



DANIELLE SOUSA PEREIRA

**Avaliação da MAGP1 no processo de
trombose arterial induzida por cloreto
férico e assistida por microscopia intravital**

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANIELLE SOUSA PEREIRA

**Avaliação da MAGP1 no processo de trombose
arterial induzida por cloreto férrico e assistida
por microscopia intravital**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra, em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA DANIELLE SOUSA PEREIRA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. CLAUDIO CHRYSOSTOMO WERNECK

Claudio C. Werneck

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P414a Pereira, Danielle Sousa, 1988-
Avaliação da MAGP1 no processo de trombose arterial induzida por cloreto férrico e assistida por microscopia intravital / Danielle Sousa Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Claudio Chrysostomo Werneck.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glicoproteínas associadas a microfibrila-1. 2. Matriz extracelular. 3. Trombose arterial. 4. Cloreto férrico. 5. Microscopia intravital. I. Werneck, Claudio Chrysostomo, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of MAGP1 in the process of arterial thrombosis induced by ferric chloride and assisted by intravital microscopy

Palavras-chave em inglês:

Microfibril-associated glycoprotein-1

Extracelular matrix

Arterial thrombosis

Ferric chloride

Intravital microscopy

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Claudio Chrysostomo Werneck [Orientador]

José Camillo Novello

Gláucia Coelho de Mello

Data de defesa: 17-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 17 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck (orientador)



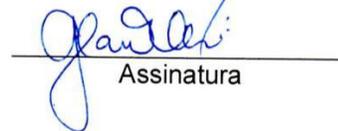
Assinatura

Prof. Dr. Jose Camillo Novello



Assinatura

Dra. Gláucia Coelho de Mello



Assinatura

Dra. Melissa Regina Fessel

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

Resumo

MAGP1 (Microfibril-Associated GlycoProtein1) é um os constituintes das microfibrilas. Numerosos estudos têm demonstrado que MAGP1 interage com outras moléculas *in vitro* e sua expressão é de grande importância para o desenvolvimento vascular em *zebrafish*. Dados obtidos em nosso laboratório a partir do modelo fotoquímico de indução de trombo em animais deficientes em MAGP1 sugerem a importância deste componente da microfibrila no processo trombótico. Entre as técnicas para indução da formação de trombo, têm-se o cloreto férrico. Tal técnica, quando aplicada em pequenos animais, gera uma lesão endotelial de alta intensidade em apenas dois minutos. Além disso, com o auxílio da microscopia intravital, o cloreto férrico permite a captura de imagens do vaso sanguíneo em tempo real. A microscopia intravital possibilita a análise do processo de formação do trombo e as possíveis diferenças deste processo nos camundongos deficientes em MAGP1. Sendo assim, o presente trabalho objetivou estabelecer a técnica de trombose arterial induzida por cloreto férrico e assistida por microscopia intravital, a fim de verificar a função de MAGP1 no processo de formação do trombo. Para isto, as células brancas e as plaquetas de animais selvagens e deficientes em MAGP1 foram coradas com Rhodamina 6G e analisadas por microscopia intravital.

Palavras – chave: MAGP-1, matriz extracelular, Trombose arterial, Plaquetas, Cloreto Férrico, Microscopia intravital.

Abstract

MAGP1 (Microfibril - Associated GlycoProtein1) is a constituent of the microfibrils. Numerous studies have shown that MAGP1 interact with other molecules in vitro and its expression is of importance for vascular development in zebrafish. Data obtained in our laboratory from the photochemical model of thrombus induction in animals deficient in MAGP1 suggest the importance of this component of the microfibril in the thrombotic process. Among the techniques for inducing thrombus formation, it has been ferric chloride. This technique when applied in small animals generates a high intensity endothelial injury in just two minutes. Furthermore, with the aid of intravital microscopy, ferric chloride enables the capture of blood vessel images in real time. The intravital microscopy allows the analysis of the process of thrombus formation and possible differences of this process in mice deficient in MAGP1. Therefore, this study aimed to establish the technique of arterial thrombosis induced by ferric chloride and assisted intravital microscopy, in order to verify the function of MAGP1 in the process of thrombus formation. For this, white cells and platelets MAGP1 deficient and wild animals were stained with Rhodamine 6G e analyzed by intravital microscopy.

Keywords: MAGP-1, extracellular matrix, arterial thrombosis, platelets, ferric chloride, intravital microscopy.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS.....	xix
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Matriz extracelular e fibras elásticas.....	2
1.2. Rede de microfibrilas e Fibrilina 1.....	3
1.3. Glicoproteína 1 associada à microfibrila (MAGP1).....	6
1.4. Trombose arterial.....	10
1.5. Métodos de indução da trombose arterial.....	11
1.6. Microscopia Intravital.....	13
1.7. Hemostase e Plaquetas.....	14
2. Objetivo Geral.....	18
2.1. Objetivos Específicos.....	19
3. Materiais e Métodos.....	22
3.1. Materiais.....	23
3.2. Animais.....	23
3.3. Trombose arterial induzida por FeCl ₃	26
3.4. Microscopia Intravital.....	27
3.5. Isolamento e inativação de plaquetas.....	28
3.6. Injeção de plaquetas, MAGP-1 e VG1.....	29
3.7. Proteômica de plaquetas.....	30
3.8. Clonagem, expressão e purificação de MAGP1DsRed.....	32
4. Análise estatística.....	35
5. Resultados e discussão	36
5.1. Trombose arterial induzida por FeCl ₃	37
5.2. Microscopia Intravital.....	43
5.3. Injeção de plaquetas, MAGP-1 e VG1.....	47
5.4. Proteômica de plaquetas.....	59
5.5. Clonagem, expressão e purificação de MAGP1DsRed.....	62
6. Conclusão.....	63
7. Referências Bibliográficas.....	65
8. Anexos.....	72

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Por ser meu melhor amigo e enviar sempre anjos para que me guardassem pelo caminho.

Aos meus pais e aos meus irmãos,

Que me inspiraram a sonhar e não mediram esforços para que eu conquistasse este sonho. Sem o amor que vocês compartilharam comigo, não chegaria a mais esta realização.

As minhas avós,

Que sempre com ternura me ensinaram a nunca desistir por mais que o caminho estivesse cheio de espinhos.

A minha companheira Pérola,

Que com seu jeito meigo e ao mesmo tempo impulsivo me esperava todos os dias ansiosamente para me oferecer sua companhia. Sua presença fez toda diferença durante essa jornada.

Ao Professor, orientador e amigo Claudio Werneck,

Por abrir portas para que eu alcançasse mais um objetivo e pela compreensão e dedicação a todo tempo. Sua amizade e cuidado me fez ganhar mais que um mestre, tenho em você um verdadeiro “paizão”.

À Professora Cristina Pontes Vicente,

Por toda amizade e colaboração técnica.

À minha grande amiga e “madrinha de laboratório” Tallita Vassequi,

Por desde o início me acolher com tanto carinho e dedicação e por ser essa amiga querida que você se tornou.

Aos amigos do laboratório, Fabiana Uno, Carolina Kayano, Marcelli Fontenelle, Isabella Suzuki, Camila Wielewski Leme, Guilherme Barbosa, Grace Keiler, Thanuci Silva, Ana Claudia Diez, Catherine Pereira, Guilherme Braga e João Neto.

Por serem pessoas raras, que em meio a um mundo tão competitivo e cruel oferecem ajuda e amizade aos que se dispõem a trabalhar. Obrigada pelos momentos de companheirismo e alegria, guardarei todos vocês em meio as lembranças mais bonitas.

Aos professores José Camillo Novello, Marcelo Brocchi, Sérgio Marangoni, Paulo Pinto Juazeiro, Eduardo Galembeck e Edson Pimentel e às doutoras Glaucia Coelho Mello e Melissa Fessel

Por aceitarem, com toda gentileza, o convite para compor a banca de qualificação e de defesa da dissertação de mestrado.

Ao professor Fábio Trindade Maranhão Costa,
Pela colaboração com o empréstimo do microscópio intravital

Agradecimento especial:



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Eletromicrografia de tecido rico em fibra elástica (aorta) em desenvolvimento.....	3
Figura 1.2. Geração de camundongos deficientes em MAGP1.....	8
Figura 1.3. Modelos mostrando as fontes celulares de TF que contribuem para a trombose arterial e venosa.....	11
Figura 1.4. Cascata de coagulação.....	15
Figura 3.1. Fluxograma experimental da técnica de trombose arterial induzida por Cloreto férrico e assistida por microscopia Intravital (FeCl ₃).....	24
Figura 3.2. Fluxograma experimental da quantificação do tempo de oclusão após a injeção de plaquetas, MAGP1 e MAGP1-VG1, assistida por microscopia Intravital.....	25
Figura 3.3. Imagem da indução de trombo por FeCl ₃ na artéria carótida direita de camundongos.....	26
Figura 3.4. Conversão de escala do programa ImageJ.....	28
Figura 3.5. Dupla mutação pontual de MAGP1.....	29
Figura 3.6. Aparelho IPGphor de focalização isoeletrica, correspondente à 1º dimensão da eletroforese 2D.....	32
Figura 5.1. Tempo de oclusão da artéria carótida em animais selvagens e deficientes em MAGP1 com lesão provocada por papel de filtro úmido.....	38
Figura 5.2. Tempo de oclusão em animais selvagens e deficientes em MAGP1 com o uso de papel de filtro embebido em cloreto e seco em estufa.....	39
Figura 5.3. Comparação do tempo de oclusão com o uso de duas metodologias diferentes.....	40
Figura 5.4. Microscopia intravital da formação da trombose arterial em camundongos selvagens e deficientes em MAGP1.....	44
Figura 5.5. Microscopia intravital da formação da trombose arterial na artéria carótida direita de animais selvagens e deficientes em MAGP1.....	45
Figura 5.6. Análise quantitativa da técnica de microscopia intravital.....	45
Figura 5.7. Microscopia intravital da formação da trombose arterial da artéria carótida direita de animais selvagens e deficientes em MAGP1, após a injeção de MAGP1 recombinante e MAGP1-VG1.....	46
Figura 5.8. Análise quantitativa da técnica de microscopia intravital.....	46
Figura 5.9. Análise quantitativa da técnica de microscopia intravital.....	47
Figura 5.10. Tempo de oclusão da artéria carótida direita em animais MAGP1 ^{+/+} após a injeção de plaquetas provenientes de animais MAGP1 ^{+/+} e MAGP1 ^{-/-}	49
Figura 5.11. Tempo de oclusão da artéria carótida direita em animais MAGP1 ^{-/-} após a injeção de plaquetas provenientes de animais MAGP1 ^{+/+} e MAGP1 ^{-/-}	50

Figura 5.12. Microscopia Intravital da trombose arterial na carótida direita de animais selvagens e deficientes em MAGP1	50
Figura 5.13. Análise quantitativa da técnica de microscopia intravital.....	51
Figura 5.14. Tempo de oclusão da artéria carótida direita em animais MAGP1 ^{+/+} após a injeção de plaquetas MAGP1 recombinante	53
Figura 5.15. Tempo de oclusão da artéria carótida direita em animais MAGP1 ^{-/-} após a injeção de plaquetas e MAGP1 recombinante.....	53
Figura 5.16. Microscopia intravital da trombose arterial na artéria carótida direita de animais selvagens e deficientes em MAGP1 com a injeção de plaquetas e MAGP1 recombinante	54
Figura 5.17. Análise quantitativa da técnica de microscopia intravital.....	54
Figura 5.18. Tempo de oclusão da artéria carótida direita em animais MAGP1 ^{+/+} após a injeção de plaquetas provenientes de animais MAGP1 ^{+/+} e MAGP1 ^{-/-} e MAGP1-VG1.....	57
Figura 5.19. Tempo de oclusão da artéria carótida direita em animais MAGP1 ^{-/-} após a injeção de plaquetas provenientes de animais MAGP1 ^{+/+} e MAGP1 ^{-/-} e MAGP1-VG1	57
Figura 5.20. Microscopia intravital da artéria carótida direita de animais MAGP1 ^{+/+} e MAGP1 ^{-/-} com a injeção de plaquetas e MAGP1-VG1.....	58
Figura 5.21. Análise quantitativa da técnica de microscopia intravital.....	58
Figura 5.22. Comparação dos resultados com a Injeção de plaquetas, MAGP1 recombinante e MAGP1-VG1 em animais deficientes em MAGP1.....	59
Figura 5.23. Eletroforese bidimensional de plaquetas provenientes de animais selvagens.....	61
Figura 5.24. Eletroforese bidimensional de plaquetas provenientes de animais deficientes em MAGP1	61
Figura 5.25. Eletroforese do DNA de MAGP1 e DsRed	62

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.1. Sequência de aminoácidos correspondentes a uma região de homologia compartilhada pela trombospondina-1 e MAGP-1	9
Tabela 5.1. Tabela da padronização e comparação dos géis 2D resultantes de amostras de plaquetas de animais selvagens e deficientes em MAGP1	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D = bidimensional

ACD = Ácido citrato dextrose

ADP = Adenosina difosfato

BMP = Proteína Mofogenética Óssea

CEMIB = Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

DsRed = Proteína vermelho fluorescente

DTT = Dithiothreitol

Fbn1^{mgΔ/+} = Camundongos Heterozigotos para a mutação do gene da fibrilina-1

Fbn1^{mgΔ/mgΔ} = Camundongos Homozigotos para a mutação da fibrilina-1

FeCl₃ = Cloreto Férrico

GFP = Proteína verde fluorescente

IAP = Proteína associada à integrina

IPTG = IsoPropil Tio Galactosídeo

MAGP1 = Glicoproteína associada à microfibrila-1

MAGP1^{-/-} = Camundongo deficiente em MAGP1

MAGP1^{+/+} = Camundongo selvagem

MAGP1-VG1 = MAGP1 mutante

MAGP2 = Glicoproteína associada à microfibrila-2

MAGPs = Glicoproteínas associadas à microfibrila

MBD = Domínio ligante à matriz

mgΔ = Camundongos geneticamente modificados para o gene da fibrilina-1

MVS = Microvesículas

PCR = Reação em cadeia da polimerase

PECAM-1 = Molécula de adesão celular de plaquetas

pFN = Fibronectina

PRP = Plasma rico em plaquetas

Ptl = Plaquetas

SDS = Sulfato Dodecil de Sódio

SMC = Células musculares lisas

TF = Fator Tecidual

TGFβ = fator de crescimento tumoral Beta

TSP-1 = trombospondina 1

vFW= Fator de Von Willebrand

WT = Animal selvagem

INTRODUÇÃO

1.1. Matriz extracelular e fibras elásticas

A matriz extracelular é um biopolímero complexo, exclusiva dos animais, que une as células e confere resistência aos tecidos desempenhando papéis na organogênese e na hemostase (Craft et al. 2010).

As fibras elásticas são importantes constituintes da matriz extracelular de órgãos e tecidos que se encontram em constante estresse mecânico como pele, pulmões e grandes vasos. Elas são capazes de restaurar um tecido deformado em sua condição original devido a sua capacidade em armazenar energia (Charbonneau et al. 2003; Chen et al. 2006).

A fibra elástica madura se constitui à partir da deposição de tropoelastina, molécula que tem como principal característica a presença de domínios hidrofóbicos alternados por domínios de reações cruzadas (*cross-link*) ricos em lisina e tem massa molecular de aproximadamente 70 kDa. Na matriz extracelular, a tropoelastina se auto agrega num processo denominado coacervação, onde domínios hidrofóbicos de diferentes moléculas se alinham, formando o agregado, que por sua vez são covalentemente ligados através da ação de enzimas do tipo lisil oxidases sobre os resíduos de lisina dos domínios de reações cruzadas, formando a elastina (Thomassin et al. 2005; Wagenseil and Mecham 2007).

As fibras elásticas são constituídas por inúmeros componentes, dos quais se destacam, a elastina e a rede de microfibrilas, que são componentes distintos e visíveis por meio da microscopia eletrônica (Figura 1.1). Acredita-se que a rede de microfibrilas funcione como um molde para que ocorra a deposição de elastina por tropoelastina e a formação da fibra elástica madura e funcional (E.G. 1996; Charbonneau et al. 2003).

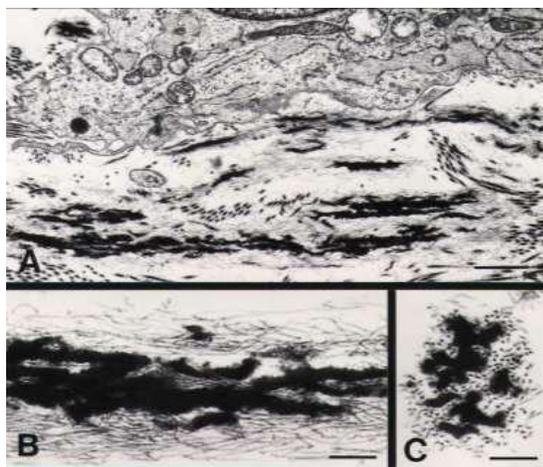


Figura 1.1. Eletromicrografia de tecido rico em fibra elástica (aorta) em desenvolvimento. A – Visão geral do tecido rico em fibra elástica. B e C – Presença de uma região mais eletrondensa, a elastina, e a rede de microfibrila. B – Corte longitudinal e C – Corte transversal (Davis 1994).

As microfibrilas são filamentos que apresentam de 10 a 12 nm de diâmetro, são compostas principalmente por fibrilinas, encontrando-se em sua constituição outras moléculas, como as MAGPs, a fibulina e a emilina (Kielty et al. 2002).

As fibras elásticas e as microfibrilas são organizadas em tecidos específicos e estão dispostas de acordo com as exigências mecânicas do sistema de órgãos individuais. Na pele, as microfibrilas estão dispostas desde a membrana basal da derme até a derme reticular, a qual permanece paralelamente com as fibras elásticas e confere elasticidade à pele. Na aorta, as microfibrilas se associam com a elastina na camada média para formar as lâminas concêntricas que separam a camada muscular lisa. Nos olhos, as microfibrilas formam feixes paralelos com a lente (Ramirez et al. 2004).

1.2. Rede de microfibrilas e fibrilina1

Anteriormente, acreditava-se que a principal função da rede de microfibrilas era atuar como molde para a formação das fibras elásticas. Recentemente, muitos trabalhos têm demonstrado que as microfibrilas são importantes não só na parte estrutural, mas também na regulação de fatores que influenciam os mais variados processos celulares, desde a diferenciação até a proliferação. Um exemplo é a síndrome de Marfan, uma

doença genética autossômica, descrita em 1896 pelo pediatra francês, Antoine Bernard Marfan, que de acordo com os dados epidemiológicos tem incidência de 2 a 3 casos a cada 10.000 nascimentos. Antoine descreveu primeiramente o caso de uma menina de cinco anos que apresentava altura superior e incompatível com sua idade, membros e dedos alongados e magros, contraturas nas articulações dos dedos e joelhos, crânio estreito e alongado, cifose-escoliose torácica, deformidade do esterno e enfisema pulmonar. No decorrer de sua carreira, relatou inúmeros casos e verificou características semelhantes nestes pacientes como sub-luxação do cristalino, malformação da válvula aórtica, além de constatar que ambos os sexos eram acometidos por estas alterações patológicas (Peyeritz 2000).

Os portadores dessa síndrome apresentam, frequentemente, anomalias nas estruturas esquelética, pulmonar, cardíaca, ocular, vasos sanguíneos entre outras, e uma sobrevida abaixo do normal, 40 anos em média. No entanto, atualmente o tratamento cirúrgico aumentou a expectativa de vida destes pacientes. Fisicamente, são indivíduos altos, com escoliose, braços e mãos alongadas e deformidade torácica, em que cerca de 90% dos casos, a morte é causada por falha cardiovascular (McKusick 1991; Neptune et al. 2003; Robinson et al. 2006).

Para o entendimento da síndrome foram desenvolvidos vários modelos animais com mutações no gene da fibrilina-1, entre eles o modelo experimental de camundongos modificados geneticamente ($mg\Delta$), onde ocorreu a substituição dos éxons 19 a 24 pelo cassete que confere resistência à neomicina, com o promotor PGK. A modificação resultou em animais denominados $mg\Delta$ que apresentam uma diminuição de 10 vezes na quantidade de fibrilina-1 nos tecidos. Os animais heterozigotos, aparentemente, apresentam início da vida adulta normal, devido a uma maior expressão de proteínas normais que suprimem o efeito negativo da mutação ($Fbn1^{mg\Delta/+}$). Já os animais

homozigotos (*Fbn1*^{mgΔ/mgΔ}) morrem na primeira semana de vida, devido a complicações vasculares similares à síndrome de Marfan (Pereira et al. 1997).

Em humanos e em modelos de camundongos, os sinais clínicos da síndrome de Marfan estão sendo relacionados, com a ativação excessiva do Fator de Crescimento Tumoral- TGF-β. Estudos com modelos murinos de síndrome de Marfan constataram que as microfibrilas formadas por fibrilina-1 não são essenciais para a formação da fibra elástica e sim, importantes para a manutenção das fibras elásticas durante a vida pós-natal. Isso sugere que a ausência de comunicação correta entre as fibras elásticas e as células musculares lisas, papel supostamente desempenhado pela fibrilina-1, leva estas células a expressarem moléculas como as metaloproteinases (MMPs) 2 e 9, que promovem a calcificação da fibra elástica, inflamação da parede vascular, hiperplasia da íntima devido a migração e hiperplasia de células musculares lisas e, por fim, colapso estrutural da parede do vaso (Pereira, Andrikopoulos et al. 1997; Pereira, Lee et al. 1999). Estas características patológicas também foram encontradas em grandes artérias musculares de pacientes com síndrome de Marfan (Bunton et al. 2001).

A função estrutural das microfibrilas ricas em fibrilina-1 é bastante conhecida, mas as evidências de que as microfibrilas tem papel crítico na regulação de citocinas, que são moléculas que afetam o desenvolvimento de tecidos, bem como a homeostase, regulando a atividade celular, como proliferação, migração, capacidade de síntese e morte, tem aumentado. Dados recentes da literatura sugerem que mutações no gene da fibrilina-1 levam à fragmentação das fibras elásticas e a uma diminuição na quantidade de fibrilina-1, que resulta em ativação exacerbada do complexo latente de TGF-β. Esta atividade exacerbada, quando estabelecida em camundongos por mutação no gene da fibrilina-1, leva ao aparecimento de determinados sinais clínicos encontrados na

Síndrome de Marfan, como os aneurismas e dissecção aórticos (Neptune et al. 2003; Ramirez and Rifkin 2003; Robinson et al. 2006).

O tratamento de camundongos com antagonistas do TGF- β , tais como anticorpos anti TGF- β ou com um bloqueador dos receptores AT1 de angiotensina II, Losartan, leva a reversão dos sintomas da síndrome de Marfan devido á diminuição nos níveis de TGF- β , sugerindo que a fibrilina-1 participa na regulação da atividade desse fator de crescimento (Reinhardt et al. 1996; Habashi et al. 2006; Robinson et al. 2006; Brooke et al. 2008).

Além da síndrome de Marfan, dados da literatura sugerem que microfibrilas ricas em fibrilina são importantes suportes para a adesão e agregação de plaquetas demonstrando ter função trombogênica em condições dinâmicas *in vitro* (Ross et al. 1998). Considerando a distribuição destas microfibrilas na parede dos vasos, principalmente dos grandes vasos como a aorta, esta característica pode ser importante, juntamente com outras moléculas da região subendotelial, na modulação da resposta das plaquetas diante da lesão do vaso sanguíneo (Ross et al. 1998).

1.3. Glicoproteína associada à Microfibrila-1 (MAGP1)

Outro grupo de proteínas, aparentemente, importante é o das Glicoproteínas Associadas à Microfibrila (MAGPs). Os dois representantes dessa família, Glicoproteína-1 Associada à Microfibrila (MAGP1) e Glicoproteína-2 Associada à Microfibrila (MAGP2) têm uma sequência de 60 aminoácidos na região C-terminal com alta homologia, apresentando todos os resíduos de cisteína da molécula nesta região e de maneira conservada. Este domínio na MAGP1 parece ser importante para a deposição destas moléculas na matriz extracelular, sendo definido como domínio MBD (Matrix Binding Domain). A região N-terminal da MAGP1 e MAGP2 são diferentes, entretanto ambas são enriquecidas com aminoácidos de caráter ácido. Na MAGP1, a região N-

terminal interage com o TGF- β ativo. Ao contrário das fibrilinas, que são glicoproteínas de elevada massa molecular (~350 kD), as MAGPs possuem massa molecular baixa (20kDa, aproximadamente) (Segade et al. 2002).

O gene de MAGP1, *Mfap2* é localizado em humanos, no cromossomo 1p36 e em ratos no cromossomo 4qD3. A ausência de genes homólogos da MAGP1 em banco de dados de leveduras, moscas ou vermes, sugere que a MAGP1 é um gene relativamente recente na escala evolutiva, além disso, seu surgimento coincide com o aparecimento do gene da elastina, o que evidencia uma relação entre estas proteínas. A MAGP1 é uma proteína altamente conservada entre os mamíferos e vertebrados inferiores e nenhuma patologia relacionada à deficiência ou a mutações no gene MAGP1 foi constatada até o momento (Sage and Gray 1981; Segade et al. 2002).

Estudos com *zebrafish* demonstraram que a MAGP1 desempenha papel fundamental na formação das microfibrilas durante a embriogênese e sua expressão é de grande relevância para o desenvolvimento vascular (Chen et al. 2006). Além disso, muitas pesquisas bioquímicas têm demonstrado a interação da MAGP1 com várias moléculas *in vitro*, entre as quais estão fibrilinas 1 e 2, tropoelastina, biglican, decorina, colágeno tipo IV e TGF- β (Finnis and Gibson 1997; Trask et al. 2000; Jensen et al. 2001; Werneck et al. 2004; Weinbaum et al. 2008). A MAGP1 está associada a todas microfibrilas, exceto às adjacentes à membrana plasmática das células endoteliais da aorta e a aquelas na junção da zônula ciliar (Kumaratilake et al. 1989; Davis 1994).

Camundongos deficientes em MAGP1 (MAGP1^{-/-}) foram obtidos através da substituição dos exons 3-6 por um cassete de neomicina (fig.1.2). Estes animais são viáveis e férteis e apresentam fenótipos como diátese hemorrágica, obesidade, neutropenia, monocitopenia e osteopenia, além de deficiência na circulação (Segade and Mecham 2005; Weinbaum et al. 2008; Craft et al. 2010; Craft et al. 2012).

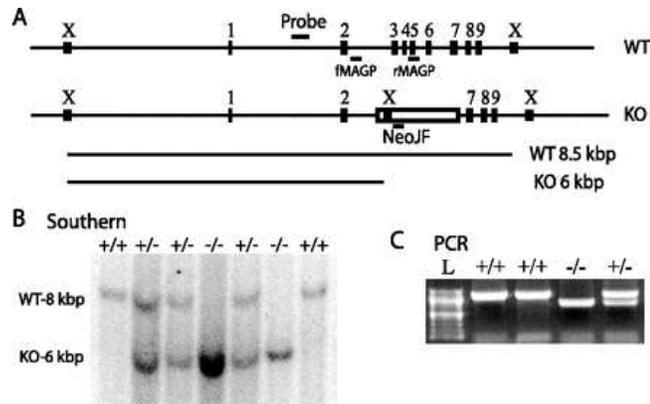


Figura 1.2. Geração de camundongos deficientes em MAGP-1. A- esquema do locus *Mfap2* selvagem (WT) e *MAGP-1*^{-/-} (KO). Retângulos numerados correspondem a éxons 1-9 do gene *Mfap2*, o retângulo aberto corresponde ao cassete de resistência à neomicina inserido. Linhas horizontais indicam a localização da sonda no Southern blot e primers de PCR, caixas marcadas com "X" indicam sítios de restrição de *Xba*I. Longas linhas horizontais representam os fragmentos que hibridam com a sonda de Southern blot, 8,5 kpb e 6kpb para o selvagem-*MAGP1*^{+/+} (WT) e *MAGP-1*^{-/-} (KO), respectivamente. B- Amostras de DNA genômico de camundongos digeridas por *Xba*I. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose e analisadas por Southern blot. Genótipos resultantes são indicados por cada banda. C- DNA genômico foi submetido a PCR com primers de genotipagem e separados por eletroforese em gel de agarose. Os tamanhos das bandas são 1160 e 714 pb para o tipo selvagem e *MAGP-1*^{-/-}, respectivamente. L- 100 pb (Weinbaum et al. 2008).

Werneck e colaboradores sugerem a relevância da MAGP1 na formação de trombos na artéria carótida de camundongos deficientes em MAGP1 em comparação com animais selvagens (WT). Constatou-se através do modelo fotoquímico de indução do trombo, que os animais deficientes em MAGP1 necessitam de quase o dobro do tempo de um animal selvagem para formar um trombo (99 e 58 minutos, respectivamente). Mas após a injeção de MAGP1 recombinante nos animais deficientes, o tempo de oclusão foi restabelecido. Estudos para mapear a atividade pró-trombótica da MAGP1 têm sido realizados (Werneck et al. 2008).

A MAGP-1 tem em sua região C-terminal, um peptídeo semelhante a um encontrado na trombospondina-1 (TSP-1), glicoproteína de aproximadamente 450kDa. Estudos sugerem que tanto *in vitro* quanto *in vivo* a trombospondina-1 tem função na agregação das plaquetas durante a trombogênese e sua ausência em animais provoca a embolização do trombo. Um peptídeo da TSP-1 foi identificado por ativar a Proteína

Associada à Integrina (IAP), o peptídeo controle VV-GG perde sua função de assegurar a agregação sólida das plaquetas, quando sofre mutação pontual na região C-terminal com a substituição de duas valinas por duas glicinas (Bonney et al. 2001). Considerando a homologia deste peptídeo encontrado na MAGP1, este peptídeo bem como o seu controle foram sintetizados, por nosso grupo de pesquisa, conforme descrito no anexo II, a fim de avaliar se estes peptídeos atuam da mesma forma do que os da TSP-1 (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Sequência de aminoácidos correspondentes a uma região de homologia compartilhada pela trombospondina-1 e MAGP-1. Em destaque, as formas mutantes do peptídeo 4N1K, com a substituição de duas valinas, e da MAGP-1 com alteração semelhante.

Peptídeo	Denominações adotadas	Sequência (aminoácidos)
Trombospondina-1	4N1K	KRFY V V M WKK
Trombospondina-1 mutante	4NGG	KRFY G G M WKK
MAGP-1	MAGP-1	RRVY V V N K
MAGP-1 mutante	VG1	RRVY G G N K

Estudos recentes demonstram que animais deficientes em MAGP1 e MAGP2 apresentam como principais características comuns, neutropenia e monocitopenia, sugerindo que têm participação na hematopoiese. Além disso, demonstrou-se que as MAGPs têm função na manutenção da integridade dos grandes vasos sanguíneos, como a aorta. Apesar de poucos estudos estarem relacionados à MAGP2, que é menos abundante nas microfibrilas quando comparada à MAGP1, sabe-se que esta molécula interage como TGF- β 1, TGF- β 2 e BMP-2, assim, pode estar envolvida na regulação dos fatores de crescimento e na regulação celular (Combs et al. 2013).

Estudos demonstram que a MAGP1 interage com o fator de crescimento tumoral ativo, o TGF- β , e pode estar relacionada à regulação da ação deste fator. O TGF- β regula vários processos biológicos e conseqüentemente controla o desenvolvimento e a

fisiologia de órgãos e tecidos (Weinbaum et al. 2008). Além disto, foi demonstrado que MAGP1 também interage com importantes moléculas do processo de formação do trombo como o fator von Willebrand e o fibrinogênio (Werneck et al. 2008).

1.4. Trombose arterial

A trombose arterial é a causa mais comum de morte no mundo moderno, sendo causada principalmente pela ruptura ou instabilidade de uma placa aterosclerótica que forma um coágulo local, impedindo o fluxo sanguíneo e resultando em infarto do miocárdio ou em acidente vascular cerebral (Figura 1.3). Eventos trombóticos são mais graves quando ocorrem nas artérias coronária ou carótida, as quais são propensas a doenças ateroscleróticas. Vários fatores podem contribuir para que ocorra a trombose arterial, são os chamados fatores de risco, como a diabete mellitus, o tabagismo, a hipertensão e a hiperlipidemia. O trombo arterial é rico em plaquetas e é denominado trombo branco (Owens and Mackman 2010).

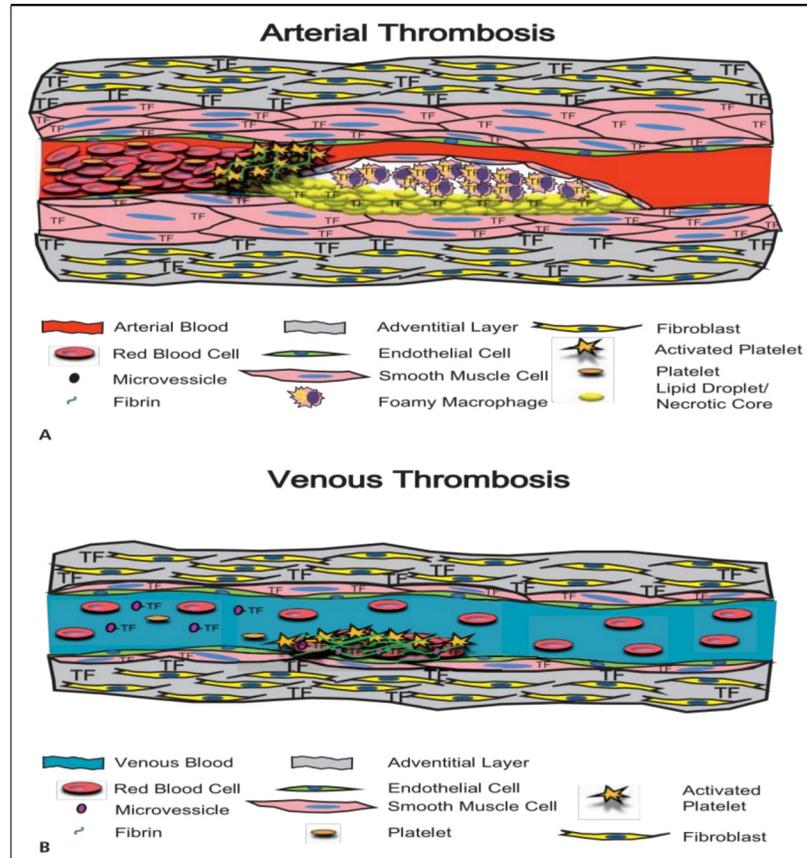


Figura 1.3. Modelos mostrando as fontes celulares de Fator Tecidual (TF) que contribuem para a trombose arterial e venosa. A- A trombose arterial. O gatilho primário de trombose arterial num vaso doente é a ruptura de uma placa aterosclerótica. Isto envolve o rompimento da camada de Células Musculares Lisas (SMC) expondo sangue para TF. O coágulo resultante é composto principalmente por plaquetas com os níveis mais baixos de fibrina, e é referido como um "coágulo branco". B- A trombose venosa. A trombose venosa ocorre em uma camada endotelial relativamente intacta. A trombose venosa pode ser desencadeada por TF associados a Microvesículas (MVs) circulantes. O coágulo é composto principalmente de fibrina, plaquetas e glóbulos vermelhos do sangue aprisionado e é referido como um "coágulo vermelho" (Owens and Mackman 2010).

Para o entendimento da formação de trombo e da hemostasia, as técnicas bioquímicas de proteínas dominaram os estudos por um longo tempo. Entretanto, os estudos com experimentos *in vivo*, facilitam a compreensão sobre o complexo sistema de coagulação (Furie and Furie 1988).

1.5. Métodos de indução da trombose arterial

Muitos são os métodos utilizados para induzir a formação do trombo em modelos animais, entre os mais utilizados tem-se a indução fotoquímica do trombo.

Nesse modelo a injeção de Rosa de bengala na circulação sanguínea do animal e a interação dessa substância com um laser de 543nm, gera espécies reativas de oxigênio que lesionam o local exposto ao laser e dispara a formação do trombo (Wilson and Hatchell 1991; Ambrosio et al. 1997). O modelo fotoquímico é bastante eficiente para ocasionar a injúria arterial, entretanto essa técnica apresenta desvantagens por requerer muito tempo para que ocorra a formação do trombo levando a problemas de reprodutibilidade (Umemura et al. 1995; Umemura 1997). Apesar de bem estabelecido em nosso laboratório, o método de indução fotoquímica tem tempo experimental muito longo (\pm 70 minutos para cada animal selvagem, chegando a 140 minutos para animais deficientes em fibrilina-1, por exemplo), o que determina uma taxa de utilização muito grande dos equipamentos necessários, além de exigir uma quantidade maior de animais utilizados nos ensaios experimentais, já que a técnica pode apresentar uma variação grande. Tais desvantagens dificultariam a análise da trombose arterial por microscopia intravital, já que o tempo e o número de animais exigidos seriam maiores. Desta forma, foi de grande interesse para o nosso laboratório o estabelecimento de uma nova técnica com um tempo mais curto e que permitisse as análises por microscopia intravital, permitindo observar a formação do trombo em tempo real.

Outro método utilizado para disparar a formação do trombo em modelos animais emprega o cloreto férrico (FeCl_3). A aplicação desse mecanismo em pequenos animais, gera uma lesão endotelial de caráter grave e agudo e leva o vaso à oclusão (Watson et al. 1985; Kurz et al. 1990).

Um dos benefícios desse modelo é que diferentes concentrações de cloreto férrico geram lesões de gravidade diferenciadas e conseqüentemente, tempo de oclusão do vaso sanguíneo variado. Com o estabelecimento da concentração de FeCl_3 e tempo

de aplicação a técnica tem se mostrado reprodutível (Farrehi et al. 1998; Owens and Mackman 2010; Eckly et al. 2011).

O cloreto férrico gera radicais livres e provoca uma lesão oxidativa generalizada, que danifica o endotélio e expõe a matriz subendotelial com apenas 2 minutos após a aplicação. Além disso, em conjunto com a utilização da microscopia intravital, o cloreto férrico proporciona a visualização direta da formação do trombo no interior dos vasos sanguíneos (Farrehi et al. 1998; Fay et al. 1999; Ni et al. 2000; Tseng et al. 2006), o que sugere que tal técnica pode solucionar os problemas experimentais encontrados no modelo fotoquímico de indução do trombo e pode ser utilizada para estabelecer o método de análise da trombogênese por microscopia intravital.

1.6. Microscopia Intravital

A microscopia intravital surgiu para o estudo da interação dos leucócitos com a parede do vaso em animal vivo, desde então essa técnica têm sido utilizada por muitos pesquisadores, a fim de capturar imagens em tempo real (Atherton and Born 1972; Schmid-Schonbein et al. 1980).

Oude Egrink & cols. estão entre os primeiros que utilizaram da combinação trombose experimental e vídeo-microscopia intravital. Essa técnica possibilitou a visualização de eventos vasculares, como a formação do trombo, fornecendo imagens destes acontecimentos em tempo real (oude Egbrink et al. 1988; Tangelder and Arfors 1991; Sriramarao et al. 1996)

A microscopia intravital permite uma nova análise visual e quantitativa dos princípios aceitos na formação do trombo e a determinação se as previsões de experimentos anteriores *in vitro* são ou não válidas para o sistema *in vivo*, além disso, é capaz de fornecer descrições mais detalhadas da formação do trombo e do

comportamento de seus componentes (Rucker et al. 1998), como por exemplo, as plaquetas (Ni et al. 2003).

Para se obter imagens por microscopia intravital é necessário marcadores fluorescentes. A Dsred, proteína de 28 kD responsável pela coloração vermelha em torno do disco oral do coral do gênero *Discosoma* é utilizada por esses cnidários para atrair peixes e emite uma fluorescência vermelha. Quando comparada com a Proteína Verde Fluorescente (GFP), DsRed tem melhor resistência a pH extremos, além de exibir um maior coeficiente de extinção, entretanto, pode se encontrar dificuldades ao trabalhar com a proteína, já que esta tem maior tendência em formar oligômeros e tem maturação mais lenta (Baird et al. 2000; Wall et al. 2000). Clones de DsRed se mostraram aplicáveis *in vivo* quando utilizados para marcar blastômeros do gênero *Xenopus* depois de uma semana de desenvolvimento (Matz et al. 1999).

1.7. Hemostase e plaquetas

As plaquetas são componentes cruciais para que ocorra a hemostase (figura 1.4). Classificadas como corpúsculos citoplasmáticos anucleados, em 1882, são originadas a partir da maturação de megacariócitos produzidos na medula óssea (Kuijpers et al. 2003). No organismo humano, 70% das plaquetas estão na circulação, enquanto 30% estão no baço. Elas permanecem, em média, dez dias na circulação, quando então, são retiradas pelas células reticulo-endoteliais do baço e do fígado (Jackson et al. 1997; Andrews and Berndt 2004). Possuem uma forma discoide complexa e têm a propriedade de modificar sua morfologia quando ativadas. O sistema hemostático, que preza pela manutenção do fluxo sanguíneo, assim como pela integridade vascular, conta com as plaquetas para executar a primeira etapa da hemostasia, que é a formação do tampão plaquetário sobre o endotélio danificado (Bates and Lau 2005). Quando o sistema vascular é de alguma forma lesionado, as plaquetas interagem com os componentes da

matriz extracelular expostos na parede do vaso sanguíneo, assim os receptores de adesão das plaquetas se ligam ao fator de von Willebrand (vFW) e ao colágeno, moléculas estas que regulam a adesão plaquetária, a fim de formar um agregado de plaquetas que se ligará ao fibrinogênio a fim de formar o "plug" hemostático (Israels et al. 2001; Heemskerk et al. 2005). A regulação negativa das plaquetas é indispensável para prevenir a trombose, formação descontrolada de trombo, e pode ser feita pelo óxido nítrico, pela prostaciclina e por PECAM-1. Além disso, quatro sistemas anticoagulantes podem contrabalancear a resposta pró-coagulante, são eles, antitrombina/heparina, trombomodulina/proteína C/proteína S, fibrinolítico e inibidor da via do tecido tissular (Albelda et al. 1991; Jones et al. 2001; Cicmil et al. 2002; Gibbins 2004).

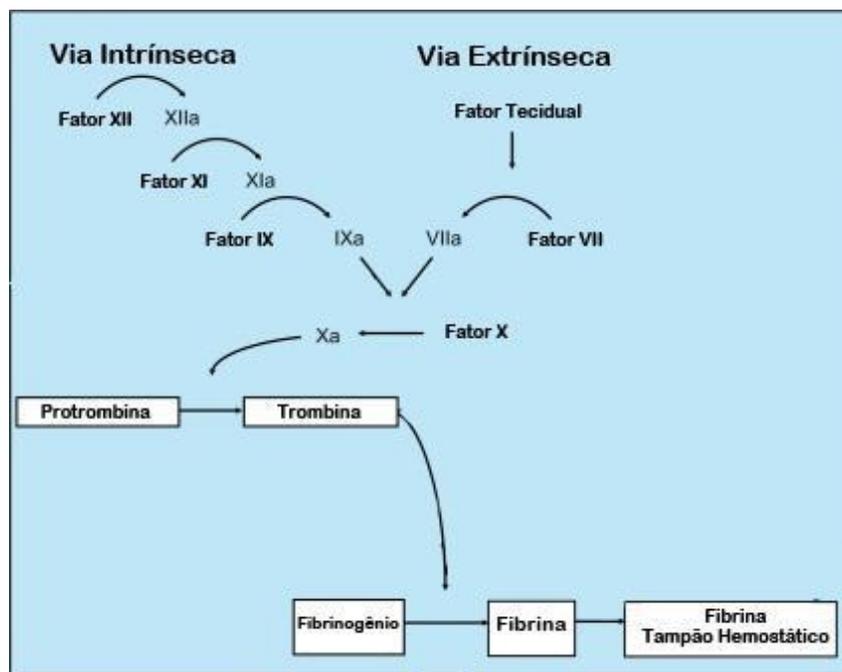


Figura 1.4. Cascata de coagulação. Via intrínseca é dependente da ativação de diversos fatores (XII, XI, IX e X) e a via extrínseca é ativada a partir da lesão vascular que promove o lançamento do fator tecidual. Ambas as vias tem um ponto comum com a ativação do fator X em Xa, o qual converte protrombina em trombina, a qual por sua vez converte fibrinogênio em fibrina para promover a formação do coágulo. Setas pretas representam conversão e ativação de fatores (Modificado de Ham, Lew et al. 2010).

Anormalidades no número, na composição das plaquetas e na interação destas com fatores de coagulação podem gerar desequilíbrio na fase inicial da hemostasia, comprometendo a função plaquetária. As plaquetas estão envolvidas em inúmeras patologias importantes, como a trombose arterial, e por isso esses fragmentos citoplasmáticos são vistos como alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos antitrombóticos (Nurden et al. 1995; Brown et al. 1997).

Devido à ausência de informações genéticas suficientes, já que as plaquetas são anucleadas, a análise do genoma e transcriptoma quase nunca são promissoras para se estudar a biologia das plaquetas, assim, prefere-se análises a nível de proteínas. A análise proteômica é a metodologia mais apropriada para se estudar o funcionamento dos genes, já que analisa o produto final do genoma, e cada vez mais fornece informações completas sobre as proteínas (Pandey and Mann 2000), assim, permite avaliar e compreender a expressão protéica das plaquetas.

A técnica que apresenta maior vantagem na análise proteômica é a eletroforese bidimensional (2D), pois tem capacidade de separar com alta resolução uma grande quantidade de proteínas e possibilita a avaliação da expressão gênica através da comparação de padrões protéicos (Herbert et al. 2001).

A eletroforese 2D foi desenvolvida em 1975 por O'Farrel e Klose e ganhou avanços com o desenvolvimento tecnológico (Klose 1975; O'Farrell 1975; Gorg et al. 1985; Rabilloud et al. 1997; Herbert 1999). A técnica combina a separação das proteínas em duas dimensões, a primeira por ponto isoelétrico e a segunda por massa molecular, e em conjunto com a espectrometria de massas permite a identificação das proteínas expressas em células, tecidos ou fluidos. Além disso, a proteômica consegue identificar isoformas de proteínas que podem estar relacionadas a patologias ligadas

intimamente com as plaquetas, como a trombose (Blackstock and Weir 1999; Hebestreit 2001).

Dados preliminares do nosso grupo de pesquisa mostraram que as plaquetas provenientes de animais deficientes em MAGP1 não apresentam diferença morfológica quando comparados com animais selvagens, porém a agregação plaquetária é diminuída *in vitro* quando induzida pelo agonista ADP. Outro dado obtido, mostra diferença relevante na proteômica das plaquetas provenientes de animais deficientes em fibrilina-1 em relação aos animais selvagens, já que a vinculina, proteína importante na formação do citoesqueleto, foi encontrada mais expressa em plaquetas de animais deficientes em fibrilina-1 do que em MAGP1^{+/+}.

Considerando a participação da MAGP1 na formação do trombo, a utilização de outras técnicas que permitam avaliar o processo em questão pode ser de grande importância para identificar os pontos-chaves onde a MAGP1 possa estar atuando. Assim o presente trabalho objetivou estabelecer a técnica de trombose arterial, induzida por cloreto férrico, a fim de verificar através da microscopia intravital a possível participação de MAGP1 no processo trombótico, assim como avaliar sua possível interação com componentes importantes do trombo, como as plaquetas.

OBJETIVOS

2. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o papel da MAGP1 no processo de trombose arterial induzida por cloreto férrico e assistida por microscopia intravital.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Estabelecer a técnica de trombose arterial induzida por cloreto férrico e assistida por microscopia intravital.

Dados anteriores sugerem que a MAGP1 está de alguma maneira relacionada na formação do trombo arterial. Werneck *et al.* mostraram, através do modelo fotoquímico de indução do trombo, que animais deficientes em MAGP1 necessitam de quase o dobro do tempo para que haja oclusão no vaso sanguíneo lesionado. Assim foi nosso interesse desenvolver novas técnicas que permitiriam o estudo mais profundo da dinâmica da molécula em questão no processo trombótico. O FeCl₃ provoca uma lesão oxidativa em poucos minutos, desnudando localmente o endotélio, além disso, em conjunto com a microscopia intravital permite a visualização da trombogênese em tempo real (Werneck et al. 2008).

2.1.2. Verificar o papel da MAGP1 no processo trombótico através da microscopia intravital.

Numerosos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de compreender os processos envolvidos na formação do trombo, dentre eles, a criação de camundongos geneticamente modificados, que apresentam deficiência em algum dos componentes da hemostasia e também o desenvolvimento de técnicas que permitam o monitoramento da trombogênese, como por exemplo, a microscopia intravital, que permite registrar a formação do trombo em tempo real (Kamocka et al. 2010).

Para melhor entender o que está ocorrendo na formação de trombo em nosso modelo animal, que apresenta um tempo de formação maior que os animais selvagens, eles foram submetidos a uma cirurgia de formação de trombo arterial e monitorados por

microscopia intravital, utilizando-se do cloreto férrico para ocasionar a lesão. Ao estabelecer a técnica de trombose arterial induzida por cloreto férrico e assistida por microscopia intravital foi possível verificar a influência da MAGP1 no processo trombótico e comparar este modelo com o modelo fotoquímico através da análise da reprodutibilidade na diferença do tempo de oclusão entre os animais selvagens e deficientes em MAGP1, assim como as embolizações ocorrentes em animais onde MAGP1 é ausente.

2.1.3. Verificar se a injeção de MAGP1 recombinante, de MAGP1-VG1 e plaquetas provenientes de animais selvagens tem capacidade de reestabelecer o tempo de oclusão normal para formação do trombo em animais deficientes em MAGP1.

Estudos anteriores demonstram que a injeção de MAGP1 recombinante consegue reestabelecer o tempo normal de formação do trombo através do modelo fotoquímico de indução da trombose arterial (Werneck et al. 2008). Por isso foi de nosso interesse avaliar se há o resgate do tempo de oclusão pela MAGP1 recombinante quando utilizada a técnica de indução da trombose por FeCl₃. Outra molécula avaliada quanto à recuperação no tempo de oclusão aumentado foi a MAGP1-VG1, que é uma mutação da MAGP1, obtida em nosso laboratório através de duas mutações pontuais na região C-terminal, onde duas valinas foram substituídas por duas glicinas (região de alta homologia com a trombospondina).

Como mencionado anteriormente, estudos em nosso laboratório sugerem algumas diferenças na proteômica das plaquetas de animais deficientes em fibrinólise quando comparados aos animais selvagens. Além disso, ensaios *in vitro* com plaquetas de animais deficientes em MAGP1 apresentaram menor agregação na presença do agonista ADP. Assim neste trabalho as plaquetas provenientes de animais selvagens também foram injetadas em animais deficientes, a fim de verificar diferenças na

interação desses componentes essenciais na hemostase, tanto no tempo quanto na dinâmica de formação do tampão plaquetário.

2.1.4. Fazer análise proteômica de plaquetas provenientes de animais selvagens e deficientes em MAGP-1.

Como já citado as plaquetas são elementos essenciais na hemóstase e podem formar o trombo arterial em caso de lesão do vaso sanguíneo. Assim, é de grande importância analisar esses componentes quanto às possíveis diferenças que podem apresentar nos diferentes genótipos, como por exemplo em animais selvagens e deficientes em MAGP1. A proteômica de plaquetas possibilita uma análise das proteínas presentes nesses corpúsculos e através da comparação e identificação é possível estabelecer ou não diferenças proteicas entre as plaquetas provenientes de diferentes grupos de animais.

2.1.5. Clonar, expressar e purificar a MAGP1 fusionada com uma cauda fluorescente, DsRed.

Depois de estabelecida a técnica de indução do trombo por FeCl_3 e assistida por microscopia intravital a avaliação da dinâmica da trombogênese poderá ser realizada. Após isto, poderemos analisar a ação da MAGP1 nesse processo. Para isso, MAGP1 será clonada, expressa e purificada ligada a uma proteína fluorescente, DsRed, a fim de ser detectada por microscopia intravital e avaliada quanto a sua interação na formação do trombo em tempo real.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

Os vacuettes com citrato e ACD foram obtidos da GreinerBio-one, Americana, SP, Brasil. Os eppendorff com beads foram adquiridos da GE Healthcare, Reino Unido. O anestésico cloreto de ketamina foi adquirido da Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP e o cloreto de xilazina da Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP. Os demais reagentes foram produtos analíticos de uso corrente adquiridos em empresas fornecedoras locais.

3.2. Animais

Para a execução dos experimentos, foram utilizados camundongos cedidos pelo Dr Robert P. Mecham, Washington University School of Medicine (WUSW), EUA, os quais são deficientes em MAGP1. Já para o controle, foram utilizados camundongos selvagens da linhagem C57BL/6, com idade entre 7-10 semanas e com peso entre 21-25[±]2 gramas provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas, SP. Os camundongos foram mantidos em temperatura de 22[±] 1°C em ciclo de claro-escuro de 12h, com livre acesso à água e à ração. Os protocolos experimentais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/IB/Unicamp) (protocolo n°2395-1). Além disso, para os roedores, foi utilizado dieta padrão (Nuvilab CR1[®]). Os camundongos foram divididos em grupos experimentais conforme esquematizado nas figuras 3.1 e 3.2:

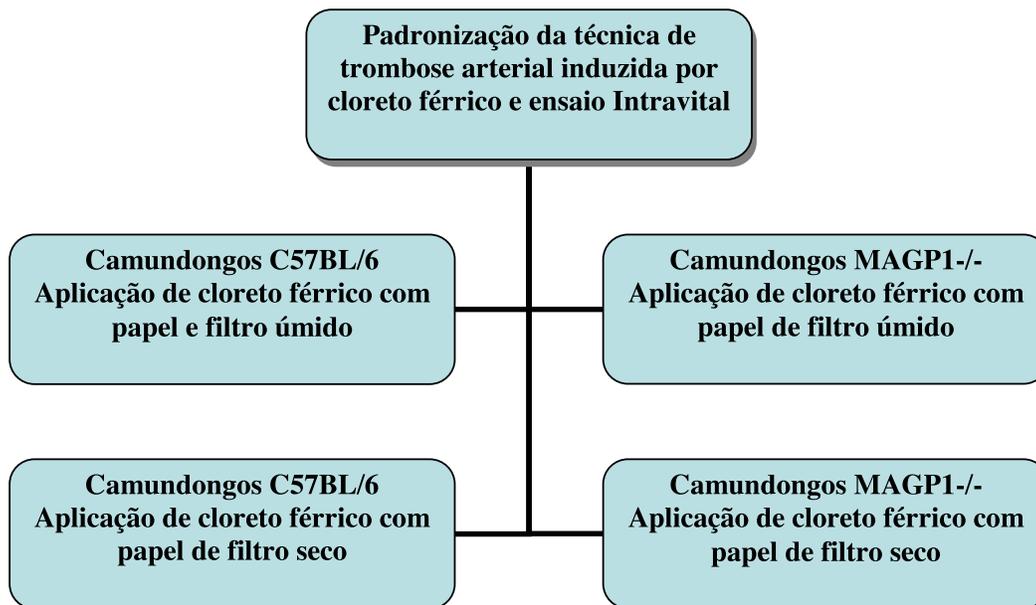


Figura 3.1. Fluxograma experimental da padronização da técnica de trombose arterial induzida por FeCl_3 e assistida por microscopia Intravital. Os camundongos dos dois genótipos, $\text{MAGP1}^{+/+}$ e $\text{MAGP1}^{-/-}$, foram divididos em dois grupos. O grupo 1 de cada genótipo foi submetido à lesão arterial com papel de filtro embebido em FeCl_3 (15%) úmido e o grupo 2 de cada genótipo foi exposto a lesão com papel de filtro embebido em FeCl_3 (15%) e seco em estufa. Ambos os grupos foram analisados quanto à formação do trombo em tempo real por microscopia intravital. $n \geq 6$ por grupo.

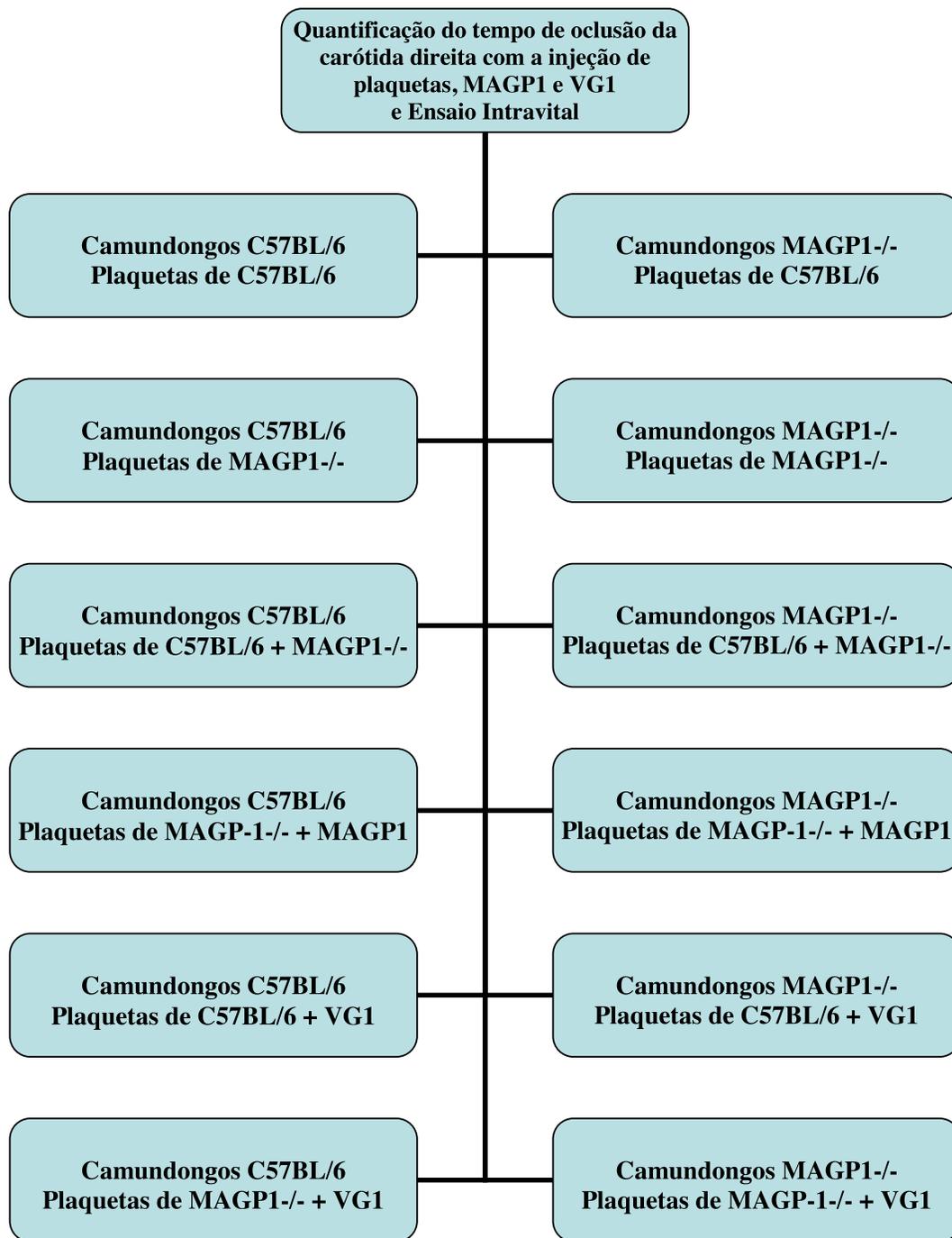


Figura 3.2. Fluxograma experimental da quantificação do tempo de oclusão após a injeção de plaquetas, MAGP1 e MAGP1-VG1 e ensaio intravital. Os camundongos dos dois genótipos, MAGP1^{-/-} e MAGP1^{+/+}, foram submetidos à injeção de MAGP1 recombinante, de MAGP1-VG1 e de plaquetas provenientes tanto de animais selvagens, quanto de animais deficientes em MAGP1. MAGP1 recombinante e MAGP1-VG1 foram injetados em concentração de 50µg/kg e as plaquetas foram injetadas em quantidade de 1x10⁸. n≥6 por grupo.

3.3. Trombose arterial induzida por cloreto férrico

Os animais foram anestesiados com os cloretos de ketamina (10% - 100mg/kg de peso) e de xilazina (2% - 16mg/kg de peso) injetado de forma intramuscular e foram colocados na posição supina. Logo após, foi feita uma incisão na média cervical do lado direito, a fim de isolar a artéria carótida. A formação de trombo foi induzida através de duas técnicas isoladas, ambas por meio de um papel de filtro (1,0 x 1,0mm) saturado com cloreto férrico (FeCl_3) Sigma Aldrich (15%) que foi posicionado na parte superior da artéria carótida por 2 minutos e provocou uma lesão de fora para dentro no vaso. Primeiramente, usou-se o papel de filtro úmido nos animais no grupo 1 de cada modelo animal. Posteriormente, os animais do grupo 2 de cada modelo animal foram submetidos ao papel de filtro seco que, anteriormente, foi levado à estufa à 37°C por período de aproximadamente 16h (*Overnight*), a fim de se obter o papel de filtro saturado e seco. O tempo de oclusão dos animais foi quantificado com o uso de sonda de ultrassom modelo Transonic Flow Probe MAO SPSB para medição do fluxo sanguíneo. Após estabelecer a metodologia de lesão da carótida, as imagens do vaso foram capturadas por meio do uso da microscopia intravital.

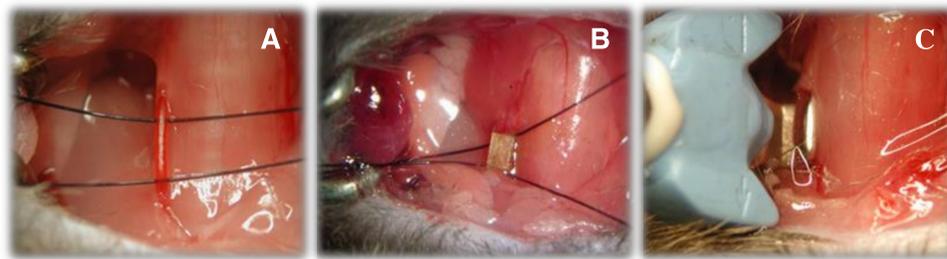


Figura 3.3. Metodologia de indução da trombose arterial por FeCl_3 , na artéria carótida direita de camundongo. A) Incisão na média cervical e isolamento da carótida direita B) Lesão do vaso por papel de filtro saturado com FeCl_3 (15%) e C) Posicionamento da sonda de ultrassom para quantificação do tempo de oclusão.

3.4. Microscopia intravital

A análise do trombo por meio da microscopia intravital foi realizada conforme descrito por Kuijpers *et al.*, com algumas modificações. Após o procedimento de quantificação do fluxo sanguíneo, células brancas e plaquetas foram coradas com uma solução de Rhodamina 6G (Sigma Aldrich, St Louis-USA) (0,1%), para a padronização da técnica de trombose arterial induzida por FeCl₃. Para a injeção de plaquetas, essas foram coradas isoladamente com uma solução de Rhodamina 6G (Sigma Aldrich, St Louis-USA) (10%). Em ambas as marcações as soluções foram injetadas pela veia caudal dos animais. Os componentes do processo trombótico foram analisados quanto ao funcionamento com o auxílio de uma câmera AxioCam H5m e o experimento foi realizado no microscópio modelo Carl Zeiss Imager.A2. Foram gravados vídeos da artéria carótida direita de todos os grupos experimentais, antes e após a lesão por FeCl₃ (Kuijpers et al. 2009).

Para a análise quantitativa das imagens obtidas por microscopia intravital foi utilizado o software ImageJ. As imagens foram analisadas considerando a fração de área ocupada pelo trombo em cada um dos intervalos de tempo. Primeiramente as imagens que estavam, originalmente, em escala de preto e amarelo foram convertidas para a escala de cinza afim de se trabalhar melhor no software e convertidas em escala “fire” de cores para a montagem das pranchas de imagens (figura 3.4). A área do vaso foi traçada manualmente e a fração de área ocupada pela marcação foi determinada com a aplicação de um limiar manual para converter a imagem 8-bits em binária. O limiar foi aplicado igualmente a todas as imagens e a fração de área medida.

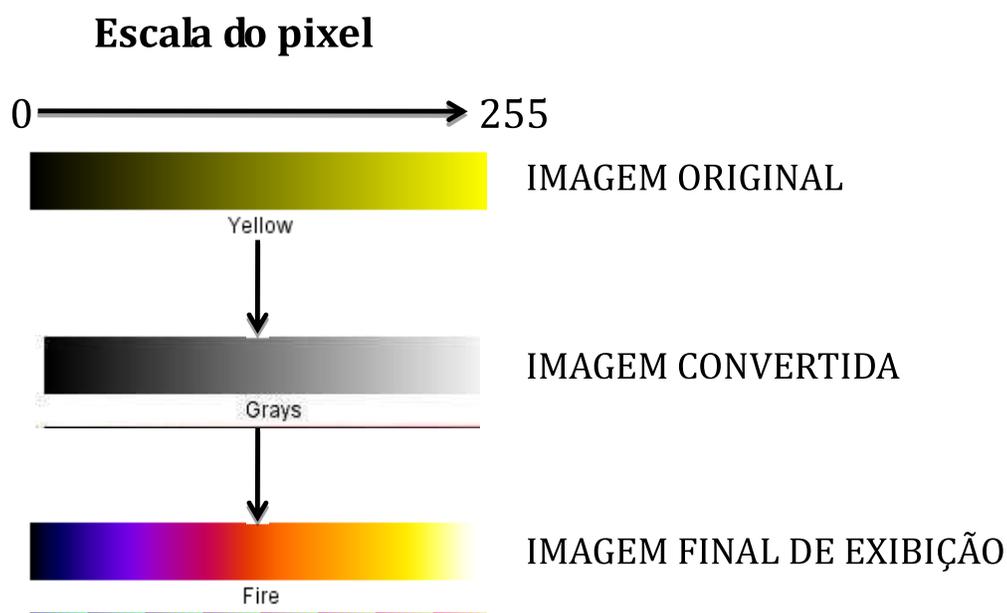


Figura 3.4. Conversão de escala do programa ImageJ. As imagens originais que estavam em escala de amarelo e preto foram convertidas para escala de cinza para facilitar a análise quantitativa. Por fim, para a montagem das pranchas de imagens com seus respectivos intervalos de tempo, usou-se a escala “fire” de cores.

3.5. Isolamento e inativação de plaquetas

O sangue foi coletado por punção cardíaca com seringa com solução de ACD, após os animais serem anestesiados com os cloridratos de ketamina (10% - 100mg/kg de peso) e de xilazina (2% - 16mg/kg de peso). O sangue coletado foi centrifugado a 2300xg por 10 segundos para cada 1ml de sangue a 25°C. Em seguida, 1ml do plasma rico em plaquetas (PRP) foi coletado e adicionado à um eppendorf limpo. O plasma rico em plaquetas foi centrifugado à 2200xg por 4 minutos, afim de precipitar as plaquetas. O sobrenadante foi descartado usando bomba de vácuo, cuidando pela remoção de todo traço de plasma das paredes do tubo para evitar a formação de trombina durante os passos seguintes. O precipitado de plaquetas foi ressuspensionado em 1ml de Tampão albumina Tyrode (NaCl 1,6g; KCl 0,04g; NaH₂PO₄ 0,016g; NaHCO₃ 0,20g; MgCl₂ 0,20g; CaCl₂ 0,21g; HEPES 1,19g; glicose 0,01g) contendo 2µl de Heparina (10U/mL), 1µL de PGI₂ (0,5µM) e 20µL de Apyrase (0,02U/mL) e em seguida incubado por 10

minutos a 37°C. Por fim, a solução foi centrifugada à 1900xg por 4 min a 25°C e o sobrenadante removido com bomba à vácuo, tendo como produto final o precipitado de plaquetas.

3.6. Injeção de plaquetas, MAGP1 e MAGP1-VG1

O precipitado rico em plaquetas obtido, como já descrito, foi ressuscitado em 1ml de tampão Tyrode contendo 2µL de Heparina (10U/mL), 1µL de PGI2 e 20µL de Apyrase (0,02U/mL) e mantido em banho Maria a 37°C enquanto as plaquetas eram quantificadas, aproximadamente 10 minutos. A quantificação de plaquetas foi realizada conforme (Harrison, Briggs et al. 2004). Logo após a quantificação das plaquetas, foram feitas alíquotas ajustando a quantidade de células para 1×10^8 e a suspensão de plaquetas foi centrifugada a 1900xg por 4 minutos e o precipitado foi ressuscitado em 60µl de tampão Tyrode.

A MAGP1-VG1 é uma versão mutada de MAGP1 obtida em nosso laboratório através de duas mutações pontuais, onde se substituiu duas valinas por duas glicinas como mostra a figura 3.5 e o anexo I.

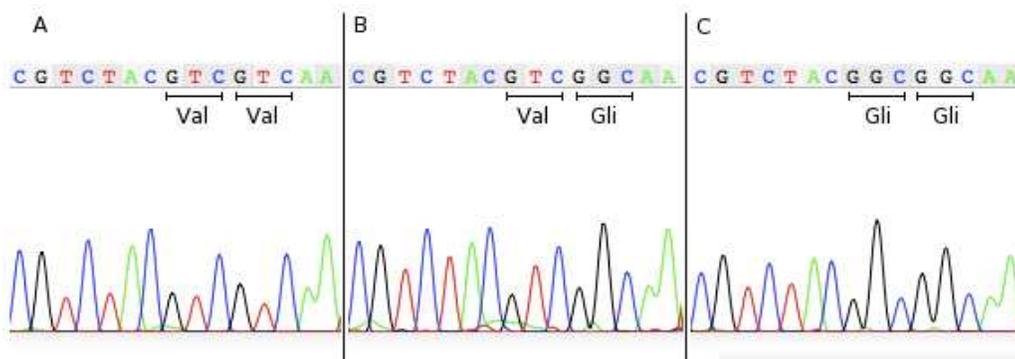


Figura 3.5. Sequências de DNA correspondentes ao vetor MAGP-1 oriundas do animal selvagem. (A) ao vetor MAGP-1 submetido ao primeiro processo de mutagênese sítio dirigida (B) e ao vetor MAGP-1 ostentando a dupla mutação pontual (C). Em destaque, nota-se a alteração dos nucleotídeos alvo resultando na substituição inicial de um aminoácido em VG2 (B) seguido de uma dupla substituição em VG1 (C).

A MAGP-1 de origem bovina e a MAGP1-VG1 foram injetadas nos animais em quantidade suficiente para se ter 50µg/kg.

Tanto as plaquetas, quanto MAGP1 e MAGP1-VG1 foram injetadas pela veia caudal dos animais cinco minutos antes da lesão na artéria carótida direita por FeCl₃.

Os grupos experimentais foram divididos conforme a figura 3.2 e realizou-se o procedimento cirúrgico de isolamento da carótida direita seguida por lesão através do FeCl₃ como descrito no item 3.3.

3.7. Proteômica de plaquetas

Para a análise proteômica de plaquetas o precipitado obtido como descrito no item 3.5 foi congelado a -80C por período overnight. Em seguida foi realizada a dosagem de proteína das amostras de plaquetas por Bradford, em placa de leitura de 96 poços e a leitura da absorbância foi realizada a 595nm no leitor de placas de ELISA modelo Synergy 2 (Biotek). As amostras foram separadas em alíquotas de 500µg de proteínas para a análise proteômica em gel 2D.

A amostra de 500µg de proteínas, provenientes das plaquetas, foi misturada a tampão Tiourea (ureia 7M; tiourea 2M; DTT 70mM; chaps 4%) e a 7µL de anfólito para pH de 4-7. A quantidade de tampão Tiourea era somado a quantidade da amostra de proteínas, em µL, e a quantidade de anfólito, a fim de se ter um volume final de 350µL. Uma pequena quantidade de Bromophenol Blue foi adicionada ao preparo da amostra. A amostra foi distribuída em sarcófago, e em seguida a tira de gel desidratado, com 18cm de comprimento para pH de 4-7 (GE healthcare) foi colocada em contato com a amostra e coberta por solução vedante plus one Dry strip Cover Fluid (Amersham Biosciences). Para a focalização isoeletrica foi utilizado o equipamento IPG phor (Pharmacia Biotech) com o programa que levou ao acúmulo de 70000V (figura 3.6).

Para a separação das proteínas por massa molecular (segunda dimensão) foi utilizado gel de poli-acrilamina 12,5% (H₂O 8,7ml; tris8,8 16,9ml; acrilamida 18,8ml; APS 10% 450µl; TEMED 45µL) preparado um dia antes da corrida e mantido a -20°C. Antes da separação das proteínas por segunda dimensão, a tira de gel desidratado com a amostra já focalizada, foi estabilizada em duas soluções de SDS (ureia 1,44g, tris8,8 200µL, glicerol 1,38mL; SDS 0,08g) a primeira contendo DTT e a segunda com iodocetamina, por 12 minutos cada. A tira estabilizada foi colocada sobre o gel de poli-acrilamida, o qual foi inserido em uma cuba contendo tampão de corrida (tris 30,3g/glicina 144,2g/ SDS 5g/ litro de água Milli-Q). A cuba foi ligada a uma fonte Electrophoresis Power supply- EPS601 (Amersham Biosciences), como mostra a figura 3.5, ajustada em dois programas: P1= 60V 400mA com duração de 1 hora e P3= 600V 35mA com tempo indeterminado, até o final da corrida.

Após a separação das proteínas em 2D o gel foi fixado em uma solução fixadora (ácido fosfórico 4mL; etanol 60mL) por período overnight (aproximadamente 16 horas). Por fim, o gel foi corado por três dias em solução de Coomassie Blue G (H₂O 50mL, ácido Fosfórico 20mL, sulfato de amônio 20g, brilliant Blue G 0,24g, metanol 40mL).

Depois de corados, os géis foram digitalizados pelo equipamento Image Quantum 150 (GE Healthcare) com a utilização do software Image Quantum 150 e posteriormente foram analisados pelo programa Mellanie 5.0. Foram comparados cinco géis de cada genótipo, selvagem (MAGP^{+/+}) e deficiente em MAGP^{-/-} (MAGP-1^{-/-}), para se estabelecer um único gel padrão para ambos, obedecendo semelhança de no mínimo 85% entre os géis. Logo após as regiões de cada padrão foram analisadas quanto à presença e à expressão de cada spot de proteína e em seguida os dois géis padrões foram comparados. A caracterização das proteínas por espectrometria de massas ainda não foi realizada.



Figura 3.6. Aparelho IPGphor de focalização isoelétrica, correspondente à 1ª dimensão da eletroforese 2D. Nesta etapa ocorreu a focalização isoelétrica em uma gama de pH de 4,0 a 7,0. Posteriormente as amostras foram submetidas à segunda etapa da eletroforese 2D.

3.8. Clonagem, Expressão e purificação da MAGP1DsRed

Para a expressão de proteínas por bactérias foi utilizado o Sistema PQE30 da QIAGEN. Neste sistema a expressão de proteínas é feita por indução com IPTG (IsoPropil Tio Galactosídeo) um análogo de lactose. Como estratégia de sub-clonagem, amplificamos o cDNA da DsRed do vetor adicionando um sítio de restrição para a enzima BamH1 na região 3' e 5' do segmento. Após amplificação por PCR, o fragmento amplificado foi tratado com a enzima, bem como o vetor pQE30-MAGP1. Eletroforese em gel de agarose foi realizada e os fragmentos foram purificados utilizando-se o kit Quick gel extracion (Invitrogen, Carlsbad). Uma reação de ligação foi realizada para posterior transformação das bactérias DH5 α (célula competente – cepa de E.coli).

3.8.1. Transformação em E. coli M15 competentes e DH5 α

Aproximadamente 5 μ L da reação de ligação purificada foram colocados no fundo de um tubo estéril e 50 μ L da suspensão de bactérias competentes foram colocadas sobre o DNA. A mistura ficou em repouso em gelo por 30 min e logo a seguir prosseguiu-se com o processo do choque térmico. Os tubos foram incubados a 42°C por exatamente 30 segundos e logo em seguida recolocados no gelo por mais 2 min. Logo

ápos, acrescentou-se ao conteúdo do tubo 500 µL 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). Os tubos foram então incubados a 37°C sob agitação constante (225 rpm) por 2 horas. As suspensões foram então plaqueadas em meio BHI-ágar, contendo 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C por 12-18 h. Algumas das colônias obtidas foram utilizadas para averiguar a expressão através do protocolo de expressão em pequena escala, como descrito pelo fabricante (QIAGEN, 2003).

3.8.2. Expressão em pequena escala (Mini-Expressão) de MAGP1DsRed

Algumas 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). Estas culturas saturadas foram diluídas 1:50 em 3 mL de meio 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 a 600 nm foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mmol/L para a indução da expressão da proteína. Essa indução ocorreu a 37°C, sob agitação constante (225 rpm) durante 4-5 h. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 4000xg por 20 min a 4° C. O precipitado foi ressuspensionado em 100 µL de tampão de lise e, destes, 20 µL foram unidos a 20 µL de tampão de amostra redutor duas vezes. Dessa mistura 20 µL foram submetidos a um SDS-PAGE. Após a corrida, o gel foi corado com azul de Coomassie para visualização das proteínas dos extratos bacterianos e para verificar quais clones apresentavam alta expressão do domínio de interesse. Uma colônia foi escolhida para a expressão em larga escala e purificação (QIAGEN, 2003).

3.8.3. Expressão e purificação em larga escala de MAGP1DsRed

Uma das colônias de *E. coli* M15 contendo o inserto foi escolhida após ensaio de mini-expressão foi cultivada em 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). Esta cultura saturada foi diluída 1:50 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 a 600 nm foi retirado 1 mL para controle e em seguida foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mmol/L para a indução da expressão da proteína. Então, a cultura foi agitada a 37°C por mais 4 h e 30 minutos, 1 ml foi retirado para controle. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 4000 xg por 20 min a 4°C. O precipitado foi utilizado no processo de purificação. Brevemente, o precipitado de bactérias obtido após indução, foi ressuspensionado em 10 mL de tampão de lise desnaturante (8 mol/L ureia, 100 mmol/L de NaH₂PO₄, 10 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0). O extrato bacteriano obtido foi clareado por centrifugação (10000 xg por 30 minutos, a 4°C) e o sobrenadante resultante foi incubado com 4 mL da resina NTA-Ni-Agarose, previamente equilibrada no tampão de lise sendo assim submetido a uma cromatografia de afinidade. Essa incubação ocorreu durante 12-18 h, a 4°C, em um tubo, sob rotação (Homogeneizador de solução AP22 Phoenix). As proteínas contendo a sequência de 6 histidinas ligaram à resina NTA-Ni-Agarose através de ligação de coordenação do cátion Ni²⁺ imobilizado e das histidinas presentes na quimera proteica com 6 histidinas. A resina foi transferida a uma coluna e lavada com 50 mL de tampão de lavagem (8 mol/L ureia, 100 mmol/L de NaH₂PO₄, 10 mmol/L de Tris-HCl pH 6,3) para que proteínas fracamente ligadas, por possuírem histidinas sequenciais, se desligassem da coluna e diminuíssem a contaminação da proteína de interesse. Após as lavagens, tentou-se eluir a proteína recombinante com 20

mL de tampão de eluição (8 mol/L ureia, 100 mmol/L de NaH_2PO_4 , 10 mmol/L de Tris-HCl pH 4,5). Todas as etapas da purificação foram monitoradas através de SDS-PAGE (Qiagen, Valencia, CA), corado com azul de Coomassie. A amostra então é renaturada através de uma diálise onde a mesma é submetida a uma solução de ácido acético 50 mmol/L. A amostra será liofilizada e a proteína obtida será ressuspensa em um pequeno volume de ácido acético 50 mmol/L (QIAGEN, 2003). Um pequeno volume desta amostra será aplicado em um gel SDS PAGE 12,5% para quantificação (Image Quant 150, GE).

4. Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm DP. As diferenças entre médias foram analisadas pelo teste t-Student, por meio do programa Prisma 5.0, com critério de significância $p \leq 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Trombose arterial induzida por cloreto férrico

No presente trabalho, utilizou-se de papel de filtro embebido em FeCl_3 com concentração de 15% para lesionar a artéria carótida de camundongos e essa concentração se mostrou propícia para causar uma lesão grave no vaso em questão, afinal foram necessários apenas dois minutos para que a substância disparasse o processo trombótico. Porém, a forma de embeber o papel de filtro se mostrou como uma interferência para que a lesão se tornasse padrão nos grupos de animais testados. O papel que foi encharcado em FeCl_3 e logo posicionado sobre a artéria carótida provavelmente sofreu variações na concentração de um teste para o outro o que resultou em diferenças significativas quanto ao tempo de oclusão em um mesmo grupo de animais em que se era esperado um tempo uniforme. Já o papel embebido em cloreto férrico e seco em estufa gerou uma lesão uniforme nos grupos de animais, o que resultou em dados significativos estatisticamente quanto ao tempo de oclusão entre os diferentes grupos, selvagens e deficientes em MAGP1.

Assim como o modelo fotoquímico de indução, a técnica de FeCl_3 em papel de filtro utilizada no presente trabalho mostrou que os animais deficientes em MAGP1 têm um atraso significativo na formação do trombo quando comparados aos animais selvagens, com tempo médio de oclusão de seis e dez minutos, respectivamente. Assim, mesmo utilizando-se de técnicas diferentes, a diferença no tempo de oclusão dos diferentes grupos de animais persistiu, mostrando que a técnica de indução do trombo por FeCl_3 foi eficaz.

Neste trabalho usou-se papel de filtro (1mmx1mm) embebido em FeCl_3 (15%) úmido ou seco em estufa para provocar a lesão arterial.

A análise do fluxo sanguíneo em animais selvagens e deficientes em MAGP1 em que se provocou a lesão da carótida direita por papel de filtro embebido em FeCl_3

ainda úmido não apresentou diferença significativa quanto ao tempo de formação do trombo entre esses animais. Além disso, dentro dos grupos com o mesmo genótipo houve alta variação do tempo de oclusão como mostra a figura 5.1. Tal resultado provavelmente foi gerado pela variação da quantidade de FeCl₃ aplicada ao embeber o papel de filtro na solução de FeCl₃, e causar a lesão com ele ainda úmido.

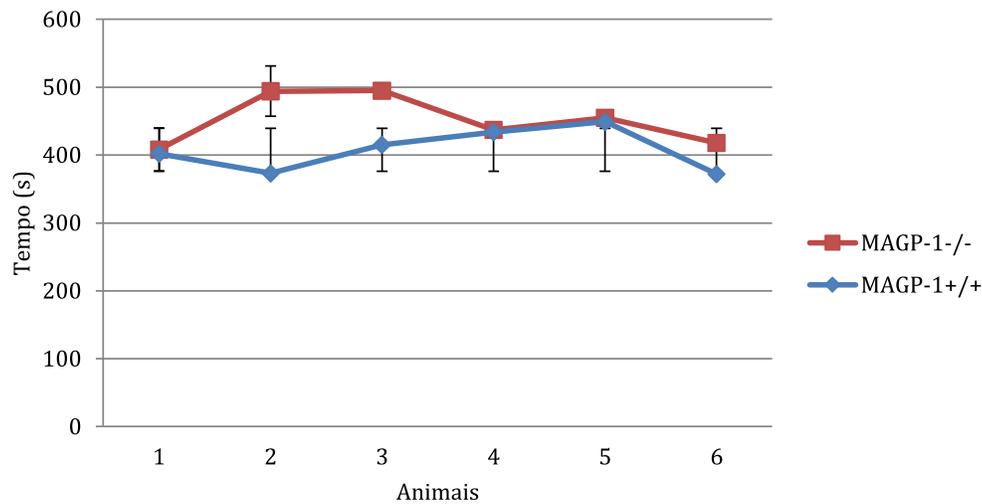


Figura 5.1. Tempo de oclusão da artéria carótida em animais selvagens e deficientes em MAGP1. Lesão vascular provocada por papel de filtro úmido embebido em cloreto férrico com concentração 15%. $n \geq 6$ para cada grupo.

Na tentativa de sanar o problema de variação na concentração de FeCl₃, o papel de filtro foi seco em estufa por período *overnight*. Com a utilização do papel de filtro embebido em solução de FeCl₃ e seco em estufa, a diferença do tempo de oclusão entre os animais controle e deficientes em MAPG1 foi significativa. Os animais selvagens apresentaram tempo de oclusão de 434.7 ± 19.56 segundos, enquanto MAGP^{-/-} teve o vaso ocluído em 616.8 ± 11.51 segundos ($p < 0.05$) (figura 5.2).

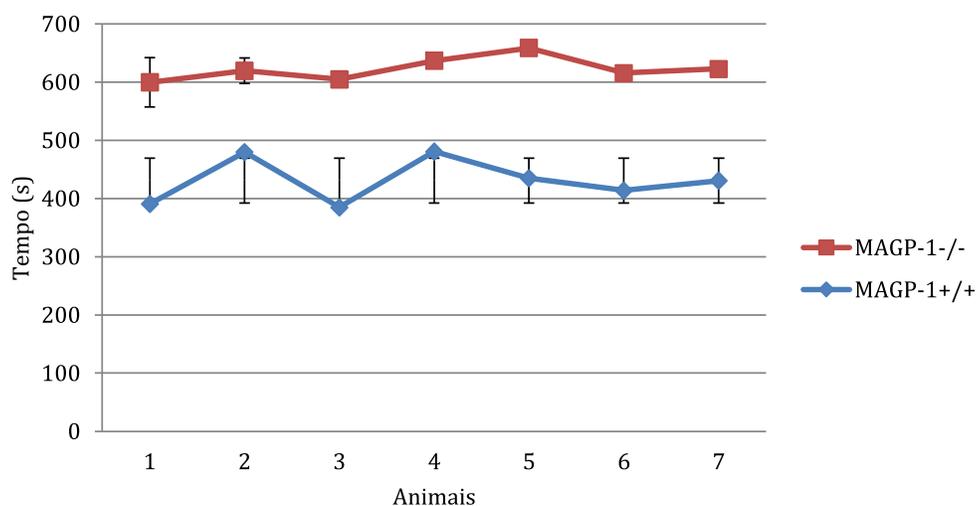


Figura 5.2. Tempo de oclusão da artéria carótida em animais selvagens e deficientes em MAGP1. Lesão vascular provocada por papel de filtro embebido em cloreto férrico com concentração 15% e seco em estufa. $n \geq 6$ para cada grupo.

As diferenças entre os resultados das metodologias utilizadas neste trabalho sugere que o papel embebido em solução de FeCl_3 15% e seco em estufa é o método mais eficaz e reprodutível para causar a lesão no vaso sanguíneo e verificar o tempo de formação do trombo no modelo animal escolhido, já que esta metodologia resulta em uma diferença significativa quanto ao tempo de oclusão entre os animais selvagens e os deficientes em MAGP1, reproduzindo os dados obtidos anteriormente, mostrando que MAGP1 tem função na hemostase e trombose arterial. A figura 5.3 mostra a diferença entre o tempo de oclusão de animais selvagens e deficientes em MAGP1 utilizando-se dos dois métodos para causar a lesão.

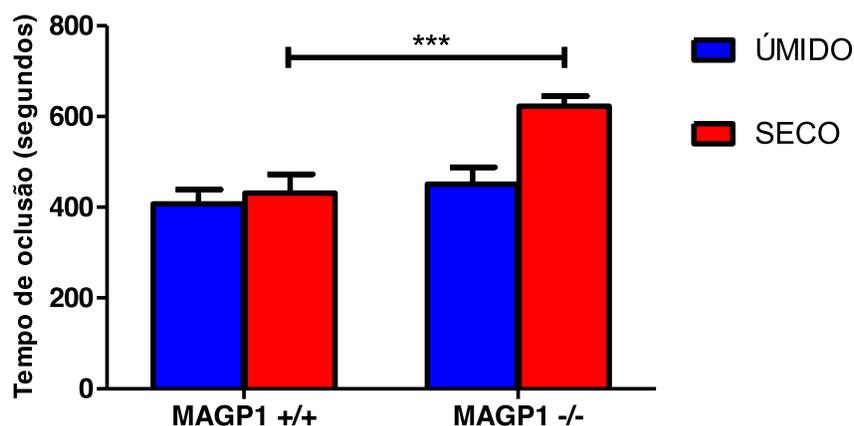


Figura 5.3. Comparação do tempo de oclusão com o uso de duas metodologias diferentes para ocasionar a trombose arterial por cloreto férrico. As barras azuis representam o tempo de oclusão da artéria carótida em animais MAGP^{+/+} e MAGP^{-/-} com a utilização do papel de filtro embebido em FeCl₃ (15%) ainda úmido. As barras vermelhas representam o tempo de oclusão da artéria carótida nos diferentes genótipos com a utilização do papel de filtro também embebido em FeCl₃ (15%) mas seco em estufa. n≥6 para cada grupo.

A trombose arterial é a causa mais comum de morte no mundo moderno. Para o estudo da trombogênese *in vivo* são utilizadas diversas técnicas para causar a injúria vascular. Entre as técnicas mais utilizadas, estão o modelo de indução elétrica, o modelo de injúria por cateter, indução fotoquímica e o modelo de indução por FeCl₃ (Owens and Mackman 2010).

Apesar de o modelo fotoquímico de indução estar bem estabelecido em nosso laboratório, esse método apresenta algumas desvantagens que impedem a utilização simultânea de outras técnicas, por exemplo, a microscopia intravital. Estudos anteriores e a nossa própria experiência mostraram que a técnica de indução fotoquímica exige grande tempo para a formação do trombo, o que ocasiona problemas na reprodutibilidade (Umemura 1997).

O FeCl₃ tem a propriedade de danificar o endotélio e expor a matriz subendotelial através de uma lesão oxidativa generalizada (Ni et al. 2000) e em apenas dois minutos pode danificar o vaso sanguíneo em estudo levando-o à oclusão (Watson et al. 1985; Kurz et al. 1990). Além de ser um método rápido, a técnica de indução da trombose arterial por FeCl₃ pode gerar lesões com gravidades e tempos diferentes através da variação na concentração de FeCl₃ (Farrehi et al. 1998), mostrando-se uma possível solução para os empecilhos encontrados na técnica de indução fotoquímica do trombo.

Eckly e cols. avaliaram a indução e formação do trombo utilizando diferentes concentrações de FeCl₃ e diferentes períodos de aplicação. A formação e o tamanho do trombo (μm^2) se mostraram dose dependente quando se utilizou as concentrações de FeCl₃ 2,5%, 5%, 7,5% e 10%. Maiores concentrações como 20% levaram o vaso à opacidade dificultando a visualização do trombo por microscopia intravital. Entretanto a lesão na artéria carótida por dois minutos, com papel de filtro embebido em FeCl₃ na concentração de 7,5%, não foi o suficiente para ocluir todo o diâmetro do vaso (Eckly et al. 2011).

Através de microscopia eletrônica, Eckly et al. constataram que após dois minutos de lesão na artéria carótida de camundongos por aplicação de FeCl₃, plaquetas, eritrócitos e fibrina eram encontrados junto com numerosos íons férrico esféricos no endotélio, aos quais as plaquetas se aderem formando agregados. Cinco minutos após a injúria foi observado trombo parietal, composto por grande número de plaquetas e coberto por fibrina. Oito minutos após a lesão, o lúmen do vaso sanguíneo foi totalmente ocluído por plaquetas ativas mais ao interior e discoides na periferia do vaso. O FeCl₃ parece alterar a habilidade de proteínas adesivas, como o colágeno, fibrinogênio e fator de von Willebrand na adesão das plaquetas (Eckly et al. 2011).

Dogne *et al.* utilizaram a técnica de indução de trombose por FeCl₃ na artéria coronária de suínos com concentrações de 20% e 50% dessa substância. Observou-se que as três camadas que constituem o vaso saudável, íntima, média e adventícia, foram danificadas no local onde se aplicou uma tira de tecido embebida em cloreto férrico com concentração de 50% por 45 minutos, já a substância em concentração de 20% não lesionou o vaso e neste caso não houve oclusão (Dogne et al. 2005).

Liu Xu *et al.* induziram a trombose arterial em camundongos à partir de dois papéis de filtro saturados com diferentes concentrações de FeCl₃ (2%, 2,4% e 2,5%), os quais foram colocados nos dois lados opostos da carótida, um abaixo e um acima, por 3 minutos. Após a leitura do fluxo sanguíneo por meio de uma sonda, constatou-se que com concentração de 2% o FeCl₃ não foi capaz de interferir no fluxo sanguíneo, em concentração de 2,4%, 6 de 9 animais tiveram o vaso ocluído em 30 minutos, já em concentração 2,5% o FeCl₃ foi capaz de causar uma lesão que levou a oclusão do vaso em 10 minutos. Assim, observou-se que quanto maior a concentração de FeCl₃ aplicado, mais rapidamente o vaso é ocluído. Neste estudo o uso de dois papéis de filtro aumentou a sensibilidade do vaso para a lesão, já que atingiu uma área maior do que se fosse usado apenas um papel de filtro (Wang and Xu 2005).

Tanto Dogne *et al.* quanto Liu Xu *et al.* sugerem que o FeCl₃ pode provocar lesão endotelial e a formação induzida de trombo oclusivo composto por plaquetas ativadas, fibrina e eritrócitos, porém a taxa de formação do trombo depende da concentração deste composto.

Embora nenhuma patologia humana tenha sido associada às mutações no gene de MAGP1, Weinbaum *et al.* verificaram que a ausência de MAGP1 está relacionada à obesidade e ao retardo no tempo de cicatrização dos tecidos em camundongos. Werneck *et al.* demonstraram, por meio de ensaios de indução fotoquímica com rosa de bengala,

que há necessidade de maior tempo para que ocorra a oclusão do vaso sanguíneo de animais deficientes em MAGP1 (aproximadamente 99 minutos) quando comparados a animais selvagens (aproximadamente 57 minutos). Além disso, mostrou-se que o animal heterozigoto para MAGP1 tem tempo de oclusão intermediário (73 ± 17.8 minutos), o que sugere que a dose do gene é efetiva na recuperação do tempo de formação do trombo. MAGP1 parece ter função, também, na hemostase no sistema venoso, já que o tempo de sangramento da veia caudal de camundongos MAGP1^{-/-} (150 ± 19 segundos) é maior do que em animais MAGP^{+/+} (81 ± 15 segundos) (Weinbaum et al. 2008; Werneck et al. 2008). O tempo prolongado no tempo de oclusão dos animais deficientes em MAGP também foi constatado através do modelo de indução por cloreto férrico, padronizado no presente trabalho.

5.2. Microscopia Intravital

No presente trabalho, a microscopia intravital pôde ser estabelecida devido à padronização da técnica de indução do trombo por FeCl₃ e foi importante no estudo da dinâmica de componentes do trombo, como as plaquetas. Além disso, a técnica expande as chances de se poder visualizar *in vivo* a atuação de MAGP1 na hemostasia.

A princípio, a artéria carótida direita dos animais MAGP^{+/+} e MAGP^{-/-}, isolada e lesionada por FeCl₃, foi submetida à microscopia intravital antes da lesão e por 12 e 15 minutos após a injúria. As imagens obtidas mostraram que a formação do trombo nos animais selvagens é mais rápida, aproximadamente 6 minutos, e o trombo se apresenta mais fixo à parede do vaso, enquanto que nos animais deficientes em MAGP1 a formação do trombo foi mais demorada, aproximadamente 10 minutos, aparentemente, devido às sucessivas embolizações que ocorreram durante a formação do trombo nesses animais (figuras 5.4 e 5.5). A quantificação da fração de área do vaso ocupada pelo trombo nas imagens também mostraram que a área ocupada pelo trombo é menor

(aproximadamente 50%) em animais deficiente em MAGP1 quando comparado a área ocupada em animais selvagens (aproximadamente 100%) (figura 5.6).

Tal constatação foi feita por Werneck *et al.* através do modelo fotoquímico de indução do trombo, onde a oclusão dos animais $MAGP^{+/+}$ foi rápida e o trombo se mantinha fixo à parede do vaso, uma vez que o trombo começava a se formar, em contraste com a trombose em animais $MAGP^{-/-}$, apresentou tempo prolongado para a oclusão, além de embolizações frequentes do trombo (Werneck et al. 2008).

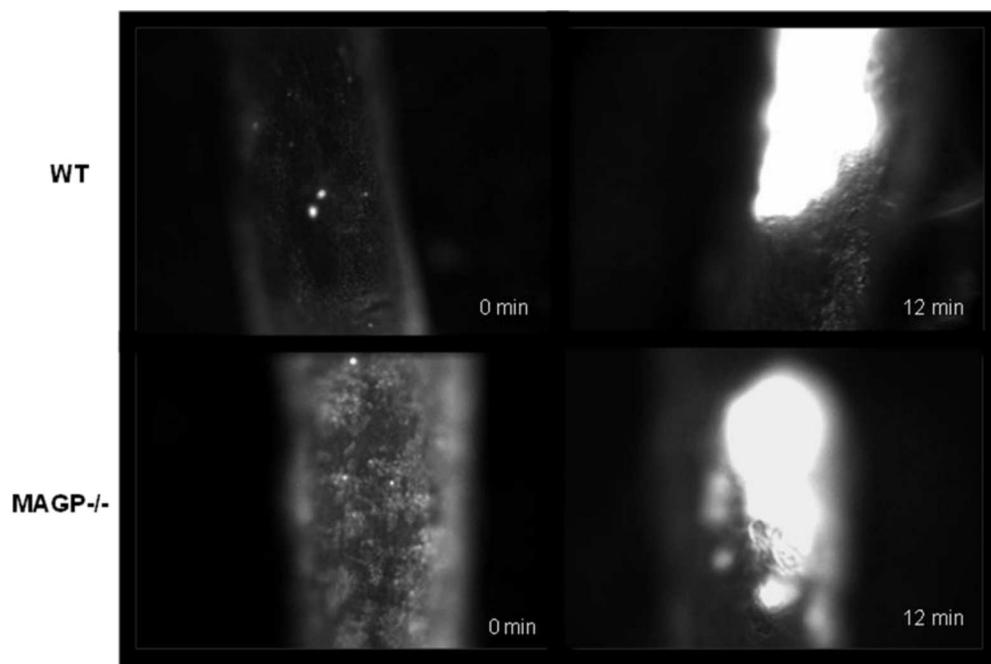


Figura 5.4. Microscopia intravital da formação da trombose arterial em camundongos selvagens e deficientes em MAGP1. Carótida direita dos animais $MAGP^{+/+}$ e $MAGP^{-/-}$ sem lesão (0 min.) e após 12 minutos da lesão ocasionada por papel de filtro embebido em cloreto férrico (15%) e seco em estufa, respectivamente. Aumento de 10X.

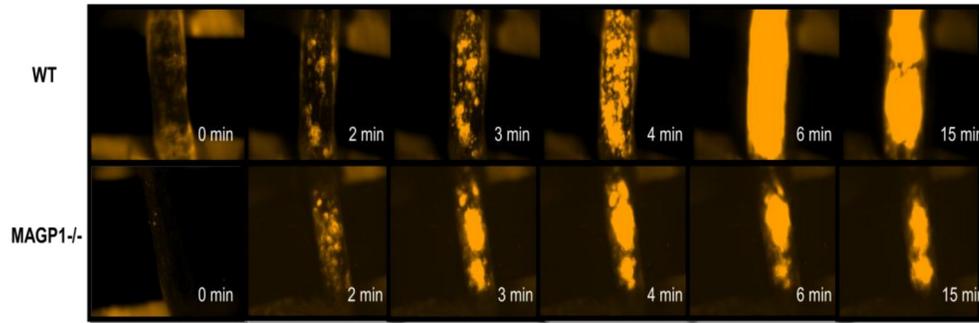


Figura 5.5. Microscopia intravital da formação da trombose arterial na artéria carótida direita de animais selvagens e deficientes em MAGP1. Carótida direita dos animais MAGP1^{+/+} e MAGP1^{-/-} antes da lesão (0 min.) e após a lesão em intervalo de 15 minutos. Aumento de 5X.

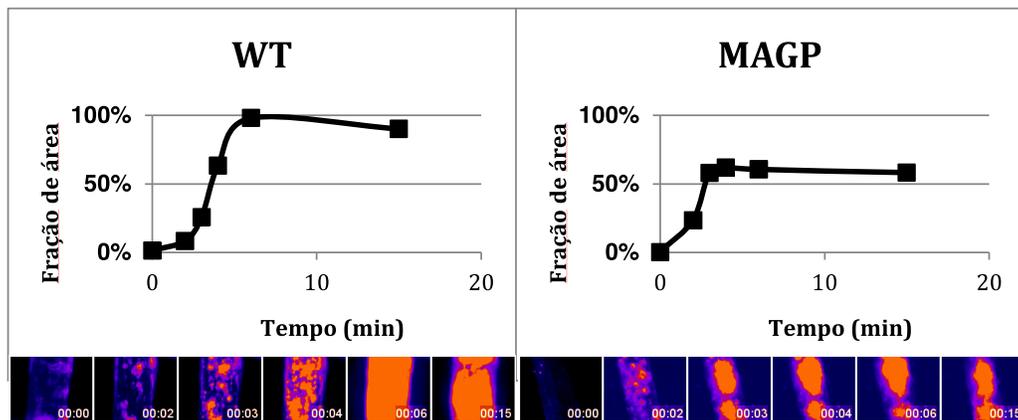


Figura 5.6. Análise quantitativa da técnica de microscopia intravital. As análises foram realizadas utilizando-se das imagens obtidas pela microscopia intravital e considerando a fração de área ocupada pelo trombo em cada uma das imagens, nos diferentes intervalos de tempo. Neste experimento foram marcadas as células brancas e plaquetas.

Posteriormente, os animais de ambos os genótipos receberam a injeção de MAGP1 recombinante e MAGP1-VG1, ambas obtidas por nosso grupo de pesquisa, e submetidos à microscopia intravital. Nos animais selvagens a injeção tanto de MAGP1 quanto MAGP1-VG1 não alterou a formação do trombo, como esperado, já que esses animais possuem MAGP1 endógena. Os animais MAGP1^{-/-} sofreram alterações na formação do trombo. Quando injetado MAGP1 recombinante (50 µg/kg de peso), a dinâmica de formação do trombo se tornou semelhante à formação trombótica dos animais selvagens e resultou em um trombo maciço, ocluindo grande área do vaso

(figura 5.7 e 5.8) e formado em menor tempo. Já a injeção de MAGP1-VG1 não foi capaz de resgatar o tempo de oclusão e nem evitar as embolização do trombo ocorrentes nos animais deficientes em MAGP1 (Figura 5.7 e 5.9), sugerindo que esta região da MAGP1 semelhante a TSP-1 parece ser importante para a estrutura e função da MAGP1 no processo trombótico.

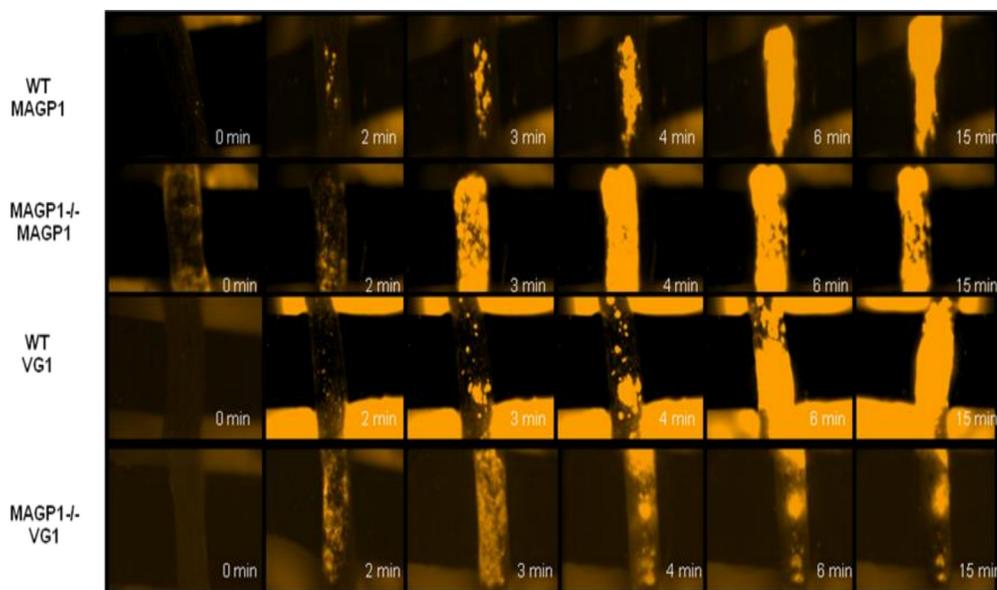


Figura 5.7. Microscopia intravital da formação da trombose arterial da artéria carótida direita de animais selvagens e deficientes em MAGP1, após a injeção de MAGP1 recombinante e MAGP1-VG1. Carótida direita dos animais MAGP1^{+/+} e MAGP1^{-/-} com a injeção de MAGP1 recombinante e MAGP1-VG1, antes da lesão (0 min.) e após a lesão em intervalo de 15 minutos. Aumento de 5X.

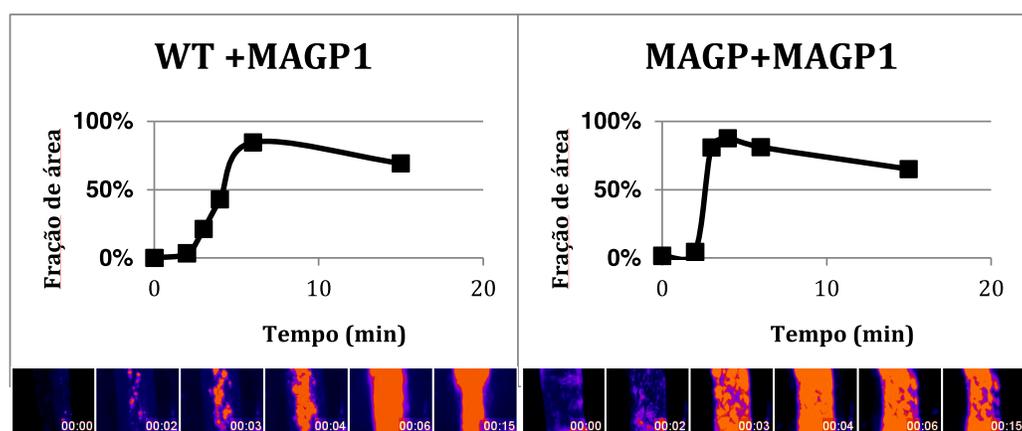


Figura 5.8. Análise quantitativa da técnica de microscopia intravital. As análises foram realizadas utilizando-se das imagens obtidas pela microscopia intravital e considerando a fração de área ocupada pelo trombo em cada uma das imagens, nos diferentes intervalos de tempo. Neste experimento foram marcadas as células brancas e plaquetas.

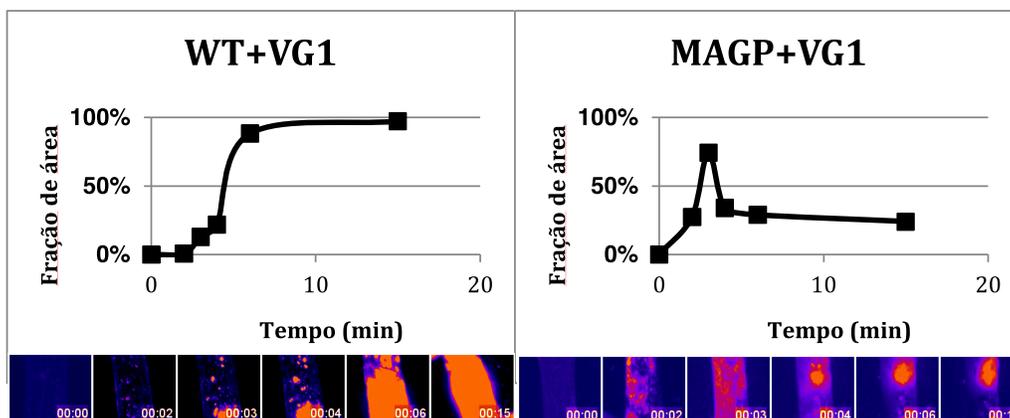


Figura 5.9. Análise quantitativa da técnica de microscopia intravital. As análises foram realizadas utilizando-se das imagens obtidas pela microscopia intravital e considerando a fração de área ocupada pelo trombo em cada uma das imagens, nos diferentes intervalos de tempo. Neste experimento foram marcadas as células brancas e plaquetas.

5.3. Injeção de plaquetas, MAGP1 e MAGP1-VG1

O fluxo sanguíneo dos grupos experimentais descritos no item 3.2 foi monitorado quanto ao tempo de oclusão com a injeção de plaquetas, de MAGP1 ou MAGP1-VG1, além disso, todos os grupos foram analisados por microscopia intravital.

As plaquetas têm função essencial na hemostase e alguns problemas nesse processo podem estar relacionados a anormalidades plaquetárias. Embora MAGP1 não esteja presente nas plaquetas, ela interage com outras proteínas importantes para a agregação das plaquetas, como o fator de Von Willebrand, fibronectina e fibrinogênio (Alevriadou et al. 1993; Israels et al. 2001; Werneck et al. 2004; Heemskerk et al. 2005; Werneck et al. 2008).

Owlowski *et al.* verificaram que a injeção de 50×10^6 plaquetas é suficiente para que ocorra a trombose venosa próximo ao original, ou seja, esta quantidade de plaquetas é suficiente para a formação do trombo em sistema venoso (Orlowski et al. 2009).

Estudos anteriores utilizaram-se da injeção de plaquetas para analisar a agregação plaquetária em arteríolas de animais deficientes em fibronectina (pFN) por microscopia intravital. Com a injeção de 5×10^6 plaquetas/g (aproximadamente 8% do

total de plaquetas endógenas) provenientes do mesmo genótipo do animal injetado e antes da lesão por FeCl₃ conseguiu-se mostrar diferenças na agregação plaquetária de animais selvagens e deficientes em pFN. Os camundongos deficientes em fibronectina não apresentaram defeitos quanto ao desenvolvimento trombótico e sim na estabilidade do trombo, sugerindo que a fibronectina tem função na ancoragem do trombo (Ni et al. 2000; Ni et al. 2003).

Neste trabalho a quantidade de plaquetas injetadas, 1×10^8 , corresponde à aproximadamente 6% da quantidade total de plaquetas endógenas, considerando que os camundongos têm aproximadamente 1×10^6 plaquetas por μl de sangue. O número de plaquetas foi escolhido de acordo com o objetivo do presente trabalho, que é avaliar a dinâmica das plaquetas na formação do trombo tanto em animais selvagens como deficientes em MAGP1^{-/-}. Uma maior quantidade de plaquetas poderia aumentar a volemia do animal e interferir na formação do trombo.

A injeção de plaquetas provenientes tanto de animais MAGP1^{+/+} quanto de animais MAGP1^{-/-} não demonstrou interferência significativa no tempo de oclusão dos animais dos diferentes genótipos (figuras 5.10 e 5.11), o que sugere que assim como demonstrado *in vitro*, as plaquetas não têm sua função prejudicada pela ausência de MAGP1, *in vivo*. Entretanto as imagens obtidas por microscopia intravital mostraram que apesar de as plaquetas se agregarem e aderirem normalmente na fase primária de formação da trombose, há uma instabilidade do trombo nos animais deficientes em MAGP1 (Figura 5.12), além disso, a quantificação da fração de área do vaso, ocupada por plaquetas marcadas, após a lesão arterial, mostrou que em animais MAGP1^{-/-} as plaquetas ocluem aproximadamente 50% do vaso, enquanto que em animais selvagens a oclusão é de aproximadamente 100% da área da artéria (figura 5.13). Assim, a análise da injeção das plaquetas por microscopia intravital sugere que MAGP1 não interfere na

adesão e agregação das plaquetas no início da formação do trombo, ao contrário do que ocorre, por exemplo, com animais deficientes em Fator de von Willebrand (vWF), molécula esta que tem função de induzir a adesão plaquetária primária (Ruggeri 1997). Nestes animais a ausência de vWF atrasa a adesão plaquetária (Ni et al. 2000).

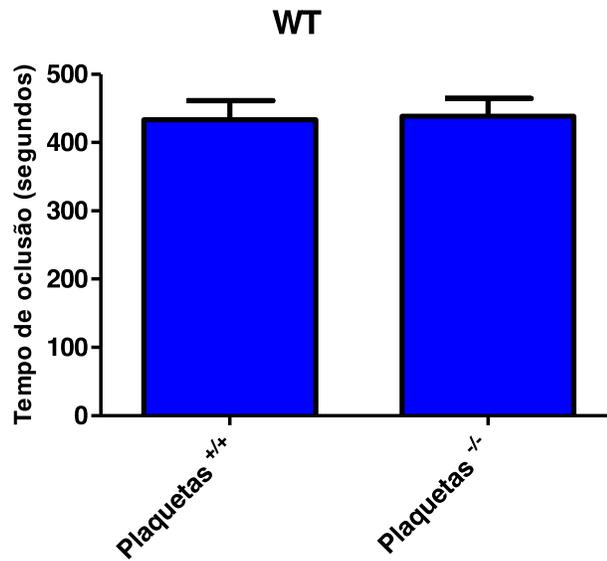


Figura 5.10. Tempo de oclusão da artéria carótida direita em animais $MAGP1^{+/+}$ após a injeção de plaquetas provenientes de animais $MAGP1^{+/+}$ e $MAGP1^{-/-}$, respectivamente. $n \geq 6$ para cada grupo.

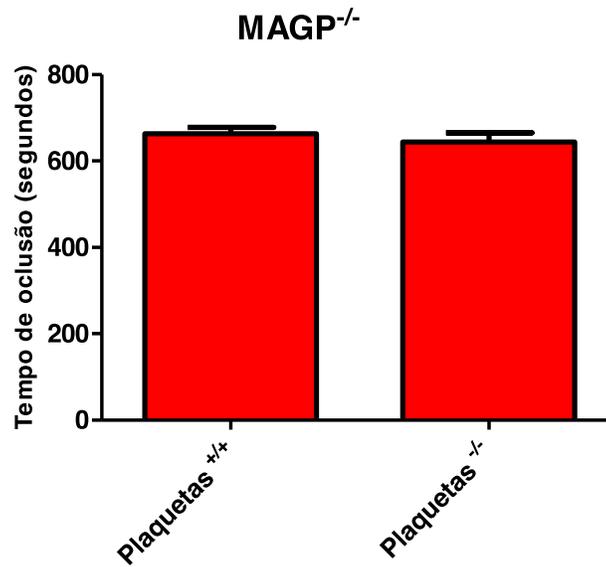


Figura 5.11. Tempo de oclusão da artéria carótida direita em animais MAGP^{-/-} após a injeção de plaquetas provenientes de animais MAGP^{+/+} e MAGP^{-/-}, respectivamente. n≥6 para cada grupo.

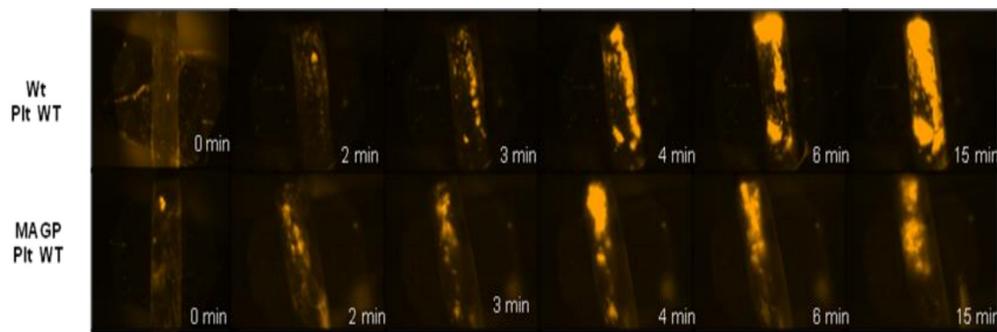


Figura 5.12. Microscopia Intravital da trombose arterial na carótida direita de animais selvagens e deficientes em MAGP1. Carótida direita de animais MAGP^{+/+} e MAGP^{-/-} com a injeção de plaquetas, antes da lesão (0 min.) e após a lesão em intervalo de 15 minutos. Aumento de 5X.

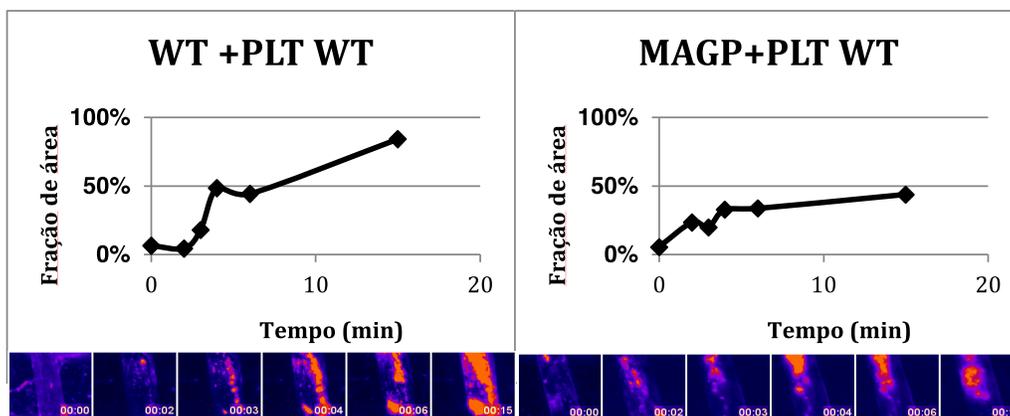


Figura 5.13. Análise quantitativa da técnica de microscopia intravital. As análises foram realizadas utilizando-se das imagens obtidas pela microscopia intravital e considerando a fração de área ocupada pelo trombo em cada uma das imagens, nos diferentes intervalos de tempo. Neste experimento foram marcadas somente plaquetas e injetadas em quantidade de 1×10^8 .

Apesar de animais $MAGP1^{-/-}$ apresentarem número reduzido de plaquetas ($770\,000 \pm 202\,000$ plaquetas/ μ l) quando comparados aos animais selvagens ($1\,020\,000 \pm 159\,000$ plaquetas/ μ l), não foram constatadas alterações evidentes na função das plaquetas de animais deficientes em $MAGP1$, quando submetidas a testes de agregação com vários agonistas (Colágeno, ADP, Ácido Aquidônico e Epinefrina). Isso sugere que as plaquetas de animais $MAGP1^{-/-}$ respondem ativamente ao processo trombótico como as plaquetas dos animais $MAGP1^{+/+}$ (Werneck et al. 2008).

Quando as plaquetas foram injetadas em conjunto a $MAGP1$ recombinante (50μ g/Kg de peso corporal), houve recuperação no tempo de oclusão dos animais $MAGP1^{-/-}$ (355.2 ± 14.11 segundos) em relação aos animais $MAGP1^{+/+}$ (353.5 ± 17.13 segundos) (Figuras 5.14 e 5.15). Werneck *et al.* já haviam demonstrado que a injeção de $MAGP1$ recombinante em concentração de 50μ g/Kg, consegue restabelecer o tempo de oclusão nos animais deficientes em relação aos selvagens, sugerindo sua possível participação no processo da trombogênese (Werneck et al. 2008).

$MAGP1$ recombinante quando injetada em animais $MAGP1^{-/-}$, pode ser visualizada por imuno-histoquímica na interface do trombo com a parede do vaso, o que

sugere que MAGP1 facilita a formação do trombo e mantém os componentes trombóticos ancorados à parede do vaso sanguíneo (Werneck et al. 2008).

Animais deficientes em TSP1 também sofrem diversas embolizações na formação do trombo, causadas por deficiência na adesão do trombo ao vaso lesionado, semelhante ao que ocorre com MAGP1 (Bonney et al. 2006).

A injeção de MAGP1 foi capaz de conter as embolizações ocorrentes nos animais MAGP1^{-/-} e formar um *plug* hemostático oclusivo, mostrando mais uma vez que sua função está possivelmente ligada a ancoragem e adesão do trombo ao vaso.

O ensaio intravital também mostrou que a injeção de MAGP1 recombinante consegue recuperar a dinâmica de formação do trombo, evitando as embolizações que geralmente ocorrem em animais MAGP1^{-/-} (Figura 5.16), além disso, a área do vaso ocupada pelo trombo em animais deficientes em MAGP1 foi maior com a injeção da MAGP1 recombinante (figura 5.17).

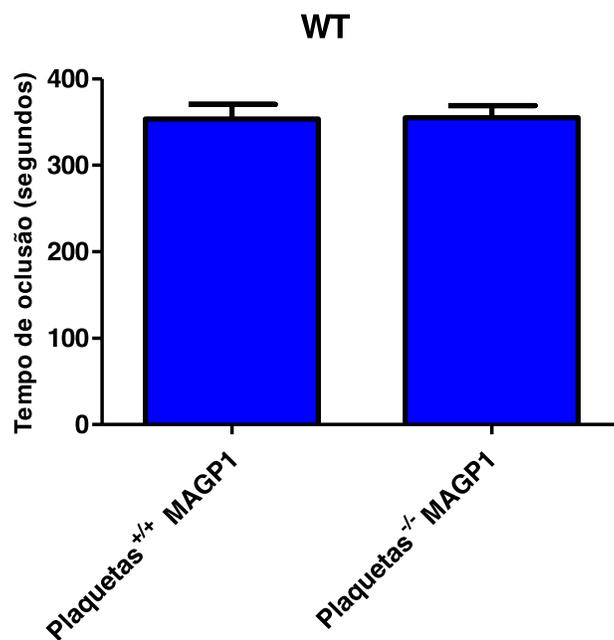


Figura 5.14. Tempo de oclusão da artéria carótida direita em animais MAGP1^{+/+} após a injeção de plaquetas provenientes de animais MAGP1^{+/+} e MAGP1^{-/-} e MAGP1 recombinante. n≥6 para cada grupo.

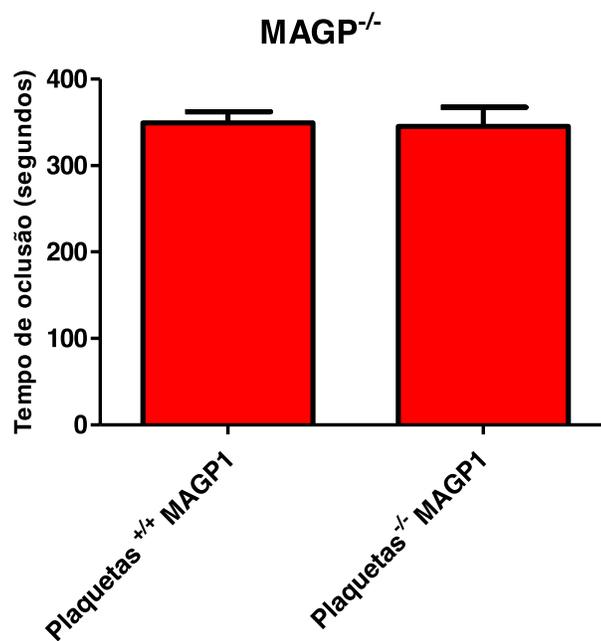


Figura 5.15. Tempo de oclusão da artéria carótida direita em animais MAGP1^{-/-} após a injeção de plaquetas provenientes de animais MAGP1^{+/+} e MAGP1^{-/-} e MAGP1 recombinante. n≥6 para cada grupo.

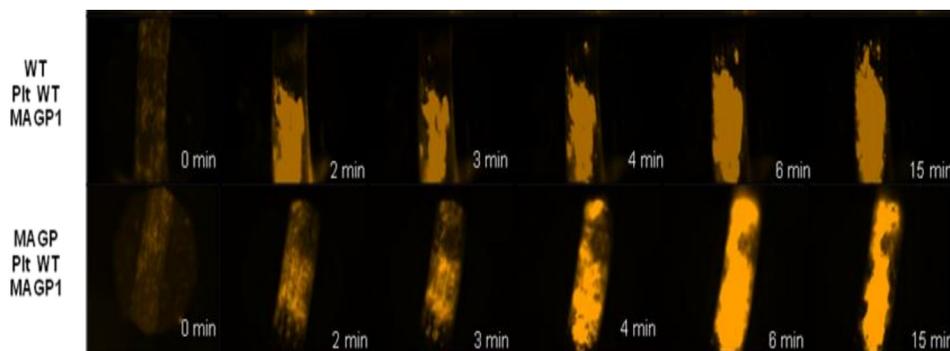


Figura 5.16. Microscopia intravital da trombose arterial na artéria carótida direita de animais selvagens e deficientes em MAGP1 com a injeção de plaquetas e MAGP1 recombinante. Carótida direita de animais MAGP1^{+/+} e MAGP1^{-/-} com a injeção de plaquetas e MAGP1 recombinante, antes da lesão (0 min.) e após a lesão em intervalo de 15 minutos. Aumento de 5X.

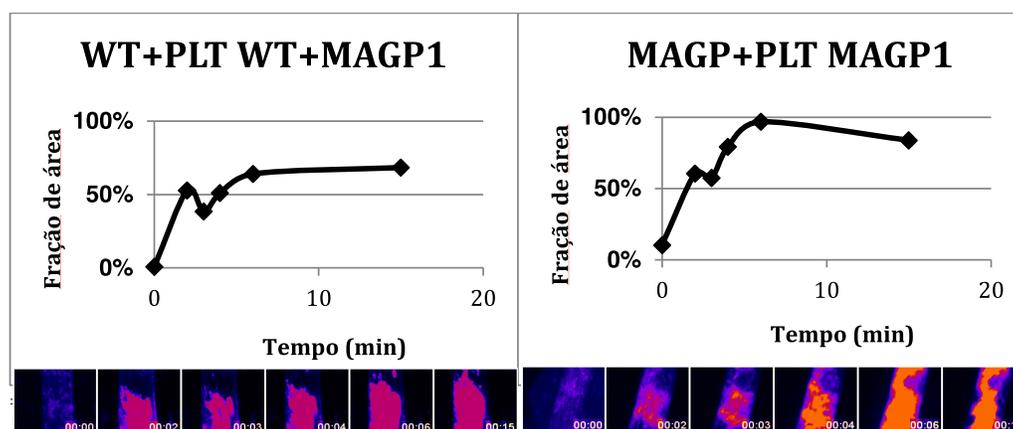


Figura 5.17. Análise quantitativa da técnica de microscopia intravital. As análises foram realizadas utilizando-se das imagens obtidas pela microscopia intravital e considerando a fração de área ocupada pelo trombo em cada uma das imagens, nos diferentes intervalos de tempo. Neste experimento foram marcadas somente plaquetas e injetadas em quantidade de 1×10^8 .

Em outro teste, as plaquetas foram injetadas com a MAGP1-VG1, mutante de MAGP1, com duas mutações pontuais feitas com a substituição de duas valinas por duas glicinas.

Um peptídeo da região C-terminal de MAGP1 é muito parecido com um peptídeo da mesma região da trombospondina 1 (TSP1), glicoproteína com função na agregação estável das plaquetas durante a formação do coágulo, que parece perder sua função quando se substitui, no peptídeo em questão, duas valinas por duas glicinas (Bonney et al. 2001).

A trombospondina está presente na parede dos vasos e nos α - grânulos das plaquetas, de onde pode ser secretada no caso da ativação plaquetária . É sintetizada por diversos tipos celulares como células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos (Lawler et al. 1993). Assim, foi de interesse do nosso laboratório fazer essa mesma mutação em MAGP1 a fim de verificar se esta também tem sua atividade em recuperar o tempo de oclusão alterada.

Lagadec et al. sugerem que TSP1 tem a função de recrutar plaquetas no caso de inflamação do endotélio. Além disso, TSP1 tem a propriedade de ancorar o trombo durante seu desenvolvimento em veias ou artérias danificadas (Bonney et al. 2001; Lagadec et al. 2003; Bonney et al. 2006).

Através da comparação das sequências de aminoácidos da MAGP1 com a da TSP1, é possível verificar um peptídeo bastante semelhante situado em suas regiões C-terminal. MAGP1, assim como a TSP1, tem habilidade de interagir com diversas proteínas da matrix extracelular, além disso, animais deficientes em TSP1, submetidos ao modelo fotoquímico de indução do trombo, apresentam tempo de oclusão aumentado (aproximadamente 23 minutos em artérias e 17 minutos em veias) em relação ao selvagem (aproximadamente 9 minutos em veias e 12 minutos em artérias) e a injeção de TSP1 (80 μ g/kg de peso corporal) é capaz de recuperar o tempo de oclusão em animais deficientes em TSP1 assim como ocorre com MAGP1 (Bonney et al. 2006).

Apesar das semelhanças, ao contrário de MAGP1, TSP1 tem sua função bem definida na agregação e adesão plaquetária, já que interage com vários receptores do processo de adesão, como CD36 (Boukerche and McGregor 1988) integrinas $\alpha_{11b}\beta_3$ ³² e $\alpha_v\beta_3$ ³³ e CD47, com proteínas adesivas como fibronectina, TGF-B e colágenos e com proteases como trombina, elastase e plasmina (Gao et al. 1996).

MAGP1-VG1 apresentou diferença significativa quanto ao tempo de oclusão, tanto quando comparado aos animais selvagens, quanto quando comparado aos animais deficientes em MAGP1, o que sugere que MAGP1-VG1 conseguiu diminuir levemente o tempo de oclusão em animais deficientes em MAGP1 (513.3 ± 16.67 segundos), entretanto não apresentou a mesma eficiência no resgate do tempo e na contenção das embolizações como MAGP1 recombinante. Além disso, MAGP1-VG1 não foi capaz de recuperar o tempo de oclusão em animais MAGP1^{-/-} quando comparados aos MAGP1^{+/+} (434.7 ± 19.56) (figuras 5.18 e 5.19), o que sugere que assim como realizado com peptídeos de trombospondina1, as mutações pontuais feitas em MAGP1 inativaram sua função na formação do trombo. Tais constatações foram confirmadas por microscopia intravital e pela quantificação da área ocupada pelo trombo, as imagens mostraram que mesmo com a injeção de MAGP1-VG1 ocorrem várias embolizações que dificultam a formação do trombo em tempo normal (figura 5.20 e 5.21).

Estudos futuros podem ser realizados para analisar especificamente o comportamento de moléculas, como MAGP1 no processo de formação do trombo, através da marcação fluorescente, MAGP1DsRed, e da visualização da dinâmica da molécula através da microscopia intravital.

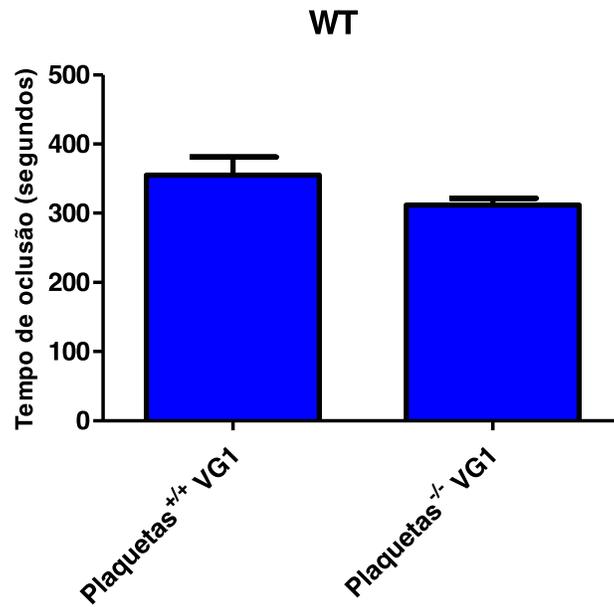


Figura 5.18. Tempo de oclusão da artéria carótida direita em animais MAGP1^{+/+} após a injeção de plaquetas provenientes de animais MAGP1^{+/+} e MAGP1^{-/-} e MAGP1-VG1. n≥6 para cada grupo.

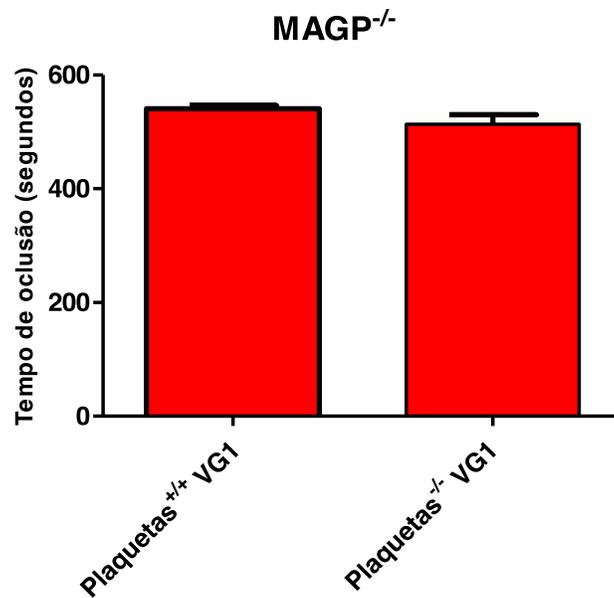


Figura 5.19. Tempo de oclusão da artéria carótida direita em animais MAGP^{-/-} após a injeção de plaquetas provenientes de animais MAGP1^{+/+} e MAGP1^{-/-} e MAGP1-VG1. n≥6 para cada grupo.

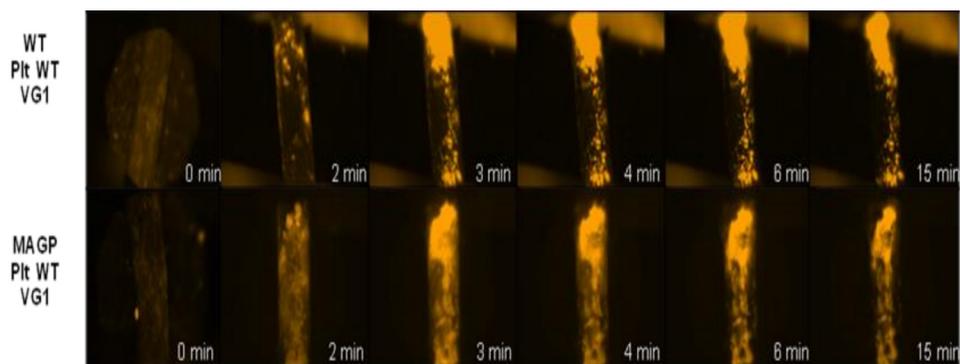


Figura 5.20. Microscopia intravital da artéria carótida direita de animais MAGP1^{+/+} e MAGP1^{-/-} com a injeção de plaquetas e MAGP1-VG1, antes da lesão (0 min.) e após a lesão em intervalo de 15 min.

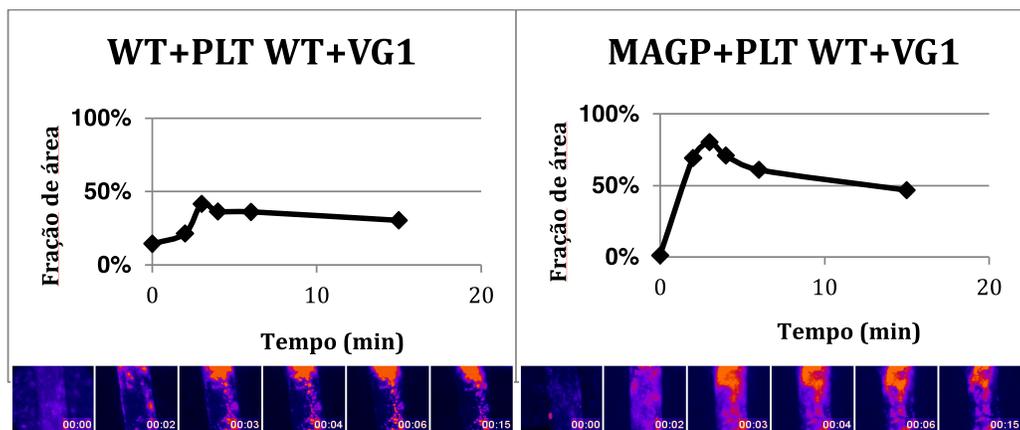


Figura 5.21. Análise quantitativa da técnica de microscopia intravital. As análises foram realizadas utilizando-se das imagens obtidas pela microscopia intravital e considerando a fração de área ocupada pelo trombo em cada uma das imagens, nos diferentes intervalos de tempo. Neste experimento foram marcadas somente plaquetas e injetadas em quantidade de 1×10^8 .

A análise de todos os grupos experimentais demonstra mais uma vez que MAGP1 recombinante é capaz de reestabelecer o tempo de oclusão em animais MAGP1^{-/-}, porém MAGP1-VG1 e as plaquetas provenientes de animais selvagens, quando injetadas na quantidade de 1×10^8 , não interferem significativamente no tempo de oclusão (Figura 5.22).

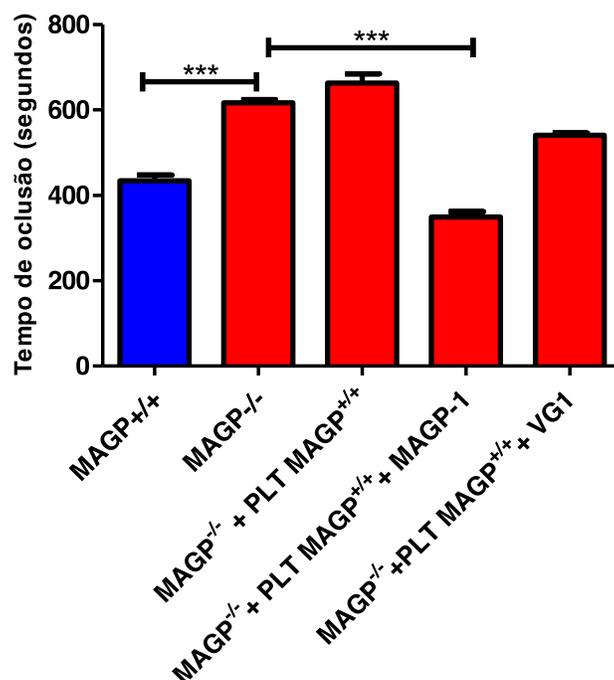


Figura 5.22. Comparação dos resultados com a injeção de plaquetas, MAGP1 recombinante e MAGP1-VG1 em camundongos deficientes em MAGP1. Os camundongos foram submetidos à lesão da artéria carótida direita por FeCl₃ e monitorados por sonda de fluxo sanguíneo. A injeção de plaquetas provenientes de animais selvagens e MAGP1-VG1 não foram capazes de resgatar o tempo de oclusão nos animais onde MAGP1 é ausente. Considerando o tempo de oclusão dos animais selvagens, apenas MAGP1 recombinante foi capaz de recuperar o tempo de de formação do trombo em animais MAGP1^{-/-}. n ≥ 6 para cada grupo.

5.4. Proteômica de plaquetas

Com o intuito de verificar diferenças nos conteúdos plaquetários que poderiam interferir na formação de um trombo sólido como visto nos camundongos MAGP1^{+/+}, as plaquetas de animais MAGP1^{+/+} e MAGP1^{-/-} também foram analisadas por proteômica, técnica que nos permitiu avaliar possíveis diferenças, quanto às proteínas presentes. Para análise, o melhor gel de cada genótipo, ou seja, aquele com maior número de spots, foi escolhido como padrão, gel da amostra 05 para MAGP1^{+/+} e gel da amostra 01 para MAGP1^{-/-}. O gel padrão de cada grupo foi comparado com mais quatro géis a fim de

avaliar se era reprodutível dentro do grupo. Os géis resultantes de plaquetas provenientes de camundongos MAGP1^{+/+} demonstraram semelhança de aproximadamente 95%, enquanto os géis de amostras de MAGP1^{-/-} apresentaram em média 91% de semelhança. A análise comparativa entre os géis padrões resultou em 87% de semelhança (Tabela 5.1) o que sugere que o padrão de distribuição e ocorrência das proteínas nas plaquetas dos diferentes animais são praticamente iguais. Contudo, uma análise mais cuidadosa das regiões dos géis, mostrou a ausência de alguns spots de proteínas no gel padrão de MAGP1^{-/-}, além de uma menor expressão em muitas delas (figuras 5.23 e 5.24).

Tabela 5.1- Comparação entre o gel 2D padrão de cada genótipo com seus reprodutíveis e entre os padrões.

Gel Padrão	Nome do Gel	Spots comuns	Semelhança (%)
Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 05	Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 01	107	91
Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 05	Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 02	114	95
Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 05	Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 03	116	97
Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 05	Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 04	112	94
Gel Padrão	Nome do Gel	Spots comuns	Semelhança (%)
Gel 2D- plaquetas MAGP1 ^{-/-} Amostra 01	Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 02	84	91
Gel 2D- plaquetas MAGP1 ^{-/-} Amostra 01	Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 03	85	92
Gel 2D- plaquetas MAGP1 ^{-/-} Amostra 01	Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 04	85	91
Gel 2D- plaquetas MAGP1 ^{-/-} Amostra 01	Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 05	83	90
Nome do gel	Nome do gel	Spots comuns	Semelhança (%)
Gel 2D- plaquetas WT-Amostra 05	Gel 2D- plaquetas MAGP1 ^{-/-} Amostra 01	97	87

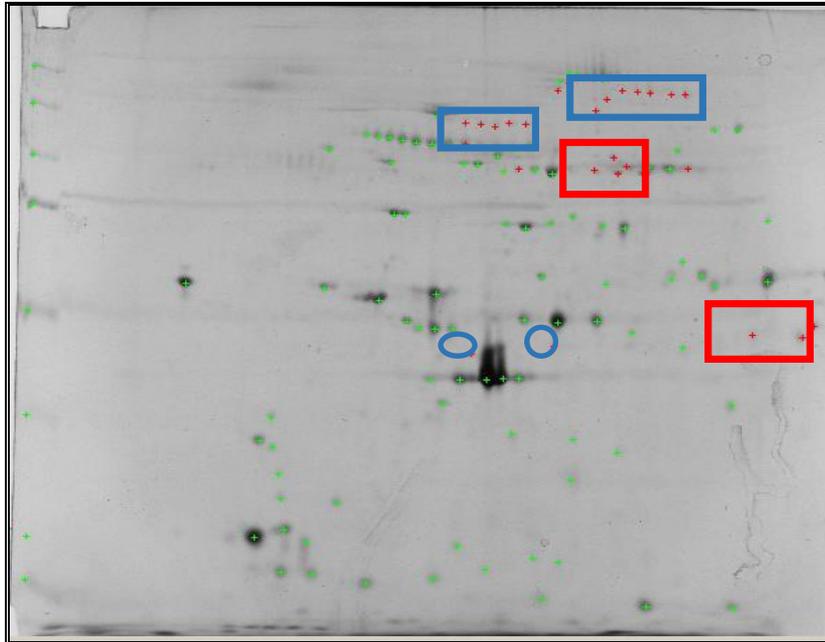


Figura 5.23. Eletroforese bidimensional de plaquetas provenientes de animais selvagens. Gel 2D obtido de amostra de plaquetas de animais MAGP1^{+/+}. Marcados em vermelho e destacados em azul os spots de proteínas que aparecem menos expressos na proteômica de plaquetas dos animais deficientes em MAGP1 e destacados em vermelho os spots que não aparecem em géis obtidos de amostras de plaquetas de animais MAGP1^{-/-} (n≥5).

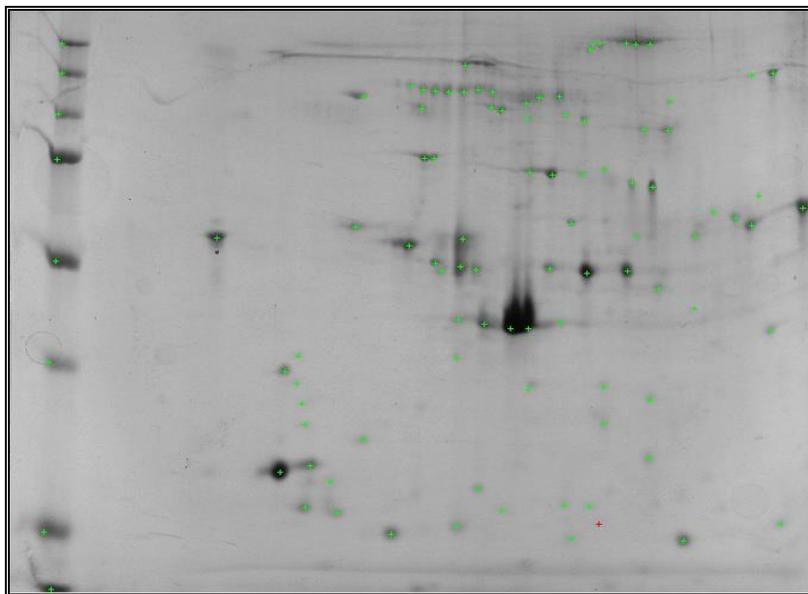


Figura 5.24. Eletroforese bidimensional de plaquetas provenientes de animais deficientes em MAGP1. Gel 2D obtido de amostra de plaquetas de animais MAGP1^{-/-}. Em verde todos os spots de proteínas que são comuns com o gel 2D de amostra de plaquetas provenientes de animais MAGP1^{+/+} e em vermelho um único spot exclusivo da proteômica de plaquetas de animais MAGP1^{-/-} (n≥5).

5.5. Clonagem, expressão e purificação de MAGP1DsRed

Com o objetivo de visualizar o destino da MAGP1 injetada durante a formação do trombo por microscopia intravital, iniciamos o processo de subclonagem e expressão da MAGP1 com uma cauda fluorescente (MAGP1-DsRed). Até o momento MAGP1 e DsRed foram clonadas, expressas e purificadas separadamente (Figura 5.25), entretanto o tempo experimental ainda não foi o suficiente para obtermos a ligação entre as moléculas.

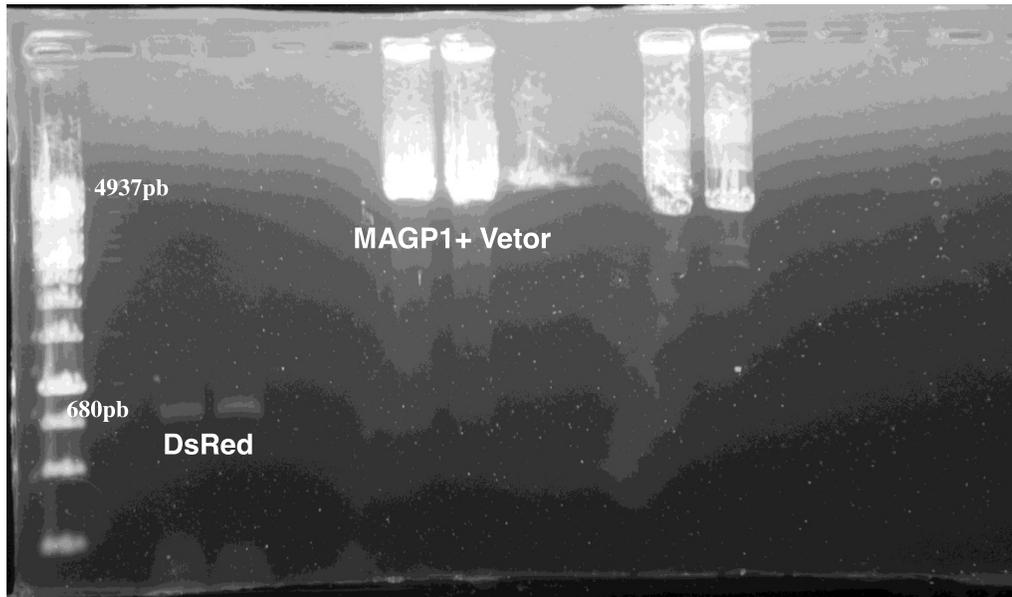


Figura 5.25. Eletroforese do DNA de MAGP1 e DsRed. Padrão eletroforético mostrando as bandas de MAGP1 ligada ao Vetor com aproximadamente 4937pb e DsRed com aproximadamente 680pb.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, temos como expectativas futuras, avaliar a morfologia dos trombos proveniente dos grupos experimentais testados, através da histologia; Caracterizar os spots de proteína encontrados, por espectrometria de massa; Clonar, expressar e purificar MAGP1DsRed e avaliar a dinâmica da molécula por microscopia intravital.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que:

- O método de trombose arterial induzida por FeCl_3 é efetivo quando utilizado o papel de filtro embebido em FeCl_3 (15%) e aplicado sobre a carótida por 2 min.
- A injeção de plaquetas provenientes de animais $\text{MAGP1}^{+/+}$ não é capaz de reestabelecer o tempo de oclusão aumentado em animais $\text{MAGP1}^{-/-}$.
- A injeção de MAGP1 recombinante consegue restabelecer o tempo de oclusão dos animais $\text{MAGP1}^{-/-}$.
- MAGP1-VG1 não foi capaz de reestabelecer o tempo de oclusão e nem evitar as embolizações em animais $\text{MAGP1}^{-/-}$.
- A proteômica das plaquetas provenientes de $\text{MAGP1}^{+/+}$ e $\text{MAGP1}^{-/-}$ resultou em géis semelhantes (similaridade >85%). Entretanto, uma análise mais minuciosa mostrou a ausência ou a menor expressão de alguns spots de proteínas no gel padrão de plaquetas de $\text{MAGP1}^{-/-}$. Assim, uma melhor investigação acerca da proteômica de plaquetas de animais deficientes em MAGP1 é necessária. Para isso pode-se usar outras técnicas de separação de proteínas e a espectrometria de massas.
- A análise da formação do trombo por microscopia intravital mostrou que a ausência de MAGP1 causa diversas embolizações do trombo durante a trombose e que MAGP1 recombinante é capaz de reestabelecer a adesão do trombo à parede do vaso, ao contrário de MAGP1-VG1 que não consegue promover a fixação do trombo na artéria carótida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albelda, S. M., W. A. Muller, et al. (1991). "Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule." The Journal of cell biology 114(5): 1059-1068.
- Alevriadou, B. R., J. L. Moake, et al. (1993). "Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets." Blood 81(5): 1263-1276.
- Ambrosio, G., I. Tritto, et al. (1997). "Reactive oxygen metabolites and arterial thrombosis." Cardiovascular research 34(3): 445-452.
- Andrews, R. K. and M. C. Berndt (2004). "Platelet physiology and thrombosis." Thrombosis research 114(5-6): 447-453.
- Atherton, A. and G. V. Born (1972). "Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel walls." The Journal of physiology 222(2): 447-474.
- Baetens, M., L. Van Laer, et al. (2011). "Applying massive parallel sequencing to molecular diagnosis of Marfan and Loeys-Dietz syndromes." Human mutation.
- Baird, G. S., D. A. Zacharias, et al. (2000). "Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(22): 11984-11989.
- Bates, E. R. and W. C. Lau (2005). "Controversies in antiplatelet therapy for patients with cardiovascular disease." Circulation 111(17): e267-271.
- Blackstock, W. P. and M. P. Weir (1999). "Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins." Trends in biotechnology 17(3): 121-127.
- Bonnefoy, A., K. Daenens, et al. (2006). "Thrombospondin-1 controls vascular platelet recruitment and thrombus adherence in mice by protecting (sub)endothelial VWF from cleavage by ADAMTS13." Blood 107(3): 955-964.
- Bonnefoy, A., R. Hantgan, et al. (2001). "A model of platelet aggregation involving multiple interactions of thrombospondin-1, fibrinogen, and GPIIb/IIIa receptor." The Journal of biological chemistry 276(8): 5605-5612.
- Boukerche, H. and J. L. McGregor (1988). "Characterization of an anti-thrombospondin monoclonal antibody (P8) that inhibits human blood platelet functions. Normal binding of P8 to thrombin-activated Glanzmann thrombasthenic platelets." European journal of biochemistry / FEBS 171(1-2): 383-392.
- Brooke, B. S., J. P. Habashi, et al. (2008). "Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome." N Engl J Med 358(26): 2787-2795.
- Brown, A. S., Y. Hong, et al. (1997). "Megakaryocyte ploidy and platelet changes in human diabetes and atherosclerosis." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 17(4): 802-807.
- Bunton, T. E., N. J. Biery, et al. (2001). "Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome." Circ Res 88(1): 37-43.
- Charbonneau, N. L., B. J. Dzamba, et al. (2003). "Fibrillins can co-assemble in fibrils, but fibrillin fibril composition displays cell-specific differences." The Journal of biological chemistry 278(4): 2740-2749.
- 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): 4364-4374.

- Cicmil, M., J. M. Thomas, et al. (2002). "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets." Blood 99(1): 137-144.
- Combs, M. D., R. H. Knutsen, et al. (2013). "Microfibril-associated Glycoprotein 2 (MAGP2) Loss of Function Has Pleiotropic Effects in Vivo." The Journal of biological chemistry 288(40): 28869-28880.
- Craft, C. S., T. J. Broekelmann, et al. (2012). "Oophorectomy-induced bone loss is attenuated in MAGP1-deficient mice." Journal of cellular biochemistry 113(1): 93-99.
- Craft, C. S., W. Zou, et al. (2010). "Microfibril-associated glycoprotein-1, an extracellular matrix regulator of bone remodeling." The Journal of biological chemistry 285(31): 23858-23867.
- Davis, E. C. (1994). "Immunolocalization of microfibril and microfibril-associated proteins in the subendothelial matrix of the developing mouse aorta." Journal of cell science 107 (Pt 3): 727-736.
- Dogne, J. M., S. Rolin, et al. (2005). "Characterization of an original model of myocardial infarction provoked by coronary artery thrombosis induced by ferric chloride in pig." Thrombosis research 116(5): 431-442.
- E.G., F. W. H. S. L. B. C. (1996). "Ultrastructural studies on early elastogenesis." Anatomia Rec. 115(13): 13.
- Eckly, A., B. Hechler, et al. (2011). "Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis." Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 9(4): 779-789.
- Farrehi, P. M., C. K. Ozaki, et al. (1998). "Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice." Circulation 97(10): 1002-1008.
- Fay, W. P., A. C. Parker, et al. (1999). "Vitronectin inhibits the thrombotic response to arterial injury in mice." Blood 93(6): 1825-1830.
- Finnis, M. L. and 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): 22817-22823.
- Furie, B. and B. C. Furie (1988). "The molecular basis of blood coagulation." Cell 53(4): 505-518.
- Furie, B. and B. C. Furie (2005). "Thrombus formation in vivo." The Journal of clinical investigation 115(12): 3355-3362.
- Gao, A. G., F. P. Lindberg, et al. (1996). "Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin." The Journal of biological chemistry 271(1): 21-24.
- Gibbins, J. M. (2004). "Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation." Journal of cell science 117(Pt 16): 3415-3425.
- Gorg, A., W. Postel, et al. (1985). "pH, urea and substrate gradients for the optimization of ultrathin polyacrylamide gel zymograms." Journal of biochemical and biophysical methods 10(5-6): 341-350.
- Habashi, J. P., D. P. Judge, et al. (2006). "Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome." Science 312(5770): 117-121.
- Ham, S. W., W.K. Lew, et al. (2010). "Thrombin use in surgery: an evidence-based review of its clinical use." Blood 1: 135-142.
- Harrison, P., C. Briggs, et al. (2004). "Platelet counting." Methods in molecular biology 272: 29-46.

- Hebestreit, H. F. (2001). "Proteomics: an holistic analysis of nature's proteins." Current opinion in pharmacology 1(5): 513-520.
- Heemskerk, J. W., M. J. Kuijpers, et al. (2005). "Platelet collagen receptors and coagulation. A characteristic platelet response as possible target for antithrombotic treatment." Trends in cardiovascular medicine 15(3): 86-92.
- Herbert, B. (1999). "Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis." Electrophoresis 20(4-5): 660-663.
- Herbert, B. R., J. L. Harry, et al. (2001). "What place for polyacrylamide in proteomics?" Trends in biotechnology 19(10 Suppl): S3-9.
- Israels, S. J., T. Cheang, et al. (2001). "Evaluation of primary hemostasis in neonates with a new in vitro platelet function analyzer." The Journal of pediatrics 138(1): 116-119.
- Jackson, D. E., C. M. Ward, et al. (1997). "The protein-tyrosine phosphatase SHP-2 binds platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and forms a distinct signaling complex during platelet aggregation. Evidence for a mechanistic link between PECAM-1- and integrin-mediated cellular signaling." The Journal of biological chemistry 272(11): 6986-6993.
- 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): 39661-39666.
- Jones, K. L., S. C. Hughan, et al. (2001). "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a negative regulator of platelet-collagen interactions." Blood 98(5): 1456-1463.
- Kamocka, M. M., J. Mu, et al. (2010). "Two-photon intravital imaging of thrombus development." Journal of biomedical optics 15(1): 016020.
- Kielty, C. M., T. J. Wess, et al. (2002). "Fibrillin-rich microfibrils: elastic biopolymers of the extracellular matrix." Journal of muscle research and cell motility 23(5-6): 581-596.
- Klose, J. (1975). "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals." Humangenetik 26(3): 231-243.
- Kuijpers, M. J., K. Gilio, et al. (2009). "Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model." Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 7(1): 152-161.
- Kuijpers, M. J., V. Schulte, et al. (2003). "Complementary roles of glycoprotein VI and alpha2beta1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 17(6): 685-687.
- Kumaratilake, J. S., M. A. Gibson, et al. (1989). "The tissue distribution of microfibrils reacting with a monospecific antibody to MAGP, the major glycoprotein antigen of elastin-associated microfibrils." European journal of cell biology 50(1): 117-127.
- Kurz, K. D., B. W. Main, et al. (1990). "Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride." Thrombosis research 60(4): 269-280.
- Lagadec, P., O. Dejoux, et al. (2003). "Involvement of a CD47-dependent pathway in platelet adhesion on inflamed vascular endothelium under flow." Blood 101(12): 4836-4843.
- Lawler, J., M. Duquette, et al. (1993). "The evolution of the thrombospondin gene family." Journal of molecular evolution 36(6): 509-516.

- Matz, M. V., A. F. Fradkov, et al. (1999). "Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species." Nature biotechnology 17(10): 969-973.
- McKusick, V. A. (1991). "The defect in Marfan syndrome." Nature 352(6333): 279-281.
- Neptune, E. R., P. A. Frischmeyer, et al. (2003). "Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome." Nature genetics 33(3): 407-411.
- Ni, H., C. V. Denis, et al. (2000). "Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen." The Journal of clinical investigation 106(3): 385-392.
- Ni, H., P. S. Yuen, et al. (2003). "Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(5): 2415-2419.
- Nurden, P., P. Savi, et al. (1995). "An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function." The Journal of clinical investigation 95(4): 1612-1622.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." The Journal of biological chemistry 250(10): 4007-4021.
- Orlowski, E., R. Chand, et al. (2009). "A platelet tetraspanin superfamily member, CD151, is required for regulation of thrombus growth and stability in vivo." Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 7(12): 2074-2084.
- oude Egbrink, M. G., G. J. Tangelder, et al. (1988). "Thromboembolic reaction following wall puncture in arterioles and venules of the rabbit mesentery." Thrombosis and haemostasis 59(1): 23-28.
- Owens, A. P., 3rd and N. Mackman (2010). "Tissue factor and thrombosis: The clot starts here." Thrombosis and haemostasis 104(3): 432-439.
- Pandey, A. and M. Mann (2000). "Proteomics to study genes and genomes." Nature 405(6788): 837-846.
- Pereira, L., K. Andrikopoulos, et al. (1997). "Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome." Nature genetics 17(2): 218-222.
- Pereira, L., S. Y. Lee, et al. (1999). "Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 3819-3823.
- Pyeritz, R. E. (2000). "The Marfan syndrome." Annual review of medicine 51: 481-510.
- Rabilloud, T., C. Adessi, et al. (1997). "Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." Electrophoresis 18(3-4): 307-316.
- Ramirez, F. and D. B. Rifkin (2003). "Cell signaling events: a view from the matrix." Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology 22(2): 101-107.
- Ramirez, F., L. Y. Sakai, et al. (2004). "Fibrillin microfibrils: multipurpose extracellular networks in organismal physiology." Physiological genomics 19(2): 151-154.
- Reinhardt, D. P., D. R. Keene, et al. (1996). "Fibrillin-1: organization in microfibrils and structural properties." J Mol Biol 258(1): 104-116.

- Robinson, P. N., E. Arteaga-Solis, et al. (2006). "The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders." J Med Genet 43(10): 769-787.
- Ross, J. M., L. V. McIntire, et al. (1998). "Fibrillin containing elastic microfibrils support platelet adhesion under dynamic shear conditions." Thromb Haemost 79(1): 155-161.
- Rucker, M., F. Roesken, et al. (1998). "A novel approach for comparative study of periosteum, muscle, subcutis, and skin microcirculation by intravital fluorescence microscopy." Microvascular research 56(1): 30-42.
- Ruggeri, Z. M. (1997). "Mechanisms initiating platelet thrombus formation." Thrombosis and haemostasis 78(1): 611-616.
- Sage, H. and W. R. Gray (1981). "Studies on the evolution of elastin-III. The ancestral protein." Comp. Biochem. Physiol. 68B: 473-480.
- Schmid-Schonbein, G. W., S. Usami, et al. (1980). "The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels." Microvascular research 19(1): 45-70.
- Segade, F. and R. P. Mecham (2005). "Regulatory elements of microfibril-associated glycoprotein-1 gene expression in muscle cells." Biochimica et biophysica acta 1731(3): 215-224.
- 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): 11050-11057.
- Sriramarao, P., L. R. Languino, et al. (1996). "Fibrinogen mediates leukocyte-endothelium bridging in vivo at low shear forces." Blood 88(9): 3416-3423.
- Tangelder, G. J. and K. E. Arfors (1991). "Inhibition of leukocyte rolling in venules by protamine and sulfated polysaccharides." Blood 77(7): 1565-1571.
- Thomassin, L., C. C. Werneck, et al. (2005). "The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers." J Biol Chem 280(52): 42848-42855.
- 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): 1499-1507.
- Tseng, M. T., A. Dozier, et al. (2006). "Transendothelial migration of ferric ion in FeCl₃ injured murine common carotid artery." Thrombosis research 118(2): 275-280.
- Umemura, K. (1997). "[A novel photochemical model of the middle cerebral artery for thrombosis research and evaluation of anti-thrombotic agents]." Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica 109(4): 175-185.
- Umemura, K., H. Ishihara, et al. (1995). "Anti-platelet effects of clopidogrel in rat middle cerebral artery thrombosis model." Thrombosis research 80(3): 209-216.
- Wagenseil, J. E. and R. P. Mecham (2007). "New insights into elastic fiber assembly." Birth Defects Res C Embryo Today 81(4): 229-240.
- Wall, M. A., M. Socolich, et al. (2000). "The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed." Nature structural biology 7(12): 1133-1138.
- Wang, X. and L. Xu (2005). "An optimized murine model of ferric chloride-induced arterial thrombosis for thrombosis research." Thrombosis research 115(1-2): 95-100.

- Watson, B. D., W. D. Dietrich, et al. (1985). "Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis." Annals of neurology 17(5): 497-504.
- 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): 25533-25543.
- Werneck, C. C., B. C. Trask, et al. (2004). "Identification of a major microfibril-associated glycoprotein-1-binding domain in fibrillin-2." The Journal of biological chemistry 279(22): 23045-23051.
- 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): 4137-4144.
- Wilson, C. A. and D. L. Hatchell (1991). "Photodynamic retinal vascular thrombosis. Rate and duration of vascular occlusion." Investigative ophthalmology & visual science 32(8): 2357-2365.

ANEXOS

Anexo I

Obtenção de formas proteicas mutantes

Primeiramente, objetivou-se a seleção dos vetores apropriados aos procedimentos de mutagênese programados. Para tanto, os vetores de expressão (Qiagen, Valencia, CA) disponíveis em estoque foram utilizados na transformação de células M15[pREP4]. A partir das colônias selecionadas, realizou-se a cultura em presença de antibióticos seletivos (ampicilina 100ug/ml e kanamicina 25ug/ml) e a indução de expressão da proteína de interesse através do uso de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, concentração final 5mM). As bactérias foram centrifugadas (3000g por 30 minutos) e o precipitado foi lisado com tampão de lise (NaH₂PO₄ 100mM + Tris-HCl 10mM + Uréia 8M pH 8,0) em agitador durante duas horas em temperatura ambiente. As amostras foram então submetidas à centrifugação por 30 minutos à 15000xg e o sobrenadante foi reservado para análise.

Realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e a expressão da proteína em questão avaliada em comparação ao perfil de expressão proteica das bactérias não induzidas com IPTG. Selecionou-se as amostras com maiores níveis de expressão para que fossem empregadas no processo de mutagênese.

Em posse do DNA plasmidial analisado em gel de agarose 0.7% e isolado das amostras com atividade de expressão mais significativa, procedeu-se com a mutação sítio-dirigida da região C-terminal. O produto do processo de PCR (Polymerasechainreaction) foi transformado em células supercompetentes Max Efficiency™ DH5 α ™ (Invitrogen) e plaqueado em meio sólido; Isolou-se seis colônias para posterior sequenciamento e confirmação da efetividade do procedimento.

As colônias submetidas à reação de sequenciamento cujo resultado mostrou-se positivo para a mutação de interesse (Figura 1) foram utilizadas na transformação de células M15[pREP4] (Qiagen), com subsequente cultura em presença de antibióticos seletivos (ampicilina 100ug/ml e kanamicina 25ug/ml) e indução de expressão com IPTG (concentração final 5mM). Os produtos desse processo foram analisados em gel de poliacrilamida 10%, como descrito na Figura 2 (Seção 5 – Resultados e Discussão).

O processo de purificação em coluna utilizando resina de NTA-Níquel (ácido nitrilo tri-acético) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, Valencia, CA).

O processo de mutagênese completo objetivou a obtenção de duas mutações pontuais sequenciais na região C-terminal, culminando na produção de proteínas com dois aminoácidos-alvo trocados. A segunda mutação dirigida procedeu de forma semelhante à anteriormente explicitada.

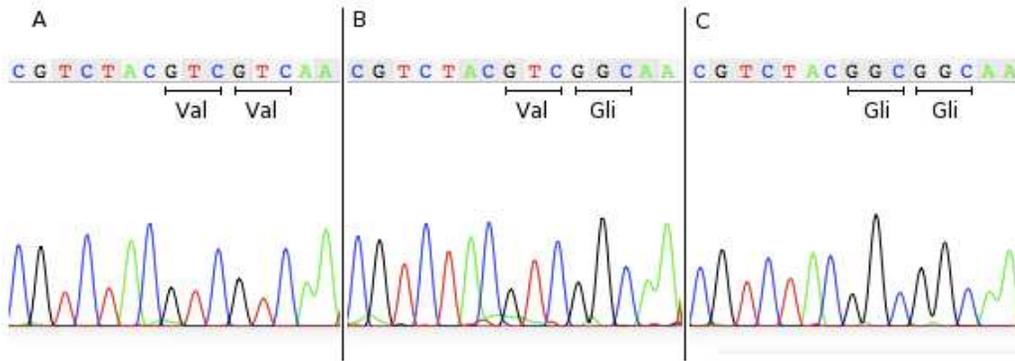


Figura 1. Sequências de DNA correspondentes ao vetor MAGP-1 oriundas do animal selvagem (A) ao vetor MAGP-1 submetido ao primeiro processo de mutagênese sítio dirigida (B) e ao vetor MAGP-1 ostentando a dupla mutação pontual (C). Em destaque, nota-se a alteração dos nucleotídeos alvo resultando na substituição inicial de um aminoácido em VG2 (B) seguido de uma dupla substituição em VG1 (C).

Obtenção da proteína mutante

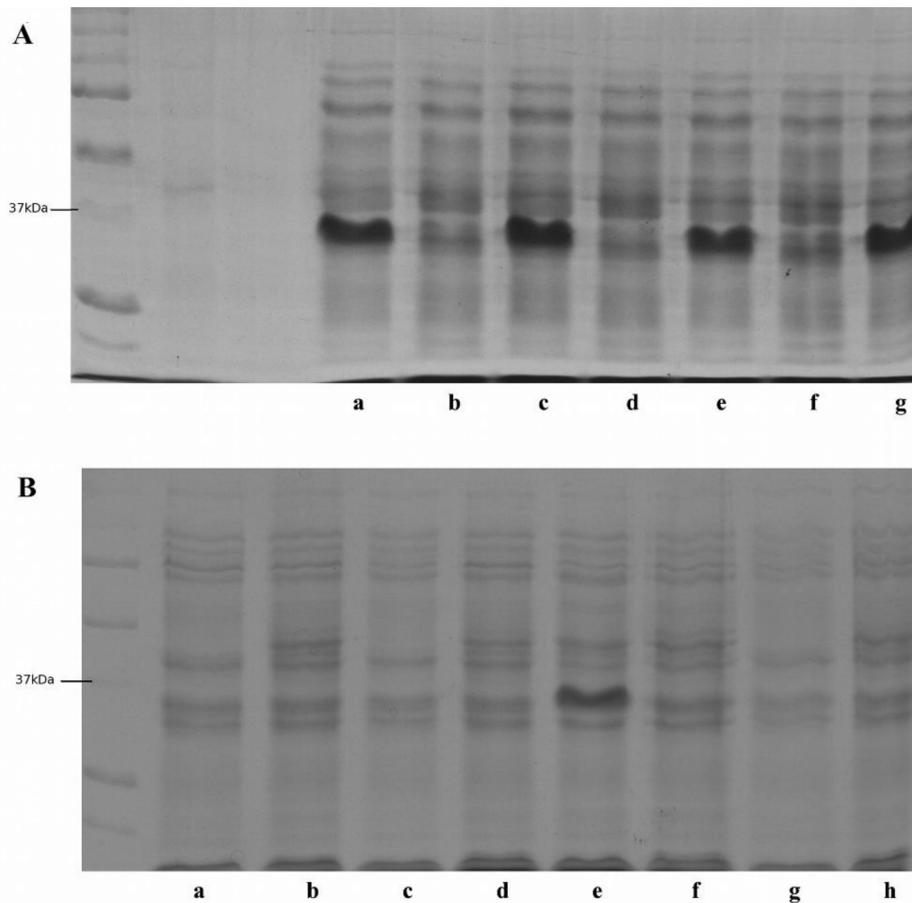


Figura 2. (A) MAGP bovina com mutação VG2 em gel de poliacrilamida 10%, após transformação em células M15[pREP4] e indução de expressão protéica. Amostras submetidas à indução com IPTG (5mM) evidenciadas por bandas escuras com aproximadamente 37kDa (a, c, e, g), enquanto amostras não induzidas (b, d, f) não apresentam banda significativa. (B) MAGP bovina com mutação dupla VG1 em gel

de poliacrilamida 10%. Após indução (a, c, e, g) é evidenciada atividade significativa de somente uma colônia, correspondente à banda e.

Tabela 1. Sequência de aminoácidos correspondentes a uma região de homologia compartilhada pela trombospondina-1 e MAGP-1. Em destaque, as formas mutantes do peptídeo 4N1K, com a substituição de duas valinas, e da MAGP-1 com alteração semelhante.

Proteína	Denominações adotadas	Sequência (aminoácidos)
Trombospondina-1	4N1K	KRFY VV MWKK
Trombospondina-1 mutante	4NGG	KRFY GG MWKK
MAGP-1	MAGP-1	RRVY VV NK
MAGP-1 mutante	VG1	RRVY GG NK

Anexo II

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada:
Avaliação da MAGP1 no processo de trombose arterial induzida por cloreto férrico e assistida por
microscopia intravital.

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e
biossegurança.

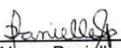
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

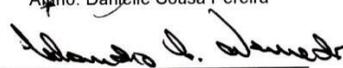
() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição:
_____.

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No.2395-1, Instituição: IB/Unicamp.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:
_____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização
dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese
ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do
aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Daniella Sousa Pereira


Orientador: Claudio Chrysóstomo Werneck

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

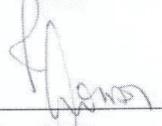
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da trombose arterial por microscopia intravital" (protocolo nº 2395-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck / Danielle Sousa Pereira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de maio de 2011.

Campinas, 04 de maio de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>