

JULLIANA CARVALHO CAMPOS DE OLIVEIRA

Interação do micoplasma e do SUMO na aterogênese e na resposta antilipemiante e anti-inflamatória do composto PTCTS em coelhos com dieta hipercolesterolêmica

Versão Corrigida

(A versão original se encontra disponível na Biblioteca do Programa de Pós-Graduação de Cardiologia e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP).

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

Programa de Cardiologia
Orientadora: Prof. Dra. Maria de Lourdes Higuchi

São Paulo

2020

JULLIANA CARVALHO CAMPOS DE OLIVEIRA

Interação do micoplasma e do SUMO na aterogênese e na resposta antilipemiante e anti-inflamatória do composto PTCTS em coelhos com dieta hipercolesterolêmica

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

Programa de Cardiologia
Orientadora: Prof. Dra. Maria de Lourdes Higuchi

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Campos de Oliveira, Julliana Carvalho
Interação do micoplasma e do SUMO na aterogênese
e na resposta antilipemiante e anti-inflamatória do
composto PTCTS em coelhos com dieta
hipercolesterolêmica / Julliana Carvalho Campos de
Oliveira. -- São Paulo, 2020.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientadora: Maria de Lourdes Higuchi.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.Doença infecciosa
3.Mycoplasma pneumoniae 4.Nanopartícula com
transialidade 5.Sumoilação

USP/FM/DBD-089/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

*Ao meu maior exemplo, a pessoa mais nobre que já conheci, meu guia de profissionalismo, por sempre estar comigo e pelo seu amor incondicional, a minha mãe, **Paula**. Sou e sempre serei eternamente grata por dividir todas as experiências dessas e de outras existências comigo. Estar ao seu lado, onde quer que seja sempre será um prazer, um aprendizado e uma renúncia. Tenho MUITO orgulho de ser sua filha! Obrigada por tudo!*

*A minha irmã, **Camilla**, por ser a pessoa mais importante da minha vida. Pelo amor que não consigo descrever, por me entender melhor que ninguém e nunca desistir de mim. É uma honra e um privilégio ser sua irmã!*

*Ao amor da minha vida, **Douglas**, pelo apoio, carinho, suporte, companherismo, parceria, amor, amizade e por acreditar em mim sempre! Espero poder retribuir tudo isso um dia e sempre demonstrar minha admiração e amor por ti. Te amo!*

*A pessoa que me fez sentir um amor sem limites, por ser minha razão de viver e por confortar meu coração, **Miguel**, you are my crazy little thing called love!!!*

*A minha orientadora, **Prof^a Dra. Maria de Lourdes Higuchi**, pela oportunidade de desenvolvimento e aprendizado desse trabalho, assim como, pelo crescimento pessoal. Obrigada por me ensinar a ver a cardiologia por outra perspectiva.*

*A **Renata Ikegami** e a **Suely Palomino** pelas lágrimas, alegrias, palavras de apoio quando estive em dúvida e pelo trabalho de espalhar a luz e o bem no laboratório.*

*A **Camila Moreno**, pela presença, pelo amor que me doa e por me ensinar a ser melhor.*

*A **Shérrira Garavelo** e **Jaqueline Pereira**, pelo exemplo de lealdade, amizade e cumplicidade entre vocês e por me fazer querer viver isso em um ambiente de trabalho. Sou fã ciumenta de vcs!!!*

*A **Marcia Reis e Joyce Kawakami**, pelas preciosas lições aprendidas.*

*Ao meu Pai, **Jose Luiz**, por me ensinar a amar a sala de aula.*

*As minhas tias, **Célia, Iara, Celina e Eny** que muito me aguentaram nessa longa jornada da vida. O carinho e o amor de vocês supera qualquer mal do mundo. Obrigada!*

*Ao meu cunhado, **Flávio**, pelo presente mais lindo que ele poderia me dar!!! Obrigada!!! Tê-lo como irmão mais velho é outro presente.*

*Aos meus padrinhos, **Rose e Jose** pela oportunidade de ter uma segunda família, ser a filha postíça de vcs. A certeza de que posso contar sempre com vocês me dá coragem de enfrentar o mundo.*

*Aos meus sogros, cunhada e sobrinho **Leo**, por entenderem minha ausência e pela torcida na primeira fila. Hoje eu sei que o fruto não cai longe da árvore. Obrigada!*

*Aos meus primos queridos, **Lígia, Luis Fellipe, Adriana, Anderson, Renato, Marcia**, por não desistirem de mim e me mostrar o verdadeiro significado da palavra primos!!*

*Aos meus eternos amigos, **Renata, Ana, Luciana, Laercio e João Carlos** do qual anos de amizade, confidências e companherismo, me fazem acreditar nas pessoas.*

*Ao meu “pai científico”, **Dr. Pedro Lemos**, por me ensinar que quando sabemos onde queremos chegar, os ventos sopram a favor. Admiração pela pessoa, profissional e pesquisador que o sr. é. Obrigada por um dia acreditar em mim.*

*A **Gisele**, pelas conversas, ensinamentos, seu exemplo de dedicação, correções em todas as palavras que escrevo e por ser a pessoa importante que você é na minha vida.*

*A **Luna**, a quem os caminhos longos e tortuosos não teriam feito sentido se não fosse por alinhar meus pensamentos e me mostrar o lado positivo do meu eu.*

*Os amigos de jornada **Fernanda Gallinaro, Keila Barbosa, Bruna Miranda, Elaine Tavares, Alessandra Rogério, Orlando Ribeiro, Vicente Silveira, Dr. Eduardo Pompeu e Donizete** não só pelos almoços, pudins, desabafos e happy hours, mas pela paciência e auxílio em todos os momentos.*

*As meninas da pós-graduação, **Juliana Lattari, Luana Guedes, Valdecira Ferreira, Mônica Souto, Neusa Dini e Dra Ludhmila Hajjar** por todo auxílio, competência, disposição e paciência prestados ao longo desses anos.*

*A **você**, que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuiu para esse trabalho e principalmente para meu crescimento profissional e pessoal, muito obrigada!*

“Se você julga as pessoas, você não tem tempo de amá-las”

Madre Teresa de Calcutá

“Quando a mulher negra se movimenta, toda a estrutura da sociedade se movimenta com ela.”

Angela Davis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquematização.....	17
Figure 2. Medida feita na coloração de SUDAN IV.....	19
Figura 3. Modelo de medições da área da placa.....	19
Figura 4. Reação de imunohistoquímica a ser analisada.....	22
Figura 5. Vetor usado na clonagem.....	25
Figura 6. Melt da curva de qRT-PCR.....	27
Gráfico 1 – Valores da bioquímica.....	31
Figura 7. Corte da macroscópica do CNegativo.....	32
Gráfico 2. Porcentagem de gordura	33
Figura 8. Corte da macroscópica CPositivo e PTCTS.....	33
Gráfico 3. Média das técnicas microscópicas.....	36
Figura 9. Fotomicrografia de cortes histológicos.....	37
Gráfico 4- Células positivas histoquímica de Masson.....	37
Figura 10. Fotomicrografia de cortes histológicos do CPositivo.....	38
Figura 11. Fotomicrografia de cortes histológicos do PTCTS.....	39
Figura 12. Fotomicrografia de cortes histológicos do CNegativo	40
Figura 13. Expressão de proteínas na Aorta.....	44
Gráfico 5 – Porcentagem de proteína.....	45
Gráfico 6. Quantificação absoluta do DNA de M. pneumoniae por qRT-PCR.....	46

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Relação de anticorpos utilizados na técnica de Western blotting.....	23
Tabela 2. Mediana do peso dos animais.....	29
Tabela 3. Mediana da largura, comprimento e área da Aorta.....	29
Tabela 4. Mediana dos valores da bioquímica.....	30
Tabela 5. Mediana da área da placa e porcentagem de gordura.....	34
Tabela 6. Mediana do número de células positivas.....	35
Tabela 7. Correlação de Spearman grupos separados.....	41
Tabela 8. Correlação de Spearman soma dos grupos.....	42
Tabela 10. Mediana da expressão proteica.....	43

Resumo

Campos-Oliveira JC. *Interação entre micoplasma e SUMO na aterogênese e na resposta antilipemiante e anti-inflamatória do composto PTCTS em coelhos com dieta hipercolesterolêmica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 2020

Introdução: Aterosclerose não é classificada como uma doença infecciosa, mas há evidências crescentes de que o estresse oxidativo, a inflamação, o diabetes, a obesidade e doenças valvares podem ser desencadeados por agentes infecciosos. Trabalhos prévios do laboratório mostraram grande quantidade de agentes infecciosos, principalmente o *Mycoplasma pneumoniae* nas placas de aterosclerose. Essa bactéria pode modular negativamente o sistema de modificação pós traducional, SUMO, para aumentar sua proliferação e infecção, inativando o sistema imunológico. PTCTS, uma nova droga que transloca o ácido siálico, foi usado na forma aquosa e diminuiu micropartículas de antígenos de *M.pneumoniae* no soro, mas não o tamanho das placas em estudos anteriores. **Objetivo:** Avaliar se nova formulação do composto em gel tem eficácia na remoção do *M.pneumoniae* podendo reestabelecer o sistema imunológico através do SUMO e diminuir aterosclerose. **Métodos:** Coelhos alimentados com dieta rica em colesterol ou não por 12 semanas receberam ou não tratamento com PTCTS e foram divididos em 3 grupos de 9 animais: CPositivo com dieta e sem tratamento; PTCTS com dieta e tratamento e CNegativo sem dieta e tratamento. As Aortas foram estudadas pelas técnicas de Imunohistoquímica para SUMO1, SUMO2/3, oxLDL e macrófago, TUNEL, Hibridação *in situ* e PCR real time quantitativo para DNA de *M. pneumoniae* e Western blotting para NFkB e receptor de LDL. **Resultados:** A dieta hipercolesterolêmica aumentou a quantidade de colesterol total ($p=0,0003$) nos grupos ateroscleróticos. O PTCTS diminuiu a porcentagem de área com placas de ateroma ($p=0,015$), do DNA de *M. pneumoniae* na placa na porção abdominal ($p=0,02$) e de oxLDL nas porções ascendente e abdominal ($p=0,02$ e $0,01$, respectivamente) e aumentou na porção abdominal a quantidade de SUMO1 ($p=0,04$), SUMO2/3 ($p=0,03$), de células apoptóticas ($p=0,005$) e de NFkB ($p=0,01$). **Conclusão:** PTCTS em gel mostrou melhor eficiência na remoção do *M. pneumoniae* promovendo uma ação antiaterosclerótica, anti-inflamatória e antilipemiante; aumentou proteínas sumoiladas e NFkB melhorando a resposta imune, reduzindo todos os elementos pesquisados que contribuem para a progressão da aterosclerose.

Descritores: Aterosclerose; infecção; *Mycoplasma pneumoniae*; PTCTS, Transialidase; Sumoilação.

Abstract

Campos-Oliveira JC. *Interaction between Mycoplasma and SUMO in atherogenesis and the anti-lipid and anti-inflammatory response of the PTCTS compound in rabbits on a hypercholesterolemic diet* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo”; 2020

Introduction: Atherosclerosis is not classified as an infectious disease, but there are many evidences that oxidative stress, inflammation, diabetes obesity and valve diseases can be triggered by infectious agents. Previous laboratory works showed large amount of infectious agents in human atherosclerosis, mainly *Mycoplasma pneumoniae*. This bacterium can use the post-translational modification system, SUMO, to increase its proliferation and infection by inactivating the immune system. PTCTS is a drug containing nanoparticles that translocates sialic acid, preventing mycoplasma from entering the cell and can also trigger inflammatory processes and the progress of atheromatous plaque. **Objective:** To assess whether the new PTCTS formulation in gel compound is effective in removing *M. pneumoniae* and if it can re-establish the immune system through SUMO, reducing, atherosclerosis. **Methods:** This trial studied rabbits that were fed with a cholesterol-rich diet, or not, for 12 weeks and received, or not, treatment with PTCTS, being divided into 3 groups: CPositive with diet and without treatment; PTCTS with diet and treatment and CNegative without diet and treatment. The collected Aortas were used in the immunohistochemistry techniques for SUMO1, SUMO2 / 3, oxLDL and macrophage, Tunel, In situ hybridization and quantitative real time PCR for *M. pneumoniae* DNA and Western blotting for NFkB and LDL receptor. **Results:** The hypercholesterolemic diet increased the amount of total cholesterol ($p=0.0003$) in atherosclerotic groups. PTCTS decreased the amount of percentage of the area with atheromatous plaques ($p=0.015$), *M. pneumoniae* bacteria in the abdominal portion ($p=0.02$) and oxLDL in the ascending and abdominal portions ($p=0.02$ and 0.01 , respectively) and increased the amount of SUMO1 ($p=0.04$), SUMO2 / 3 ($p=0.03$), apoptotic cells ($p=0.005$) and NFkB ($p=0.01$) in the abdominal portion. **Conclusion:** PTCTS has shown a better efficiency in the removal of the bacterium *M. pneumoniae* promoting an anti-atherosclerotic, anti-inflammatory and antilipemiant action, increasing sumoilated proteins and NFkB to improve the immune response, being able to reduce atherosclerosis in all aspects studying.

Descriptors: Atherosclerosis; Infectious disease; *Mycoplasma pneumoniae*; Nanoparticles transialidase, Sumoylation

Sumário

	LISTAS DE FIGURAS	
	LISTA DE TABELAS	
	RESUMO	
	ABSTRACT	
1	INTRODUÇÃO.....	8
1.1	PTCTS: no combate da aterosclerose.....	10
2	OBJETIVO.....	13
2.1	Objetivo principal.....	13
2.2	Objetivos secundários.....	13
3	MÉTODOS.....	15
3.1	Dieta dos animais.....	16
3.2	Coleta de sangue e métodos laboratoriais.....	16
3.3	Sacrifício dos animais.....	17
3.4	Estudo anatomopatológico.....	18
3.4.1	Preparo dos órgãos.....	18
3.4.2	Histoquímica.....	18
3.4.3	Preparação dos cortes para microscopia óptica.....	19
3.4.4	Imunohistoquímica.....	20
3.4.5	Hibridização <i>in situ</i>.....	21
3.4.6	TUNEL.....	21
3.5	Western blot.....	22
3.6	Preparo molecular DNA micoplasma.....	23
3.6.1	Obtenção das amostras para PCR	23
3.6.2	Clonagem para <i>M. pneumoniae</i>.....	24
3.6.3	Transformação por choque térmico.....	25
3.6.4	Extração e quantificação do <i>M. pneumoniae</i>.....	25
3.6.5	Quantificação absoluta por PCR real time (qRT-PCR).....	25
3.7	Análise estatística.....	27
4	RESULTADO.....	29
5	DISCUSSÃO.....	48
6	CONCLUSÃO.....	55
7	REFERÊNCIAS.....	57

1. Introdução

Aterosclerose é uma desordem focal vascular inflamatória crônica, que geralmente começa com o acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) após uma lesão endotelial em regiões específicas do vaso sofrendo várias modificações, como a oxidação, disfunção das células endoteliais (ECs), redução da biodisponibilidade do óxido nítrico e formação das células xantomatosas¹.

Uma das perguntas que permanece é o que leva à disfunção endotelial localizada, com acúmulo de LDL oxidada (oxLDL).

A oxLDL está envolvida na formação da placa, e sua progressão pode ser acelerada pelo estresse oxidativo e a inflamação desempenhando um papel interconectado².

Atualmente, há evidências crescentes de que o estresse oxidativo, a inflamação, o diabetes, a obesidade e doenças valvares podem ser desencadeados por agentes infecciosos^{3,4}.

Trabalhos prévios do nosso laboratório, mostraram grande variedade de agentes infecciosos em placas gordurosas humanas, no interior das células xantomatosas, principalmente o *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), que apresenta características únicas como a necessidade de colesterol para sua sobrevivência⁵.

Micoplasmas são bactérias da classe Mollicutes, com poucas organelas e que crescem em simbiose, interagindo com células do hospedeiro⁶, porque não conseguem sintetizar muitas moléculas essenciais, como os aminoácidos, ácidos graxos e colesterol precisando buscá-los no ambiente do hospedeiro. Em sua membrana apresentam 2 tipos de lipídeos: fosfolipídeos e glicolipídeos onde seriam necessários pelo menos 10 tipos de enzimas para sintetizá-los e somente 3 são encontradas em seu nível de sequência de DNA⁷.

Além do micoplasma, outro agente infeccioso bastante encontrado nas placas de ateroma foi a *Chlamydophila pneumoniae*⁸, que foi relacionada à disfunção nas EC, permitindo a entrada da oxLDL na região subendotelial⁹.

Outro fator que pode estar envolvido na disfunção das ECs e na progressão da aterosclerose é a modificação pós traducional de proteínas, adicionando um grupo SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) a proteína-alvo. Essa modificação é conhecida como Sumoilação.

SUMO são proteínas de aproximadamente 18 kDa, que apresentam 4 isoformas: SUMO1, SUMO2, SUMO3 e SUMO4. SUMO1, 2 e 3 são expressos em tecidos e em todas as fases de desenvolvimento¹⁰. SUMO2 e 3 compartilham cerca de 97% de igualdade e junto com SUMO1 estão relacionados às condições de estresse^{11,12}.

Sumoilação leva à alteração da função e/ou localização das proteínas-alvo, podendo ter um efeito na atividade funcional de vários mecanismos, mesmo em pequena quantidade de proteína sumoilada¹³.

O processo de sumoilação envolve a ativação enzimática da E3 ligase, que transfere o SUMO ao resíduo de lisina do substrato, e a desconjugação envolve a protease SENP, enzima responsável pela quebra da ligação^{14,15}.

Da variedade de processos biológicos regulados pela sumoilação destacam-se: a transcrição gênica, a diferenciação e o desenvolvimento das células, o controle do ciclo celular, a estabilidade proteica, o reparo de DNA, o processamento do RNA e o transporte núcleo-citoplasma¹⁶. SUMO pode regular a transcrição, quando está conjugado a fatores de transcrição, influenciando as funções de ativação ou supressão em um subconjunto específico de promotores¹⁷.

Por esses motivos, a diminuição da molécula SUMO aumenta a quantidade de moléculas de adesão no endotélio, causando o remodelamento vascular mediado por inflamação, e diminuindo a ativação do fator nuclear kappa B (NFkB)¹⁸.

O NF κ B é uma família importante de fatores de transcrição que são ativados por uma variedade de estímulos inflamatórios¹⁹. Tem um papel central na resposta imune do hospedeiro a infecção por patógenos microbianos²⁰. A atividade funcional do NF κ B é regulada pela sumoilação através de uma variedade de caminhos. Regula indiretamente os fatores, como a conjugação de NEMO (NF- κ B essential modulator) pelo SUMO que aumenta a atividade de NF κ B²¹.

Certos patógenos bacterianos também interferem no sistema de sumoilação, geralmente inibindo esse processo para entrar na célula do hospedeiro, aproveitar os componentes celulares como as proteínas, metabólitos e lipídeos para sua replicação, neutralizar o sistema imunológico e se espalhar para as células vizinhas.^{22,23}

Com a descrição dos genes do micoplasma²⁴ codificando proteases específicas SUMO (SENP) do sistema de sumoilação, que têm a função de desconjugar as proteínas SUMO dos seus substratos, permite assim, a adaptação dos patógenos em vários ambientes²⁵.

1.1 PTCTS no combate a aterosclerose

Após vários estudos buscando reduzir agentes infecciosos e inflamação exacerbada em doenças crônicas, Higuchi²⁶ desenvolveu um novo composto formado por nanopartículas antioxidantes provenientes de plantas medicinais associadas à transialidase (PTCTS - particulated transialidase) cujo método de obtenção e preparação está protegido por patentes concedidas nos Estados Unidos (nº. 7.914.781, em 29 de março de 2011) e no Brasil (nº. PI0101648-8), produzidas pela H&S Ciência e Biotecnologia Ltda²⁷. Esse composto PTCTS poderia levar à regressão do processo aterosclerótico ao eliminar micoplasmas através da sua capacidade de realocação de ácidos siálicos e diminuir inflamação.

Os ácidos siálicos, uma família de amino-açúcares, estão envolvidos em interações célula-célula²⁸ e sempre ocupa a posição terminal dos glicolipídios. Desempenham papéis essenciais em muitos processos fisiológicos e patológicos importantes, como embriogênese do sistema nervoso, metástase do câncer, infecção bacteriana e viral^{29,30}.

Pesquisas clínicas demonstraram que altos níveis plasmáticos de ácido siálico total (TSA) contribuíram para aumentar o risco de futuros eventos cardiovasculares, independentemente do índice de massa corporal (IMC) e colesterol³¹. O ácido siálico também se associou a vários fatores de risco de DAC, como dislipidemia, resistência à insulina e respostas imunes³².

O ácido siálico também é um importante nutriente para a manutenção in vivo dos micoplasmas³³ e está presente nas partículas de LDL, VLDL, IDL e HDL³⁴. A não interação entre o ácido siálico e seu receptor (Siglecs), presente em macrófagos e neutrófilos por exemplo, pode impedir a formação de placas ateroscleróticas, a produção de citocinas pró-inflamatórias levando à diminuição da inflamação³⁵.

As nanopartículas vegetais do PTCTS apresentam atividade antioxidante que quando diluídas em água termal, acrescida de gel e transialidase³⁶, formam nanopartículas muito estáveis que podem translocar o ácido siálico dos glicolipídeos e impedir o desenvolvimento da aterosclerose.

Em um recente trabalho³⁷, coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol por 12 semanas e tratados via oral com PTCTS aquoso nas últimas seis semanas, mostrou diminuição no soro de micropartículas com antígenos de *Mycoplasma pneumoniae* e de oxLDL, porém com diminuição não significativa do volume de placas de ateroma.

Neste projeto, testamos a nova formulação do PTCTS em gel, trazendo estabilidade às nanopartículas e conseqüentemente pode ter um efeito antiaterosclerótico em coelhos mais eficaz. E hipotetizamos que esse efeito possa estar relacionado com o processo de proteínas sumoiladas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo principal

Avaliar se o composto PTCTS estabilizado em gel, tem eficácia na regressão da placa de ateroma e sua influência sobre o *M. pneumoniae* e o SUMO.

2.2 Objetivos secundários

- Avaliar se a dieta rica em colesterol leva ao aumento de *M. pneumoniae* em paralelo ao surgimento de placa de aterosclerose.
- Analisar se há alteração na modulação do NF- κ B.
- Averiguar o processo inflamatório através da quantificação de macrófagos xantomatosos.
- Comparar os valores bioquímicos do colesterol e frações além das enzimas hepáticas no soro em diferentes tempos de coleta.

3. Métodos

Foram estudados 27 coelhos da raça Nova Zelândia (White New Zealand), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina – USP, com aproximadamente 60 dias de idade, machos e fêmeas pesando $2,2 \pm 0,5$ kg. Os mesmos foram acondicionados em gaioleiros de aço inoxidável adequados à espécie no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina – USP, mantidos com ração específica para a espécie (150g/dia) e água *ad libitum*, com ciclos claro/escuro de 14/10 h e temperatura ambiente de aproximadamente 22°C.

O protocolo de inclusão se deu nos animais que após 45 dias sendo alimentados com dieta enriquecida em colesterol apresentaram nível de colesterol total circulante >200 mg/dL.

O cálculo amostral foi calculado segundo a distribuição de Fleiss.

A droga PTCTS composta de nanopartículas orgânicas diluídas em água termal com proteína recombinante do *Trypanosoma cruzi* (transialidase) adicionadas a um gel, foi utilizada como o medicamento no grupo tratado.

Os coelhos foram divididos em 3 grupos distribuídos da seguinte forma:

Grupo 1 – Controle positivo (CPositivo): composto por 9 coelhos (5 machos e 4 fêmeas) alimentados com a dieta habitual enriquecida com 1% de colesterol conforme descrição abaixo, durante 12 semanas e para garantirmos que todos os animais passaram pelo mesmo procedimento e estresse de tratamento foram administradas 500 μ L água/dia no lugar do composto PTCTS.

Grupo 2 – Tratado (PTCTS): composto por 9 coelhos (5 machos e 4 fêmeas) alimentados com a mesma dieta enriquecida do grupo 1, durante 12 semanas e foram tratados com o composto PTCTS, administrado via oral na dose de 500 μ L/dia do durante as 6 últimas semanas.

Grupo 3 - Controle negativo (CNegativo): composto por 9 coelhos (5 machos e 4 fêmeas) alimentados com a dieta habitual durante 12 semanas e para garantirmos que todos os animais passaram pelo mesmo procedimento e estresse de tratamento foram administradas 500 μ L água/dia no lugar do composto PTCTS.

Todos os procedimentos envolvendo a experimentação com os animais foram realizados de acordo com princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal 2013, National Research Council 2011 e a aprovação do comitê de ética da Universidade de São Paulo (USP).

3.1. Dieta dos animais

Os animais foram alimentados inicialmente com a ração para coelhos Nuvilab, do laboratório Nuvital, Curitiba, PR. Brasil.

Para obter a dieta hipercolesterolêmica, foram adicionados 10 g de colesterol em pó (Sigma – C 8503 – 95% de pureza) a cada quilo de ração comercial. O colesterol foi dissolvido em uma mistura de 100 ml de éter etílico (Casa da Química Ind. Com Ltda. Diadema-S. P.) e 50 ml de etanol P.A. absoluto/g (Divisão de Farmácia. HC-FMUSP) sob constante agitação, em seguida, adicionado à ração por pulverização. Cada animal recebeu diariamente 150g de ração, e tal consumo foi controlado por pesagem diária.

3.2. Coleta de sangue e métodos laboratoriais

Amostras de sangue da veia auricular marginal de cada animal foram coletadas no início (basal) e na 6^a e 12^a semana do experimento a fim de determinar os níveis séricos de colesterol total e frações e das enzimas hepáticas AST e ALT. Os valores obtidos na coleta basal serviram como valores de referência (normal).

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 rpm e o soro obtido, foi fracionado, acondicionado em microtubos e mantido à temperatura de - 20 °C.

A determinação de colesterol total se deu por meio do método enzimático CHOD-PAP (Merck, E.U.A.) e os níveis séricos de HDL medidos após precipitação com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. A

concentração das demais lipoproteínas – não HDL colesterol (n-HDL-C) – foi calculada pela diferença entre as concentrações de colesterol total e de colesterol de HDL ($n\text{-HDL-C} = \text{CT} - \text{HDL-C}$) e os valores dos triglicerídeos por método enzimático de cor (GPO-PAP) com o uso do aparelho Cobas Mira (Roche).

As dosagens de lipídeos foram realizadas no Laboratório Clínico do InCor-HC FMUSP, todos conforme as Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias.

3.3. Sacrifício dos animais

Após a pesagem, os animais foram sacrificados com overdose de anestésico (ketamina 25-50 mg/kg associado à xilazina 2-5 mg/kg via intramuscular), cuja ação foi aprofundada com anestésico parenteral (Diprivan).

Os animais foram imediatamente submetidos à necropsia para a retirada do arco aórtico e aorta e descartados conforme protocolo de segurança do biotério.

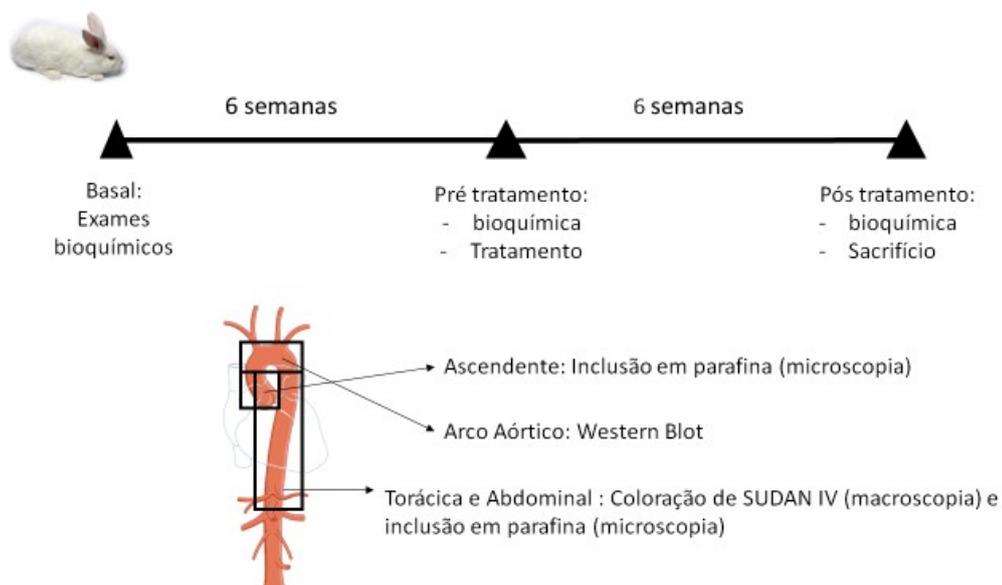


Figura 1: Esquematização: cronograma do estudo e separação das porções da Aorta após o sacrifício.

3.5. Estudo anatomopatológico

3.4.1. Preparo dos órgãos:

A aorta foi dissecada e seccionada no início da artéria aorta ascendente. Foi feito um corte transversal junto da raiz da aorta, contendo cerca de 1cm de extensão de artéria ascendente, e posteriormente emblocado em parafina. O mesmo foi feito com um fragmento do arco aórtico, cujo corte transversal foi congelado para a extração de proteína. O restante da aorta foi fixado em formol para estudo macro e microscópico descrito a seguir.

3.4.2. Histoquímica:

As porções torácica e abdominal da aorta foram abertas longitudinalmente, presas à uma superfície lisa de cortiça com alfinetes e fixadas em formol tamponado 10 %, pH 7.4, por 24 h. Em seguida, foram coradas pelo método histoquímico Scarlet R (SUDAN IV), que cora a gordura em vermelho.

Esse material posteriormente foi fotografado em câmera digital, cujo arquivo foi importado ao programa de análise de imagem Aperio ImageScope Software® (Aperio Technologies, Inc. CA, USA).

A ferramenta *Rule Tool* foi utilizada para medir o comprimento total do vaso, bem como a altura do mesmo em três diferentes pontos (extremidades e o meio do vaso) para obtenção do comprimento médio. Já a área total do vaso foi determinada com a ferramenta *Pen Tool*. Foi utilizado o contorno como delimitação da área a ser analisada pelo software para quantificar a porcentagem de área corada com o SUDAN IV (Figura 2).

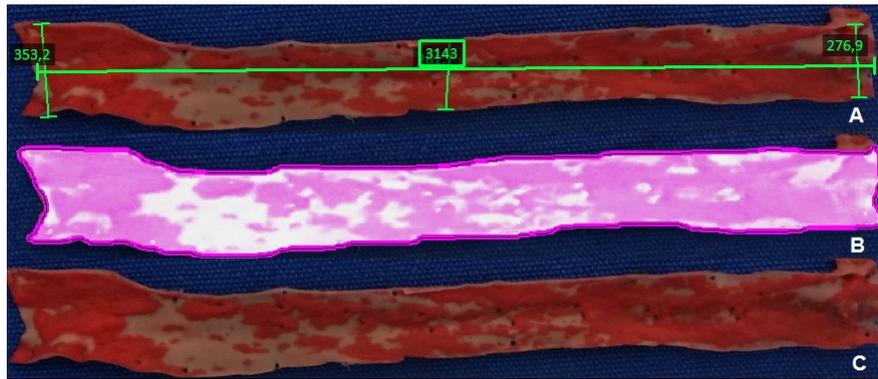


Figura 2: A- Medida feita no ImageScope para obtenção dos valores do comprimento, altura e área da aorta. B- Quantificação de área com placa (em rosa) através da análise de identificação do corante Sudan IV dentro da área selecionada. C- Aorta corada com Sudan IV, fotografada e usada para as análises.

3.4.3 – Preparação dos cortes para microscopia óptica

Os fragmentos retirados das 3 porções da aorta (ascendente, torácica e abdominal), foram emblocados em parafina, realizados cortes seriados de 5 μm das secções, corados por Hematoxilina & Eosina (H&E) e escaneados através do aparelho ScanScope CS System® (Aperio Tecnologia, Inc. CA, USA) com uma objetiva Olympus UPlanSApo 40x acoplada ao escâner que gerou arquivos de imagem ".svs" para serem analisadas no programa Aperio ImageScope Software.

Através do software, foi medida a área da placa (mm^2) e a porcentagem de células gordurosas nas porções da Aorta, conforme demonstrado na Figura 3.

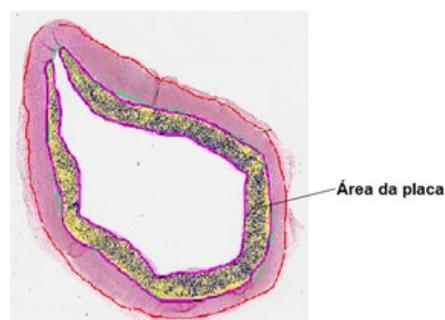


Figura 3: Modelo de medição no corte histológico da aorta ascendente aplicado à análise de área da placa. A porcentagem de células gordurosas encontra-se avaliado dentro da área da placa em azul.

3.4.4. Imunohistoquímica:

Os cortes histológicos das 3 porções foram fixados em formol, parafinados, cortados a 3,5 μm e pescados em lâminas com 3-aminopropiletoxissilano (Sigma). A seguir, os cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em álcool de diferentes concentrações (100 %, 95 %, 70 %) e água. Quando necessária, a recuperação antigênica foi realizada com tampões TRIS-EDTA 10mM pH 9.0, Citrato 10mM pH6.0 ou Trilogy™ (Cell Marque cód. 920P-07) em panela de pressão (DakoCytomation- California/ Code N° S2800), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a lavagem do material em água foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com 2 banhos de 8 minutos a temperatura ambiente (T.A.) em solução de Peróxido de Hidrogênio a 6% e o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com CAS Block (Invitrogen cód. 8120), 10 minutos à T.A. De acordo com a padronização e orientação do fabricante, o anticorpo primário foi diluído em Antibody Diluent (Invitrogen cód. 3218) e cada corte foi incubado durante 60 minutos à T.A.

A seguir, após a lavagem em PBS pH 7.4, foi realizada a detecção do antígeno/anticorpo, utilizando-se do Universal immuno-peroxidase Polymer - Histofine (Nichirei Biosciences-cod 414131F). Na revelação das reações, foi utilizado o substrato cromógeno DAB, (DakoCytomation- California/ Code N° K3468), e a contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris.

As lâminas com as reações foram desidratadas em álcool de diferentes concentrações (70%, 95% e 100%), diafanizadas com xilol e montadas com lamínulas e resina sintética Entellan® (Merk, Alemanha).

Os anticorpos usados na imunohistoquímica foram: SUMO-1 (clone SM1/495 - Novus), SUMO-2/3 (clone SPM572 – Novus), anti-macrófago específico de coelho (clone RAM11 - DAKO) LDLox (anticorpo gentilmente cedido pela prof^a Dulcineia Abdalla - Ciências Farmacêutica da USP).

3.4.5. Hibridação *in situ* (HIS):

Após desparafinização, recuperação e bloqueio, secções aórticas foram incubadas com a sonda para a identificação do DNA de *Mycoplasma pneumoniae* (CGTAAGCTATCAGCTACATGGAGG)³⁸, na concentração de 50 ng/uL e desnaturada em estufa. A hibridação se deu em câmara úmida a 37 °C por 19 h. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em solução de estringência (GenPoint DakoCytomation – Califórnia/ Code N° K0620) e em estreptoavidina (GenPoint DakoCytomation – Califórnia/ Code N° K0620) para a revelação em DAB 1:50 (GenPoint DakoCytomation – Califórnia/ Code N° K0620) e contracolorados com hematoxilina de Harris.

3.4.6. Ensaio marcação de “nicks” por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase (TUNEL):

Após desparafinização, recuperação e bloqueio, cortes histológicos foram submetidos à permeabilização em solução de proteinase K a 3 µg/ml em tampão Tris-HCl 10mM pH 7.4 por 3 min em banho-maria a 37 °C.

As lâminas foram incubadas com o reagente de TUNEL por 60min a 37 °C, lavadas com tampão PBS sob agitação constante, exposta ao reagente POD para incubação em câmara úmida por 30min a 37 °C, reveladas com DAB 1:50 (GenPoint DakoCytomation – Califórnia/ Code N° K0620) e contracolorados com hematoxilina de Harris, seguida da desidratação em álcool de diferentes concentrações (70 %, 95 % e 100 %), diafanizadas com xilol e montadas com lamínulas e resina sintética Entellan® (Merk, Alemanha).

As análises dos cortes submetidos à imunohistoquímica, à HIS e ao TUNEL se deram na área total da placa. Foi delimitada a área a ser analisada pelo software Aperio ImageScope Software® (Aperio Technologies, Inc. CA, USA) para quantificar a porcentagem de área marcada pelo anticorpo ou sonda estudado (Figura 4).

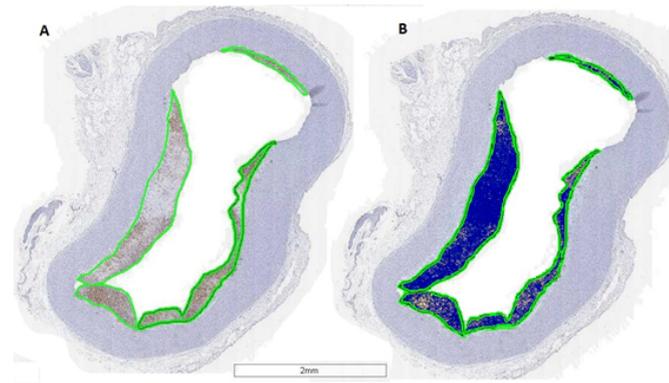


Figura 4. A – Modelo da seleção da área da placa de reação de imunohistoquímica analisada pelo Aperio ImageScope. B – Área analisada por diferença de coloração onde as áreas marcadas em amarelo são positivas.

3.5. Western blotting (WB)

Amostras do tecido do arco aórtico foram submetidas à pulverização em nitrogênio líquido e misturado em tampão RIPA contendo inibidores de proteases. Após centrifugação (10.000 rpm, 5 min., 4 °C) o sobrenadante foi coletado e armazenado em a -80 °C.

A concentração proteica foi determinada por espectrofotometria, segundo o método descrito por Bradford (1976), e calculada segundo equação da reta obtida a partir de uma curva-padrão de albumina bovina sérica.

Para a separação em gel de poliacrilamida-SDS, alíquotas de 20 µg foram incubadas com tampão de amostra contendo DTT e incubadas por 5 min a 100 °C para desnaturação. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida (8%) a 100 V por 2 h e depois foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham – GE) a 100 V por 1 h. A eficácia da transferência foi analisada pela coloração de Ponceau, cuja imagem serviu como normalizador às análises densitométricas das proteínas-alvo. Após a lavagem em TBST, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário por 16 h a 4 °C.

No dia seguinte, após a lavagem com TBST, as membranas foram expostas ao anticorpo secundário conjugado com peroxidase sob agitação por

1 h em temperatura ambiente. Foram lavadas novamente e incubadas com a solução de ECL (Bio-rad) e reveladas por quimiluminescência.

As bandas específicas de acordo com a proteína de interesse foram quantificadas pelo programa UVI tech. Os valores foram expressos em porcentagem em relação a expressão da coloração de Ponceau. Os anticorpos, seus respectivos fabricantes e diluições utilizadas encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Relação de anticorpos utilizados na técnica de *Western blotting*

	Anticorpo	Fabricante	Diluição
Primários	Anti-SUMO1	Novus	1:3.000
	Anti-SUMO2/3	Novus	1:1.000
	Anti-PIASy/E3	Novus	1:500
	Anti-LDLr	Abcam	1:500
	Anti-NFkB	Santa Cruz	1:500
Secundário	Anti-Mouse	Jacskon	1:5.000

3.5. Preparo molecular do tecido para DNA de micoplasma

3.6.1. Obtenção das amostras para PCR

Para a técnica de PCR foi utilizada somente a aorta abdominal, devido à escassez de amostra.

Amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina foram cortadas com 5 µm de espessura por fita em micrótomo convencional. Foram utilizadas 3 fitas por amostra para a extração de DNA. Foi usada uma navalha para cada bloco, com o intuito de evitar contaminação entre as amostras.

As amostras foram desparafinizadas em banho de xilol com 30 minutos de incubação a 65°C, centrifugadas em 14.000 rpm por 5 minutos, seguido de desidratação e reidratação em etanol com incubações de 1 minuto a temperatura ambiente seguido por centrifugações de 14.000 rpm por 5 minutos. Após a obtenção do *pellet*, as amostras foram incubadas com tampão de lise

(10mM Tris-HCL pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, SDS e Triton X-100 na concentração final de 0,8% e 0,06%) + 20 mg/mL de proteinase K a 60 °C por 18 h. O DNA foi extraído e purificado seguindo as especificações do fabricante, utilizando o Kit Purelink® Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, ref: 12280050).

As concentrações das amostras foram determinadas por meio da leitura no aparelho NanoDrop (espectrofotômetro da Thermo Scientific).

A otimização dos primers se deu pelo teste da plataforma de PCR com a realização de gradiente de temperatura entre 45 °C e 68 °C. As amostras de cultura sabidamente positivas para *M. pneumoniae*, foram usadas como controle positivo e o controle negativo foi utilizado água ultrapura.

Usamos o nested de PCR para aumentar a quantidade de amplificação do produto e para facilitar a visualização na corrida de eletroforese.

Com os produtos amplificados, foi realizado um gel de 2% de agarose, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

No qRT-PCR, é necessário o conhecimento do número de cópias do DNA do controle positivo (100%) para o cálculo da porcentagem de positividade nas amostras.

3.6.2. Clonagem do *M. pneumoniae*

Para cálculo da porcentagem foram utilizados clones do *M. pneumoniae* gentilmente preparados pelas biólogas Samar Freschi de Barros e Raquel Elaine de Alencar do laboratório de Imunologia do InCor – LIM 19. Foi realizada a clonagem pelo kit comercial pGEM®-T Easy Vector Systems (Invitrogen ref: A1360) apropriado para clonagem de produtos de PCR. Esse vetor linearizado (Figura 5) expõe resíduos de timina, que são complementares aos resíduos de adenina, adicionados ao produto de PCR pela enzima Taq polimerase.

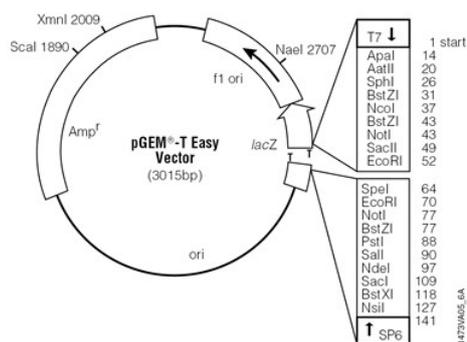


Figura 5. Vetor pGEM®-T e pontos de referência de sequências e mapas

3.6.3. Transformação por choque térmico

A transformação dos vetores contendo os insertos se deu por uma *E. coli* quimicamente competente.

Foram adicionados 3 μL do plasmídeo em 45 μL de células competentes (DH5 α Thermo Scientific #18258012), seguido por incubação em banho de gelo por 15 minutos e incubação a 42°C por 30 segundos, para o choque térmico.

Em seguida, as bactérias foram colocadas novamente no gelo por 5 minutos e incubadas em 300 μL de meio SOC a 37° com agitação por 1 hora. Em seguida, foi plaqueado todo o conteúdo do crescimento bacteriano em meio LB ágar contendo ampicilina/X-gal, para selecionar as bactérias que continham os plasmídeos. As placas foram incubadas por 16 horas a 37°C.

Após incubação, 7 colônias brancas e azuis (corroborando a inserção de um fragmento no sítio múltiplo de clonagem do vetor), foram coletadas com o auxílio de uma ponteira estéril e homogeneizadas em 10 μL de água estéril. Usamos 5 μL desse volume para inocular no meio LB + ampicilina crescendo sob agitação a 39°C por 16hs. Os 5 μL restantes foram utilizados como template para PCR, selecionando as colônias que continham os insertos correspondentes. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de 1% de agarose.

3.6.4. Extração e quantificação do DNA de *M. pneumoniae*

A extração do plasmídeo foi realizada pelo kit comercial “Rapid Plasmid Purification System” (Invitrogen). O DNA plasmidial foi visualizado em gel de 1% de agarose.

Em seguida, o plasmídeo foi quantificado no NanoDrop nos comprimentos 260 nm e 280 nm. A concentração do controle positivo, foi determinada através do cálculo de moléculas/ μ L conforme descrita na fórmula:

$$X\text{g}/\mu\text{l DNA [n}^\circ\text{ pares de base do plasmídeo x660]} \times 6,022 \times 10^{23} = Y \text{ moléculas}/\mu\text{L}$$

Com base na fórmula a quantificação absoluta de DNA de *M. pneumoniae* por amostra foi determinada através da curva padrão.

3.6.5. Quantificação absoluta por PCR em tempo real (qRT-PCR)

As Reações de Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real foram feitas em placas de 96 poços, usando reagente Power SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems – EUA), conforme descrito pelo fabricante e o equipamento utilizado foi o Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Para determinar o limite de detecção da reação de qRT-PCR, foram utilizadas curvas padrões com diluições seriadas de DNA extraído, a partir de amostras sabidamente positivas para o gene de *Mycoplasma pneumoniae* com primers iniciadores na sequência (F) ATT ACC ATC CTT GTT GTA AG / (R) GAA GCT TAT GGT ACA GGT TGG³⁸, em ciclos de 96 °C por 15 min repetido uma vez, 95 °C por 1 min; 56 °C por 1 min e 72 °C por 1 min repetidos 40 vezes.

Todas as amplificações foram feitas em duplicatas e finalizadas com a curva de dissociação “*melting*” para verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de primers ou qualquer outro produto inespecífico (Figura 6).

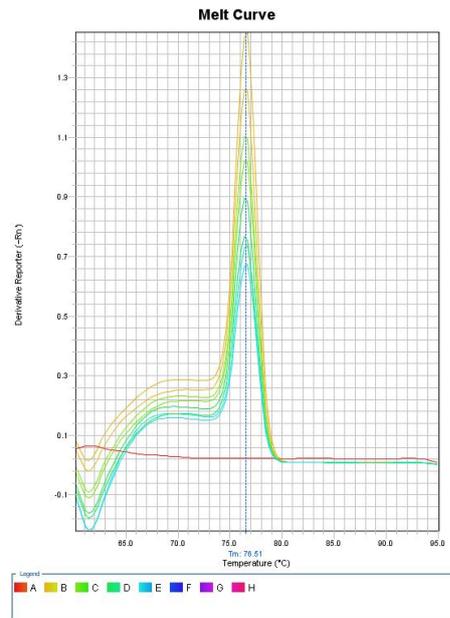


Figura 6. Melt da curva do qRT-PCR para *M. pneumoniae*

3.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 6.0. As variáveis quantitativas foram expressas em mediana e intervalo interquartil.

Foram feitos teste de normalidade entre as variáveis onde nenhuma variável se manteve paramétrica.

Para análise entre os grupos foi realizado o teste Kruskal-wallis. Quando o teste comparativo apresentava diferença significativa, a comparação entre grupos foi feita usando o teste de Dunn.

Aplicamos o teste de Wilcoxon para comparar dados no mesmo animal, em tempos de coleta diferentes (Pré x Pós-tratamento). Realizamos o teste Mann Whitney para análise entre dois grupos.

A correlação foi feita pelo correlação de Spearman.

4. Resultados

Pesamos os animais para obter controle do ganho de peso, uma vez que a aterosclerose está relacionada ao índice de massa corporal. O CNegativo mostrou aumento de peso significativo ao final do experimento, mas não nos demais grupos, cujos resultados estão na Tabela 2.

Tabela 2. Mediana (intervalo interquartil) do peso dos animais de cada grupo nas fases basal, pré e pós-tratamento, e média do consumo de ração. Comparação do peso nas fases pré vs pós-tratamento pelo Wilcoxon.

	Peso (Kg)				Consumo ração
	Basal	Pré	Pós	p	
Controle positivo	3,2 (3 – 3,4)	3,4 (3,1 – 3,5)	3,3 (2,8 – 3,5)	0,46	90 (88 – 94)
PTCTS	3,4 (3,3 – 3,4)	3,4 (3,1 – 3,7)	3,3 (2,8 – 3,4)	0,147	79 (65 – 90)
Controle negativo	3,2 (2,9 – 3,3)	3,5 (3,3 – 3,7)	4 (3,5 – 4,2)	0,012	138 (113 – 144)

A análise macroscópica das porções da aorta torácica e abdominal comparando os três grupos (tabela 3) não mostrou diferença em relação ao comprimento ($p= 0,09$), na área ($p= 0,31$) e nem na largura ($p= 0,55$) obtido pela mediana dos três pontos (valores adquiridos pela extremidades e meio da aorta).

Tabela 3. Mediana (intervalo interquartil) da largura (sendo: ponto 1- extremidade próxima da raiz da aorta; ponto 2- meio do vaso; ponto 3 - extremidade final do vaso), comprimento (cm) e área (cm²) da Aorta torácica e abdominal dos animais de cada grupo.

	Largura			p
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	
Controle positivo	1 (0,95 – 1,15)	0,9 (0,8 – 0,9)	0,8 (0,7 – 0,9)	0,55
Tratado	1 (0,9 – 1,2)	0,8 (0,75 – 1)	0,8 (0,7 – 0,85)	
Controle negativo	1 (1 – 1,1)	0,9 (0,9 – 0,95)	0,9 (0,7 – 0,95)	
	Comprimento (cm)	p	Área (cm ²)	p
Controle positivo	10,6 (10,25 – 11,3)	0,09	9,7 (8,5 – 10,7)	0,31
Tratado	9,2 (8,4 – 10,35)			
Controle negativo	10,6 (9,05 – 11,65)			
			8 (7,1 – 10,7)	
			9,6 (8,6 – 11)	

4.1 Análise Bioquímica

Na condição basal, não se observa diferença nos níveis lipídicos ou de enzimas hepáticas entre os três grupos (tabela 4). Na fase pré-tratamento, o grupo CNegativo apresentou valores menores em todas as frações do

colesterol quando comparado ao CPositivo e no PTCTS, com exceção apenas da fração de triglicérides (gráfico 1) onde apresentou significância com o CPositivo. Esse resultado já era esperado, já que o mesmo não comeu ração hipercolesterolêmica.

Na fase pós-tratamento, somente houve significância estatística nos níveis de triglicérides entre os dois grupos ateroscleróticos. Na redução de n-HDL a significância se deu entre o CNegativo e os outros grupos.

Tabela 4. Mediana (intervalo interquartil) dos valores de colesterol total e frações, triglicérides e transaminases dos grupos CPos, PTCTS e CNeg nas fases basal, pré e pós-tratamento, e comparação entre os grupos nas fases basal, pré-tratamento e pós-tratamento pelo teste de Kruskal-Wallis.

	Basal	Pré	Pós
Colesterol			
CPositivo	50 (42 – 91)	1089 (894 – 1290)	1111 (936 – 1451)
PTCTS	55 (39 – 130)	1172 (629 – 1468)	808 (678 – 1153)
CNegativo	66 (50 – 143)	111 (71 – 124)	50 (44 – 107)
<i>p</i> entre os grupos	0,26	0,0003	<0,0001
HDL			
CPositivo	29 (14 – 42)	462 (272 – 797)	349 (238 – 519)
PTCTS	35 (25 – 45)	500 (245 – 968)	458 (211 – 720)
CNegativo	36 (19 – 49)	39 (35 – 47)	29 (6 – 38)
<i>p</i> entre os grupos	0,61	0,0002	0,0002
Não HDL			
CPositivo	10 (6 – 34,5)	490 (300,5 – 730,5)	664 (598 – 762)
PTCTS	33 (10 – 94,5)	493 (233,5 – 732,5)	431 (367 – 551,5)
CNegativo	26 (8,5 – 100)	63 (20 – 74,5)	10 (5,5 – 63)
<i>p</i> entre os grupos	0,26	0,0005	<0,0001
Triglicérides			
CPositivo	75 (48,5 – 148)	152 (116,5 – 186,5)	269 (202,5 – 475)
PTCTS	62 (37,5 – 98)	125 (33 – 160,5)	676 (462 – 1004)
CNegativo	74 (68,5 – 89)	70 (51,5 – 89)	83 (30 – 269,5)
<i>p</i> entre os grupos	0,739	0,02	0,001
AST			
Controle positivo	32 (25,5 – 49)	40 (37 – 91)	55 (49,5 – 72)
PTCTS	30 (23 – 36,5)	56 (49,5 – 74,5)	85 (70 – 112,5)
CNegativo	37 (31 – 51,50)	37 (23,5 – 54,5)	40 (34,5 – 57)
<i>p</i> entre os grupos	0,18	0,06	0,0006
ALT			
Controle positivo	77 (61 – 103,5)	87 (57 – 122)	52 (41 – 83,5)
PTCTS	70 (63 – 88,5)	77 (61,5 – 166,5)	89 (54,5 – 155)
CNegativo	74 (56,5 – 100,5)	93 (54 – 150,5)	64 (48,5 – 75)
<i>p</i> entre os grupos	0,75	0,99	0,20

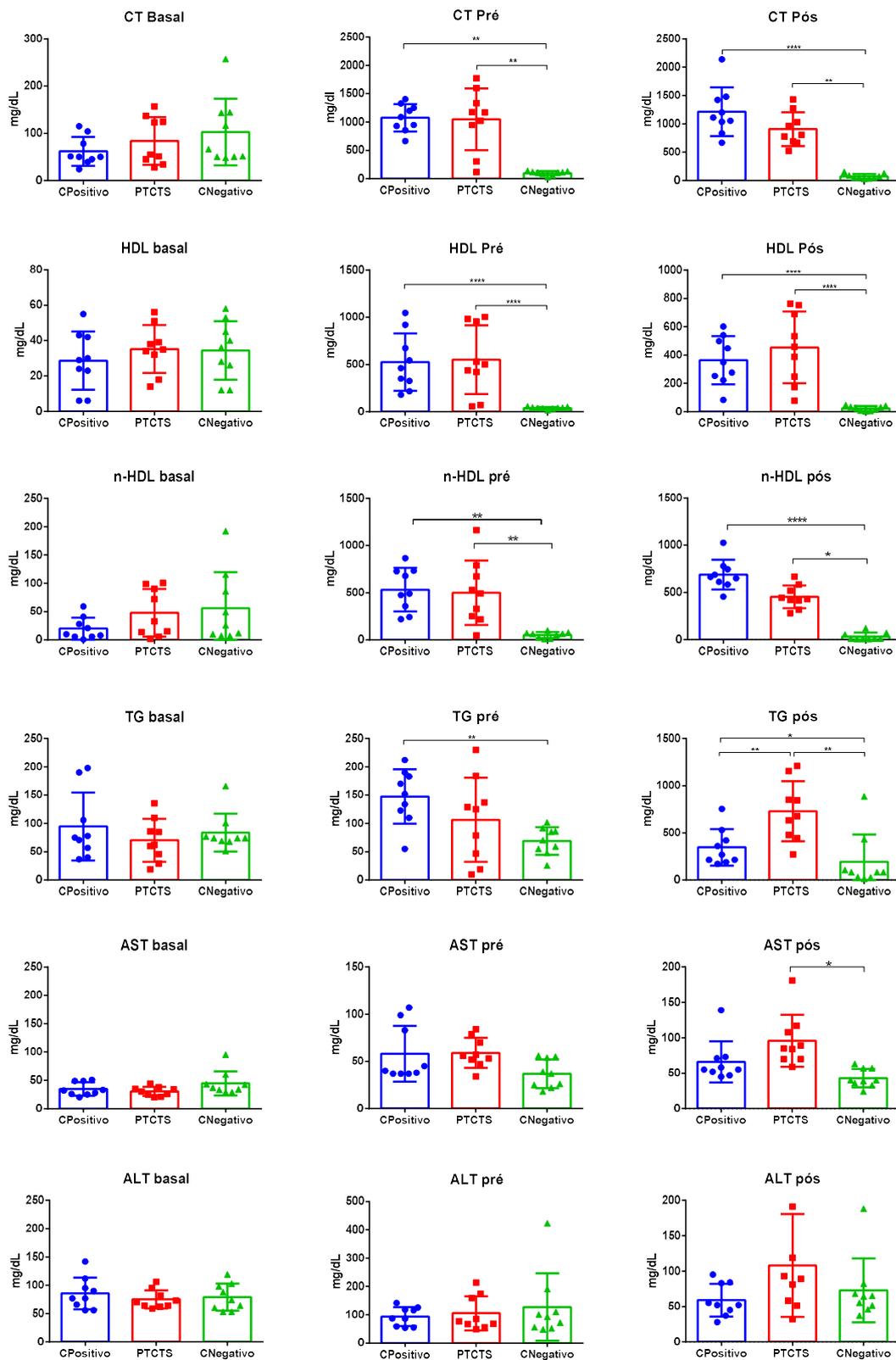


Gráfico 1 – Concentração plasmática de colesterol total e frações e as enzimas hepáticas nos três grupos em diferentes tempos de coleta (basal, pré e pós-tratamento). Teste de Dunn * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. CT – colesterol total; TG – triglicérides.

Controle Negativo

O grupo controle negativo (CNegativo) foi alimentado com dieta habitual e ao longo da fase de tratamento foi submetido ao mesmo estresse dos outros grupos, a ingestão de água pela seringa ao invés do PTCTS, para termos como padrão normal tanto na morfologia como nos padrões bioquímicos. Por essa razão, não avaliamos a proliferação intimal, por não apresentar placa (figura 6). Assim, os resultados descritos abaixo são referentes aos grupos ateroscleróticos.



Figura 7. Corte da macroscópica das porções da aorta torácica e abdominal corada pelo SUDAN IV exemplificando a não produção da proliferação intimal no CNegativo.

Comparação dos grupos ateroscleróticos: não tratado (controle positivo) vs tratado (PTCTS)

4.1 Análise comparativa macroscópica e microscópica das placas de ateroma

A análise comparativa da quantidade de placas avaliadas macroscopicamente, das aortas torácicas e abdominais, detectadas pelo SUDAN IV, revelou que o grupo PTCTS apresentou menor porcentagem da área com placas de ateroma 15,78 [7,4 – 20,43] (gráfico 2 e figura 7), em relação ao do grupo CPositivo 41,77 [27,93 – 77,12]; $p=0,015$.

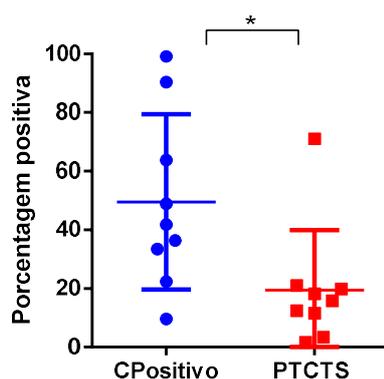


Gráfico 2. Porcentagem de gordura realizada macroscopicamente com corante de SUDAN IV nos grupos ateroscleróticos.



Figura 8. Corte da macroscópica das porções da aorta torácica e abdominal corada pelo SUDAN IV exemplificando a placa de gordura nos grupos CPositivo (A) e PTCTS (B).

A análise microscópica das 3 porções da aorta pelo HE, entre os grupos CPositivo e PTCTS mostrou diferença significativa pelo teste de Mann Whitney

na área de placa na porção abdominal e porcentagem de gordura na porção torácica. Os demais valores não apresentaram significância (tabela 5).

Tabela 5. Mediana (intervalo interquartil) da área da placa e porcentagem de gordura das aortas dos animais de cada grupo, em análise microscópica, em coloração HE.

	Área da placa (mm ²)	% gordura
Ascendente		
CPositivo	1,43 (0,62 – 2,64)	26 (14 – 36)
PTCTS	1,96 (0,09 – 3,5)	17 (11 – 36,5)
<i>p</i>	0,508	0,627
Torácica		
CPositivo	0,52 (0,19 – 1,8)	56 (28,3 – 68,8)
PTCTS	0,07 (0,01 – 1,5)	28,9 (0 – 36,6)
<i>p</i>	0,16	0,04
Abdominal		
CPositivo	0,32 (0,10 – 1)	36,7 (14,7 – 37,5)
PTCTS	0,01 (0 – 0,15)	0 (0 – 36,2)
<i>p</i>	0,02	0,18

4.3 Análise da Imunohistoquímica, da Hibridação in situ (HIS) e TUNEL nas diferentes porções da Aorta

Comparamos o SUMO 1, SUMO 2/3, oxLDL, Macrófago específicos de coelho (RAM11), células apoptóticas (TUNEL) e DNA de *Mycoplasma pneumoniae* (HIS) entre os grupos CPositivo e PTCTS, pelo teste de Mann Whitney nas 3 alturas (porções) da Aorta.

Aorta Ascendente

Mostrou maior quantidade de células positivas para SUMO1, SUMO2/3 e células apoptóticas (TUNEL) e menor quantidade de células positivas para oxLDL e macrófago na placa do grupo PTCTS sendo significante somente na variável oxLDL ($p=0,02$). A porcentagem de área para DNA de Micoplasma na placa foi igual nos dois grupos (tabela 6 e gráfico 3).

Aorta Torácica

Mostrou uma diminuição de *Micoplasma*, macrófagos específicos de coelho (RAM11) e LDLox; assim como manteve um maior número de SUMO1, SUMO2/3 e células apoptóticas. Porém, nenhum dos resultados foi significativo.

Aorta Abdominal

Os resultados mostraram significância na comparação das variáveis, *Micoplasma* ($p=0,02$), SUMO1 ($p=0,04$), SUMO2/3 ($p=0,03$), LDLox ($p=0,01$) e TUNEL ($p=0,005$). Não houve significância na redução de RAM11 nessa porção da Aorta.

Tabela 6. Mediana (intervalo interquartil) do número de células positivas para SUMO1, SUMO2/3, oxLDL, RAM11, TUNEL e porcentagem de área de DNA de *Micoplasma pneumoniae* na camada íntima da aorta ascendente, torácica e abdominal nos grupos CPositivo e PTCTS.

	CPositivo	PTCTS	P
Ascendente			
SUMO 1	401 (39 – 1352)	3193 (23 – 10.656)	0,42
SUMO 2/3	123 (7 – 922,5)	2397 (14,5 – 4.870)	0,13
oxLDL	0,4 (0,2 – 0,6)	0,08 (0 – 0,31)	0,02
RAM11	0,3 (0,1 – 0,95)	0,4 (0 – 0,65)	0,58
TUNEL	1095 (174,8 – 3.729)	405 (6,5 – 7.863)	0,79
<i>M. pneumoniae</i>	0,41 (0,26 – 0,66)	0,47 (0,02 – 0,85)	0,99
Torácica			
SUMO 1	101,2 (17,22 – 1909)	2,18 (0 – 210,5)	0,09
SUMO 2/3	27,5 (2,7 – 357,3)	0,2 (0 – 447,2)	0,36
oxLDL	0,05 (0,02 – 0,23)	0,01 (0 – 0,14)	0,09
RAM11	0,09 (0,01 – 0,4)	0,004 (0 – 0,08)	0,16
TUNEL	57 (13,3 – 722,3)	0,84 (0 – 673,3)	0,16
<i>M. pneumoniae</i>	0,17 (0,04 – 0,94)	0,03 (0 – 0,4)	0,06
Abdominal			
SUMO 1	40,5 (0,25 – 165,5)	0 (0 – 2.500)	0,04
SUMO 2/3	4 (0,75 – 40)	0 (0 – 2)	0,03
oxLDL	0,04 (0,005 – 0,15)	0 (0 – 0,009)	0,01
RAM11	0 (0 – 0,1)	0 (0 – 0,01)	0,36
TUNEL	14,4 (5,6 – 158)	0 (0 – 0,5)	0,005
<i>M. pneumoniae</i>	0,06 (0,04 – 0,2)	0,002 (0 – 0,04)	0,02

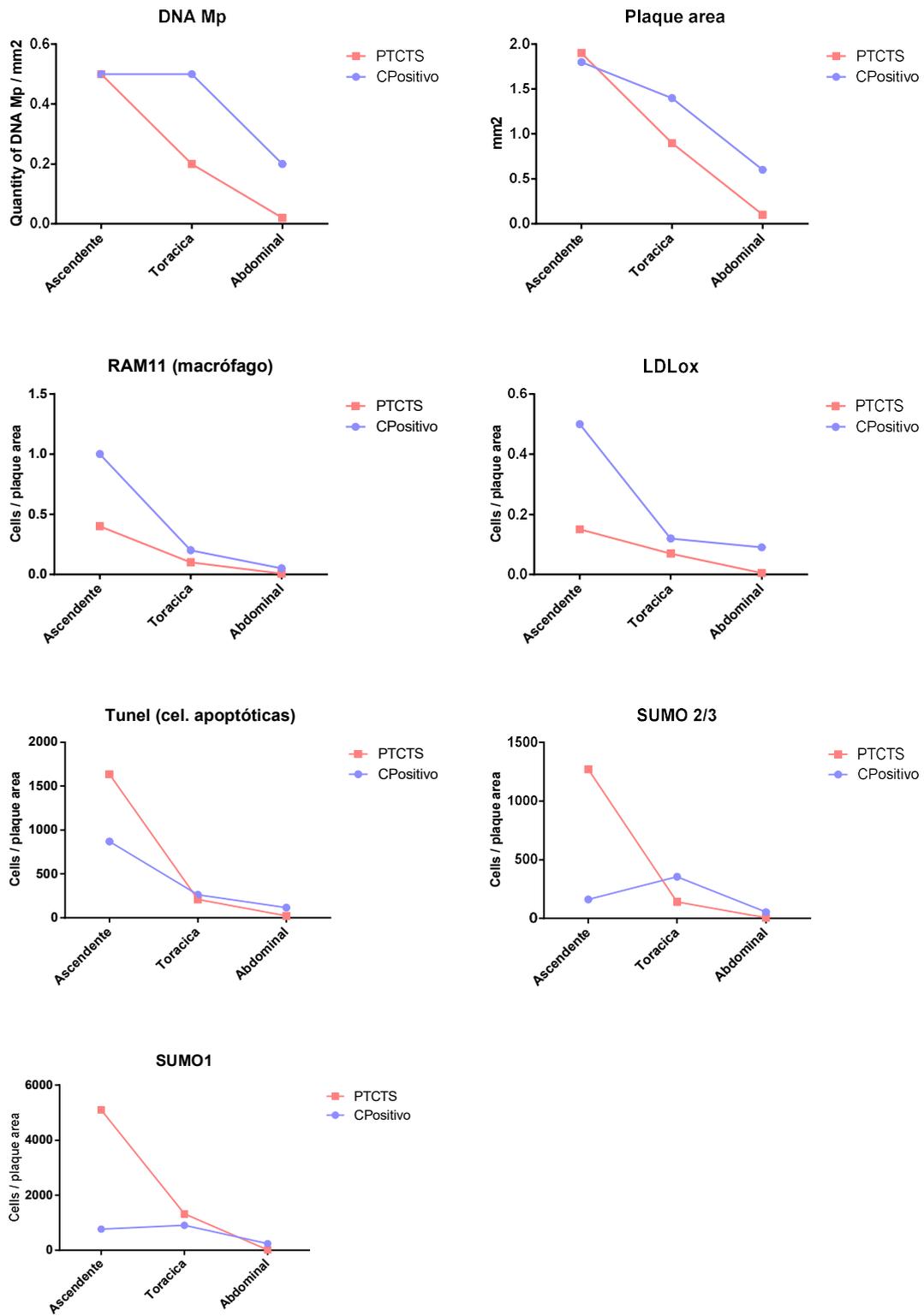


Gráfico 3. Média de células positivas analisadas na imunohistoquímica pelos anticorpos SUMO1, SUMO2/3, oxLDL, RAM11, TUNEL para células apoptóticas e Hibridização in situ de *Micoplasma pneumoniae* na camada íntima da aorta Ascendente, Torácica e Abdominal.

Na análise microscópica observamos que no CPositivo, as células xantomatosas estão por toda a placa sem a presença de uma capa para proteção; já no PTCTS as células xantomatosas estão localizadas na parte inferior da placa, apresentando uma morfologia celular diferente do CPositivo. Essa diferença poderia ser a formação de uma capa de células fusiformes positivas para SUMO1, tanto no endotélio como na proliferação intimal (figura 8).

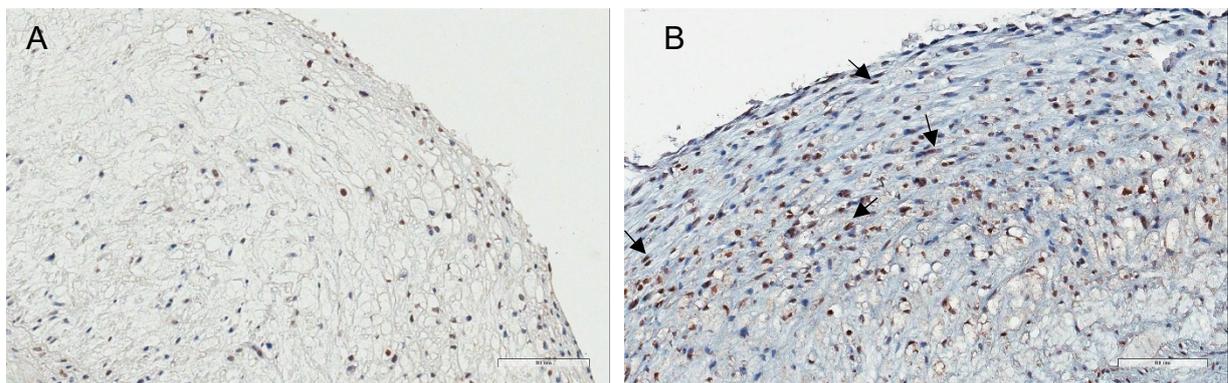


Figura 9. Fotomicrografia de cortes histológicos de fragmentos de Aorta ascendente imunodetectados para SUMO1: setas pretas mostrando morfologia fusiforme na capa fibrótica com núcleos lipídico próximo a camada da média. A – exemplifica o animal do CPositivo (20X) e B – tratado com PTCTS (20X).

Para verificarmos se havia uma formação de placa estável, fizemos a análise da coloração de Masson, onde avaliamos o colágeno presente na placa das três alturas da Aorta. Os resultados apresentaram menor quantidade de colágeno nas porções Ascendente e Abdominal e igual quantidade entre os grupos na Aorta torácica (gráfico 4), indicando que não se trata de uma capa fibrótica estabilizando a placa, mas sim, de uma mudança morfológica que possa auxiliar na redução da placa.

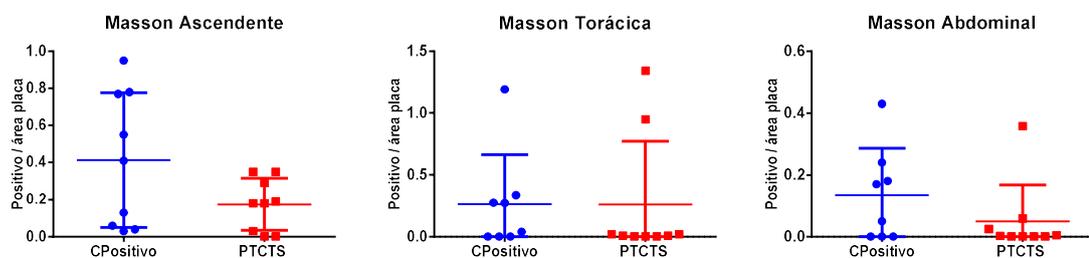


Gráfico 4- Células positivas analisadas na histoquímica pela coloração de Masson na camada Íntima da aorta Ascendente, Torácica e Abdominal sem significância estatística.

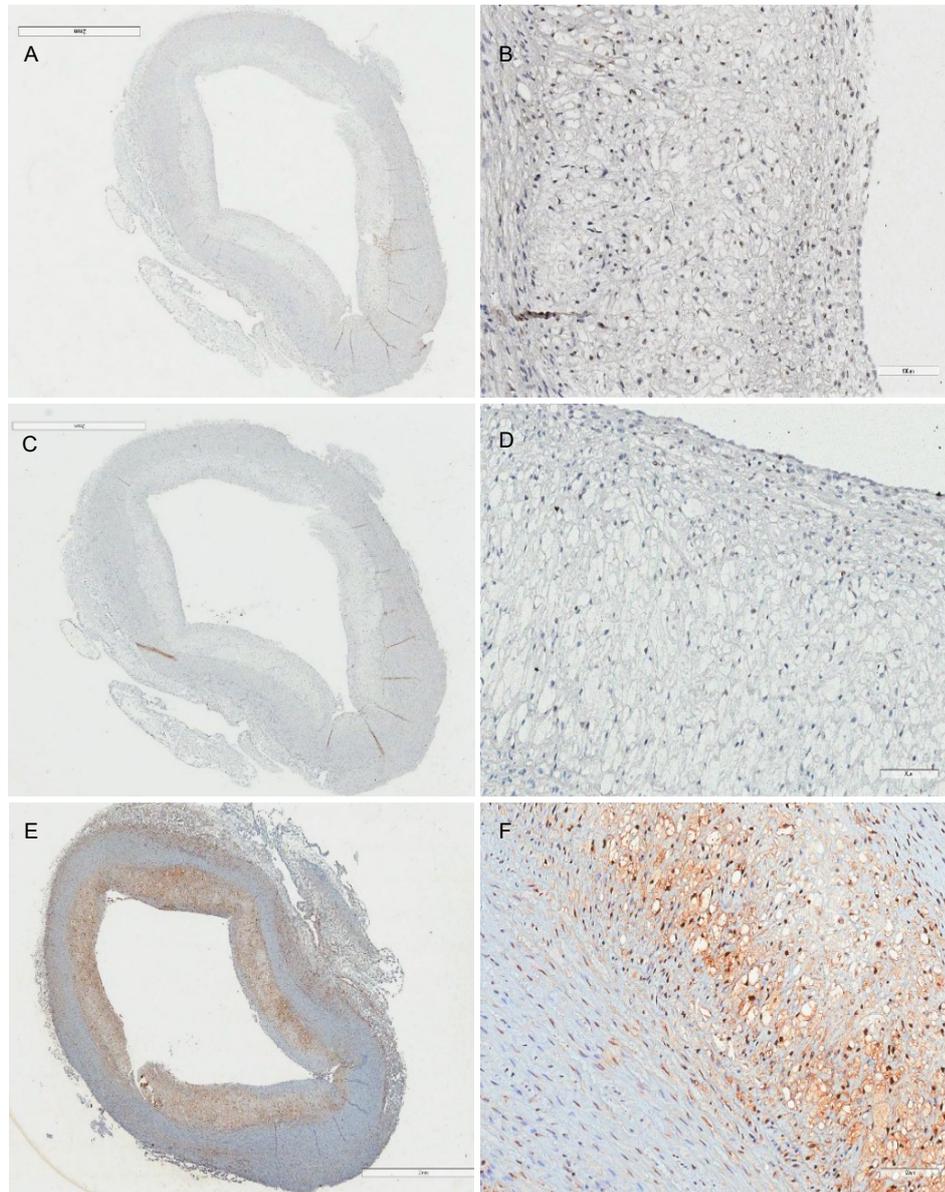


Figura 10. Fotomicrografia de cortes histológicos de fragmentos de Aorta ascendente imunodetectados do CPositivo: A e B mostrando pouca marcação de células para antígenos de SUMO1; C e D mostrando pouca marcação para antígenos de SUMO2/3; E e F hibridização *in situ* para DNA de *M. pneumoniae* mostrando muita marcação principalmente na área da placa. A, C e E panorâmica e B, D e F aumento de 20X.

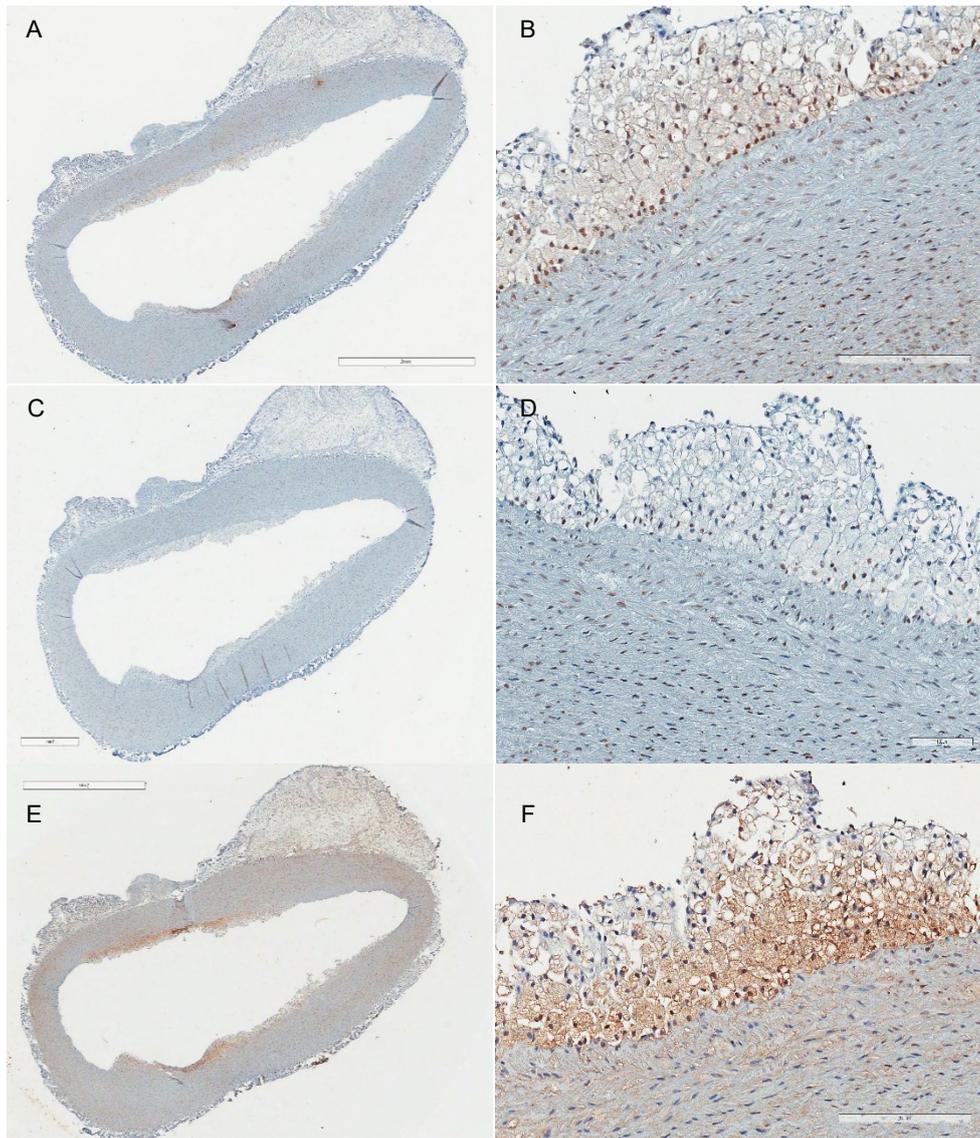


Figura 11. Fotomicrografia de cortes histológicos de fragmentos de Aorta ascendente imunodetectados do grupo PTCTS: A e B mostrando muita marcação de células para antígenos de SUMO1; C e D mostrando muita marcação para antígenos de SUMO2/3; E e F hibridização *in situ* para DNA de *M. pneumoniae* mostrando uma menor marcação. A, C e E panorâmica e B, D e F aumento de 20X.

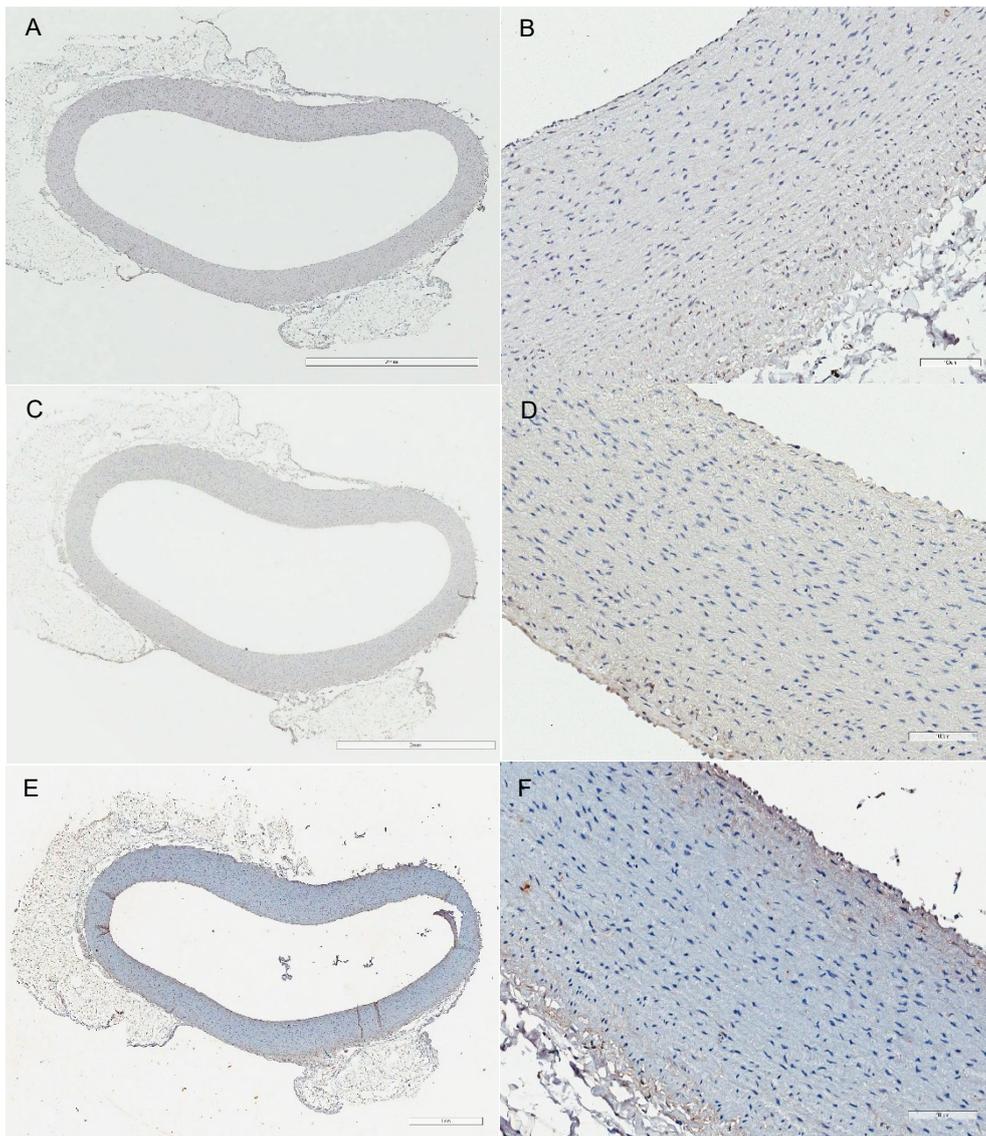


Figura 12. Fotomicrografia de cortes histológicos de fragmentos de Aorta ascendente imunodetectados do CNegativo: A e B mostrando pouca marcação de células para antígenos de SUMO1; C e D mostrando pouca marcação para antígenos de SUMO2/3; E e F hibridização *in situ* para DNA de *M. pneumoniae* mostrando pouca marcação. A, C e E panorâmica e B, D e F aumento de 20X.

4.4 Análise de correlação nos grupos ateroscleróticos

O teste de correlação de Spearman entre todas as variáveis analisadas (tabela 7) nos mostrou várias correlações nas três alturas. Destacamos a correção entre a presença de DNA de Micoplasma com a quantidade de oxLDL no grupo aterosclerótico ($r=1$; $p<0,0001$) na Aorta Ascendente. Todas as correlações foram significantes no grupo PTCTS na Torácica. Por fim, o DNA de Micoplasma com a área da placa no grupo PTCTS na Abdominal ($r= 0,995$; $p= <0,0001$).

Tabela 7. Correlação de Spearman do número de células positivas/mm² do SUMO1, SUMO2/3, LDLox, RAM11 e TÚNEL e porcentagem de área positiva para DNA de Mp nos grupos CPositivo e PTCTS. (r - coeficiente de correlação).

		CPositivo					PTCTS				
		Micoplasma	SUMO1	SUMO2/3	Macrófago	Apoptose	Micoplasma	SUMO1	SUMO2/3	Macrófago	Apoptose
Ascendente											
Área da placa	r	0,867	0,519	1	0,617	0,738	0,833	0,767	0,717	0,933	0,467
	P	<0,0001	0,13	<0,0001	0,06	0,02	0,001	0,01	0,02	<0,0001	0,18
LDLox	r	1	0,259	0,867	0,35	0,548	0,729	0,695	0,627	0,831	0,559
	P	<0,0001	0,46	<0,0001	0,33	0,14	0,02	0,03	0,05	0,002	0,09
Micoplasma	r		0,26	0,867	0,35	0,548		0,717	0,95	0,933	0,4
	P		0,46	<0,0001	0,33	0,13		0,02	<0,0001	<0,0001	0,26
SUMO1	r			0,519	0,159	0,381			0,767	0,883	0,783
	P			0,13	0,64	0,32			0,01	<0,0001	0,008
SUMO2/3	r				0,617	0,738				0,883	0,533
	P				0,06	0,02				<0,0001	0,12
Apoptose (Túnel)	r				0,762					0,6	
	P				0,02					0,07	
Torácica											
Área da placa	r	0,267	0,55	0,06	0,85	0,383	0,961	0,766	0,699	0,95	0,936
	P	0,46	0,11	0,84	0,0003	0,28	<0,0001	0,01	0,03	<0,0001	<0,0001
LDLox	r	0,783	0,267	-0,134	0,65	0,06	0,956	0,776	0,726	0,868	0,931
	P	0,008	0,46	0,70	0,05	0,84	<0,0001	0,008	0,02	<0,0001	<0,0001
DNA Micoplasma	r		0,317	0,293	0,367	0,117		0,761	0,695	0,926	0,956
	P		0,38	0,4	0,3	0,74		0,01	0,03	<0,0001	<0,0001
SUMO1	r			0,83	0,733	0,617			0,956	0,732	0,914
	P			0,001	0,02	0,06			<0,0001	0,02	<0,0001
SUMO2/3	r				0,393	0,444				0,629	0,85
	P				0,2	0,2				0,05	0,0003
Apoptose (Túnel)	r				0,667					0,902	
	P				0,04					<0,0001	

		CPositivo					PTCTS				
		Micoplasma	SUMO1	SUMO2/3	Macrófago	Apoptose	Micoplasma	SUMO1	SUMO2/3	Macrófago	Apoptose
Abdominal											
Área da placa	r	0,643	0,619	0,311	-0,06	0,617	0,995	0,766	0,821	0,307	0,5
	P	0,07	0,08	0,42	0,84	0,06	<0,0001	0,01	0,003	0,42	0,15
LDLox	r	0,252	0,071	0,47	0,407	0,371	0,527	0,23	0,559	0,38	0,141
	P	0,49	0,83	0,20	0,29	0,32	0,12	0,52	0,09	0,28	0,709
DNA Micoplasma	r		0,5	0,49	0,571	0,952		0,763	0,817	0,305	0,522
	P		0,18	0,18	0,12	<0,0001		0,01	0,004	0,42	0,14
SUMO1	r			0,359	-0,02	0,429			0,624	0,554	0,72
	P			0,35	0,93	0,26			0,06	0,14	0,02
SUMO2/3	r				-0,108	0,323				0,554	0,443
	P				0,75	0,39				0,14	0,2
Apoptose (Túnel)	r				0,567					0,252	
	P				0,09					0,5	

Devido a quantidade de animais de cada grupo de estudo ser pequeno, fizemos o teste de correlação agrupando os casos (n=18) com o objetivo de encontrar correlações que não foram detectadas nos grupos separadamente.

Assim, encontramos correlações (tabela 8) nas três alturas entre Micoplasma com todas as variáveis.

Tabela 8. Correlação de Spearman das células positivas/mm² e porcentagem de área de DNA de *M. pneumoniae* nas diferentes alturas da Aorta juntando-se os CPositivo e o PTCTS.

Porções da Aorta	Ascendente		Torácica		Abdominal	
	r	P	r	P	r	P
n=18						
Micoplasma vs SUMO1	0,681	0,002	0,934	<0,0001	0,843	<0,0001
Micoplasma vs SUMO2/3	0,772	0,0002	0,753	0,0003	0,801	0,0003
Micoplasma vs LDLox	0,651	0,003	0,921	<0,0001	0,532	0,03
Micoplasma vs Cells Apoptóticas	0,649	0,006	0,965	<0,0001	0,916	<0,0001
Micoplasma vs Macrófago	0,676	0,002	0,891	<0,0001	0,741	0,0009
SUMO1 vs SUMO2/3	0,893	<0,0001	0,878	<0,0001	0,766	0,001
SUMO1 vs LDLox	0,351	0,154	0,869	<0,0001	0,402	0,13
SUMO1 vs Cells Apoptóticas	0,831	<0,0001	0,946	0,0001	0,885	<0,0001
SUMO1 vs Macrófago	0,636	0,005	0,893	0,001	0,775	0,001
SUMO2/3 vs LDLox	0,262	0,3	0,641	0,004	0,759	0,002
SUMO2/3 vs Cells Apoptóticas	0,673	0,004	0,779	<0,0001	0,799	0,0005
SUMO2/3 vs Macrófago	0,662	0,003	0,698	0,001	0,439	0,09
LDLox vs Cells Apoptóticas	0,601	0,01	0,906	<0,0001	0,531	0,03
LDLox vs Macrófago	0,531	0,02	0,918	<0,0001	0,057	0,08
Cells Apoptóticas vs Macrófagos	0,778	0,0004	0,815	<0,0001	0,703	0,001

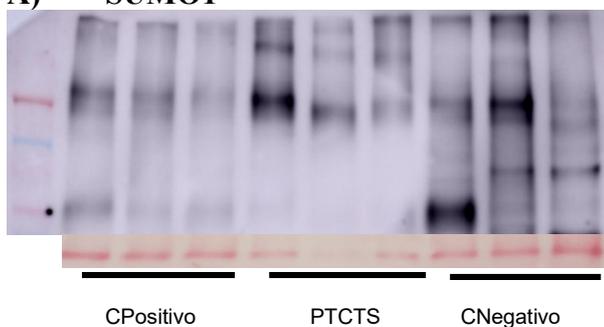
4.5 Análise dos resultados de Western blotting

Para corroborar com os dados da imunohistoquímica, realizamos a técnica de western blotting para expressão tecidual de proteínas sumoiladas 1 e 2/3, enzima ativadora de SUMO (PIASy/E3), NFkB e o receptor de LDL. Usamos os três grupos por se tratar do macerado de tecido e não somente da região da placa, o que nos permitiu comparar a expressão proteica dos coelhos aparentemente saudáveis com os tratados (tabela 10 e figura 12).

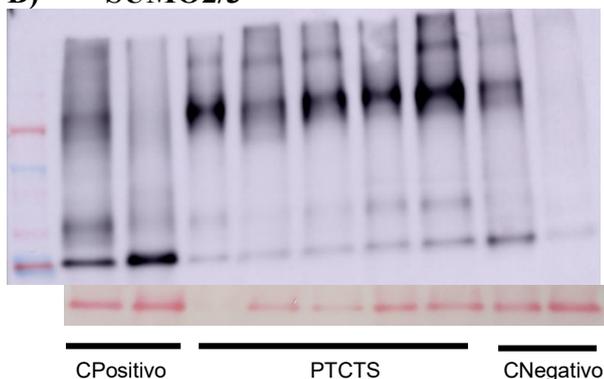
Tabela 10. Mediana (intervalo interquartil) da expressão proteica em relação ao controle positivo para SUMO1, SUMO2/3, PIAS, NFkB e LDLr nos grupos CPositivo, PTCTS e CNegativo. Análise de Kruskal-wallis e pos-hoc Dunn.

	CPositivo	PTCTS	CNegativo	P CPos X PTCTS	P PTCTS X CNeg
SUMO 1	100 (90 – 100)	134,2 (102,7 – 173,5)	111 (85,3 – 118,3)	0,01	0,1
SUMO 2/3	80,9 (100 – 109,2)	144 (129,7 – 168,3)	82,2 (50 – 93,25)	0,05	0,01
PIAS	95,7 (82,8 – 100)	131,8 (95,2 – 156,9)	80,1 (48,6 – 133)	0,04	0,2
NFkB	100 (76,03 – 103,6)	154,9 (126,6 – 187)	85,4 (55,4 – 123,5)	0,01	0,05
LDLr	100 (75 – 115,3)	139 (91,6 – 154,2)	42,06 (22,15 – 94,17)	0,06	0,01

A) SUMO1



B) SUMO2/3



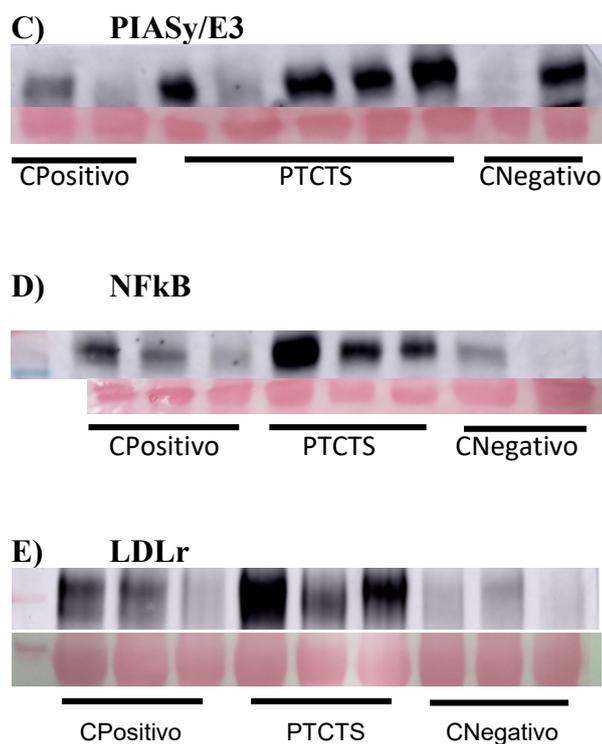


Figura 13. Imagem representativa da expressão de proteínas na Aorta de coelhos controles ateroscleróticos, tratados com PTCTS e controles negativo, respectivamente, por Western Blotting. A coloração de Ponceau foi utilizada como controle interno. A) Anticorpo para SUMO2/3; B) anticorpo para SUMO1; C) anticorpo para enzima ativadora de SUMO, PIASy/E3; D) anticorpo para NFkB; E) anticorpo para receptor de LDL.

A análise de expressão tecidual de proteínas polisumoiladas consiste em um dos principais ensaios como indicador da atividade da proteína SUMO. Isto porque o SUMO conjugado com outra proteína ativa ou altera a função da mesma, podendo alterar sua via de sinalização e seu efeito final. A polisumoilação é a ligação do SUMO com várias proteínas ao mesmo tempo, aumentando a quantidade de vias ativas e conseqüentemente, aumentando a quantidade de desfechos moleculares.

Os resultados obtidos demonstram que o PTCTS altera a expressão de proteínas sumoiladas, principalmente as proteínas de alto peso molecular (figura 12A e B), com significância estatística no SUMO1 entre os grupos PTCTS e CPositivo ($p= 0,01$), SUMO2/3 entre PTCTS e CPositivo ($p= 0,05$) e PTCTS e CNegativo ($p= 0,01$) (gráfico 5).

A enzima de ativação de SUMO, PIASy/E3, acompanhou o aumento da expressão de SUMO no grupo PTCTS sendo estatisticamente significativa.

Como SUMO pode modular o NFkB por vários caminhos, avaliamos sua expressão no tecido aórtico e encontramos aumento no grupo PTCTS comparado com os demais grupos, apresentando significância estatística com os dois grupos: CPositivo ($p= 0,01$) e CNegativo ($p= 0,05$).

Para verificarmos se a diminuição de LDL estaria sendo pelo seu receptor de LDL (LDL-r) uma vez que reconhecem a apoproteína B presente na LDL e a apoproteína E presente no VLDL e na IDL, avaliamos sua expressão proteica e obtivemos maior porcentagem nos grupos ateroscleróticos, principalmente no grupo PTCTS, indicando uma maior captação das mesmas. Sua significância estatística se deu pela comparação com o CNegativo ($p= 0,01$).

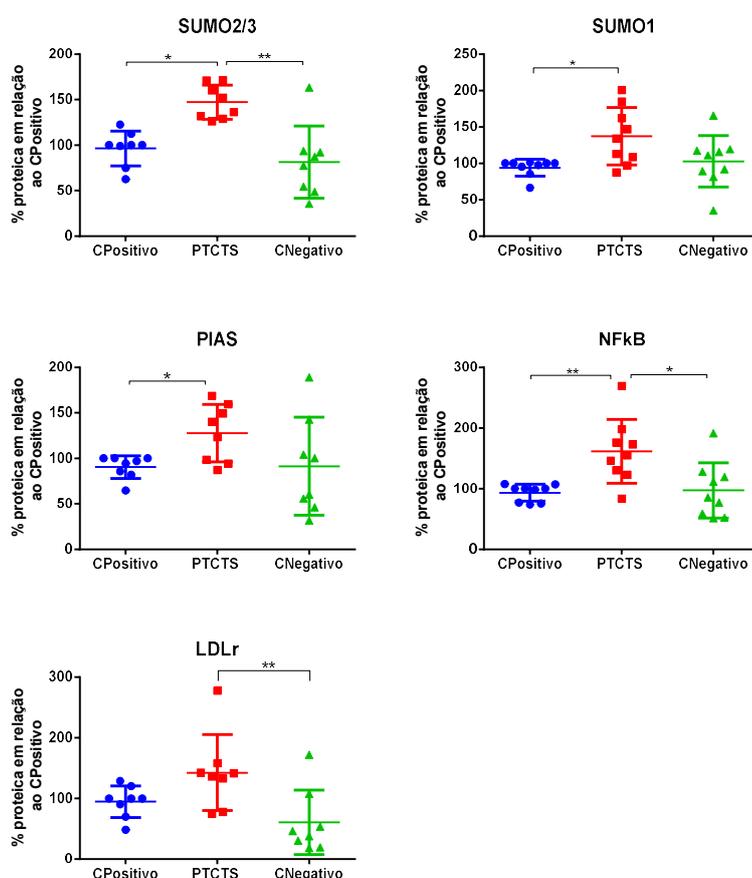


Gráfico 5 – Porcentagem de proteína no tecido macerado analisada por western blotting nos três grupos. Teste de Kruskal-wallis e Dunn * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.

4.6 Análise da quantificação absoluta de qRT-PCR para *Mycoplasma pneumoniae*

Além da análise de Hibridação *in situ para* a quantificação de DNA de *M. pneumoniae*, usamos também a análise da quantificação de cópias do DNA por qRT-PCR.

Os resultados obtidos corroboram que houve uma menor quantidade de DNA de *M. pneumoniae* no grupo PTCTS 6,6 [3,8 – 11,20] quando comparado ao CPositivo 13,05 [8,5 – 18,03], com resultados bem próximos ao CNegativo 6,7 [3,5 – 8,4] porém, não houve significância estatística entre os 3 grupos ($p=0,09$) mostrando que colesterol influência na quantidade de *Mycoplasma* e os dois juntos, influenciam na progressão da aterosclerose (gráfico 6).

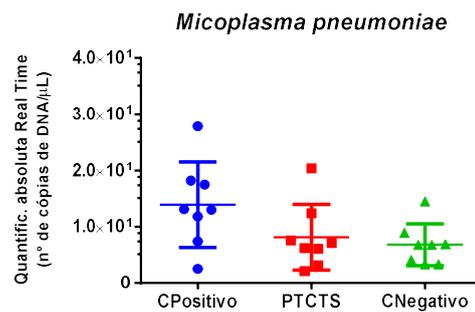


Gráfico 6. Quantificação absoluta do número de cópias do DNA de *Mycoplasma pneumoniae* por PCR real time.

5. *Discussão*

O colesterol sérico, em particular, o LDL e sua posterior modificação em oxLDL desempenham um papel fundamental em todas as etapas da aterosclerose, regulando várias vias de sinalização em diferentes tipos celulares³⁹.

Acredita-se que o controle do perfil lipídico é uma das medidas chave para se reduzir a incidência de eventos cardíacos, uma vez que as dislipidemias estão entre os fatores de risco cardiovascular. Neste trabalho estudamos se o PTCTS em gel tem ação antiaterosclerótica e quais mecanismos podem estar envolvidos, utilizando um modelo animal, o coelho alimentado com ração enriquecida com colesterol. O PTCTS levou a redução de colesterol total e do n-HDL e aumento do HDL em comparação com o controle positivo (não tratado), todavia ainda apresentando valores acima do esperado em relação ao controle negativo.

O aumento das transaminases hepáticas no grupo tratado pode ser justificado segundo Forrester *et al.*⁴⁰ onde possivelmente o aumento dos níveis séricos de HDL acelera o carreamento do excesso de colesterol das células periféricas para o fígado, onde são removidos, por meio do transporte reverso de colesterol.

Quanto aos triglicerídeos, tanto o controle positivo, quanto o tratado, apresentaram números exacerbados ao final do experimento. Isso se deu devido a dieta enriquecida com colesterol e o tratamento não foi capaz de reduzir até o momento da avaliação.

As lesões ateroscleróticas têm uma predileção em regiões de forte curvatura ou ramificações com hemodinâmica complexa aumentando o desenvolvimento das placas⁴¹. A raiz aórtica e a porção ascendente foram os locais onde permaneceu a maior quantidade de placa, não havendo diminuição igual as regiões da aorta torácica e abdominal, mas houve um aumento significativo de SUMO.

Nesse trabalho vimos também a importância de se estudar não somente a porção ascendente, mas sim os outros segmentos da aorta.

Como discorrido na introdução, apesar de muitas pesquisas procurando esclarecer a patogenia da aterosclerose, ainda não se conseguiu explicar o porquê da oxidação da LDL e o motivo dos macrófagos não conseguirem destruí-la em seu interior. Todavia, procuramos em trabalhos anteriores verificar se agentes infecciosos poderiam estar envolvidos com essas duas questões.

Nas descobertas anteriores sugeriu-se que o *M. pneumoniae* pode ter um papel importante na interação funcional da inflamação e do crescimento da placa, devido ao favorecimento da proliferação deste patógeno promovido pelo colesterol. O que corrobora com os nossos dados, visto que, observamos maior quantidade de *M. pneumoniae* nos grupos com dieta hipercolesterolêmica.

Em estudos com pacientes portadores de doenças cardiovasculares, foi mostrado que o ácido siálico presente na LDL tem menor quantidade do que os indivíduos normais, podendo ser um importante passo para aterosclerose, já que LDL sem o ácido siálico podem sofrer mais modificações oxidativas e se acumularem mais⁴². O *M. pneumoniae* utiliza o ácido siálico em sua superfície para a adesão à célula do hospedeiro⁴³. O micoplasma pode retirar o ácido siálico da LDL para poder entrar na célula, burlando o sistema imune e deixando a LDL suscetível para oxidação e para o acúmulo intracelular. Sendo mais uma necessidade do colesterol para o *M. pneumoniae*, um auxílio para entrada na célula.

Por outro lado, o ácido siálico é um ligante tanto de ativação das *siglecs* quanto dos receptores de LDL (LDL-r)⁴⁴. A transialidase do composto PTCTS possivelmente realoca o ácido siálico, dificultando a ligação do *M. pneumoniae*, que pode assim, facilitar a ativação das *siglecs* que diminuem a reação inflamatória²⁸. E quando se ligam aos receptores de LDL, formando os LDL-r glicosilados, estabilizam os mesmos na superfície celular, se ligando e capturando as LDL circulantes do sangue⁴⁵.

O LDL-r também está associado a proliferação celular uma vez que quando ligado ao LDL, internaliza e degrada a partícula via lisossomo. Após os ésteres de colesterol da LDL sofrerem a hidrólise, são transformados em colesterol livre e podem ser usados na síntese de membranas ou na síntese de hormônios esteroides⁴⁶. Sendo um indício dos nossos achados para os LDL-r estarem aumentados nos grupos ateroscleróticos, para tentar eliminar a quantidade excessiva de colesterol LDL.

O grupo tratado apresentou menor porcentagem de área com placa na Aorta torácica e abdominal. Como também, uma menor quantidade de LDLox na ascendente e uma maior expressão de LDL-r glicosilado. Podendo indicar uma ação antilipemiante de duas maneiras: 1- a estabilidade do receptor na superfície celular LDL-r, justificando a redução do colesterol total e do n-HDL séricos; ou 2- a redução da oxidação da LDL por não remover o ácido siálico da mesma. Tendo um potencial para ser uma nova droga antilipemiante.

Há evidências crescentes de que muitas proteínas hospedeiras envolvidas na imunidade inata e intrínseca são reguladas pela sumoilação, assim, sua função pode ser desregulada por ataques de patógenos no sistema de sumoilação⁴⁷. Um dos possíveis patógenos é o *M. pneumoniae* com a inibição do SUMO.

A não interação do micoplasma pode favorecer o surgimento do SUMO, até então bloqueado, podendo resultar em uma melhor resposta imunológica, que levaria a uma mudança morfológica nas células e principalmente a uma regressão da placa.

Curiosamente, a Sumoilação regula a atividade funcional de muitos dos fatores de transcrição que governam as transições morfológicas, sendo que em alguns casos, o fator de transcrição é conjugado diretamente com SUMO, alterando assim sua atividade transcricional. Em outros casos, a Sumoilação altera os mecanismos de transcrição através de efeitos secundários⁴⁸. Portanto, SUMO pode ser uma molécula de sinalização utilizada para promover as mudanças morfológicas das células na aterosclerose.

É descrito que plantas contêm SUMO, fornecendo um excelente sistema para estudar as funções da proteína⁴⁹. A sumoilação afeta vários processos importantes nas plantas. Destacam-se as respostas aos estresses abióticos, como deficiência de fosfato, calor, baixa temperatura e seca, ou estresses bióticos, bem como reações de defesa à infecção por patógenos. Além disso, os regulamentos de tempo de floração, crescimento e desenvolvimento celular e assimilação de nitrogênio foram recentemente adicionados à lista de funções⁵⁰.

Em experimentos prévios da caracterização dos nossos animais, foi administrado o composto PTCTS em coelhos com ração habitual e observamos um aumento de SUMO se comparado ao nosso controle negativo exemplificado nesse trabalho. Desta forma, hipotetizamos que as nanopartículas do PTCTS possam estar modulando o aumento de SUMO nos dois grupos de animais tratados.

O que também poderia explicar a correlação positiva como resultado do grupo PTCTS com o *M. pneumoniae*, podendo o aumento da variável SUMO ser pela droga atuando nas proteínas ligantes, como a PIASy/E3 promovendo sua conjugação e funcionalidade, podendo levar a ativação de vias que poderiam desencadear na regressão da placa, na ativação do sistema imune ou até mesmo no combate a infecção.

Estudos por imunohistoquímica em cânceres, o tecido neoplásico primário mostrou mais proteína SUMO, do que outros tecidos ao redor do mesmo paciente, ao passo que na metástase, a quantidade de SUMO foi significativamente menor⁵¹. Isso sugere que nos processos patológicos pode haver aumento de SUMO reagindo à doença, conforme ocorreu no grupo PTCTS. Quando apresentam uma variabilidade de quantidade de SUMO, como ocorreu com o grupo CPositivo, pode ser um indicativo de proliferação primária no estágio inicial da aterosclerose e uma pior evolução da doença, quando essa quantidade é menos expressa.

Doenças crônicas tendem a apresentar uma diminuição da quantidade de expressão de proteínas e citocinas quando comparadas com doenças agudas⁵². O que corroboraria com a fase inicial da doença estar com uma quantidade grande de SUMO no CPositivo, por se tratar de um experimento de fase aguda. A conjugação de SUMO1 e SUMO2/3 é fortemente induzida sob várias condições de estresse,^{53,54} tornando-as um bom sensor para espécies redox⁵⁵.

Uma das vias de resposta ao estresse e a formação de radicais livres⁵⁶, assim como responsável na regulação da resposta imunitária à infecção, que é sumoilada, é a via do NFkB.

O aumento do SUMO e do NFkB no grupo PTCTS, pode nos demonstrar um aumento envolvido na resposta celular a estímulos de estresse, citocinas, radicais livres, oxLDL ou antígenos bacterianos⁵⁷.

O acúmulo de todos os radicais livres como resultado ao estresse oxidativo que naturalmente ocorre durante a nossa vida, torna-se algo permanente e cumulativo. O que poderia explicar porque temos oxidação dos lipídeos, uma vez que os radicais livres são prejudiciais⁵⁸. Nossas células têm naturalmente defesas contra esses danos, mas por motivo ainda não bem esclarecido, perdem a capacidade de reparar esse estresse oxidativo através da apoptose⁵⁹, por exemplo.

Esse processo de apoptose é a última linha de defesa contra a remoção e a destruição de células danificadas que podem potencialmente levar a doença⁶⁰. O aumento da apoptose no grupo PTCTS está notoriamente correlacionada com o aumento de SUMO, mesmo que ainda não tenha redução de placa.

Em trabalhos prévios, utilizando PTCTS em formulação aquosa, apresentou redução de micropartículas no soro marcadas para oxLDL e para *M. pneumoniae*³⁸. No presente trabalho, com PTCTS em formulação em gel estabilizando a enzima, houve resultados mais eficazes não só reduzindo as

mesmas variáveis analisadas previamente (agora analisadas em tecido), mas também reduzindo a quantidade de placa ateromatosa.

Com os resultados observados, acreditamos que o PTCTS seja um novo alvo terapêutico, não só por poder impedir o *M. pneumoniae* de entrar na célula, mas também tendo potencial de exercer efeitos protetores contra uma possível oxidação e acúmulo da LDL, não desencadeando os efeitos seguintes como inflamação e progressão da aterosclerose.

Em estudos futuros, um maior tempo de tratamento ou uso de métodos de absorção mais lentas como cápsulas, podem ser analisados, assim como um estudo clínico, pioneiro em representar uma intervenção terapêutica para o tratamento de aterosclerose com a remoção do *M. pneumoniae*, seja alvo promissor.

6. Conclusão

O composto PTCTS estabilizado em gel é eficaz na regressão da placa de ateroma e do *M. pneumoniae* com aumento da expressão de SUMO. Nos indicando uma ação antiaterosclerótica aparentemente por inibir a entrada da bactéria *M. pneumoniae*.

Dieta rica em colesterol levou ao surgimento de placa de aterosclerose em paralelo ao aumento de *M. pneumoniae* no interior da mesma.

No grupo PTCTS, o aumento do SUMO ocorreu em paralelo com a expressão do NF- κ B para melhorar a resposta imune, podendo reduzir os aspectos da aterosclerose.

Houve redução da quantidade de macrófagos xantomatosos e do volume das placas nas regiões abdominal e torácica, indicando efeitos anti-inflamatórios. Unindo-se a esse fato, ainda acreditamos que o macrófago sem estar infectado com o micoplasma pode se tornar funcional e eliminar a oxLDL fagocitada não se tornando uma célula espumosa.

O PTCTS foi eficaz em reduzir os valores bioquímicos do colesterol e frações, com aumento das enzimas hepáticas, principais causadores do progresso da doença podendo ser também, uma droga antilipemiante.

7. Referências

-
- ¹ Mangge H, Becker K, Fuchs D, Gostner JM. Antioxidantes, inflamação e doenças cardiovasculares. *World J. Cardiol.* 2014; 6 : 462-477. doi: 10.4330 / wjc.v6.i6.462.
 - ² Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation.* 1997; 96(11):4095–4103
 - ³ Rosenfeld M.E., Campbell L.A. Pathogens and atherosclerosis: Update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* 2011;106:858–867. doi: 10.1160/TH11-06-0392.
 - ⁴ Cani P.D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* 2018;67:1716–1725. doi:10.1136/gutjnl-2018-316723
 - ⁵ Higuchi ML, Sambiasi NV, Palomino SAP, Gutierrez P, *et al.* Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured atherosclerotic plaques. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 1023-1026, 2000
 - ⁶ Garavelo SM, Pereira JJ, Wadt NSY, Reis MM, Higuchi ML. Oral PTCTS (Particulated Transialidase) removes serum microparticles and decreases inflammation in atherosclerotic plaques of rabbits. *Advances in Nanoparticles*, 2015; 4: 107-115
 - ⁷ Klement M.L.R., Ojemyr L., Tagscherer K.E., Widmalm G., Wiedsländer A. A processive lipid glycosyltransferase in the small human pathogen *Mycoplasma pneumoniae*: involvement in host immune response. *Molecular Microbiology* 2007; 65 (6).
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05865.x>
 - ⁸ Higuchi ML, Reis MM, Sambiasi NV, Palomino SAP, Castelli, J.B., Gutierrez, P.S., Aiello, V.D. and Ramires, J.A.F. Co-infection with *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured plaques associated with acute myocardial infarction. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2003; 81: 12-22.
 - ⁹ Campbell L.A., Lee A.W., Rosenfeld M.E., Kuo C.C. *Chlamydia pneumoniae* induces expression of pro-atherogenic factors through activation of the lectin-like oxidized LDL receptor-1. *Pathog. Dis.* 2013;6:1–6.
 - ¹⁰ Meulmeester E, Melchior F. Cell biology: SUMO. *Nature.* 2008; v.452, n. 7188: 709-711
 - ¹¹ Saitoh H, Hinchey J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 6252-6258.
 - ¹² Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular Biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Molec Biol Rev* 1998;62:1094-156.
 - ¹³ Bettermann K, Benesch M, Weis S, Haybaeck J. SUMOylation in carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2012; 316:113–25. [PubMed: 22138131]
 - ¹⁴ Wilson VG. Sumoylation: Molecular Biology and Biochemistry. 2004; Horizon Biosciences, Norfolk.
 - ¹⁵ Rabellino A., Andreani C., Scaglioni P.P. The role of PIAS SUMO E3-Ligase in Cancer. *Cancer Res*; 77(7) April 1, 2017. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2958
 - ¹⁶ Wilson VG. SUMO Regulation of Cellular Processes. Springer; Dordrecht, The Netherlands: 2009. p. 339.

-
- ¹⁷ Bernardi R, Pandolfi PP. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 12: 1006-1016.
- ¹⁸ Qiu, C., Wang, Y., Zhao, H. et al. The critical role of SENP1-mediated GATA2 deSUMOylation in promoting endothelial activation in graft arteriosclerosis. *Nat Commun* 8, 15426 (2017) doi:10.1038/ncomms15426.
- ¹⁹ Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol* 2000;18:621–663. [PubMed: 10837071].
- ²⁰ Rahman MM, McFadden G. Modulation of NF- κ B signalling by microbial pathogens *Nat Rev Microbiol.* Abr de 2011; 9 (4): 291–306. Doi: 10.1038 / nrmicro2539
- ²¹ Mabb AM, Miyamoto S. SUMO and NF-kappaB ties. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64:1979–96. [PubMed: 17530464].
- ²² Proteomics and integrative omic approaches for understanding host-pathogen interactions and infectious diseases.
- ²³ Wilson, Van G. Sumoylation at the Host-Pathogen Interface *Biomolecules* 2012, 2, 203-227; doi: 10.3390/ biom2020203
- ²⁴ Naito M, Morton JB, Pawlowska TE. Minimal genomes of Mycoplasma-related endobacteria are plastic and contain host-derived genes for sustained life within Glomeromycota. *PNAS*, 2015; 112 (25): 7791-7796
- ²⁵ Medvedeva ES, Baranova NB, Mouzykantov AA, et al., “Extracellular vesicles of mycoplasmas and development of resistance to quinolones in bacteria,” *Doklady Biochemistry and Biophysics*, vol. 454, no. 1, pp. 34–37, 2014
- ²⁶ Higuchi ML. Trypanosoma cruzi’s trans-sialidase as a new therapeutic tool in the treatment of chronic inflammatory diseases: possible action against mycoplasma and chlamydia. *Med Hypotheses.* 2004;63(4):616–23.
- ²⁷ Higuchi ML, Santos MHH, Fagundes RQ, Palomino SAP, Reis MM. Trans-Sialidase from Trypanosoma cruzi: Anti-Atherosclerotic Drug. *Proceedings of the Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology—Drugs from Bugs: The Anti-Inflammatory Drugs of Tomorrow*, Snowbird Resort, 2011; 66: 3-7
- ²⁸ Crocker PR. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell–cell interactions and signaling. *Curr Opin Struct Biol.* 2002;12(5):609-15.
- ²⁹ Rohrig CH, Choi SS, Baldwin N. The nutritional role of free sialic acid, a humans milk monosaccharide, and its application as a functional food ingredient. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57:1017–38
- ³⁰ Bull C, Stoel MA, den Brok MH, Adema GJ. Sialic acids sweeten a tumor's life. *Cancer Res.* 2014;74:3199–204
- ³¹ Gopaul KP, Crook MA. Sialic acid: a novel marker of cardiovascular disease? *Clin Biochem.* 2006;39:667–81
- ³² Zhang, C., Chen, J., Liu, Y. et al. Sialic acid metabolism as a potential therapeutic target of atherosclerosis. *Lipids Health Dis* 18, 173 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1113-5>

- ³³ McDonald ND, Lubin J-B, Chowdhury N, Boyd EF. Host-derived sialic acids are an important nutrient source required for optimal bacterial fitness in vivo. *mBio* 7(2):e02237-15.
- ³⁴ Tertov VV, Kaplun VV, Sobenin IA, Boytsova EY, Bovin NV, Orekhov AN. Humans plasma trans-sialidase causes atherogenic modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis*. 2001;159:103–15.
- ³⁵ Xiong YS, Wu AL, Mu D, Yu J, Zeng P, Sun Y, Xiong J. Inhibition of siglec-1 by lentivirus mediated small interfering RNA attenuates atherogenesis in apoE-deficient mice. *Clin Immunol*. 2017;174:32–40.
- ³⁶ Sousa ECP, Chacra NAB, Kawakami JT, Higuchi ML. Characterization of organic nanoparticles for the production of the topic medications. *Global Journal of Engineering Science and Research Management*, 2016; 3(7). DOI: 10.5281/zenodo.58279
- ³⁷ Garavelo SM, Higuchi ML, Pereira JJ, Reis MM, *et al.* Comparison of the Protective Effects of Individual Components of Particulated trans-Sialidase (PTCTS), PTC and TS, against High Cholesterol Diet-Induced Atherosclerosis in Rabbits. *BioMed Research International* 2017 <https://doi.org/10.1155/2017/7212985>.
- ³⁸ Diagnostic Molecular Microbiology- Principles and Applications, 1993. Cap 1.12; pag 255
- ³⁹ Schwarz, A., Bonaterra, G.A., Schwarzbach, H. *et al.* Oxidized LDL-induced JAB1 influences NF- κ B independent inflammatory signaling in human macrophages during foam cell formation. *J Biomed Sci* **24**, 12 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0320-5>
- ⁴⁰ Forrester JS. Prevention of plaque rupture: a new paradigm of therapy. *Ann Intern Med*. 2002;137(10):823-33.
- ⁴¹ Timmins LH, Molony DS, Samady H. Oscillatory wall shear stress is a dominant flow characteristic affecting lesion progression patterns and plaque vulnerability in patients with coronary artery disease. *J. R. Soc Interface* 2017; DOI: 10.1098/rsif.2016.0972
- ⁴² Cerne D, Jürgens G, Ledinski G, Kager G, Greilberger J, Lukac-Bajalo J. Relationship between the Sialic Acid Content of Low-Density Lipoprotein (LDL) and Autoantibodies to Oxidized LDL in the Plasma of Healthy Subjects and Patients with Atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med*. 2002; 40: 15-20
- ⁴³ Williams, C. R., Chen, L., Driver, A. D., Arnold, E. A., Sheppard, E. S., Locklin, J., & Krause, D. C. (2018). Sialylated Receptor Setting Influences Mycoplasma pneumoniae Attachment and Gliding Motility. *Molecular microbiology*, 109(6), 735–744. <https://doi.org/10.1111/mmi.13997>
- ⁴⁴ Zhang, C., Chen, J., Liu, Y. *et al.* Sialic acid metabolism as a potential therapeutic target of atherosclerosis *Lipids Health Dis* 18, 173 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1113-5>
- ⁴⁵ Wang S, Mao Y, Narimatsu Y, Ye Z, *et. al.* Site-specific O-glycosylation of members of the low-density lipoprotein receptor superfamily enhances ligand interactions. *J Biol Chem*, 2018.
- ⁴⁶ Pires LA, Hegg R, Freitas FR, Tavares ER, Almeida CP, Baracat EC, Maranhão RC. Effect of neoadjuvant chemotherapy on low-density lipoprotein (LDL) receptors and LDL receptor-related protein 1 (LRP-1) receptor in locally advanced breast cancer. *Braz J Med. Biol. Res*. 2012;45(6):557-64
- ⁴⁷ Wilson VG. Sumoylation in Interface do Host-Pathogen. *Biomolecules* 2012; 2 (2), 203-

227; doi: 10.3390 / biom2020203.

⁴⁸ Bogachek MV, Andrade JP, Weigel RJ. Regulation of epithelial-mesenchymal Transition Through SUMOylation of Transcription Factors. *Cancer Res.* 2015; 75:11-15

⁴⁹ Elrouby N. Analysis of Small Ubiquitin-Like Modifier (SUMO) Targets Reflects the Essential Nature of Protein SUMOylation and Provides Insight to Elucidate the Role of SUMO in Plant Development. *Plant Physiology* 2015;169 (2): 1006-1017.

⁵⁰ Park HJ, Kim WY, Yun DJ. SUMO and SUMOylation in plants. *Mol Cells* . 2011; 32 (4): 305-316.

⁵¹ Stergios J. Moschos, Drazen M. Jukic, Charalambos Athanassiou, Rohit Bhargava, *et al.* Expression analysis of Ubc9, the single small ubiquitin-like modifier (SUMO) E2 conjugating enzyme, in normal and malignant tissues. *Human Pathology.* 2010; 41: 1286–1298.

⁵² Bennett Jeanette M., Reeves Glenn, Billman George E., Sturmberg Joachim P. Inflammation– Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing “the Epidemic” of Chronic Diseases *Frontiers in Medicine*, 2018; 316 <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00316>

⁵³ Bohren KM, Nadkarni V., Canção JH, Gabbay KH, Owerbach D. A M55V Polymorphism in a Novel SUMO Gene (*SUMO-4*) Differentially Activates Heat Shock Transcription Factors and Is Associated with Susceptibility to Type I Diabetes Mellitus. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 : 27233-27238.

⁵⁴ Johnson ES. Protein modification by SUMO. *Annu Rev. Biochem.* 2004; 73 : 355-382.

⁵⁵ Bossis G, Malnou CE, Farras R, Andermarcher E, *et al.* Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. *Mol Cell Biol.* 2005 Aug;25(16):6964-79

⁵⁶ Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2, 17023–. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>

⁵⁷ Liu, J., Xiang, J., Li, X. *et al.* NF-κB activation is critical for bacterial lipoprotein tolerance-enhanced bactericidal activity in macrophages during microbial infection. *Sci Rep* 7, 40418 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep40418>

⁵⁸ Yadav, U. C., & Ramana, K. V. (2013). Regulation of NF-κB-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 690545. <https://doi.org/10.1155/2013/690545>

⁵⁹ He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X: Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem* 2017;44:532-553. <https://doi.org/10.1159/000485089>

⁶⁰ Chen, Q., Kang, J. & Fu, C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Sig Transduct Target Ther* 3, 18 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0018-5>