

ROSEMEIRE APARECIDA SILVA

**Identificação de novos fatores moleculares na
patogênese da aterosclerose**

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

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Elias Kalil Filho

São Paulo

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Rosemeire Aparecida

Identificação de novos fatores moleculares na patogênese da aterosclerose /
Rosemeire Aparecida Silva. -- São Paulo, 2006.

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

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Jorge Elias Kalil Filho.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.Biblioteca de peptídeos 3.Macrófagos

USP/FM/SBD316-/06

**“O Prazer de descobrir o novo deve ser uma missão em
nossa existência.”**

(autor desconhecido)

Dedicatória

A Deus, por me dar forças para enfrentar as adversidades da vida

Aos meus pais, Otaviano (*in memoriam*) e Lolita,
sempre ao meu lado

A Dra. Gesabel Clemente Marques (*in memoriam*), minha amiga,
que mostrou-me o caminho da pós-graduação, uma dedicação
toda especial

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pela amizade, confiança e principalmente por acreditar na minha capacidade, dando a oportunidade de desenvolver-me profissionalmente em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Whady Hueb que indicou-me para o Prof. Dr. Jorge Kalil ao doutorado pela Disciplina de Cardiologia do Instituto do Coração, meu sincero muito obrigada.

Ao Dr. Ricardo Giordano, do M.D. Anderson Cancer Center – Houston, Texas, pela co-orientação, por apresentar-me ao mundo do *Phage Display* e por estar comigo numa das experiências mais difíceis da minha vida, a participação na retirada de órgãos para a realização deste trabalho, o meu agradecimento pelo apoio e pelas correções desta tese.

Aos Drs. Wadih Arap e Renata Pasqualini do M.D. Anderson Cancer Center – Houston, Texas, pela participação e por cederem a Biblioteca de *Phage Display* para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

A todos os chefes de grupo: Prof. Dr. Edécio Cunha Neto, Dra. Verônica Coelho e Profa. Dra. Luíza G. Guglielmi, pelas sugestões e comentários.

A Profa. Dra. Anna Carla Goldberg, pela amizade, e por ter me dado a oportunidade do aprendizado em biologia molecular, tão necessário para o entendimento de outras técnicas, e a Dra. Sandra Drigo, dentro do possível sempre ao meu lado, auxiliando-me com paciência e amizade nos protocolos de biologia molecular bem como nas correções desta tese, meu muito obrigada.

A Profa. Dra. Andréa Maranhão pela amizade, sempre disposta a ajudar, me ensinando o outro lado de *Phage Display*, e principalmente pelas correções, críticas e comentários desta tese, meu muito obrigada em especial.

A Dra. Cristina Caldas pela amizade e os ensinamentos de vida nos momentos mais difíceis.

A Dra. Nazaré Soeiro, pesquisadora da FIOCRUZ, não tenho palavras para lhe agradecer tudo que tem feito por mim, a distância só fortalece nossa amizade, a você, Marcelo e Mateus, meu muito obrigada de todo coração.

A Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, pelos ensinamentos sobre aterosclerose, sugestões, assim como pela amizade.

A Sandra Emiko Oshiro, Dra. Kellen Faé e Dra. Léa Demarchi, pela amizade, pelas sugestões e comentários nesta tese e principalmente, por estarem presentes no momento que eu mais precisava, que foi a perda de meu pai nesta instituição, não há palavras para agradecer o apoio naquele momento.

A Neuzeti, minha amiga, que acompanha todas as etapas de minha vida, sempre acompanhadas de uma boa taça de vinho para celebrar a vida, como sempre desejou meu pai, muitíssimo obrigada por tudo.

A Dra. Simone Fonseca, por discutir comigo os protocolos e estar presente desde as primeiras reuniões do grupo de discussão de aterosclerose, até as madrugadas trabalhando com os tecidos dos doadores, meu muito obrigada todo especial a você.

Ao Prof. Dr. Rubin Tuder pela amizade, sugestões, correções e comentários e por ter em sua mãe Klara Tuder uma grande amiga.

A Sandra Maria Monteiro, pelas noites não dormidas, por passar aqui trabalhando comigo, enquanto sua família sentia sua falta, só a amizade faz isso, muitíssimo obrigada Sandra Maria.

A Evelyn, Samantha, Maísa (docinho), Simone Corrêa, Karen e Christiano (pelas excelentes ilustrações), Vítor, Bosco, Adalberto, Rajen, Gabriel, Erneston, Bia Fortunato, Giovana, Márcio, Kenya e Márcia, Regina,

Rose, Fernando, Beatriz e Guilherme, ótimos amigos, na companhia de vocês descobri como é importante a amizade.

Ao grupo que começou o *Phage Display* comigo: Juliana, Georgia, Viviane e Bia, aprendi muito com vocês.

Ao Dr. Nicholas Panajotopoulos, que sempre incentivou-me na busca do conhecimento, meu muito obrigada.

Ao Dr. Cláudio Püschel e Washington que me ajudaram na precipitação dos fagos bem como na síntese de peptídeos.

Aos funcionários e pós-graduandos do Laboratório de HLA e Vacinas pela ajuda oportuna, bem como a todos do Laboratório de Imunologia que direta ou indiretamente ajudaram na realização desta tese.

A toda equipe da OPO (Organização de Procura de Órgãos), em especial, aos enfermeiros Marcelo, Edvaldo e Cida, responsáveis pela abordagem familiar dos doadores de órgãos, num momento tão difícil.

As famílias dos doadores de órgãos e pacientes, fundamentais para realização desta tese. Meu muito obrigada.

A Disciplina de Cirurgia Vascular na pessoa do Prof. Dr. Pedro Puech-Leão, em especial ao Dr. Su Chao, pelo material obtido, sugestões e comentários.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica, funcionários, médicos, pós-graduandos e principalmente ao Dr. Paulo Gutierrez, pela ajuda, amizade, ensinamentos e correções desta tese.

Ao Prof. Dr. Bruno Caramelli e equipe, bem como ao Prof. Dr. Telésforo Bacchella por todo apoio para a implantação do projeto temático em aterosclerose.

Ao Laboratório de Cardiologia Molecular, em especial ao doutorando Tiago e Dr. Paulo S. L. de Oliveira, da Biologia Computacional, bem como ao Laboratório de Biologia Vasculare – meu muito obrigada.

Ao Dr. Marco Antonio Arap, pela amizade, sugestões e comentários, bem como os ensinamentos de *Phage Display*, lhe agradeço muito.

A Dra. Lúcia M. A. Braz, do IMT, pela amizade, apoio e correções desta tese, sempre ao meu lado nos momentos que mais precisei.

A pós-graduanda e colega Paula de Cássia Buck, na mesma semana passamos por grandes perdas e nos fortalecemos juntas, obrigada.

A Lucia Maria de Oliveira e Daniel Soares por toda ajuda na revisão desta tese.

A Neusa Dini, Juliana Lattari Sobrinho e Eva Malheiros, não tenho palavras para agradecer tudo que fazem por mim.

Ao Serviço de Biblioteca e Documentação Científica, pela gentileza e atenção da Diretora Maria do Carmo e funcionários Vanda Lenir, Marcos e Emílio.

Ao Padre Antonio Marcos Girardi – sem sua ajuda espiritual seria muito difícil ...

A minha família.

... e a todos aqueles que de alguma maneira participaram direta ou indiretamente de meu trabalho.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTAS

Abreviações e símbolos

Figuras

Tabelas

RESUMO

SUMMARY

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	2
1.2. Epidemiologia	3
1.3. A Aterosclerose	4
1.4. Patogênese	7
1.5. A resposta imune (ou inflamatória) na aterosclerose	8
1.6. Utilização da técnica de <i>Phage Display</i> na identificação de marcadores moleculares presentes em ateroma	11
1.6.1. Estrutura dos bacteriófagos	12
1.6.2. Construção da biblioteca de peptídeos.....	14
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Tecnologia de apresentação de bacteriófagos (<i>Phage Display</i>)	21
3.1.1. Biblioteca de peptídeos.....	21
3.2. Seleção de fagos em tecido vivo de ateroma (<i>Biopanning</i>)	22
3.3. Análise dos peptídeos selecionados em banco de dados	22

3.4. Tecnologia de apresentação de peptídeos por bacteriófagos – endarterectomia de carótida	23
3.5. Doadores de órgãos e pacientes com aterosclerose	23
3.5.1. Amostras de carótidas	23
3.6. Fluxograma de coleta de material biológico	26
3.7. A seleção de fagos em tecido vivo (ateroma) – <i>Biopanning</i>	27
3.8. Recuperação dos fagos ligantes – infecção bacteriana	28
3.9. Seleção dos clones de fagos	32
3.10. PCR para amplificação do DNA dos clones de fagos selecionados	32
3.11. Seqüenciamento dos clones	34
3.12. Preparo do gel de seqüenciamento	34
3.13. Tradução da seqüência de DNA inserido na pIII dos clones de fagos	36
3.14. Análise dos peptídeos selecionados e critérios de seleção	37
3.15. Produção em larga escala dos fagos selecionados	38
3.16. Ensaio de ligação do fago ao ateroma (<i>Phage Overlay</i>)	39
3.17. Expressão da molécula CD163 e do fago específico em tecido proveniente de baço e tireóide por imunoperoxidase	42
3.18. Ensaio de dupla marcação com co-localização à imunofluorescência em tecido proveniente de baço e tireóide utilizando fago específico	43
3.19. Ensaio de ligação <i>in vitro</i> com os receptores comerciais haptoglobina, hemoglobina, haptoglobina-hemoglobina e fagos	47
4. RESULTADOS	50
4.1. Seleção de clones de fagos provenientes de ateromas	51
4.2. Seqüenciamento dos clones de fagos	52
4.3. Análise do alinhamento e do Blast	54
4.4. Escolha dos clones de fagos para os ensaios de ligação	60
4.5. Ensaio de ligação por fagos em ateroma <i>Phage Overlay</i>	62
4.6. Clones de fagos escolhidos para os ensaios de ligação	64
4.7. Coloração por hematoxilina-eosina em artérias	65

4.8. Expressão da molécula CD163 e do fago (CTHRSSVVC) em tecidos	69
4.9. Ligação específica do fago <i>in vitro</i> – Ensaio de <i>binding</i>	73
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÕES	87
7. PERSPECTIVAS	90
8. REFERÊNCIAS.....	92
9. APÊNDICES	103



LISTAS

Abreviações e símbolos

CD 36	receptor <i>scavenger</i> presente na superfície dos macrófagos
CD 54	molécula de adesão intercelular, também conhecida como ICAM-1
CD 62-E	molécula de adesão leucocitária ao endotélio, também conhecida como E-selectina
CD 62-P	molécula de adesão expressa em plaquetas, megacariócitos e endotélio, também conhecida como P-selectina
cm	centímetros
DAC	Doenças Arteriais Coronarianas
DNA	do inglês “desoxyribonucleic acid” ou ácido desoxirribonucléico
dNTP	mistura dos quatro desoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
EDTA	sal tripotássico do ácido etileno-diamino-tetracético
E-selectina	molécula de adesão leucocitária ao endotélio, também conhecida como CD 62-E
Fd	fagos da classe Ff específicos para <i>E. coli</i> com plasmídeo F
Fd-tet	fago controle negativo com gene de resistência para a tetraciclina
g	aceleração da gravidade ($9,8\text{m/s}^2$)
°C	Graus Celsius
Hb	Hemoglobina
HbSR	receptor <i>scavenger</i> de hemoglobina
HDL	do inglês “High Density Lipoprotein”, ou lipoproteína de alta densidade

HLA	do inglês “Human Leukocyte Antigens”, ou Antígenos Leucocitários Humanos
Hp	Haptoglobina
ICAM-1	do inglês “Intercellular adhesion molecule-1”, ou molécula de adesão intercelular-1, também conhecida como CD 54
LDL	do inglês “Low Density Lipoprotein”, ou lipoproteína de baixa densidade
MCP-1	do inglês “monocyte chemotactic protein-1”, ou proteína quimiotática para monócitos-1
min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
nm	nanômetro
nM	nanomolar
m/v	massa por volume
pH	potencial hidrogeniônico
pb	pares de bases
PBMC	do inglês “peripheral blood mononuclear cells”, ou células mononucleares de sangue periférico
P-selectina	molécula de adesão expressa em plaquetas, megacariócitos e endotélio, também conhecida como CD 62- P
q.s.p.	quantidade suficiente para
r.p.m.	rotações por minuto

Taq DNA polimerase enzima DNA polimerase produzida pela bactéria *Thermophilus aquaticus*

TB meio de cultura "Terrific Broth"

TEMED solução de Tetramethylethylenediamine utilizada em corrida eletroforética

Tris/HCl sal Trizma com pH corrigido por adição de ácido clorídrico

V Volt

VCAM-1 do inglês "Vascular cell adhesion molecule-1" ou molécula de adesão vascular-1, também conhecida como CD 106

Abreviações dos aminoácidos

1 letra	3 letras	Nome dos aminoácidos
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido Aspártico
E	Glu	Ácido Glutâmico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

Figuras

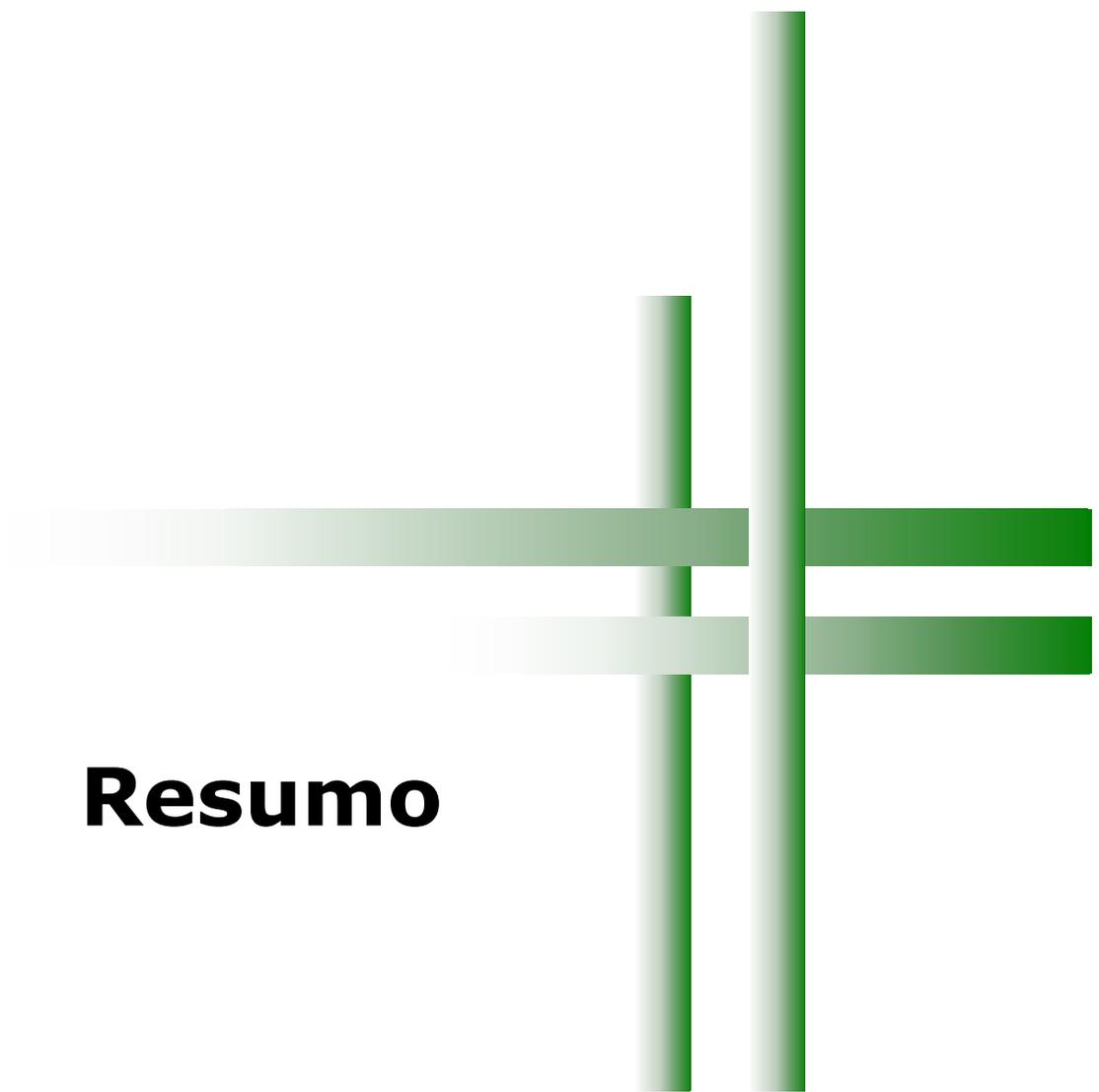
	Pág
Figura 1. Representação de uma artéria normal	5
Figura 2. Representação de uma artéria com ateroma	6
Figura 3. Estrutura do bacteriófago	13
Figura 4. Representação da construção da biblioteca de peptídeos	15
Figura 5. Fluxograma de coleta de material biológico	26
Figura 6. <i>Phage Display</i> – seleção de peptídeos ligantes à placa aterosclerótica ou ateroma	28
Figura 7. Fluxograma do ensaio de seleção e suas etapas	31
Figura 8. Gel analítico de agarose 1,5%	34
Figura 9. Exemplo de seqüência nucleotídica codificadora de um peptídeo apresentado em fago	37
Figura 10. Esquema de ensaio de sobreposição de fagos	42
Figura 11. Esquema da placa de ELISA para ensaio de ligação <i>in vitro</i>	49
Figura 12. Esquema do ensaio de ligação <i>in vitro</i> dos receptores imobilizados em placa de ELISA	49
Figura 13. Enriquecimento de clones de fagos	51
Figura 14. Alinhamento das seqüências dos peptídeos selecionados.....	53
Figura 15. Ensaio de ligação de fagos	64
Figura 16. Coloração por HE	65
Figura 17. Alinhamento do peptídeo (CTHRSSVVC) apresentado pelo fago (6E) e outras espécies	66
Figura 18. Seqüência protéica entre o peptídeo e a molécula CD163 receptor scavenger M2BP	67

Figura 19.	Estrutura cristalográfica do receptor <i>scavenger</i> M2BP	68
Figura 20.	Baço - coloração por HE	71
Figura 21.	Reação de imuno-histoquímica e ensaio de ligação de fagos - marcação de células da polpa vermelha do baço.....	72
Figura 22.	Co-localização da molécula CD163 com fago específico e não específico em baço	72
Figura 23.	Ensaio de ligação dos fagos 6E e Fd - razão da formação de clones de fagos (1)	74
Figura 24.	Ensaio de ligação dos fagos 6E e Fd - razão da formação de clones de fagos (2)	74
Figura 25.	Representação do domínio de CD163	85
Figura 26.	Representação hipotética em homodimerização, domínio 5 (CTHRSSVVC)	86

Tabelas

	Pág.
Tabela 1. Caracterização clínica dos pacientes e doadores (controles)	24
Tabela 2. Exemplos de proteínas humanas mimetizadas por motivos peptídicos selecionados em ateroma	55
Tabela 3. Seleção de peptídeos ligantes de ateroma	61
Tabela 4. Ensaio de ligação de clones de fagos (<i>phage display</i>) com seqüências peptídicas distintas expressas por fagos em artérias carótidas com e sem aterosclerose	63
Tabela 5. Reação de imunoperoxidase com seqüências peptídicas expressas por fagos e anticorpo monoclonal anti-CD163 humano	70

Resumo



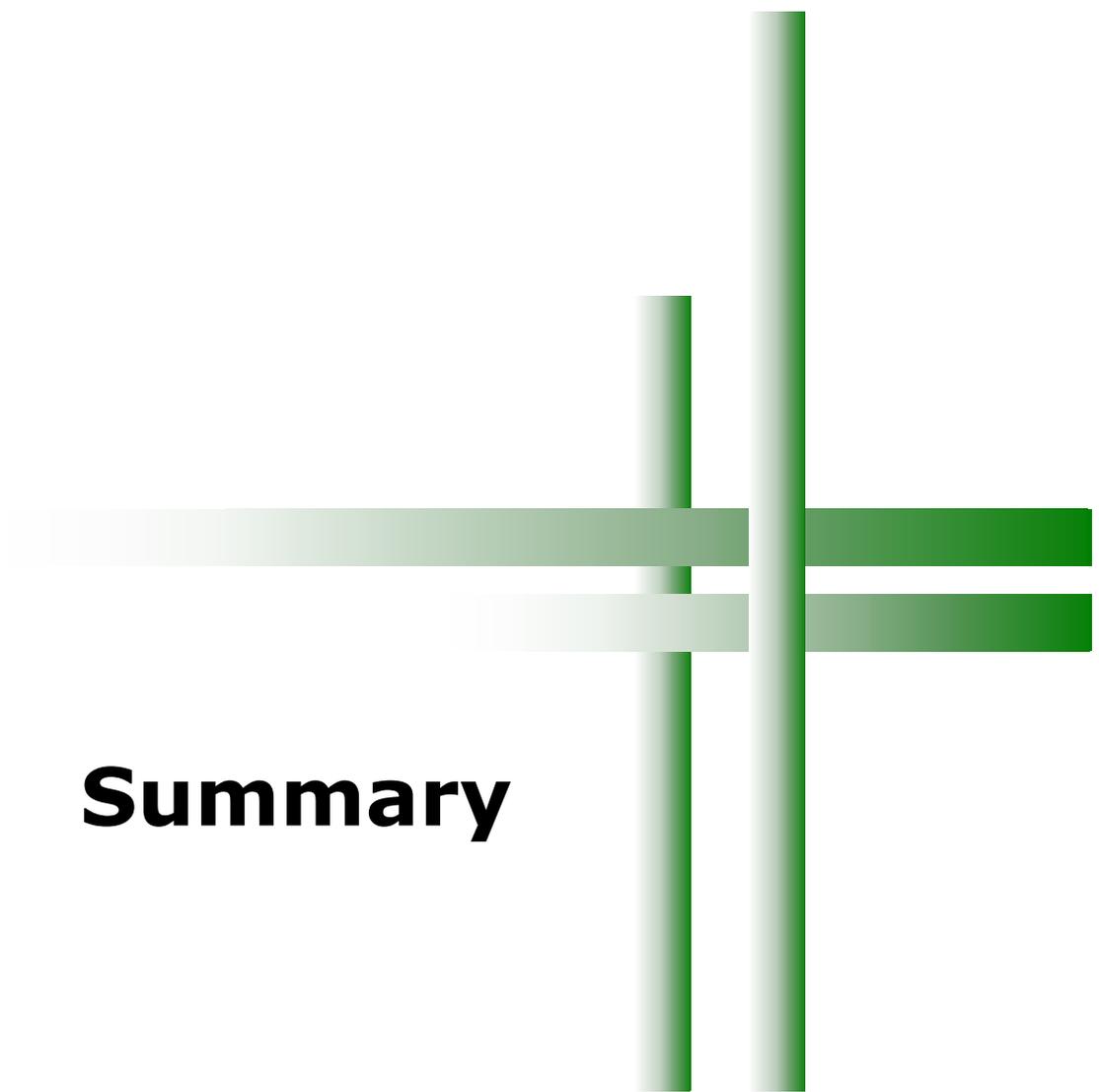
Silva RA. *Identificação de novos fatores moleculares na patogênese da aterosclerose* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

INTRODUÇÃO: Doenças cardiovasculares, como o infarto agudo do miocárdio, e eventos cerebrovasculares são causados diretamente pela aterosclerose (AS), um processo multifatorial, o qual começa precocemente, evolui progressivamente durante a infância e a adolescência, e se manifesta clinicamente mais tarde com a erosão da placa ou ruptura. Estas complicações resultam em morbidade ou eventos clínicos fatais. A presença de macrófagos e de linfócitos ativados nos ateromas sustenta o conceito de que a AS é uma doença inflamatória. **OBJETIVOS:** Para se entender os fatores que causam a AS, utilizamos a técnica de *phage display* na identificação de novos ligantes moleculares, expressos durante a evolução da doença. Peptídeos apresentados na superfície de fagos têm sido amplamente usados para se identificar epítomos importantes envolvidos no processo inflamatório. **MÉTODOS:** Uma biblioteca de peptídeos, com 7 resíduos de aminoácidos flanqueados por resíduos de cisteínas (CX₇C), foi usada em três ateromas aleatórios, provenientes de pacientes submetidos à endarterectomia de carótida no Hospital das Clínicas – InCor – HC-FMUSP. Três ciclos sucessivos de seleção ou de enriquecimento foram realizados, seguidos de seleção aleatória de clones de fagos para seqüenciamento. O alinhamento das seqüências foi feito utilizando-se o programa ClustalW. A identificação dos peptídeos apresentados por fagos, bem como seus ligantes, foi realizada utilizando-se o programa Blastp e o Genbank

database. RESULTADOS: Obtivemos 49 seqüências peptídicas provenientes de clones de fagos por seleção positiva em ateromas, o que nos permitiu selecionar peptídeos candidatos por sua distribuição em tecidos, órgãos, localização celular, função biológica, bem como auxílio de dados da literatura. Utilizando-se estes critérios, foram escolhidos, como candidatos, os seguintes peptídeos: CVSSTLLRC, CVQLNSLPC, CQAYKLGSC e CTHRSSVVC, que apresentaram positividade para ateroma em regiões distintas. CONCLUSÕES: Um peptídeo candidato, apresentando a seqüência CTHRSSVVC, ligou-se fortemente em regiões de centro lipídico, com e sem trombos, mas não em carótida não aterosclerótica, proveniente de doadores de órgãos. Este peptídeo mostra similaridade para CD163 e liga-se ao seu ligante natural que é a haptoglobina. Os dados obtidos até o momento sugerem que o CD163, um receptor *scavenger* para haptoglobina expresso por macrófagos, poderia ser um importante participante na aterosclerose.

Descritores: Aterosclerose, Biblioteca de peptídeos, Macrófagos, CD163 e Haptoglobina

Apoio: FAPESP



Summary

Silva RA. *Identification of new molecular factors involved in the pathogenesis of atherosclerosis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2006.

INTRODUCTION: Cardiovascular diseases, such as myocardial infarctions and cerebrovascular events, are directly caused by atherosclerosis (AS), a multifactorial process that begins in early in life, slowly progresses during childhood and adolescence, and manifests clinically later in life with plaque erosion or rupture. These important complications ultimately account for morbid or fatal clinical events. The presence of macrophages and activated lymphocytes within AS plaques supports the concept that AS is an inflammatory disorder. **OBJECTIVES:** With the overall goal of a better understanding the molecular mechanisms of disease progression and to find novel ways of preventing its clinical consequences, we have employed a phage display peptide library to identify new molecular ligands involved in AS. Peptides displayed on the surface of a phage particle have been widely used to identify important epitopes involved in inflammatory processes. **METHODS:** A peptide library with 7 random amino acids flanked by cysteine residues (labeled as CX₇C) was used on three random atheroma plaques from patients who underwent carotid endarterectomy at Hospital das Clínicas – InCor – HC-FMUSP. Three successive rounds of biopanning were performed, followed by selection of randomly picked phage clones for sequencing. The identification of displayed peptides and its ligands were done using Blastp software and the genbank database. **RESULTS:** We obtained 49 peptide sequences from phage clones selected by panning,

which allowed us to select candidate peptides by means of tissue and organs distribution, cellular localization, biologic function and data from literature. Using these broad criteria, we identified candidate peptides like: CVSSTLLRC, CVQLNSLPC, CQAYKLGSC and CTHRSSVVC. CONCLUSIONS: One leading candidate peptide, displaying the sequence CTHRSSVVC, bound strongly to thrombus atheroma regions but not to normal human carotid from organs donors. This peptide shows significant similarity to CD163, and binds to the CD163 natural ligand haptoglobin. These data suggest that CD163, a scavenger receptor for haptoglobin expressed by macrophages, might be an important player in atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis, Phage Display, Macrophages, CD163, Haptoglobin

Supported by: FAPESP



1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Ao longo da história, filósofos e cientistas têm contribuído para o entendimento das causas e conseqüências de diversas doenças. Descrições sobre obstrução arterial foram feitas desde o tempo de Hipócrates, seguido por outros cientistas, como Edward Jenner e Caleb Parry, que publicou sua descoberta de que a *angina pectoris* era causada pela obstrução das artérias coronárias (Parry, 1799), porém o fato pouco chamou a atenção. No decorrer do século XIX, outros cientistas como Rudolf Virchow (Virchow, 1856) e Karl Rokitansky (Rokitansky, 1852) propuseram hipóteses para explicar a aterosclerose (do grego, *athero* – mingau e *sclerosis* – endurecimento).

O primeiro indício de que o colesterol poderia estar associado com a doença aterosclerótica surgiu em 1910 com A. Windaws (Windaws, 1910), permitindo que outros pesquisadores, como S. Chalатов (Chalатов, 1912) e Nikolai Anitschkow (Anitschkow, 1913), induzissem aterosclerose em coelhos de laboratório alimentados com uma dieta rica em colesterol. Estes animais exibiam placas ateroscleróticas, ou ateromas, semelhantes às humanas.

O próprio Anitschkow admitiu que, na aterosclerose humana, a hipertensão, assim como os processos inflamatórios direcionados a parede interna da artéria, poderia acentuar o processo aterosclerótico.

O mecanismo molecular de formação do ateroma ainda é controverso. Inicialmente considerado como simples produto do acúmulo de lipídeos na parede dos vasos, a aterosclerose é hoje, sabidamente, uma doença que envolve uma resposta inflamatória em curso (Libby et al., 2002).

1.2. Epidemiologia

Dados mundiais indicam a aterosclerose como a principal causa de morte nos países industrializados, e está associada a um forte impacto sócio-econômico. A Organização Mundial de Saúde (OMS do inglês, “World Health Organization”, WHO) estima que, no ano de 2020, as doenças cardiovasculares serão responsáveis por aproximadamente 25 milhões de mortes em todo o mundo, quando uma em cada três mortes deve ter a doença arterial coronária como a principal causa.

No Brasil, a doença aterosclerótica e suas complicações são responsáveis por quase um terço de todos os óbitos, configurando-se como a principal causa de mortalidade também em nosso país, segundo dados de 2002 (Datusus – base de dados do sistema único de saúde, www.datasus.gov.br).

A aterosclerose coronária é uma doença que tem como causa múltiplos fatores, e diversos estudos têm destacado associação consistente com alguns fatores de risco, entre os quais a idade, o gênero masculino, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, níveis séricos alterados de LDL e HDL colesterol, diabetes, agentes infecciosos, fatores ambientais e marcadores genéticos. Listam-se, ainda, outros fatores que estão associados a uma maior probabilidade da doença, e que são chamados de marcadores de risco (Lusis, 2000).

1.3. A Aterosclerose

Tradicionalmente, a aterosclerose é uma doença caracterizada por um processo inflamatório decorrente da disfunção endotelial. Pode se iniciar já na vida fetal, progredir lentamente ao longo da infância e da adolescência, e se acelerar de forma episódica durante a vida adulta, resultando, finalmente, em eventos clínicos. Assim, a aterosclerose é uma doença que se desenvolve ao longo de vários anos e em diversas fases. A aterosclerose afeta, principalmente, artérias de médio e grande calibre, preferencialmente nas regiões de bifurcação da carótida, onde a turbulência do fluxo sanguíneo é maior, resultando na formação de lesões denominadas ateromas (Ross, 1999).

Quando complicadas, seja através do seu crescimento progressivo, seja através de trombose local, tais ateromas reduzem o lúmen dos vasos

sanguíneos, restringindo o fluxo de sangue para os tecidos e, assim, provocando isquemia e morte tecidual. As artérias e vasos normais são constituídos basicamente por uma estrutura trilaminar: íntima, média e adventícia (Figura 1).

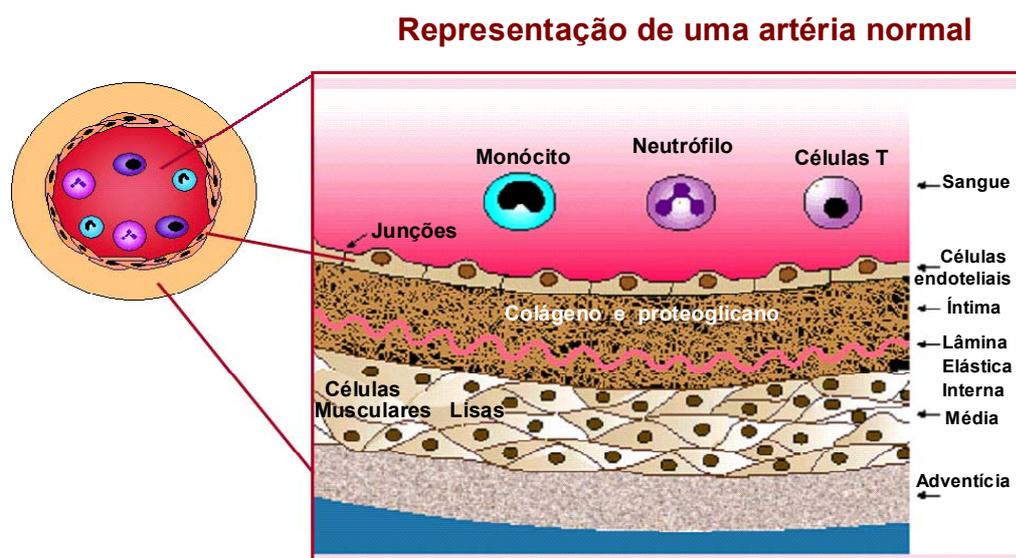


Figura 1. Representação de uma artéria normal (modificada de Lusis A. *In: Nature* 2000)

O primeiro indício da doença aterosclerótica se caracteriza pelo acúmulo de macrófagos repletos de lipídeos presentes na camada íntima do vaso. Os lipídeos oxidados ou modificados são endocitados por receptores *scavenger* (receptores que removem resíduos) (CD36) presentes na superfície dos macrófagos, tornando-se células espumosas (do inglês “foam cells”). A lesão que se forma é conhecida como *estria gordurosa*, precursora do ateroma. O mesmo acontece com algumas células do músculo liso que

penetram na íntima, e que também se transformam em células espumosas (Schoen e Cotran, 1999; Lusis, 2000; Libby, 2001) (Figura 2).

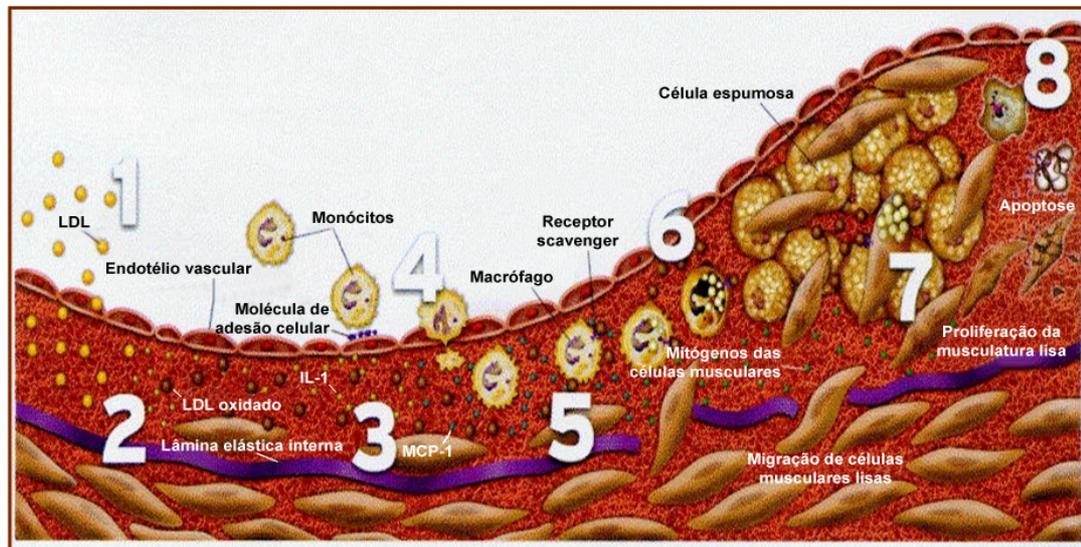


Figura 2. Representação de uma artéria com ateroma (modificada de Libby P. In: *Heart Disease*, 2001)

As células endoteliais da íntima arterial constituem a superfície de contato com o sangue, desempenhando um papel regulador de extrema importância na homeostase vascular com funções trombolíticas e trombogênicas, e mantendo o tônus vascular. O endotélio controla, também, as interações das células imunocompetentes com a parede do vaso.

Encontradas inclusive em crianças e em sociedades caracteristicamente menos afetadas pela doença aterosclerótica, as *estrias gordurosas*, embora sejam condição para o desenvolvimento de lesões avançadas, podem permanecer quiescentes por anos, décadas, e até por toda a vida do indivíduo.

1.4. Patogênese

A disfunção endotelial, ao longo de todo o processo, é considerada o evento inicial de uma série de doenças de natureza inflamatória ou imune, como as vasculites e a aterosclerose. O endotélio, como interface entre os elementos circulantes e os tecidos, é uma das barreiras de proteção contra a agressão externa, e apresenta múltiplas características que permitem sua participação na regulação da resposta imunológica. Portanto, quando o equilíbrio de produção de substâncias pelo endotélio é rompido, verifica-se um acúmulo de substâncias vasoconstritoras, pró-trombogênicas, pró-inflamatórias e proliferativas (Da Luz e Favarato, 2003).

Há vários anos, vêm sendo pesquisados os fatores que perpetuam a inflamação dentro do ateroma, ou seja, antígenos que, apresentados aos linfócitos T presentes na lesão, sejam capazes de ativá-los e de dar prosseguimento à resposta imune local, determinando a evolução de uma estria gordurosa em placa avançada. Candidatos como a LDL oxidada (Shoenfeld, 2000; e Sherer e Shoenfeld, 2002), em modelo animal, *heat shock protein 60/65* (Xu, 2002, Bason et al., 2003, Wick et al., 2004), e microrganismos como a *Chlamydia pneumoniae* (Kol et al., 1999) e *Mycoplasma pneumoniae* (Higuchi et al., 2000) lideram a lista dos possíveis antígenos mediadores da imunidade adaptativa dependente dos linfócitos T (Hansson, 2001).

Em diversos modelos animais que reproduzem a aterosclerose vascular, há sinais de inflamação na íntima dos vasos sangüíneos

associada, também, ao acúmulo de lipídeos. Este processo inflamatório na parede vascular parece se iniciar a partir de uma disfunção das células endoteliais.

1.5. A resposta imune (ou inflamatória) na aterosclerose

Estudos epidemiológicos demonstram que, na presença de hipertensão, diabetes, dislipidemia ou tabagismo, o endotélio que recobre a face luminal dos vasos sangüíneos perde parte de sua função normal (Quyumi et al., 1995; Suwaidi et al., 2000). Estes fatores de risco para o desenvolvimento da doença aterosclerótica induzem o endotélio a se ativar, recrutando células inflamatórias para a região subendotelial, iniciando a resposta inflamatória vascular. O estado ativado se traduz, também, no aumento da expressão de moléculas de adesão, como a P-selectina ou CD62-P, E-selectina ou CD62-E, ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) ou CD54 e VCAM-1 ou CD106 (molécula de adesão da célula vascular), na superfície das células endoteliais. São estas moléculas que, ao ligar-se às integrinas dos leucócitos, vão permitir a transferência dessas células para o interior do tecido pelo fenômeno conhecido como diapedese (Lusis, 2000).

Além disso, sob o efeito de citocinas inflamatórias, como IL-1 (Interleucina-1) e TNF- α (Fator- α de necrose do tumor), as células endoteliais passam ao estado ativado, também caracterizado pela perda de heparansulfatos na superfície celular, diminuição na produção de

trombomodulina e fator tecidual, e fenótipo permissivo à agregação plaquetária e à coagulação.

A VCAM-1, por exemplo, pode ser induzida no endotélio pela presença de produtos do LDL oxidado. A expressão de VCAM-1 permite aos monócitos e linfócitos T, dois dos principais tipos celulares encontrados no ateroma, aderirem às células endoteliais e migrarem para a região subendotelial da íntima vascular (Ly et al., 1993). Os monócitos e linfócitos T são estimulados a produzir IFN- γ (Interferon- γ) e TNF- α , resultando em mais inflamação, além do TGF- β (Fator- β de crescimento do tumor), que induz remodelamento de matriz e fibrose. Os monócitos são as primeiras células a serem recrutadas, as quais podem se diferenciar em macrófagos tissulares com capacidade fagocítica e de apresentação de antígenos. Podem, também, diferenciar-se em células dendríticas, essenciais para a expansão e eficiência da resposta imune direcionada e antígeno-específica. Entre as quimiocinas responsáveis por este recrutamento, uma das mais potentes é a MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos) (Ugucioni et al., 1995). Tanto a MCP-1, quanto seu receptor, CCR2, já foram identificados em lesões ateroscleróticas, confirmando seu papel no desenvolvimento de doenças inflamatórias (Boring et al., 1998; Gu et al., 1998; Kowala et al., 2000). Além disso, camundongos deficientes em MCP-1, ou em seus receptores CCR2, tinham suas lesões ateroscleróticas significativamente reduzidas, sugerindo que a interação MCP-1/CCR2 tem um papel no recrutamento de monócitos na aterosclerose (Lusis et al., 2000).

Nesse momento, na íntima do vaso, os monócitos agora denominados macrófagos, sob a ação do M-CSF (do inglês “macrophage colony-stimulating factor” ou fator estimulante de colônias de macrófagos) tornam-se ativados, fagocitando partículas de LDL que sofreram oxidação local. Nessas condições, os macrófagos são fundamentais para o início da resposta inflamatória, particularmente da resposta imune inata, por meio da secreção de radicais livres, proteases, fatores de complemento, e citocinas. Por outro lado, os macrófagos também podem iniciar a resposta imune adaptativa, por meio da apresentação de antígenos às células T. Uma vez ativados, os linfócitos T elaboram citocinas inflamatórias, como por exemplo, o IFN- γ , a IL-2 (Interleucina – 2) e o TNF- α , os quais são capazes de causar reativação dos macrófagos e amplificar a resposta inflamatória local. (Frostegård et al., 1999).

À medida que o processo inflamatório progride, linfócitos, células endoteliais, e outros tipos celulares dentro do ateroma, começam a liberar mediadores de replicação e apoptose das CML (células musculares lisas), os quais, por sua vez, encontram-se entre os principais responsáveis pela produção de matriz extracelular, característica do ateroma adulto (Lusis, 2000).

Nos estágios finais do processo, ocorre necrose focal e a fibrose invade a luz do vaso, alterando o fluxo sanguíneo. A inflamação não está presente apenas na formação do ateroma, contribuindo também de forma decisiva para desencadear as complicações trombóticas agudas associadas ao mesmo (Libby et al., 2002).

A LDL oxidada pode, também, inibir a produção de óxido nítrico, um mediador químico com múltiplas propriedades anti-aterogênicas, e sua inativação tem fundamental importância na disfunção do endotélio.

Dentro deste contexto, experimentos com camundongos deficientes de óxido nítrico sintase endotelial mostraram aterosclerose aumentada, evidenciando sua importância (Lusis, 2000).

Muitas das moléculas que foram mencionadas têm sido implicadas, direta ou indiretamente, na doença aterosclerótica. Entretanto, quais fatores são realmente importantes na etiologia da doença? Quais receptores são ativos, super-expressos e acessíveis para uso terapêutico?

Para abordar estas questões, utilizamos a técnica de apresentação de peptídeos na superfície de fagos (do inglês "*Phage Display*"), para a busca de novos marcadores moleculares associados à doença aterosclerótica, e sua possível utilização como ferramenta diagnóstica ou terapêutica. Os resultados por nós obtidos estão apresentados nesta tese.

1.6. Utilização da técnica de *Phage Display* na identificação de marcadores moleculares presentes em ateroma

Phage display é uma técnica que foi inicialmente desenvolvida por George Smith (Smith, 1985) para o mapeamento de sítios de ligação de anticorpos. Consiste da expressão de seqüências aleatórias de pequenos peptídeos (5-20 aminoácidos) fusionados a proteínas estruturais de

bacteriófagos ou fagos, vírus que infectam bactérias (Smith, 1985, Scott e Smith, 1990).

1.6.1. Estrutura dos bacteriófagos

Bacteriófagos filamentosos da família *Inoviridae* (gênero Inovírus) pertencem a um grupo de vírus de genomas circulares e de DNA de fita simples, envolvidos por um longo capsídeo cilíndrico. A classe Ff (fago filamentoso), da qual fazem parte os fagos Fd e M13, tem sido a mais amplamente estudada. A infecção viral ocorre via *pilus* sexual de células bacterianas gram negativas, as quais apresentam o gene desta fímbria especial codificado pelo plasmídeo F. Assim, os fagos da classe Fd (específicos para *Escherichia coli* (*E. coli*) com plasmídeo F), utilizados nesta tese, medem 6,5 nm de diâmetro e 930 nm de comprimento, e não promovem a morte da bactéria hospedeira. Conforme a Figura 3, a partícula viral exhibe cinco moléculas codificadas pelos genes VII (pVII - 33 resíduos aa) e IX (pIX - 32 resíduos aa), e, na outra extremidade, os fagos contêm cinco moléculas protéicas codificadas pelos genes III (pIII - 406 resíduos aa) e VI (pVI - 113 resíduos aa). O gene VIII codifica a pVIII (pVIII - 50 resíduos aa) (Webster, 2001) (Figura 3).

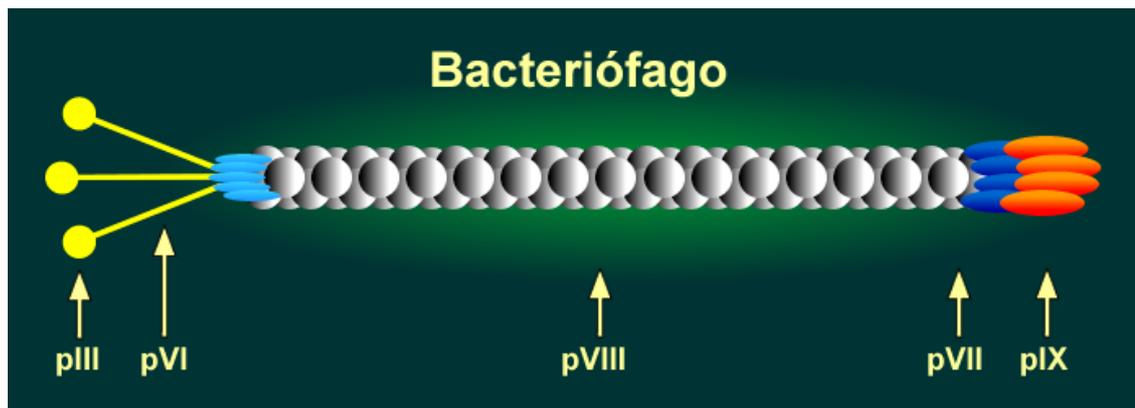


Figura 3. Estrutura do bacteriófago. Vírus bacteriano com fita única de DNA envolta dentro de um longo capsídeo, protéico cilíndrico, sendo a proteína pVIII a formadora do capsídeo e a proteína pIII a utilizada para apresentação dos peptídeos e infecção bacteriana; as proteínas pVI, pVII e pIX representam outras proteínas estruturais do vírus (modificada de Arap MA. 2003)

Já as bibliotecas de peptídeos, compreendem seqüências de aminoácidos de determinado comprimento randomicamente geradas, capazes de mimetizar e de reconhecer praticamente qualquer forma molecular presente na natureza. Variam, principalmente, conforme o comprimento do peptídeo e a sua posição na superfície do fago. De acordo com o comprimento, o peptídeo pode conter um número variável de aminoácidos. Por exemplo, a biblioteca **CX₇C** (biblioteca de peptídeo com um número variável de aminoácidos: C-cisteína e X qualquer resíduo de aminoácido), utilizada nesta tese, é constituída por fagos contendo peptídeos de 7 resíduos de aminoácidos aleatoriamente gerados, e que resulta em 2×10^7 formas diferentes. Já a posição do peptídeo na superfície do fago, variará de acordo com a localização do inserto no genoma do capsídeo viral, **pIII** e **pVIII** são as duas principais proteínas do capsídeo utilizadas pela técnica de bibliotecas apresentadas em fagos.

1.6.2. Construção da biblioteca de peptídeos

A construção da biblioteca começa pelo desenho e pela síntese de um oligonucleotídeo degenerado, o qual irá codificar a seqüência aleatória de peptídeos apresentada pelo fago. Cada resíduo da seqüência recombinante é, em geral, codificado por um códon degenerado NNK ou NNS (códon degenerado que codifica cada resíduo da seqüência recombinante (N= qualquer nucleotídeo A, G, C ou T; K=G ou T; S=G ou C). Ambas as combinações (NNK e NNS) codificam os 20 aminoácidos. Em seguida, o que se faz é clonar essa população de oligonucleotídeos pareados em vários desses segmentos, pois cada um irá codificar um peptídeo diferente em vetores que possibilitem a montagem dos peptídeos na partícula viral de um bacteriófago (vírus bacteriano), como por exemplo, o DNA de fago (fUSE5), o qual possui esses segmentos de DNA fusionados ao gene III do capsídeo viral. Dessa forma, ocorrerá a incorporação de proteína de fusão (pIII) contendo os peptídeos randômicos na superfície do fago filamentosos. A principal vantagem desta técnica é a possibilidade de gerar um grande número de formas diferentes para se selecionar o que se liga, como por exemplo, no endotélio de ateromas. Assim, as proteínas pIII e pVIII são as mais utilizadas, sendo a pIII a de mais fácil manipulação, apresentando em torno de 3-5 cópias idênticas por partícula, e que são facilmente identificadas por reação de seqüenciamento e análise em banco de dados (Pasqualini et al., 2001) (Figura 4).

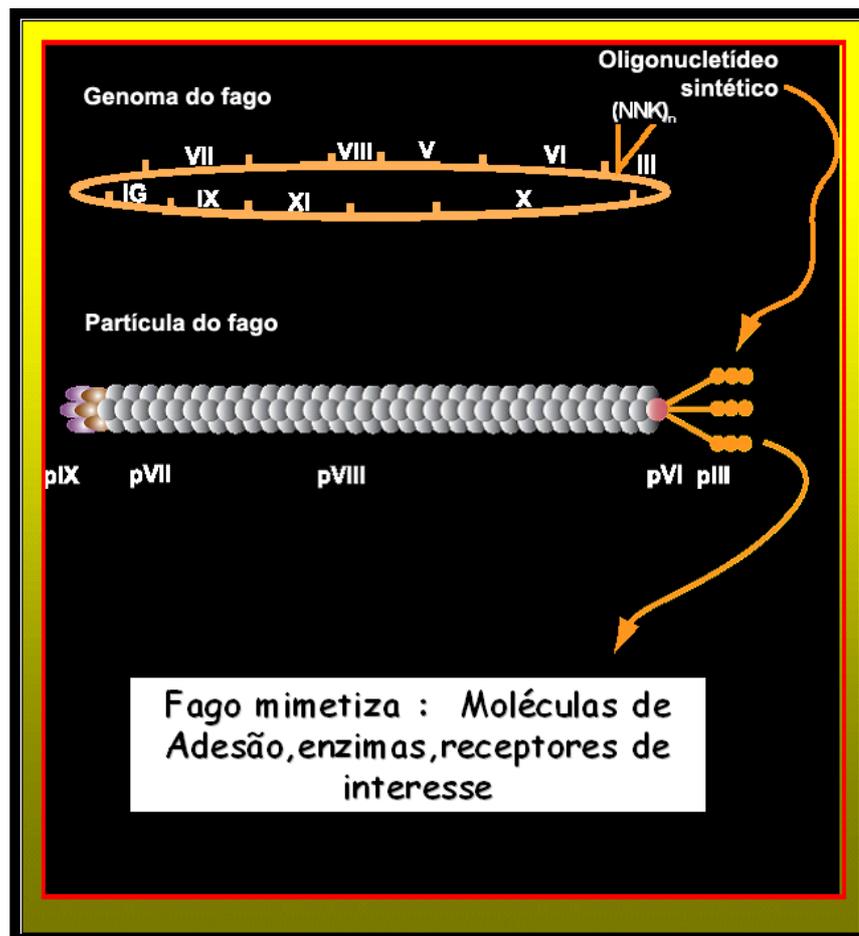


Figura 4. Representação da construção da biblioteca de peptídeos

Diversos tipos de bibliotecas podem ser construídas. As mais simples, denominadas de lineares, contêm apenas a seqüência aleatória de aminoácidos (geralmente entre 5 e 15 resíduos) e são chamadas de X_n, onde "n" representa o número de aminoácidos encontrados (p.ex., X₇ para 7 aminoácidos, X₁₅ para 15 aminoácidos, etc). As bibliotecas mais utilizadas geralmente contêm um ou dois resíduos de cisteínas, criados durante o planejamento e a construção da biblioteca. Estes resíduos de cisteína precedem, ou flanqueiam, o inserto de aminoácidos aleatórios, formando pontes de dissulfeto, que restringem o grau de liberdade do peptídeo,

proporcionando maior rigidez. Estas bibliotecas são denominadas de bibliotecas cíclicas, como nesse exemplo (CX₁₀C, CX₇C, etc).

Nos últimos anos, a técnica do *phage display* tem contribuído para descobertas nos mais diversos campos de pesquisa envolvendo reconhecimento molecular. O *phage display* é uma poderosa ferramenta para o estudo de interações protéicas *in vitro*, em células em cultura, e, principalmente, *in vivo*.

Contudo, estudos em aterosclerose, utilizando esta forte tecnologia, estão apenas no início. Comumente, é utilizada para a seleção de peptídeos, de anticorpos e de proteínas recombinantes capazes de ligação específica (Scott e Smith, 1990; Koivunen et al. 1999a; Pasqualini et al., 2002; Brígido e Maranhão, 2002). Além disto, esta técnica não apenas permite a identificação de novos alvos terapêuticos, mas também fornece informações importantes relativas à atividade biológica dos alvos identificados. Os peptídeos isolados por meio deste procedimento, assim como seus respectivos receptores, podem ser rapidamente levados à clínica, sejam como alvos diagnósticos (Mintz et al., 2002), agentes carregadores de drogas (Arap *et al.*, 1998), vetores para terapia gênica (Trepel et al., 2000; Muller et al., 2003; Hajitou et al., 2006), entre outras aplicações. Assim, surgiu o conceito de apresentação de peptídeos por fagos (do inglês "*Peptide Phage Display*"), o qual permitiu que bibliotecas de peptídeos randômicos, apresentadas por fagos (*phage display*), fossem amplamente utilizadas na identificação de peptídeos ligantes de, virtualmente, qualquer alvo biológico (Arap, 2005).

Células transfectadas super-expressadas LOX-1(receptor “lectina-like” de LDL oxidado) foram utilizadas para selecionar peptídeos ligantes desta molécula (White et al., 2001). LOX-1 é expresso em grandes quantidades em endotélios disfuncionais, tais como o endotélio aterosclerótico, mas em baixíssimos níveis em endotélios normais. Apesar dos autores identificarem uma série de peptídeos ligantes de LOX-1, nenhuma atividade funcional foi relatada até o presente.

Mais recentemente, num trabalho semelhante, peptídeos contra P-selectina foram selecionados e estão sendo utilizados para terapia direcionada de endotélios ativados, tais como o aterosclerótico (Molenaar et al., 2003). Outros trabalhos, utilizando-se bibliotecas de anticorpos, tendo como alvo principalmente o receptor de LDL, foram relatados (Shaw et al., 2001), mas ainda assim, é muito pouco, considerando-se a importância desta tecnologia para se estudar o sistema vascular (Arap & Pasqualini, 2001; Trepel et al., 2001; Pasqualini et al., 2002).

Dentro deste contexto, neste trabalho, buscou-se o isolamento de peptídeos específicos ligantes ao endotélio contendo ateroma, com o intuito de identificar-se novos marcadores para diagnóstico, ou novos alvos terapêuticos.



2

Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Identificação de novos fatores moleculares envolvidos na patogênese da aterosclerose.

2.2. Objetivos Específicos

1. Selecionar peptídeos ligantes da superfície luminal de ateroma por *phage display*, utilizando-se amostras de pacientes com indicação cirúrgica para estenose de carótida.
2. Identificar entre os peptídeos selecionados os correspondentes receptores moleculares presentes no ateroma.
3. Validar as observações por ensaios de ligação do fago ao ateroma (*Phage Overlay*), bem como ensaios de ligação *in vitro* ao receptor (quando disponível comercialmente).

Material e Métodos

3



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Tecnologia de apresentação de bacteriófagos (*Phage Display*)

3.1.1. Biblioteca de peptídeos

A biblioteca utilizada nesta tese, **CX₇C**, foi produzida nos laboratórios do Dr. Wadih Arap e Dra. Renata Pasqualini (Universidade do Texas – M.D. Anderson Cancer Center, USA), e do Dr. Erkki Koivunen (Universidade de Helsinque, Finlândia), utilizando-se o vetor fUSE5 (baseado no fago fd-tet), e a metodologia foi desenvolvida por George Smith (Smith e Scott, 1993), com modificações para melhor eficiência e para a obtenção de maior número de clones finais (Koivunen et al., 1993; 1999a e 1999b). O gene de resistência à tetraciclina, constituído no genoma do fago (Tet^R), é o que possibilita o crescimento e a seleção de bactérias infectadas com fago em meio de cultura LB (meio de cultura Luria-Bertani) contendo tetraciclina. Em meio líquido (solução) LB/tet (LB contendo o gene de resistência ao antibiótico tetraciclina), a concentração final é de 20 µg/mL; já em meio sólido (contendo ágar) LB tet/ágar, a concentração final é de 40 µg/mL.

3.2. Seleção de fagos em tecido vivo de ateroma (*Biopanning*)

A seleção de fagos ligantes de ateroma foi feita por incubação da biblioteca de fagos diretamente no tecido vivo.

3.3. Análise dos peptídeos selecionados em banco de dados

Os peptídeos identificados pela técnica do *phage display* foram analisados da seguinte forma. Numa primeira etapa, os peptídeos foram alinhados com o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), para identificar possíveis motivos peptídicos enriquecidos durante o processo de seleção. A seguir, foram realizadas pesquisas em bancos de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1997), para identificar proteínas similares aos peptídeos selecionados, levando-se em conta a distribuição em órgãos, tecidos, localização celular, e função biológica, nos auxiliando, portanto, na identificação de pares ligante-receptor.

3.4. Tecnologia de apresentação de peptídeos por bacteriófagos – endarterectomia de carótida

A obtenção do material, para a realização desta tese, foi concedida após parecer favorável da Comissão de Ética do Instituto do Coração, HC-FMUSP, bem como da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da USP, com o protocolo de pesquisa número 054/03.

3.5. Doadores de órgãos e pacientes com aterosclerose

3.5.1. Amostras de carótidas

Dois grupos de amostras foram utilizados neste estudo: (I) Amostras provenientes da rotina de doadores de Transplante de Órgãos do Hospital das Clínicas da FMUSP, denominada carótida de doador de órgãos ou carótida não aterosclerótica (n=3); e (II) ateromas de pacientes provenientes do Instituto do Coração e do Hospital das Clínicas da FMUSP, vinculados ao Departamento de Cirurgia Vascular, com indicação cirúrgica para estenose de carótida (n=3).

O critério de inclusão no grupo (I) de doadores (controle) foi idade menor de 55 anos, e o dos pacientes no grupo (II), serem maiores de 18

anos, sendo excluídos pacientes com doenças infecciosas (incluindo AIDS, síndrome da imunodeficiência adquirida), câncer, intervenção cirúrgica prévia no mesmo local, transplantados prévios ou pacientes imunossuprimidos, ou com histórico de dislipidemia familiar (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização clínica dos pacientes e doadores (controles)

Pacientes e Controles	Idade* Anos	Gênero	Material Retirado	Dados Clínicos
Paciente 1	72	Masculino	Ateroma Carótida Direita	Hipertensão Arterial Sistêmica. Dislipidemia Estenose de Carótida Esquerda.
Paciente 2	61	Masculino	Ateroma Carótida Direita	Diabético Estenose de Carótida Esquerda 70%. Estenose De Carótida Direita 90%
Paciente 3	68	Masculino	Ateroma Carótida Esquerda	Dislipidemia. Hipertensão Arterial Sistêmica. Acidente Vascular Cerebral.
Doador 1	36	Masculino	Carótida Direita	Trauma Crânio Encefálico (Espancamento)
Doador 2	17	Masculino	Carótida Direita	Trauma Crânio Encefálico (Arma de Fogo)
Doador 3	16	Masculino	Carótida Esquerda	Trauma Crânio Encefálico (Arma de Fogo)

* Idade dos pacientes no momento da coleta das amostras.

Os procedimentos de retirada e armazenamento de fragmentos, tanto de doadores, como de pacientes, foram similares, ou seja, após a remoção dos órgãos, o cirurgião retirou um fragmento de artéria carótida de aproximadamente (3 cm de extensão). Um anel de 1 cm de extensão (1/3

da amostra) foi seccionado com pinça e tesoura estéreis em 2 fragmentos, ainda no centro cirúrgico. Para minimizar ataque enzimático no tecido, as amostras foram imersas em meio DMEM (do inglês “Dulbecco’s Modified Eagle’s Médium” ou Meio Eagle modificado por Dulbecco; Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) livre de antibióticos, suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado – SFB (do inglês “FBS – Fetal Bovine Serum”; Gibco, EUA), e mantido em gelo até a chegada ao laboratório para os procedimentos de seleção, cultura de linfócitos infiltrantes, e testes anátomo-patológicos. Um dos fragmentos foi imerso em nitrogênio líquido para uso futuro.

As amostras provenientes de endarterectomia de carótida foram removidas pelo cirurgião durante o procedimento cirúrgico após raspagem da camada íntima da artéria contendo o ateroma. Um fragmento do material (~10-20%) foi processado, ainda no centro cirúrgico, e imerso em nitrogênio líquido. O restante foi imerso em meio DMEM, suplementado com SFB - 5%, e mantido em gelo até a chegada ao laboratório para os procedimentos de seleção, cultura de linfócitos infiltrantes e testes anátomo-patológicos.

Fragmentos de todos os materiais obtidos foram fixados em formalina 10% tamponada (Serviço de Farmácia do HC-FMUSP, pH 7.2) e, após 48 horas, levados ao Laboratório de Anatomia Patológica do InCor, onde foram emblocados em parafina para análise histopatológica. Os fragmentos incluídos em parafina foram utilizados para imuno-histoquímica dos marcadores identificados neste trabalho. Os resultados do estudo histopatológico são fundamentais para a caracterização dos materiais

analisados pelo método de *phage display*. Até o momento, 3 amostras de carótidas normais e 20 amostras de ateroma foram obtidas e levadas ao laboratório (Figura 5).

3.6. Fluxograma de coleta de material biológico

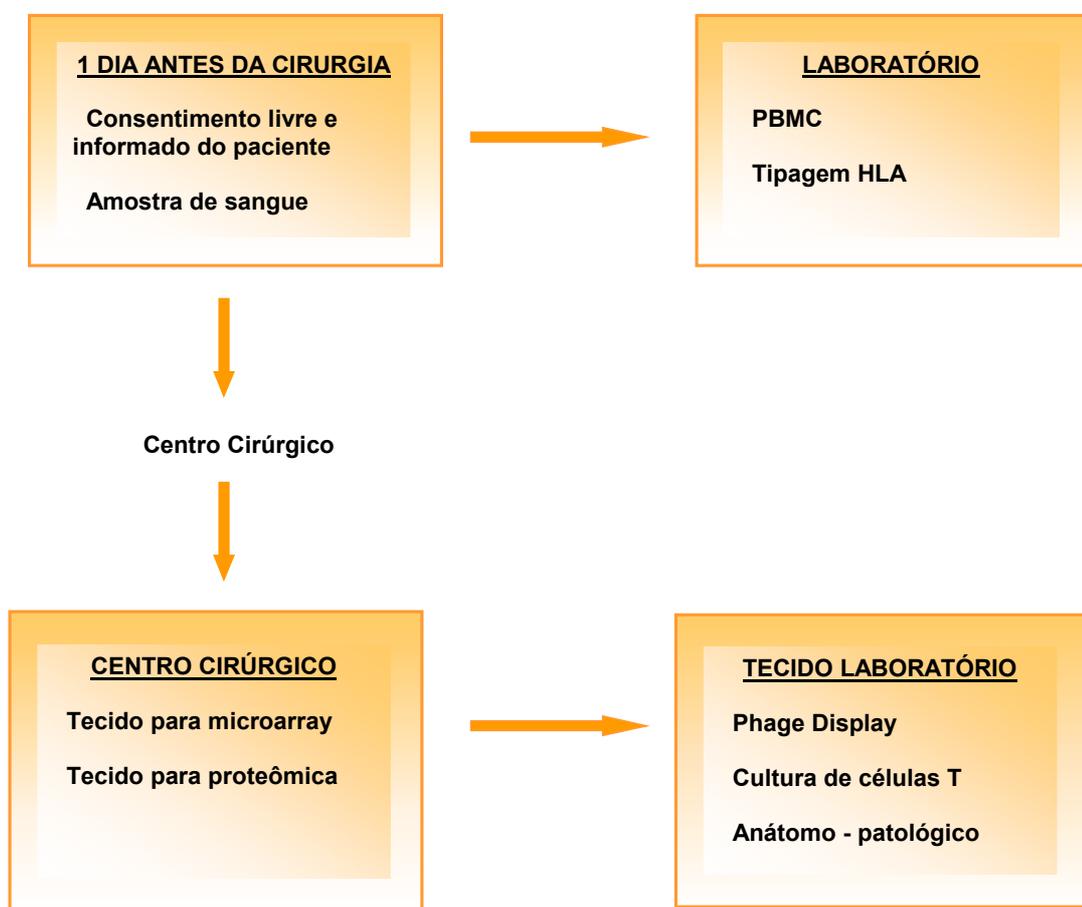


Figura 5. Fluxograma de coleta de material biológico um dia antes e no momento da cirurgia

3.7. A seleção de fagos em tecido vivo (ateroma) - *Biopanning*

A seleção de fagos ligantes em células endoteliais da superfície do lúmen de carótidas ateroscleróticas foi realizada da seguinte maneira: aproximadamente entre 1,0 cm – 3,0 cm de extensão por 1 mm de espessura, em corte longitudinal, de fragmento proveniente de endarterectomia de carótida (ateroma) foram obtidos por paciente.

No momento de chegada ao laboratório, estavam preservados em meio DMEM com SFB - 5%, em gelo. Após procedimento de separação do material, aproximadamente 0,5 a 1,0 cm deste fragmento foi lavado em placa de plástico de 24 orifícios fundo chato estéril (Marca Falcon, EUA) até que não houvesse desprendimento de sangue ou outras células, principalmente do lúmen. O tecido foi incubado com DMEM 3% BSA (do inglês “bovine serum albumin” ou albumina bovina, USB, EUA), por 15 min. em gelo, para bloquear sítios de ligação inespecíficos, sendo, em seguida, adicionada à biblioteca de fagos ($\sim 10^9$ UT – Unidades de Transdução ou Unidades Formadoras de Clones de Fagos) em 100 μ L de DMEM 3% BSA).

A incubação foi feita em contato direto com o lúmen da artéria (Figura 6). A seguir, foi colocada, aproximadamente, 500 μ L de solução de PBS (do inglês “Phosphate buffered saline”, ou solução salina tamponada com fosfato) em 3 orifícios aleatórios para se fazer uma câmara úmida, preservando-se o fragmento. A placa de plástico foi fechada com tampa e os fagos ficaram incubados em contato direto com a superfície luminal por 2

horas no gelo, realizando o que chamamos de seleção positiva, ou seja, promovendo a varredura de ligantes de ateroma e normais aí expressos.

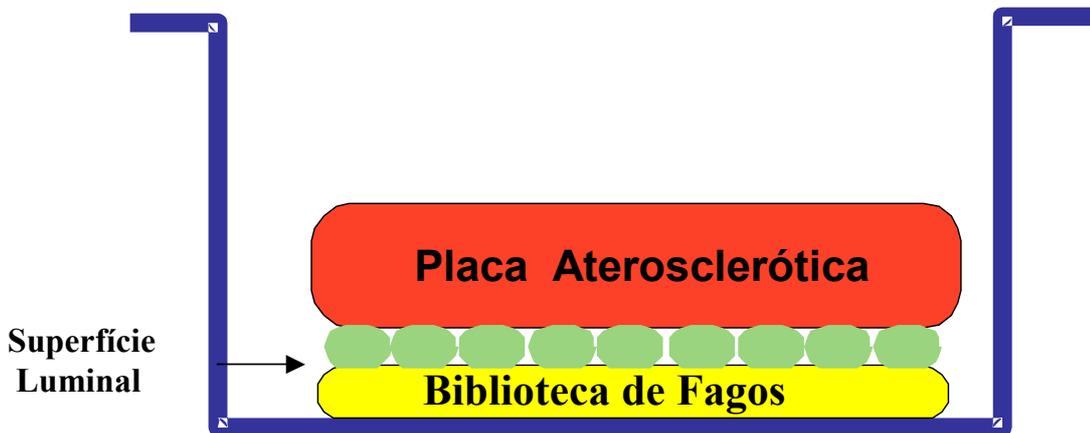


Figura 6. *Phage display* – seleção de peptídeos ligantes à placa aterosclerótica ou ateroma

3.8. Recuperação dos fagos ligantes – infecção bacteriana

Durante o período de incubação, um inóculo da bactéria *E. coli*, linhagem K91kan, a qual constitutivamente expressa o gene que confere resistência à kanamicina (Kan^R), foi colocado para crescer em 5 ml de meio de cultura TB (meio de cultura “Terrific Broth”) suplementado com tampão fosfato e kanamicina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sob agitação (Orbital Shaker, Thermoforma, EUA) a 250 rpm/37 °C. Este inóculo foi utilizado para infecção dos fagos aderidos ao ateroma, uma vez atingida a fase logarítmica de crescimento (densidade óptica 1.0 – 2.0 a 600 nm).

Após 2 horas de incubação, o ateroma foi cuidadosamente lavado com DMEM, e os fagos aderidos a mesma foram recuperados por infecção bacteriana com 2 mL *E. coli*, K91kan, que se encontrava na fase logarítmica de crescimento, acrescidos de meio de cultura LB/tet (20 µg/mL) q.s.p. 20 mL em tubos de plástico de 50 mL estéreis.

Após 40 minutos de incubação, à temperatura ambiente, uma pequena parte desta suspensão de bactérias infectadas por fagos foi submetida à titulação em volumes de 1 – 100 µL.

Depois, foram semeadas em placas de LB ágar/ tet (40 µg/mL). As placas de ágar foram incubadas por uma noite em estufa a 37°C e o número de colônias formadas nas placas foi calculado das triplicatas para cada diluição. Uma placa controle, contendo apenas a bactéria, também foi semeada (controle negativo de crescimento).

O restante da suspensão foi amplificado durante a noite em meio LB tet (20 µg/mL), sob agitação a 250 rpm/37°C. No dia seguinte, a suspensão foi centrifugada a 4°C, 15.000g, 15 min, e o sobrenadante recolhido em tubo estéril. Para cada 10 mL de sobrenadante, foram adicionados 1,5 mL (15%) de polietileno glicol 8.000 (USB,OH,EUA) suplementado com cloreto de sódio - PEG/NaCl (Smith G e Scott JK,1993), e os tubos foram mantidos a 4°C no gelo, por no mínimo 2 horas, para precipitação dos fagos.

Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 15.000g, por 30 min, a 4°C, e o sedimento (*pellet*) de aspecto leitoso foi lavado com 500 µL de PBS, centrifugado a 13.000g, por 10 min, e ressuspenso em 200 µL de PBS.

Esta biblioteca enriquecida, obtida do primeiro ateroma ou placa aterosclerótica, foi chamada de: “1° ciclo de enriquecimento ou seleção”, sendo utilizada no próximo ateroma (2° ciclo de enriquecimento ou seleção), e esta, utilizada na seqüência em outro ateroma (3° ciclo de enriquecimento ou seleção). Ao menos três ciclos de seleção foram realizados. Na última seleção ou 3° ciclo, os clones de fagos, obtidos durante semeadura em placas de LB ágar/tet (40 µg/mL), foram selecionados aleatoriamente, utilizando-se palitos de madeira estéreis, armazenados em 3 placas de plástico, cada uma com 96 orifícios, estéreis, em fundo U, (Marca Falcon, EUA), e que foram denominadas Placas 1, 2 e 3, contendo 50 µL de PBS/orifício, as quais foram mantidas a -20°C (Figura 7).

Método - Ensaio de seleção (Panning)

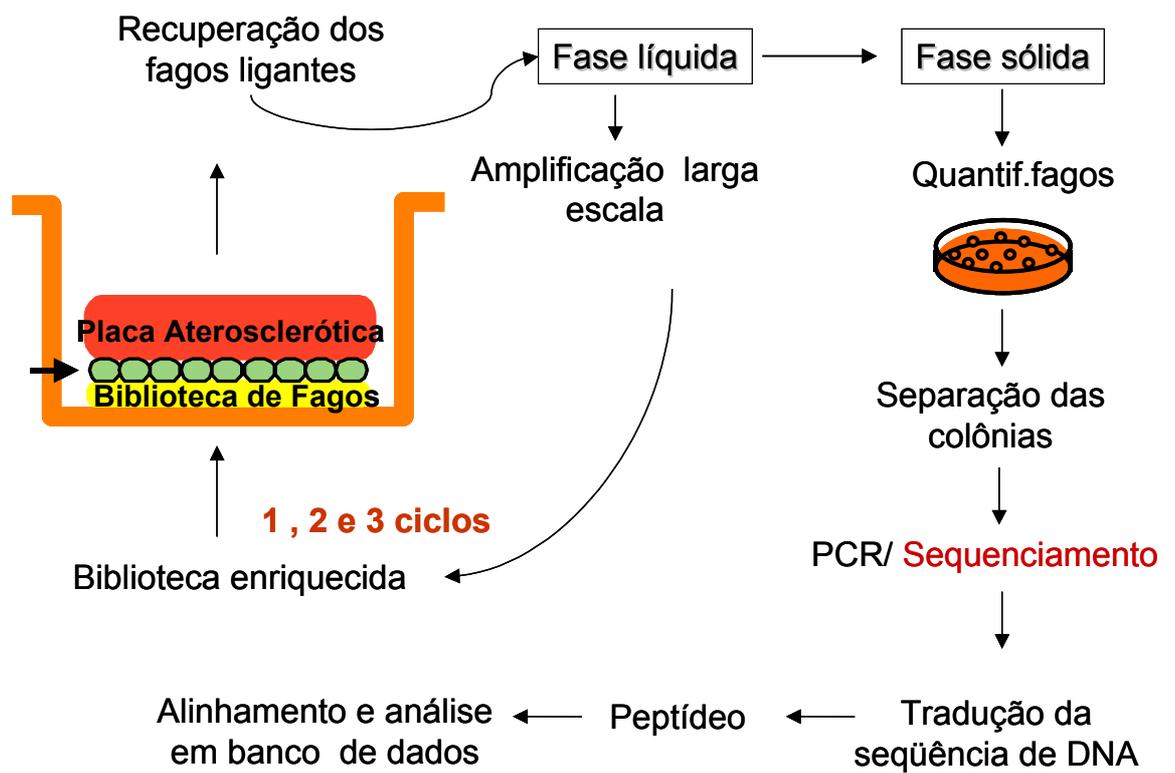


Figura 7. Fluxograma do ensaio de seleção e suas etapas

3.9. Seleção dos clones de fagos

Ao final, clones de fagos foram aleatoriamente seqüenciados para a identificação dos peptídeos selecionados em ateroma. Vale ressaltar que o número de ciclos realizados foi determinado com base na experiência anterior do grupo, quando resultados significativos foram obtidos sem haver perda da diversidade de fagos ligantes à superfície celular (Giordano et al., 2001). O conceito importante a ser lembrado é que a partícula viral carrega em seu DNA toda a informação necessária para reproduzir a si mesma, incluindo a pequena seqüência gênica codificante para o peptídeo apresentado pela partícula de bacteriófago.

Portanto, uma vez recuperados os fagos que se ligaram ao alvo selecionado, estes podem ser reintroduzidos em bactéria e isolados na forma de clones de fagos. O peptídeo apresentado pela partícula viral obtida pode, então, ser identificado por meio de uma reação de PCR (do inglês “Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase) seguida de seqüenciamento, identificando-se, então, o peptídeo ligante do ateroma.

3.10. PCR para amplificação do DNA dos clones de fagos selecionados

Descongelamos uma placa de 96 orifícios, denominada **Placa 2**, para a reação de PCR e seqüenciamento. A região do DNA do bacteriófago

contendo o inserto foi amplificada a partir de 2 μL da suspensão de PBS do DNA do fago dissolvido em 50 μL de PBS. Em um volume final de 20 μL , além do DNA, também foi adicionado à reação: 2 μL de tampão para PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl (cloreto de potássio), GIBCO,EUA); 2 μL dNTP 1 mM (GIBCO,EUA); 0,8 μL de MgCl_2 (cloreto de magnésio) a 2 mM (GIBCO,EUA); 0,2 μL de cada iniciador específico a 1,0 nM (Genosys Laboratories, EUA) para o gene da proteína pIII do fago; 0,3 μL de Taq DNA polimerase a 1.5U (Invitrogen, CA, EUA); e água destilada estéril q.s.p. 20 μL .

Esta reação foi processada em termociclador por 35 ciclos, e que compreendem: desnaturação a 94° C, por 15 segundos; hibridização a 60° C, por 30 segundos; e extensão a 72° C por 1 min. Como controle do processo, foi utilizado o gene da pIII do fago selvagem, Fd-Tet, o qual não contém o inserto de DNA exógeno codificante do peptídeo, que sempre foi amplificado em paralelo, uma vez que o produto de PCR gerado é menor do que os clones de fagos contendo inserto.

Os iniciadores utilizados para amplificar a região do gene da pIII contendo o inserto codificante do peptídeo foram: (iniciadores 5' ou senso e 3'ou anti-senso) senso 5' CATGCC CGGGTA CCTTTC TATTCT C- 3'; e anti-senso 5' CCCTCA TAGTTA GCGTAA CGATCT- 3'. O produto de amplificação foi aplicado em gel analítico de agarose a 1,5% (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), corado com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e submetido à corrida eletroforética de 100 V, por 45 min.

Na Figura 8, está representada uma amostra representativa da pureza da amplificação, para a qual *Ladder* 100 pb (pares de bases) (marca GIBCO, EUA) foi o marcador de peso molecular.

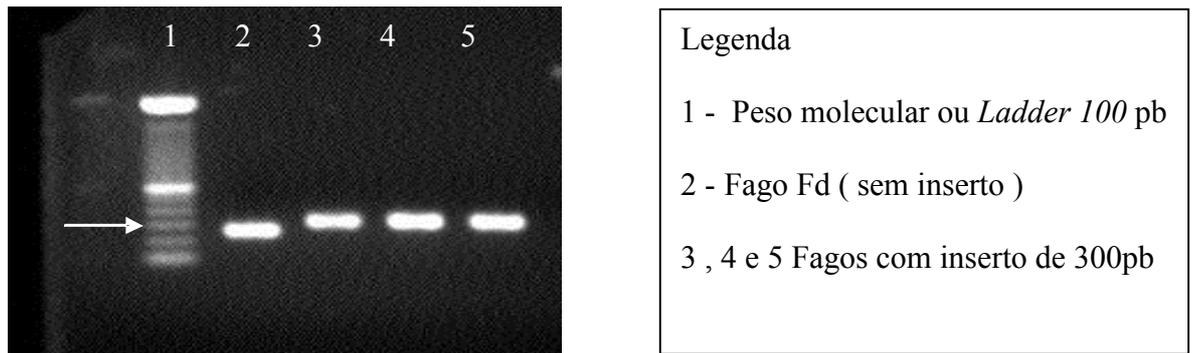


Figura 8. Gel analítico de agarose 1,5%. Amplificação dos insertos provenientes de clones de fagos

3.11. Seqüenciamento dos clones

Uma vez confirmada a presença do inserto, o produto de PCR foi, então, submetido à reação de seqüenciamento, utilizando-se o “Cy5 AutoCycle Sequencing Kit” (Pharmacia Biotech), e analisado em seqüenciador automático ABI Prism™ DNA Sequencer (Applied Biosystems), e/ou ABI Prism™ 3100 genetic analyzer-Instituto Ludwig.

3.12. Preparo do gel de seqüenciamento

A análise do DNA inserido no gene da pIII do fago foi realizada em gel de seqüenciamento contendo 6% de poliacrilamida, 8 Molar de uréia, e

1x tampão Tris-Borato-EDTA (TBE). As placas de vidro foram lavadas com detergente não abrasivo (Extran, Merck, Merck SA, Indústria Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e enxaguadas com água corrente seguida de água destilada. Antes do acoplamento das placas no suporte de migração, as mesmas foram limpas novamente com metanol para a completa remoção de resíduos de detergente e gordura.

Para uma solução de 50 mL de gel, foram pesados 18 gramas de uréia e 1,3 a 1,4 grama da resina “Amberlite” (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), acrescidos de 24,5 mL de água destilada e de 5,2 mL de solução 40% (m/v) de acrilamida/bis-acrilamida 19/1 (BioRad, Hercules, CA, EUA). Esta solução foi colocada em agitação leve até a dissolução completa da uréia.

Em seguida, esta solução foi filtrada em membrana de 0,22 μm , contendo em sua parte inferior 5 mL de tampão Tris-Borato-EDTA (TBE 10x), e o volume da solução foi completado para 50 mL com água destilada. A polimerização da acrilamida-bis-acrilamida foi, então, iniciada pela adição de 250 μL de solução de persulfato de amônia a 10% (m/v) e de 35 μL de TEMED (Amresco, Solon, Ohio, EUA), e o gel foi rapidamente transferido, com o auxílio de uma seringa, para as placas de vidro. Após a completa polimerização (aproximadamente 1 hora/30 min.), o gel foi transferido para o aparelho e a eletroforese das amostras de seqüenciamento foi iniciada.

3.13. Tradução da seqüência de DNA inserido na pIII dos clones de fagos

O peptídeo apresentado por cada clone de fago, por nós selecionado e seqüenciado, foi identificado da seguinte forma: Inicialmente, localizamos as seqüências específicas de DNA que flanqueiam o nosso inserto codificante para o peptídeo (Figura 9). No caso particular do *phage display* em ateroma, descrito nesta tese, utilizamos uma biblioteca do tipo CX₇C. Portanto, o primeiro códon que apareceu junto às seqüências flanqueadoras correspondeu a ACA (reverso e complementar para o códon de cisteína TGT), dado que este códon foi geneticamente engenheirado durante a construção da biblioteca. Para localizarmos a seqüência de DNA inserido na pIII dos clones de fagos, procuramos por seqüências flanqueadoras da proteína pIII seguida das cisteínas. Posteriormente, programas específicos disponíveis em páginas da rede (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>) foram utilizados para a tradução da seqüência de DNA que identifica o peptídeo apresentado por fago (Figura 9).

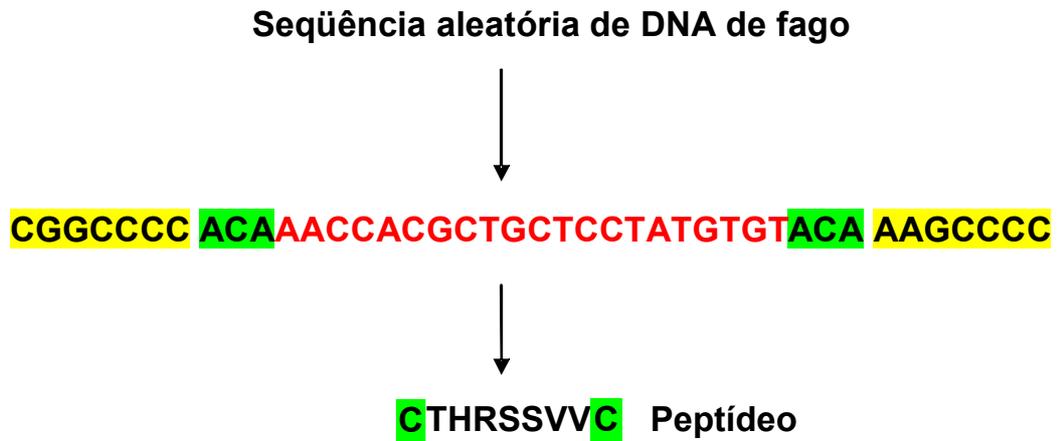


Figura 9. Exemplo de seqüência nucleotídica codificadora de um peptídeo apresentado em fago. Em amarelo - seqüências flanqueadoras do inserto codificando o peptídeo do fago; em verde – códon das cisteínas presente na biblioteca cíclica CX₇C; em vermelho – inserto codificante de um peptídeo de 7 resíduos de aminoácidos

3.14. Análise dos peptídeos selecionados e critérios de seleção

Os peptídeos ligantes de ateroma identificados foram analisados utilizando-se diversas ferramentas de bioinformática. Peptídeos com homologia na seqüência primária foram identificados utilizando-se o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). A similaridade dos peptídeos com proteínas conhecidas foi avaliada utilizando-se o algoritmo BLAST (do inglês “Basic Local Alignment Search Tool”) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). A identificação do peptídeo foi feita utilizando-se o programa Blastp (BLAST para proteínas), com o ícone de procura “Blast-search for nearly exact matches” e “matriz PAM30”. Caso a seqüência candidata não apresentasse similaridade com a do humano, transportava-se toda a seqüência nucleotídica obtida para o Blastp, limitava-

se a procura especificamente para *Homo sapiens*. Para a análise de similaridade com proteínas humanas, levou-se em consideração critérios de distribuição em órgãos, tecidos, localização celular, estrutura e função biológica, assim como possível participação na doença aterosclerótica por meio de dados da literatura.

3.15. Produção em larga escala dos fagos selecionados

Após seqüenciamento dos fagos e análise dos peptídeos em banco de dados de proteínas conhecidas, os clones dos fagos selecionados foram preparados em larga escala, de modo que houvesse quantidade suficiente para futuros experimentos de validação. Após cada etapa de amplificação, realizou-se, novamente, o seqüenciamento do clone de fago (armazenado à -20°C em PBS nas placas de 96 orifícios), a fim de assegurar que o mesmo não sofresse mutações antes ou depois do processo de produção em larga escala. A produção em larga escala foi feita conforme o item (3.8)

Todas as preparações em larga escala foram tituladas 3 vezes, em paralelo com uma preparação do fago Fd (sem inserto), e calculou-se o título final em UT/ μ L.

3.16. Ensaio de ligação do fago ao ateroma (*Phage Overlay*)

- Ensaio de "*Overlay*" - Sobreposição de fagos
- Adaptação da metodologia utilizada por Arap *et al.*, 2004

O processo de desparafinização e hidratação das secções de 4µm de espessura em lâminas de microscopia provenientes de pacientes submetidos à endarterectomia de carótida e de doadores de órgãos, apresentando carótida não aterosclerótica, foram realizados no Laboratório de Anatomia Patológica do InCor – HC-FMUSP. Todas as amostras utilizadas foram examinadas, e as lesões foram confirmadas com base nas características histopatológicas à microscopia óptica, após coloração pela hematoxilina–eosina (HE), sendo denominados achados histopatológicos. A análise das lâminas, assim como das fotos, foram realizadas utilizando-se microscópio Zeiss do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor e supervisionadas por um único patologista.

No dia da realização do experimento, as lâminas foram desparafinizadas por 3 incubações de 15 min em xileno, 3 passagens de 3 segundos em etanol 100% (v/v), 3 passagens em etanol 95% (v/v), uma passagem em etanol 70% (v/v), e lavagem em água. Antes do uso as lâminas foram hidratadas por incubação de 5 min em água destilada.

A remoção da peroxidase endógena foi feita por 3 incubações de 10 min em H₂O₂ (água oxigenada), 10 volumes em PBS, seguida de 5 min em

água e 5 min em TBS pH 7.5 com 0,1% Tween-20 (do inglês "Tris buffered saline" ou salina tamponada com sal Trizma, contendo Tween).

A recuperação antigênica foi feita em solução de citrato e aquecimento em microondas com potência máxima por 8 min, em potência 40% por 12 min, manutenção dentro do microondas por 10 min, e à temperatura ambiente por mais 10 min. Depois disso, seguiram-se 3 lavagens em TBS . Este processo foi realizado em parte dos espécimes de placa de ateroma e de carótida não aterosclerótica. Em outra parte dos espécimes de ateroma, baço e tireóide, foi utilizado o processo de recuperação antigênica com Tris/EDTA 1X pH 9.0, com 0,05% de Tween-20 a 95°C em banho-maria por 25 min, depois 20 min à temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens em TBS. Este protocolo foi estabelecido pelo Laboratório de Anatomia Patológica do InCor. O bloqueio, quanto a eventuais ligações protéicas inespecíficas, foi feito com DAKO protein block (DAKO, Carpinteria, CA, EUA) por 30 min.

Após a remoção do bloqueio, foram adicionados 2×10^9 UT dos fagos selecionados em banco de dados e controle negativo (Fd - tet) em 200 μ L de PBS com 1% (m/v) BSA, sendo as lâminas mantidas à temperatura ambiente por 2 horas em câmara úmida. Os fagos foram removidos por inversão de lâmina e se acrescentou 100 μ L do anticorpo primário anti-bacteriófago, anti-Fd desenvolvido em coelho (Sigma Chemical Group, St. Louis, MO, EUA), na diluição 1:500 em TBS, mantendo-se à temperatura ambiente em câmara úmida por 1 hora. Lavou-se 3X com TBS Tween 0.1% (m/v) por 5 min, e se acrescentou 100 μ L do anticorpo

secundário feito em cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Vector labs), diluído a 1:400 em TBS. Lavou-se 3X com TBS Tween 0.1% por 5 min. Vale ressaltar que também foi utilizada, como opção paralela, após incubação de anticorpo primário coelho anti-Fd, o conjunto de peroxidase LSAB+ (streptoavidina-biotina) (DAKO, Carpinteria, CA, EUA), devido à praticidade do sistema, no qual foi feito contra anticorpos primários de coelho, camundongo e cabra.

A imunohistoquímica foi realizada pelo método de peroxidase. Utilizou-se 100 μ L, por lâmina, de DAB (Diaminobenzidina, DAKO, Carpinteria, CA, EUA), substrato da peroxidase, diluído como cromógeno de coloração castanha, num período que variava entre 3 a 5 min à temperatura ambiente em câmara úmida, no escuro. As lâminas foram lavadas em água de torneira para a remoção do cromógeno e coradas com hematoxilina de Harris entre 30 e 45 segundos. Seguiu-se lavagem em água de torneira, incubação entre 30 e 45 segundos em Água Scott para contra - coloração, seguida de lavagens em água de torneira.

Os cortes foram desidratados em gradiente alcoólico e xileno, por uma passagem de 3 segundos em etanol 70%, duas de 3 segundos cada em etanol 95%, duas de 3 segundos cada em etanol a 100%, e 4 passagens rápidas de aproximadamente 2 segundos em xileno, permanecendo nas cubas durante a montagem. As lâminas foram montadas ainda úmidas com Entellan e lamínula (Figura 10).

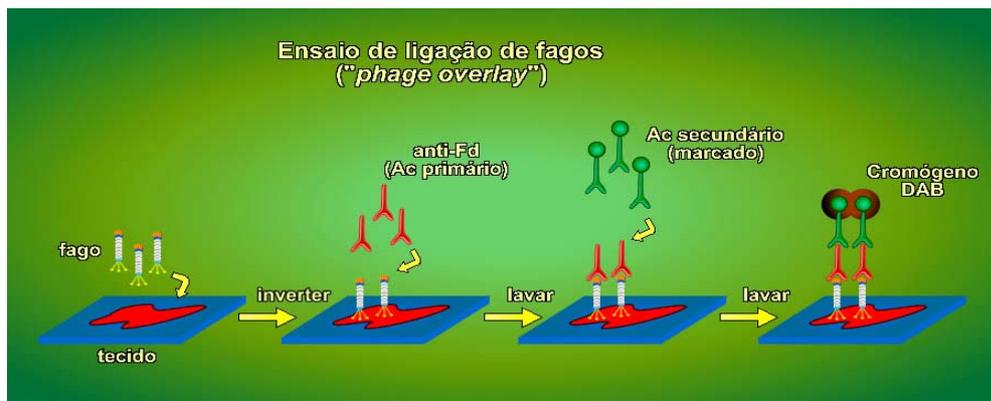


Figura 10. Esquema de ensaio de sobreposição de fagos

A análise das lâminas foi feita da seguinte maneira: positividade fraca (+) focal na capa fibrosa, positividade intensa (++) centro lipídico e áreas de trombo, e negatividade (–) nenhuma região do tecido.

3.17. Expressão da molécula CD163 e do fago específico em tecido proveniente de baço e tireóide por imunoperoxidase

Este modelo de padronização, realizado em baço e tireóide humanos provenientes do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor, teve por objetivo analisar a expressão da molécula CD163 (receptor *scavenger* do complexo hemoglobina-haptoglobina (Hb-Hp), presente na superfície de macrófagos e monócitos, também conhecida como molécula M130 ou p155) bem como a capacidade de reconhecimento do fago específico, CTHRSSVVC, selecionado nesta tese, e do fago controle negativo, (Fd-tet),

pelo ensaio de ligação de fagos (“*Overlay*” – já descrito anteriormente), em tecidos que sabidamente expressam a molécula CD163, como o baço, e que não a expressam, como a tireóide, antes de realizarmos os testes específicos em ateroma e carótida não aterosclerótica.

Todo o processo de desparafinização, recuperação antigênica, bloqueio e realização do teste, foram ocorrendo como descrito anteriormente, sendo que, para o anticorpo monoclonal camundongo anti-CD163 humano para tecidos (Novocastra Laboratories, New Castle Upon Tyne, UK), foi utilizada a diluição de 1:100 em 100 µL de TBS. Após a incubação do anticorpo primário, utilizou-se o conjunto de peroxidase LSAB+ (streptoavidina-biotina) (DAKO, Carpinteria, CA, EUA). A imuno-histoquímica pelo método da peroxidase foi realizada da mesma forma que no item 3.16, e a análise foi feita da seguinte maneira: positividade (+) difusa, e negatividade (–) nenhuma região do tecido.

3.18. Ensaio de dupla marcação com co-localização à imunofluorescência em tecido proveniente de baço e tireóide, utilizando fago específico, fago não específico, e anticorpo monoclonal camundongo anti-CD163 humano

Este ensaio de dupla marcação foi realizado com anticorpo monoclonal e fagos, os quais foram reconhecidos por anticorpos anti-Fd. Marcou-se em verde, os fagos, com conjugado fluorescente FITC (do inglês

“Fluorescein IsoThioCyanate” ou Isotiocianato de Fluoresceína, Sigma, EUA) e para o anticorpo monoclonal camundongo anti-CD163 humano marcou-se em vermelho para reconhecimento da molécula CD163 humana (Cyanine dye, Sigma, EUA).

O ensaio teve por objetivo observar a existência ou não de co-localização entre o fago e a molécula CD163, e assim confirmar-se a hipótese de quais seriam os possíveis ligantes deste fago, uma vez que este se liga ao complexo Hb-Hp (complexo Hemoglobina – Haptoglobina) (Kristiansen et al., 2001). Todas as amostras utilizadas foram examinadas com base nas características histopatológicas à microscopia óptica, após coloração pela HE.

O processo de desparafinização, hidratação e recuperação antigênica de secções de 4 μm de espessura em lâminas de microscopia, foram provenientes de baço e tireóide humanos do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor, e seguiram o processo metodológico descrito no item 3.16. A seguir, foi realizado bloqueio de 1 hora com “protein block” (bloqueador proteico - DAKO, Carpinteria, CA, EUA) para evitar reação inespecífica.

A quantidade de 2 X 10⁹ fagos específico (CTHRSSVVC) e não específico (CVSSTLLRC) foram diluídos em 200 μL de PBS com 1% (m/v) BSA, e adicionados ao tecido proveniente de baço em lâminas separadas, e devidamente identificadas, por 2 horas.

Após este tempo, desprezou-se os fagos por inversão de lâmina e acrescentou-se, concomitantemente, 100 μL do anticorpo primário anti-Fd

desenvolvido em coelho (isotipo de imunoglobulina G-IgG) (Sigma Chemical Group, St. Louis, MO, EUA), na diluição 1:500 em TBS, mantendo-se à temperatura ambiente em câmara úmida, no escuro, por 1 hora.

Lavou-se 3 X em TBS Tween 0.1% (v/v) e acrescentou-se 100 µL do anticorpo secundário fluorescente desenvolvido em cabra anti-IgG de coelho FITC, na diluição 1:30 em TBS, mantendo-se à temperatura ambiente em câmara úmida, no escuro, por 1 hora.

A seguir, lavou-se 3 X em TBS Tween 0.1% (v/v) e acrescentou-se o anticorpo monoclonal anti-CD163 humano, já descrito anteriormente, na diluição 1:100 em TBS, mantendo-se à temperatura ambiente em câmara úmida, no escuro, por 1 hora.

Após este tempo, houve outra lavagem de 3 X em TBS Tween 0.1% (v/v) e acrescentou-se o conjugado fluorescente desenvolvido em ovelha anti-IgG camundongo CY3 (do inglês "Cyanine dye" ou corante de cianina, Sigma, EUA), na diluição 1:700 em TBS, mantendo-se à temperatura ambiente em câmara úmida, no escuro, por 1 hora. Lavou-se 3 X em TBS Tween 0.1% (v/v) e acrescentou-se nas lâminas PBS com glicerol (v/v), sendo vedadas com esmalte. O controle negativo fago (Fd-Tet) e o fago específico (CTHRSSVVC) (em duplicata sem dupla marcação), denominados controles do teste, seguiram todos os procedimentos acima em tecidos provenientes de baço e tireóide, até a adição do anticorpo secundário cabra anti-IgG coelho FITC (Sigma, EUA), na diluição 1:30 em TBS, mantendo-se à temperatura ambiente em câmara úmida, no escuro, por 1 hora.

Após este tempo, lavou-se 3 X em TBS Tween 0.1% e acrescentou-se nas lâminas PBS com glicerol (v/v), sendo vedadas com esmalte. A leitura foi realizada imediatamente em microscópio Axion Vision200 com filtros –FITC (565-580 nm) e CY3 (552 – 570 nm) do Laboratório de Biologia Vascular do InCor HC-FMUSP.

As imagens foram estabelecidas, do começo ao fim das leituras, com o mesmo tempo de exposição aos seguintes fluoróforos: 1) **FITC** – 400 milisegundos, e 2) **CY3** – 1800 milisegundos, neste dia. Na lâmina correspondente à dupla-marcação, a leitura foi realizada da seguinte maneira: após estabelecer o tempo de exposição para os fluoróforos acima, frente aos controles utilizados, para a mesma região, sem mudar a lâmina de campo, foram fotografados em filtro FITC, e mudando-se, imediatamente, para filtro CY3, e fotografados novamente, utilizando-se objetiva 10 vezes (10X) de magnitude. As imagens obtidas foram, então, gravadas no computador e utilizadas para “Co-Localização” (sobreposição) no Laboratório de Cardiologia-Molecular do InCor HC-FMUSP, o qual possui o programa de “Co-Localização” (Image Pró-Plus, EUA). As imagens co-localizadas são aquelas cuja somatória no computador ficam coradas em amarelo. Para as imagens não co-localizadas, não há somatória no computador, ficando, dessa forma, entremeadas.

3.19. Ensaio de ligação *in vitro* com os receptores comerciais haptoglobina, hemoglobina, hemoglobina-haptoglobina e fagos

Para validar a interação entre fago-receptor, foram realizados ensaios de ligação *in vitro* dos fagos aos receptores comerciais haptoglobina e hemoglobina (Sigma Chemical Group, St. Louis, MO, EUA), e do complexo Hb-Hp imobilizados em placa de ELISA (placas de ensaio imunoenzimático de 96 orifícios, fundo chato, Marca Falcon, Pro - Bind, EUA).

No ensaio, foi empregado 10 µg/mL em PBS de cada receptor, bem como controle PBS – 3% BSA. A seguir, sensibilizamos a placa de 96 orifícios com 50 µL da concentração acima, de um dia para outro, em duplicatas a 4°C para os receptores acima, bem como o BSA como controle da especificidade da ligação peptídeo / receptor .

Três lavagens com PBS foram efetuadas, visando à remoção do excesso de receptor (estima-se que apenas 100 nanogramas é adsorvido à placa). O bloqueio com 200 µL PBS-3% BSA realizou-se por 1-2 horas à temperatura ambiente. Durante esse período, iniciou-se a cultura da bactéria *E. coli* K91 kan em 5 mL de meio TB, como descrito anteriormente. O crescimento bacteriano foi monitorado de modo a utilizar a bactéria na fase logarítmica (log) de crescimento, ou seja, fase em que a bactéria expressa o F-pili (pili sexual) necessário para a infecção.

Posteriormente, 1×10^9 UT do clone de fago expressando o peptídeo de interesse (CTHRSSVVC), bem como do fago selvagem controle Fd-tet (sem inserto de peptídeo exógeno), foram adicionados num volume

final de 50 μ L PBS-1,5% BSA e incubados por 1 hora à temperatura ambiente (Figura 11).

O título do fago expressando o peptídeo CTHRSSVVC foi obtido após sucessivas infecções bacterianas, de modo a se obter um número mais preciso de partículas virais infectantes. Os orifícios foram lavados 9 vezes com PBS, e os fagos ligados aos receptores imobilizados foram, então, recuperados por infecção com 100 μ L de *E. coli* K91 kan. Após o período de infecção de aproximadamente 20 min, a bactéria foi homogeneizada nos orifícios, e 90 μ L foram removidos para se prosseguir com diluições em meio LB.

Diluições seriadas foram realizadas, sendo plaqueadas em meio LB-ágar-tetraciclina (40 μ g/mL). As placas foram incubadas por 16-18 horas em estufa a 37°C, e o número de fagos aderidos a cada orifício pôde ser quantificado por contagem de colônias, como descrito anteriormente. Para ligações específicas do fago/receptor, esperamos obter um maior número de colônias nos orifícios onde o fago candidato foi adicionado aos receptores, em comparação com os orifícios controle, ou seja, tanto com adsorção de PBS-3% BSA, quanto com adição do fago Fd-tet no receptor imobilizado (Figura 12).

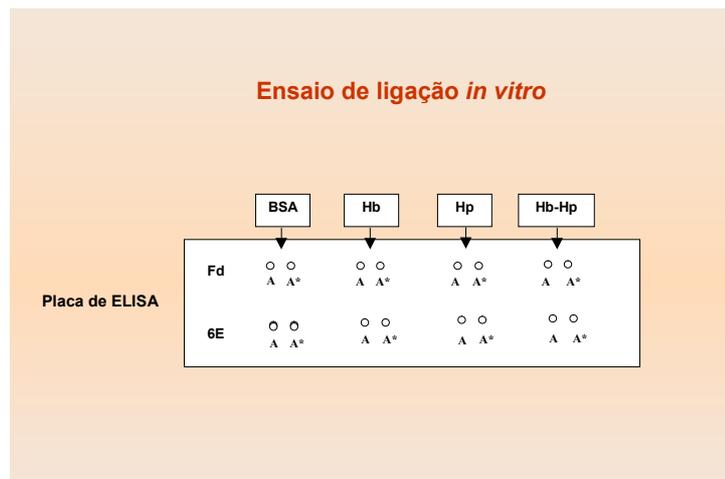


Figura 11. Esquema da placa de ELISA para ensaio de ligação *in vitro* - Fago Fd (sem inserto) e Fago (6E) CTHRSSVVC

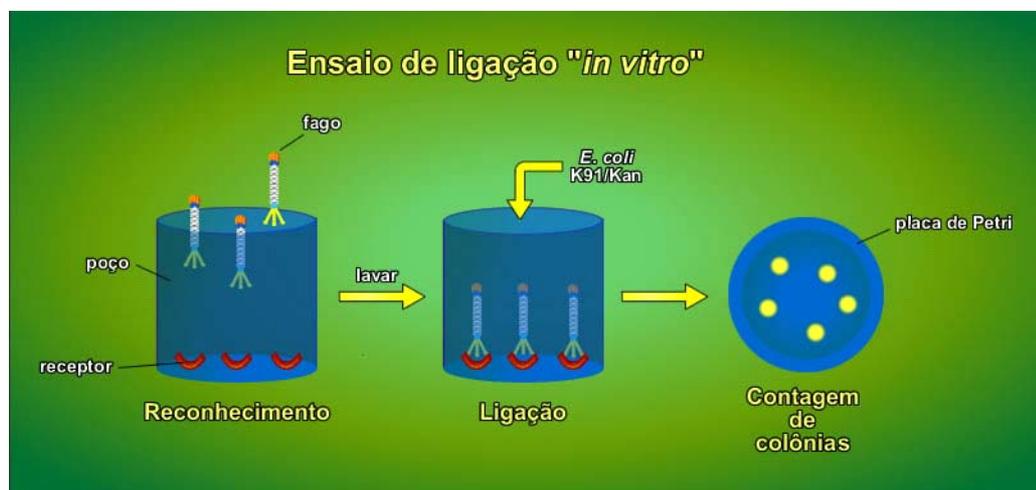


Figura 12. Esquema do ensaio de ligação *in vitro* - receptores imobilizados em placa de ELISA por orifício ou poço

4

Resultados



4. RESULTADOS

4.1. Seleção de clones de fagos provenientes de ateromas

Após 3 ciclos de seleção de clones de fagos, utilizando a biblioteca CX₇C (1 x 10⁹ UT – Unidade de transdução ou formadora de clones de fagos) proveniente da passagem em ateroma de pacientes submetidos à endarterectomia de carótida, os números de fagos recuperados no primeiro, segundo e terceiro ciclos foram: 14 x 10⁶; 7,6 x 10⁶ e 78 x 10⁶ UT, respectivamente (Figura 13). Estes clones contendo o DNA dos fagos selecionados foram utilizados na reação de PCR e, posteriormente, seqüenciados.

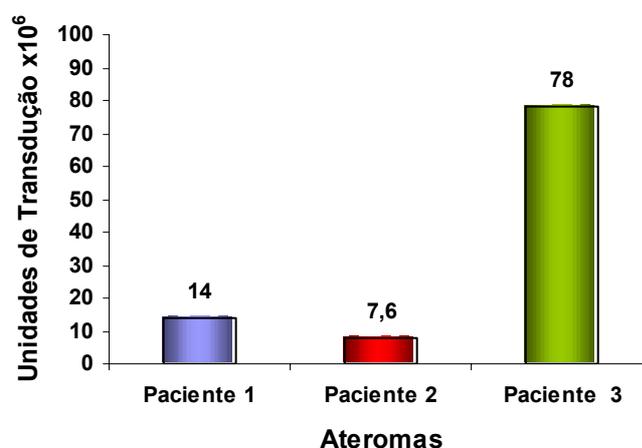


Figura 13. Enriquecimento de clones de fagos. Número de fagos obtidos nos 3 ciclos de seleção em ateroma

4.2. Seqüenciamento dos clones de fagos

Foram realizados seqüenciamentos de duas placas de 96 orifícios (Placa 2 em primeiro e, posteriormente, Placa 1), sendo analisada apenas a Placa 2, a qual resultou em 49 seqüências peptídicas identificadas, tendo sido alinhadas com o auxílio do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), para identificar possíveis motivos peptídicos (domínios semelhantes) enriquecidos durante o processo de seleção do *phage display* (Figura 14). As seqüências restantes não foram analisadas, devido ao elevado número de nucleotídeos não-definidos (“N”), o que impossibilitou que fossem traduzidas para proteínas. As Placas 1 e 3 provenientes desta seleção serão analisadas futuramente.

Alinhamento das seqüências dos peptídeos - CLUSTAL W (1.82)

```

1a      LEDSSWA--- 7
3d      ---KSWARWF 7
10c     SSQARRE--- 7
11b     LGHSSTA--- 7
4e      FGVHSWL--- 7
8e      --VSSTLLR- 7
3h      -TSVVSSR-- 7
6e      -THRSSVV-- 7
10d     -GRSTEVN-- 7
10e     --RNISMDR- 7
10f     --RGISSIV- 7
4b      AGRQLSM--- 7
4c      --SIDGVLN- 7
11f     ---MSGVGRA 7
7a      -ERHPGVK-- 7
7b      -ERHPGVK-- 7
2e      -IGLSHIP-- 7
10h     -ARLSPDP-- 7
1e      -FQMGWVS-- 7
5e      ---VPAVS-- 5
1h      -HGLGGDG-- 7
11c     --GQGGTGR- 7
9a      --GAVRQGG- 7
3e      -GGSIMDG-- 7
4h      TGGSFRA--- 7
2b      SLG-GFLV-- 7
11d     KVNNGFL--- 7
12D     -GGLLFLA-- 7
8c      SKGSAHG--- 7
10a     LRGSRGS--- 7
8h      -AGSTGAD-- 7
2d      WFAFTQA--- 7
12E     -FGFEMAH-- 7
9e      WLTQSGS--- 7
4a      -QAYKLGs-- 7
12g     YSRLRWA--- 7
4g      -PALDGLY-- 7
9d      VLDIHDR--- 7
3b      LFGDVAV--- 7
7c      -AGYGDHR-- 7
11h     -PNVLTsf-- 7
1b      -VQLNSLP-- 7
9b      -PSYIQYP-- 7
12A     -DSNNSDG-- 7
3f      NRDFRRS--- 7
2h      -AARDAME-- 7
6g      -WDVMTTR-- 7
8f      -AKLETVA-- 7
8g      -DDCLLEC-- 7

```

Figura 14. Alinhamento das seqüências dos peptídeos selecionados. Clones de fagos ligantes ao ateroma. Números e letras à esquerda da figura simbolizam a posição do fago na placa. Representação dos aminoácidos: verde = polares, vermelho = hidrofóbicos, azul = ácidos, rosa = básicos

4.3. Análise do alinhamento e do Blast

As seqüências obtidas dos insertos de 49 fagos selecionados foram alinhadas utilizando o programa Clustal W, em busca de peptídeos idênticos ou distintos. O alinhamento obtido mostrou distinção entre os peptídeos, sendo que pouquíssimos apresentaram três resíduos de aminoácidos consecutivos em comum, mostrando enriquecimento no processo de seleção, pois não há praticamente repetição de seqüências, apenas uma.

Estes resultados sugerem que a diversidade das seqüências dos fagos ligantes ao ateroma aponta para o reconhecimento de uma mesma molécula por alguns deles, utilizando-se o programa BLAST (Tabela 2).

Ressaltamos que a seleção de peptídeos feita diretamente na amostra alvo, sem uma etapa de pré-seleção, pode ser muito complexa para ser analisada, dada a grande quantidade de marcadores de ateroma e de normais expressa. Assim, foram escolhidas 29/49 seqüências peptídicas, cujos critérios já foram apresentados anteriormente (Tabela 2).

Tabela 2. Exemplos de proteínas humanas mimetizadas por motivos peptídicos selecionados em aterosclerose

Seqüência dos Peptídeos	Motivos	Proteína humana contendo o motivo	Descrição da proteína humana	Número de acesso
1a CLESSWAC	EDSSW	CD44	Glicoproteína de superfície celular	> gb AAB13623.1
	ED SSWA	Receptor de interleucina 28	Molécula de adesão celular	> ref NP_734464.1
	++SSWA	<i>Stabilin1</i>	Receptor transmembrana	> ref NP_055951.1
1b CVQLNSLPC	QLNSLP	Galectina 4	Lecitina	gb AAH34750.1
	CV LNSL C	Fibrilina 1 precursor	Proteína de microfibrila extracelular	gi 7459676 pir A47221
1e CFQMGWVSC	GWVS	ICAM-4	Glicoproteína de adesão intercelular	> ref NP_001535.1
1h CHGLGGDGC	CHGL	<i>Stabilin 1</i>	Receptor transmembrana	> ref NP_055951.1
	G GGDG	PAFAH	Fator de ativação de plaquetas acetilhidrolase	> ref NP_002564.1
2b CSLGGFLVC	LGGFL	Colágeno 4	Proteína de matriz celular	> ref NP_000083.1
2e CIGLSHIPC	IGLSH+	MMP -17	Metaloproteinase de matriz	> ref NP_057239.2
	IGLSH	FGFR1	Fator de crescimento de fibroblasto	> ref NP_075593.1
	GL HIP	NKG2-D	Proteína transmembrana	> ref NP_031386.1
	SHIP	Nidogenio	Proteína de matriz extracelular	> ref NP_031387.1
2h CAARDAMEC	+AMEC	Fator von Willebrand	Fator de coagulação	> emb CAA26503.1
	A DAME	Endotelina	Peptídeo	> ref NP_055508.1

continua ...

... continuação

Seqüência dos Peptídeos	Motivos	Proteína humana contendo o motivo	Descrição da proteína humana	Número de acesso
3d CKSWARWF	C SWAR FC	MMP-23 A	Metaloproteinase de matriz	> ref NP_004650.1
	SW AR FC	Interleucina 14	Citocina	> pir A48203
	W AR FC	L-selectina	Molécula de adesão de leucócitos	> sp Q28768 LEM1_PAPHA
3e CGGSIMDGC	CGGSI +	Fator IX da coagulação	Fator da coagulação	> ref NP_000124.1
	CGGSI	Fator XI da coagulação de plaquetas	Fator da coagulação	> ref NP_062505.1
	C GSIM+	Óxido nítrico sintase induzível (iNOS) de músculo cardíaco	Enzima	> gb AAC83554.1
3f CNRDFRRSC	RDFR	C1q e	Proteína do complemento	> ref NP_114114.1
		Fator de necrose tumoral (TNF)	Citocina	
	RDFR	Interferon- α	Glicoproteína anti-viral	> gb AAA52724.1
	DFRR	Trombospondina	Proteína de matriz	> gi 4507485 ref NP_003237.1
4a CQAYKLGSC	YKLGs	FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto	> gb AAA52448.1
	CQAY	Semaforina 3F	Proteína transmembrana	> sp Q13275 SM3F_HUMAN

continua ...

... continuação

Seqüência dos Peptídeos	Motivos	Proteína humana contendo o motivo	Descrição da proteína humana	Número de acesso
4c CSIDGVLRC	D VLRC	α -1-B-glicoproteína	Proteína de fase aguda	> pir IOMHU1B
	+DGV LRC	Fator de necrose tumoral (TNF)	Citocina	> ref NP_003800.1
	CS DG+ R	Proteína migratória associada a angiogênese (AAMP)	Proteína angiogênica	> ref NP_001078.1
	S+DGVL	Lipase C	Enzima do metabolismo lipoproteico	> ref NP_000227.1
4e CFGVHSWLC	HSWL	Semaforina M	Proteína transmembrana	> gb AAF80660.1 AF053369_1
	HSWL	Semaforina W	Proteína transmembrana	> dbj BAA75631.1
4g CPALDGLYC	PALD L	HSP - 60	Proteína de choque térmico	> gb AAK60261.1 AF380943_2
	PAL+ LY	Trombospondina 4	Proteína de matriz	> sp P35443 TSP4_HUMAN
4h CTGGSFRAC	GGsFR	OX40 (CD134) (Membro da família de receptores para TNF)	Glicoproteína de superfície celular	> pir I37552
	TGGS R C	Laminina α 5	Molécula de adesão	> ref NP_005551.3
	GSFR	LDL receptor - LR3 (Receptor de lipoproteína de baixa densidade)	Proteína de superfície celular	> gb AAC72791.1
6e CTHRSSVVC	R SVVC	Trombospondina	Proteína de matriz	> gi 55959009 emb CAI15501.1
	C+HSRDV VVC	CD163	Receptor scavenger de macrófagos	> emb CAB45233.1
7a CERHPGVKC	CERHP	Fibrilina 2	Proteína extracelular de microfibrila	sp P35556 FBN2
	CERH G+ C	Integrina β 7	Molécula de adesão	> ref NP_000880.1

continua ...

... continuação

Seqüência dos Peptídeos	Motivos	Proteína humana contendo o motivo	Descrição da proteína humana	Número de acesso
7c CAGYGDHRC	CAGY D	Sítio mutante ativo do Fator VII	Proteína extracelular	> gb AAK58686.2
8c CSKGSAGHC	SKGSA	Apolipoproteína C-II	Lipoproteína	> sp P27916 APC2_CAVPO
8e CVSSTLLRC	CVS LLRC	Fator PLGF	Fator de crescimento placentar	> pir A41236
	VSS LLR	Integrina α - 10	Molécula de adesão	> gb AAF61638.1 AF172723_1
9a CGAVRQGGC	CG VRQG C	Plexina B3	Proteína transmembrana	> ref NP_005384.2
	CG V QG C	Receptor de semaforina	Proteína transmembrana	emb CAB57277.1
9d CVLDIGDRC	D+GDRC	Trombospondina 1	Proteína de matriz	> ref NP_003237.1
9e CWLTQSGSC	TQSGS	Receptor 2 do VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular)	Proteína transmembrana	> gb AAC16450.1
10a CLRGSRGSC	LRGS GS	Pro- α 2(I) colágeno	Proteína de matriz	> gb AAB93981.1
	R RGSC	Fibrinogênio α A	Proteína de fase aguda	> prf I1004351A
	GSRGS	Citocina quimiotática para eosinófilo	Citocina	> ref NP_068569.1

continua ...

... continuação

Seqüência dos Peptídeos	Motivos	Proteína humana contendo o motivo	Descrição da proteína humana	Número de acesso
10d CGRSTEVRC	G TEVR	CTLA-4 (antígeno 4 de linfócito T citotóxico)	Glicoproteína de superfície celular	> gb AAD00698.1
	G EVRC	Proteína precursora de superfície de leucócito	Glicoproteína de superfície celular	> gb AAK84009.1 AF393676_1
	G EVRC	PECAM-1 (molécula 1 de adesão de célula endotelial para plaquetas)	Molécula de adesão	> gb AAA60057.1
10e CRNISMDCR	RNIS++	VEGFR-3 (Receptor 3 de fator de crescimento endotelial vascular)	Proteína transmembrana	> sp P35916 VGR3_HUMAN
11f CMSGVGRAC	CM GV	Neuropilina derivada de célula do músculo liso e endotelial.	Proteína transmembrana	> ref NP_563615.2
12a CDSNNSDGC	DSN+SD	Osteopontina (OPN)	Proteína de matriz extracelular	gb AAA59974.1
	SNNSD	CD84	Proteína de superfície de leucócito	> gb AAF06840.1
12d CGLLFLAC	LLF AC	Endotelina 1	Peptídeo	> ref NP_001946.2
	GGLL LA	CD11b	Glicoproteína de superfície celular	> pir IRWHU1B
	GGLL LA	Integrina α 10	Molécula de adesão	> gb AAF21944.1 AF112345_1

4.4. Escolha dos clones de fagos para os ensaios de ligação

Destas seqüências peptídicas, quatro peptídeos candidatos apresentados por clones de fagos foram selecionados por terem similaridade com proteínas envolvidas na aterosclerose em diversos estágios da doença, bem como pela existência de receptores comerciais disponíveis para os ensaios de ligação dos fagos.

As seqüências peptídicas são: CVSSTLLRC (Integrina $\alpha 10$), ligante de colágeno encontrada em ateroma, associada à interação célula-colágeno; CVQLNSLPC (Galectina – 4), associada a doenças auto-imunes, sendo que até o momento só foi encontrada galectina 3 em ateroma, CQAYKLGSC (Semaforina 3F), envolvida no desenvolvimento cardiovascular, bem como na sinalização; e CTHRSSVVC (CD163), receptor *scavenger* do complexo Hb-Hp (Hemoglobina-Haptoglobina) encontrado em macrófagos presentes em ateroma.

Tabela 3. Seleção de peptídeos ligantes de ateroma

Fago/Peptídeo	Alinhamento	Score*	Literatura
1B CVQLNSLPC	3 QLNSLP 8 QLNSLP 175 QLNSLP 180	21.8	gb AAH34750.1 lectin, galactoside-binding, (galectin 4) [Homo sapiens] Galectina 4
4A CQAYKLGSC	1 CQAY 4 CQAY 548 CQAY 551	20.3	sp Q13275 SM3F_HUMAN Semaphorin 3F Semaforina 3F
6E CTHRSSVVC	Query:1 CTHRS---SVVC 9 CTH S SVVC Sbjct:566 CTH-SRDVSVVC 576	20.2	gi 16716385 ref NP_444324.1 http://www.n163 antigen [Mus musculus] gi 13236131 gb AAK16065.1 macrophage hemoglobin scavenger receptor CD163 precursor [Mus musculus] Length = 1121
	Query 541 CTHSRDVSVC 597 C+HSRDV VVC Sbjct 542 CSHSRDVGVC 598	38.8	emb CAB45233.1 CD163 [Homo sapiens] emb CAA80541.1 M130 antigen [Homo sapiens] CD163 receptor scavenger de macrófagos
8E CVSSTLLRC	2 VSSTLLR 8 VSS LLR 274 VSSMLLR 280	18.9	gb AAF61638.1 AF172723_1 integrin alpha 10 subunit [Homo sapiens] Integrina α-10

* **Score** = medida de similaridade entre duas seqüências

4.5. Ensaio de ligação por fagos em ateroma (“*Phage Overlay*”)

A ligação para capa fibrosa foi observada em três seqüências peptídicas distintas apresentadas por fagos nos pacientes estudados (n=3), provenientes do processo de seleção, e com nenhuma ligação para carótida não aterosclerótica (n=1).

Apenas um peptídeo “CTHRSSVVC” foi selecionado por apresentar intensa ligação para centro lipídico com e sem presença de trombo, e nenhuma ligação para carótida não aterosclerótica, tendo sido o melhor peptídeo ligante entre os escolhidos, e que foi alvo de estudo mais aprofundado devido a esta ligação (Tabela 4) e (Figura 15). O clone de fagos que expressa este peptídeo foi utilizado para os ensaios de validação com receptores comercialmente disponíveis. Colorações por HE foram realizadas em todas as amostras estudadas (Figura 16).

Tabela 4. Ensaio de ligação de clones de fagos (*Phage Overlay*), com seqüências peptídicas distintas expressas por fagos em artérias carótidas com e sem aterosclerose

	Achados histopatológicos	Controles		Fagos adicionados			
		NA	Fd	CVSSTLLRC	CVQLNSLPC	CQAYKLGSC	CTHRSSVVC
Similaridade				Integrina	Galectina 4	Semaforina	CD163
Tecidos							
Paciente 1	Inflamação , sem trombose, pouco cálcio, sem hemorragia.	-	-	+ CF	NR	NR	++ CL
Paciente 2	Inflamação , trombose, cálcio, hemorragia.	-	-	+ CF	+ CF	+ CF	++ CL, T
Paciente 3	Inflamação, trombose, cálcio sem hemorragia.	-	-	+ CF	+ CF	+ CF	++ CL, T
Carótida não Aterosclerótica 3	Normal	-	-	-	-	NR	-

NA = Não adicionado, **Fd** = fago sem inserto, **(-)** = negatividade, **(+)** = positividade fraca, **(++)** = positividade intensa, **CF** = capa fibrosa, **NR** = não realizado, **CL** = centro lipídico, **T** = trombo

4.6. Clones de fagos escolhidos para os ensaios de ligação

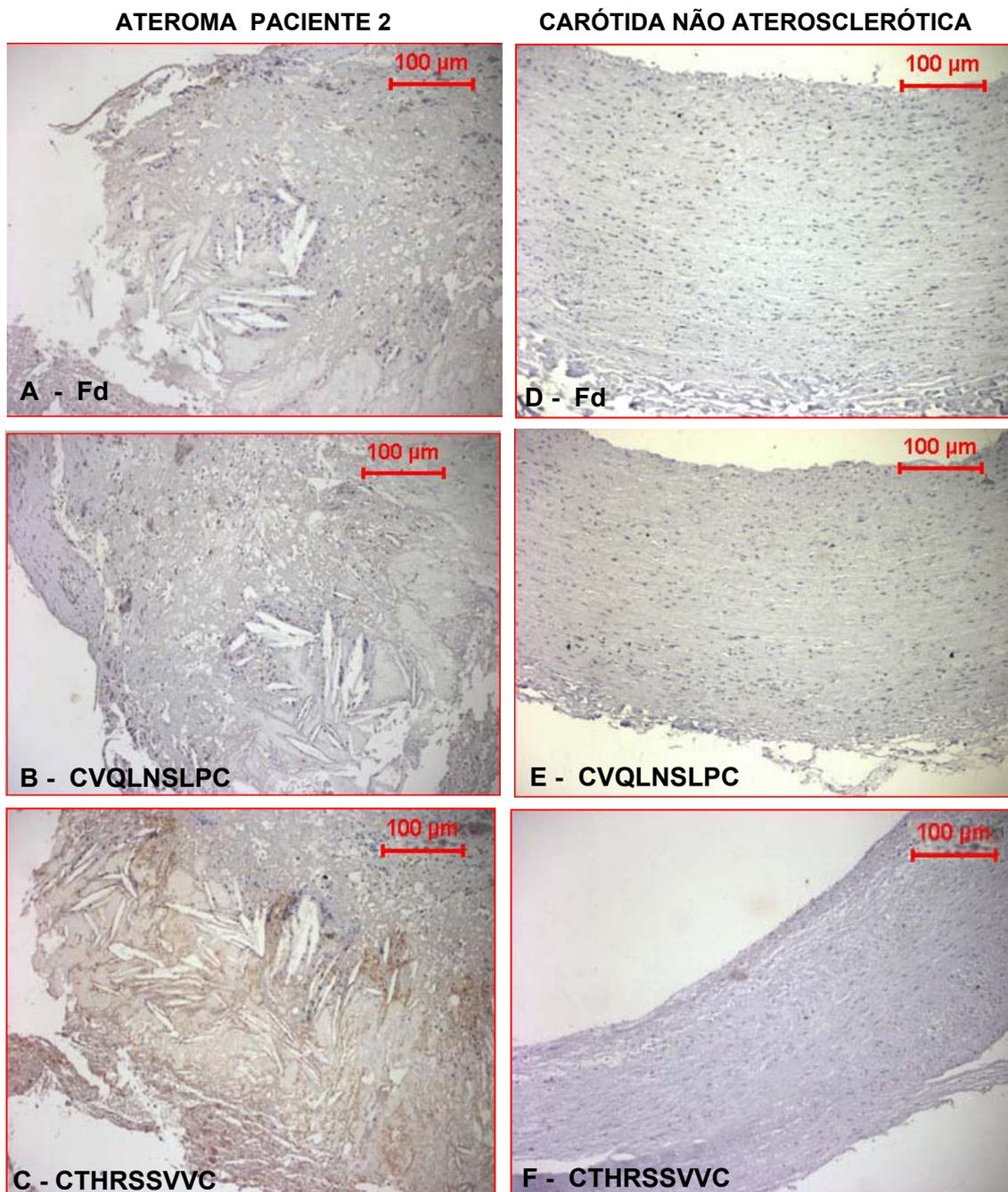


Figura 15. Ensaio de ligação de fagos. A a C - artérias carótidas com aterosclerose; D a F - controles. A e D, fagos Fd (sem inserto); B e E, fagos com a seqüência CVQLNSLPC; C e F, fagos com a seqüência CTHRSSVVC. As reações foram negativas, exceção do ensaio de fagos com a seqüência CTHRSSVVC em ateroma (C), positivo (castanho), na região do centro lipídico, caracterizado por cristais de colesterol e trombo

4.7. Coloração por hematoxilina–eosina em artérias

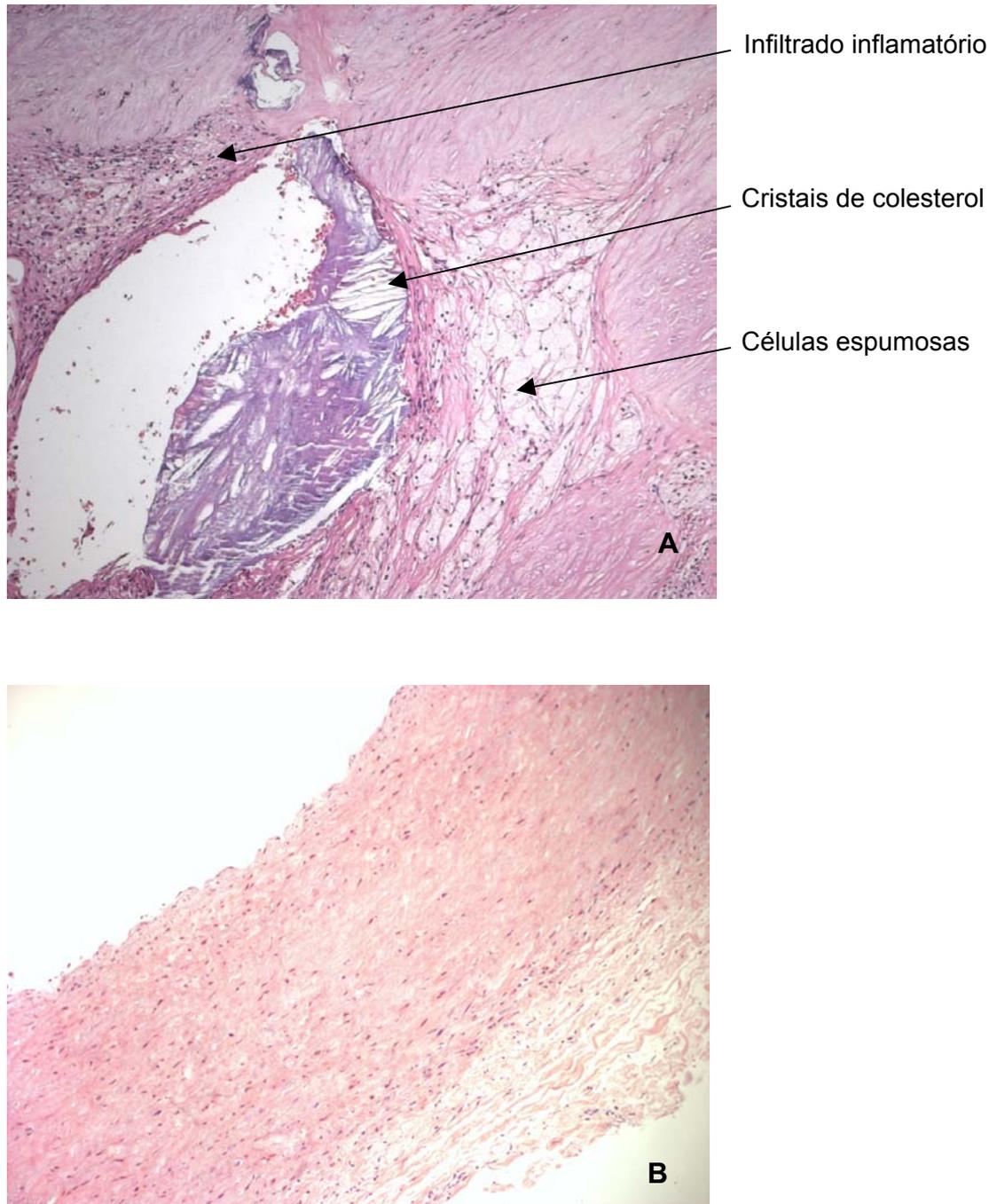


Figura 16. Coloração por HE – (A) artéria carótida com aterosclerose (paciente 2) e **(B)** carótida normal por coloração de hematoxilina–eosina. Notar presença de infiltrado inflamatório e cristais de colesterol em **A** não observado em **B**. Aumento 10X

Observamos que o peptídeo “CTHRSSVVC” – CD163, expresso pelo fago escolhido, possui similaridade com vários resíduos de aminoácidos entre as seqüências genômicas encontradas, tanto no *Homo sapiens* (homem), quanto *Mus musculus* (camundongo), para os quais alguns domínios se mantiveram preservados (Figura 17).

CLUSTAL W (1.82) ALINHAMENTO DE MÚLTIPLAS SEQÜÊNCIAS

```

HOMEM          CSHSRDVGVC 11
CAMUNDONGO     CTHSRDVSVC 11
PEPTÍDEO       CTH-RS - SVVC 9
                * : * * . . * * *

```

Figura 17. Alinhamento do peptídeo (CTHRSSVVC) apresentado pelo fago (6E) e outras espécies. Símbolos: * resíduos de aminoácidos nesta coluna são idênticos. : substituições conservadas de aminoácidos são observadas. . substituições semi-conservadas de aminoácidos são observadas

Diante destes resultados, fizemos um estudo para entender a relação estrutura-função entre o peptídeo CTHRSSVVC e a molécula CD163. Dada que a estrutura tridimensional do receptor de haptoglobina e a molécula CD163 ainda não foram solucionadas, nossa primeira providência foi procurar no banco de dados de estruturas (PDB - Protein Data Bank, www.pdb.org) moléculas contendo domínios similares aos de CD163.

Esta análise foi feita utilizando-se o algoritmo "rpsblast" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A proteína com maior similaridade foi o também receptor *scavenger* M2BP (do inglês, "Mac-2 binding protein", antígeno associado a tumor, Hohenester et al., 1999), (código 1BY2 no PDB). Uma vez identificada a estrutura molecular mais próxima à da

molécula CD163, localizou-se a região onde o peptídeo CTHRSSVVC apresenta similaridade à seqüência do CD163. Esta região (domínio 5) ilustrada em vermelho abaixo, mostra, similaridade de seqüência em amarelo, entre o peptídeo CTHRSSVVC e o CD163 e apresenta um pequeno "gap" de dois aminoácidos. Este "gap" de seqüência coincide na estrutura com uma alça que se sobrepõe à região de similaridade do CTHRSSVVC, expondo apenas os aminoácidos conservados com a molécula de CD163 (S/T, H, R, VVC) (Figura 18).

```

1  mvlledsgsa dfrhrfvnls pftitvlll sacfvvtsslq gtdkelrlvd genkcsgrve
61  vkvqeewgtv cngwsmeav svicnqlgcp taikapgwan ssagsgriwm dhvscrnges
121 alwdckhdgw gkhsncthqg dagvtcsdgs nlemrltrgg nmcsgrieik fqgrwgtvcd
181 dnfndhasv icrqlecgsa vsfsgssnfg egsgpiwfdd licngnesal wnckhggwgk
241 hncdhaedag vicskgadls lrlvdgvtec sgrlevrfqg ewgticddgw dsydaavack
301 qlgcptavta igrvnaskgf ghiwldsvsc qghepavwqc khhwgkhyc nhnedagvtc
361 sdgsdlelrl rgggsrcaqt veveiqrlg kvcdrgwglk eadvvcrqlg cgsalktsyq
421 vyskiqatnt wflsscngn etslwdcknw qwggltdchy eeakitcsah reprlvggdi
481 pcsgrvevkh gdtwgsicds dfsleaasvl crelqcgtvv silggahfge gngqiwaef
                                CTH-R-SSV VC
541 qcegheshls lcpvaprpeg tcshsrdvgv vcsryteirl vngktpcegr velktlgawg
601 slcnshwdie dahvlcqqlk cgvalstpgg arfgkgngqi wrhmfhctgt eqhmgdcpvt
661 algalcpse qvasvicsgn qsqtllscns sslgptrpti peesavacie sgqlrlvngg
721 grcagrveiy hegswgticd dswdlsdahv vcrqlgcgea inatgsahfg egtgpiwlde
781 mkcngkesri wqchshgwqg qncrhkedag vicsefmslr ltseasreac agrlevfyng
841 awgtvgkssm settvgvcr qlgcadkqki npaslkdams ipmwvndvqc pkgpdtlwqc
901 psspwekrla spseetwitc dnkirlqegp tscsgrveiw hggswgtvcd dswlddaqv
961 vcqqlgcgpa lkafkeafg qgtgpiwlne vkckgnssl wdcparrrwgh secghkedaa
1021 vnctdisvqk tpqkattgrs srqssfiavg ilgvvllaif valffltkkr rqrqrlavss
1081 rgenlvhqi q yremnsclna ddldlmnssg ghseph

```

Figura 18. Seqüência protéica: em **vermelho**, com maior similaridade, entre o peptídeo e a molécula CD163 *receptor scavenger M2BP*; em **amarelo**, o alinhamento do peptídeo (CTHRSSVVC) à proteína. Notar a presença de um pequeno "gap" com dois aminoácidos entre as seqüências

Cristalografia do receptor *scavenger* M2BP

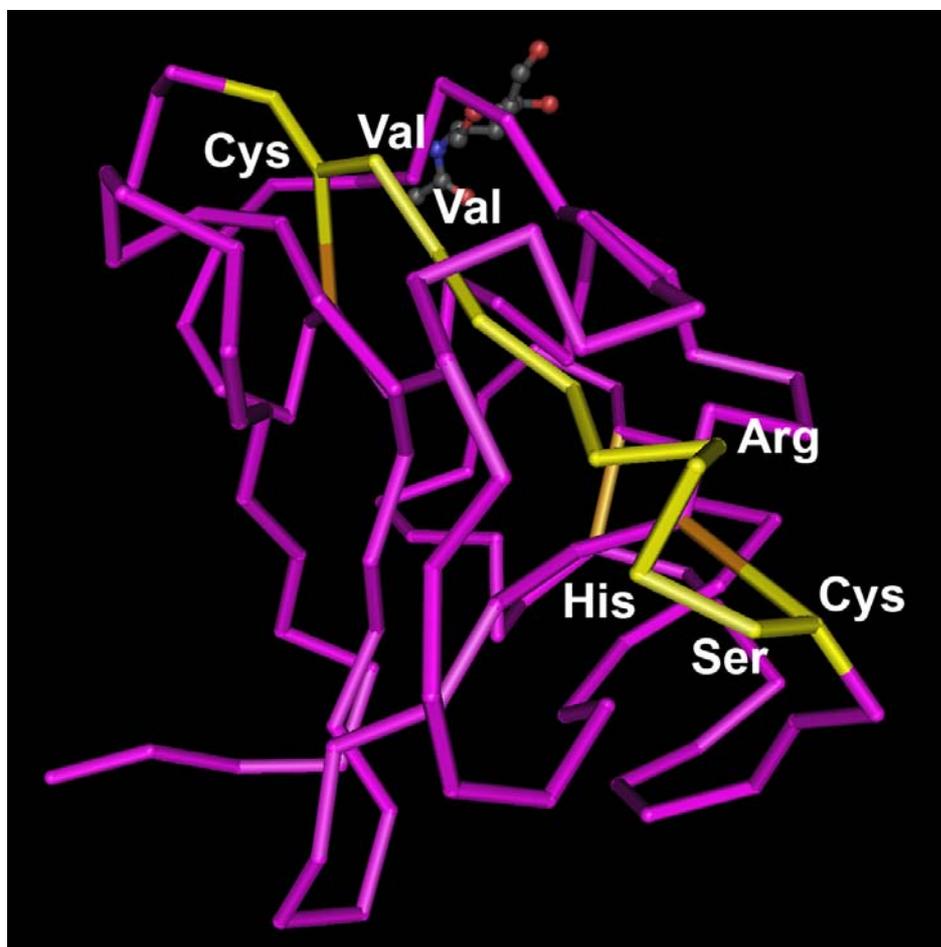


Figura 19. Estrutura cristalográfica do receptor *scavenger* M2BP: em amarelo a região similar ao peptídeo CTHRSSVVC. Observa-se que existem duas regiões expostas: CSHR e VVC onde seriam os possíveis sítios de interação com a haptoglobina

4.8. Expressão da molécula CD163 e do fago (CTHRSSVVC) em tecidos

Após padronização por imuno-histoquímica do anticorpo monoclonal camundongo α CD163 humano para tecidos, utilizamos o anticorpo monoclonal e também o fago específico (CTHRSSVVC-CD163) e não específico (CVSSTLLRC–integrina α 10) em tecidos, os quais, sabidamente, expressam (baço–macrófagos) e não expressam (tireóide) a molécula CD163 (Tabela 5). Coloração por HE também foi realizada (Figura 20).

A expressão da molécula em macrófagos foi observada pela imuno-histoquímica, por meio da reação de imunoperoxidase (Figura 21), bem como por imunofluorescência (dupla marcação com co-localização, Figura 22).

Estes resultados mostraram que a molécula CD163 e o fago específico se co-localizam pela imunofluorescência, marcando uma mesma região, o que reforça a identidade deste fago com a molécula CD163. A co-localização não aconteceu com o fago não específico, o resultado é está na Figura 22.

Tabela 5. Reação de imunoperoxidase com seqüências peptídicas expressas por fagos e anticorpo monoclonal anti-CD163 humano

Tecidos	Controles		Fagos	
	Fd	α CD163 humano	CTHRSSVVC	CVSSTLLRC
Tireóide	-	-	-	-
Baço	-	+	+	-

Tecidos - Tireóide negativo e baço positivo para fago CTHRSSVVC, Controles: Fd = fago sem inserto, α CD163 humano = camundongo α CD163 humano, Fagos = específico (seqüência de interesse – CTHRSSVVC) e inespecífico (outra seqüência - CVSSTLLRC), (-) = negatividade , (+) = positividade.

Polpa Vermelha

Folículo Linfóide

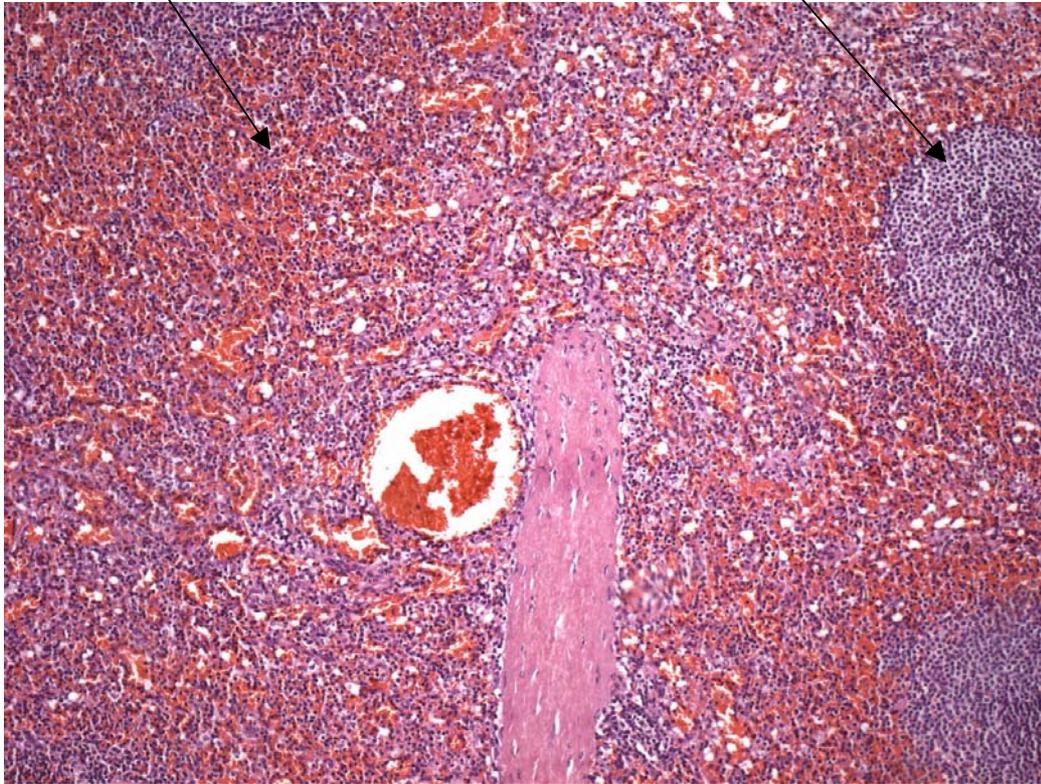


Figura 20. Baço - Coloração por HE – 10X aumento

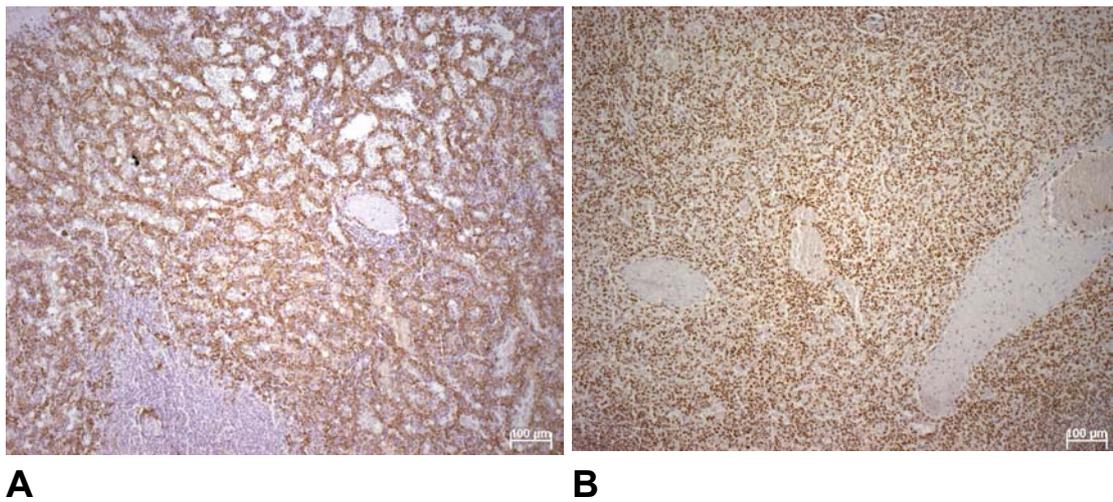


Figura 21. Reação de imuno-histoquímica e ensaio de ligação de fagos - marcação de células da polpa vermelha do baço. A - CD163; B - ensaio de ligação com fago CTHRSSVVC (reação de imunoperoxidase).

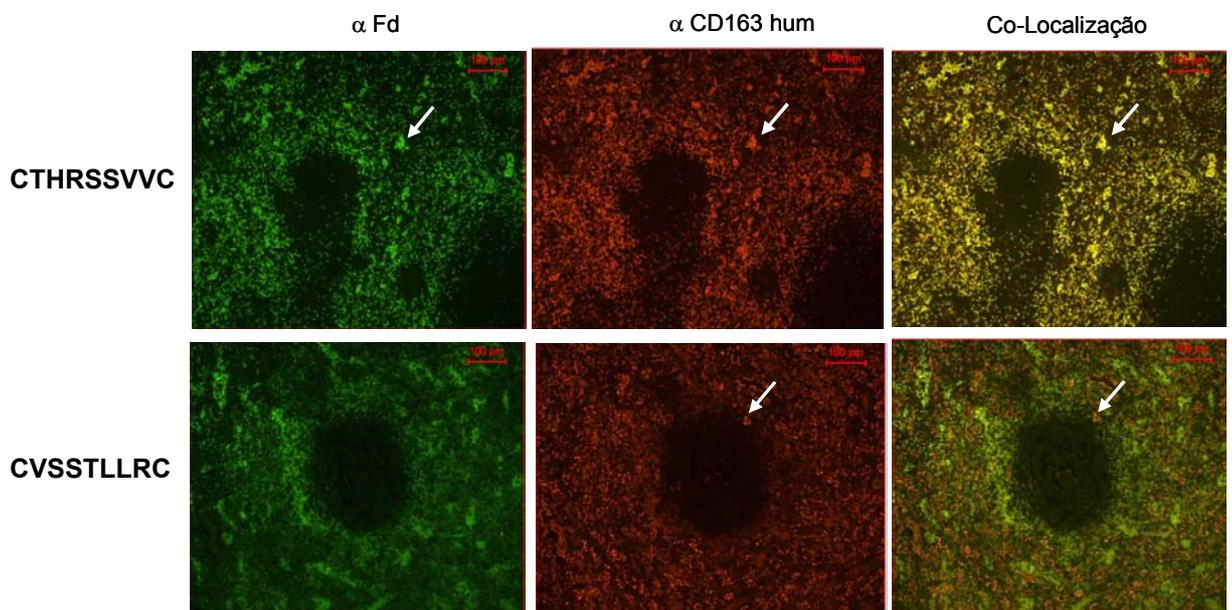


Figura 22. Co-localização da molécula CD163 com fago específico e não específico em baço. Co-localização de CD163 com fago específico (CTHRSSVVC) acima, e não específico (CVSSTLLRC) abaixo. Nota-se que as marcações para CD163 (em vermelho) e para o fago específico (em verde) dão-se nas mesmas células, as quais, com a somatória feita pelo computador, ficam coradas em amarelo. Quanto ao fago não específico, as marcações ficam entremeadas, mas não há somatória.

4.9 Ligação específica do fago *in vitro* - Ensaio de *binding*

Uma vez validada a interação entre o peptídeo CTHRSSVVC e ateromas distintos, partimos para responder a questão referente à similaridade entre a molécula CD163 e CTHRSSVVC, expressa em abundância nos macrófagos. CD163 é um receptor *scavenger* importante para remoção da hemoglobina livre, a qual consiste em um potente agente pró-inflamatório, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês “Reactive Oxygen Species”).

Um mecanismo de defesa contra seus efeitos tóxicos é a haptoglobina, a qual se liga à hemoglobina, impedindo-a de reações oxidativas (Guetta, 2006). Dentro deste contexto, a molécula CD163 promove a remoção do complexo Hb-Hp por meio da ligação do complexo ao domínio 3 endocitando-o, e dessa forma, protegendo os tecidos do efeito oxidativo danoso da Hb livre (Kristiansen et al., 2001; Graversen et al., 2002; Madsen et al., 2004).

Como o peptídeo CTHRSSVVC mimetiza a molécula CD163, é possível que o fago CTHRSSVVC ligue-se ao ligante natural do CD163, a haptoglobina.

Para validar a interação entre o fago (CTHRSSVVC) receptor e o seu possível ligante, foram realizados ensaios de ligação *in vitro* dos fagos (Fd e fago específico) aos respectivos receptores (ligantes) Hb (hemoglobina), Hp (haptoglobina), e o complexo Hb-Hp (hemoglobina-haptoglobina), imobilizados em placa de 96 orifícios. O resultado dos testes (n=2) sugere que os valores da razão de ligação do fago específico

(CTHRSSVVC ou fago 6E) à haptoglobina humana, normalizado pelo fago Fd (sem inserto) à haptoglobina humana (6EHp/FdHp), quando comparado pela razão de ligação do fago (CTHRSSVVC) a BSA, e normalizado pelo fago Fd a BSA (6EBSA/FdBSA), é da ordem de 9 e 49 vezes, respectivamente, conforme apresentado nas Figuras 23 e 24.

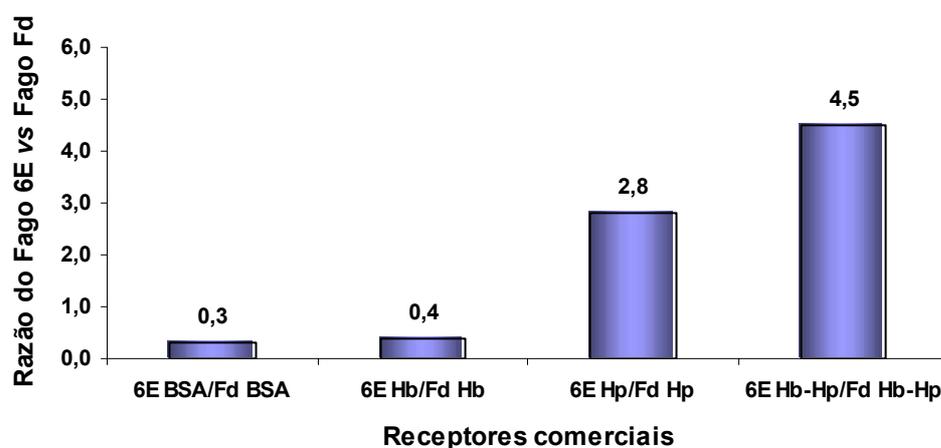


Figura 23. Ensaio de ligação dos fagos 6E e Fd - razão da formação de clones de fagos entre o fago específico pelo fago Fd (selvagem), frente a receptores comerciais (1)

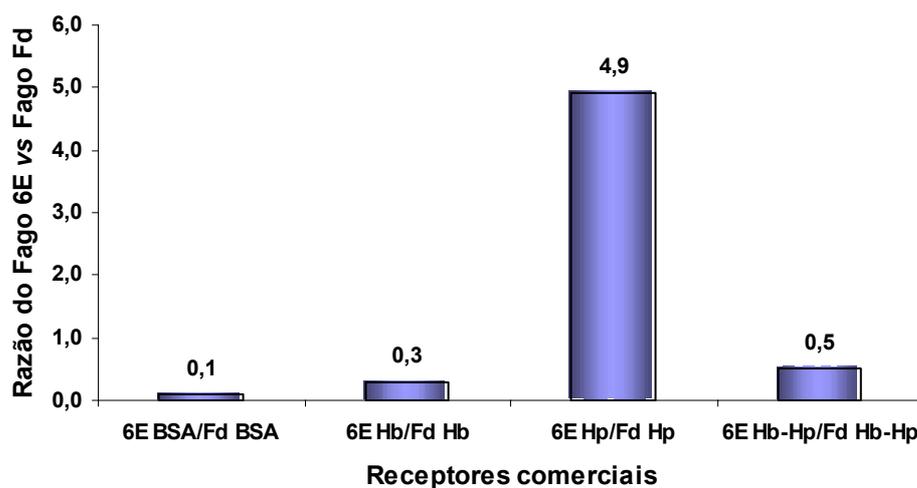


Figura 24. Ensaio de ligação dos fagos 6E e Fd - razão da formação de clones de fagos entre o fago específico pelo fago Fd (selvagem), frente a receptores comerciais (2)

Discussão

5



5. DISCUSSÃO

Neste estudo, nós verificamos a utilização da tecnologia de apresentação de fagos como ferramenta diagnóstica, ou terapêutica, futura, a qual permitiu isolar peptídeos específicos ligantes a endotélio contendo ateroma. Houve seleção *ex vivo* de uma biblioteca de peptídeos ligantes de fragmentos de carótidas. Foram realizados 3 ciclos de seleção em pacientes distintos, e conseguimos obter o enriquecimento de fagos por seleção positiva, obtendo-se, desta forma, marcadores moleculares, tanto de ateroma, quanto de carótidas normais.

Dentre os grupos que se utilizam dessa técnica, com aplicabilidade e potencial terapêutico descritos, se destaca o grupo da Dra. Renata Pasqualini, Dr Ricardo Giordano e Dr. Wadih Arap, atualmente na Universidade do Texas, MD Anderson Cancer Center, e que foi um dos primeiros a descrever o sistema de seleção *in vivo* (do inglês “*biopanning*”) de peptídeos-ligantes, inicialmente em camundongo (Pasqualini e Ruoslahti, 1996; Rajotte et al., 1998), e, mais recentemente, estendido também para busca de marcadores específicos em humanos (Arap et al., 2002a). Este sistema de seleção funcional foi, inicialmente, padronizado e utilizado para identificar peptídeos ligantes da vasculatura dos diferentes órgãos de camundongos, incluindo cérebro e rins (Pasqualini e Ruoslahti, 1996), pulmão, pele, pâncreas, intestino, útero, glândula adrenal e retina (Rajotte et

al., 1998), músculo (Samoylova e Smith, 1999), próstata (Arap et al., 2002b), mama (Essler e Ruoslahti, 2002) e placenta (Kolonin et al., 2002). Esta estratégia também revelou um sistema de "endereçamento endotelial" dos diferentes órgãos, o qual pode ser explorado e utilizado para o direcionamento de drogas, vetores gênicos e outros insumos, utilizando-se os peptídeos identificados.

Para a seleção *in vivo*, as bibliotecas de peptídeos foram injetadas por via intravenosa na cauda de camundongos e, após a sua circulação na corrente sangüínea, o animal foi sacrificado, seus órgãos retirados, e os fagos ligantes recuperados.

Este processo foi repetido diversas vezes, até que houvesse um enriquecimento dos peptídeos específicos para aquele determinado órgão. A partir desses estudos, várias aplicações envolvendo a química e a radioterapia específica têm sido propostas.

Além disso, buscou-se a associação entre os peptídeos expressos em fagos e aqueles presentes na superfície de células tumorais metastáticas, visando o desenho de drogas capazes de impedir a migração e, conseqüentemente, a metástase (Arap et al., 2004). Essa metodologia pode auxiliar na busca de drogas específicas que possam alterar o curso da doença aterosclerótica.

Assim, a análise das proteínas similares a peptídeos selecionados mostrou que algumas apresentavam similaridade aos diferentes peptídeos que foram selecionados, como por exemplo, a proteína integrina α 10, cujos diferentes peptídeos a ela relacionados são: CGLLFLAC e CVSSTLLRC,

mostrando que houve, no processo de seleção, diversidade de seqüências, e que algumas reconheceram uma mesma molécula, observando-se apenas uma repetição dos peptídeos selecionados (Figura 14). Estes resultados deveram-se, provavelmente, ao padrão aleatório de obtenção de placas, as quais, em cada momento, deveriam expressar diferentes marcadores moleculares na superfície do endotélio.

Desta maneira, selecionamos fagos candidatos que expressariam moléculas envolvidas na aterogênese, por meio de pesquisa criteriosa em banco de dados de proteínas conhecidas. Estes critérios levaram em conta a distribuição em órgãos, tecidos, localização celular, função, e relevância biológica; sustentada por dados da literatura, bem como por meio de diálogos estabelecidos com o grupo de discussão de aterosclerose.

Após a escolha das moléculas candidatas, passou-se à validação dos resultados. Foram escolhidas, para os ensaios de validação preliminares, as seguintes proteínas (peptídeos) mimetizadas pelos fagos: a molécula CD163, a integrina α -10, a galectina 4, e a semaforina 3F.

A seguir, serão mostrados os dados da literatura por meio dos quais baseou-se a seleção dos candidatos.

A molécula CD163, também conhecida como M130 (Law et al., 1993), ou p155, é um receptor *scavenger* de hemoglobina (HbSR), membro dos receptores *scavenger* ricos em cisteína (SRCR). Pertencentes à família das glicoproteínas, estes receptores são tipicamente associados ao sistema imune e na aterosclerose sua participação pode ser muito mais complexa do que acreditava-se (Moore e Freeman, 2006), sendo sugeridos à molécula

CD163 vários papéis, entre eles, mecanismos de regulação pelas citocinas e glucocorticóides, e em processos inflamatórios (Sulahian et al., 2001; Goldstein et al., 2003; Moestrup e Möller, 2004).

A expressão de CD163 é específica de macrófagos e monócitos. Recentemente, foi descrita como responsável pela endocitose do complexo hemoglobina-haptoglobina (Hb-Hp), tanto para sua remoção, quanto no metabolismo da hemoglobina livre (Kristiansen et al., 2001). A molécula de CD163 é altamente conservada, possuindo 9 domínios extracelulares com aproximadamente 110 resíduos (Law et al., 1993), sendo o domínio 3 o de ligação com o complexo Hb-Hp (Kristiansen et al., 2001) (Figura 25).

Atualmente, a CD163 e o complexo Hb-Hp vêm sendo associados à aterosclerose (Delanghe et al., 1993; Levy et al., 2000; Roguin et al., 2001). Estes autores demonstraram, por meio de estudos epidemiológicos, a associação entre o polimorfismo da Hp e a aterosclerose, bem como a relação com doenças vasculares.

Os autores revelaram, ainda, que pacientes diabéticos com fenótipo Hp (2-2) tiveram pior evolução após angioplastia do que pacientes diabéticos Hp (1-1). Dados semelhantes foram encontrados em pacientes com complicação vascular periférica, os quais apresentaram diabetes mellitus tipo II ou hipertensão arterial, sugerindo que deve existir uma ligação molecular entre estas doenças e uma resposta inflamatória com um perfil direcionado provavelmente, pelo polimorfismo no genótipo de Hp (Guetta et al., 2006).

Neste contexto, Fernandez et al., 2001, forneceram dados em que a hemólise intravascular foi aumentada durante o desenvolvimento da lesão aterosclerótica, em modelo animal, sugerindo que as propriedades oxidativas da hemoglobina livre (Hb) aceleram o processo aterosclerótico. Sustentando esta hipótese, Li et al., 2004 observaram depósitos de hemoglobina e ferritina, bem como a expressão de CD163, em carótidas com lesão precoce e avançada, e em artérias coronárias humanas, sugerindo um envolvimento de CD163 na modulação do processo inflamatório da aterosclerose. Isto porque o catabolismo da Hb pelos macrófagos contribui para a deposição do ferro e a indução de ferritina em lesões ateroscleróticas.

Do ponto de vista molecular, a seqüência do peptídeo expressa pelo fago (CTHRSSVVC), e que mimetiza a molécula CD163, quando comparada às seqüências peptídicas de outras espécies, para este motivo, apresenta 3 aminoácidos consecutivos iguais entre a seqüência do fago e a do candidato (seqüência humana), além de 3 aminoácidos idênticos intercalados.

Provavelmente, estes domínios conservados se mantiveram por razões evolutivas de defesa do hospedeiro e de manutenção da espécie provavelmente pela capacidade que os receptores *scavenger* têm de se ligar a uma variedade de patógenos (Krieger,1997). A análise cristalográfica, utilizando o receptor *scavenger* M2BP (Hohenester et al., 1999), também permitiu uma visualização hipotética de como o receptor CD163 interagiria com a seqüência peptídica apresentada pelo fago e os possíveis sítios de ligação (Figura 19). Sendo assim, todas estas características conferem a

este peptídeo uma forte similaridade para a molécula CD163, tendo sido a escolhida para os ensaios de validação.

Nos ensaios de ligação de fagos a fragmentos de tecidos (*Phage Overlay*), observamos, na camada íntima, ligação para capa fibrosa com as seqüências peptídicas (CVSSTLLRC, CVQLNSLPC, CQAYKLGSC), e somente para a seqüência “CTHRSSVVC” foi observada uma ligação intensa em área de centro lipídico com e sem trombos.

Nenhuma positividade foi observada em carótida não aterosclerótica para as seqüências peptídicas selecionadas, mostrando a especificidade deste fago para centro lipídico (Figura 15).

Frente a estes resultados, concluímos que, de quatro fagos selecionados, todos mostraram positividade para ateroma e nenhum para tecido não aterosclerótico, mostrando que o processo de seleção de fagos foi realizado com sucesso (Tabela 4).

Vale ressaltar que alguns autores observaram estes achados em lesões ateroscleróticas precoces (Ratcliffe et al., 2001), outros em lesões precoces e avançadas (Li et al., 2004), mas nenhum relato observou tal fenômeno, até o momento, utilizando-se da técnica de *Phage Display*.

A recente identificação da molécula CD163 como um receptor para o complexo Hb-Hp pode determinar uma pista no envolvimento desta molécula com a progressão da aterosclerose. Este sim seria um fato novo no contexto da doença.

Muitos autores têm atribuído vários papéis para a CD163, uma vez que poderia ter um papel pró-oxidante no metabolismo do ferro durante a

aterogênese (Kristiansen et al., 2001). Por outro lado, tem sido sugerido que a CD163 ou a sCD163 (forma solúvel) estejam desempenhando um papel na resolução da inflamação, devido ao fato de encontrarem-se expressos em tecidos inflamados (Fabriek et al., 2005).

Assim, selecionou-se o fago que mimetiza a molécula CD163 para os ensaios específicos de validação. Nesses ensaios, utilizou-se, também, um anticorpo comercial anti-CD163 humano. Foi constatada não só a ligação de ambos (Figura 21), como sua co-localização por imunofluorescência (Figura 22).

A especificidade de ligação do fago foi testada utilizando-se tecido proveniente de baço (com presença de macrófagos), e de tireóide (ausência de macrófagos). Obteve-se, pela reação de imunoperoxidase e imunofluorescência, positividade, tanto para o fago que expressa o peptídeo (CTHRSSVVC) e que mimetiza a molécula CD163, quanto para o receptor comercial anti-CD163 humano, o qual se liga à molécula CD163 em macrófagos no baço, mas nenhuma positividade em tireóide.

O ensaio de co-localização à imunofluorescência mostrou que, tanto o peptídeo expresso pelo fago, quanto o receptor comercial anti-CD163 humano, se co-localizaram, reconhecendo a mesma região. A co-localização não ocorreu com fago não específico (CVSSTLLRC).

Desse modo, observou-se que o anticorpo monoclonal reconhece os domínios 1 à 4 da molécula CD163, porém não foi possível identificar em qual domínio o fago se ligou, nem qual seria o seu ligante. Constatou-se, apenas, que se liga na mesma região que o anticorpo monoclonal. Estes

resultados sugeriram o questionamento: “Qual a importância biológica deste achado?”, “Qual seria o ligante para esta molécula representada pelo fago, a Hb (hemoglobina) ou a Hp (haptoglobina)?”, “Ou ainda o complexo Hb-Hp (hemoglobina-haptoglobina), o qual se liga no domínio 3 da molécula CD163?”, “Talvez um outro ligante ainda não descrito?”, “E qual sua participação na progressão ou na estabilidade do ateroma?”.

Para tentar responder estas perguntas, o presente trabalho realizou testes, cujo objetivo foi validar a interação entre o fago (receptor) e seu possível ligante, uma vez que a haptoglobina é o ligante natural da molécula CD163, e que o fago específico é muito similar a esta molécula (Figuras 25 e 26).

Foi utilizada, para este estudo, uma outra abordagem por meio de um ensaio de ligação *in vitro* (Giordano et al., 2001, Cardó-Vila M et al., 2003) com receptores comerciais disponíveis. Neste estudo, os possíveis candidatos a ligantes foram a Hb (hemoglobina), a Hp (haptoglobina), e o complexo Hb–Hp. Este ensaio foi feito tanto para o fago que expressa o peptídeo (CTHRSSVVC), o qual mimetiza a molécula CD163, como para um fago sem inserto, chamado de fago selvagem (Fd).

O resultado preliminar deste teste sugeriu ligação do fago à haptoglobina livre. Esse resultado deverá ser confirmado, bem como serão testados outros prováveis ligantes como: ferritina, observada em acúmulo em lesões precoces e avançadas (Li et al., 2004); trombina e plasmina, as quais, juntamente com as metaloproteases, podem contribuir para a neovascularização e a ruptura da placa (Lijnen, 2002).

A segunda proteína selecionada, mimetizada pelos fagos, foi a integrina α 10. Essa proteína é um receptor para componentes da matriz extracelular (incluindo colágeno tipo I, IV e VI) e laminina 1. Sua importância biológica está associada à interação célula-colágeno, porém pouco se sabe da biologia desta integrina (Tulla et al., 2001).

A terceira proteína selecionada, a galectina 4, é uma lectina encontrada na superfície de células, bem como na matriz extracelular. Está associada à hemaglutinação, adesão e migração celular, e em muitos processos patológicos, como por exemplo, em doenças auto-imunes. Na aterosclerose, só foi descrita, até o momento, a galectina-3, que se expressa em lesões ateroscleróticas de carótida, e não a galectina-4 (Nachtigal et al., 1998; Wada e Makino, 2001).

A quarta proteína, a semaforina 3F, está envolvida nos processos que fazem parte do desenvolvimento cardiovascular, e está associada a mecanismos de sinalização celular. O entendimento dessas vias de sinalização poderia contribuir para se entender doenças cardíacas congênitas (Gitler et al., 2004).

Em conclusão, os dados obtidos com a utilização do *Phage Display* mostraram moléculas distintas como participadoras da aterogênese, e com potencial de investigação a ser estudado. Neste contexto, a haptoglobina mostrou-se a candidata como par ligante - receptor do fago selecionado.

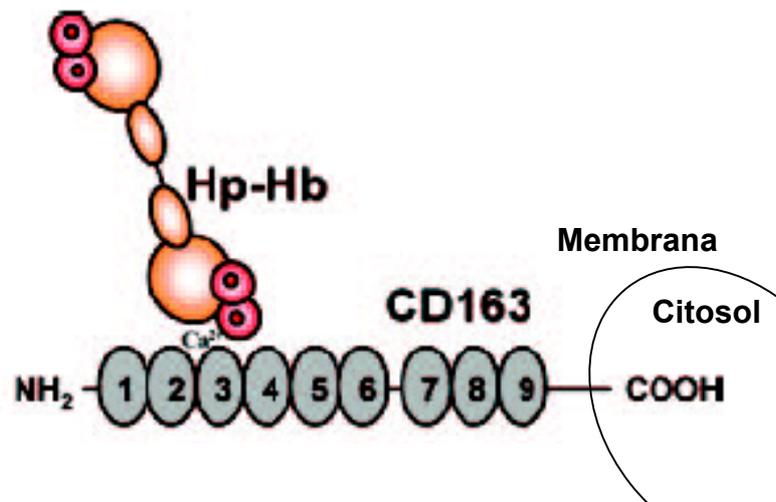


Figura 25. Representação do domínio de CD163 que se liga ao complexo Hp-Hb ou Hb-Hp. As sub-unidades em rosa do complexo Hb-Hp representam Hb $\alpha\beta$ dímeros. As sub-unidades em laranja (círculo menor) representam as pontes de dissulfeto de Hp subunidade α . As sub-unidades em laranja (círculo maior) representam as sub-unidades β da Hp ligando-se na hemoglobina na presença de cálcio (modificado de Madsen *et al.*, 2004)

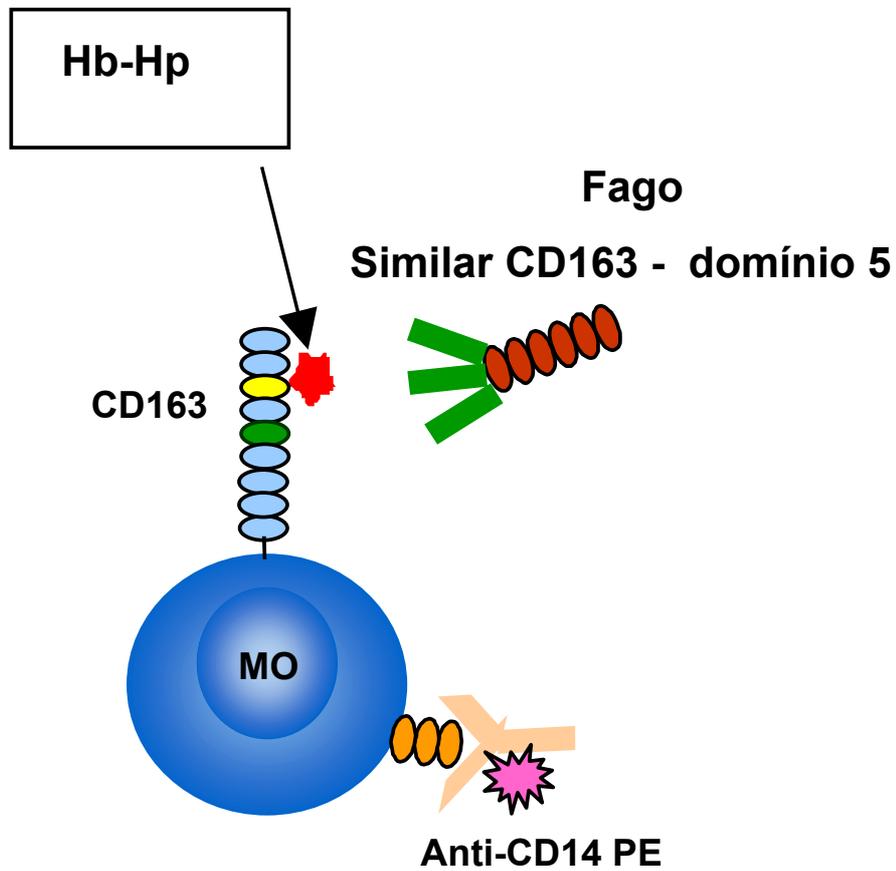
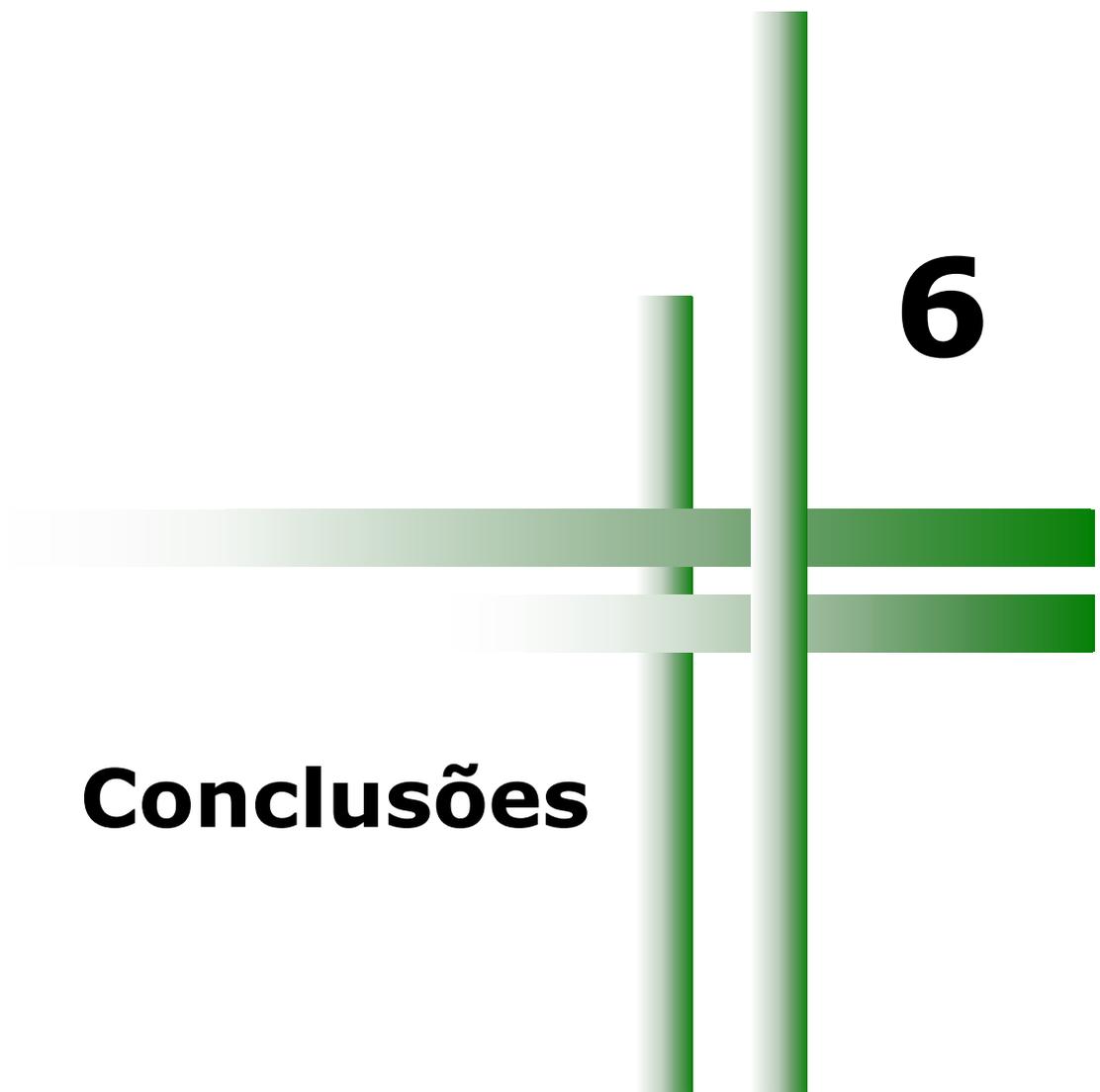


Figura 26. Representação hipotética em homodimerização, do domínio 5 (CTHRSSVVC) apresentado pelo fago ligando-se ao complexo Hb-Hp que está ancorado no domínio 3 (Fonseca e Silva, 2006)

Conclusões

6



6. CONCLUSÕES

1. Selecionou-se, identificou-se e analisou-se peptídeos apresentados por fagos que interagem na superfície luminal de ateroma, e que não interagem em carótida não aterosclerótica.
2. A detecção de marcadores moleculares já relacionados à doença reforçou a confiabilidade dos resultados obtidos por esta técnica. Por outro lado, ao estudar-se marcadores não relacionados à doença, fato que seria relevante, haveria o risco de não existir receptor comercial para a validação do teste.
3. O fago isolado CTHRSSVVC, o qual mimetiza a molécula CD163, reconheceu regiões de centro lipídico com e sem trombos dos ateromas, em ensaio de ligação, e não reconheceu nenhuma estrutura da artéria carótida não aterosclerótica, mostrando especificidade de ligação ao ateroma.

4. Os resultados obtidos até o momento, no ensaio de ligação *in vitro*, sugerem que o peptídeo CTHRSSVVC poderia ser um receptor para haptoglobina, uma vez que este consiste no ligante natural da molécula CD163, o qual o fago mimetiza.
5. O domínio 5, ou seqüência por ele representada, atuaria como homodímero no domínio 3 da CD163, onde a haptoglobina naturalmente está ligada à hemoglobina, e este constituiria um dado molecular novo.
6. Este estudo deparou-se com um domínio (5) ainda não descrito na literatura, e que atua provavelmente, como o domínio 3 na remoção do complexo Hb-Hp, atuando também como participante da doença.

The graphic consists of two vertical bars and two horizontal bars. The left vertical bar is a light green gradient, and the right vertical bar is a darker green gradient. The top horizontal bar is light green, and the bottom horizontal bar is dark green. They intersect to form a cross-like shape.

7

Perspectivas

7. PERSPECTIVAS

1. Ensaios de co-localização à imunofluorescência, utilizando-se anti-Hp e o fago específico (CTHRSSVVC) em tecidos provenientes de baço, ateromas, e carótida não aterosclerótica serão realizados.
2. Continuidade de ensaios de ligação *in vitro* com fago específico e receptores comerciais.
3. A análise futura de outros fagos já isolados e analisados, bem como sua validação, poderá levar à identificação de outros fatores alterados no ateroma, e que poderiam encontrar-se associados à parede da artéria inflamada.



8

Referências

8. REFERÊNCIAS

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389-402.
- Anitschkow N, Chalатов S. On experimental cholesterol steatosis and its significance in the origin of some pathological process (1913). Reprinted *In: Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1983;3:178-82.
- Arap MA. Estudo da proteína de choque térmico GRP78 para o desenvolvimento de um sistema de receptor-ligante para o câncer de próstata [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003
- Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, Hajitou A, Sarkis AS, Arap W, Pasqualini R. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell.* 2004;6:275-84.
- Arap MA. Phage display technology – Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology.* 2005;28:1-9.
- Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science.* 1998;279:377-80.
- Arap W, Pasqualini R. The human vascular mapping project. Selection and utilization of molecules for tumor endothelial targeting. *Haemostasis.* 2001;31:30-1.

- Arap W, Kolonin MG, Trepel M, Lahdenranta J, Cardo-Vila M, Giordano RJ, Mintz PJ, Ardelt PU, Yao VJ, Vidal CI, Chen L, Flamm A, Valtanen H, Weavind LM, Hicks ME, Pollock RE, Botz GH, Bucana CD, Koivunen E, Cahill D, Troncoso P, Baggerly KA, Pentz RD, Do KA, Logothetis CJ, Pasqualini R. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat Med.* 2002a;8:121-7.
- Arap W, Haedicke W, Bernasconi M, Kain R, Rajotte D, Krajewski S, Ellerby HM, Bredesen DE, Pasqualini R, Ruoslahti E. Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002b;99:1527-31.
- Bason C, Corrocher R, Lunardi C, Puccetti P, Olivieri O, Girelli D, Navone R, Beri R, Millo E, Margonato A, Martinelli N, Puccetti A. Interaction of antibodies against cytomegalovirus with heat-shock protein 60 in pathogenesis of atherosclerosis. *Lancet.* 2003;362:1949-50.
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894-7.
- Brígido MM, Maranhão AQ. Bibliotecas apresentadas em fagos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* 2002;26:44-51.
- Cardó-Vila M, Arap W, Pasqualini R. Alpha v beta 5 integrin-dependent programmed cell death triggered by a peptide mimic of annexin V. *Mol Cell.* 2003;11:1151-62.
- Chalatov S. Ueber der Verhalten der Leber Gegenüber. Den Verschiedenen Arten von Speisfett. Virchows Archiv (1912). In: Friedman M, Friedland GW, revisores. *As 10 maiores descobertas da medicina.* 5^A ed. São Paulo, Companhia das Letras, 2003.

- Da Luz, PL, Favarato D. A disfunção endotelial como índice prognóstico e alvo terapêutico. *In: Luz P, Laurindo FRM, Chagas ACP. Endotélio e doenças cardiovasculares.* Rio de Janeiro : Atheneu , 2003. p.203-13.
- Delanghe JR , Duprez Da, De Buyzere ML, Bergez BM, Callens BY, Leroux-Roels GG, Clement DL. Haptoglobin polymorphism and complications in established essential arterial hypertension. *J Hypertens.* 1993;11:861-7.
- Essler M, Ruoslahti E. Molecular specialization of breast vasculature: A breast-homing phage- displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99:2252-7.
- Fabrick BO, Dijkstra CD, van den Berg TK The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology.* 2005;210:153-60.
- Fernandez, AZ, Lopez F, Tablante A, Romano E, Hurt-Camejo E, Camejo G, Apitz-Castro R. Intravascular hemolysis increases atherogenicity of diet-induced hypercholesterolemia in rabbits in spite of heme oxygenase-1 gene and protein induction. *Atherosclerosis.* 2001;158:103-11.
- Frostegård J, Ulfgrén AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999;145:33-43.
- Giordano RJ, Cardó-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med.* 2001;7:1249-53.
- Gitler AD, Lu MM, Epstein JA. PlexinD1 and semaphorin signaling are required in endothelial cells for cardiovascular development. *Dev Cell.* 2004;7:107-16.

- Goldstein JI, Goldstein KA, Wardwell K, Fahrner SL, Goonan KE, Cheney MD, Yeager MP, Guyre PM. Increase in plasma and surface CD163 levels in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Atherosclerosis*. 2003;170:325-32.
- Graversen JH, Madsen M, Moestrup SK. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34:309-14.
- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998;2:275-81.
- Guetta J, Strauss M, Levy NS, Fahoum L, Levy AP. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis*. 2006; *in press*
- Hajitou A, Pasqualini R, Arap W. Vascular targeting: recent advances and therapeutic perspectives. *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16:80-8
- Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1876-90.
- Higuchi ML, Sambiasi N, Palomino S, Gutierrez P, Demarchi LM, Aiello VD, Ramires JA. Detection of mycoplasma pneumoniae and chlamydia pneumoniae in ruptured atherosclerotic plaques. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33:1023-6.
- Hohenester E, Sasaki T, Timpl R. Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily. *Nat Struct Biol*. 1999;6:228-32.
- Koivunen E, Arap W, Rajotte D, Lahdenranta J, Pasqualini R. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *J Nucl Med*. 1999a;40:883-8.

- Koivunen E, Restel BH, Rajotte D, Lahdenranta J, Hagedorn M, Arap W, Pasqualini R. Integrin-binding peptides derived from *phage display* libraries. *Methods Mol Biol.* 1999b;129:3-17.
- Koivunen E, Gay DA, Ruoslahti E. Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library. *J Biol Chem.* 1993;268:20205-10.
- Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest.* 1999;103:571-7.
- Kolonin MG, Pasqualini R, Arap W. Teratogenicity induced by targeting a placental immunoglobulin transporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:13055-60.
- Kowala MC, Recce R, Beyer S, Gu C, Valentine M. Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. *Atherosclerosis.* 2000;149:323-30.
- Krieger M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol.* 1997;8:275-80
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature.* 2001;409:198-201.
- Law SK; Micklem KJ; Shaw JM; Zhang,XP; Dong Y; Willis AC, Mason DY. A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *Eur J Immunol.* 1993;23:2320-5.
- Levy AP, Roguin A, Hochberg I, Herer P, Marsh S, Nakhoul FM, Skorecki K. Haptoglobin phenotype and vascular complications in patients with diabetes. *N Engl J Med.* 2000;343:969-70.

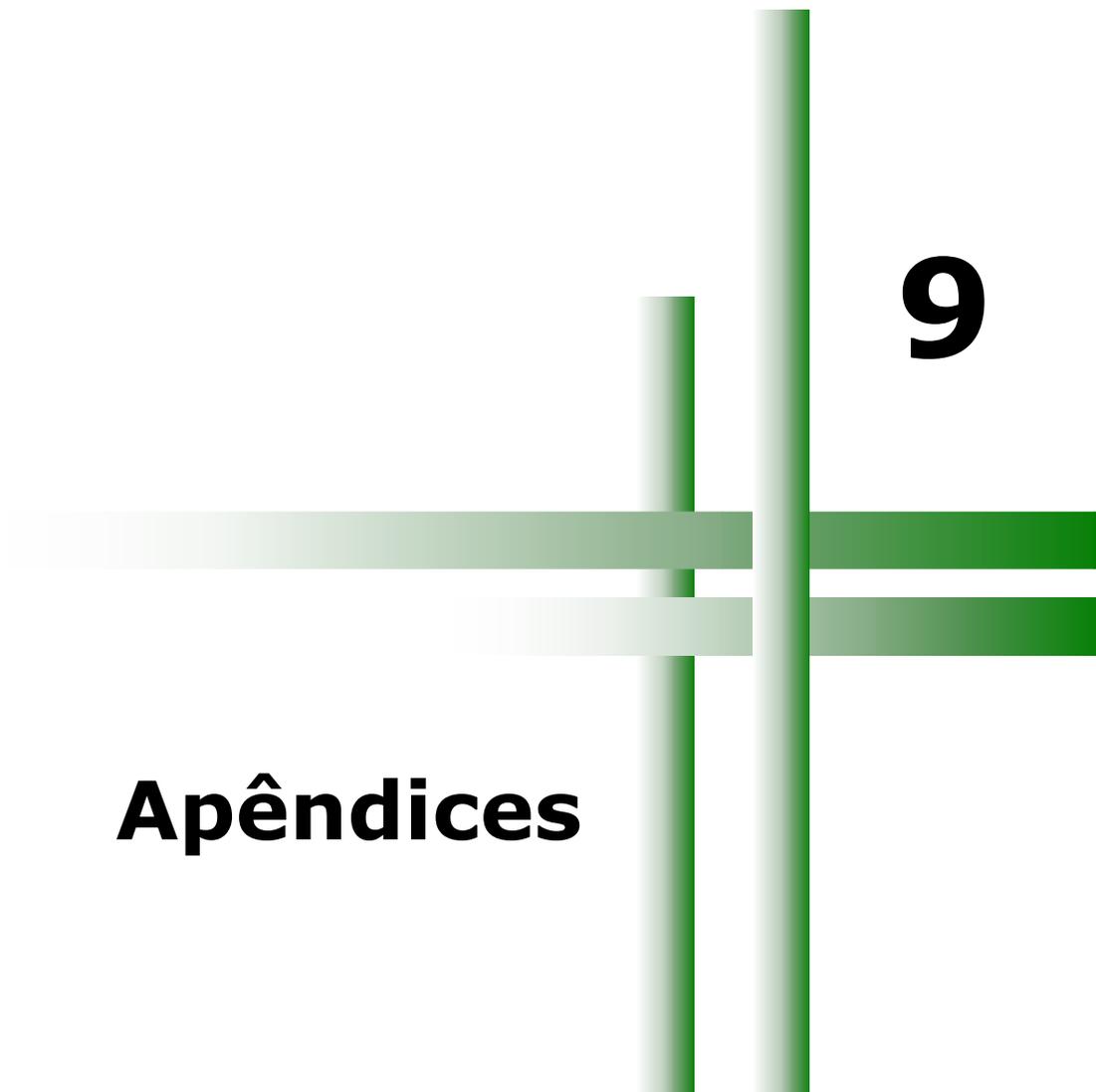
- Li W, Xu LH, Yuan XM. Macrophage hemoglobin scavenger receptor and ferritin accumulation in human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1030:196-201.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135-43.
- Libby P. The vascular biology of atherosclerosis. *In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P, editors. Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, 6th ed, Philadelphia: Saunders, 2001. p.995 -1009.*
- Lijnen HR. Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis. *Biochem Soc Trans.* 2002;30:163-7.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233 - 41.
- Ly H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, et al. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule in rabbit endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1993;13:197-204.
- Madsen M, Moller HJ, Nielsen MJ, Jacobsen C, Graversen JH, van den berg T, Moestrup SK. Molecular characterization of the haptoglobin.hemoglobin receptor CD163. ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region. *J Biol Chem.* 2004;279:51561-7.
- Mintz PJ, Kim J, Do KA, Wang X, Zinner RG, Cristofanilli M, Arap MA, Hong WK, Troncoso P, Logothetis CJ, Pasqualini R, Arap W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol.* 2002;21:57-63.
- Moestrup SK, Möller HJ. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med.* 2004;36:347-54.

- Molenaar TJ, Twisk J, de Haas SA, Peterse N, Vogelaar BJ, van Leeuwen SH, Michon IN, van Berkel TJ, Kuiper J, Biessen EA. P-selectin as a candidate target in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:856-66.
- Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis. Beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1702-11.
- Muller OJ, Kaul F, Weitzman MD, Pasqualini R, Arap W, Kleinschmidt JA, Trepel M. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol.* 2003;21:1040-6.
- Nachtigal M, Al-Assaad Z, Mayer EP, Kim K, Monsigny M. Galectin-3 expression in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1998;152:1199-208.
- Parry CH. An inquiry into the symptoms and causes of the syncope anginosa, commonly called *angina pectoris*, 1799. In: Friedman M, Friedland GW, revisores. *As 10 maiores descobertas da medicina.* 5^A ed. São Paulo, Companhia das Letras, 2003.
- Pasqualini R, Arap W, McDonald DM. Probing the structural and molecular diversity of tumor vasculature. *Trends Mol Med.* 2002; 8:563-71.
- Pasqualini R, Arap W, Rajotte D, Ruoslahti E. In vivo selection of phage display libraries. In: Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ, eds. *Phage display : a laboratory manual.* USA : Cold spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 22.1 – 27.
- Pasqualini R, Ruoslahti, E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature.* 1996, 380: 364-6.

- Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO 3rd. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1995; 95:1747-55.
- Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, Koivunen E, Pasqualini R, Ruoslahti E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J Clin Invest.* 1998;2:430-7.
- Ratcliffe NR, Kennedy SM, Morganelli PM. Immunocytochemical detection of Fcγ receptors in human atherosclerotic lesions. *Immunol Lett.* 2001;77:169-74.
- Roguin A, Hochberg I, Nikolsky E, Markiewicz W, Meisel SR, Hir J, Grenadier E, Beyar R, Levy AP. Haptoglobin phenotype as a predictor of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol.* 2001; 87:330-2.
- Rokitansky K. Ueber einiger der wichtigsten krankheiten der arterien, Akademie Der Wissenschaft Wien, 4, 1852. In: Friedman M, Friedland GW, revisores. *As 10 maiores descobertas da medicina.* 5^A ed. São Paulo, Companhia das Letras, 2003.
- Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26.
- Samoylova TI, Smith BF. Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening. *Muscle Nerve.* 1999;22:460-6.
- Schoen FJ, Cotran RS. Blood vessels. In: Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia : Saunders , 1999.
- Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science.* 1990; 249:386-90.

- Shaw PX, Horkko S, Tsimikas S, Chang MK, Palinski W, Silverman GJ, Chen PP, Witztum JL. Human-derived anti-oxidized LDL autoantibodies blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localize to atherosclerotic lesions in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1333-9.
- Sherer Y, Shoenfeld Y. Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2002;1:21-7.
- Shoenfeld Y, Sherer Y, George J, Harats D. Autoantibodies associated with atherosclerosis. *Ann Med.* 2000; 32: 37-40.
- Smith G, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* 1993; 217:228-57.
- Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985; 228:1315-7.
- Sulahian TH, Hintz KA, Wardwell K, Guyre PM. Development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids. *J Immunol Methods.* 2001; 252: 25-31.
- Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2000;101:948-54.
- Trepel M, Grifman M, Weitzman MD, Pasqualini R. Molecular adaptors for vascular-targeted adenoviral gene delivery. *Hum Gene Ther.* 2000;11:1971-81.
- Trepel M, Arap W, Pasqualini R. Modulation of the immune response by systemic targeting of antigens to lymph nodes. *Cancer Res.* 2001;61:8110-2.

- Tulla M, Pentikainen OT, Viitasalo T, Kapyla J, Impola U, Nykvist P, Nissinen L, Johnson MS, Heino J. Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J Biol Chem.* 2001;276:48206-12.
- Ugucioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur J Immunol.* 1995; 25:64-8.
- Virchow R. Phlogose und thrombose in gefass-system (berlim, gesammelte abhandlungen für wissenschaftlichen medizin, 1856). *In: Friedman M, Friedland GW, revisores. As 10 maiores descobertas da medicina. 5^A ed. São Paulo, Companhia das Letras, 2003.*
- Wada J, Makino H. Galectins, galactoside-binding mammalian lectins: clinical application of multi-functional proteins. *Acta Med Okayama.* 2001;55:11-7.
- Webster R. Filamentous Phage Biology. *In: Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ, eds. Phage Display : a laboratory manual. USA : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 1.1 – 37.*
- White SJ, Nicklin SA, Sawamura T, Baker AH. Identification of peptides that target the endothelial cell-specific LOX-1 receptor. *Hypertension.* 2001;37:449-55.
- Wick G, Knoflach M, Kind M, Henderson B, Bernhard D. Heat shock proteins and stress in atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2004;3:30-1.
- Windaus A. Ueber der gehalt normaler und atheromatoser aorten an cholesterol und cholesterinester, zeitschrift für physiologische chemie 67 (1910):174. *In: Friedman M, Friedland GW, revisores. As 10 maiores descobertas da medicina. 5^A ed. São Paulo, Companhia das Letras, 2003.*
- Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1547-59.



9

Apêndices

9. APÊNDICES

Anexo D

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M _ F _
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL...LEGAL.....
NATUREZA(grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M _ F _
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Identificação de novos fatores moleculares na patogênese da aterosclerose.
2. PESQUISADORES: Dimas Ikeoka CARGO/FUNÇÃO: Médico / Pós graduando /InCor INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .CRM 88531.Laboratório de Imunologia. -InCor Prof. Dr. **Telésforo Bacchella** CARGO/FUNÇÃO: Prof.Associado.- Unidade de Fígado INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .CRM 17208

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos.....**III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:**

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ; Estudar os motivos que levam as pessoas a desenvolver aterosclerose (formação de placa de gordura) .
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; O Sr (a) será operado para a retirada de uma placa de gordura que impede a passagem de sangue na artéria carótida. Esta artéria é um dos principais vasos que leva o sangue para o cérebro e quando entupida pode levar a problemas na circulação cerebral, conhecidos como derrames. Está cirurgia já havia sido indicada pelo seu médico que é um cirurgião vascular. O que queremos é aproveitar a retirada de um pedaço da artéria doente junto com a placa de gordura do Sr (a) durante a cirurgia que será estudado no laboratório para entendermos a doença. Também será necessário a retirada de 10 à 40 ml de sangue .
3. desconfortos e riscos esperados ; risco mínimo para o paciente. A cirurgia é que tem riscos, não a retirada do material.
4. benefícios que poderão ser obtidos; procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo. A longo prazo um tratamento para a aterosclerose ou descobrir as possíveis causas de sua formação.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS

Rosemeire Aparecida Silva, Av. Com. Alberto Bonfiglioli, 406 – Butantan – Tel 9177-9933 cel. / 3722-3918 residência./ 3069 - 5912 ou 3069 – 5913 Laboratório de Imunologia – InCor.

Viviane Z. Rocha, Rua Capote Valente, 668 – apto 44 Pinheiros – Tel: 9616-4765 cel. / 3083 – 6175 residência

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2003 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal
(carimbo ou nome Legível)

assinatura do pesquisador

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO

(Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)

1. Este termo conterà o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa -CAPPesq deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.



INSTITUTO DO CORAÇÃO
(Fundação E. J. Zerbini)
Hospital das Clínicas
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA
Tel.: 3069-5912 - 3069-5913 Fax.: 3069-5902



**TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DOAÇÃO DE SEGMENTO DE ARTÉRIA
PARA PESQUISA**

Objetivo da pesquisa: Estudar os motivos que levam as pessoas a desenvolver aterosclerose (formação de placa de gordura) nas veias.

Aproveitaremos a retirada dos órgãos para retirada de um segmento da artéria carótida ou abdominal de doadores de órgãos sem aterosclerose, para compararmos as veias doentes e saudáveis bem como a coleta de 10 à 40 ml de sangue para estudo no laboratório e a partir daí entender a doença.

Para isso contamos com o consentimento da família, pelo explicado acima.

São Paulo, de de 2003

Assinatura responsável legal, RG.



INSTITUTO DO CORAÇÃO
(Fundação E. J. Zerbiní)
Hospital das Clínicas
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



Mem.CC.1203

São Paulo, 19 de dezembro de 2002.

Ao
Prof. Dr. Jorge Kalil Filho

A Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração, apreciou e aprovou na sessão 421/02/21 de 19.12.2002, Protocolo de Pesquisa SDC - 2186/02/193 - "Identificação de **novos** fatores moleculares na patogênese da aterosclerose", e foi o seguinte o parecer do Relator: "Aprovado no mérito científico, sem ônus para a Instituição".

Atenciosamente,


Selma Cristina Quaia
Secretária da Comissão Científica e de Ética
InCor/HC/FMUSP



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19/02/03, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 054/03, intitulado: "Identificação de novos fatores moleculares na patogênese da aterosclerose" apresentado pelo Departamento de CÁRDIO-PNEUMOLOGIA, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: PROF. DR. JORGE KALIL FILHO

Pesquisador(a) Executante: SRA. ROSEMEIRE APARECIDA SILVA

CAPPesq, 19 de Fevereiro de 2003.


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)