

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



DENISE MACHADO

**“Caracterização do domínio da Glicoproteína Associada a
Microfibrila-1 (MAGP-1) com atividade pró-trombótica”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>DENISE MACHADO</u> <u>Claudio Chrysostomo Werneck</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do
título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular na área
de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Campinas
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M18c	<p>Machado, Denise Caracterização do domínio da glicoproteína associada a microfibrila-1 (MAGP-1) com atividade pró-trombótica / Denise Machado. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Cláudio Chrysóstomo Werneck. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Glicoproteína associada a microfibrila-1. 2. Fibras elásticas. 3. Trombose. 4. Microfibrilas. I. Werneck, Cláudio Chrysóstomo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
-------------	--

Título em inglês: Characterization of Microfibril-associated Glycoprotein-1 (MAGP-1) domain with pro-thrombotic activity.

Palavras-chave em inglês: Microfibril-associated glycoprotein-1; Elastic fibers; Thrombosis; Microfibrils.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Cláudio Chrysóstomo Werneck, Sérgio Marangoni, Mauro Sérgio Gonçalves Pavão.

Data da defesa: 20/07/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

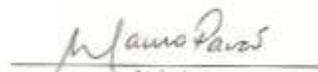
Campinas, 20 de julho de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni


Assinatura

Prof.ª Dra. Luciana Maria de Hollanda

Assinatura

Prof.ª Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão

Assinatura

“A arte de sorrir cada vez que o mundo diz não.”

Guilherme Arantes.

Dedicatória

À Família *Machado*

Meus pais Wanderlúcio e Neuza,
são pessoas que eu admiro e amo, que me ensinaram
a ser o que sou hoje, com princípios, caráter e educação.

Minha irmã Daisy,
ela sabe o quanto é importante para mim,
minha melhor amiga, meu melhor espelho de vida.

Meus irmãos Henilson e Neilson,
são meus amigos e estão sempre dispostos a estender
a mão quando preciso, obrigada.

A minha tia Cristina,
dizem que sou sua queridinha mas no fundo sou
eu que admiro o seu jeito de ser.

Aos meus avós “*in memorian*”,
sem vocês não seria o que sou hoje pois vocês
possibilitaram a minha vida e minha educação.

A todos um muito obrigada.

Amo cada um de uma forma totalmente única e especial.

Ao *Luis Gustavo de Araujo*

Uma pessoa que entrou na minha vida juntamente com a UNICAMP, os dois de uma forma muito especial.

Ele me mostrou que com o dia a dia poderei aprender sempre a ser melhor.

Gustavo, a cada dia que passa sinto que estamos mais unidos e isto é sinal do quanto entendemos um ao outro além do nosso relacionamento.

Obrigada pela compreensão, por cada bronca, por cada final de semana que passou sem a minha presença ou que estive na UNICAMP.

Sei que esta jornada que passei não teria o mesmo prazer sem você.

Eu te amo.

Agradecimento

Ao Prof. Dr. Cláudio Chyrstostomo Werneck

Uma pessoa que contribuiu de forma gigantesca para o meu aprimoramento intelectual, profissional e pessoal.

Possui uma grande capacidade de engrandecer aqueles que o rodeiam. Obrigada pela oportunidade única de ser a primeira aluna do Laboratório de Fibras Elásticas.

À Prof^a. Dr^a. Cristina Vicente Pontes

Grande mestre possui uma paciência e uma forma simples de explicar o que é difícil. Aprendi a ser mais firme e mais madura com a convivência ao seu lado.

Seu alto astral contagiante fazia o dia ter outro gosto depois de passar pelo laboratório.

Obrigada pela grande contribuição na minha vida profissional e pessoal.

Aos professores *Mauro Sérgio G. Pavão, Sérgio Marangoni, Ana Carolina Santos de Souza Galvão e Luciana Maria de Hollanda* que participaram da banca da tese por ter aceitado o convite e pela contribuição nesta tese de mestrado.

Aos professores *Sérgio Marangoni, Luciana Maria de Hollanda, Fabio Trindade Maranhão Costa, José Camillo Novello, Ana Carolina Santos de Souza Galvão e Hiroshi Aoyama* que aceitaram participar da banca de qualificação e deram o primeiro passo com sugestões e críticas para que esta tese se tornasse real.

Ao professor Dr. *Marcelo Brocchi* que abriu as portas do seu laboratório para fazer os meus primeiros ensaios até os últimos possibilitando meu crescimento.

À professora Dr^a. *Carmen Veríssima Ferreira* que sempre esteve presente para esclarecer tudo. Suas aulas contribuíram muito para a minha visão e valorização do profissional PROFESSOR.

Ao professor Dr. *Paulo P. Joazeiro* pela contribuição nesta tese e pela disponibilidade de esclarecer qualquer dúvida.

Ao professor Dr. *Hiroshi Aoyama* uma pessoa muito especial, com a sua simplicidade conseguiu me fazer ser mais uma admiradora.

Ao *João Batista Fabrin Neto* além de técnico do laboratório e capoeirista é um grande amigo sempre disposto a uma conversa com um cafezinho na cozinha, nestes momentos que lembro o quanto vale um momento simples de felicidade.

As meninas do laboratório de Fibras Elásticas *Ana Cláudia, Camila, Catherine, Tallita, Talita, Rita, Fernanda* e o único menino *Guilherme* meus amigos, companheiros de experimentos e conversas como poderei agradecer a companhia do dia a dia. Vocês vieram dando uma contribuição enorme na minha vida com a alegria contagiante e com as conversas, festinhas e escapadinhas do laboratório.

Ao *Silvio Roberto Consonni* no ano de 2009 conheci imaginando que passaria a ser somente um colega, mas com o tempo percebi que não era somente um colega, mas uma pessoa de coração e alma boa.

À *Dr^a. Luciana Maria Hollanda* foi quem estendeu as mãos para os meus primeiros passos aqui na UNICAMP e mesmo sabendo que havia dificuldades nunca largou minha mão. Eu simplesmente te admiro muito como pessoa e como profissional. Saiba que se hoje estou aqui é porque você esteve comigo e é tão merecedora deste título quanto eu.

Ao Prof Dr. *Marcelo Lancellotti* como poderei agradecer seus puxões de orelhas, suas broncas e conselhos. Mesmo se vivesse mais uma vida ficaria ainda em débito contigo. Lancellotti, você fez com que a Denise se tornasse mais forte, mais firme em suas atitudes e decisões, obrigada pelo seu apoio no meu engrandecimento.

Ao *Rodrigo Augusto da Silva*, *Dr^a. Ana Carolina Santos de Souza Galvão* são duas pessoas que conheci no laboratório de Bioensaios e Transdução de Sinais que aprendi a admirar profissionalmente.

Ao *Fernando e Paulo*, duas pessoas do LABEX, que sempre estão nos momentos bons da minha vida aqui na UNICAMP, afinal eles estavam em todas as festas. Aprendi com eles a como estar sempre animada e de bem com a vida, foram ganhando espaço aos poucos e é desta forma que merecem este espaço aqui na minha tese.

Ao *Gilberto*, meu professor de inglês, pela paciência em cada aula e por sua compreensão quando não podíamos ter aulas, hoje um grande amigo.

À *Andréia Vigiato*, secretária da SCPG-BFM, sempre sorrindo nos nossos encontros e disposta a esclarecer todas as dúvidas.

À *Silvia e Rafael*, secretários da pós, sempre passando primeiro por eles e com um sorriso passavam a solução dos meus problemas.

À *Marina Andressa*, secretária do Departamento de Bioquímica, uma pessoa que admiro e que sempre ajuda com boa vontade as pessoas do departamento.

À família *Araujo* que desde que conheci me acolheu com muito respeito e carinho. Cada dia que passa me sinto mais membro e sei que sempre estarão me apoiando em cada atitude, em cada ação. Obrigada por me aceitar desta forma simples e singular.

À família *Takano* que é uma extensão da minha, cada um de vocês, tia Carmen, Dayane, Thaís e Cláudio tem uma parcela enorme do meu sucesso. Sei o quanto sou grata e o quanto admiro cada um em especial.

À *FAPESP* e *UNICAMP* que possibilitaram o desenvolvimento desta tese.

Em especial aos moradores da *Casa São Vicente de Paulo* em Piumhi – MG. Sei que mesmo não me conhecendo a fundo acredito em cada sorriso, em cada esperança e em cada oração destinada a mim. Que continuem ajudando ao próximo e me fazendo crer que há esperança, que há uma luz.

A todos aqueles que não estão mencionados em nome aqui, mas que participaram, seja a forma que for, contribuindo ou não, do meu processo para obtenção deste título meu muitíssimo obrigado.

Obrigada!

Financiamento

Processo número 2008/02239-2



Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

Processo 2008/02239-2

Agradecimento especial



Universidade Estadual de Campinas

Laboratório de Fibras Elásticas - UNICAMP

Laboratório de Química de Proteínas – UNICAMP

Laboratório de Enzimologia - UNICAMP

Laboratório de Bioensaios e Transdução de Sinal - UNICAMP

Laboratório de Arteroesclerose e Trombose – UNICAMP

Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica – UNICAMP

Laboratório de Genômica e Biologia Molecular Bacteriana – UNICAMP

Laboratório de Microscopia Eletrônica – UNICAMP

Lista de abreviaturas

$\mu\text{g/Kg}$ – micrograma por quilograma

$\mu\text{g/mL}$ – micrograma por mililitro

μL – microlitro

μL^3 – microlitro cúbico

μm – micrômetro

nm – nanômetro

ATP – adenosina trifosfato

BHI – Brain-heart infusion

bp – pares de bases

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

C57BL6 – C57 Black 6

CaCl_2 – cloreto de cálcio

cm – centímetro

C-terminal – Carboxi terminal

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTT – ditioneitol

E. coli - *Escherichia coli*

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

gr - grama

g/L – grama por litro

h – hora

HCl – ácido clorídrico

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactosídeo

KCl – cloreto de potássio

kDa – quilo Dalton

Kg - quilograma

L – litro

MAGP-1 – Glicoproteína Associada a Microfibrila-1

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Mg - magnésio

mg/Kg – micrograma por quilograma

MgSO₄ – sulfato de magnésio

min – minuto

mL – mililitro

mmol/L – micromolar por litro

mol/L – molar por litro

MOPS – ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

mW – micro Watt

NaCl – cloreto de sódio

NaH₂PO₄ – fosfato de sódio monobásico

N-terminal – Amino terminal

PCR – reação em cadeia de polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

RbCl – cloreto de rubídio

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese realizada com gel de poliacrilamida / dodecil sulfato de sódio

seg – segundos

seg/mL – segundo por mililitro

TEMED - N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano

TO – tempo de oclusão

U/mL – unidade por mililitro

V – volts

ZnCl₂ – cloreto de zinco

Índice

	Resumo	Xviii
	Abstract	Xx
1.	Introdução	1
2.	Objetivo	13
2.1.	Objetivo geral	14
2.2.	Objetivos específicos	14
3.	Material e Métodos	15
3.1.	Materiais	16
3.2.	Métodos	19
3.3.	Análise de resultados	32
4.	Resultados	33
4.1.	Características morfológicas dos trombos obtidos a partir de camundongo selvagem e deficiente em MAGP-1	34

4.2.	Mapeamento dos domínios da MAGP-1 importantes na formação do trombo	39
5.	Discussão	58
6.	Conclusão	65
7.	Referencias Bibliográficas	67
8.	Anexos	73

Resumo

Nos últimos anos, o principal objetivo de nosso laboratório é esclarecer a participação da Glicoproteína Associada a Microfibrila-1 (MAGP-1) na formação de trombos no modelo de trombose arterial fotoquímica. Dados indicam que a MAGP-1 não interage diretamente com as plaquetas, importante componente na trombose arterial, mas que, provavelmente, a MAGP-1 esteja interagindo com uma molécula que tenha participação neste processo. Neste sentido, a interação da MAGP-1 com moléculas importantes na formação do trombo foi estudada. A MAGP-1 tem a capacidade de interagir com o fator de von Willebrand, bem como com fibrinogênio e fibronectina. Além disto, foi verificado que a injeção da MAGP-1 recombinante em camundongos deficientes em MAGP-1 é capaz de reestabelecer o tempo normal de formação de trombos nestes animais. Considerando a ausência da MAGP-1 e seu efeito na formação de trombos, foi questionado se a morfologia dos trombos obtidos em camundongos deficientes em MAGP-1 era diferente dos trombos obtidos em camundongos selvagens. Dados iniciais sugeriam que os trombos de camundongos deficientes em MAGP-1 apresentavam ultraestrutura diferente, onde um número maior de plaquetas apresentavam aparentemente, os seus grânulos e corpos densos intactos, sugerindo uma ativação ineficiente na ausência de MAGP-1. No presente trabalho, além de análise ultraestrutural mais detalhada, foram feitos estudos para determinar qual a região da MAGP-1 é responsável pela atividade trombogênica. Neste sentido, proteínas mutadas, truncadas e peptídeos derivados da MAGP-1 foram obtidos e então injetados nos camundongos selvagens e deficientes em MAGP-1. Como resultados, pudemos observar que os trombos dos camundongos selvagens bem como dos camundongos deficientes em MAGP-1 apresentam basicamente a mesma morfologia, levando em consideração as técnicas

utilizadas, microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Em relação ao mapeamento dos domínios, quando utilizada a molécula inteira, seja de camundongo, seja bovina, o tempo normal de oclusão foi reestabelecido. A injeção da forma truncada da região carboxi-terminal foi suficiente para obter este mesmo resultado que está principalmente relacionado a um peptídeo também determinado. O mecanismo pelo qual este peptídeo atua normalizando o tempo de oclusão normal ainda não é conhecido e será objeto de estudos futuros.

Abstract

In the last years, the main purpose of our laboratory has been to clarify the participation of the Microfibril-Associated GlycoProtein-1 (MAGP-1) in forming thrombus in photochemically-induced artery thrombosis model. It was considered that MAGP-1 does not interact directly with platelets, important component in artery thrombosis and probably MAGP-1 is interacting with a molecule which has participation in this process. In this sense, the interaction of the MAGP-1 with important molecules in the thrombus formation was studied. The MAGP-1 has the ability to interact with von Willebrand factor, as well as with fibrinogen and fibronectin. In addition, it was verified that the injection of recombinant MAGP-1 in MAGP-1-deficient mice was able to restore normal time of thrombus formation in these animals. Considering the MAGP-1 absence and its effect on the thrombi formation, it was questioned whether thrombi morphology obtained from MAGP-1-deficient mice was different from thrombi obtained from wild-type mice. Initial data suggested that the thrombi from MAGP-1-deficient mice had different structure, where platelets apparently showed their intact granules and dense bodies, suggesting an inefficient activation in the MAGP-1 absence. In this work, besides the ultra-structural analysis, more detailed studies have been made to determine which region of the MAGP-1 is responsible for the thrombogenic activity. In this sense, truncated proteins, mutated proteins and peptides, were obtained and then injected into MAGP-1-deficient mice to verify their activities. As result, we noticed that the thrombi have similar structure taking into consideration used techniques, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. Furthermore, in relation to MAGP-1 mapping domains studies when we inject recombinant full-length molecule either mice or bovine, the normal time occlusion was restored. The injection of

carboxy-terminal region was enough to get this same result what is mainly related to an also determined peptide. Mechanisms involved in this process are unknown and will be our aim in the future studies.

Introdução

1. Introdução

Aspectos gerais

A capacidade dos componentes da matriz extracelular em desempenhar funções estruturais e informacionais em tecidos de mamíferos está bem descrita. Atualmente, uma das áreas mais ativas da pesquisa biomédica envolve matriz extracelular e o estudo dos mecanismos de sinalização celular através de integrinas e outros receptores de superfície celular interligados com macromoléculas de matriz extracelular. Estes mecanismos de sinalização estão relacionados diretamente com diferenciação, proliferação e migração celular tendo impacto na embriogênese, no reparo tecidual e em uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos, como no desenvolvimento pulmonar, nas doenças vasculares e no câncer (Fauvel-Lafeve, 1999; Ross et al., 1998).

A caracterização bioquímica de proteínas de matriz extracelular apontou a dupla função da Glicoproteína Associada a Microfibrila-1 (MAGP-1). Além da forma encontrada como parte integrante das microfibrilas constituintes das fibras elásticas, a MAGP-1 apresenta uma variante intracelular que pode exercer importantes funções regulatórias na célula. Vários grupos de pesquisa (Weinbaum et al., 2008; Werneck et al., 2008; Davis, 1994; Segade et al., 2002) têm se dedicado em estudar as funções intracelulares e extracelulares da MAGP-1, particularmente como elas estão relacionadas com o desenvolvimento e a manutenção dos tecidos ricos em elastina.

Recentemente, Werneck e colaboradores (2008) utilizaram camundongos deficientes em MAGP-1 para demonstrar que esta molécula, aparentemente, não tem função primordial durante o desenvolvimento de camundongos C57BL/6, já que, na ausência, estes camundongos não

apresentam nenhuma alteração fenotípica evidente, apresentando expectativa de vida e capacidade reprodutiva normais. Porém, quando desafiados em um modelo de trombose arterial, foi verificado que a formação de trombos nestes animais acontece de forma menos eficiente, necessitando do dobro do tempo dos camundongos selvagens (normais).

O presente trabalho nos proporcionou o estudo da participação da MAGP-1 na formação de trombos, estudando sua ultra-estrutura bem como determinar qual região desta proteína possui atividade trombogênica.

Fibras elásticas e MAGP-1

As fibras elásticas são importantes componentes de tecidos que estão sob constante estresse mecânico, como por exemplo, os pulmões, os grandes vasos e a pele. Análises por microscopia eletrônica mostram os dois componentes básicos das fibras elásticas (Figura 1). O primeiro apresenta-se como um material mais eletrodense e amorfo formado pela elastina que está embebido em uma rede de microfilamentos, as microfibrilas, seu segundo componente (Davis, 1994). As microfibrilas apresentam diâmetro de 10-12 μm e têm como componentes majoritários as fibrilinas e as MAGPs (do inglês *Microfibril-Associated GlycoProtein*) (Kielty et al., 2005).

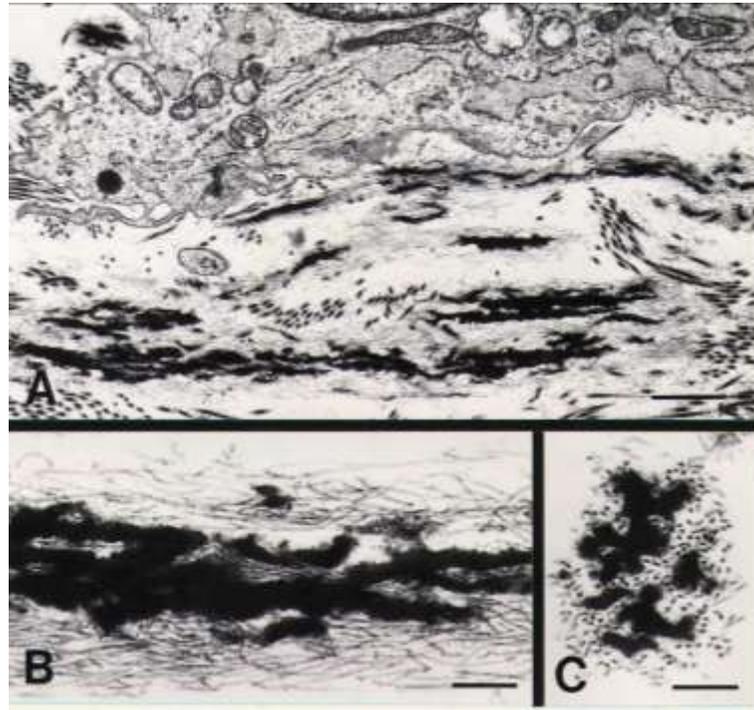


Figura 1: Eletromicrografia da fibra elástica onde pode notar a presença de uma região mais eletrodensa, a elastina, e a rede de microfibrila (B e C). A – visão geral do tecido rico em fibra elástica. B – corte longitudinal da fibra elástica. C – corte transversal da fibra elástica. (Davis, E.C.).

A análise ultraestrutural revela que as microfibrilas assemelham-se a um “**colar de contas**”. Uma das principais funções atribuídas às microfibrilas é participar na formação das fibras elásticas. Durante o desenvolvimento, a rede de microfibrilas funciona como um molde para a deposição apropriada de tropoelastina, para a ação das enzimas lisil oxidases, promovendo as reações cruzadas (de “cross-linking”) entre estes monômeros, formando, então, o polímero insolúvel e amorfo de elastina (Trask et al., 2001). As funções específicas de cada um dos componentes na formação das microfibrilas e das fibras elásticas ainda não são totalmente conhecidas. Mutações no gene da fibrilina 1 estão relacionadas com a Síndrome de Marfan e

resultam em anormalidades no esqueleto ósseo e na formação das paredes dos vasos sanguíneos, que ficam sujeitos à ocorrência de aneurismas e rupturas (Reinhardt et al., 1996).

Mutações no gene da fibrilina 2 levam à aracnodactilia contratural congênita, uma doença autossômica de caráter dominante, que apresenta algumas características em comum com a Síndrome de Marfan (Lee et al., 1991; Gupta et al., 2002).

No que diz respeito as MAGPs, que constitui um outro grupo de proteínas aparentemente importante para a função estrutural das microfibrilas e seu desenvolvimento, sabe-se da ocorrência de isoformas intracelulares que podem desempenhar importante função na sinalização celular. Os dois membros da família das MAGPs, MAGP-1 e 2, apresentam como principal característica, uma sequência de 60 aminoácidos na região carboxi-terminal que foi identificada como sendo o domínio de ligação com a matriz extracelular (Segade et al., 2002). Ao contrário das fibrilinas, que são glicoproteínas de alta massa molecular, as MAGPs apresentam baixa massa molecular (aproximadamente 22 kDa) (Gibson e Cleary, 1987).

O gene da MAGP-1 (*MFAP2*) localizado na região cromossômica 4qD3 murina possui aproximadamente 1037 pb divididos em 9 exons (Chen et al., 1993). A proteína MAGP-1 é formada por 183 aminoácidos (Gibson et al., 1991), e possui dois domínios distintos: a região N-terminal (exon 3 a 6), com características ácidas, é rica em prolina e em resíduos de glutamina. Enquanto a região C-terminal (exon 7 a 9) apresenta todos os 13 resíduos de cisteínas presentes na molécula e carga total líquida positiva em pH fisiológico. Esta região é muito importante na determinação da estrutura terciária e na interação da proteína com outras moléculas presentes nas fibras elásticas, por intermédio da formação de pontes dissulfeto (Prosser et al., 1984).

Embora o significado biológico não seja conhecido, muitos estudos bioquímicos demonstraram que MAGP-1 interage com várias moléculas *in vitro*, dentre elas, fibrilinas 1 e 2 (Werneck et al., 2004; Trask et al., 2000), tropoelastina (Reinhardt et al., 2001), biglican (Reinboth et al., 2002), decorina (Trask et al., 2000), colágeno tipo VI (Brown-Augsburger et al., 1994; Finnis e Gibson, 1997) e Notch 1 (Miyamoto et al., 2006). Até o momento, nenhuma doença foi relacionada à deficiência ou mutações no gene da MAGP-1. Estudos comparativos das sequências de MAGP-1 mostram que é uma proteína altamente conservada, não somente entre os mamíferos, mas também entre vertebrados inferiores (65% de homologia se considerada a molécula toda e 96% se considerada a região C-terminal da proteína de mamífero comparada a do “*Zebrafish*”). Nenhum gene homólogo a MAGP-1 foi encontrado em banco de dados de levedura, mosca ou vermes, sugerindo que MAGP-1 é um gene relativamente novo na escala evolutiva. Na verdade, o aparecimento da MAGP-1 coincide com o aparecimento do gene da elastina (Segade et al., 2002; Sage, 1981), sugerindo que estas proteínas estão relacionadas evolutivamente.

Estudos recentes com “*Zebrafish*” mostraram que MAGP-1 desempenha papel importante na formação de microfibrilas durante a embriogênese e que a expressão de MAGP-1 é crítica para o desenvolvimento vascular. Alterações vasculares aparentemente estão relacionadas com a diminuição da interação integrina/matriz extracelular (Chen et al., 2006), evidenciando a importância da MAGP-1 como proteína capaz de mediar a interação das células com o ambiente externo.

Considerando a distribuição da MAGP-1 nas paredes dos vasos e dados da literatura que sugerem a interação da região C-terminal da MAGP-2, região esta que apresenta alta homologia com a C-terminal da MAGP-1, com o fator de von Willebrand (Penner et al., 2002) os animais

deficientes em MAGP-1 foram desafiados utilizando um modelo de trombose arterial. Neste modelo, a formação de trombos na artéria carótida é iniciada por espécies reativas de oxigênio produzidas pela foto-estimulação do corante (Rosa de Bengala) previamente injetado (He et al., 2002) (Figura 2). O fluxo sanguíneo é medido neste vaso através de uma sonda de ultrassom, até o ponto em que o trombo formado, é volumoso o suficiente para bloquear a carótida, determinando o tempo de oclusão. Nestes experimentos, os animais deficientes em MAGP-1 apresentaram tempo de oclusão maior quando comparados com os animais selvagens. Através de técnicas bioquímicas foi demonstrando que a MAGP-1 é capaz de ligar a fibrinogênio e fator de von Willebrand sugerindo um possível mecanismo de ação através da interação com estas moléculas (Werneck et al., 2008).

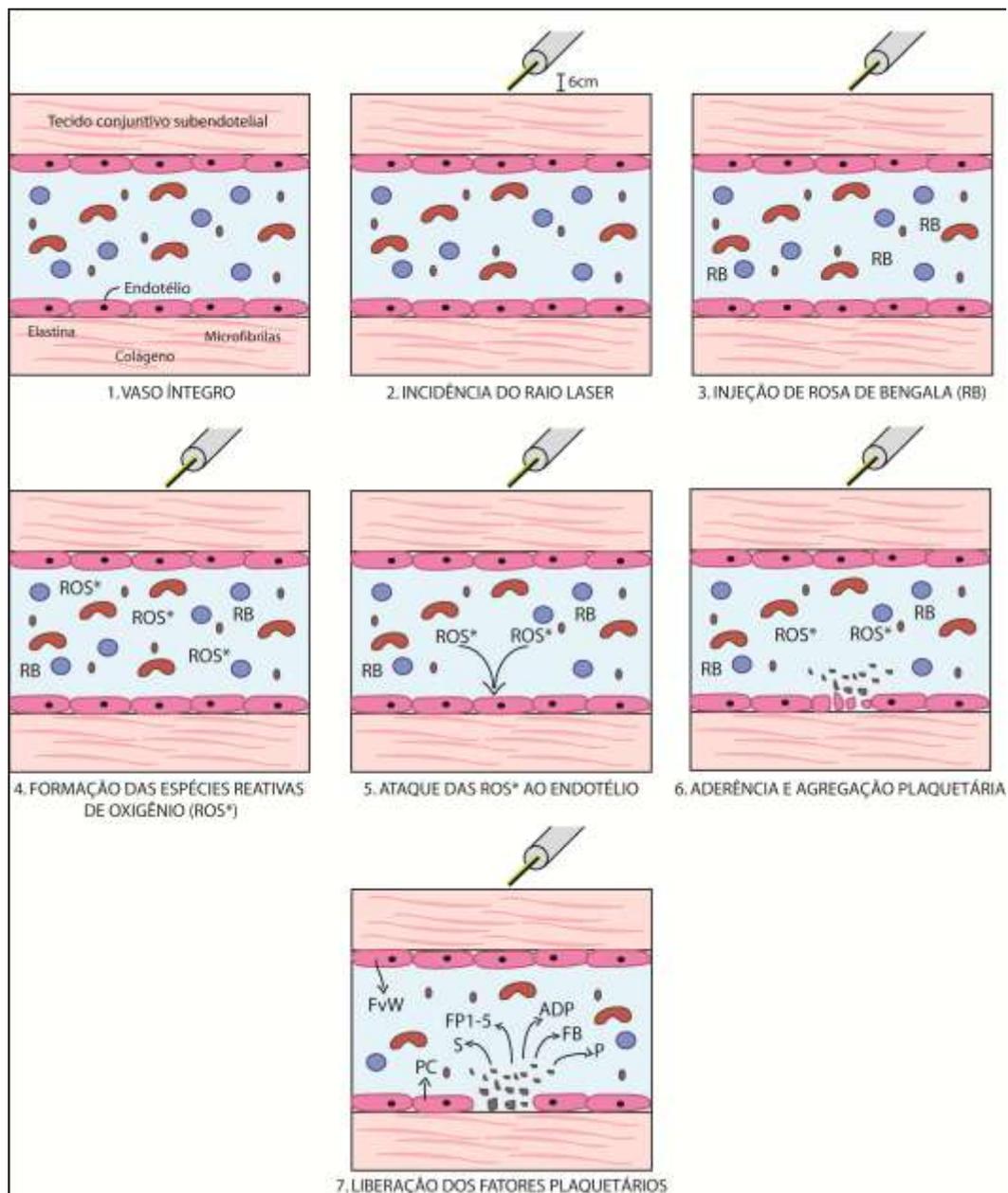


Figura 2: Esquema da lesão endotelial no método fotoquímico. Após o isolamento da carótida a sonda de ultrassom é posicionada e a luz do laser é direcionada para esta região do vaso. Através da veia caudal é injetado o corante (RB) que vai disparar a formação do trombo pela formação das espécies reativas de oxigênio produto da ação do laser sobre o corante. Plaquetas representadas por ; hemácias representadas por ; RB – rosa de bengala; ROS* - espécies reativas de oxigênio ativada; FvW – Fator de von Willebrand; Fb - fibrinogênio P – plaquetas ativadas representadas por .

A injeção de MAGP-1 recombinante antes do ensaio de trombose arterial, recupera o tempo normal de oclusão. Dados de imunolocalização demonstram que a MAGP-1 injetada, se liga na interface do trombo com a parede do vaso e ainda, com menor intensidade, nas outras regiões do trombo, sugerindo que a MAGP-1 está sendo incorporada na estrutura deste (Werneck et al., 2008).

Com a ativação da cascata de coagulação, mais especificamente na via comum da cascata (Figura 3), a trombina atua sobre o fibrinogênio, promovendo a formação da rede de fibrina, que por sua vez, sofre ação do fator XIII da cascata, que é uma transglutaminase. Este fator catalisa a formação de ligações cruzadas compactando a rede de fibrina através de ligações cruzadas. Dados da literatura demonstram que MAGP-1 apresenta sequência consenso característica de substrato para transglutaminases (Brown-Augsburger et al., 1994), podendo desta forma, ser integrada ao trombo.

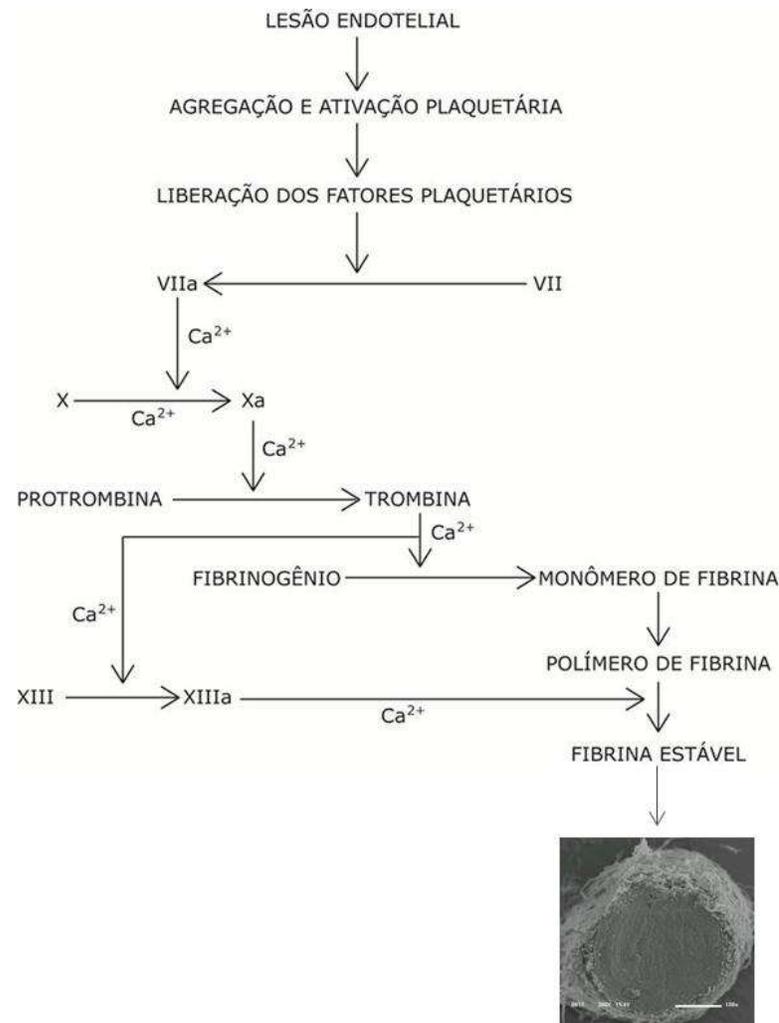


Figura 3: Esquema parcial da via extrínseca da cascata de coagulação até a obtenção do trombo que possibilita a oclusão da luz do vaso.

Trombospondina-1

A hemostasia é a primeira linha do organismo de defesa contra a hemorragia descontrolada. Mas, se levado muito a longe, o processo fisiológico pode obstruir os vasos sanguíneos com trombos e levar a eventos, tais como angina instável e infarto do miocárdio. As plaquetas desempenham um papel fundamental e benéfico na hemostasia, porque elas podem ser

ativadas e serem mobilizadas rapidamente para formar um tampão hemostático. Elas também podem desempenhar um papel deletério quando em contato com as proteínas da matriz subjacente de lesões (Jennings, 2009). Na matriz extracelular encontram-se várias proteínas que participam do processo de hemostase, como por exemplo, fator de von Willebrand, fibrinogênio, trombospondina-1, MAGP-1.

A trombospondina-1, que em humanos tem o gene *THSB-1* responsável pela sua expressão, é uma glicoproteína com múltiplas funções e com múltiplos domínios da matriz extracelular e um dos principais produtos de secreção dos alfa grânulos das plaquetas juntamente com o fator de von Willebrand. Além disso, é secretada por várias células, como as células endoteliais, fibroblastos e células inflamatórias. Apresenta massa molecular de 450 KDa e 1152 aminoácidos dividido em 22 exons (Bornstein et al., 2001) e reside no cromossomo 15 (Bonney et al., 2008 A).

A proteína trombospondina-1 pode ligar-se ao fibrinogênio, fator de Von Willebrand, fibronectina, colágeno do tipo V e integrinas. A trombospondina-1 quando secretada pelas plaquetas vão ligar na superfície da mesma, sendo esta ligação cálcio dependente, modulando o processo de adesão e ativação plaquetária. Está envolvida na angiogênese, inflamação, câncer e cicatrização. Na parede do vaso, é sintetizada pelas células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas (Bonney et al., 2008 A).

A região N-terminal da trombospondina-1, com aproximadamente 200 aminoácidos, caracteriza-se por promover a interação com a membrana da plaqueta ativada, esta região é clivada por várias proteinases como trombina, tripsina, entre outras, além de interagir com fibrinogênio, glicosaminoglicanos, calreticulina. (Bonney et al., 2008 B) Já a região C-terminal apresenta ponte de bissulfeto, é estabilizada com a ligação da trombospondina-1 com o Ca^{2+} e

interage com as integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ das plaquetas, promovendo a aglutinação e agregação plaquetária (Bonney et al., 2008 A).

Jung e colaboradores (1999) descreveram a ação de um peptídeo derivado da trombospondina-1, 4N1k (KRFYVVMWKK), que tem ação na agregação e ativação plaquetária e na fosforilação das proteínas plaquetárias. Uma sequência da região C-terminal da MAGP-1 (RRVYVVNK) apresenta alta homologia com este peptídeo testado, podendo ser a possível via de participação da MAGP-1 no processo de hemostase.

O camundongo deficiente em trombospondina-1 (*Tsp1*^{-/-}) revelou que esta molécula não é estritamente necessária para a hemostase já que estes camundongos não apresentam nenhum problema de sangramento ou hemorragia, embora *in vitro* esta molécula tenha atividade no processo de agregação e ativação plaquetária (Bonney et al, 2008 B). Estes dados podem ser uma indicação de que a trombospondina possa ter uma atividade redundante neste processo onde outras moléculas podem atuar em conjunto ou alternativamente à trombospondina.

Considerando todos estes dados, acreditamos que uma análise morfológica mais detalhada e aprofundada dos trombos obtidos de camundongos deficientes em MAGP-1 pode ser de grande relevância para caracterizar melhor o papel desempenhado por esta molécula na trombose arterial. O objetivo principal deste projeto é estudar e caracterizar o papel da MAGP-1 na trombogênese arterial, fazendo uma análise morfológica dos trombos obtidos a partir de animais selvagens e deficientes em MAGP-1 e ainda determinar qual domínio da MAGP-1 apresenta atividade trombogênica.

Objetivo

2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto é avaliar a importância biológica da MAGP-1 no processo de formação dos trombos e determinar quais são os domínios para a atividade trombogênica.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Análise morfológica dos trombos obtidos de animais selvagens e deficientes em MAGP-1;
- ✓ Análise morfológica comparativa dos trombos formados *in vitro* utilizando plasma de animais selvagens e deficientes em MAGP-1;
- ✓ Verificar se diferentes formas da MAGP-1 (forma mutada e truncada, além dos peptídeos) podem influenciar a formação de trombos *in vivo* podendo desta forma mapear o domínio ativo da MAGP-1 ativo neste processo.

Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1. Materiais

Padrão de peso molecular e azul de bromofenol foram obtidos da Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Cloridrato de cetamina 10% e xilazina 2% foram obtidos da União Química Farmacêutica (Embu-Guaçu, SP, BR). Meio SOC, IPTG, kit miniprep plasmidial e DTT foram obtidos da Invitrogen (Eugene, OR, USA). Metilbisacrilamida, acrilamida, enzima de restrição *Pst* I, GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit e TEMED foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences (Amsterdam, Netherlands). Glicerol, cloreto de cálcio, cloreto de sódio, cloreto de manganês, tris, MOPS, Coomassie Brilliant Blue R, EDTA e tween foram obtidos da USB Corporation (Cleveland, OH, USA). Sal de ampicilina sódica e sulfato de kanamicina foram obtidos da GIBCO (Grand Island, NY, USA). Meio de cultura BHI Agar e BHI foram obtidos da OXOID (Cambridge, UK). Cloreto de rubídio, rosa de bengala, uréia, persulfato de amônio, tubo de celulose para diálise 33 mm x 21 mm e tubo para diálise benzoilado 32 mm x 21 mm foram obtidos pela Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Dihidrogenofosfato de sódio monohidratado, SDS, ácido acético glacial, hidrogenofosfato dissódico dodecahidrato e sacarose foram obtidos da Merck KGaA (Darmstadt, GE). Resina Ni – NTA Agarose foi obtido da Qiagen (Valencia, CA, USA). Acetato de potássio e glicina foram obtidos da Mallinckrodt Chemicals Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Ácido acético glacial, álcool etílico e álcool metílico foram obtidos da LabSynth (Diadema, SP, Brasil). Glutaraldeído, cacodilato, ácido tânico, tetróxido de ósmio, óxido de propileno, resina epon, azul de toluidina e paraformaldeído foram obtidos da Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA). Enzima de restrição *SpH* I foi obtido da

Fermentas Life Sciences (USA). Membrana de PVDF foi obtida da Millipore (EUA). CAPS foi obtido da Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Kit de mutagênese foi obtido da Stratagene (Santa Clara, CA, USA). Filme de raio x, revelador e fixador foram obtidos da Kodak (Waterville, NY, USA).

Animais e bactérias

Em colaboração com os Drs. Richard Pierce e Jeffrey Bonadio (Washington University School of Medicine, USA), o gene da MAGP-1 (*Mfap2*) foi inativado em homozigose usando recombinação homóloga substituindo os exons 3 a 6 (região codificadora para N-terminal) do cromossomo 4qD3 murino por um cassete que confere resistência a neomicina. Desta maneira, foi obtido um camundongo que, na verdade, apresenta uma forma truncada intracelular da MAGP-1 ao invés da completa inativação do gene (Weinbaum et al., 2008). Estes animais são viáveis e têm expectativa de vida normal.

Inicialmente, quando eram misturados geneticamente (sv129/Swiss com C57BL/6) apresentaram várias características fenotípicas, com diferentes frequências entre os animais. Os camundongos deficientes em MAGP-1 (*MAGP-1^{-/-}*) quando comparado a camundongos selvagens C57BL/6 apresentaram alterações no esqueleto ósseo, nos vasos, sendo eles maiores, com paredes mais calibrosas, em função de células musculares lisas hipertrofiadas, além de lamelas elásticas mais espessas. Verificou-se um aumento na deposição de gordura na cavidade peritoneal (Figura 4).

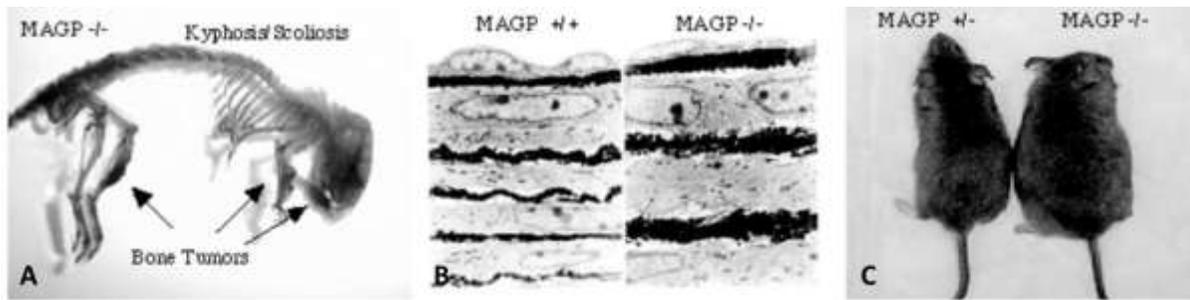


Figura 4: Mudanças fenotípicas apresentadas pelos camundongos deficientes em MAGP-1. A - Manifestações no esqueleto ósseo que inclui cifose, escoliose e osteosarcoma. B - Fenótipo vascular que consiste de vasos maiores, com lamela elástica mais grossa e desorganizada. C - Os camundongos deficientes de MAGP-1 são maiores do que os animais selvagens devido a acúmulo de gordura (Weinbaum et al., 2008).

Os animais foram retro-cruzados com camundongos C57BL/6, por 10 gerações, obtendo-se desta maneira uma linhagem murina mais pura, e estável filogeneticamente e que apresentaram resultados fenotípicos mais homogêneos. Estes animais não apresentaram alterações sugerindo que para esta linhagem de animais, aparentemente, a MAGP-1 não é importante durante o desenvolvimento (Weinbaum et al., 2008).

Os camundongos deficientes em MAGP-1^{-/-} foram cedidos gentilmente pelo Dr. Robert P. Mecham, Washington University School of Medicine (WUSW), Estados Unidos, já os selvagens C57BL/6 foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), UNICAMP. Os ensaios realizados foram sempre com machos com aproximadamente 7-10 semanas de vida. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/IB/UNICAMP) dezembro de 2006, sendo protocolado o número 200606.

As bactérias *Escherichia coli* M15 foram cedidas gentilmente pelo professor Dr. Marcelo Brocchi, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, UNICAMP.

3.2. Métodos

Preparo de Bactérias Competentes

As bactérias competentes foram preparadas pelo método químico com CaCl_2 e RbCl (QIAGEN, 2003). Uma colônia de *E. coli* M15 foi repicada em 10 mL de meio BHI contendo 25 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina e colocada sob agitação constante (225 rpm) por 12-18 horas a 37°C. O volume de 1 mL da cultura pura foi transferido para erlenmeyer, que continha 100 mL de meio BHI contendo 25 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina. Em seguida, foi incubado a 37°C em agitação constante (225 rpm), por aproximadamente 3 h, até atingir uma densidade óptica de 0,6 (leitura a 600 nm). A mesma, foi transferida para tubos estéreis e mantida em banho de gelo por 5 minutos, e posteriormente, foi centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5810 R) a 4000 xG por 5 min a 4°C, na qual foi desprezada o sobrenadante. As bactérias foram ressuspendidas em 30 mL de tampão TFB1 (RbCl 100 mmol/L, MnCl_2 50 mmol/L, acetato de potássio 30 mmol/L, CaCl_2 10 mmol/L, 15% glicerol, pH 5,8) gelado e mantidas por 90 min no banho de gelo. As bactérias foram centrifugadas novamente e o sobrenadante desprezado. Logo, o precipitado de bactérias foi ressuspendido em 4 mL de tampão TFB2 (MOPS 10 mol/L, RbCl 10 mmol/L, CaCl_2 75 mmol/L, 15% glicerol, pH 6,8) gelado. Finalmente, foram distribuídas em alíquotas de 500 μL em tubos de polipropileno estéreis para serem congelados e, em seguida, foi verificada a viabilidade das bactérias, que foram plaqueadas em meio BHI sem kanamicina e meio BHI com kanamicina.

Purificação e obtenção do vetor pQE30 com o inserto MAGP-1 bovina

Para purificação do vetor pQE30-MAGP-1 mini preparações de plasmídios obtidas de cultura de células M15 foram obtidas. Este DNA plasmidial foi tratado com a enzima de restrição *SphI* durante 4 h a 37°C e aplicada em gel de agarose 0,8%. O gel foi fotografado (Imagen Quant 150, GE), as bandas identificadas e cortadas (4397 bp) para logo após serem purificadas utilizando kit específico de acordo com instruções do fabricante (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE). O vetor pQE30-MAGP-1 foi ligado usando a enzima *DNA T4 ligase* e esta amostra foi utilizada para a transformação com células DH5 α ultra competentes para amplificação do vetor. Uma colônia foi colocada em 3 mL de BHI ampicilina e colocada em agitação constante (225 rpm), a 37°C durante 12-18 h. Em seguida foi utilizado um kit para a obtenção do DNA plasmidial (Pure Link Quick Plasmid Miniprep kit, Invitrogen).

Transformação em E. coli M15 competentes e DH5 α super competente

Aproximadamente 2 μ L da reação de ligação foi colocado no fundo de um tubo estéril com 100 μ L da suspensão de bactérias competentes. A mistura foi deixada em repouso em banho de gelo, por 20 min. Os tubos foram então incubados a 42°C por 90 segundos e logo em seguida recolocados no banho de gelo por mais 2 min. Passado esse tempo, foi acrescentado ao conteúdo do tubo 900 μ L de meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 1 mol/L, KCl 0,25 mol/L, MgSO₄ 2 mol/L e glicose 1 mol/L) pré-aquecido. Os mesmos, foram incubados a 37°C, sob agitação constante (225 rpm) por 90 min. As suspensões foram plaqueadas em meio BHI Agar, contendo 25 μ g/mL de kanamicina e 100 μ g/mL de ampicilina quando bactérias do tipo M15 e somente com ampicilina na mesma concentração quando DH5 α . As placas foram

incubadas a 37°C por 12-18 h. Por fim, foi averiguado a expressão das colônias obtidas, por meio do protocolo de expressão em pequena escala, como descrito na metodologia.

Mutagênese sítio dirigida do gene MAGP-1 bovina

A mutagênese foi realizada utilizando o kit de mutagênese sítio-dirigida seguindo as instruções do fabricante (Stratagene). Brevemente, uma amostra de vetor pQE30-MAGP-1 foi utilizada para seguinte reação de PCR, 5 µL de tampão 10x, 2 µL de DNA plasmidial, 2 µL primer reverse 10 mmol/L (tabela 1), 2 µL de primer forward 10 mmol/L (Tabela 1), 1 µL de dNTP mix, 1 µL de *Pfu ultra HF DNA polimerase*, 37 µL de água ultra pura estéril. A reação passou por 1 ciclo 95°C por 30 seg, e 12 ciclos (95°C por 30 seg, 50°C por 1 min, 68°C por 9 min) em um termociclador para as mutações CG3 e CG9. Já as mutações VG2 e VG1 tiveram a temperatura de hibridização ou *annealing* de 60°C (Stratagene Gradient Cycler G5100). Terminado, a amostra foi tratada com 1 µL enzima *Dpn I* por 1 h à 37°C. Todas as mutações aconteceram nos exons 7 a 9, ou seja, na região C-terminal.

Tabela 1: Desenho dos pares de oligonucleotídeos utilizados para a mutagênese.

Nome da sequência (exon 7 a 9)	Aminoácido de origem aminoácido final	Sequência 5'→ 3'
C-G3F	109 a 119	5'-TCCATACACAAGCCC GG CAAGCAGTGTCTCA-3'
C-G3R		5'-TGAGACACTGCTTG CCGGG CCTTGTGTATGGA-3'
V-G2F	127 a 137	5'-GCCGCGTCTACGTC GG CAATAAGGAGATCTG-3'
V-G2R		5'-CAGATCTCCTTATTG CCG ACGTAGACGCGGC-3'
C-G9F	155 a 165	5'-GACAAGTTCTCCA AGGG CGGCGTGCTGGCCA-3'
C-G9R		5'-TGGCCAGCACGCCG CCCT TGGAGAACTTGTC-3'
V-G1R	126 a 137	5'-ATCTCCTTATTG CCGCGC GTAGACGCGGCGGA-3'
V-G1F		5'-TCCGCCGCGTCTACG CGCG CAATAAGGAGAT-3'

* Em destaque a região mutada.

O material foi usado para transformação usando células DH5 α ultra competentes. As colônias obtidas após inoculaçã de placas de BHI ágar com antibiótico foram usadas para inocular meio de cultura líquido para obtenção de DNA plasmidial, por meio do kit (Invitrogen). A mutação foi constatada através de sequenciamento realizado nas seguintes condições: 1 μ L de Big Dye, 1 μ L de primer (Tabela 2), 3 μ L de tampão, 1 μ L de DNA, 4 μ L de água ultra pura. A reação passou por 1 ciclo 96°C por 1 min, 35 ciclos (96°C por 10 seg, 57°C por 6 seg, 60°C por 4

min) em um termociclador. A amostra foi precipitada usando uma variação crescente de etanol e quando finalizada foi enviada para análise no Serviço de Sequenciamento de DNA (SSDNA), Instituto de Química, USP.

A mutação foi confirmada através da análise das sequências (SeqMan) e do pareamento da MAGP-1 bovina com a mutada usando os programas Meg Align (Lasergene, Stratagene) e Chromas Lite e em seguida foi feito o experimento para expressão e purificação de proteína como já mencionado anteriormente.

Tabela 2: Desenho dos oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento.

Nome da sequência	Sequência 5'→3'
bMAGP-1 FWD	TTCCAGTCCCAGCAGCA
t5 FWD	CCCGAAAAGTGCCACCTG
pQEBWD	GGTCATTACTGGATCTATC

Expressão e purificação da proteína 6 His MU MAGP-1 e seus fragmentos e formas mutadas de MAGP-1 bovina

O vetor PQE30 (Qiagen, Valencia, CA) (Figura 5), com as construções corretas, foi utilizado para transformação de cepas de *E. coli* DH5 α e M15 competentes, a fim de amplificar o vetor e expressar as proteínas, respectivamente.

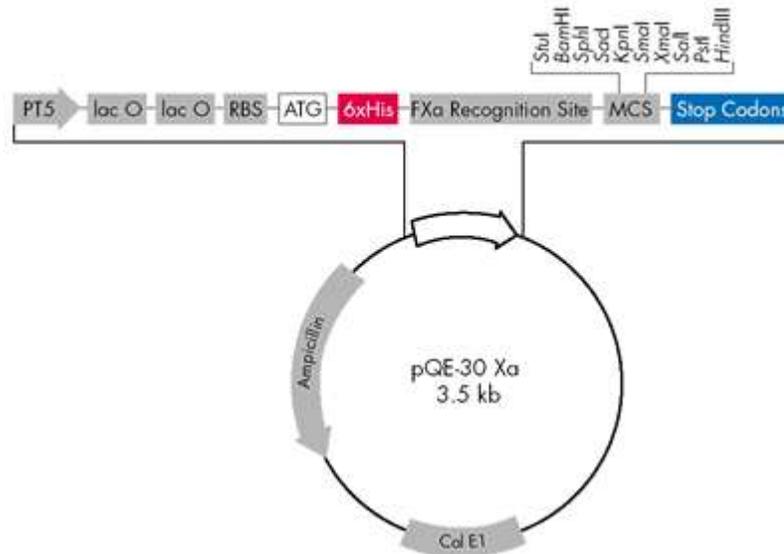


Figura 5: Estrutura do vetor pQE30 da Qiagen (Qiagen, 2003).

Para o processo de mutagênese foi usando o DNA plasmidial de origem bovina, já para as formas truncadas, leia-se região C-terminal e N-terminal, além da forma inteira foi de origem murina e o vetor pQE31, os peptídeos foram sintetizados pelo professor Dr. Eduardo M. Cilli, Instituto de Química, UNESP (Araraquara).

Expressão em pequena escala

Colônias obtidas após transformação foram isoladamente expandidas em 3 mL de meio BHI contendo 25 µg/mL de kanamicina e 100 µg/mL de ampicilina, durante 12-18 h a 37°C sob agitação constante (225 rpm). Posteriormente, estas culturas saturadas foram diluídas 1:20 em 3 mL de meio BHI contendo 25 µg/mL de kanamicina e 100 µg/mL de ampicilina e, seu crescimento foi a 37°C sob agitação constante (225 rpm). Ao atingir a densidade óptica de 0,6

(leitura a 600 nm), foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mmol/L, a fim de induzir a expressão da proteína. Essa indução ocorreu a 37°C, sob agitação constante (225 rpm) durante 4-5 h. Logo, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 4000 xG por 20 min a 4°C. O precipitado foi ressuscitado em 100 µL de tampão de lise e, uma alíquota de 20 µL foi retirada e combinada com 20 µL de tampão de amostra (duas vezes concentrado), fervido por 5 min, e submetidos ao SDS-PAGE. Após a eletroforese, o gel foi corado com azul de Coomassie para visualização das proteínas dos extratos bacterianos, com intuito de verificar quais clones apresentavam alta expressão da proteína de interesse. Por fim, uma colônia foi escolhida para a expressão em larga escala e purificação.

Expressão e purificação em larga escala

Uma das colônias de *E. coli* M15, que continha o inserto, que foi pré-selecionada após ensaio de expressão em pequena escala, foi usada para inocular 10 mL de meio BHI contendo 25 µg/mL de kanamicina e 100 µg/mL de ampicilina, durante 12-18 h a 37°C, sob agitação constante (225 rpm). A cultura saturada foi diluída 1:20 em 200 mL BHI contendo 25 µg/mL de kanamicina e 100 µg/mL de ampicilina e foram crescidas a 37° C sob agitação constante (225 rpm). Ao atingir a densidade óptica de 0,6 (leitura a 600 nm), foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mmol/L, a fim de induzir a expressão da proteína e a cultura foi incubada a 37°C por mais 4 h e 30 min sob constante agitação. As bactérias foram centrifugadas a 4000 xG por 20 min a 4°C e, o precipitado submetido ao processo de purificação. Logo, o precipitado de bactérias obtido após indução e centrifugação, foi ressuscitado em 10 mL de tampão de lise (8 mol/L uréia, 100 mmol/L de NaH₂PO₄, 10 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0) e, mantido a temperatura

ambiente por 2 h sob rotação constante (Homogeneizador de solução AP22 Phoenix). Posteriormente, o extrato bacteriano obtido foi clareado por centrifugação 10000 xG por 30 min, a 4°C e, o sobrenadante resultante foi incubado com 4 mL de resina NTA-Ni-Agarose, o qual permaneceu incubado por 12-18 h, a 4°C, em um tubo, sob rotação constante (Homogeneizador de solução AP22 Phoenix). Após o período de ligação, a resina foi transferida a uma coluna e, posteriormente, lavada com 50 mL de tampão de lavagem (8 mol/L uréia, 100 mmol/L de NaH₂PO₄, 10 mmol/L de Tris-HCl pH 6,3). Após a lavagem, a amostra foi eluída com 20 mL de tampão de eluição (8 mol/L uréia, 100 mmol/L de NaH₂PO₄, 10 mmol/L de Tris-HCl pH 4,5). Todas as etapas da purificação foram monitoradas através de SDS-PAGE (Qiagen, Valencia, CA). A amostra foi dialisada em tubos de diálise (MWCO de 14-16 kDa - Sigma) contra ácido acético 50 mmol/L por 24-48 h (2 L mais 2 L). A amostra foi liofilizada e a proteína obtida ressuspensa em um pequeno volume de ácido acético 50 mmol/L (QIAGEN, 2003). Um pequeno volume desta amostra foi aplicado em um gel SDS PAGE 12,5% para quantificação (Image Quant 150, GE).

Indução e obtenção dos trombos

Com as proteínas obtidas, as mesmas foram injetadas em camundongos selvagens e camundongos deficientes em MAGP-1^{-/-} e o tempo de formação de trombos analisado através do ensaio de indução fotoquímica (tempo de oclusão).

Modelo de Trombose Arterial fotoquímica

O ensaio fotoquímico foi realizado conforme He e colaboradores (2002), onde o camundongo com aproximadamente 20 gr e 8 semanas de vida foi anestesiado com ketamina (30 μ L/ 25 g de camundongo) e xilasina (20 μ L/ 25 g de camundongo), foi pesado e colocado sobre uma superfície na posição de supino. Posteriormente, foi feita uma incisão na média cervical do lado direito, a fim de isolar a artéria carótida comum. Na veia caudal do animal, foi injetado a solução de proteína e, em seguida, uma solução de rosa de Bengala (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) com volume de 120 μ l com concentração de 50 mg/kg de peso corporal, que utilizou uma agulha de 29-gauge. Após tal procedimento, foi aplicado o laser de luz verde a 1,5 mW com 540 nm (Melles Griot 25 LGR), posicionado a uma distância de 6 cm da incisão. O laser permaneceu ligado até a formação do trombo, onde o fluxo foi monitorado por uma sonda de ultra-som (Transonic Flowprobe MAO 5 PSB) e capturado pelo programa DATAQ (Transonic System TS 420). O processo de trombose após a injeção de Rosa de Bengala está relacionado com a formação de espécies reativas de oxigênio a partir da estimulação do corante pela luz do laser, que levam à lesão do endotélio, conforme demonstrado na figura 2 e 6.

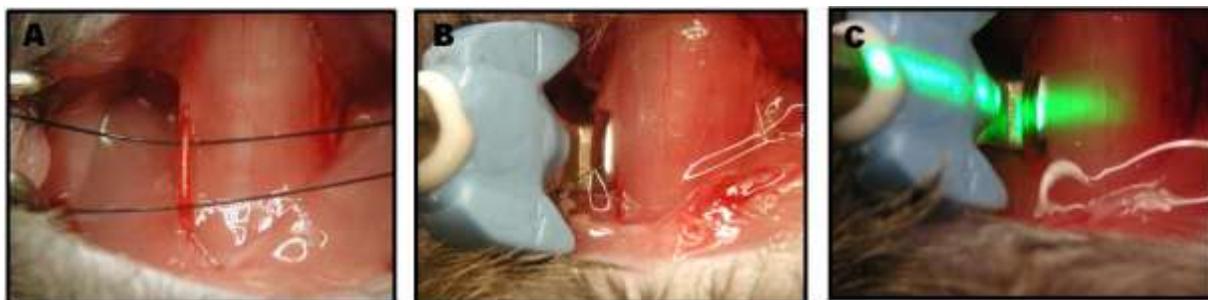


Figura 6: Imagens da cirurgia de indução de trombose arterial. A – isolamento da artéria carótida direita; B – posicionamento da sonda; C – o raio laser incidindo sobre a artéria e a sonda.

Nos ensaios nos quais foram utilizadas frações proteicas murinas (região N-terminal e C-terminal), peptídeos e as proteínas mutadas, as mesmas foram injetadas antes do corante Rosa de Bengala, esperando um intervalo de 15 min entre os mesmos.

Obtenção de trombo

Os trombos foram obtidos por meio do ensaio fotoquímico e, então dissecados, fixados e tratados de acordo com a técnica a ser utilizada posteriormente – como coloração com hematoxilina e eosina e azul de toluidina durante a preparação de corte semi-finos para microscopia de luz. Eles também foram fixados e preparados para microscopia eletrônica de transmissão e varredura (Pinheiro et al., 2005; Feitosa et al., 2006; Veridiano et al., 2007; Rosa et al., 2008).

Histologia

Microscopia de Luz – procedimento e análise

Três animais machos de cada grupo foram submetidos ao ensaio fotoquímico de indução de trombose para verificação do tempo de oclusão e os segmentos dos vasos que possuíam o trombo fossem coletados. Estas amostras foram fixadas de 12-24 h a 4°C com paraformaldeído 4% e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,4. Em seguida, foram lavadas com água destilada por 5 min, por 3 vezes, sendo desidratada com concentrações crescentes de álcool etílico durante 30 min (50-100%).

Após a preparação da resina (resina base + peróxido de benzoila) o processo de infiltração foi realizado. As amostras foram deixadas em uma mistura da resina e álcool etílico 100% na proporção 1:1 durante 3 h sob agitação constante a 4°C e em seguida deixadas por 12 h em um dissecador a vácuo com resina pura. Foram montados os moldes posicionando o material na resina e deixando polimerizar por 3 h em temperatura ambiente. O material foi submetido à microtomia.

Microscopia de varredura – procedimento e análise

Cinco animais machos de cada grupo foram submetidos ao ensaio fotoquímico de obtenção de trombo para verificação do tempo de oclusão e os segmentos dos vasos que possuíam o trombo fossem coletados e fixados com glutaraldeído 2,5%, cacodilato 0,1 mol/L e ácido tânico 0,3% pH 7,4 por um período de 12 h. Após a fixação as amostras foram processadas nas etapas que se seguem. O material foi embebido em soluções com concentrações crescentes de sacarose 0,5-3 mol/L (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0) por 12 h em cada concentração; criofatura em nitrogênio líquido; pós-fixação da amostra em solução de tetróxido de ósmio 1% por 1 h. Posteriormente, foram feitas 3 lavagens de 5 min com água destilada, em seguida foi realizada a desidratação com concentrações crescentes de etanol 50-100% (50; 70; 80; 95; 100). O material foi seco em Ponto Crítico (CPD 030, Balzers) e recoberto com uma película de ouro no Sputter Coat (SCD 050, Balzers) (Veridiano et al. 2007; Rosa et al. 2008). As imagens foram analisadas em microscópio de varredura (ISM 5800 LV, Jeol) do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Instituto de Biologia – Unicamp.

Microscopia de transmissão – procedimento e análise

Três animais machos de cada grupo foram submetidos ao ensaio fotoquímico de obtenção de trombo para determinação do tempo de oclusão e os segmentos do vaso que possuíam o trombo fossem coletados e fixados durante 3 h com glutaraldeído 2%, ácido tânico 0,3% em tampão cacodilato 0,1 mol/L. As amostras foram lavadas em tampão cacodilato de mesma molaridade, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% a 4°C durante 1 h. Em seguida, desidratadas pelo álcool etílico em concentrações crescentes. Os fragmentos de tecidos foram pré-embebidos em mistura de óxido de propileno e resina Epon na proporção de 1:1, 3:1 durante 2 h cada e embebidos em resina Epon 100% *overnight*. As amostras foram então embebidas em resina, mantidas em estufa a 57°C, durante 72 h. Desse material foram obtidos cortes semi-finos (1 µm), para estudo morfológico e análise da área de interesse, corados a quente em solução de 0,5% de Azul de Toluidina. Ainda desse material foram obtidos cortes ultrafinos de 70 nm coletados em grades de cobre e analisados no microscópio eletrônico de transmissão (Pinheiro et al. 2005; Feitosa et al. 2006). Os cortes ultrafinos foram, estudados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906-Zeiss) do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Instituto de Biologia – Unicamp.

Análise Imunoquímico por Western blotting

As amostras foram selecionadas por eletroforese (SDS-PAGE) e as bandas protéicas foram eletro-transferidas utilizando um tampão CAPS 10 mmol/L pH 11, a 60 V por 45 min.

Em seguida, a membrana foi submetida a agitação constante em tampão de bloqueio (5% leite desnatado, 0,01% Tween, PBS), durante 1 h em temperatura ambiente. Logo, foi adicionado o anticorpo primário (RGS His IgG camundongo, Qiagen diluição 1:1000) no tampão de

bloqueio no qual permaneceu em contato *overnight* com a membrana à 4°C sob agitação constante (Cole Parmer 4422).

Depois, a membrana foi lavada com o tampão de bloqueio 3 vezes durante 5 min a temperatura ambiente e, posteriormente, incubada com o anticorpo secundário (ECLTM anti-mouse IgG, GE diluição 1:1000) por uma hora à temperatura ambiente, sob agitação constante.

Por fim, a membrana foi lavada, novamente, com o tampão de bloqueio 3 vezes durante 5 min a temperatura ambiente e, em seguida, com água ultra pura. A membrana foi colocada em contato com as soluções de quimioluminescência e revelada usando filme de raio X (Kurien e Scofield, 2009).

Ensaio in vitro de formação de coágulo

Os ensaios *in vitro* de formação de trombo/coágulo foram realizados segundo Dugan e colaboradores (2006). Brevemente, em um eppendorf de 200 µL foi adicionado 9 µL de fibrinogênio 20 mmol/L, 81 µL de tampão (20 µmol/L de HEPES, 150 mmol/L de NaCl, 0,1% de CHAPS, 5 mmol/L de ácido ε-aminocapróico, 5 mmol/L de CaCl₂ e 20 µmol/L de ZnCl₂, pH 7,4) na presença e ausência de MAGP-1 (100 mg/Kg de animal), e 10 µL de trombina 0,25 U/mL, em seguida, foi incubado por 3 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, foi realizada a fixação onde o trombo foi lavado com 150 µL de cacodilato 50 mmol/L por 10 min por 3 vezes, em seguida foi adicionado cacodilato na mesma concentração com 2% de glutaraldeído. Foi adicionado então o ósmio por 20 min e a amostra foi desidratada com uma série crescente de soluções com diferentes concentrações de etanol. Cada etapa de desidratação teve a duração de 30 min. O material foi seco em Ponto Crítico e banhado

em ouro em Sputter Coat (Dugan et al., 2006). As imagens foram analisadas em microscópio de varredura como já mencionado na metodologia.

Em paralelo, foi feito o ensaio com o plasma do camundongo selvagem e deficiente em MAGP-1 onde foi realizada a coleta do sangue através de punção cardíaca usando 100 μ L de anticoagulante citrato de sódio 3,2% para cada animal. O sangue foi centrifugado a 2300 xG por 10 seg/mL para obtenção do plasma. Em 100 μ L deste plasma foi adicionado diferentes concentrações de proteína MAGP-1 (25, 50, 100 μ g/Kg de animal) e 4 μ L trombina 0,25 U/mL. Após a formação do trombo o material foi lavado com cacodilato 0,1 mol/L por 5 min, por 3 vezes e, em seguida, ficou por 12-24 h com o tampão cacodilato 0,1 mol/L e glutaraldeído 2%, passando assim pelo processo de microscopia transmissão e varredura (Bonneyoy e Legrand, 2000; Pretorius et al., 2007).

3.3. Análise de resultados

Os experimentos realizados com animais teve um n igual a 6 e seus resultados foram apresentados na forma de gráfico. Para a análise estatística foi usado o programa Microsoft Excel e o teste empregado foi *t Student* e Anova. Foram considerados significativamente diferentes os valores com $p < 0,05$. Os experimentos relacionados com histologia teve um número de animais entre 3-5.

Resultados

4. Resultados

4.1. Características morfológicas dos trombos obtidos a partir de camundongo selvagem e deficiente em MAGP-1

Para verificar a estrutura dos trombos, experimentos foram realizados onde os camundongos foram submetidos ao ensaio fotoquímico de trombose arterial e quando atingido o tempo de oclusão do vaso pelo trombo, os animais foram sacrificados e a região da carótida, que contém o trombo, foi dissecada e submetida ao processamento histológico (Figura 7). Como pode ser observado, a análise destes cortes histológicos, não revela nenhuma diferença estrutural entre os trombos dos animais selvagens (MAGP-1^{+/+}) e deficientes em MAGP-1 (MAGP-1^{-/-}). As plaquetas aparentemente se apresentam no mesmo estágio de comprometimento na formação do trombo, estando retidas no agregado plaquetários algumas ainda no seu estágio com presença de grânulos, melhor visualizados figura 7 (painéis C, D, E e F) e figura 8 (painéis E e F).

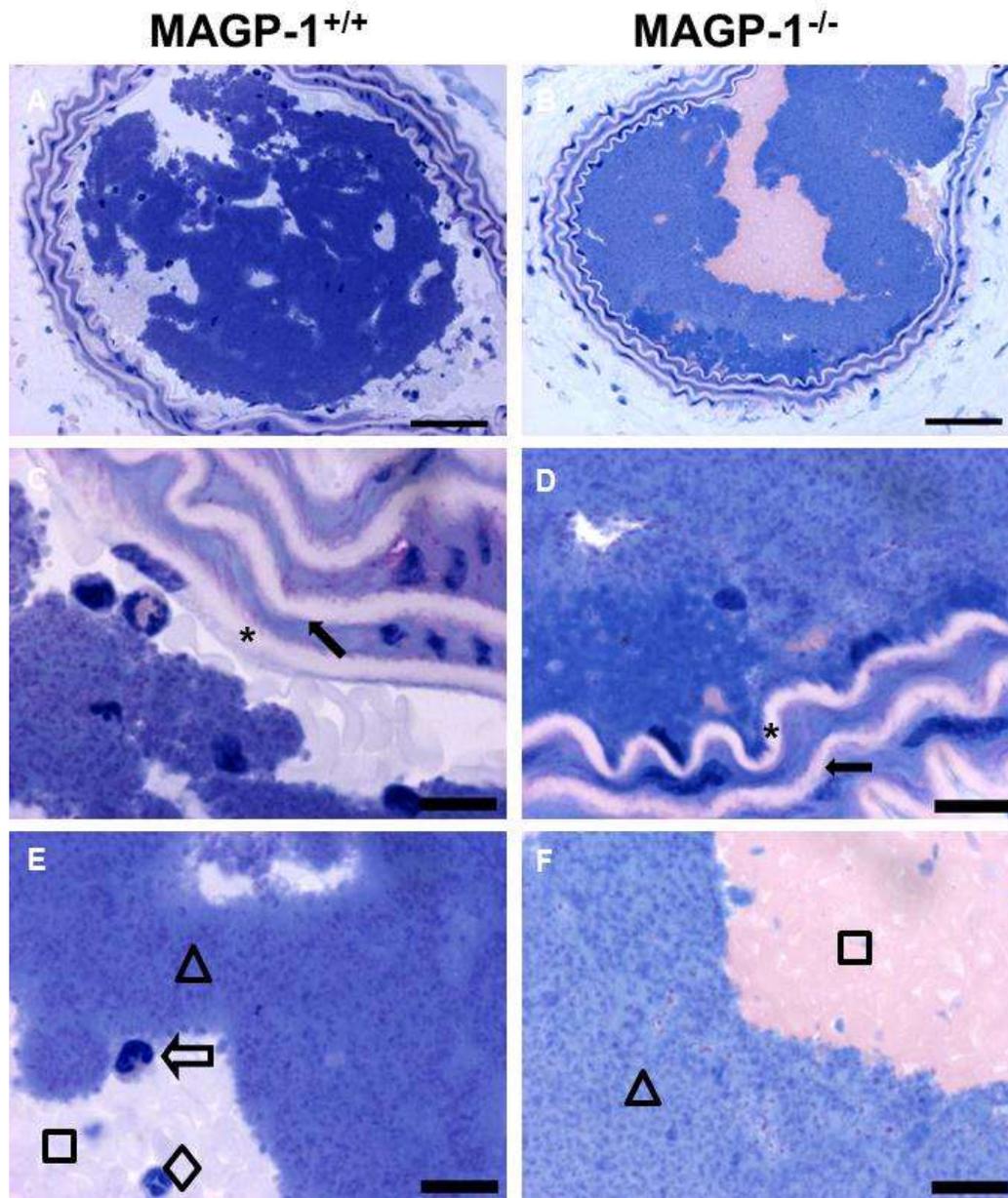


Figura 7: Fotomicrografias de trombos de camundongos selvagens (A, C e E) e deficientes em $MAGP-1^{-/-}$ (B, D e F) obtidos através de ensaio fotoquímico de trombose. A e B - Observe a morfologia típica encontrada nos trombos dentro da artéria carótida. C e D - Note a lâmina elástica interna (asterisco) e a lâmina elástica intacta (seta cheia) presente na túnica média. E e F - Observe a morfologia dos componentes formadores do trombo, como as hemácias (quadrado), plaquetas com grânulos (triângulo), monócito (seta) e neutrófilo (losango). Azul de toluidina. Barras A e B representam 20 μm e barras C, D, E, F = 100 μm .

A análise ultraestrutural realizada confirma os dados de que os trombos obtidos nos camundongos selvagens e deficientes em MAGP-1 aparentam ser semelhantes, sugerindo que os dados iniciais que apontavam diferenças entre eles eram, provavelmente, artefatos criados durante o processamento do tecido ou amostras de trombos representando regiões em diferentes estágios de amadurecimento. Como pode ser visto na figura 8, painéis A e B, as análises foram efetuadas em trombos que preenchiam totalmente a luz do vaso. Estes trombos apresentam estrutura bastante compacta e num aumento maior, nos painéis C e D, é possível ver a participação não somente das plaquetas, mas também de hemácias. Nos painéis E e F, é possível observar as estruturas de armazenamento das plaquetas, os grânulos e corpos densos, que nos dados iniciais se apresentavam diferentes. Aqui, mais uma vez, não foi possível verificar nenhuma diferença neste aspecto seja nos trombos dos animais selvagens, seja nos trombos dos animais deficientes em MAGP-1.

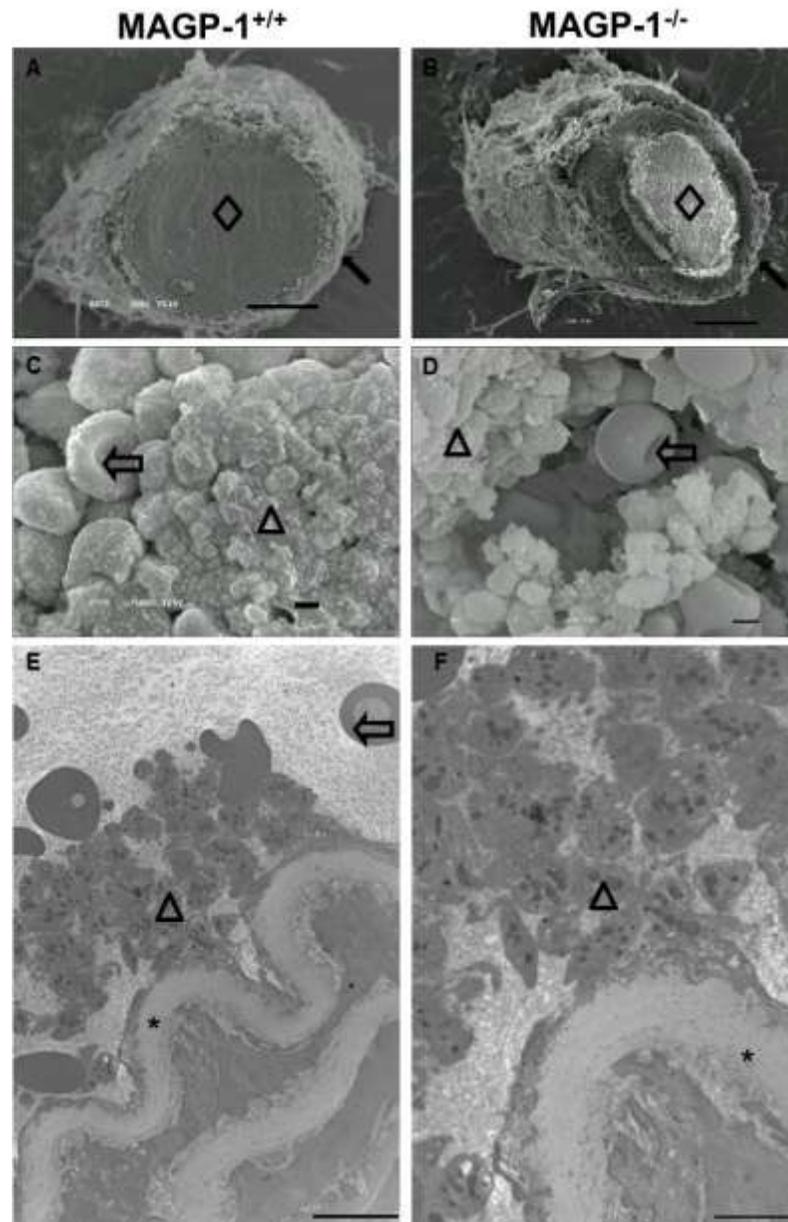


Figura 8: Eletromicrografias de trombos de camundongos selvagens (A, C e E) e deficientes em MAGP-1 (B, D, F) obtidos através de ensaio fotoquímico de trombose. A e B - Observe a morfologia encontrada nos trombos dentro da artéria carótida (losango) bem como a morfologia da parede que constitui a artéria (seta cheia). C e D - Note a morfologia dos componentes formadores do trombo, como as hemácias (seta) e plaquetas (triângulo). E e F - Observe o trombo aderido ao endotélio e próximo à lâmina elástica interna intacta (asterisco), a presença de hemácias (seta) e as plaquetas (triângulo) com grânulos. A, B, C, D = MEV; E, F = MET. Barras A e B representam 100 μm , barras C e D = 1 μm , E e F = 5 μm .

Nossas análises dos trombos formados *in vivo*, de uma maneira geral, sugerem que os trombos obtidos dos dois tipos de animais apresentam estrutura semelhante e que possíveis diferenças entre eles não puderam ser detectadas por estas técnicas. Porém, quando analisamos a estrutura de trombos obtidos em ensaios *in vitro* por adição de trombina ao plasma pobre em plaquetas de camundongos selvagens e deficientes em MAGP-1 (Figura 9), foi observado que a rede de fibrina nos camundongos selvagens apresenta-se de forma rugosa, enquanto que no plasma dos camundongos deficientes em MAGP-1, esta rede de fibrina se apresenta mais lisa. Apesar de interessante, é importante ressaltar que a MAGP-1 não se encontra na forma solúvel no plasma ou nos grânulos plaquetários, logo é pouco provável que esta floculação possa estar associada diretamente a presença de MAGP-1. Novos estudos para identificar o que poderia estar dando este aspecto floculado a rede de fibrina serão necessários.

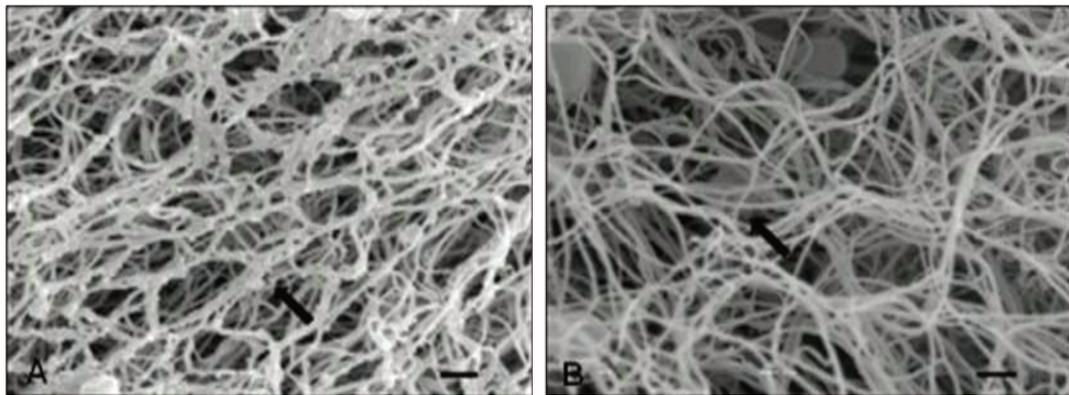


Figura 9: Eletromicrografias de trombos *in vitro* utilizando plasma de camundongo selvagem (A) e deficiente em MAGP-1 (B). Observe a diferença na adesão nas fibrinas do trombo formado (seta). Barras representam 1 μm .

4.2. Mapeamento dos domínios da MAGP-1 importantes na formação do trombo

Como observado anteriormente os resultados obtidos mostraram que a injeção da MAGP-1 recombinante antes do ensaio de trombose arterial resgata o tempo normal de formação do trombo. Um dos principais objetivos deste projeto e da linha de pesquisa desenvolvida em nosso laboratório é a determinação de qual região da MAGP-1 é essencial para a formação de trombo. Para tanto, clonamos em um vetor os éxons 3 a 6 do gene *Mfap2* murino que quando transcrito e traduzido originará a proteína MAGP-1 contendo apenas a região N-terminal. Enquanto que, em outro vetor foram clonados os éxons de 7 a 9 que quando transcritos e traduzidos originará a proteína correspondente a região C-terminal.

Além destas, outras formas foram produzidas por mutações pontuais via mutação sítio dirigida nas regiões exônicas 7 a 9, correspondente a região C-terminal, do gene da MAGP-1 (*Mfap2*) bovino. Estas alterações estão representadas na tabela 3.

Tabela 3: Alterações do gene da MAGP-1 através da mutagênese.

Clones	Alteração base	Aminoácido alterado
C-G9	Timina por guanina	Cisteína 149 Glicina
C-G3	Timina por guanina	Cisteína 103 Glicina
C-G3C-G9	Timina por guanina	Cisteína 103 Glicina e Cisteína 149 Glicina
V-G2	Timina por guanina	Valina 121 Glicina
V-G1	Timina por guanina	Valina 120 Glicina Valina 121 Glicina

As mutações dos resíduos de cisteína tiveram como base o trabalho de Segade e colaboradores (2002) que observaram que mutações em resíduos de cisteína abolem a deposição da MAGP-1 na matriz extracelular em cultura de células. As substituições das duas valinas foram escolhidas pelo fato da MAGP-1 apresentar uma sequência semelhante a sequência encontrada na trombospondina-1 (Tabela 4) que parece ser importante na ativação de plaquetas (Fauvel-Lafeve, 1999). Estas mutações foram obtidas a partir da modificação do vetor pQE30-MAGP-1.

Tabela 4: Sequência dos aminoácidos que apresentam homologia entre MAGP-1 e Trombospondina-1.

Proteína (peptídeo)	Sequência de aminoácido
Trombospondina-1	KRFYVVMWKK
MAGP-1	RRVYVVNK

Obtenção das proteínas recombinantes

Como parte inicial do trabalho para a mutagênese sitio dirigida, foi necessário ter o vetor pQE30-MAGP-1 bovina purificado, já que tínhamos uma preparação junto do vetor pREP4, vetor este que é responsável pela expressão da proteína regulatória repressora do gene *Lac*. A proteína originada a partir da expressão deste vetor liga-se a região operadora do vetor pQE30 inibindo a expressão gênica da MAGP-1 recombinante, permitindo o controle da expressão da proteína de interesse.

Para a purificação do vetor, foi utilizada a enzima de restrição *SphI* que clivou ambos vetores da seguinte forma (Figura 10):

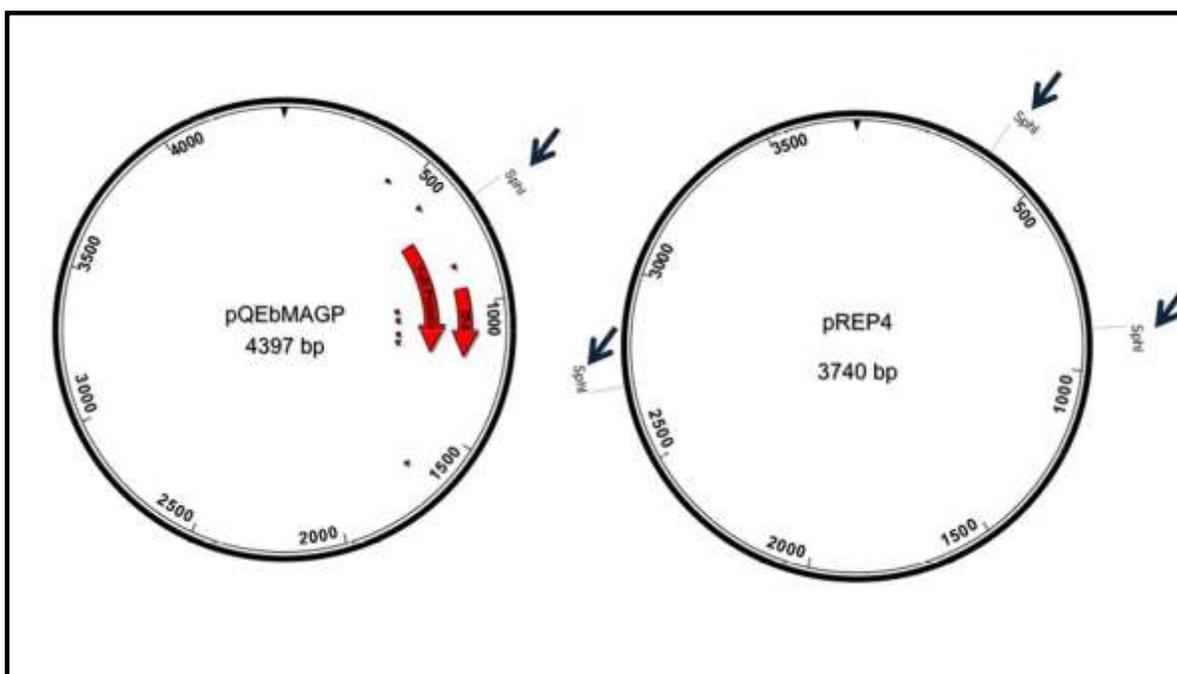


Figura 10: Esquema demonstrando a frequência e os sítios de restrição da enzima *SphI* nos vetores pQE30-MAGP-1 bovina e pREP4. Nas setas estão representadas as regiões onde a enzima de restrição *SphI* atua.

Após tratamento enzimático, a amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose 0,8% e como previsto, foram visualizadas as bandas de diferentes tamanhos. A amostra referente ao pQE30-MAGP-1 bovina (4397 bp) foi cortada e purificada de acordo com as instruções do fabricante do kit específico (GE) (Figura 11A), além das três bandas referentes ao vetor pREP4 (1800 bp, 1427 bp e 530 bp). A confirmação da purificação foi verificada para duas diferentes colônias como visualizado no gel de agarose 0,8%, a banda corresponde 4397 bp (Figura 11B).

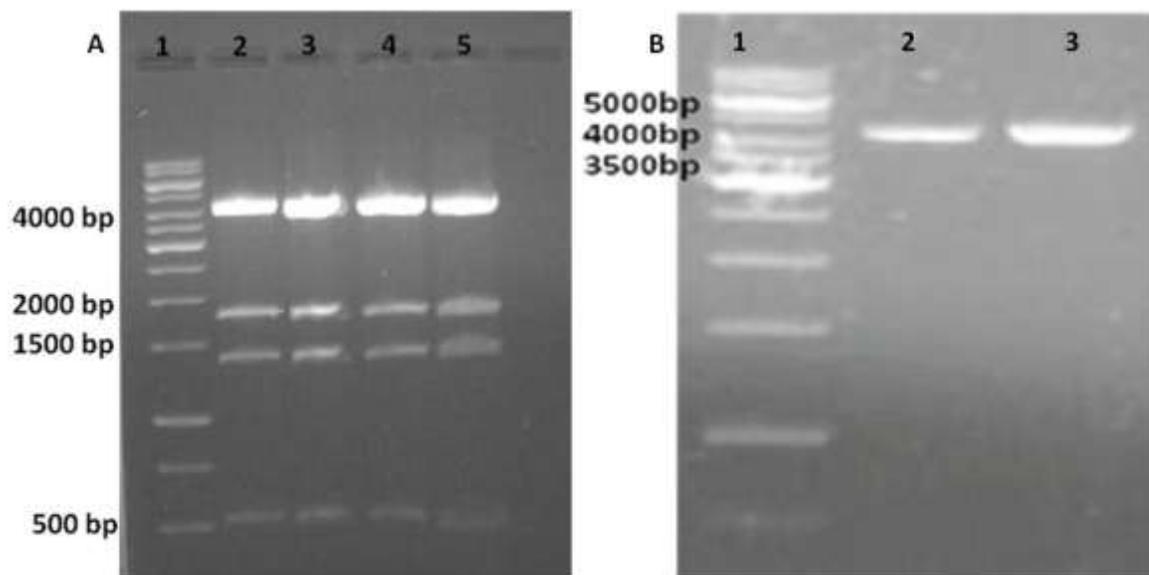


Figura 11: Géis de agarose 0,8% mostrando a purificação do vetor pQE30 com o inserto do gene que codifica a MAGP-1 bovina. A – amostra foi incubada juntamente com a enzima de restrição *SphI* a 37°C durante 2 h. Toda a amostra foi aplicada no gel e foram obtidas as bandas referente a pQE30+MAGP-1 e outras três referentes ao vetor pREP4. Linha 1: padrão de 1 Kb; 2: colônia 1; 3: colônia 2; 4: colônia 3; 5: colônia 4. B – Eletroforese realizada para a confirmação da purificação realizada pelo kit. Linha 1: padrão de 1 Kb; 2: colônia 1; 3: colônia 2.

Este DNA purificado, como demonstrado na figura 11 B, foi tratado com a enzima *DNA T4 ligase* como descrito em materiais e métodos, e parte do volume da reação foi utilizada para transformar células DH5 α . Após choque térmico e período de expressão, as células foram plaqueadas em meio BHI ágar com ampicilina e incubadas por 16 h a 37°C. As colônias obtidas cresceram em meio líquido BHI com ampicilina e preparação de DNA plasmidial foi realizada. Para verificação, o DNA foi tratado com a enzima de restrição *Hind III*. Após o tratamento enzimático, eletroforese em gel de agarose 0,8% foi realizada (Figura 12) onde pode-se verificar a presença do cDNA da MAGP-1 bovina nas 3 colônias testadas. Diante desta confirmação, preparação em larga escala de DNA plasmidial foi realizada com uma das colônias e o DNA obtido utilizado nos ensaios de mutagênese.

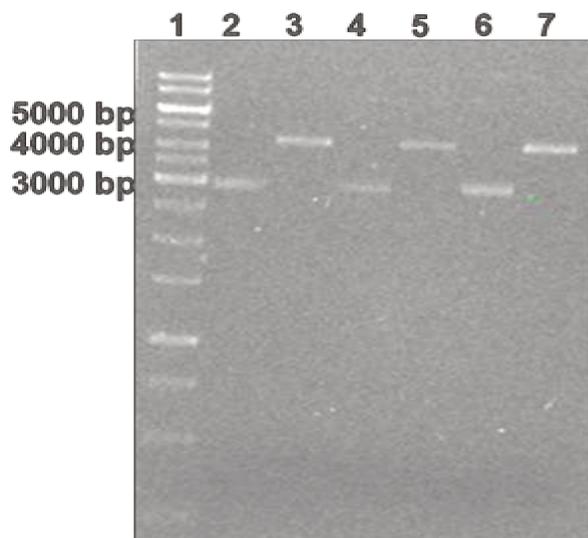


Figura 12: Gel de agarose 0,8%. A MAGP-1 bovina foi obtida através do kit de miniprep plasmidial e em seguida tratada com a enzima *Hind* III. As amostras permaneceram no banho a 37°C durante 2 h em seguida aplicadas no gel. Linha 1: padrão de 1 Kb; 2, 4 e 6: sem corte da enzima de restrição *Hind* III; 3, 5 e 7: com corte da enzima de restrição *Hind* III.

Como mencionado anteriormente, Segade e colaboradores (2002) demonstraram que na região C-terminal da MAGP1 estão presentes todos os 13 resíduos de cisteínas existentes na molécula (Figura 13) e que a mutação de um destes resíduos abole a deposição da MAGP-1 na matriz extracelular, sugerindo que esta região é de extrema importância para a deposição da mesma. Com o intuito de criar mutações em resíduos de cisteínas e verificar se a deposição na matriz extracelular é importante para a sua ação pró-trombótica, pares de oligonucleotídeos foram desenhados e criados CG3F e CG3R, CG9F e CG9R. Com estes oligonucleotídeos, uma mutação pontual foi gerada modificando uma base nitrogenada timina por guanina, na região exônicas 7 a 9, para obter glicina no lugar de cisteína nos resíduos 103 e 149, CG3 e CG9, respectivamente.

MRAASLFLLF LPAFLLAQGQ YDLDP LPPYP DHVQYTHYSE QIENPDYYDY
 PEMTPRPPEE QFQFQSQQQV QQEVIPAPTL EPGTVETEPT EPGPLDCREE
QYPCTRLYSI HKPCKQCLNE VCFYSLRRVY VVNKEICVRT VCAQEELLRA
DLCRDKFSKC GVLASSGLCQ SVAAACARSC GGC

Figura 13: Sequência de aminoácidos da MAGP-1 bovina. Região sublinhada corresponde a região C-terminal (exons 7 a 9). Os resíduos de cisteínas estão em destaque em vermelho, assim como os resíduos com homologia a trombospondina-1 em azul (Chen et al., 1993).

Ainda na porção final da molécula, existe uma sequência com alta homologia com a trombospondina-1. Chung e colaboradores (1997) observaram que o peptídeo da trombospondina-1 tinha a capacidade de ativar agregação plaquetária em ensaios *in vitro* e que esta atividade era abolida pela substituição das duas valinas por glicina. Em nossos estudos, utilizamos os peptídeos derivados da MAGP-1 e da trombospondina-1. Além dos peptídeos, cDNA de MAGP-1 bovina mutantes nesta sequência foram criadas. Para efetuar as mutações nesta região C-terminal foram utilizados os pares de oligonucleotídeos VG1F e VG1R, VG2F e VG2R, que leva a substituição de uma base nitrogenada timina por guanina, promovendo a substituição de valina por glicina.

As mutações foram confirmadas através da análise do sequenciamento de DNA obtido após preparações em pequena escala de DNA plasmidial. As cinco mutações desejadas, foram obtidas, e na figura 14 estão representadas algumas delas. Após confirmação da mutação, células M15 foram transformadas para expressão das proteínas alteradas. Após expressão, as proteínas foram extraídas e purificadas como descrito em Materiais e Métodos, e, como exemplo, mostramos os dados da expressão e purificação em diferentes estágios para a mutação CG9.

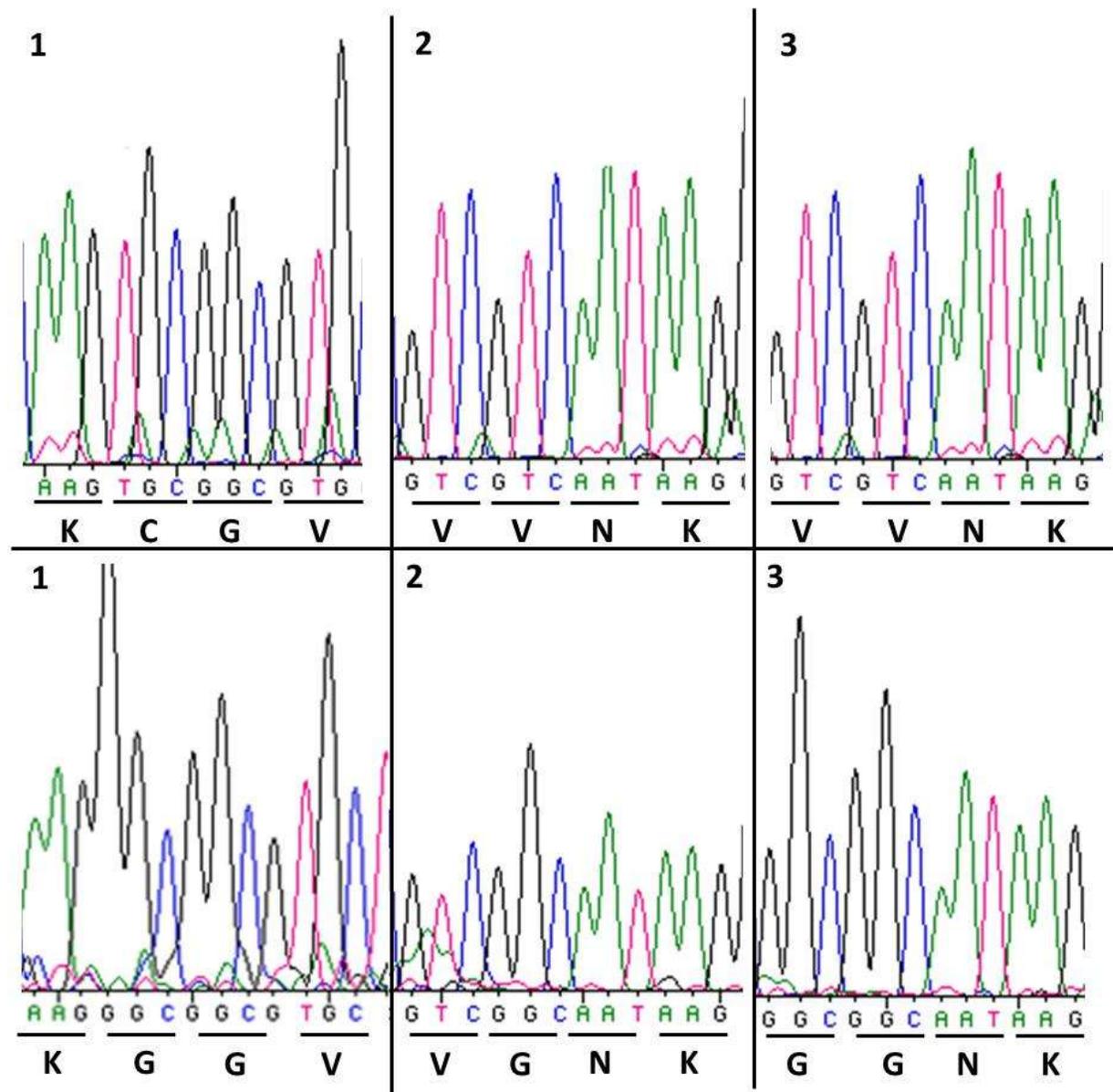


Figura 14: Resultado do sequenciamento da MAGP-1 bovina. Na figura estão representadas as sequências de pares de bases (colorido) e a sequência de aminoácidos (preto). Estão representadas as alterações de uma timina por uma guanina, sendo que em 1 - CG9 observamos uma alteração de cisteína para glicina, assim como nos casos 2 - VG1 e 3 - VG2 que houve alteração de uma valina por uma glicina. A imagem superior é referente a sequência bovina original e a inferior com a sequência mutada. 1 – mutação do resíduo de cisteína número 149 por uma glicina CG9; 2 – mutação do resíduo de valina número 121 por uma glicina VG2; 3 – mutação do resíduo de valina número 120 por uma glicina VG1.

A expressão da proteína foi obtida primeiramente em pequena escala e analisada em eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 15). Como descrito em materiais e métodos, para induzir a expressão da proteína foi utilizado IPTG 1 mmol/L (linha 2, Figura 15), sendo este o indutor da transcrição gênica. Como controle da indução utilizamos uma alíquota de células que não foram induzidas com IPTG (linha 3, Figura 15). Após o período de indução, purificação com a resina Ni-NTA foi realizada (linha 4, Figura 15). A amostra foi ainda submetida a Western blot (imuno blot) utilizando anticorpo anti-MAGP-1 para confirmar a sua identidade (linha 5, Figura 15). A colônia que apresentou maior nível de expressão recuperável de MAGP-1 foi utilizada em uma preparação em larga escala para obtenção de proteínas visando sua utilização nos ensaios de trombose arterial.

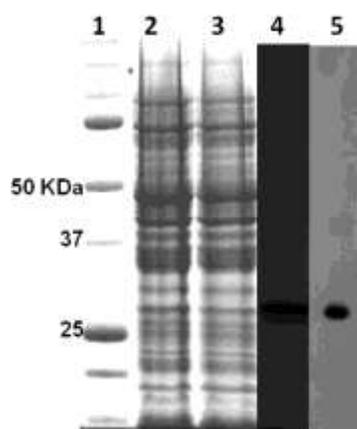


Figura 15: Gel de poliacrilamida com SDS 12,5% e Western blotting mostrando as etapas de obtenção e purificação das proteínas obtidas das células transformadas com o vetor pQE30-MAGP-1 mutada no resíduo 149 (CG9). Após transformação, quatro colônias foram induzidas com IPTG e as proteínas foram então purificadas. Linha 1: padrão de peso molecular; 2: Extrato protéico da colônia induzida com IPTG; 3: Extrato protéico da colônia não induzida com IPTG; 4: Proteína purificada com a resina Ni-NTA, 5: Western blot usando anticorpo anti-MAGP-1. Linhas 2-4 coradas com Azul de Coomassie.

Além das proteínas mutadas, também produzimos as proteínas, desta vez de origem murina, nas suas formas truncadas. Neste sentido, utilizamos vetores pQE31-MAGP1 inteira, pQE31-MAGP-1 Exon 3 a 6 (região N-terminal) e pQE31-MAGP-1 Exon 7 a 9 (região C-terminal) gentilmente cedidos por um de nossos colaboradores, Dr Robert P. Mecham. O processo de transformação, expressão e purificação das proteínas foi basicamente o mesmo utilizado na obtenção das formas alteradas e assim como apresentamos os passos de purificação para a mutação CG9, fazemos o mesmo para a região C-terminal (MAGP1 Exon 7 a 9) (Figura 16).

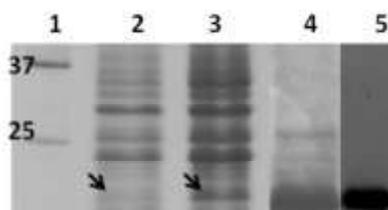


Figura 16: Gel de poliacrilamida com SDS 12,5% e Western blotting mostrando as etapas de obtenção e purificação das proteínas obtidas das células transformadas com o vetor pQE31-MAGP-1 Exon 7 a 9. Após transformação, quatro colônias foram induzidas com IPTG e as proteínas foram extraídas e purificadas. Linha 1: padrão de peso molecular; 2: Extrato protéico da colônia não induzida com IPTG; 3: Extrato protéico da colônia induzida com IPTG; 4: Proteína purificada com a resina Ni-NTA, 5: Western blot usando anticorpo anti-6His. Linhas 2-4 coradas com Azul de Coomassie. As setas indicam a banda correspondente a proteína a ser purificada.

A partir da obtenção de todos os reagentes necessários, as proteínas mutadas, truncadas e os peptídeos, iniciamos os testes *in vivo* de trombose arterial. Na figura 17 é possível observar a importância da proteína em questão, que mesmo a níveis reduzidos, animais heterozigotos, determina um tempo de oclusão médio entre os camundongos sem MAGP-1 e os selvagens. A injeção de MAGP-1 bovina recombinante leva a restauração do tempo normal de formação de

trombo. Em camundongos deficientes em MAGP1, quando foi utilizada a concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, o tempo de oclusão normal encontrado nos camundongos selvagens foi obtido (Figura 18).

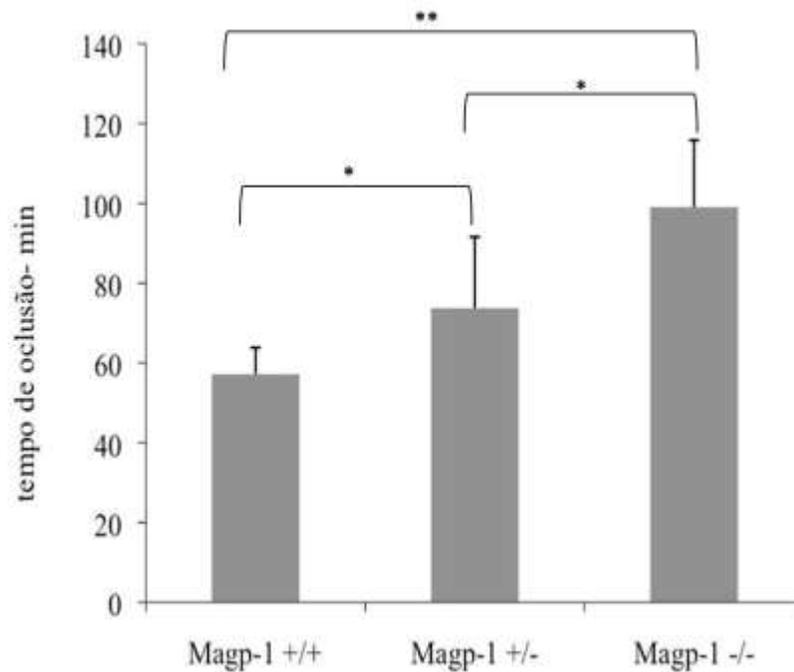


Figura 17: Tempo de oclusão da artéria carótida comum em camundongos selvagem e deficiente em MAGP-1. O ensaio de trombose arterial foi realizado como descrito em materiais e métodos em camundongos selvagens ($\text{Magp-1}^{+/+}$), heterozigotos ($\text{Magp-1}^{+/-}$) e homozigotos ($\text{Magp-1}^{-/-}$) para a expressão de MAGP-1. Tempo 0 = injeção do Rosa de Bengala. Tempo de oclusão - tempo necessário para o trombo levar a obstrução da artéria carótida (fluxo sanguíneo igual a zero). Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados, onde na figura * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ em relação ao controle (teste t -student).

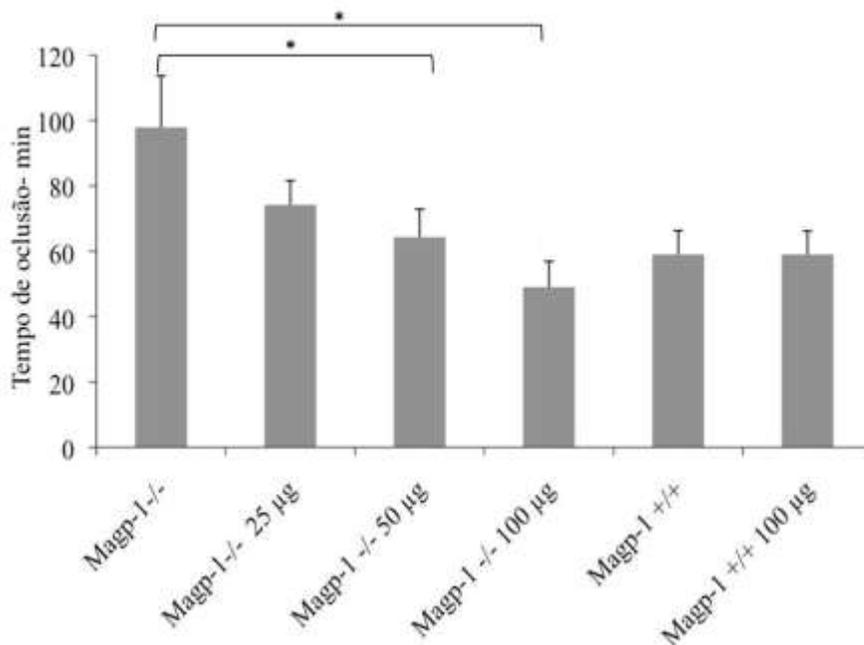


Figura 18: Tempo de oclusão da artéria carótida comum em camundongos selvagem e deficiente em MAGP-1 após injeção de MAGP-1 bovina recombinante. O ensaio de trombose arterial foi realizado como descrito em materiais e métodos em camundongos selvagens ($Magp-1^{+/+}$) e deficientes em MAGP-1 ($Magp-1^{-/-}$), porém 15 min antes de injetar o rosa de Bengala, diferentes concentrações de MAGP-1 bovina recombinante foram injetadas (25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ peso de animal). Tempo 0 = injeção do Rosa de Bengala. Tempo de oclusão - tempo necessário para o trombo levar a obstrução da artéria carótida (fluxo sanguíneo igual a zero). Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados, onde na figura * $p < 0,05$ em relação ao controle (teste t -student).

Durante estes estudos, a MAGP-1 recombinante utilizada foi a bovina. Para investigar se a MAGP-1 murina era mais ou menos ativa do que a bovina, levando em consideração algum tipo de inter-especificidade, a MAGP-1 murina foi clonada, expressa e purificada. Nos ensaios *in vivo* de formação de trombos (Figura 19A), o perfil de atividade na recuperação do tempo de oclusão normal de formação dos trombos foi muito semelhante ao obtido com a MAGP-1 bovina. A concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso foi a que mais se aproximou do tempo oclusão normal,

enquanto que 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso ficou abaixo do tempo normal, assim como observado para a MAGP-1 bovina, enquanto no selvagem não foi observado alteração significativa (Figura 19B).

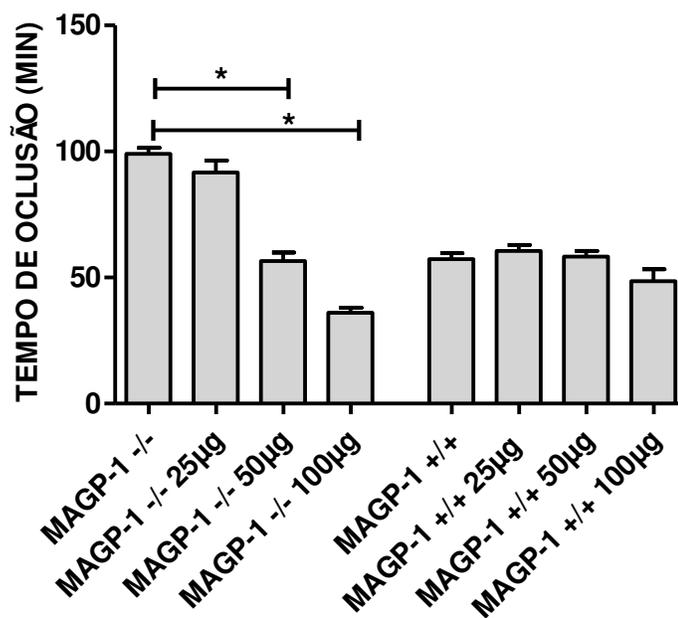


Figura 19: Tempo de oclusão da artéria carótida comum em camundongos deficiente em MAGP-1 e selvagem após injeção de MAGP-1 murina recombinante. O ensaio de trombose arterial foi realizado como descrito em materiais e métodos em camundongos selvagens ($\text{Magp-1}^{+/+}$) e deficientes em MAGP-1 ($\text{Magp-1}^{-/-}$), porém 15 min antes de injetar o rosa de Bengala, diferentes concentrações de MAGP-1 murina recombinante foram injetadas (25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ peso de animal). Tempo 0 = injeção do Rosa de Bengala. Tempo de oclusão - tempo necessário para o trombo levar a obstrução da artéria carótida (fluxo sanguíneo igual a zero). Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados, onde na figura * $p < 0,05$ em relação ao controle (teste Anova).

Uma vez obtidos os dados para a MAGP-1 murina, formas truncadas foram obtidas e purificadas e os dados obtidos com a região C-terminal estão apresentados logo abaixo (Figura 20). A concentração utilizada foi de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso. Os dados sugerem que esta região é importante para o resgate do tempo normal de formação de trombos, já que o tempo obtido com a

região C-terminal (MmMAGP1CT) foi semelhante ao encontrado com a molécula integra (MmMAGP1).

Esta região C-terminal não foi efetiva em alterar o tempo de oclusão dos camundongos selvagens como pode ser visto na figura 20. Segade e colaboradores (2002) utilizando cultura de células, demonstraram que esta região é importante para a deposição desta molécula na matriz extracelular, a qual foi denominada MBD (do inglês *Matrix Binding Domain*). No presente trabalho, os dados sugerem que esta região também é importante para a atividade pró-trombótica da MAGP-1, favorecendo a formação de trombos em tempo normal.

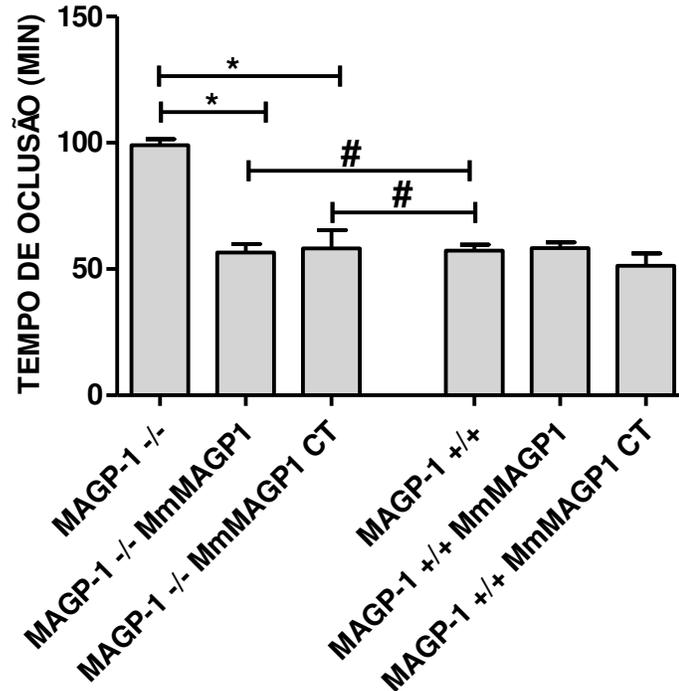


Figura 20: Tempo de oclusão da artéria carótida comum em camundongos selvagem e deficiente em MAGP-1 após injeção da região C-terminal da MAGP-1 murina recombinante (*Mus musculus*). O ensaio de trombose arterial foi realizado como descrito em materiais e métodos em camundongos selvagens (*Magp-1^{+/+}*) e deficientes em MAGP-1 (*Magp-1^{-/-}*), porém 15 min antes de injetar o rosa de Bengala, a região C-terminal da MAGP-1 murina recombinante foi injetada (50 µg/kg de peso). Tempo 0 = injeção do Rosa de Bengala. Tempo de oclusão - tempo necessário para o trombo levar a obstrução da artéria carótida (fluxo sanguíneo igual a zero). *Magp-1^{-/-}* - animal deficiente em MAGP-1; *Magp-1^{-/-} MmMagp-1* - animal deficiente em MAGP-1 no qual foi injetado a proteína *Magp-1* murina inteira; *Magp-1^{-/-} MmMagp-1CT* - animal deficiente em MAGP-1 no qual foi injetado a região C-terminal da proteína *Magp-1* murina; *Magp-1^{+/+}* - animal selvagem; *Magp-1^{+/+} MmMagp-1* - animal selvagem no qual foi injetado a proteína *Magp-1* murina inteira; *Magp-1^{+/+} MmMagp-1CT* - animal selvagem no qual foi injetado a região C-terminal da proteína *Magp-1* murina. Os resultados foram representados como média ± desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados, onde na figura * $p < 0,05$ em relação ao controle e # $p > 0,9$ (teste Anova).

Com a obtenção do resultado acima, houve um interesse maior em verificar os resultados das proteínas mutadas na região C-terminal assim como os peptídeos derivados da mesma. As proteínas mutadas obtidas apresentam modificação genética em quatro pontos, dois em cisteínas e duas em valinas.

Sendo assim, a proteína com alteração na cisteína foi injetada e observamos que não houve o resgate do tempo de oclusão (Figura 21) *in vivo*. Este resultado mais os dados de Segade e colaboradores (2002) que determinou a importância dos resíduos de cisteína da deposição da MAGP-1 na matriz extracelular sugerem que esta deposição é importante para a atividade trombogênica da mesma.

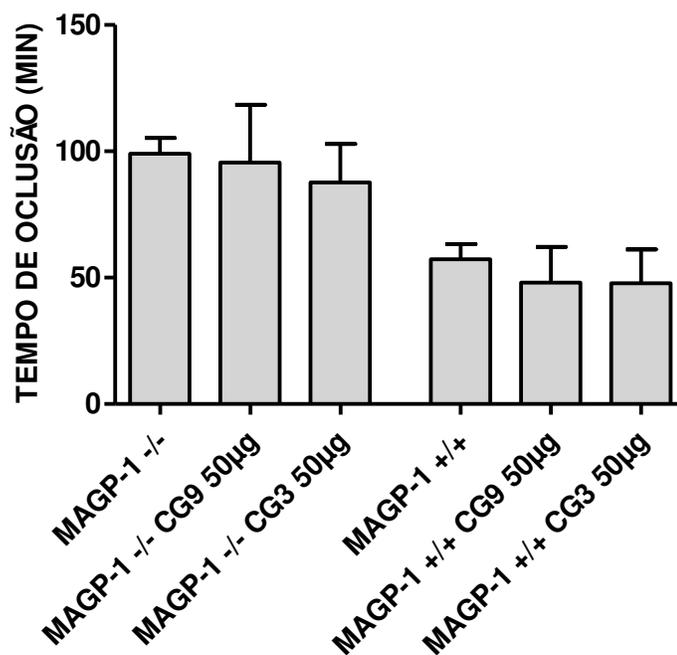


Figura 21: Tempo de oclusão da artéria carótida comum em camundongos selvagem e deficiente em MAGP1 após injeção da proteína MAGP-1 bovina alterada CG3 (A) e CG9 (B). O ensaio de trombose arterial foi realizado como descrito em materiais e métodos em camundongos selvagens ($Magp-1^{+/+}$) e deficientes em MAGP-1 ($Magp-1^{-/-}$), porém 15 min antes de injetar o rosa de Bengala, a proteína MAGP-1 bovina alterada foi injetada (50 µg/kg de peso). Tempo 0 = injeção do Rosa de Bengala. Tempo de oclusão - tempo necessário para o trombo levar a obstrução da artéria carótida (fluxo sanguíneo igual a zero). $Magp-1^{-/-}$ - animal deficiente em MAGP-1; $Magp-1^{-/-}$ CG9 – animal deficiente em MAGP-1 no qual foi injetado a proteína CG9 bovina mutada no resíduo número 149; $Magp-1^{-/-}$ CG3 – animal deficiente em MAGP-1 no qual foi injetado a proteína CG3 bovina mutada no resíduo número 103; $MAGP-1^{+/+}$ - animal selvagem; $Magp-1^{+/+}$ CG9 – animal selvagem no qual foi injetado a proteína CG9 bovina mutada no resíduo número 149; $Magp-1^{+/+}$ CG3 – animal selvagem no qual foi injetado a proteína CG3 bovina mutada no resíduo número 103. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados, onde na figura * $p < 0,05$ em relação ao controle (teste Anova).

Análise da sequência de aminoácidos da MAGP-1, nos permitiu identificar um peptídeo com homologia ao peptídeo 4N1k da trombospondina-1. Este peptídeo tem a capacidade de ativar a agregação de plaquetas como mostrado por Chung e colaboradores (1999). Para verificar se este peptídeo da MAGP-1 era ativo no processo de formação de trombos, ele foi sintetizado e

utilizado no ensaio de trombose arterial (Tabela 5). Os dados obtidos estão apresentados na figura 23.

Tabela 5: Sequência dos aminoácidos que apresentam homologia entre MAGP-1 e Trombospondina-1 e seus respectivos controles.

Proteína (peptídeo)	Sequência de aminoácido
Trombospondina-1	KRFYVVMWKK
Trombospondina-1 controle	KRFYGGMWKK
MAGP-1	RRVYVVNK
MAGP-1 controle	RRVYGGNK

Como pode ser visto na figura 22, este peptídeo demonstrou ter atividade pró-trombótica, resgatando o tempo de normal de oclusão nos animais deficientes em MAGP-1, porém, muito embora estatisticamente não sejam diferentes dos valores obtidos para os animais selvagens, existe uma tendência destes valores serem um pouco mais altos, sugerindo que esta região não contenha todos os resíduos necessários a atividade.

Os dados sugerem que este peptídeo presente na MAGP-1 é ativo no processo de formação de trombos arteriais, diminuindo o tempo de formação destes nos animais deficientes em MAGP-1. O peptídeo controle, muito embora menos ativo, ainda demonstrou atividade diminuindo também o tempo de formação de trombos, mas não na mesma magnitude do peptídeo original.

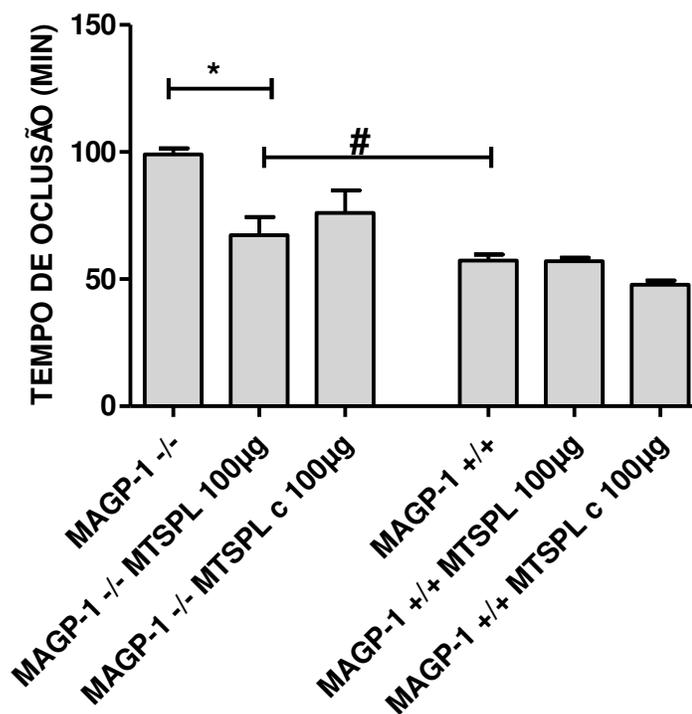


Figura 22: Tempo de oclusão da artéria carótida comum do camundongo selvagem e deficiente em MAGP-1 previamente injetados com o peptídeo MTSPc (do Inglês Magp-1 ThromboSPondina-Like peptide). O ensaio de trombose arterial foi realizado como descrito em materiais e métodos, porém 15 min antes da injeção do Rosa de Bengala, os peptídeos foram injetados na dose de 100 µg/kg de peso corporal dos camundongos. Tempo 0 = injeção do Rosa de Bengala. Tempo de oclusão - tempo necessário para o trombo levar a obstrução da artéria carótida (fluxo sanguíneo igual a zero). Magp-1^{-/-} - animal deficiente em MAGP-1; Magp-1^{-/-} MTSPc - animal deficiente em MAGP-1 no qual foi injetado o peptídeo Magp-1 controle; Magp-1^{-/-} MTSPc - animal deficiente no qual foi injetado o peptídeo Magp-1; Magp-1^{+/+} - animal selvagem; Magp-1^{+/+} MTSPc - animal selvagem no qual foi injetado o peptídeo Magp-1 controle; Magp-1^{+/+} MTSPc - animal selvagem no qual foi injetado o peptídeo Magp-1. Os resultados foram representados como média ± desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados, onde na figura * p < 0,05 e # p > 0,9 em relação ao controle (teste Anova).

Em contrapartida, foi sintetizado o peptídeo trombospondina-1 para verificar o efeito que este teria nos camundongos deficientes em MAGP-1 e nos animais selvagens. O resultado observado foi que o peptídeo derivado da trombospondina-1 também é efetivo em resgatar o

tempo de oclusão nos camundongos deficientes em MAGP-1 e também reduz o tempo de oclusão nos camundongos selvagens (Figura 23).

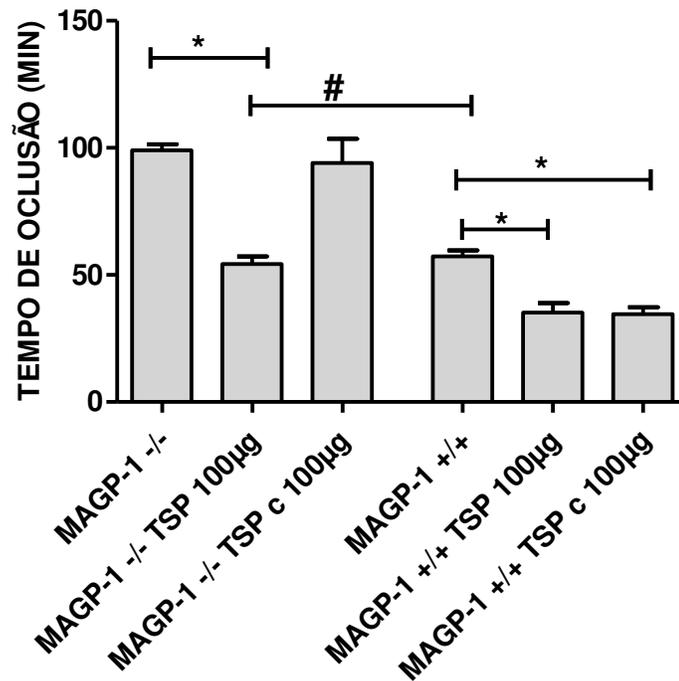


Figura 23: Tempo de oclusão da artéria carótida comum do camundongo selvagem e deficiente em MAGP-1 previamente injetados com o peptídeo derivado da trombospondina-1. O ensaio de trombose arterial foi realizado como descrito em materiais e métodos, porém 15 min antes da injeção do Rosa de Bengala, os peptídeos foram injetados na dose de 100 µg/kg de peso corporal dos camundongos. Tempo 0 = injeção do Rosa de Bengala. Tempo de oclusão - tempo necessário para o trombo levar a obstrução da artéria carótida (fluxo sanguíneo igual a zero). $Magp1^{-/-}$ - animal deficiente em MAGP-1; $Magp1^{-/-}$ TSPc – animal deficiente em MAGP-1 no qual foi injetado o peptídeo trombospondina-1 controle; $Magp1^{-/-}$ TSP – animal deficiente em MAGP-1 no qual foi injetado o peptídeo trombospondina-1; $Magp1^{+/+}$ - animal selvagem; $Magp1^{+/+}$ TSPc – animal selvagem no qual foi injetado o peptídeo trombospondina-1 controle; $Magp1^{+/+}$ TSP – animal selvagem no qual foi injetado o peptídeo trombospondina-1. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão de 6 experimentos independentes realizados, onde na figura * $p < 0,05$ e # $p > 0,9$ em relação ao controle (teste Anova).

Discussão

5. Discussão

Após a lesão na parede do vaso sanguíneo, as plaquetas e os componentes da via de coagulação interagem com a matriz extracelular subendotelial que forma a rede hemostática que estanca o sangramento. As plaquetas, que desempenham importante papel na formação do trombo, seja no sistema arterial, seja no sistema venoso, são ativadas quando a região subendotelial é exposta. Durante esta ativação, elas têm a velocidade de circulação na corrente sanguínea alterada, diminuída, devido a interação com diferentes fatores, dentre eles o fator de von Willebrand. Esta interação leva a um rearranjo do citoesqueleto das plaquetas e elas liberam de seus grânulos várias substâncias, dentre elas o fator de von Willebrand, trombospondina-1, ADP, entre outras. Entre as proteínas da matriz extracelular, o colágeno e fator de von Willebrand tem importante papel, responsáveis por mediar a adesão e agregação plaquetária (de Groot et al., 1988; Wagner et al., 1984). Werneck e colaboradores (2008) demonstraram que, outra proteína também pertencente a parede dos vasos denominada de Glicoproteína Associada a Microfibrilas-1 (MAGP-1) também participa do processo hemostático e interage com o fator de von Willebrand.

MAGP-1 é uma proteína de baixa massa molecular associada com as fibrilinas nas microfibrilas na matriz extracelular. Essas microfibrilas são filamentos encontrados em vários tecidos, especialmente nos tecidos elásticos, ossos e cartilagens (Mecham et al., 1994). A principal função atribuída as microfibrilas é servir como um arcabouço para a deposição da tropoelastina na montagem das fibras elásticas, muito embora até o presente momento, acredita-se que elas não contribuam mecanicamente com as propriedades dos tecidos elásticos, e sim, para

assegurar a integridade estrutural dos tecidos não-elásticos e ancorar as células nas fibras elásticas e outros componentes da matriz (Segade et al., 2002).

Além disso, MAGP-1 e MAGP-2 são duas das proteínas associadas covalentemente com as fibrilinas contidas nas microfibrilas (Henderson et al., 1996). MAGP-1 contém 183 aminoácidos que formam dois domínios distintos: o amino-terminal que é altamente ácido e rico em prolina e além disso, possui grupos de resíduos de glutamina. A região carboxi-terminal possui todos os 13 resíduos de cisteínas encontrados na molécula e carga líquida positiva. Pontes de dissulfeto aparentemente ocorrem entre os resíduos de cisteína da proteína MAGP-1 e as microfibrilas (Gibson et al., 1986).

O gene *MAGP1* foi caracterizado em humanos (também conhecido como *MFAP2*) (Faraco et al., 1995), em camundongos (*Magp1*) (Chen et al., 1993) e em bovinos (Bashir et al., 1994). Um estudo comparativo entre os genes humano e de camundongo levou Segade e colaboradores (2000) a identificar novas isoformas de MAGP-1 que surgiram a partir do splicing alternativo de um único transcrito. Os autores identificaram cinco variantes de splicing em adição a forma normal *MAGP1A*. Estes transcritos são espécies específicos e são gerados por diferentes processos. As formas de splicing alternativo *MAGP1A'*, *MAGP1B* e *MAGP1C* são expressas em tecidos humanos, e duas variantes *MAGP1A''*, *MAGP1D* encontradas apenas em camundongos. Os padrões de restrição das formas de splicing alternativo mostraram que a *MAGP1B* humana e a forma *Magp1D* murina não são proteínas extracelulares, mas representam as possíveis formas intracelulares de MAGP-1 (Segade et al, 2002).

Além destas formas intracelulares cuja função não é conhecida, foi demonstrado que a MAGP-1 extracelular interage com várias proteínas, dentre estas encontram-se a tropoelastina (Brown-Augsburger et al., 1994), Fibrilinas 1 e 2 (Trask et al., 2000 e Werneck et al., 2004),

colágeno VI (Finnis et al., 1997), decorina (Trask et al., 2000), biglicanos (Reinboth et al., 2002), e Notch1 (Miyamoto et al., 2006). Até o presente momento, não foram descritas ligações de MAGP-1 com os colágenos I, II e V (Finnis et al., 1997). MAGP-1 também influencia a via pelas quais as células interagem com a matriz extracelular, e dentro deste contexto encontramos as proteínas trombospondina, tenascina e outros membros da família de proteínas da matriz celular. Também até o presente momento, não existe nenhuma evidência de como MAGP-1 interage com as integrinas, embora interações com outras proteínas de ligação de matriz da superfície celular não foram extensivamente estudadas (Werneck et al., 2008).

Para melhor entender o funcionamento da MAGP-1 Weinbaum e colaboradores (2008) inativou o gene alvo da MAGP-1 (*Mfap2*) em camundongo. Como estratégia os autores substituíram os exons de 3 a 6, que codifica a porção de sinalização peptídica e quase metade das sequências codificantes desta molécula. Nos camundongos deficientes em MAGP-1, a formação do trombo é atrasada, apesar de ocorrer a coagulação normal do sangue *in vitro*. Sugerindo que, as microfibrilas contendo MAGP-1 possui importante função na hemostasia e na trombogênese (Werneck et al., 2008).

Frente ao exposto, este projeto, bem como outros do nosso laboratório, tiveram como ponto de partida os dados obtidos por Werneck e colaboradores (2008). Estes dados demonstraram que, a ausência de MAGP-1 altera o tempo de formação de trombo na artéria carótida de camundongos deficientes em MAGP-1, em um valor próximo ao dobro de um selvagem (C57BL/6), e que a injeção prévia de MAGP-1 bovina recombinante resgata o tempo normal de formação de trombos (Figura 18).

Pensando nesta diferença de tempo de colusão passamos a estudar a possibilidade da diferença estrutural destes trombos. Os resultados obtidos demonstram que, com as técnicas

utilizadas, a morfologia dos trombos formados nos animais selvagens e deficientes em MAGP1 é bastante semelhante, não sendo possível observar diferenças. Estes experimentos foram planejados a partir de dados iniciais do nosso laboratório nos quais foi possível observar diferenças estruturais que provavelmente foram resultado de artefatos durante a preparação das amostras (Figura 7).

Além da análise morfológica foram realizados estudos para verificar a relação de inter-especificidade da proteína, uma vez que, os resultados publicados por Werneck e colaboradores (2008) eram relacionados a proteína MAGP-1 recombinante de origem bovina. Nossos dados indicam que a MAGP-1 bovina e a MAGP-1 murina são equivalentes no processo de recuperação do tempo de oclusão (formação dos trombos) (Figura 19). Porém é importante destacar, que estas moléculas por serem expressas em bactérias, não possuem as modificações pós-traducionais permanecendo ainda, a questão de que a MAGP-1 endógena possa ter um comportamento diferente, ser mais ou menos ativa do que estas recombinantes. Os dados obtidos para os camundongos selvagens são um reflexo desta diferença de atividade entre as MAGP-1 injetadas e a MAGP-1 endógena, que parece ser a predominante nestes camundongos, que apresentam diferentes tempos de formação de trombos somente com a concentração mais alta (100 µg/kg de peso) (Figura 19), não sofrendo tanta interferência pela MAGP-1 recombinante injetada.

Considerável atenção tem sido dada para determinar qual o possível domínio da proteína MAGP-1 tem importante papel na trombogênese (Werneck et al., 2008). Os resultados obtidos indicam que a região C-terminal possui atividade pró-trombótica (Figura 20) mais especificamente, que o peptídeo RRVYVVNK, que se encontra na região C-terminal da molécula. Ensaios de trombose realizados após a injeção de MAGP-1 recombinante mutadas em resíduos de cisteínas (CG3 ou CG9) sugerem, mais uma vez, a importância da região C-terminal

para esta ação trombótica, pois estas formas mutadas foram incapazes de resgatar o tempo de oclusão normal. Estudos realizados por Segade e colaboradores, demonstraram que estes resíduos de cisteínas, quando mutados, levam ao impedimento da deposição desta molécula na matriz extracelular. No nosso modelo de trombose arterial, provavelmente a ação pró trombótica da MAGP-1 está associada com a sua deposição na matriz e sua capacidade de interação com outras moléculas, fator de Von Willebrand por exemplo, e estas mutações provavelmente abolem estas interações. Estudos estruturais e de interação proteína-proteína podem ser esclarecedores neste sentido (figura 21). Por outro lado, a injeção do peptídeo foi capaz de resgatar o tempo de oclusão normal. Este peptídeo tem homologia a uma sequência da trombospondina-1 (peptídeo 4N1K) que, em testes *in vitro*, tem a capacidade de ativar plaquetas aumentando a adesão e formando agregados (Chung et al., 1999). Os dois peptídeos, da MAGP-1 e trombospondina-1, foram efetivos em diminuir o tempo de formação de trombos nos ensaios *in vivo*. Considerando os dados dos peptídeos mais a ausência de atividade da forma mutada da MAGP-1 em um dos resíduos de cisteína, podemos sugerir que esta mutação impede a deposição da MAGP-1 na matriz extracelular, como visto por Segade e colaboradores, e isto faz com que a sequência responsável por esta atividade, o peptídeo, não seja exposta. É importante ressaltar, que em ensaios de agregação plaquetária com a MAGP-1 inteira, esta não possui atividade, provavelmente pelo fato desta sequência estar mais internamente na molécula, não estando disponível ou acessível para a sua ação (Werneck et al., 2008).

É importante destacar ainda que, no caso dos peptídeos, a concentração utilizada foi de 100 µg/kg de peso, ou seja, duas vezes mais do que a massa utilizada nos ensaios com a proteína inteira. Quando levamos em consideração a razão molar, a concentração dos peptídeos é ainda

muito maior, o que nos leva a sugerir que além deste peptídeo, outra região possa ter importância para esta atividade.

Baseado em tudo isto, podemos sugerir que a cisteína livre, já que a molécula possui número ímpar de resíduos (13 resíduos), é importante no processo de deposição da proteína na matriz extracelular, e que ela pode ser o ponto de interação com outra proteína neste processo de hemostasia ou que a ausência de uma cisteína faz com que a estrutura terciária da proteína se altere de tal forma levando ao impedindo da deposição na matriz, impedindo sua atividade.

Para esclarecer esta dúvida, estudos de determinação da estrutura terciária das proteínas “selvagens” e mutadas serão importantes. Além disto, como dito anteriormente, ensaios de interação proteína-proteína com as formas selvagens e mutadas podem sugerir a influência da mutação nestas interações. Por exemplo, a MAGP-1 interage com o fator de Von Willebrand importante componente do trombo. Seria interessante verificarmos se a interação é afetada pela mutação. Logo, devido ao fato dos resultados obtidos direcionarem para a região C-terminal como o domínio da proteína MAGP-1 na trombogênese (Figura 20), a confirmação do real envolvimento de moléculas chaves neste processo é de fundamental importância para sua melhor compreensão, sendo assim, os próximos passos serão os ensaios *in vitro* de interação das proteínas com a MAGP-1. Um estudo descritivo dos possíveis parceiros da MAGP-1 neste processo será de grande importância para o melhor entendimento do mecanismo pelo qual esta molécula está atuando.

Conclusão

6. Conclusão

Através de todos os resultados apresentados e analisados concluímos que:

- ✓ A análise morfológica dos trombos obtidos *in vivo*, sugere ausência de diferenças nos trombos formados nos animais selvagens ou deficientes em MAGP-1^{-/-} de acordo com as técnicas utilizadas;
- ✓ Quando injetada a proteína MAGP-1 murina recombinante em camundongos selvagens e deficientes em MAGP-1^{-/-} foi observado o resgate do tempo de oclusão na mesma concentração da proteína MAGP-1 bovina;
- ✓ A região C-terminal (exon 7 a 9) apresenta atividade pró-trombótica;
- ✓ O peptídeo derivado desta região, **RRVYVVNK**, que apresenta homologia com uma região da trombospondina-1, também apresenta esta atividade.

Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

- Bashir, M. M., W. R. Abrams, *et al.* (1994) " Microfibril-associated glycoprotein: Characterization of the bovine gene and of the recombinantly expressed protein." Biochemistry **33**:593–600.
- Bonnefoy, A., C. Legrand (2000). "Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase." Thromb Res **98**(4):323-32.
- Bonnefoy, A., M. F. Hoylaerts (2008). "Thrombospondin-1 in Von Willebrand Factor Function." Current Drug Targets **9**:822-32.
- Bonnefoy, A., R. Moura, *et al.* (2008). "The evolving role of thrombospondin-1 in hemostasis and vascular biology." Cell Mol Life Sci **65**:713-27.
- Bornstein, P. (2001). "Thrombospondins as matricellular modulators of cell function." J Clin Invest **107**:929-34.
- Brown-Augsburger, P., T. Broekelmann, *et al.* (1994). "Microfibril-associated glycoprotein binds to the carboxyl-terminal domain of tropoelastin and is a substrate for transglutaminase." J Biol Chem **269**(45):28443-9.
- Chen, Y., J. Faraco, *et al.* (1993). "Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern of the Murine *Magp* Gene" J. Biol. Chem. **268**:27381–89.
- Chen, E., J. D. Larson, *et al.* (2006). "Functional analysis of zebrafish microfibril-associated glycoprotein-1 (*Magp1*) in vivo reveals roles for microfibrils in vascular development and function." Blood **107**(11):4364-74.
- Chung, J., A. G. Gao, *et al.* (1997). "Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin α IIb β 3." J Biol Chem **272**(23):14740-6.
- Chung, J., X. Q. Wang, *et al.* (1999). "Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in α 2 β 1-mediated platelet activation." Blood **94**(2):642-8.
- Davis, E. C. (1994). "Immunolocalization of microfibril and microfibril-associated proteins in the subendothelial matrix of the developing mouse aorta." J Cell Sci **107**(Pt 3):727-36.

- de Groot, P.G., M. Ottenhof-Rovers *et al.* (1988) "Evidence that the primary binding site of von Willebrand factor that mediates platelet adhesion on subendothelium is not collagen." J Clin Invest. **82**:65-73.
- Dugan, T. A., V. W. Yang, *et al.* (2006). "Decorin modulates fibrin assembly and structure." J Biol Chem **281**(50):38208-16.
- Faraco, J., M. Bashir, *et al.* (1995) " Characterization of the human gene for microfibril-associated glycoprotein (MFAP2) assignment to chromosome." Genomics **25**:630–637.
- Fauvel-Lafeve, F. (1999). "Microfibrils from the arterial subendothelium." Int Rev Cytol **188**:1-40.
- Feitosa, V. L., F. P. Reis, *et al.* (2006). "Comparative ultrastructural analysis of different regions of two digital flexor tendons of pigs." Micron **37**(6):518-25.
- Finnis, M. L., M. A. Gibson (1997). "Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) binds to the pepsin-resistant domain of the alpha3(VI) chain of type VI collagen." J Biol Chem **272**(36):22817-23.
- Folk, J. E., S. I. Chung (1985). "Transglutaminases." Methods Enzymol **113**:358-75.
- Gibson, M. A., J. L. Hughes, *et al.* (1986). "The major antigen of elastin-associated microfibrils is a 31-kDa glycoprotein." J Biol Chem **261**:11429-36.
- Gibson, M. A., E. G. Cleary (1987). "The immunohistochemical localisation of microfibril-associated glycoprotein (MAGP) in elastic and non-elastic tissues." Immunol Cell Biol **65**:345–56.
- Gibson, M. A., L. B. Sandberg, *et al.* (1991). "Complementary DNA cloning establishes microfibril-associated glycoprotein (MAGP) to be a discrete component of the elastin-associated microfibrils." J Biol Chem. **266**:7596-601.
- Gupta, P. A., E. A. Putnam, *et al.* (2002). "Ten novel FBN2 mutations in congenital contractural arachnodactyly: delineation of the molecular pathogenesis and clinical phenotype." Hum Mutat **19**(1):39-48.
- Hanssen, E., F. H. Hew, *et al.* (2004). "MAGP-2 Has Multiple Binding Regions on Fibrillins and Has Covalent Periodic Association with Fibrillin-containing Microfibrils." J. Biol. Chem. **279**:29185–94.

- He, L., C. P. Vicente, *et al.* (2002). "Heparin cofactor II inhibits arterial thrombosis after endothelial injury." J Clin Invest **109**(2):213-9.
- Henderson, M., R. Polewski, *et al.* (1996) "Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) is specifically located on the beads of the beaded-filament structure for fibrillin-containing microfibrils as visualized by the rotary shadowing technique." J. Histochem. Cytochem. **44**:1389–1397.
- Jenning, L. K. (2009). "Role of Platelet in Atherothrombosis." Am J Cardiol **103**:4A-10A.
- Jensen, S. A., D. P. Reinhardt, *et al.* (2001). "Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1." J Biol Chem **276**(43):39661-6.
- Kielty, C. M., M. J. Sherratt, *et al.* (2005). "Fibrillin microfibrils." Adv Protein Chem **70**:405-36.
- Kurien, B. T., R. H. Scofield (2009). "A brief review of other notable protein blotting methods." Methods Mol Biol **536**:367-84.
- Lee, B., M. Godfrey, *et al.* (1991). "Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes." Nature **352**(6333):330-4.
- Jennings, L.K. (2009). "Role of platelets in Atherothrombosis." J Cardiol **103**:4-10.
- Lollar, P., D. C. Hill-Eubanks (1984). "Purification of the factor VIII complex." Thromb Res **35**:431-50.
- Mecham, R. P., E. C. Davis (1994) "Elastic fiber structure and assembly." Extracellular Matrix Assembly and Structure 281–314.
- Miyamoto, A., R. Lau, *et al.* (2006). "Microfibrillar proteins MAGP-1 and MAGP-2 induce Notch1 extracellular domain dissociation and receptor activation." J Biol Chem **281**(15):10089-97.
- Ower, W. G., C. T. Esmon *et al.* (1974). "The conversion of prothrombin to thrombin I. Characterization of the reaction products formed during the activation of bovine prothrombin." J Biol Chem **249**:594-605.
- Penner, A. S., M. J. Rock, *et al.* (2002). "Microfibril-associated glycoprotein-2 interacts with fibrillin-1 and fibrillin-2 suggesting a role for MAGP-2 in elastic fiber assembly." J Biol Chem **277**(38):35044-9.

- Pinheiro, M. C., O. A. Mora, *et al.* (2005). "Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in the mouse pubic symphysis during pregnancy." Cell Biol Int **29**(6):458-71.
- Pretorius, E., P. Humphries, *et al.* (2007). "Comparative ultrastructural analyses of mouse, rabbit, and human platelets and fibrin networks." Microsc Res Tech **70**(9):823-7.
- Prosser, I. W., M. A. Gibson, *et al.* (1984). "Microfibrillar protein from elastic tissue: a critical evaluation." Aust J Exp Biol Med Sci **62** (Pt 4):485-505.
- Reinboth, B., E. Hanssen, *et al.* (2002). "Molecular Interactions of Biglycan and Decorin with Elastic Fiber Components: Biglycan forms a ternary complex with Tropoelastin and Microfibril-Associated Glycoprotein 1." J Biol Chem **277**:3950-57.
- Reinhardt, D. P., D. R. Keene, *et al.* (1996). "Fibrillin-1: organization in microfibrils and structural properties." J Mol Biol **258**(1):104-16.
- Rosa, R. G., C. A. Tarsitano, *et al.* (2008). "Relaxation of the mouse pubic symphysis during late pregnancy is not accompanied by the influx of granulocytes." Microsc Res Tech **71**(3):169-78.
- Ross, J. M., L. V. McIntire, *et al.* (1998). "Fibrillin containing elastic microfibrils support platelet adhesion under dynamic shear conditions." Thromb Haemost **79**:155-61.
- Sage, H. (1983). "The evolution of elastin: correlation of functional properties with protein structure and phylogenetic distribution." Comp Biochem Physiol B **74**(3):373-80.
- Sage, H., W. R. Gray (1981). "Studies on the evolution of elastin-III. The ancestral protein." Comp Biochem Physiol **68B**:473-80.
- Santoro, S. A., W. A. Frazier (1987). "Isolation and characterization of thrombospondin." Methods Enzymol **144**:438-46.
- Segade, F., T. Broekelmann, *et al.* (2000) "Revised genomic structure of the human MAGP1 gene and identification of alternate transcripts in human and mouse tissues." Matrix Biol. **19**:671-682.
- Segade, F., R. P. Mecham (2005). "Regulatory elements of microfibril-associated glycoprotein-1 gene expression in muscle cells." Biochim Biophys Acta **1731**:215-24.

- Segade, F., B. C. Trask, *et al.* (2002). "Identification of a matrix-binding domain in MAGP1 and MAGP2 and intracellular localization of alternative splice forms." J Biol Chem **277**(13):11050-7.
- Thorell, L., B. Blomback (1984). "Transglutaminases." Methods Enzymol **113**:358-75.
- Trask, B. C., T. J. Broekelmann, *et al.* (2001). " Posttranslational Modifications of Microfibril Associated Glycoprotein-1 (MAGP-1)." Biochemistry **40**(14):4372–80.
- Trask, T. M., B. Crippes Trask, *et al.* (2000). "Interaction of Tropoelastin with the Amino-terminal Domains of Fibrillin-1 and Fibrillin-2 Suggests a Role for the Fibrillins in Elastic Fiber Assembly." J Biol Chem **275**:24400–6.
- Trask, B. C., T. M. Trask, *et al.* (2000). "The microfibrillar proteins MAGP-1 and fibrillin-1 form a ternary complex with the chondroitin sulfate proteoglycan decorin." Mol Biol Cell **11**(5):1499-507.
- Veridiano, A. M., E. A. Garcia, *et al.* (2007). "The mouse pubic symphysis as a remodeling system: morphometrical analysis of proliferation and cell death during pregnancy, partus and postpartum." Cell Tissue Res **330**(1):161-7.
- Wagner D. D., M. Urban-Pickering, *et al.* (1984). "Von Willebrand protein binds to extracellular matrices independently of collagen." Proc Natl Acad Sci **81**:471-475.
- Weinbaum, J. S., T. J. Broekelmann, *et al.* (2008). "Deficiency in microfibril-associated glycoprotein-1 leads to complex phenotypes in multiple organ systems." J Biol Chem **283**(37):25533-43.
- Werneck, C. C., B. C. Trask, *et al.* (2004). "Identification of a major microfibril-associated glycoprotein-1-binding domain in fibrillin-2." J Biol Chem **279**(22):23045-51.
- Werneck, C. C., C. P. Vicente, *et al.* (2008). "Mice lacking the extracellular matrix protein MAGP1 display delayed thrombotic occlusion following vessel injury." Blood **111**(8):4137-44.

Anexos

8. Anexos

Trabalho em congresso

“MAGP-1 and Thrombus Formation”

X Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular and V International Symposium on Extracellular Matrix.

Local: Búzios, RJ, Brasil.

Documentação da aprovação do Comitê de Ética

 UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia	 CEEA-IB-UNICAMP
--	--	--

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
 CEEA-IB-UNICAMP**

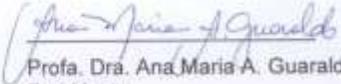
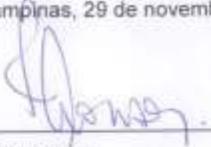
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1167-1, sobre "Implicação de uma glicoproteína associada à microfibrila (MAGP-1) na trombogênese", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 29 de novembro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1167-1, entitled "Function of microfibril-associated glycoprotein (MAGP-1) in thrombogenesis", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on November 29, 2006.

Campinas, 29 de novembro de 2006.

 Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnido Presidente	 Fátima Alonso Secretária Executiva
--	---

CEEA/IB - Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP - Brasil	Telephone: (19) 3788-8359 Telefax: (19) 3788-8356 E-mail: ceea@cemib.unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm
---	---



CIBio/IB-Unicamp
 Comissão Interna de Biossegurança
 Unicamp – Instituto de Biologia
 Caixa Postal 6109
 13083-970 Campinas SP
 Tel.: (19) 3521-6359
 Fax: (19) 3521-6356

Of. CIBio 020/2006.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
 06 de dezembro de 2006.

Prof. Dr. EDUARDO GALEMBECK
 Chefe do Departamento de Bioquímica
 Instituto de Biologia
 UNICAMP

CÓPIA

Prezado Professor:

Informamos que o projeto abaixo relacionado, envolvendo AnGM do tipo I, sob responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck (2006/06), foi aprovado pela CIBio-IB/UNICAMP, em reunião realizada no dia 06/12/2006, para ser desenvolvido nas dependências do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Unicamp:

No. Projeto (Data da aprovação)	Data de recepção	Nome do Projeto	Prazo para envio de relatório à CIBio
2006/06 (06/12/2006)	28/11/2006	Implicação de uma glicoproteína associada à microfibrila (MAGP-1) na trombogênese	08/2007

Pedimos sua atenção a Instrução Normativa CTNBio nº 12, de 27.05.98, que dispõe sobre as normas para trabalho em contenção com animais geneticamente modificados < <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/full/3500> >. Solicitamos ainda que nos sejam enviados o croqui e as normas de funcionamento do biotério onde para credenciamento junto a CTNBio.

Como a previsão de início deste projeto é março de 2007, pedimos que a documentação acima nos seja encaminhada na segunda quinzena de janeiro de 2007, com uma proposta de data para visita dos membros da CIBio ao biotério para credenciamento.

Atenciosamente,


 Prof. Dr. **MARCELO MENOSSI TEIXEIRA**
 Presidente da CIBio/IB/UNICAMP

Cópia: Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

15:45
 15/01/07