*), importante quimioatraente de monócitos. Recentemente, WILSON et al. (2009), revelaram que os monócitos têm importante papel na LPiV. Além de chegarem rapidamente ao pulmão com *status* ativado, foi visto que essas células influenciam nas propriedades elásticas do pulmão, aumentando o edema em quantidades significativas.

Nos estágios precoces da lesão, aos 20 minutos de VM, a proteína IL1B esteve mais expressa no compartimento brônquico dos camundongos transgênicos do que nos animais CD1, corroborando o achado de maior infiltrado inflamatório. Em contrapartida, no mesmo compartimento brônquico aos 60 min de VM, essa citocina esteve mais presente nos animais CD1, porém nesses animais a expressão de IL1B e a quantidade de células inflamatórias permaneceram estáveis ao longo da VM (aos 20, 40 e 60 min) (Figura 13). É possível especular que o aumento excessivo de IL1B e células inflamatórias no tecido pulmonar dos animais transgênicos aos 20 minutos de VM, pode ter sido acompanhado de um mecanismo de *feedback* negativo, e aos 60 minutos de VM, o número de células inflamatórias e a expressão de IL1B diminuiu, numa tentativa de controlar a resposta inflamatória, se igualando aos níveis dos animais CD1. CEPINSKAS et al. (2003) mostraram um mecanismo pelo qual a amplificação da resposta inflamatória por IL1B pode ser limitada. Usando microscopia confocal, foi

visto que o acúmulo de NFkappaB nuclear, induzido por IL1B, em monocamadas de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) foi dramaticamente reduzido quando leucócitos polimorfonucleares migraram ao longo destas monocamadas (CEPINSKAS et al. 2003).

Ao longo do tempo, também observamos que a expressão protéica de TNFA e IL1B foi mais proeminente nas células do compartimento do epitélio brônquico do que nas células do compartimento alveolar, inclusive aos 150% de elastância pulmonar, sugerindo que o epitélio brônquico seja mais responsivo à VM e produza mais mediadores inflamatórios do que o epitélio alveolar.

Sabemos que nem sempre a expressão gênica pode ser correlacionada diretamente com a expressão protéica e pelo fato das amostras terem sido coletadas em momentos pontuais da lesão (20, 40, 60min e 150%Elas), os resultados observados podem não refletir o verdadeiro papel de uma citocina no contexto inflamatório como um todo. Um exemplo que ilustra bem essa condição diz respeito ao TNFA, cuja expressão protéica e gênica na LPIV têm sido alvo de controvérsias na literatura uma vez que seus níveis foram detectados em muitos estudos, mas não em todos (RICARD et al. 2001). No entanto WILSON et al. (2003) mostraram recentemente que a produção de TNFA na LPIV é transiente, tendo um pico em estágios precoces e declinando em períodos tardios. Em nosso estudo, os animais transgênicos apresentaram expressão excessiva de RNAm de TNFA aos 150% de elastância pulmonar quando comparados aos animais do tipo selvagem, mas essa diferença de expressão gênica não

pôde ser percebida a nível protéico. Nesse raciocínio, podemos presumir que TNFA teve seu pico de produção anterior ao momento da coleta das amostras e que, os maiores níveis de RNAm produzidos pelo transgênicos ainda serão transcritos em proteínas. Além disso, sabemos que TNFA é capaz de promover a rápida liberação de PTX3 pré-formado nos grânulos dos neutrófilos (JAILLON et al. 2007), e também de induzir a transcrição de *Ptx3* nas células do epitélio brônquico e alveolar (HAN et al. 2005). A síntese *de novo* de PTX3 pelas células pulmonares e também pelos macrófagos, sugere um possível mecanismo pelo qual a resposta inflamatória é exacerbada nos animais transgênicos.

Embora *Ptx3* tenha promovido a resposta inflamatória, vimos que os animais nocautes também foram capazes de desenvolver a lesão no mesmo padrão do seu grupo controle, sugerindo que PTX3 não é essencial para a ocorrência da LPIV. Apesar de histologicamente e mecanicamente similares, os camundongos *Ptx3^{+/+}* e *Ptx3^{-/-}* apresentaram um balanço diferente de mediadores inflamatórios. No tecido pulmonar dos camundongos *Ptx3^{-/-}* foi encontrada menor quantidade nos transcritos de *Il1b* e *Il10*, e maiores quantidades de *Il6*. Sabendo que IL10 é um modulador com características anti-inflamatórias, cujos baixo níveis já foram relacionados a maior mortalidade de pacientes com SARA (DONNELLY et al. 1996), esses resultados, somados a maior expressão de *Il6*, podem explicar pelo menos em parte, o desenvolvimento da LPIV mesmo na ausência de *Ptx3*, e sugere uma possível via compensatória ativada no camundongo *Ptx3^{-/-}*. Usando animais nocautes para *Ptx3*, foi descrito na literatura que *Ptx3* possui um

papel não-redundante na resistência contra infecções por *A. fumigatus* e *P. aeruginosa* (GARLANDA 2002). Entretanto, essa função única de *Ptx3* não pode ser extrapolada para os nossos dados, uma vez que os animais nocautes foram capazes de desenvolver LPIV em resposta a VM agressiva, mostrando a complexidade e redundância das citocinas na inflamação. Da mesma maneira, quando camundongos nocautes para receptores de TNFA foram submetidos à VM em alto volume corrente, apesar de um menor infiltrado neutrofílico, esses animais também foram capazes de desenvolver inflamação pulmonar, evidenciando do mesmo modo a existência de uma via alternativa compensatória (WILSON et al. 2005).

Os menores níveis nos transcritos de *Il1b* encontrados nos camundongos nocautes (Figura 8A), e os maiores níveis protéicos encontrados no pulmão dos animais *Ptx3^{+/+}* (Tabela 8) também apontam para importante papel desta citocina em nosso modelo experimental. Além de induzir a produção de *Ptx3* em macrófagos (ALLES et al. 1994) e células pulmonares (HE et al. 2007), o excesso de expressão gênica e protéica de IL1B nos animais *Ptx3^{+/+}*, sugere que PTX3 deva promover a expressão de *Il1b*. Esses dados vão de encontro a estudos prévios do grupo (SOUZA et al. 2002) e a dados preliminares de *microarray* ainda não publicados, que indicam que PTX3 promove a expressão de *Il1b* em células inflamatórias.

Em outros trabalhos prévios publicados pelo grupo observamos que PTX3 desempenha diferentes papéis *in vivo*, dependendo do grau de exposição a agentes infecciosos. A maior expressão de *Ptx3* nos camundongos transgênicos expostos a um pequeno inóculo pulmonar de

Klebsiella pneumoniae conferiu um papel protetor resultando em maior sobrevivência destes animais. Em contrapartida, quando os mesmos foram desafiados com grandes quantidades da bactéria, uma maior taxa de mortalidade foi observada. Esses dados sugerem um duplo papel de PTX3 dependendo da quantidade expressa. Se por um lado a resposta inflamatória foi promovida por *Ptx3* em resposta a uma estratégia de VM agressiva, o mesmo efeito não foi observado quando os mesmos animais foram submetidos a condições de VM minimamente lesivas ao pulmão. Apesar de “protetora”, a VM com volume corrente de 8 ml/kg causou um processo inflamatório no pulmão, resultados que foram também observados recentemente em camundongos por VANEKER et al. (2007). Entretanto, o grau de lesão encontrado entre os animais transgênicos, nocautes e respectivos controles ventilados foi bastante similar, sugerindo que o início da inflamação na LPIV precede a ativação de PTX3 e que seu impacto parece ser maior em LPIV mais severas. Também observamos que os níveis de expressão gênica e protéica de IL1B, TNFA e CCL2 foram similares aos encontrados nos controles não ventilados, indicando que a agressão mecânica provocada pelo ventilador não foi suficiente para causar alteração substancial no perfil de expressão desses mediadores. O tempo de VM estudado foi de 90 minutos e é possível que a longo prazo, a lesão inflamatória pulmonar evolua e se agrave, onde então o aumento ou ausência da expressão de *Ptx3* tenha um impacto mais evidente. De qualquer forma, mesmo apresentando graus sutis e semelhantes de lesão pulmonar, observamos maior expressão gênica e protéica de IL1B nos

camundongos *Ptx3^{+/-}* quando comparados aos nocautes, mostrando novamente a importante relação entre PTX3 e IL1B em nosso modelo experimental, independentemente da estratégia de VM adotada.

Pelo fato dos animais transgênicos desenvolverem a LPIV mais rapidamente é plausível especular que resposta inflamatória seja mais exacerbada em pacientes sob ventilação mecânica onde os níveis séricos de PTX3 encontram-se previamente aumentados devido a outras doenças. De acordo com esse raciocínio, MAURI et al. (2008) mostraram recentemente que elevados níveis séricos de PTX3 se correlacionam com a mortalidade de 23 pacientes com SARA. Nesse sentido, é possível imaginar que a modulação negativa de PTX3 possa trazer algum benefício. Aplicando 100 mg/kg com reaplicação de 100 mg/kg/h a cada 10 minutos de Pentoxifilina, parece existir uma tendência na diminuição dos níveis séricos de TNFA, CXCL1 e CCL2 nos camundongos transgênicos. Mas uma diferença estatisticamente significativa não foi encontrada entre os animais ventilados tratados com PTOX quando comparados aos controles salina, possivelmente devido ao número pequeno de animais utilizado no experimento (n=4/grupo). Além disso, é possível que a via de administração intraperitoneal utilizada possa ter influenciado no resultado pois a PTOX possui uma meia-vida muito curta no plasma. Os artigos prévios que mostraram diminuição de mediadores inflamatórios em modelos de VILI fizeram infusão contínua da droga (OLIVEIRA JUNIOR et al. 2003; LESSA et al. 2008).

O exato mecanismo pelo qual PTX3 amplifica a resposta inflamatória ainda é desconhecido. Até os dias de hoje, não se sabe da existência de um

receptor específico para essa proteína, mas recentemente foi visto que PTX3 pode se ligar ao receptor FcγRIII/CD16 (LU et al. 2008). Numa revisão ainda mais recente da literatura, Mantovani e cols comentam que apesar de ainda não publicado, PTX3 se ligaria também ao receptor FcγRII durante a atividade de opsonização do *A. fumigatus* (BOTTAZZI et al. 2009). O receptor Fc-*gamma* se liga na porção Fc das imunoglobulinas IgG e promove a fagocitose de microorganismos opsonizados (ABBAS et al. 2003b). Atualmente, os receptores Fcγ têm sido apontados como importantes reguladores da resposta imune. Quando ligados a específicas subclasses de IgG, os receptores Fcγ podem ativar (FcγRIII) ou inibir (FcγRII) a cascata de sinalização em células efetoras como monócitos, macrófagos, células dendríticas, basófilos e mastócitos, regulando funções como fagocitose, explosão oxidativa (“oxidative burst”) e liberação de citocinas (NIMMERJAHN e RAVETCH 2008). As consequências da ligação de PTX3 a esses receptores na resposta inflamatória ainda precisam ser investigadas.

Um outro possível mecanismo pelo qual PTX3 poderia amplificar a resposta inflamatória seria através do Sistema Complemento, uma vez que, dependendo da maneira como PTX3 é apresentada à subunidade C1q, é capaz de ativar ou inibir a via clássica. INFORZATO et al. (2006) investigaram como o status de glicosilação de PTX3 afeta a sua interação com C1q e a sua capacidade de ativar o complemento. Três fontes da proteína PTX3 foram estudadas, PTX3 recombinante produzida em linhagem celular de ovário de hamster, PTX3 proveniente de célula dendrítica humana

estimulada por LPS e PTX3 de células de fibrosarcoma humano estimuladas com TNFA. O status de glicosilação proveniente das células estimuladas aumentou em 3 vezes a ligação de PTX3 a C1q, e aumentou a deposição de C3, quando comparadas a proteína não modificada (recombinante). No contexto inflamatório da LPIV, é possível que a proteína PTX3 seja produzida em resposta ao TNFA e ative o sistema complemento. Em um outro modelo de inflamação em camundongos chamado “air pouch model” a ação de PTX3 foi estudada. Neste modelo, cria-se uma bolsa de ar subcutânea onde a resposta inflamatória é avaliada após a administração de diferentes estímulos. Quando PTX3 foi administrada juntamente com o componente da parede celular KpOmpA (recombinant Outer Membrane protein A) de *Klebsiella pneumoniae*, houve maior recrutamento de leucócitos e aumento na produção de IL6 e CCL2 no local, quando comparado a injeção somente de KpOmpA. Entretanto, o efeito de PTX3 foi drasticamente reduzido quando foram aplicados inibidores da cascata do complemento, mostrando que a amplificação da resposta inflamatória causada por PTX3 foi dependente do complemento (COTENA et al. 2007). O dano tecidual provocado pela ventilação mecânica nas células pulmonares resulta na geração de citocinas e atração de leucócitos que por sua vez aumentam ainda mais a lesão tecidual. Apesar do modelo experimental da LPIV não possuir um motivo microbiano no pulmão no qual PTX3 possa se ligar, PTX3 poderia estar depositado em tecidos danificados, principalmente após a degranulação de neutrófilos (JAILLON et al. 2007), levando a ativação do complemento.

O sistema complemento é bastante conhecido pela sua capacidade de lisar microorganismos, mas possui importante papel também na resposta imune, uma vez que os peptídeos produzidos na cascata enzimática estimulam a resposta inflamatória local (ABBAS et al. 2003b). A anafilotoxina C5a é um potente quimioatraente de neutrófilos, monócitos, eosinófilos, capaz de levar ao *burst* oxidativo em neutrófilos e a vasodilatação. Em leucócitos humanos, C5a estimula ainda a síntese e liberação de TNFA, IL1B, IL6 e IL8 (homólogo funcional em humanos da CXCL1/KC de murinos), e a relação do sistema complemento com a exacerbação da resposta inflamatória já foi descrita em doenças como a sepse, isquemia e reperfusão, asma e lesão pulmonar aguda (GUO e WARD 2005). C5a já foi encontrada aumentada no lavado broncoalveolar de 9 pacientes com SARA e a ativação do complemento foi resolvida quando os pacientes estavam recuperados (ROBBINS et al. 1987). Em neutrófilos provenientes do lavado intra-alveolar de pacientes com SARA, foi demonstrado que a produção de Tissue factor (TF) é regulada positivamente por C5a e TNFA (KAMBAS et al. 2008). Em células mononucleares, PTX3 também promove a expressão de TF (NAPOLEONE et al. 2002), e sua expressão foi recentemente relacionada com a maior atividade do TF e com a severidade da lesão pulmonar no lavado broncoalveolar de camundongos desafiados pela instilação de LPS (HE et al. 2009). A deposição de fibrina (formação de membrana hialina) na parede alveolar ocorre como resultado do dano tecidual ao endotélio capilar ou ao epitélio alveolar. A ativação da cascata de coagulação é uma característica da síndrome da SARA/LPIV, cuja resposta

pró-coagulante é associada à expressão aumentada do TF (RUF e RIEWALD 2003). A relação entre PTX3 e TF aponta para um possível mecanismo pelo qual PTX3 pode mediar a lesão pulmonar em resposta à VM.

A proteína PTX3 parece estar envolvida nas diferentes vias envolvidas na SARA/LPIV, como sistema complemento, cascata de coagulação e ainda nos mecanismos celulares, como na produção de PTX3 por células alveolares e inflamatórias. Uma grande limitação desse estudo foi a incapacidade de mostrar a expressão protéica e a localização de PTX3 no pulmão, entretanto os dados gerados revelam a ação dessa proteína e contribuem para um melhor entendimento da patofisiologia da LPIV onde PTX3 age como um mediador que exacerba a lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica. O exato mecanismo pelo qual PTX3 amplifica a resposta inflamatória ainda precisa ser melhor investigado, entretanto, níveis elevados de *Il1b*, *Tnfa*, *Cxcl1* e *Ccl2* observados nos animais transgênicos, indicam que essas citocinas participam da injúria tecidual local levando a um desenvolvimento mais precoce da lesão. O melhor entendimento do papel biológico de PTX3 na LPIV pode contribuir para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas e estudos futuros ainda serão importantes para investigar as consequências clínicas da liberação de PTX3 durante a ventilação mecânica e o seu potencial como uma ferramenta indicativa da severidade da lesão pulmonar em pacientes submetidos a esta terapia.

8 CONCLUSÕES

- 1) A expressão aumentada de *Ptx3* exacerbou a resposta inflamatória levando ao desenvolvimento mais rápido da LPIV nos transgênicos quando comparados aos animais do tipo selvagem, mas a produção de PTX3 não é essencial para a ocorrência da lesão, uma vez que camundongos nocautes foram capazes de desenvolvê-la em tempos semelhantes ao controle do tipo selvagem. Um possível mecanismo pelo qual os animais nocautes compensam a ausência de PTX3, seria pelo aumento de *Il1b* e *Il6*, e diminuição de *Il10*
- 2) A ventilação mecânica em alto volume corrente resultou no recrutamento precoce de células inflamatórias no pulmão aos 20 minutos de VM e níveis elevados de *Il1b*, *Tnfa*, *Cxcl1* e *Ccl2* nos animais que super expressam *Ptx3*
- 3) PTX3 não exacerbou nem protegeu o pulmão na resposta inflamatória após 90 minutos de VM em condições minimamente lesivas ao pulmão, sendo que o início da inflamação precede a ativação de PTX3
- 4) O tratamento com Pentoxifilina na dose de 100 mg/kg + 100 mg/kg/h a cada 10 min, não foi efetivo em retardar o aparecimento da LPIV nos camundongos que super expressam *Ptx3*. A tendência na diminuição dos níveis séricos de TNFA, CXCL1 e CCL2 nos grupos tratados deve ser melhor investigado.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editores. **Imunologia celular e molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003a. Imunidade inata; p.270-90.

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editores. **Imunologia celular e molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003b. Mecanismos efetores da imunidade humoral; p.309-34.

Adhikari N, Burns KE, Meade MO. Pharmacologic treatments for acute respiratory distress syndrome and acute lung injury: systematic review and meta-analysis. **Treat Respir Med** 2004; 3:307-28.

Altose MD. Pulmonary Mechanics. In: Fishman A, Elias J, Fishman J, Grippi M, Senior R, Pack A. **Pulmonary diseases and disorders**. USA: McGraw-Hill Book Company; 1980. p.359-72.

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.

Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med** 1998; 338:347-54.

Amato MB, Carvalho CR, Isola A, et al. Mechanical ventilation in Acute Lung Injury (ALI)/Acute Respiratory Discomfort Syndrome (ARDS). **J Bras Pneumol** 2007; 33 Suppl 2S:S119-S27.

Ardizzoia A, Lissoni P, Tancini G, et al. Respiratory distress syndrome in patients with advanced cancer treated with pentoxifylline: a randomized study. **Support Care Cancer** 1993; 1:331-3.

Azzurri A, Sow OY, Amedei A, et al. IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in Mycobacterium tuberculosis infection. **Microbes Infect** 2005; 7:1-8.

Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, et al. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis. **J Clin Invest** 2002; 110:1703-16.

Bermejo Martin JF, Jimenez JL, Munoz-Fernandez A. Pentoxifylline and severe acute respiratory syndrome (SARS): a drug to be considered. **Med Sci Monit** 2003; 9:SR29-34.

Biagi E, Col M, Migliavacca M, et al. PTX3 as a potential novel tool for the diagnosis and monitoring of pulmonary fungal infections in immunocompromised pediatric patients. **J Pediatr Hematol Oncol** 2008; 30:881-5.

Bos A, Vever R, Roos D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. **Biochim Biophys Acta** 1987; 525: 37-44.

Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An Integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. **Annu Rev Immunol** 2009 Dec 7. [Epub ahead of print]

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.

Breviario F, Daniello 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.

Camozzi M, Rusnati M, Bugatti A, et al. Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3. **J Biol Chem** 2006; 281:22605-13.

Caruso P, Meireles SI, Reis LFL, Mauad T, Martins MA, Deheinzelin D. Low tidal volume ventilation induces proinflammatory and profibrogenic response in lungs of rats. **Intens Care Med** 2003; 29:1808-11.

Cepinskas G, Savickiene J, Ionescu CV, Kvietys PR. PMN transendothelial migration decreases nuclear NFkappaB in IL-1beta-activated endothelial cells: role of PECAM-1. **J Cell Biol** 2003; 161:641-51.

Checkley W, Brower R, Korpak A, Thompson BT. Effects of a clinical trial on mechanical ventilation practices in patients with acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med** 2008; 177:1215-22.

Choudhury S, Wilson MR, Goddard ME, O'Dea KP, Takata M. Mechanisms of early pulmonary neutrophil sequestration in ventilator-induced lung injury in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2004; 287:L902-10.

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.

Crimi E, Slutsky AS. Inflammation and the acute respiratory distress syndrome. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol** 2004; 18:477-92.

de Carvalho MEP, Dolhnikoff M, Meireles SI, et al. Effects of overinflation on procollagen type III expression in experimental acute lung injury. **Crit Care** 2007; 11 (1):R23.

Dias AAM, Goodman AR, dos Santos JL, et al. TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. **J Leukocyte 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 Leuk Biol** 2004; 75:649-56.

Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, et al. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. **Ann Int Med** 1996; 125:191-6.

dos Santos CC, Han B, Andrade CF, et al. DNA microarray analysis of gene expression in alveolar epithelial cells in response to TNF alpha, LPS, and cyclic stretch. **Physiol Genomics** 2004; 19:331-42.

Frank JA, Parsons PE, Matthay MA. Pathogenetic significance of biological markers of ventilator-associated lung injury in experimental and clinical studies. **Chest** 2006; 130:1906-14.

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.

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.

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.

Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. **Annu Rev Immunol** 2005; 23:821-2.

Halbertsma FJJ, Vaneker M, Scheffer GJ, van der Hoeven JG. Cytokines and bio-trauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. **Neth J Med** 2005; 63:382-92.

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.

He X, Han B, Bai X, et al. PTX3 as a potential biomarker of acute lung injury: supporting evidence from animal experimentation. **Intensive Care Med** 2009; Nov 18 [Epub ahead of print].

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

Headley AS, Tolley E, Meduri GU. Infections and the inflammatory response in acute respiratory distress syndrome. **Chest** 1997; 111:1306-21.

Inforzato A, Peri G, Doni A, et al. Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. **Biochemistry** 2006; 45:11540-51.

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.

Ji Q, Zhang L, Jia H, Xu J. Pentoxifylline inhibits endotoxin-induced NF-kappa B activation and associated production of proinflammatory cytokines. **Ann Clin Lab Sci** 2004; 34:427-36.

Kambas K, Markiewski MM, Pneumatikos IA, et al. C5a and TNF-alpha up-regulate the expression of tissue factor in intra-alveolar neutrophils of patients with the acute respiratory distress syndrome. **J Immunol** 2008; 180:7368-75.

Kobzik L. O pulmão. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, editores. **Robins, patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.626-79.

Latini R, Maggioni AP, Peri G, et al. Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. **Circulation** 2004; 110:2349-54.

Lee GW, Lee TH, Vilcek J. Tsg-14, A Tumor Necrosis Factor-Inducible and IL-1-Inducible Protein, Is A Novel Member of the Pentaxin Family of Acute Phase Proteins. **J Immunol** 1993; 150:1804-12.

Lessa A, Suguihara C, Xianyu S, Hehre D, Devia C, Bancalari E. The effect of pentoxifylline on the pulmonary response to high tidal volume ventilation in rats. **Pulm Pharmacol Ther** 2008; 21:54-60.

Lu J, Marnell LL, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. Structural recognition and functional activation of FcgammaR by innate pentraxins. **Nature** 2008; 456:989-992.

Lucangelo U, Bernabe F, Blanch L. Respiratory mechanics derived from signals in the ventilator circuit. **Respir Care** 2005; 50:55-65.

Macintyre NR. Current issues in mechanical ventilation for respiratory failure. **Chest** 2005; 128:561S-7.

Marques LJ, Zheng L, Poulakis N, Guzman J, Costabel U. Pentoxifylline inhibits TNF-alpha production from human alveolar macrophages. **Am J Respir Crit Care Med** 1999; 159:508-11.

Mauri T, Coppadoro A, Bellani G, et al. Pentraxin 3 in acute respiratory distress syndrome: An early marker of severity. **Crit Care Med** 2008; 36:2302-8.

Miller K, Louie A, Baltch AL, Smith RP, Davis PJ, Gordon MA. Pharmacokinetics of pentoxifylline and its metabolites in healthy mice and in mice infected with *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother** 1998; 42:2405-09.

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 SA, Bastone A, et al. Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: a novel link between vascular inflammation and clotting activation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2002; 22:782-787.

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.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. **Nat Rev Immunol** 2008; 8:34-47.

Okutani D, Han B, Mura M, Waddell TK, Keshavjee S, Liu MY. 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.

Olesen R, Wejse C, Velez DR, et al. DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans. **Genes Immunol** 2007; 8:456-67.

Oliveira-Junior IS, Pinheiro BV, Silva IDCG, Salomao R, Zollner RL, Beppu OS. Pentoxifylline decreases tumor necrosis factor and interleukin-1 during high tidal volume. **Braz J Med Biol Res** 2003; 36:1349-57.

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

Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G. Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal. **Am J Respir Crit Care Med** 2001; 163:1176-80.

Robbins RA, Russ WD, Rasmussen JK, Clayton MM. Activation of the complement system in the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis** 1987; 135:651-8.

Rubinfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M. Incidence and outcomes of acute lung injury. **N Engl J Med** 2005; 353:1685-93.

Ruf W, Riewald M. Tissue factor-dependent coagulation protease signaling in acute lung injury. **Crit Care Med** 2003; 31:S231-7.

Salazar E, Knowles JH. Analysis of Pressure-Volume Characteristics of Lungs. **J Appl Physiol** 1964; 19:97-104.

Sanofi Aventis. **Trental (Pentoxifylline)**. 2007. Available from: <<http://products.sanofi-aventis.us/trental/trental.pdf>> [2009 Dec.20].

Santos FB, Nagato LKS, Boechem NM, et al. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. **J Appl Physiol** 2006; 100:98-106.

Sibilla S, Tredici S, Porro A, et al. Equal increases in respiratory system elastance reflect similar lung damage in experimental ventilator-induced lung injury. **Intensive Care Med** 2002; 28(2):196-203.

Simon BA, Easley RB, Grigoryev DN, et al. Microarray analysis of regional cellular responses to local mechanical stress in acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2006; 291:L851-61.

Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury: from barotrauma to biotrauma. **Respir Care** 2005; 50:646-59.

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, Amaral FA, Fagundes CT, et al. The Long Pentraxin PTX3 Is Crucial for Tissue Inflammation after Intestinal Ischemia and Reperfusion in Mice. **Am J Pathol** 2009; 174:1309-18.

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.

Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. **J Clin Invest** 1997; 99:944-52.

Vaneker M, Halbertsma FJ, VAN Egmond J, et al. Mechanical ventilation in healthy mice induces reversible pulmonary and systemic cytokine elevation with preserved alveolar integrity: an in vivo model using clinical relevant ventilation settings. **Anesthesiology** 2007; 107:419-26.

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

Villa P, Sartor G, Angelini M, et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. **Clin Diagn Lab Immunol** 1995; 2:549-53.

von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R, et al. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. **Am J Respir Crit Care Med** 1998; 157:263-72.

Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med** 2000; 342:1334-49.

Wilson MR, Choudhury S, Goddard ME, O'Dea KP, Nicholson AG, Takata M. High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. **J Appl Physiol** 2003; 95:1385-93.

Wilson MR, Choudhury S, Takata M. Pulmonary inflammation induced by high-stretch ventilation is mediated by tumor necrosis factor signaling in mice. **Am J Respir Crit Care Med** 2005; 288:L599-607.

Wilson MR, O'Dea KP, Zhang D, Shearman AD, van Rooijen N, Takata M. Role of Lung-Marginated Monocytes in an In Vivo Mouse Model of Ventilator-Induced Lung Injury. **Am J Respir Crit Care Med** 2009; 179:914-22.

Wu CC, Liao MH, Chen SJ, Yen MH. Pentoxifylline improves circulatory failure and survival in murine models of endotoxaemia. **Eur J Pharmacol** 1999; 373:41-9.

Wu Q, Shu H, Yao S, Xiang H. Mechanical stretch induces pentraxin 3 release by alveolar epithelial cells in vitro. **Med Sci Monit** 2009; 15:135-40.

Yoshikawa S, King JA, Lausch RN, Penton AM, Eyal FG, Parker JC. Acute ventilator-induced vascular permeability and cytokine responses in isolated and in situ mouse lungs. **J Appl Physiol** 2004; 97:2190-9.

ANEXO

Anexo 1 - Padronização das reações de imunistoquímica para PTX3 em amostras murinas

Uma extensa pesquisa e levantamento bibliográfico foram realizados para conhecimento e escolha dos melhores anticorpos a serem empregados no estudo. Os anticorpos selecionados para detecção de PTX3 pela técnica de imunistoquímica estão relacionados na Tabela A1. O sistema de detecção escolhido foi o de polímeros, que não contém biotina e por este motivo evita reações cruzadas com tecido de camundongo. Foram selecionados o Kit SuperPicture Polymer de amplo espectro (Invitrogen #87-8963) e o Kit SuperPicture Polymer para anticorpos primários produzidos em bode (Invitrogen #87-9363).

Tabela A1 - Anticorpos adquiridos para detecção dos mediadores inflamatórios PTX3 por Imunistoquímica em amostras de pulmão de camundongos.

Anticorpo	Catálogo	Fabricante	Mediador de interesse
Polyclonal Antibody to PTX3	ALX-210-365	Alexis	PTX3
Polyclonal anti-PTX3 H-300	sc-32866	Santa Cruz	PTX3

As primeiras reações de imunistoquímica foram feitas com a colaboração da técnica Suely Nonogaki do Departamento de Anatomia Patológica Investigativa do Hospital AC Camargo.

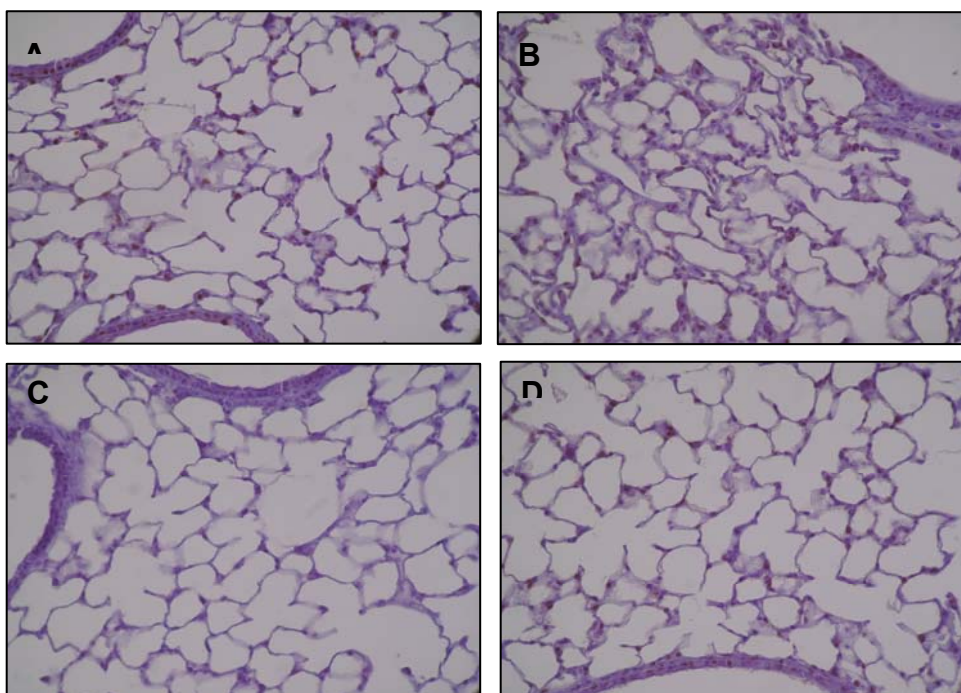
A.1.1 Padronização da Imunoistoquímica utilizando Anticorpo “Polyclonal Antibody to PTX3” (Alexis #ALX-210-365)

Na primeira etapa da padronização foram utilizadas amostras de pulmão de camundongos transgênicos para *Ptx3* [Tg(*Ptx3*)CD1] ventilados até 150% Elastância Pulmonar. Foram empregadas na padronização diferentes concentrações do Ac policlonal para PTX3 biotinilado (Alexis Biochemicals #ALX-210-365), e 4 lâminas contendo cortes de tecido provenientes de 2 animais Tg(*Ptx3*)CD1 diferentes e submetidas, cada uma, a 2 diluições distintas do anticorpo referido, sendo elas: 1:1'000 e 1:2'000; e 1:5'000 e controle negativo (onde foi suprimido o anticorpo anti-PTX3). A estratégia experimental desta primeira etapa de padronização está resumida na Tabela 2.

Tabela A2 – Estratégia experimental empregada na primeira etapa da padronização de imunoistoquímica para detecção de PTX3 no pulmão de camundongos.

Lâmina	Amostra Pulmão	Diluições testadas
A1	Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 16	1:1'000 / 1:2'000
B1	Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 16	1:5'000 / Controle negativo
C1	Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 17	1:1'000 / 1:2'000
D1	Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 17	1:5'000 / Controle negativo

Na Figura A1 são mostradas fotomicrografias representativas dos cortes histológicos de pulmões dos animais transgênicos submetidos à ventilação e à imunoistoquímica para detecção PTX3 nas condições descritas acima. Como pode ser observado, os sinais detectados utilizando as diluições testadas apresentaram-se bastante fracos, o que nos indicou a necessidade do uso mais concentrado do Ac.



Legenda: Cortes histológicos de pulmão (3 μ m) de camundongos transgênicos para *Ptx3* foram submetidos à reação de imunistoquímica utilizando o SuperPicture Polymer detection kit (Invitrogen) e diferentes diluições do Ac policlonal anti-PTX3 (#ALX 210-365). Painéis A e B: cortes de pulmão colocados em duplicata na mesma lâmina (lâmina C1) sendo eles submetido à IMH utilizando o Ac policlonal anti-PTX3 na diluição de 1:1'000 (A) 1:2'000 (B). Painéis C e D: cortes de pulmão colocados em duplicata na mesma lâmina (lâmina D1) sendo eles submetido à IMH utilizando o Ac policlonal anti-PTX3 na diluição de 1:5'000 (C) e controle negativo no qual foi suprimido o uso do Ac (D). As fotos são mostradas no aumento de 400X.

Figura A1 – Primeira etapa da padronização da imunistoquímica para detecção de PTX3 em tecidos murinos.

Na segunda etapa da padronização menores diluições do anticorpo como 1:100, 1:200 e 1:500 foram testadas, e novas amostras de pulmão de animais ventilados até 150% Elastância Pulmonar foram incluídas, como o grupo controle de mesmo background genético dos transgênicos (CD1Wt), camundongos nocautes (*Ptx3*^{-/-}) e seu respectivo grupo de controle de mesmo background genético (*Ptx3*^{+/+}).

Foram utilizadas 2 lâminas de cada grupo e cada lâmina foi submetida a 2 diferentes concentrações do referido anticorpo, sendo elas: 1:100 e

1:200; e 1:500 e controle negativo (foi suprimido o anticorpo anti-PTX3). A

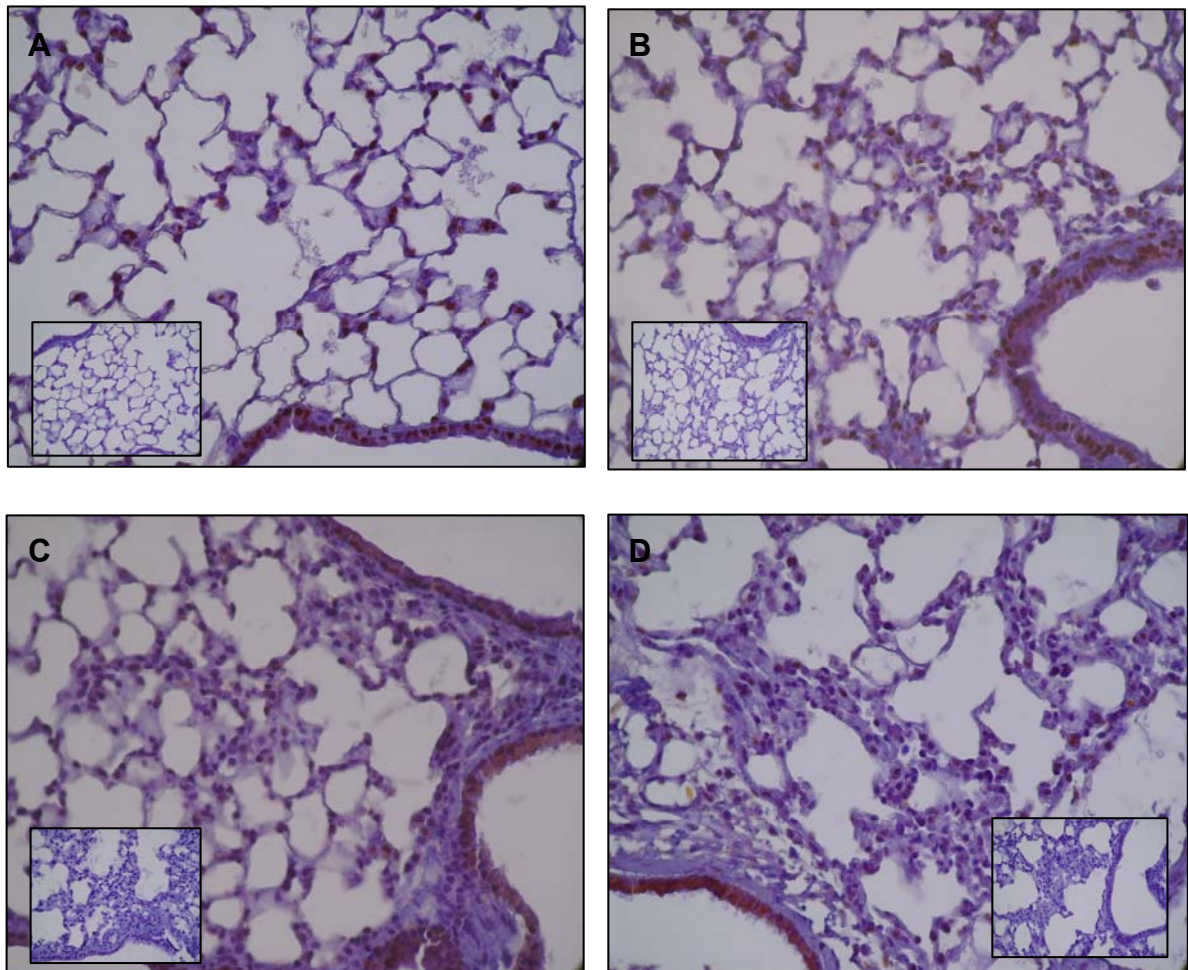
Tabela A3 resume a nova estratégia adotada.

Tabela A3 – Estratégia experimental empregada na segunda etapa da padronização de imunohistoquímica para detecção de PTX3 no pulmão de camundongos.

Lâmina	Amostra Pulmão	Diluições testadas
A2	Tg(<i>Ptx3</i>)CD1	1:100 / 1:200
B2	Tg(<i>Ptx3</i>)CD1	1:500 / Controle negativo
C2	CD1Wt	1:100 / 1:200
D2	CD1Wt	1:500 / Controle negativo
E2	<i>Ptx3</i> ^{+/+}	1:100 / 1:200
F2	<i>Ptx3</i> ^{+/+}	1:500 / Controle negativo
G2	<i>Ptx3</i> ^{-/-}	1:100 / 1:200
H2	<i>Ptx3</i> ^{-/-}	1:500 / Controle negativo

Como pode ser observado na Figura A2, o uso do Ac anti-PTX3 na diluição de 1:100 gerou um padrão de coloração semelhante para todos os grupos de amostras estudados (Tg(*Ptx3*)CD1, *Ptx3*^{-/-} e Wts). Nesta diluição foi verificada uma forte marcação no núcleo e citoplasma das células do epitélio brônquico e alveolar. Por sua vez, o uso do anticorpo nas concentrações de 1:200 e 1:500 levou a uma significativa redução da marcação citoplasmática nos brônquios e também nos cortes provenientes dos animais nocautes, quando comparados à diluição de 1:100 (dado não apresentado), porém a marcação nuclear persistiu nos alvéolos e brônquios dos animais transgênicos ventilados. Este padrão de marcação inicialmente nos pareceu inadequado uma vez que PTX3 é uma proteína secretada e, portanto, uma marcação citoplasmática era esperada. Além disso, a marcação positiva encontrada nos animais nocautes para *Ptx3* (Painel D,

Figura A2) sugere que possíveis reações cruzadas do anticorpo em questão podem ter ocorrido com outras proteínas da família das pentraxinas.



Legenda: Cortes histológicos de pulmão (3 μ m) de camundongos transgênicos para *Ptx3* [Tg(*Ptx3*)CD1] e nocautes (*Ptx3*^{-/-}), e seus respectivos grupo controle CD1Wt e *Ptx3*^{+/+}, foram submetidos à reação de imunistoquímica utilizando o SuperPicture Polymer detection kit (Invitrogen). A diluição do Ac policlonal anti-PTX3 (#ALX 210-365) utilizada nessa figura é de 1:100. Painel A: corte histológico de pulmão de Tg(*Ptx3*)CD1 proveniente da lâmina A2. Painel B: corte histológico de pulmão de CD1Wt proveniente da lâmina C2. Painel C: corte histológico de pulmão de *Ptx3*^{+/+} proveniente da lamina E2. Painel D: corte histológico de pulmão de (*Ptx3*^{-/-}). As fotos foram tiradas no aumento de 400X. Os insertos das fotomicrografias funcionam de controle negativo das mesmas.

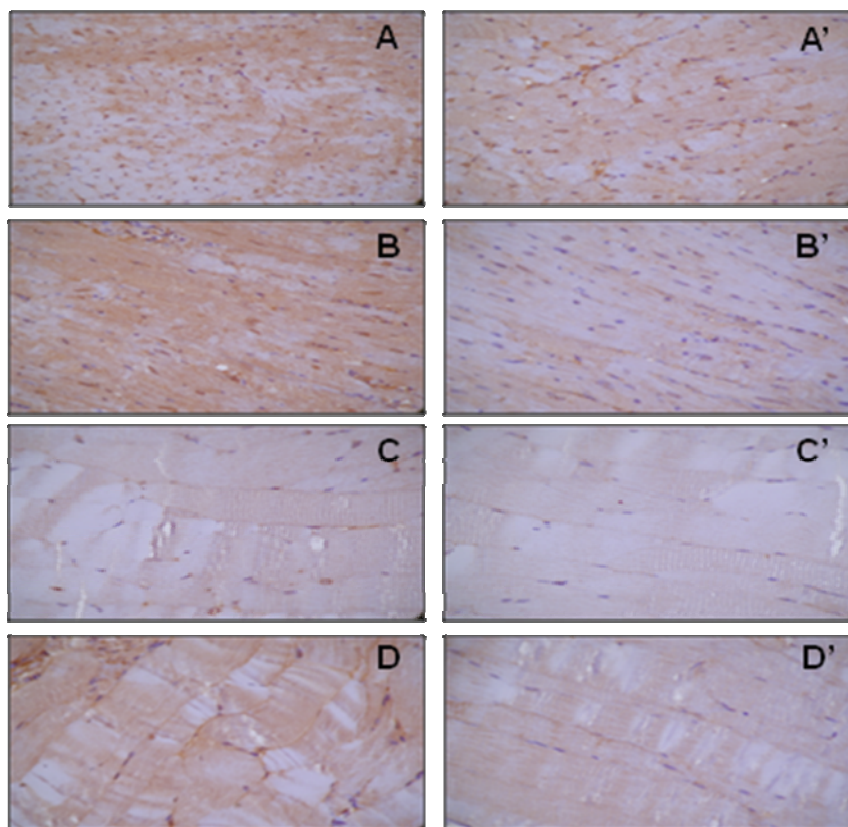
Figura A2 – Segunda etapa da padronização da imunistoquímica para detecção de PTX3 em tecidos murinos. Diluição 1:100.

A fim de melhor investigarmos a especificidade do Anticorpo “Polyclonal Antibody to PTX3” (Alexis #ALX-210-365) na detecção de PTX3 por imunistoquímica, uma terceira etapa da padronização foi realizada utilizando outros tipos de tecidos murinos. Optamos por utilizar cortes de coração e músculo de camundongos transgênicos para *Ptx3* injetados intra-peritonealmente com LPS (100 µg/camundongo por 6 horas), uma vez que dados da literatura mostram que LPS é um potente indutor da expressão de *Ptx3* (LEE GW et al. 1990). Como controle negativo utilizamos os mesmos tecidos provenientes de animais não injetados com LPS e, baseado nos resultados do experimento anterior, a diluição de escolha foi de 1:200. Observamos que as amostras de coração dos animais transgênicos injetados com LPS não apresentaram coloração no citoplasma dos cardiomiócitos como esperado, e desta vez, nenhuma positividade foi observada no núcleo das células. Já nas amostras de músculo tratados ou não com LPS nenhuma marcação foi observada. Os dados mostram que este anticorpo não respondeu como esperado nos diversos tecidos testados e sua utilização foi desconsiderada.

A.1.2 Padronização da Imunistoquímica utilizando Anticorpo “Polyclonal anti-PTX3 H-300” (Santa Cruz # sc-32866)

Primeiramente o anticorpo scH-300 foi testado nas mesmas amostras citadas acima, coração e músculo de animais Tg(*Ptx3*)CD1 tratados ou não com LPS nas diluições 1:50 e 1:100 sugeridas pelo fabricante (Santa Cruz,

Inc.). Os resultados encontrados não foram considerados satisfatórios devido à presença de “background” na coloração como mostra a Figura A3.

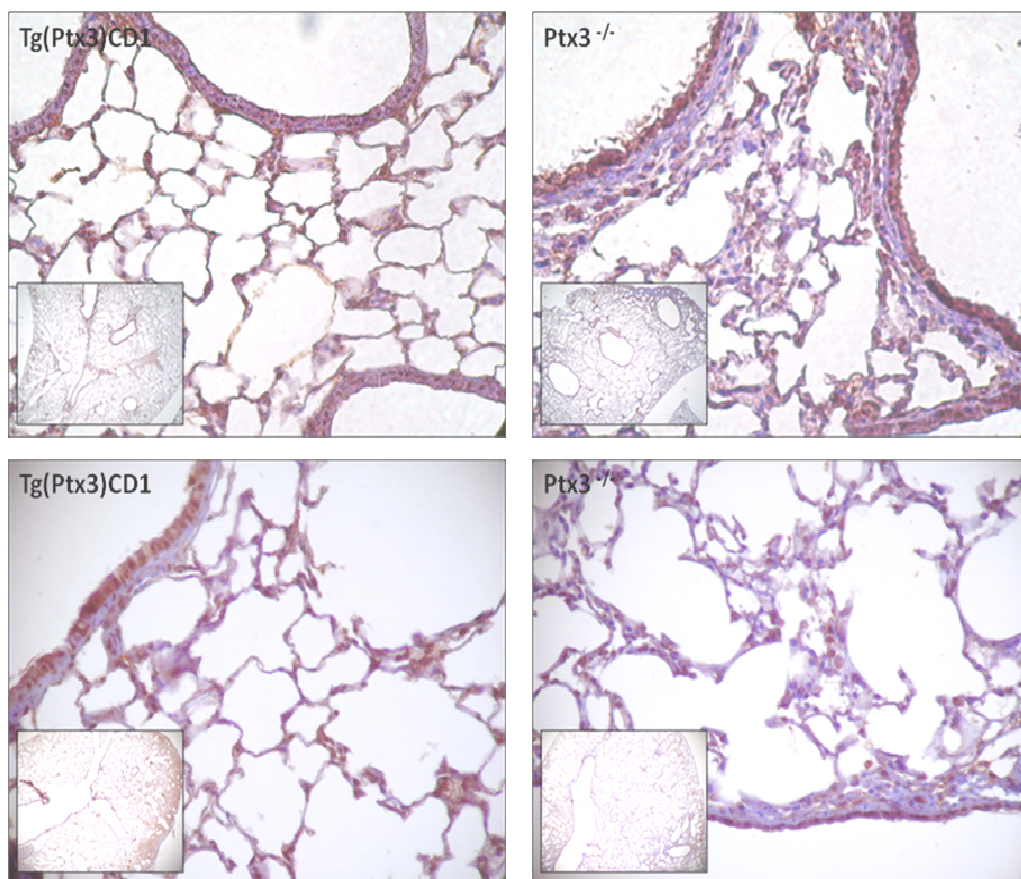


Legenda: Coração de camundongos Tg(*Ptx3*)CD1 tratados (A) ou não (B) com LPS, músculo de camundongos Tg(*Ptx3*)CD1 tratados (C) ou não (D) com LPS submetidos a reação de imunohistoquímica utilizando o SuperPicture Polymer detection kit (Invitrogen). Os painéis do lado esquerdo representam a diluição 1:50 e os painéis ao lado direito, a diluição 1:100. As fotos foram tiradas em aumento de 40X.

Figura A3 – Amostras de coração e músculo murinos submetidas à diluição 1:50 e 1:100 utilizando anticorpo sch-300.

Também foram empregadas na padronização deste anticorpo, amostras provenientes de pulmão de camundongos Tg(*Ptx3*)CD1 e *Ptx3*^{-/-}

submetidos à ventilação mecânica utilizando as diluições 1:50 e 1:100. Os resultados apresentados na Figura A4, mostram que na diluição 1:50 o pulmão de ambos animais apresentou marcação na região apical do citoplasma de células brônquio-alveolares mostrando que PTX3 está sendo secretada por estas células. O fato do animal nocaute apresentar a mesma positividade, sugere que exista uma possível inespecificidade do anticorpo scH-300. Já sob diluição de 1:100, a marcação nos animais nocautes foi menos acentuada do que nos transgênicos, entretanto uma positividade nuclear em células brônquio-alveolares foi agora detectada. Com base nestes resultados, o anticorpo scH-300 mostrou inespecificidade nas amostras de pulmão murinas.



Legenda: Pulmão de Tg(*Ptx3*)CD1 (painéis do lado esquerdo) e *Ptx3*^{-/-} (painéis do lado direito) submetidas a reação de imunohistoquímica utilizando o SuperPicture Polymer detection kit (Invitrogen). A diluição do Ac anti PTX3 sc-32866 H-300 (Santa Cruz, Inc.) utilizada nessa figura é de 1:50 nos painéis superiores e 1:100 nos painéis inferiores. As fotos foram tiradas no aumento de 40X e os inserts em 10X.

Figura A3 – Amostras de pulmão de Tg(*Ptx3*)CD1 e *Ptx3*^{-/-} ventilados submetidos à reação com o anticorpo anti-PTX3 sc-32866 H-300 (Santa Cruz, Inc.).

Para dar continuidade à padronização da imunohistoquímica para PTX3 em amostras murinas contamos com a nova colaboração do Dr. Rafael Malagoli Rocha, Pesquisador do Departamento de Patologia Investigativa do Hospital AC Camargo - Fundação Antônio Prudente. Além de amostras de tecido pulmonar de camundongos transgênicos e nocautes

submetidos à ventilação mecânica com elastância pulmonar = 150%, utilizamos também cortes de coração e músculo de camundongos transgênicos para *Ptx3* injetados intraperitonealmente com LPS (100µg/camundongo por 6 horas) ou salina.

Os anticorpos e protocolos testados estão resumidos na Tabela A4.

Em seguida, estão detalhados os protocolos e resultados obtidos.

Tabela A4 - Anticorpos e protocolo resumido da padronização de imunistoquímica para PTX3

Anticorpo	Marca	Catálogo	Diluição	Recuperação Antigênica	Amplificação
Mouse Pentraxin 3/TSG-14 MAb	R&D	MAB2166	1:25; 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000	Panela de pressão ou Citrato pH=6,2	Advance, DAKO
Monoclonal Ab to PTX3 (MNB4)	Alexis	ALX-804-464	1:25; 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000	Panela de pressão ou Citrato pH=6,3	Advance, DAKO
Polyclonal Ab to PTX3	Alexis	ALX-210-365	1:25; 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000	Panela de pressão ou Citrato pH=6,0	Advance, DAKO
Polyclonal anti-Ptx3 H-300	Santa Cruz	sc-32866	1:25; 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000	Panela de pressão ou Citrato pH=6,1	Advance, DAKO

Foram realizados cortes de 4 micrômetros de espessura, colocados em lâminas com carga elétrica (StarFrost) e mantidas em estufa a 60°C *overnight*. As lâminas foram identificadas e desparafinadas em xilol (2 trocas de 10 minutos cada); depois, passadas em álcool etílico em concentração decrescente (100%, 85% e 75%) e lavadas em seguida em água corrente por 5 minutos. A recuperação antigênica por calor foi realizada utilizando banho-maria a 98°C por 40 minutos em tampão citrato pH=6,0 para alguns

marcadores ou panela de pressão por 3 minutos para outros (Tabela 7). Após a recuperação antigênica, as lâminas foram resfriadas e lavadas em 2 banhos de PBS de 5 min cada. A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, com a duração de 20 minutos, sendo as lâminas, a seguir, lavadas em água corrente e um banho de PBS de 5 min. Em seguida os cortes foram incubados com bloqueador de proteínas (DAKO) por 5 minutos, à temperatura ambiente e em câmara úmida. O excesso do bloqueador foi retirado com lavagem em PBS e os cortes incubados com anticorpo primário, por 90 min à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em tampão PBS (3 trocas de 5 minutos cada) e, em seguida, incubadas com o anticorpo secundário e com o polímero HRP (Kit Advance-DAKO), durante 30 minutos cada reagente, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB – DAKO), por 5 minutos, sendo as lâminas lavadas em água corrente e contracoradas com hematoxilina de Harris, por 2 segundos; lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol, e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek film). Não foi possível detectar nenhuma positividade nas condições testadas.

Os resultados obtidos com os anticorpos anti-PTX3 testados foram considerados insatisfatórios devido à inespecificidade de suas reações, principalmente por verificarmos positividade nas amostras provenientes dos animais nocautes. Todos os anticorpos disponíveis comercialmente para detecção de PTX3 em camundongos foram adquiridos, mas pelo fato desses

anticorpos não terem sido desenhados contra a porção N-terminal exclusiva de PTX3, é possível que haja reação cruzada com outras pentraxinas da família.

A possibilidade de detectar PTX3 pela técnica de Imunoistoquímica com os anticorpos testados em amostras de pulmão murinas foi descartada.

Anexo 2 - Padronização do ELISA para detecção de PTX3 em amostras de pulmão murinas

O primeiro ensaio imunoenzimático realizado teve como objetivo testar os novos reagentes adquiridos e o protocolo proposto pelo fabricante para detecção de PTX3 (DuoSet Elisa Pentraxin 3 murino, R&D Systems #DY2166). Para tanto foram utilizadas amostras de soro e pulmão de camundongos transgênicos e nocautes para *Ptx3* e respectivos controle do tipo selvagem, sadios ou injetados intraperitonealmente com LPS (100 µg/camundongo).

A.2.1 Extração de Proteína

Para extrair proteínas do tecido pulmonar utilizamos um protocolo adaptado de um artigo previamente publicado pelo grupo (SOUZA et al. 2002) no qual 100 mg de tecido foram homogeneizados em 1 mL de PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄ – pH 7,2) contendo Coquetel Inibidor de Proteases (Roche # 11836153001) e 0,05% de Tween 20. As amostras foram em seguida centrifugadas a 3000 x g por 10 min à 4°C e o sobrenadante foi armazenado em freezer -80°C para posterior utilização.

A.2.2 Protocolo ELISA

Baseado no princípio sanduíche e seguindo as recomendações do fabricante (R&D Systems), o ensaio imunoenzimático foi realizado em

microplaca de 96 poços de fundo chato (Greiner #675061) cujo formato permite a utilização de menores volumes de reagentes e amostra. Cada poço foi sensibilizado com 50 µL do Anticorpo Primário Monoclonal de Captura (4 µg/mL), diluído em PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄ – pH 7,2) seguido por incubação overnight à 25 °C sob agitação de 75 rpm em Incubadora Refrigerada (Cientec – Modelo CT712R). A fim de retirar o excesso de Ac não adsorvido, sucessivas lavagens foram feitas com 180 µL de solução de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS), procedimento que foi realizado entre todas as etapas, exceto após a adição do substrato. Em seguida, adicionou-se 50 µL de solução de bloqueio (reagente diluente (R&D #DY995) composto por 1% BSA em PBS) por 2 horas à 25°C. A curva padrão foi construída com 7 diluições seriadas da proteína recombinante PTX3 a partir da concentração de 14,000 pg/mL. Os soros diluídos 1:3 em reagente diluente (R&D #DY995) e as amostras de pulmão foram distribuídas em duplicata e incubados a 25 °C overnight sob agitação. O Anticorpo Secundário Policlonal de Detecção (100 ng/mL) em reagente diluente (R&D #DY995) foi então adicionado seguido por 2 horas de incubação à 25°C sob agitação. Após incubação por 20 minutos com Estreptavidina (R&D #DY998) diluída 1:200 à temperatura ambiente, a reação foi revelada com a adição de 50 µl/well de Substrate Solution (mistura 1:1 v/v de H₂O₂ e tetrametilbenzidina) (R&D #DY999), por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, seguida de adição de inibidor da reação (H₂SO₄ 2N, R&D #DY994). A leitura foi feita no leitor Spectramax M5 (Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 450nm e

540nm. Os valores de densidade óptica (DO) encontrados na leitura de 450nm foram subtraídos da leitura feita em 540nm, a fim de corrigir quaisquer imperfeições ópticas da placa.

A utilização de amostras provenientes de condições fisiológicas e patológicas nos permitiu avaliar a sensibilidade e também a especificidade dos anticorpos, uma vez que as amostras dos camundongos nocautes servem como um controle negativo para detecção de possíveis reações cruzadas. Os valores de densidade óptica (DO) encontrados a partir das diluições seriadas da proteína PTX3 foram usados para construção de uma curva padrão a partir da qual obtivemos os resultados apresentados na Tabela A5. Como se pode observar, as amostras de soro dos camundongos saudáveis CD1Wt (não injetados com LPS) apresentaram concentração média de 6,8 ng/mL, níveis próximos as condições fisiológicas humanas já descritas (≤ 2 ng/mL) (MULLER et al. 2003) (3). Um discreto aumento na quantidade de PTX3 sérica foi percebida entre animais CD1Wt controle (6,8 ng/mL) e os mesmos injetados com LPS (9,2 ng/mL), enquanto que no pulmão, essa diferença foi mais acentuada, em média 4 ng/mL e 14 ng/mL, respectivamente. Apesar dos dados estarem dentro do esperado e terem sido considerados satisfatórios, observamos que as amostras de pulmão dos camundongos nocautes injetados com LPS, que deveriam ter sido negativas, também apresentaram uma concentração detectável ($\sim 2,4$ ng/mL). A elevada DO obtida apresentou-se acima do branco da reação (poços sem amostra) cuja DO média foi de 0,097, sugerindo que uma possível ligação inespecífica pode ter ocorrido com outras proteínas da família, como SAP

e/ou Proteína C-Reativa. Já para as amostras de soro dos camundongos nocautes, nenhuma detecção foi percebida. Portanto, consideramos que o kit apresentou-se bastante satisfatório para dosagem de PTX3 no soro mas não para amostras de pulmão.

Os dados obtidos foram encaminhados à sede do fabricante. Após alguns testes, a empresa alegou que o kit não possuía reação cruzada com outras proteínas da família, mas não foi possível chegar a uma solução para os resultados inesperados em amostras de pulmão. Sabemos que dependendo da matriz onde está a proteína alvo a ser detectada (soro ou pulmão, por exemplo), fatores presentes no meio do extrato protéico (como anticorpos, outras proteínas, fatores do complemento) podem influenciar na reação antígeno-anticorpo produzindo resultados falso-positivos ou falso-negativos (R&D SYSTEMS 2009).

Tabela 5 - Valores de Densidade Óptica e Concentrações de PTX3 (pg/mL) séricas e pulmonares em camundongos saudáveis ou injetados com LPS do tipo selvagem CD1Wt e nocautes (*Ptx3^{-/-}*)

	OD	Média OD	Desv Pad	pg/mL	Média	Desv Pad
Pulmão Normal CD1Wt 1	0,232 0,216	0,224	0,01	4046,6		
Pulmão Normal CD1Wt 2	0,255 0,261	0,258	0,00	4669,7	4226,8	385,8
Pulmão Normal CD1Wt 3	0,222 0,217	0,220	0,00	3964,2		
Pulmão LPS CD1Wt 1	0,735 0,758	0,747	0,02	13622,0		
Pulmão LPS CD1Wt 2	0,727 0,761	0,744	0,02	13576,2	14364,2	1325,4
Pulmão LPS CD1Wt 3	0,896 0,845	0,871	0,04	15894,4		
Pulmão LPS <i>Ptx3^{-/-}</i> 1	0,165 0,26	0,213	0,07	3835,9		
Pulmão LPS <i>Ptx3^{-/-}</i> 2	0,109 0,092	0,101	0,01	1783,4	2495,0	0,1
Pulmão LPS <i>Ptx3^{-/-}</i> 3	0,115 0,095	0,105	0,01	1865,8		
Soro Normal CD1Wt 1	0,408 0,431	0,420	0,02	7629,4		
Soro Normal CD1Wt 2	0,369 0,348	0,359	0,01	6511,5	6841,3	685,5
Soro Normal CD1Wt 3	0,354 0,349	0,352	0,00	6383,2		
Soro LPS CD1Wt 1	0,508 0,52	0,514	0,01	9361,2		
Soro LPS CD1Wt 2	0,54 0,572	0,556	0,02	10130,9	9232,9	968,5
Soro LPS CD1Wt 3	0,426 0,476	0,451	0,04	8206,6		
Soro LPS <i>Ptx3^{-/-}</i> 1	-0,101 -0,063	-0,082	0,03	-1561,1	-1332,1	
Soro LPS <i>Ptx3^{-/-}</i> 2	-0,057 -0,057	-0,057	0,00	-1103,0		

Ainda numa tentativa de mostrar a expressão protéica de PTX3 no pulmão de camundongos, fizemos um novo teste utilizando o anticorpo monoclonal do mesmo kit que funciona para detecção sérica (RD#DY2166). Ao invés de fazermos um esquema de Elisa do tipo sanduíche, fizemos um protocolo do tipo indireto, no qual amostras de extração protéica de pulmão murino puras e nas diluições 1:10, 1:50, 1:100 e 1:300, e a curva padrão (7 diluições seriadas da proteína recombinante PTX3 a partir da concentração de 14,000 pg/mL) foram distribuídas em duplicata na primeira etapa do protocolo, num volume de 50 µl/poço e incubadas overnight a 4°C. No dia seguinte, foram lavadas 5 vezes com 180 µl/poço de PBS Tween 0,05%, procedimento que foi realizado entre todas as etapas, exceto após a adição do substrato. Em seguida, foi feito um bloqueio da peroxidase endógena (0,3% de peróxido de hidrogênio em PBS) por 15 min antes de adicionar 50 µL de solução de bloqueio (reagente diluente composto por 1% BSA em PBS -R&D #DY995) por 2 horas à 25°C. Foi utilizado o 50µl do anticorpo monoclonal (R&D #MAB2166) (4 µg/mL) em reagente diluente (R&D #DY995) seguido por 2 horas de incubação à 25°C sob agitação. Em seguida, 50µl do Ac Anti-Rat IgG conjugado a biotina (Vector #BA-4000) (100 ng/ml) foi incubado por 1 hora à 25°C sob agitação. Após 20 minutos com Estreptavidina (R&D #DY998) diluída 1:200 à temperatura ambiente, a reação foi revelada com a adição de 50 µl/poço de Substrate Solution (mistura 1:1 v/v de H₂O₂ e tetrametilbenzidina) (R&D #DY999), por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, seguida de adição de inibidor da reação (H₂SO₄ 2N, R&D #DY994). A leitura foi feita no leitor

Spectramax M5 (Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 450nm e 540nm. Os valores de densidade óptica (DO) encontrados na leitura de 450nm foram subtraídos da leitura feita em 540nm, a fim de corrigir quaisquer imperfeições ópticas da placa.

Novamente foi observada positividade para PTX3 nas amostras de pulmão provenientes dos animais nocautes e a possibilidade de dosar PTX3 pela técnica de ELISA em amostras de pulmão murinas foi desconsiderada.

Anexo 3 - Padronização de Western blot para detecção de PTX3 em amostras de pulmão murinas

A presença da proteína PTX3 em amostras murinas foi também testada pela técnica de Western blot.

A extração de proteína total dos tecidos estudados foi feita conforme protocolo descrito no item A.2.1. Trinta microgramas de cada extrato protéico foram submetidos a gel desnaturante SDS-PAGE 12%, e transferidos para membrana de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare #RPN303F). A membrana foi incubada com anticorpo primário overnight a 4°C. Após o bloqueio com leite 5%, o anticorpo secundário foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi incubada 1 minuto com ECL (GE Healthcare #RPN2109), exposta em Hyperfilm ECL (GE Healthcare) e revelada no aparelho MIN-R Processor (Kodak).

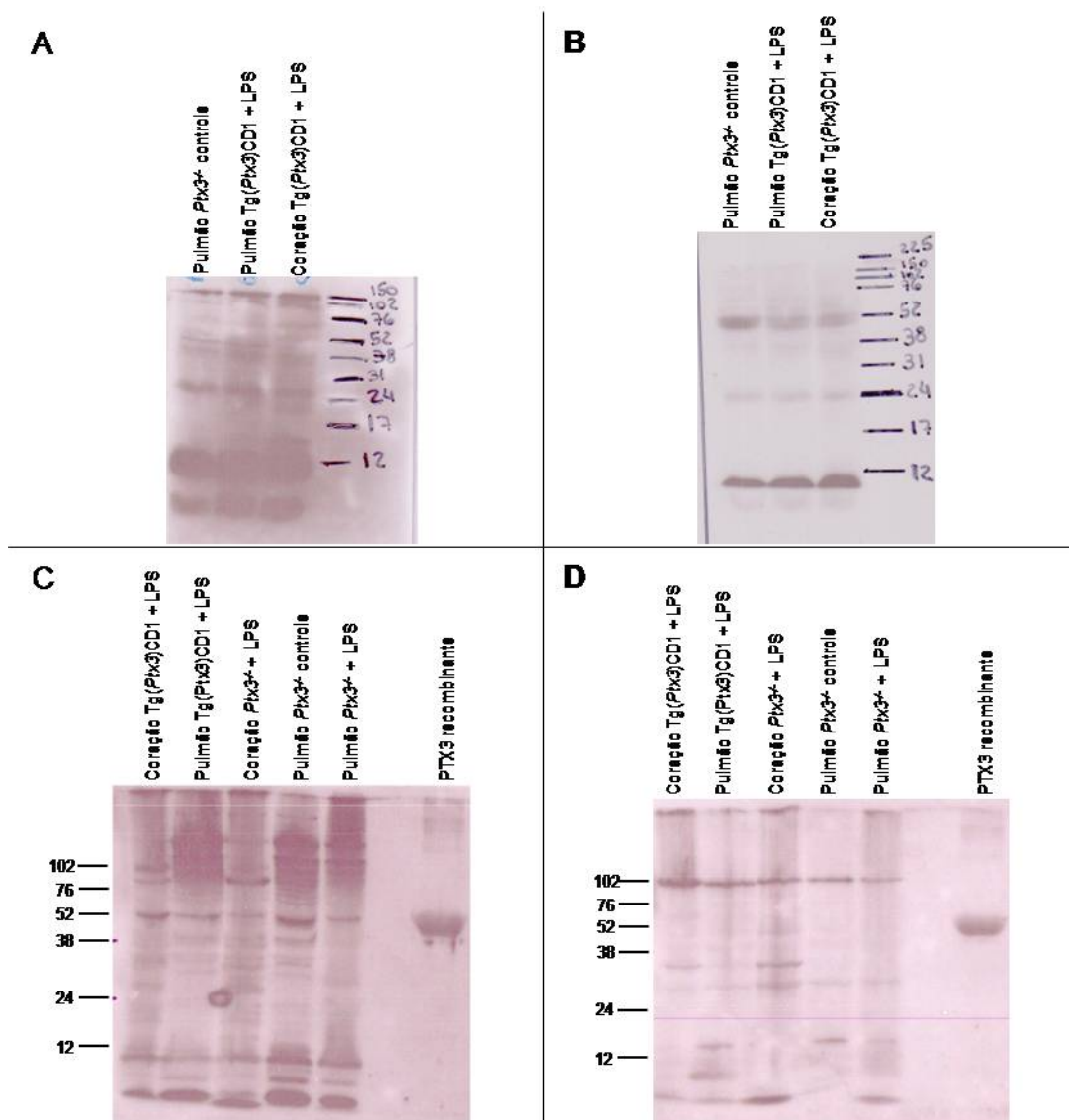
A estratégia experimental com a concentração dos anticorpos e amostras testadas está resumida na Tabela 6. Foram incluídos dois anticorpos feitos em coelhos contra 3 peptídeos sintéticos da proteína PTX3 murina: 11a (CRGELQRLRAELGRLA), 2b (NLDNEIDNGLHPTEDPTPCD) e 11c (CRLARLEDAEARRPEA). Estes anticorpos foram desenhados na porção N-terminal e por este motivo podem ser mais específicos e apresentar menos reação cruzada com outras pentraxinas da família.

Na Figura A4 observamos a presença outras bandas inespecíficas além da banda de tamanho esperado para PTX3 (~45 kDa). Além disso, bandas do tamanho esperado (~45 kDa) também são encontradas nas

amostras dos animais nocautes para *Ptx3*, sugerindo inespecificidade dos anticorpos testados. Os anticorpos feitos em coelho também apresentaram o mesmo perfil (Figura 4C e 4D), entretanto deve-se ressaltar que foram testados o soro puro dos coelhos imunizados e a purificação desses anticorpos do soro pode trazer melhores resultados.

Tabela 6 - Estratégia experimental para detecção de PTX3 em amostras murinas pela técnica de Western Blot

		Diluição	Canaleta	Amostra
Gel 1	Ac 1° PTX3 Monoclonal - RD#MAB21661 Ac 2° Ac 2° Anti-rabbit IgG - GE#NA934V	1 µg/ml 1:5000	1	Pulmão <i>Ptx3</i> ^{-/-} controle
			2	Pulmão Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 injetado com LPS
			3	Coração Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 injetado com LPS
Gel 2	Ac 1° Polyclonal PTX3 - Santa Cruz#H300 Ac 2° Anti-rat IgG Biot Vector#BA-4000	1:200 1:5000	1	Pulmão <i>Ptx3</i> ^{-/-} controle
			2	Pulmão Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 injetado com LPS
			3	Coração Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 injetado com LPS
Gel 3	Soro Coelho - R6319 Ac 2° Anti-rabbit IgG - GE#NA934V	1:500 1:5000	1	Coração Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 injetado com LPS
			2	Pulmão Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 injetado com LPS
			3	Coração <i>Ptx3</i> ^{-/-} injetado com LPS
			4	Pulmão <i>Ptx3</i> ^{-/-} controle
			5	Pulmão <i>Ptx3</i> ^{-/-} injetado com LPS
Gel 4	Soro Coelho - R6322 Ac 2° Anti-rabbit IgG - GE#NA934V	1:500 1:5000	7	Controle Positivo - PTX3 recombinante
			1	Coração Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 injetado com LPS
			2	Pulmão Tg(<i>Ptx3</i>)CD1 injetado com LPS
			3	Coração <i>Ptx3</i> ^{-/-} injetado com LPS
			4	Pulmão <i>Ptx3</i> ^{-/-} controle
			5	Pulmão <i>Ptx3</i> ^{-/-} injetado com LPS
			7	Controle Positivo - PTX3 recombinante



Legenda: Anticorpos testados para detecção de PTX3. Painel A: 1 μ g/ml RD#MAB21661; Painel B: 1:200 Ac Polyclonal PTX3 - Santa Cruz#H300; Painel C: 1:500 Soro Coelho - R6319 e Painel D: 1:500 Soro Coelho - R6322. As amostras testadas e o peso molecular (kDa) são indicados nas figuras.

Figura A4 – Western blot para detecção de PTX3 em amostras murinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Lee GW, Lee TH, Vilcek J. Tsg-14 - A Novel Tnf-Inducible Gene in Human-Diploid Fibroblasts. **Lymphokine Res** 1990, 9:570.

Lee TH, Lee GW, Ziff EB, Vilcek J. Isolation and Characterization of 8 Tumor Necrosis Factor-Induced Gene-Sequences from Human Fibroblasts. **Mol Cell Biol** 1990, 10:1982-88.

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.

R&D Systems. **DuoSets: Using Complex Sample Types**. p.5-6. Available from: <http://www.rndsystems.com/DAM_public/5667.pdf> [2009 Dec. 15].

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.