

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Fisiopatologia e Toxicologia

**Imunização de camundongos LDLr-/- com
peptídeo mimético da LDL eletronegativa: uma
potencial estratégia terapêutica para a
aterosclerose**

Gustavo Luis Tripodi

Tese para Obtenção do Título de DOUTOR
Orientadora:

Prof^a Dr^a Dulcineia Saes Parra Abdalla

Co-Orientador:

Prof Dr Eduardo Lani Volpe

São Paulo
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Fisiopatologia e Toxicologia

**Imunização de camundongos LDLr^{-/-} com
peptídeo mimético da LDL eletronegativa: uma
potencial estratégia terapêutica para a
aterosclerose**

Gustavo Luis Tripodi

Versão Original

Tese para Obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora:

Prof^a Dr^a Dulcineia Saes Parra Abdalla

Co-Orientador:

Prof Dr Eduardo Lani Volpe da Silveira

São Paulo
2021

Gustavo Luis Tripodi

Imunização de camundongos LDLr^{-/-} com peptídeo mimético da LDL eletronegativa: uma potencial estratégia terapêutica para a aterosclerose

Versão Original

Comissão Julgadora da Tese para Obtenção do Título de DOUTOR

Prof^a Dr^a Dulcineia Saes Parra Abdalla
Orientadora / Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2021.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

T982i Tripodi, Gustavo Luis
Imunização de camundongos LDLr-/- com peptídeo mimético da LDL eletronegativa: potencial estratégia terapêutica para a aterosclerose / Gustavo Luis Tripodi. - São Paulo, 2021.
112 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra
Coorientador: Volpe, Eduardo Lani

1. Aterosclerose, . 2. Inflamação, . 3. Imunização. 4. Peptídeo mimotopo,. 5. Imunomodulação..
I. T. II. Abdalla, Dulcineia Saes Parra, orientador. III. Volpe, Eduardo Lani, coorientador.

Agradecimentos

Agradeço a Prof. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla, minha orientadora, por esses 8 anos de trabalho conjunto. E ao Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira pela co-orientação no projeto de doutorado.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por me receber desde a iniciação científica até este momento.

Agradeço ao Prof. Dr. Daniel Ketelhuth por me supervisionar no estágio internacional no Karolinska Institutet, onde tive a oportunidade de crescer muito cientificamente e como pessoa.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro (Projeto temático 2012/51316-5) para a execução deste projeto e pelo auxílio mensal por meio de bolsas tanto para o doutorado (2017/06568-0) como o estágio no exterior (BEPE 2019/13598-8).

Resumo

Tripodi, G.T. **Imunização de camundongos LDLr^{-/-} com peptídeo mimético da LDL eletronegativa: uma potencial estratégia terapêutica para a aterosclerose.** 2021. 136f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Introdução: A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica decorrente de alterações na parede das artérias de médio e grande calibre e associadas a diversos fatores de risco, dentre os quais destaca-se as hiperlipidemias, ou seja, o aumento plasmático das lipoproteínas, mas também outras comorbidades, como a Síndrome Metabólica. Entre as lipoproteínas, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) é de grande relevância na aterosclerose. Diferentes espécies de LDL modificada (LDLm) são originadas através de lipólise, glicação e proteólise, além da oxidação, variando em densidade e eletronegatividade, sendo melhor denominada LDL eletronegativa [LDL (-)]. Considerando as diferenças conformacionais entre a estrutura da ApoB-100 da LDL nativa e da LDL (-), em um estudo inicial, nosso grupo desenvolveu um anticorpo monoclonal (2C7) a partir da imunização de camundongos Balb/c com a LDL (-) humana. Em uma etapa seguinte foi mapeado o epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal anti-LDL (-) através de *phage display*. O peptídeo ligante do anticorpo monoclonal anti-LDL (-) foi nomeado p2C7. Esse peptídeo não representa regiões da sequência linear da ApoB-100 humana, mas microdomínios conformacionais de epítopos da ApoB-100 da LDL (-), tornando-os candidatos para a imunomodulação da aterogênese. Portanto, investigar a imunomodulação induzida pelos peptídeo p2C7 miméticos da LDL (-), por representar um epítipo imunodominante da LDL (-), poderá abrir novas perspectivas terapêuticas futuras para a imunomodulação da aterosclerose. **Objetivo:** Avaliar a imunomodulação promovida pelo p2C7 *in vivo*, utilizando camundongos C57BL/6 LDLr^{-/-} e amostras de plasma humano. Adicionalmente, no estágio (BEPE) realizado no Instituto Karolinska (dezembro de 2019 a março de 2021), investigou-se o imunometabolismo como mediador nas doenças cardiovasculares. Na parte II-A, estão descritos os resultados do estudo inicialmente proposto. Na parte II-B, apresenta-se os resultados que foram desenvolvidos posteriormente, com ampliação do escopo do projeto, abordando-se a inflamação vascular envolvida no aneurisma de aorta abdominal através de ferramentas de bioinformática. Na parte II-C, são apresentados os resultados do estudo do envolvimento da enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) na esteatohepatite não-alcoólica (NASH) e aterosclerose em

camundongos ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-}IDO^{-/-}*double-knockout*. **Metodologia:** Foi avaliada a presença de anticorpos anti-p2C7 em amostras de plasma humano de indivíduos com ou sem síndrome metabólica. Realizamos a determinação de TNF circulante nas mesmas amostras e prosseguimos com regressões lineares associando os parâmetros inflamatórios com os níveis de anticorpos anti-p2C7. Camundongos C57BL/6 LDLr^{-/-} foram imunizados com p2C7 e os adjuvantes *Alum* ou *Montanide ISA 720*, analisando-se os títulos de anticorpos contra p2C7 e LDL (-), a produção de citocinas (IL-10, IL-4, IL-2, IL-6, IFN γ , IL-17, TNF α) e células secretoras de anticorpos. Camundongos C57BL/6 LDLr^{-/-} foram tolerizados contra os peptídeos mimotopos, com injeções intravenosas (veia caudal) e desafiados com a imunização contendo LDL (-) + *Alum*. Avaliou-se os títulos de anticorpos contra p2C7 e LDL (-) e a produção de citocinas (TNF- α , IFN γ , IL-12, IL-6, IL-10 e MCP-1). Os camundongos foram mantidos em dieta hipercolesterolêmica por 3 meses para formação da placa aterosclerótica. Após este período, os camundongos foram eutanasiados, avaliando-se a formação de placa aterosclerótica na artéria abdominal e arco aórtico, assim como a produção de citocinas (TNF- α , IFN γ , IL-12, IL-6, IL-10 e MCP-1). Camundongos C57BL/6 LDLr^{-/-} foram imunizados com OVA-p2C7 e, após dieta hipercolesterolêmica de 3 meses para formação de placa aterosclerótica, foram avaliados os parâmetros inflamatórios e avaliada a captação de 18F-FDG no arco aórtico através de PET/CT. **Resultados:** A imunização com o p2C7 (livre) não foi capaz de induzir resposta humoral, não se observando títulos detectáveis de anticorpos reativos à p2C7 ou LDL (-) em nenhum camundongo imunizado, assim como não foram detectadas células secretoras de anticorpos específicos para a LDL (-). O grupo imunizado com Alum ou Montanide + p2C7 teve aumento significativo na produção de TNF- α quando comparado com os demais grupos. O protocolo de tolerização foi realizado com sucesso, visto que os camundongos tolerizados apresentaram títulos de anticorpos inferiores aos controles para o epítipo utilizado. Apenas os camundongos tolerizados com o p2C7 apresentaram aumento significativo na produção de IL-6, IL-12, IL-10, TNF- α , IFN γ e MCP 1 após dieta hipercolesterolêmica. A imunização ativa com OVA-p2C7 foi capaz de reduzir a produção de TNF induzida pela dieta hipercolesterolêmica, assim como reduzir a captação de 18F-FDG. **Conclusão:** o epítipo p2C7 é altamente expresso na LDL (-) de pacientes com maior risco cardiovascular. Além disso, a imunização ativa com p2C7 também se mostra uma ferramenta promissora para prevenir e regular a inflamação causada pela LDL (-) no curso da aterosclerose.

Palavras-Chave: Aterosclerose, Inflamação, imunização, peptídeo mimotopo, imunomodulação.

Abstract

Tripodi, G.T. **Immunization of LDLr - / - mice with electronegative LDL mimetic peptides: a potential therapeutic strategy for atherosclerosis.** 2021. 136f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Introduction: Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease resulting from changes in the wall of medium and large-caliber arteries and associated with several risk factors, among which hyperlipidemias stand out, ie, the increase in plasma lipoproteins, but also other comorbidities, such as Metabolic Syndrome. Among the lipoproteins, low-density lipoprotein (LDL) is of great relevance in atherosclerosis. Different isoforms of modified LDL (LDLm) are originated through lipolysis, glycation and proteolysis, in addition to oxidation, varying in density and electronegativity, being better called electronegative LDL [LDL (-)]. Considering the conformational differences between the ApoB-100 structure of native LDL and LDL (-), in an initial study, our group developed a monoclonal antibody (2C7) from the immunization of Balb/c mice with human LDL (-). In a next step, the epitope recognized by the anti-LDL monoclonal antibody (-) was mapped using phage display. The binding peptide of anti-LDL monoclonal antibodies (-) was named p2C7. This peptide does not represent linear sequence regions of human ApoB-100, but conformational microdomains of LDL (-) ApoB-100 epitopes, making them candidates for the immunomodulation of atherogenesis. Therefore, investigating the immunomodulation induced by p2C7 peptide mimetics of LDL (-) as it represents an immunodominant epitope of LDL (-) could open new future therapeutic perspectives for the immunomodulation of atherosclerosis. **Objective:** To evaluate the immunomodulation promoted by p2C7 in vivo, using C57BL/6 LDLr -/- mice, and human plasma samples. In addition, in the internship (BEPE), held at the Karolinska Institute (December 2019 to March 2021), immunometabolism as a mediator of Cardiovascular Diseases was studied. In part II-A, the results of the initially proposed study are described. In part II-B, the results that were developed later are presented, expanding the scope of the project, approaching the vascular inflammation involved in the abdominal aortic aneurysm through bioinformatics tools. In part II-C, the results of the study of the involvement of the enzyme indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and atherosclerosis in ApoE-/- and ApoE-/-IDO-/-double mice are presented -knockout. **Methodology:** The presence of anti-p2C7 antibodies in human plasma samples with or

without Metabolic Syndrome was evaluated. We measured circulating TNF in the same samples and proceeded with linear regressions associating inflammatory parameters with levels of anti-p2C7 antibodies. C57BL/6 LDLr ^{-/-} mice were immunized with p2C7 and the adjuvants Alum or Montanide ISA 720, analyzing the antibody titers against p2C7 and LDL (-), the production of cytokines (IL-10, IL-4, IL -2, IL-6, IFN γ , IL-17, TNF α) and antibody-secreting cells. C57BL/6 LDLr ^{-/-} mice were tolerized against mimotope peptides with intravenous injections (caudal vein) and challenged with immunization containing LDL (-) + Alum. Antibody titers against p2C7 and LDL (-) and cytokine production (TNF- α , IFN γ , IL-12, IL-6, IL-10 and MCP-1) were evaluated. The mice were kept on a hypercholesterolemic diet for 3 months for atherosclerotic plaque formation. After this period, the mice were euthanized, evaluating the formation of atherosclerotic plaque in the abdominal artery and aortic arch, as well as the production of cytokines (TNF- α , IFN γ , IL-12, IL-6, IL-10 and MCP -1). C57BL/6 LDLr ^{-/-} mice were immunized with OVA-p2C7 and, after a 3-month hypercholesterolemic diet for atherosclerotic plaque formation, inflammatory parameters were evaluated and 18F-FDG uptake was evaluated by PET/CT. Results: Immunization with p2C7 (free) was not able to induce a humoral response, with no detectable titers of antibodies reactive to p2C7 or LDL (-) being observed in any immunized mouse, as well as no detectable antibody-secreting cells for the LDL (-). The group immunized with Alum or Montanide + p2C7 had a significant increase in TNF- α production when compared to the other groups. The tolerance protocol was successfully performed, as the tolerized mice had lower antibody titers than controls for the epitope used. Only mice tolerated with p2C7 showed a significant increase in the production of IL-6, IL-12, IL-10, TNF- α , IFN γ and MCP 1 after a hypercholesterolemic diet. Active immunization with OVA-p2C7 was able to reduce TNF production induced by the hypercholesterolemic diet, as well as to reduce 18F-FDG uptake. **Conclusion:** the p2C7 epitope is highly expressed in LDL (-) of patients with higher cardiovascular risk. Furthermore, active immunization with p2C7 is also a promising tool to prevent and regulate inflammation caused by LDL (-) in the course of atherosclerosis.

Key words: Atherosclerosis, Inflammation, immunization, mimotope peptide, immunomodulation.

Sumário

| | |
|--|----|
| Parte I: Imunização de camundongos LDLr-/- com peptídeo mimético da LDL eletronegativa: uma potencial estratégia terapêutica para a aterosclerose | 1 |
| Introdução | 1 |
| Aterosclerose | 1 |
| Lipoproteína de baixa densidade (modificada, oxidada e eletronegativa): | 6 |
| Peptídeos mimotopos da LDL (-) humana: | 11 |
| Caracterização dos peptídeos mimotopos p1A3 e p2C7: | 12 |
| Peptídeos derivados da ApoB-100 já utilizados para a imunização de camundongos | 13 |
| Justificativa | 15 |
| Objetivo | 16 |
| Metodologia: | 17 |
| Amostras de pacientes com SM | 17 |
| Conjugação do peptídeo com ovalbumina | 17 |
| ELISA para detecção do peptídeo mimotopo | 18 |
| Detecção de p2C7 em amostras humanas | 18 |
| ELISA para TNF e IL-6 Humanas | 19 |
| Protocolo de imunização | 19 |
| Detecção de IgE total | 21 |
| ELISPOT | 21 |
| Detecção de citocinas (CBA) | 22 |
| Protocolo de Tolerização | 23 |
| PET/CT | 24 |
| Resultados | 26 |
| O epítipo p2C7 é alvo para a produção de anticorpos em indivíduos com síndrome metabólica | 26 |

| | |
|---|----|
| O p2C7 induz TNF in vivo | 29 |
| A ausência de IgG anti-p2C7 agrava a inflamação | 33 |
| A IgG anti-p2C7 pode reduzir a inflamação in vivo | 36 |
| Discussão | 39 |
| <i>Bibliografia</i> | 44 |
| <i>Parte II: Estágio no exterior. Resultados obtidos no estágio realizado no Karolinska Institutet - Suécia.</i> | 52 |
| <i>II-A: Immunometabolism as a new approach to development of “natural adjuvants”</i> | 53 |
| Introduction: | 54 |
| Methodology: | 54 |
| Bone marrow-derived macrophages: | 54 |
| Splenocytes: | 55 |
| Results: | 55 |
| DCA inhibits splenocyte proliferation. | 55 |
| IDO1 regulates macrophage TNF α production. | 56 |
| The dual role of IDO1 in macrophage activation | 58 |
| Partial conclusion: | 61 |
| <i>II-B: Bioinformatic metabolic gene profiling of mouse and human AAA</i> | 62 |
| Introduction: | 62 |
| Methodology: | 63 |
| Datasets: | 63 |
| Selection of the metabolic genes: | 64 |
| Data Normalization: | 64 |
| Principal Component Analysis: | 69 |
| Heatmap and color quantification: | 69 |
| Volcano Plots: | 69 |

| | |
|--|-----|
| Results: | 70 |
| The AAA generates distinct metabolic patterns. | 70 |
| The TCA and OxPhos pathways in AAA are downregulated | 72 |
| Different animal models of AAA present similar metabolic gene profiles | 75 |
| The transcription factors ESRRA and TCF3 may be involved in AAA. | 76 |
| Discussion and Conclusions: | 78 |
| <i>III-C: The interplay of IDO1, NASH and Atherosclerosis</i> | 81 |
| Introduction: | 81 |
| Methodology: | 82 |
| Animals: | 82 |
| General physiological parameters: | 82 |
| Tissue collection: | 82 |
| Metabolic parameters: | 82 |
| Liver pathophysiological parameters: | 83 |
| Atherosclerotic parameters: | 83 |
| Results: | 84 |
| IDO1 ablation accelerates the progression of Atherosclerosis | 84 |
| IDO1 ablation does not influence NAFLD/NASH | 84 |
| The IDO1 is inversely correlated with IL1b expression in mice liver during NASH. | 88 |
| IDO2 is regulated during NASH and controls IL1b production. | 91 |
| Conclusions: | 94 |
| <i>Bibliography:</i> | 95 |
| <i>Anexo I</i> | 97 |
| <i>Anexo II</i> | 104 |
| Conjugação dos peptídeos com ovalbumina | 104 |

Lista de Figuras e Tabelas

Parte I: Imunização de camundongos LDLr-/- com peptídeo mimético da LDL eletronegativa: uma potencial estratégia terapêutica para a aterosclerose **1**

Figura 1: Aterogênese. (LDL – Lipoproteína de baixa densidade; HSP – Heat shock protein; APC- Célula apresentadora de antígenos; Th1 – Linfócito T helper 1; Treg – Linfócito T regulador). Na primeira fase, a LDL é depositada no endotélio e sofre modificações, resultando na LDL modificada (LDLm). A LDLm estimula as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão e várias quimiocinas. Isto leva a um recrutamento de monócitos, que migram para a íntima e diferenciam-se em macrófagos. Os macrófagos reconhecem a LDLm através dos seus receptores scavenger. As células musculares lisas proliferam e tentam estabilizar a placa com uma capa fibrosa. Além disso, as proteases liberadas pelos macrófagos podem desestabilizar a placa, o que pode conduzir à ruptura, dando origem ao trombo. Adaptado de Hansson, 2005. **4**

Figura 2: Formação da LDL eletronegativa. MDA – LDL: Malondialdeído LDL; HNE- LDL: 4-hidroxinonenal LDL; ERN: Espécies reativas de nitrogênio; ERO: Espécies reativas de oxigênio; LDLox – LDL oxidada; AGE-LDL: Produtos avançados de glicação-LDL. As modificações na estrutura da LDL nativa são capazes de induzir a agregação e/ou a fusão das partículas, o que é atualmente reconhecido como um pré-requisito para a iniciação do acúmulo na íntima arterial. As formas modificadas de LDL podem participar da progressão da aterosclerose através de processos inflamatórios e imunológicos. A LDL pode ser modificada por oxidação, glicação, alquilação e nitração, entre outras reações. Todas as modificações da LDL podem gerar neo-epítomos, que torna a partícula imunogênica (Revisado por Faulin et al, 2008). **10**

Tabela I: Formulações utilizadas nas imunizações. Os camundongos C57BL/6 receberam 100 uL da formulação, de acordo com o grupo designado. O grupo 1 recebeu uma injeção intramuscular de PBS. Os grupos 2 e 3 receberam vacinas com o adjuvante Alum. Grupos 4 e 5 receberam vacinas com o adjuvante Montanide ISA 720. **20**

Figura 3: Protocolo de imunização. Os camundongos C57BL/6 LDLr -/- foram divididos em 5 grupos com 4 animais cada. As coletas de sangue e as imunizações foram feitas de acordo com o esquema, com um espaçamento de 2 semanas entre os reforços. * A composição das formulações e grupos correspondem aos descritos na Tabela I. **21**

Tabela II: Formulações utilizadas na avaliação da tolerização. Foram utilizados 4 grupos para o protocolo de tolerização. Controle: foi administrado apenas o veículo (DMSO + PBS); Tpep (peptídeo scramble): camundongos tolerizados com 300 ug/dose de peptídeo aleatório; Tp2C7: camundongos tolerizados com 300 ug/dose de p2C7; **23**

Figura 4: Protocolo de tolerização. Os camundongos C57BL/6 LDLr -/- foram divididos em 3 grupos com 5 animais cada, conforme a tabela IV. A administração intravenosa foi feita através da veia caudal e as coletas, assim como a imunização com a LDL (-) foi realizada conforme esquema apresentado. **24**

Figura 5: Anticorpos anti-p2C7 nos pacientes com síndrome metabólica. As amostras foram selecionadas e divididas em dois grupos: Controle (n = 22) ou Síndrome Metabólica (SM) (n = 10). Foi utilizado o teste de ELISA para detecção de anticorpos IgM (A) e IgG (B) nas amostras de plasma humano. O resultado é mostrado como a densidade óptica (D.O.) obtida \pm SD. Foi utilizado o *student T test* para análise estatística. **27**

Figura 6: IgG anti-p2C7 e TNF nos grupos estudados. Concentração de p2C7 por LDL (-) expressa em unidade arbitrária (U.A.), definida como a razão entre a densidade óptica obtida pelo

ELISA anti p2C7/ concentração plasmática de LDL (-) (A); Análise de regressão linear avaliou a associação de IgG anti-p2C7 e p2C7/LDL (-) (B); Concentração de TNF (pg/mL) em amostras de plasma do grupo Controle vs SM (B); Análise de regressão linear avaliou a associação do TNF com IgG anti-p2C7 (vermelho) ou p2C7 / LDL (-) (azul) (C). Foi utilizado o teste T de *Student* para a análise estatística em A e B e os resultados estão expressos como média \pm SD. 28

Tabela III: Detecção de anticorpos anti-LDL (-) em camundongos imunizados com p2C7. Dados representados pela densidade óptica obtida pelo ensaio ELISA com os soros nas diluições 1:50 e 1:200. Os dias compreendem as coletas de sangue dos camundongos (apresentados na Figura 3). 30

Figura 7: Detecção de células secretoras de anticorpos responsivas a LDL (-). Imagens representativas das células da (A) medula óssea e (B) baço dos camundongos imunizados com p2C7 ou PBS. 31

Figura 8: Detecção de IgE total em camundongos imunizados com o adjuvante Alum. IgE total no soro dos camundongos imunizados com Alum (n=2). 32

Figura 9: Detecção de citocinas no soro de camundongos C57BL/6 imunizados com p2C7 e Alum ou Montanide como adjuvantes. Dados representados pela média \pm SD. O soro dos camundongos imunizados com o adjuvante Alum ou Montanide foram armazenados congelados (-80°C) até o dia da análise. Foi realizado o CBA com o soro coletado no dia da eutanásia (dia 70); G1: Controle (PBS), G2: Alum+PBS, G3: Alum+p2C7, G4: Montanide+PBS, G5: Montanide+p2C7. n = (4). A análise estatística foi realizada por OneWay Anova com Tukey como pós teste. 33

Figura 10: A ausência de anticorpos anti-p2C7 agrava a inflamação na aterosclerose. (A) Esquema de tolerização e imunização, seguido pela dieta hipercolesterolêmica por mais 12

semanas. (B) IgG anti-p2C7 após imunização com LDL (-). (C) IgG anti-LDL (-) após imunização com LDL (-). (D) Área sob a curva (ASC) representando a produção de IgG anti-LDL (-) após a imunização. (E) Área sob a curva (ASC) representando a produção de IgG anti-p2C7 (-) após a imunização. (F) IgG anti-p2C7 após HFD. (G) IgG anti-LDL (-) após HFD. (H-M) Produção de citocinas após HFD. A análise estatística foi realizada por OneWay Anova com Tukey como pós teste. **35**

Figura 11: Imunização ativa com p2C7. (A) Esquema de imunização, seguido pela dieta hipercolesterolêmica por mais 12 semanas. (B) IgG anti-p2C7 após a imunização. (C) IgG anti-LDL (-) após a imunização. (D) Área sob a curva (ASC) representando a produção de IgG anti-p2C7 (-) após a imunização. (E) Área sob a curva (ASC) representando a produção de IgG anti-LDL (-) após a imunização. (F,G) IgG e IgM anti-p2C7 após HFD. (H,I) IgG e IgM anti-LDL (-) após HFD. (J,K) Concentração plasmática de TNF e IL-6 após HFD. A análise estatística foi realizada por OneWay Anova com Tukey como pós teste. **37**

Figura 12: FDG-PET/CT dos animais imunizados. Os camundongos C57BL/6 LDLr -/- foram imunizados e posteriormente mantidos por 12 semanas em dieta hipercolesterolêmica. A inflamação foi estimada através da internalização do 18F-FDG na região do coração. (A) Medida da SUV de cada camundongo (n= 3-4) e (B) Figura representativa. A análise estatística foi realizada por OneWay Anova com Tukey como pós teste. **38**

8. Bibliografia **44**

Parte II: Estágio no exterior. Resultados obtidos no estágio realizado no Karolinska Institutet - Suécia. **52**

II-A: Immunometabolism as a new approach to development of “natural adjuvants” **53**

Figure 1: Splenocyte proliferation. The splenocytes from WT or IDO1 KO mice were plated in a 96 well plate (500.000 cells/well) and stimulated with p2c7 or LPS. The cells were treated with the IDO1 inhibitors 1MT (D, L and DL) or the glycolysis inhibitor DCA. After 72 hours, the proliferation was measured with the WST1 kit. **56**

Figure 2: Macrophage activation. Macrophage activation was measured through cytokine production. The IL10, TNF and IL6 concentrations were measured in the supernatant of BMDM from IDO1 WT or KO mouse after 18 hours of incubation with LPS or p2C7. **57**

Figure 3: Cytokine's kinetics. The IL10, TNF and IL6 concentrations were measured in the supernatant of BMDM from the IDO1 WT or KO mouse after 3, 18 or 24 hours of incubation with LPS or p2C7. **58**

Figure 4: The dual role of IDO1. BMDM obtained from WT or IDO1 KO mice were treated with 10 ng/mL LPS for 4 hours and immediately after 5 mM ATP for an additional 1 hour. The concentrations of TNF and IL1B were measured by ELISA in the supernatant. **59**

Figure 5: Tryptophan supplementation. BMDM obtained from WT or IDO1 KO mice were treated with 10 ng/mL of LPS plus different concentrations of tryptophan (0, 12.5, 25 or 50 uM) for 4 hours and immediately after 5 mM ATP for an additional 1 hour. The concentrations of TNF and IL1B were measured by ELISA in the supernatant. Interestingly, the tryptophan supplementation did not affect the TNF transcription but increased IL1b transcription. We did not see a clear effect of the pharmacological inhibition of IDO1 with 1MT DL in the mRNA levels of tested genes. **60**

Figure 6: TNF and IL1B gene expression. BMDM obtained from WT or IDO1 KO mouse were treated with 10 ng/mL LPS plus different concentrations of tryptophan (0, 12.5, 25 or 50 uM) for 4 hours. WT BMDM were also treated with 500 uM of the IDO1 inhibitor 1MT DL. **61**

II-B: Bioinformatic metabolic gene profiling of mouse and human AAA 62

Fig.1: Methodology. We first selected the datasets on NCBI – GEO and also the metabolic genes on KEGG. After the normalization of the data, the genes were analyzed and the most relevant selected as new targets. 63

Fig. 2. Organogram. The data was normalized and transformed in a qualitative method. 64

Figure 3: Heatmap of metabolic genes. (A) The heatmap represents the expression of all 555 genes divided into 10 pathways delimited in the left side of the graph. The group of samples were divided as control (no AAA), AOD (aortic obstructive disease), Large AAA and Small AAA. (B) All samples were analyzed using the PCA method. 71

Figure 4: Metabolic Pathways in AAA. Using the previous heatmap, the percentage of each color in the specific clusters was measured, as shown (A). The percentage of modulated genes in each cluster was calculated considering only the up or down regulated genes (The positive number consist in +1 cluster genes; negative numbers consist in -1 cluster genes), a line in the graph shows $y=50\%/-50\%$ (B). 72

Figure 5: Mostly differentiated pathways for Small AAA. The Log (FC) and $-\text{Log}_{10}$ (FDR) was calculated to create the volcano plot (A,C); Using the adjusted p value, the TCA pathway obtained from Kegg was colored (B); The percentage of genes up, down or non-regulated was calculated and expressed as a pizza graph (D). C1: Complex 1; C2: Complex 2; C3: Complex 3; C4: Complex 4; C5: ATP synthase. 73

Figure 7: Comparison between Large and Small AAA OxPhos genes. A Venn diagram was used to compare the similarities and differences between Large and Small AAA in OxPhos genes(A). (B) Up and (C) downregulated genes selected from the Venn diagram. 74

Figure 8: Comparison between different animal models of AAA. (A) Description of the groups analyzed in both datasets (GSE51227 and GSE12591). (B, C) The heatmap represents the expression of all genes (Table II) divided between 10 pathways delimited in the left side of the graph. The group of samples were divided as control (no AAA) or PPE AAA(7d) and control (no AAA), Ang NO AAA (no AAA) and Ang AAA. 75

Figure 9: Similarities between different AAA models. The metabolic patterns between PPE or Angio II model of AAA in the animal model were compared with human samples (A,B). Exclusive large human AAA modulated genes were compared with the mouse model of AAA (C). 76

Figure 10: Transcription factor Enrichment. The human AAA data was used to analyze the transcription factors that could be modulated in AAA. 77

III-C: The interplay of IDO1, NASH and Atherosclerosis 81

Figure 1: Atheroma plaque formation in IDO1 KO mice. The IDO1/ApoE KO mice or ApoE KO mice were fed with chow or HFD for 3,5 weeks or 7 weeks. The lesions were measured using ORO staining. ** p < 0,01; **** p < 0,001 84

Figure 2: Lipid deposition on liver of NASH mice model. The liver weight and the hepatic enzymes (ALT and AST) were evaluated as also the Immunohistochemistry to confirm the NASH phenotype. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,005 85

Figure 3: Gene expression of M1 and M2 markers. The gene expression of M1 markers (CD80, Cxcl10) and M2 markers (Arg1 and CD206) were evaluated on the liver of mice fed with the HFD or CHOW for 7 weeks. The IDO1 KO vs WT mice were also compared. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,005 86

Figure 4: Macrophage infiltration in NASH liver. Using immunofluorescence, we could detect a high infiltration of macrophages in livers of HFD mice (IDO1 KO and WT) but not in the chow diet. ** p <0,01; *** p < 0,005 87

Figure 5: Fibrosis in NASH liver. Sirius red staining at 7 weeks is shown as representative figures and also the gene expression of Col1a1 and the hydroxyproline content 87

Figure 6: Pro-inflammatory cytokines. Liver concentration of the pro-inflammatory cytokines MCP1, TNF and IL1B on 3,5 and 7 weeks of HFD (IDO1 KO vs WT). 88

Figure 7: Pro-inflammatory cytokines. Liver concentration of the pro-inflammatory cytokines MCP1, TNF and IL1B on 3,5 and 7 weeks of HFD (IDO1 KO vs WT). 89

90

Figure 8: Transcriptomics analysis in NASH. Datasets of 4 different transcriptomes of NASH were analyzed as shown above, the dataset was chosen based on the presence of a control group, liver expression data, HFD and weeks of diet. The normalization of the gene expression is described on topic 3. 90

Figure 9 IL-1 β is significantly correlated with IDO-1 gene expression in NASH. Using Pearson correlation, we identified that IDO1 is inversely correlated with IL1B expression in NASH; also, IDO1 and IL1B expression is shown with an upregulation of IDO1 and a downregulation of IL1B gene expression. The Linear regression also shows the inverse correlation between IDO1 and IL1B. 91

Figure 10: TDO2 induction in liver. Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs were used to analyse the global TDO2 expression (Software: Single Cell Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/sc/home>) – t SNE Perplexity 50; Colour plot by Organism part). The

gene expression of TDO2 was measured in the livers of the experimental mice (3,5w and 7w on HFD – IDO1 KO vs WT). **92**

Figure 11: In vitro study with HepG2 and THP-1 cells. Experimental design of interaction between hepatocytes (HepG2) and macrophages (THP-1). The TDO2 inhibitor LM10 was also used. **93**

Figure 11: TDO2 crosstalk with macrophages. The gene expression of TDO2 was analysed on HepG2 cells treated with iron (Fe2SO4), Palmitate (PA) or the mix of both. The IL1B production on macrophages treated with the conditional media with or without the Kyn supplementation was measured by ELISA. **94**

Bibliography: **95**

Anexo I **97**

Figura 1: Perfil metabólico de amostras humanas. As amostras do biobanco AGATA foram selecionadas e divididas entre Control (n = 22) ou Metabolic Syndrome (MS) (n =10). O padrão metabólico é mostrado em A-H. O perfil inflamatório foi também analisado (I-J) e os anticorpos contra LDL (-) ou p2C7 (L-O). oxLDL: LDL oxidada; LDL (-): LDL eletronegativa; MPO: mieloperoxidase; US-CRP: Proteína C-Reactiva Ultra-Sensível; SAA: Amilóide sérica A. Os outliers foram excluídos com o método ROUT (Q=1%); As amostras foram analisadas com o teste T. **99**

Figura 2: Correlações dos anticorpos anti-LDL (-) e anti-p2C7 com perfil lipídico. A análise de regressão linear avaliou a associação de IgM anti-LDL (-) com LDL (-), ApoB100, Colesterol (A); ApoE, TG (B); HDL, APOA1 (C). A análise de regressão linear avaliou a associação de IgM anti-p2C7 com LDL (-), ApoB100, Colesterol (D); ApoE, TG (E); HDL, APOA1 (F). A análise de regressão linear avaliou a associação de IgG anti-LDL (-) com LDL (-), ApoB100, Colesterol (G); ApoE, TG (H); HDL, APOA1 (I). A análise de regressão linear avaliou a associação de IgG anti-p2C7

com LDL (-), ApoB100, Colesterol (J); ApoE, TG (K); HDL, APOA1 (L). Para MS representado como pontos vazados e pontos preenchidos como Controle. **101**

Figura 3: Correlações dos anticorpos anti-LDL (-) e anti-p2C7 com marcadores inflamatórios. A análise de regressão linear avaliou a associação de IgM anti-LDL (-) com US-CRP, MPO, SAA (A); IgM anti-p2C7 (-) com US-CRP, MPO, SAA (B); IgG anti-LDL (-) com US-CRP, MPO, SAA (C); IgG anti-p2C7 (-) com US-CRP, MPO, SAA (D); A análise de regressão linear avaliou a associação de IgG anti-p2C7 com US - CRP (Para MS representado como pontos vazados e pontos preenchidos como Control) (E); Visualização da Correlação de Pearson entre a IgG e IgM anti-LDL (-) ou anti-p2C7 e uma tabela descritiva com os valores de p (F); A análise de regressão linear avaliou a associação de IgM anti-LDL (-) com IgG anti-p2C7. **103**

Anexo II **104**

Tabela I: Dados de massa molar. Foram tabelados os dados de massa molar e calculada a relação de massa molar/massa molar (1:1) entre os peptídeos e a ovalbumina. **104**

Figura 1: Avaliação das condições da reação de conjugação do peptídeo à ovalbumina. ELISA para detecção da reatividade do peptídeo com o respectivo anticorpo monoclonal. Foram testadas diferentes condições para as reações de conjugação dos peptídeos com a ovalbumina, sendo (A) 4°C por 1 hora, (B) Temperatura ambiente por 1 hora e (C) 37°C por 15 min. Para a linha em vermelho: Absorbância do branco. **107**

Figura 2: Avaliação das diferentes razões molares peptídeo:ovalbumina para a reação de conjugação dos peptídeos à ovalbumina. ELISA para detecção da reatividade do p2C7 com o respectivo anticorpo monoclonal. Foram testadas diferentes concentrações do MAb 2C7, assim como diferentes relações de molaridade entre ovalbumina e p2C7. **108**

Parte I: Imunização de camundongos LDLr^{-/-} com peptídeo mimético da LDL eletronegativa: uma potencial estratégia terapêutica para a aterosclerose

1. Introdução

1.1. Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e progressiva decorrente de alterações na parede das artérias de médio e grande calibre e associadas a diversos fatores de risco, dentre os quais destaca-se as hiperlipidemias, ou seja, o aumento plasmático das lipoproteínas (Libby et al, 2019). Dentre as comorbidades que acarretam o aumento da incidência de doenças cardiovasculares (DCV), podemos citar a síndrome metabólica (SM), que é um conjunto de fatores de risco metabólicos, caracterizados por obesidade abdominal, dislipidemia, baixos níveis de HDL, hipertensão e resistência à insulina (McCracken et al, 2017). Entretanto, fatores comportamentais como hábitos alimentares e sedentarismo estão comumente associados a essa desordem metabólica.

O estudo prospectivo Québec Cardiovascular Study mostrou que homens com SM apresentaram risco 20 vezes maior que o grupo controle para o desenvolvimento de DCV. Isto indica que estas perturbações metabólicas podem atuar sinergisticamente com os fatores de risco clássicos, como o aumento da LDL (St-Pierre et al, 2005). A inflamação crônica de baixa intensidade também é um aspecto importante desta síndrome. De fato, já se sabe que a obesidade é uma condição patológica associada a um estado inflamatório (Ellulu et al, 2017). A proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda, produzida pelo fígado em resposta à inflamação, infecção ou injúria tecidual. A PCR é liberada na circulação em resposta a outras citocinas inflamatórias como TNF e IL-6. Já é descrita uma correlação entre a PCR (como um biomarcador de inflamação subclínica) e a aterosclerose (Wang et al 2002). Interessantemente, o aumento de TNF foi descrito em indivíduos obesos, sugerindo seu papel como

citocina responsável por desencadear o processo de inflamação na obesidade, promovendo resistência à insulina e anormalidades metabólicas (Khaodhia et al, 2004).

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é de grande relevância na aterosclerose (Weber et al, 2011), sendo que os níveis plasmáticos elevados de colesterol total e da LDL estão associados a um terço dos casos descritos (Sniderman et al, 2012; Sniderman e Kwiterovich, 2013; Toth et al, 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), as DCV são a principal causa de morte no mundo (17,9 milhões de mortes, 32% do total de óbitos no mundo) (WHO, 2016), tendo a aterosclerose como o principal processo fisiopatológico que acomete as artérias. No Brasil, estima-se que até o final de 2021 haverá 400 mil mortes decorrentes de DCV, sendo que apenas no período de pandemia compreendido entre março de 2019 e o mesmo período de 2020, as capitais brasileiras registraram aumento de até 132% no número de mortes por DCV (Brant et al, 2020).

Após a passagem pelo endotélio, a LDL pode ficar retida na camada íntima arterial devido a interação entre a ApoB-100 (Apolipoproteína B100), principal proteína presente na LDL, e os proteoglicanos da matriz extracelular, tornando-a alvo de reações oxidativas (Yoshida e Kisugi, 2010). Apesar de comumente descritas, as modificações da LDL não são de caráter exclusivo oxidativo, podendo ocorrer ainda na corrente sanguínea e, dando origem a diferentes subclasses de LDL modificada (LDLm) através de lipólise, glicação e proteólise, além da oxidação (revisado por Mello et al, 2011).

O acúmulo de LDLm na camada íntima dos vasos pode afetar a função de células endoteliais estimulando a produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como a proteína quimiotática de monócitos (CCL2) e interleucina 8 (IL-8), bem como a expressão de moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 (molécula de adesão celular-1 e molécula de adesão intracelular-1 respectivamente), promovendo o recrutamento de monócitos da circulação e dando origem a uma complexa disfunção endotelial (revisado por Faulin et al, 2010) (Figura 1).

Os monócitos recrutados, após sua diferenciação em macrófagos, reconhecem as diversas classes de LDLm como padrões moleculares associados ao perigo (DAMP, danger-associated molecular patterns) através de receptores de reconhecimento padrão (PRR) do tipo Toll Like (TLR), Scavenger (SR) e NOD-like (Miller et al, 2011). Assim, o reconhecimento da LDLm pelos macrófagos leva à ativação de vias de sinalização intracelular, entre as quais a via do NF- κ B (Fator Nuclear kappa B), culminando em um evento inflamatório (Janabi et al, 2000). Concomitantemente, ocorre um influxo de LDLm para o interior dos macrófagos via receptores scavenger, o que, por falta de uma regulação por feedback negativo, resulta na formação de células com alto teor de ésteres de colesterol, denominadas células espumosas (foam cells, FC), que se acumulam no espaço subendotelial, originando as lesões designadas como estrias gordurosas, a primeira etapa da aterogênese (Moore e Tabas, 2011).

Outras células do sistema imune são recrutadas para a íntima arterial, entre elas diversas classes de linfócitos (Ketelhuth e Hansson, 2016). Os linfócitos T (CD4+ e CD8+) após ativação via contato com antígenos da LDLm apresentados por macrófagos e células dendríticas, pelo complexo principal de histocompatibilidade classe I e II (MHC I e II) (Wolf et al, 2015), passam a produzir citocinas inflamatórias, como IFN- γ e IL-4, sendo a frequência de células T CD4+, em placas ateroscleróticas humanas, maior que a de células T CD8+ (Grivel et al, 2011). As células Th17, CD4+ e secretoras de IL-17, são associadas com uma resposta pró-inflamatória e pró-aterogênica (Weaver et al, 2006), visto a presença de um desequilíbrio entre Th17 / Tregs, em pacientes com síndrome coronariana aguda, sugerindo assim, um potencial papel das células Th17 na desestabilização da placa. Além disso, já foi demonstrado que células T reguladoras (Treg) podem suprimir a atividade de células T efetoras pró-aterogênicas, desempenhando um papel anti-aterogênico (Cheng et al, 2008). As interleucinas TGF- β , IL-10 e IL-35, normalmente produzidas por Tregs, possuem papel imunossupressor, onde tanto a IL-10 como o TGF- β , em estudos in vitro e in vivo, induzem uma resposta tolerogênica e modulam a resposta dependente de macrófagos na aterosclerose (Green et al 2003; Pastrana et al, 2013). A IL-35 além de seu papel anti-inflamatório, estaria relacionada com a diferenciação de células T CD4+ em Treg (Lin et al, 2015).

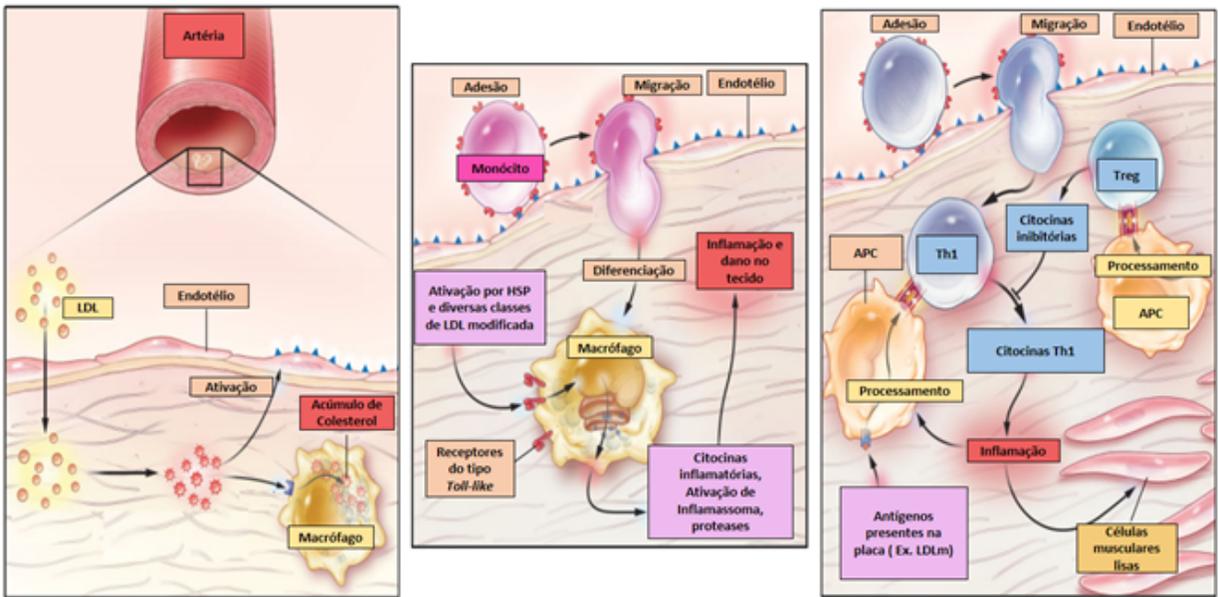


Figura 1: Aterogênese. (LDL – Lipoproteína de baixa densidade; HSP – Heat shock protein; APC– Célula apresentadora de antígenos; Th1 – Linfócito T helper 1; Treg – Linfócito T regulador). Na primeira fase, a LDL é depositada no endotélio e sofre modificações, resultando na LDL modificada (LDLm). A LDLm estimula as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão e várias quimiocinas. Isto leva a um recrutamento de monócitos, que migram para a íntima e diferenciam-se em macrófagos. Os macrófagos reconhecem a LDLm através dos seus receptores scavenger. As células musculares lisas proliferam e tentam estabilizar a placa com uma capa fibrosa. Além disso, as proteases liberadas pelos macrófagos podem desestabilizar a placa, o que pode conduzir à ruptura, dando origem ao trombo. Adaptado de Hansson, 2005.

A resposta adaptativa, dependente de anticorpos, também desempenha um importante papel na progressão da aterosclerose (Tsiatoulas et al, 2014), tendo em vista que já foram identificados diferentes antígenos presentes na placa aterosclerótica (Grosso et al, 2008; Andican et al, 2008, Gautier et al, 2009; Yeang et al, 2016). Diversos estudos demonstram que os linfócitos B1 e B2 possuem diferentes papéis na aterogênese (Caligiuri et al, 2002; Major et al, 2002; Ait-Oufella, et al 2010; Kyaw et al, 2010; Kyaw et al, 2017). Dados experimentais indicam que células B2 teriam efeito pró-aterogênico (Ait-Oufella et al, 2010; Kyaw et al, 2012); em contraste, as células B1a teriam atividade ateroprotetora (Kyaw et al, 2011; Hosseini et al, 2016; Hosseini et al, 2018). Apesar da função das células B1b não

estar elucidada, evidências indicam efeito ateroprotetor semelhante às células B1a (Rosenfeld et al, 2015; Tsiantoulas et al, 2015).

Durante a progressão da aterosclerose, células endoteliais, musculares lisas e espumosas morrem por apoptose, necroptose ou piroptose. A morte das células espumosas faz com que o conteúdo lipídico (composto basicamente por colesterol e seus ésteres) seja liberado na íntima. Como consequência, ocorre a formação do núcleo necrótico do ateroma, o qual estimula o estado inflamatório, com maior recrutamento leucocitário (Falk, 2006). Na tentativa de conter e cicatrizar a placa aterosclerótica, células musculares lisas da camada média arterial, estimuladas por fatores de crescimento e citocinas liberadas pelos macrófagos, proliferam e migram para a camada íntima. No local, forma-se uma capa fibrosa, que pode se tornar mais fina e frágil nas lesões ateroscleróticas instáveis (Falk, 2006). O centro necrótico presente no interior da placa proporciona uma zona de hipóxia, a qual estimula a liberação de fatores pró-angiogênicos como HIF-1 α (Fator induzido por hipóxia 1 alfa) e VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial) (Ho-Tin-Noé et al, 2011), promovendo, assim, a neoangiogênese. Nesse processo ocorre a formação de vasos sanguíneos frágeis que podem sofrer ruptura e originar hemorragia intraplaca, contribuindo para a instabilidade. As placas tornam-se cada vez mais complexas com calcificação e intensa liberação de diversas proteinases por macrófagos (ex. collagenases, gelatinases, metaloproteinases) que degradam a matriz extracelular, promovendo maior susceptibilidade para o rompimento da placa aterosclerótica (Shah, 2003). A exposição do centro lipídico necrótico à luz do vaso inicia uma resposta trombótica que culminará nos desfechos clínicos característicos da aterosclerose (Libby, 2009).

Dentre as citocinas já descritas para envolvimento com aterosclerose, o TNF é um mediador central das reações inflamatórias. O TNF é uma citocina homotrimérica que se liga a dois receptores, TNFR I e TNFR II, promovendo lesão das células endoteliais, apoptose e supressão das atividades dos progenitores das células endoteliais, recrutamento de células imunes, estresse oxidativo, alterações do

metabolismo de lipídios e glicose além da ativação e maturação de leucócitos (Idriss et al, 2000). Por sua vez, a LDLm pode induzir a liberação de TNF dos macrófagos (Faulin et al, 2019).

1.2. Lipoproteína de baixa densidade (modificada, oxidada e eletronegativa):

O colesterol é transportado para as células periféricas, principalmente pela LDL, a qual é internalizada por endocitose mediada pelo receptor de LDL (LDLr ou B/E), sendo então transportada por endossomas e transferida para o citosol pelas proteínas Niemann–Pick C1 e C2 até ser degradada em aminoácidos, colesterol livre e ácidos graxos. Entretanto, o acúmulo de colesterol intracelular pode causar diversas patologias, incluindo a aterosclerose, como descrito anteriormente (Wang et al, 2012).

A partícula de LDL possui diâmetro de 22 nm, aproximadamente, núcleo formado por ésteres de colesterol e triglicérides (moléculas altamente apolares) e uma superfície de fosfolipídios e colesterol não esterificado. Os lipídeos apolares são separados do meio aquoso pelos lipídeos polares, porém, a partícula ganha estabilidade devido à presença de uma proteína anfipática específica, a ApoB-100 (SIQUEIRA et al, 2006). Devido ao seu tempo de meia vida plasmática (2-3 dias), a LDL está suscetível a sofrer modificações tanto em sua parte proteica quanto em sua porção lipídica, ainda na circulação, o que tornaria essa partícula imunogênica (STEINBERG, 2009).

A formação de LDLm pode estar associada a outras patologias de base como, por exemplo, diabetes descompensada, onde existe maior probabilidade de glicação; inflamações crônicas associadas ao estresse oxidativo, que podem aumentar a oxidação desta lipoproteína; ou, até mesmo pacientes com doença renal crônica submetidos à hemodiálise, onde há maior chance de reação da ApoB-100 com a hemoglobina (revisado em MELLO, 2011).

O metabolismo da LDL nativa (LDL_n), ou seja, aquela que não sofreu modificações, se diferencia da LDLm principalmente quanto à sua remoção mediada por receptor. Enquanto a remoção da LDL_n ocorre por endocitose mediada pelo receptor B/E, via reconhecimento do domínio N-terminal da

ApoB-100, a LDLm não pode usar esta via. As alterações estruturais e/ou conformacionais da LDLm fazem com que ela se ligue a diferentes receptores scavenger (primordialmente em macrófagos) e não mais ao B/E, promovendo um quadro inflamatório. (GOLDSTEIN et al, 1979). Além disso, a captação mediada pelo receptor B/E é negativamente controlada pelos níveis de colesterol intracelular, enquanto a internalização via receptor scavenger não tem esse controle por feedback negativo (Wang et al, 2012). Apesar de serem formadas por diferentes processos, as partículas de LDLm possuem propriedades semelhantes, podendo-se citar:

Elevada eletronegatividade, quando comparada com a LDLn;

- Capacidade de ativar processos inflamatórios;
- Menor afinidade pelos receptores de LDL (B/E) no fígado (o que diminui seu catabolismo e aumenta seu tempo de meia vida na circulação sistêmica);
- Maior afinidade pelos proteoglicanos da matriz extracelular da íntima do vaso.

Sendo assim, este grupo de partículas de LDLm, mesmo que de origem heterogênea, foi designado como LDL eletronegativa [LDL (-)] por Avogaro et al (1988), baseando-se na migração eletroforética (eletroforese capilar) das subfrações de LDL.

Na década de 80, sugeriu-se que mudanças conformacionais na estrutura da ApoB-100 poderiam levar ao não reconhecimento da LDL pelo receptor B/E. Essas modificações seriam resultado da derivatização dos resíduos de lisina (lys), localizados no domínio de ligação da ApoB-100 a este receptor, com aldeídos formados na peroxidação dos ácidos graxos insaturados esterificados aos fosfolípidos, triacilgliceróis ou ésteres de colesterol da lipoproteína. Haberland e colaboradores (1984) demonstraram que, in vitro, a existência de um threshold de 15% dos resíduos de lys da LDL humana, sendo que, acima desse limiar, o reconhecimento e a internalização da mesma ocorria via receptor scavenger com perda gradativa do reconhecimento pelo receptor B/E.

A derivatização dos resíduos de lys da ApoB-100 promove um ganho de carga residual negativa, resultando em mudança do seu ponto isoelétrico. É importante ressaltar que o reconhecimento da LDL modificada via receptor scavenger está diretamente relacionado com a modificação das lisinas (lys) e as cargas alteradas da ApoB-100. A neutralização da carga positiva dos resíduos de lys por malondialdeído (MDA), anidrido acético ou glutaraldeído resulta na captação da LDLm pelos receptores scavenger, entretanto, com a preservação da carga positiva por metilação, a LDLm é reconhecida pelo receptor B/E, não induzindo o acúmulo de colesterol pelos macrófagos e, portanto, não induzindo a formação de células espumosas (HABERLAND ET AL, 1984).

Lund-Katz e colaboradores (1988) utilizaram da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) para detectar lys marcadas com o isótopo ^{13}C , na ApoB-100 de um pool de LDL isolada do plasma humano. Identificou-se duas populações distintas de lys expostas, sendo que ambas diferem quanto à frequência de ressonância (42,8 ppm e 43,2 ppm), população relativa (70 e 30%) e basicidade (valores de pKa 10.5 e 8.9, respectivamente). Valores menores de pKa indicam um microambiente mais básico na proteína, tornando os resíduos lys do domínio de ligação da apoB-100 ativos para seu reconhecimento pelo receptor B/E. Para as partículas de LDL pequenas e densas, conhecidas como aterogênicas, a proporção de lys ativas está reduzida, explicando assim sua menor afinidade pelo receptor B/E (Nigon et al, 1991). No entanto, o mesmo não foi observado para a população de LDL (-). Em comparação com a LDLn, a LDL (-) apresenta um terceiro subtipo de lys, denominada “lisina intermediária”, possuindo um microambiente diferenciado e maior basicidade (pKa 10,7). Esses resultados indicam a existência de diferenças conformacionais entre a ApoB-100 da LDL (-) e da LDLn, sugerindo microambientes distintos, proporcionado pelos aminoácidos menos básicos, o que estaria relacionado com a perda da afinidade pelo receptor B/E (Blanco et al, 2010).

Quanto à composição, a LDL (-) difere em relação à LDLn por possuir um aumento de ácidos siálicos, Apolipoproteína E, Apolipoproteína C-III e ácidos graxos não esterificados (do inglês, NEFA) (Sánchez-Quesada et al, 2004), que podem estar associados à sua eletronegatividade aumentada. As partículas de LDL (-) também são ricas em hidroperóxidos (Sevanian et al, 1997), dienos conjugados,

óxidos de colesterol (Chang et al, 1997), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e apresentam menores concentrações de α -tocoferol (Cazzolato et al, 1991) (Figura 3).

O primeiro indício de relação entre a LDL (-) e aterosclerose foi o aumento da sua concentração plasmática em pacientes com doenças associadas ao maior risco de eventos cardiovasculares, como hipercolesterolemia familiar (Benitez, S. e Ordoñez-Llanos, 2004; Barros et al, 2006), hipertrigliceridemia (Sánchez-Quesada et al, 2002) e diabetes mellitus tipo 1 e 2 (Sánchez-Quesada et al, 1996). Também foram relatadas concentrações plasmáticas de LDL (-) aumentadas em pacientes com infarto agudo do miocárdio (Chang et al, 2013), doença arterial coronariana (Niccoli et al, 2012) e obesidade infantil (Silva et al, 2013).

É importante esclarecer as diferenças entre as terminologias empregadas para designar a subfração de partículas modificadas de LDL. Apesar dos processos redox contribuírem para a modificação da apoB-100 in vivo, o termo LDL oxidada (LDLox) é frequentemente utilizado para a LDL nativa que sofreu oxidação in vitro. As propriedades inflamatórias e de internalização celular diferem de acordo com a intensidade de oxidação dos lípidos e das modificações da ApoB-100 dessas partículas de lipoproteínas, que são muito mais intensas in vitro do que in vivo (Steinberg, D, 2009). Assim, entende-se como LDL (-) a fração de LDL modificada in vivo, por diferentes processos fisiopatológicos, que resultam em alterações estruturais ou conformacionais da ApoB-100, assim como do seu conteúdo lipídico, e que alteram seu reconhecimento pelos receptores B/E (revisado por Faulin et al, 2008). Dentre as propriedades aterogênicas já descritas para a LDL (-), podemos citar a modulação da atividade de metaloproteinases, como MMP9 em monócitos (Ligi et al, 2018), disfunção mitocondrial e senescência em células endoteliais (Wang et al, 2018), aumento da produção dos fatores de diferenciação M-CSF e GM-CSF por macrófagos (Yang et al, 2017), inflamação do tecido adiposo (Ke et al, 2017) e ativação do NLRP3-Inflamassoma em macrófagos (Estruch et al, 2015).

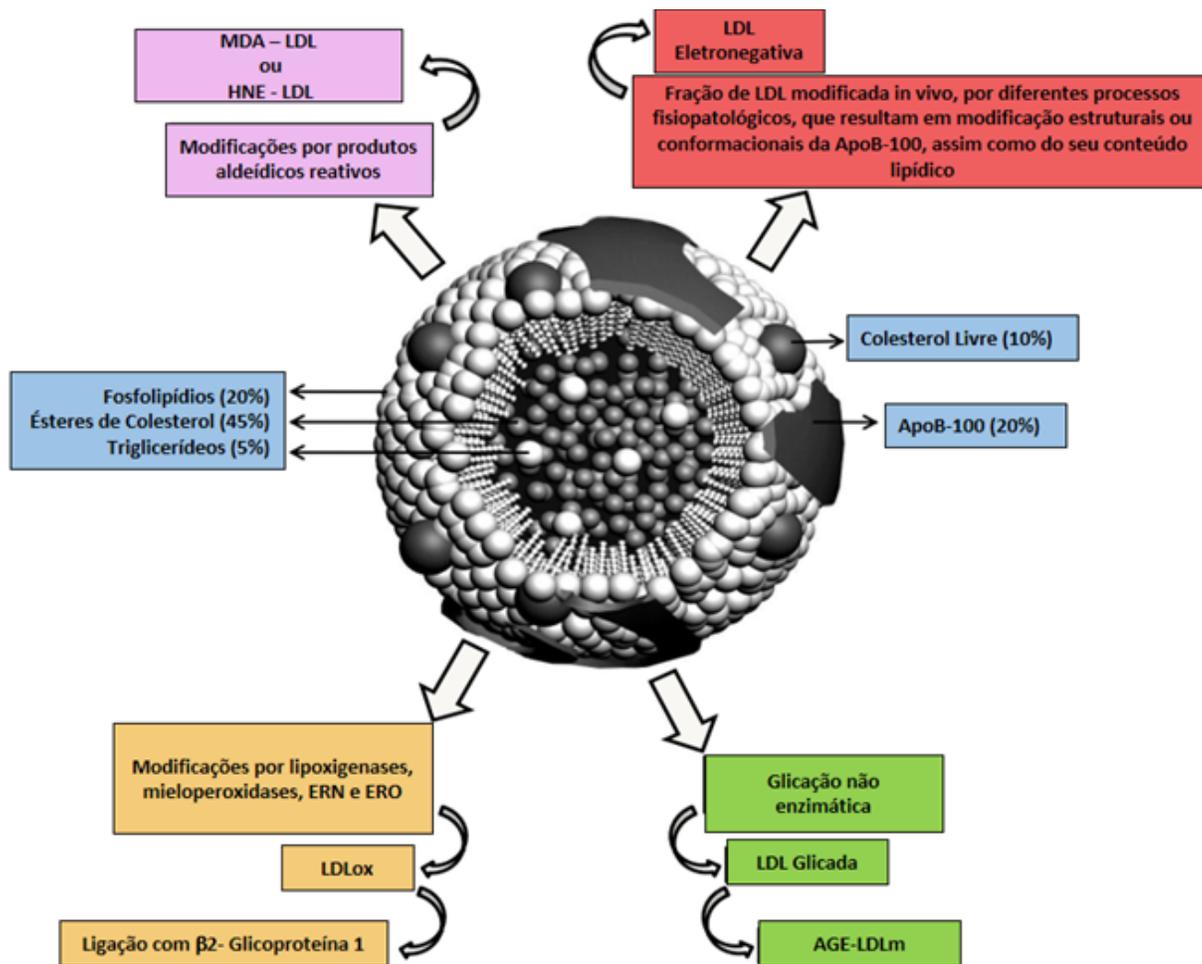


Figura 2: Formação da LDL eletronegativa. MDA – LDL: Malondialdehído LDL; HNE- LDL: 4-hidroxinonenal LDL; ERN: Espécies reativas de nitrogênio; ERO: Espécies reativas de oxigênio; LDLox – LDL oxidada; AGE-LDL: Produtos avançados de glicação-LDL. As modificações na estrutura da LDL nativa são capazes de induzir a agregação e/ou a fusão das partículas, o que é atualmente reconhecido como um pré-requisito para a iniciação do acúmulo na íntima arterial. As formas modificadas de LDL podem participar da progressão da aterosclerose através de processos inflamatórios e imunológicos. A LDL pode ser modificada por oxidação, glicação, alquilação e nitração, entre outras reações. Todas as modificações da LDL podem gerar neo-epítomos, que torna a partícula imunogênica (Revisado por Faulin et al, 2008).

1.3. Peptídeos mimotopos da LDL (-) humana:

A terminologia mimotopo foi primeiramente utilizada por Geysen e colaboradores (1986), definindo-o como uma molécula capaz de se ligar à porção variável de um anticorpo, mimetizando assim, o epítopo do antígeno. Entretanto, este conceito já foi expandido para se referir a peptídeos que mimetizam qualquer sítio de ligação (Smith et al, 1997), sendo útil para diversas áreas, como identificar alvos moleculares (Tong et al, 2002), diagnóstico (Hsiung e Wang, 2008), finalidades terapêuticas (Macdougall et al, 2009) e vacinas (Knittelfelder et al, 2009).

Considerando as diferenças conformacionais entre a estrutura da ApoB-100 da LDLn e da LDL (-), em um estudo inicial, nosso grupo desenvolveu 2 anticorpos monoclonais (1A3 e 2C7) a partir da imunização de camundongos Balb/c com a LDL (-) humana. Estes anticorpos são capazes de reconhecer epítomos derivados das modificações da ApoB-100 na LDL (-) e não possuem afinidade pela LDLn (Faulin et al, 2008). Em uma etapa seguinte, em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo José Giordano, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, foram mapeados os epítomos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais anti-LDL (-), utilizando-se de uma biblioteca de peptídeos aleatórios apresentados por bacteriófagos. Na construção da biblioteca, oligonucleotídeos aleatórios foram inseridos entre a sequência codificante para o peptídeo sinal e o N-terminal da proteína pIII do capsídeo do bacteriófago. Dessa forma, peptídeos aleatórios foram expressos como fusões da região N-terminal da proteína pIII dos fagos (Giordano et al, 2005).

A técnica de phage display utiliza-se de bacteriófagos modificados por biologia molecular, de tal forma que cada partícula viral apresenta um polipeptídeo exógeno na sua superfície (p.ex., um pequeno peptídeo ou um fragmento de um anticorpo). A coleção de fagos obtidos é, portanto, uma 'biblioteca' que pode conter milhões de elementos diferentes, onde os sítios de interação podem ser compostos por resíduos de aminoácidos contínuos (epítomos lineares) ou descontínuos (epítomos conformacionais) da

sequência primária de uma proteína. As bibliotecas de phage display são, então, utilizadas para isolar peptídeos ou moléculas ligantes de receptores, enzimas, células ou tecidos. (Pande et al, 2010).

A utilização de uma biblioteca CX8C (10 aminoácidos, sendo duas cisteínas nas extremidades formando uma ponte dissulfeto) possibilitou a seleção de ligantes dos anticorpos monoclonais anti-LDL (-). Os peptídeos obtidos podem ser classificados como mimotopos, ou seja, moléculas que mimetizam a estrutura de um epítopo, não possuindo assim a sequência linear de aminoácidos encontrados na ApoB-100. Devido a esta propriedade, é esperada indução de resposta imunológica semelhante à obtida pelos epítomos da LDL (-).

1.4. Caracterização dos peptídeos mimotopos p1A3 e p2C7:

Os peptídeos ligantes dos anticorpos monoclonais anti-LDL (-) foram nomeados como p1A3 e p2C7 (patente concedida pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o número de registro BR 10 2013 010631-3).

Quanto à estrutura primária, ambos diferem quanto aos aminoácidos presentes, possuindo 40% de similaridade (considerando as cisteínas das extremidades) e características apolares, sendo que o p2C7 possui maior número de aminoácidos apolares quando comparado ao p1A3. As duas cisteínas, posições 1 e 10, em ambos peptídeos são de extrema importância para a estrutura conformacional, já que a presença do grupo tiol na cadeia lateral permite a formação de uma ponte dissulfeto entre elas e, como consequência, a estrutura terciária possui formato de anel. Medidas de SAXS (Espalhamento de raios-X a baixo ângulo) para sistemas peptídicos circulares foram realizadas para amostras em solução de p1A3 e p2C7 e, com a modelagem aos dados experimentais adotada, foi possível demonstrar a formação dos anéis peptídicos, obtendo o raio do anel e o peso molecular (Faulin et al, 2019). Também verificamos a formação de agregados com a variação da temperatura, efeito pronunciado para o p2C7, entretanto, sem comprometer a estrutura circular (Faulin et al, 2019).

Em estudos prévios (Faulin et al, 2019; Tripodi et al, 2020), avaliamos a resposta de macrófagos (humanos e murinos) frente ao estímulo com os peptídeos ligantes dos mAb 1A3 e 2C7, in vitro. O peptídeo p2C7 apresentou atividade inflamatória em macrófagos, in vitro, ativando o sinal transcricional do inflamassoma e promovendo o aumento da expressão de pró-IL-1 β , caspase-1 e NLRP3 e do componente de sinalização intracelular MyD88, mimetizando a ação da LDL (-) e superando a capacidade de estímulo da LDL (-) para a expressão de pró-IL-18. Portanto, as evidências mostradas suportam a hipótese de que o p2C7 seria um DAMP presente na partícula de LDL (-) e que pode contribuir para o processo inflamatório da placa aterosclerótica. Os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) são moléculas liberadas sob estresse celular ou lesão de tecido e são considerados sinais de perigo endógeno, porque induzem respostas inflamatórias potentes ao ativar o sistema imunológico inato durante a inflamação não infecciosa (Roh and Sohn, 2018). O p2C7 então, seria o sinal de “dano” expresso pela LDL (-).

Adicionalmente, foi descrita a atividade imunomoduladora do p2C7 in vitro. Macrófagos murinos tratados com este peptídeo apresentaram maior polarização para o fenótipo M1 e, assim como em macrófagos humanos, também foi detectada maior produção da citocina TNF (Faulin et al 2019, Tripodi et al, 2020).

Em outro estudo preliminar, Faulin TES (comunicação verbal, dados não publicados) observou que a imunização de camundongos LDLr-/- normocolesterolêmicos com os peptídeos mimotopos adsorvidos em KLH, na presença de adjuvante completo de Freund (1a dose) e reforço com adjuvante incompleto de Freund (2a dose), induziu um aumento significativo na frequência das populações de linfócitos T (CD8+) e B (CD19+) no baço. Ainda, houve um aumento nos títulos de IgG anti-LDL (-) no soro para ambos os peptídeos, em relação ao grupo de animais não imunizados. Quanto aos títulos de IgM anti-LDL (-), observou-se aumento apenas nos camundongos imunizados com o p2C7.

1.5. Peptídeos derivados da ApoB-100 já utilizados para a imunização de camundongos

Estudos anteriores demonstraram que alguns peptídeos formados pela sequência linear da ApoB-100 humana podem ser utilizados para a imunização de camundongos e apresentam efeitos benéficos, como a redução do processo aterogênico (Fredrikson et al, 2003; Fredrikson et al, 2008; Chyu et al., 2005).

Fredrikson e colaboradores (2003) sintetizaram 302 peptídeos com 20 aminoácidos cada, representando a sequência inteira da ApoB-100 humana. A partir da premissa que a LDL modificada/oxidada é crucial no processo aterogênico, os autores derivatizaram os peptídeos com MDA antes da sua utilização como antígenos para detecção de anticorpos reativos no plasma humano. Foram detectados mais de 100 anticorpos reativos aos peptídeos desta biblioteca modificada. Por sua vez, Chyu e colaboradores (2005), utilizando a mesma biblioteca de peptídeos anteriormente citada, selecionaram dois deles, os quais apresentavam homologia com a sequência da ApoB-100 murina entre 70 e 95%. Esses peptídeos foram utilizados para protocolos de imunização: a) ativa (resposta imune do camundongo contra o peptídeo); b) passiva (transferência de esplenócitos de camundongos previamente imunizados para outro não imunizado). Apenas o peptídeo com maior homologia com a ApoB-100 murina apresentou efeito ateroprotetor com a imunização ativa. Este estudo mostrou que a imunização ativa pode induzir o aumento de IgG anti-LDLox, da expressão de IFN- γ , IL-4 e IL-10 e, conseqüentemente, reduzindo o tamanho da placa aterosclerótica, quando comparada com o controle não imunizado. Em relação à imunização passiva, o mesmo peptídeo obteve resultados positivos quando

comparado o tamanho da placa com o controle não imunizado, porém sem aumentar os níveis de IgG ou IgM contra a LDLox.

Em outro estudo, Fredrikson e colaboradores (2008) imunizaram camundongos LDLr -/- transgênicos para a ApoB-100 humana com dois peptídeos selecionados a partir da biblioteca de peptídeos da sequência linear da ApoB-100 humana e sem nenhuma modificação. Os resultados demonstraram um aumento de IgM reativo à LDL nativa e LDL oxidada com cobre, porém sem aumento de IgG ou dos genes IL-10, FOXP3, CCR4 (marcadores de resposta Th2) ou TIM3 (marcador de resposta Th1). Entretanto, observou-se redução da placa aterosclerótica quando comparada com o controle não imunizado, sugerindo um efeito ateroprotetor a partir da resposta imune-humoral (Fredrikson et al, 2008).

Com o advento da bioinformática, outras formas de seleção de alvos foram propostas. A partir da estratégia de predição de epítomos da ApoB-100 ligantes ao MHC II, Tse e colaboradores (2013) selecionaram dois peptídeos com maior índice de interação com este complexo. A imunização de camundongos C57BL/6 Apoe-/- com estes peptídeos resultou na redução de ~60% no desenvolvimento da placa aterosclerótica. Como conclusão, este trabalho mostrou a participação fundamental da IL-10 e seu papel ateroprotetor, além do aumento nos títulos de IgG1 e IgG2c contra os peptídeos utilizados. No entanto, nesse estudo utilizou-se o adjuvante completo de Freund, que não é licenciado para uso em humanos, sendo muito criticado pelos comitês de ética em pesquisa animal por causar uma resposta imune altamente inflamatória e exacerbada.

2. Justificativa

O desenvolvimento de peptídeos que mimetizam as ações da LDL (-) realizado pelo nosso grupo de pesquisa abre uma gama de possibilidades. Esses peptídeos não representam regiões da sequência linear da ApoB-100 humana, mas microdomínios conformacionais de epítomos da ApoB-100 da LDL (-), tornando-os candidatos para a imunomodulação da aterogênese. Considerando que alterações conformacionais da LDL (-) podem expor epítomos imunogênicos da ApoB-100 (Blanco et al, 2010), a

utilização do p2C7 para imunização ativa representa uma possível estratégia para a ateroproteção. Além da prevenção do desenvolvimento da placa, um grande desafio na estratégia terapêutica da aterosclerose consiste na regressão da placa aterosclerótica e, principalmente, na inibição do processo inflamatório que é responsável pela desestabilização e ruptura da lesão aterosclerótica. Como já mencionado anteriormente, na SM a inflamação constitui um fator importante associado ao desenvolvimento da aterosclerose. Estudo anterior do nosso grupo (Cicarelli, 2016 - Tese de doutorado) demonstrou que pacientes com SM não apresentaram diferenças entre os níveis plasmáticos de LDL, LDL (-) ou LDLox, embora apresentassem aumento de alguns marcadores inflamatórios. Esse achado suscitou a hipótese de que embora o conteúdo total de LDL (-) não estivesse aumentado, seus componentes modificados, como o microdomínio p2C7, poderiam contribuir para o processo inflamatório. Neste contexto, nos propusemos investigar a presença de anticorpos anti-p2C7 em indivíduos com SM, assim como sua correlação com o processo inflamatório, no sentido de avaliar o possível efeito pró-inflamatório do p2C7 em uma condição inflamatória associada ao risco aumentado para o desenvolvimento de DCV .

O p2C7, um peptídeo circular de 10 aminoácidos, é capaz de ativar o inflamassoma em macrófagos humanos e induzir a produção de TNF como mostrado anteriormente (Faulin et al, 2019; Tripodi et al, 2020), além de induzir um fenótipo M1 em macrófagos murinos. Assim, as evidências corroboram a hipótese de que o p2C7 seria um DAMP presente na partícula de LDL (-), que poderia contribuir para o processo inflamatório da placa aterosclerótica. Com base nesses achados, investigamos se o p2C7 modula a inflamação dependente do TNF, tanto verificando a associação dos anticorpos que interagem com esse epítipo no plasma humano de pacientes com SM, como utilizando diferentes protocolos de imunomodulação de camundongos C57BL/6 LDLr -/-.

3. Objetivo

Avaliar a imunomodulação induzida pelo p2C7 em camundongos C57BL/6 LDLr -/-.

- Detectar anticorpos anti-p2C7 em amostras de pacientes com síndrome metabólica e em indivíduos sem essa síndrome (controle);
- Avaliar as correlações entre os parâmetros associados à inflamação e aterosclerose com os níveis de anticorpos anti-p2C7;
- Avaliar a imunogenicidade do peptídeo p2C7 em camundongos C57BL/6 LDLr ^{-/-};
- Comparar os efeitos dos adjuvantes (hidróxido de alumínio e Montanide ISA 720) no processo de imunização;
- Utilizar o peptídeo conjugado para imunização ativa de camundongos C57BL/6 LDLr ^{-/-};
- Avaliar a resposta inflamatória induzida pelo peptídeo p2C7 nos diferentes protocolos utilizados.

4. Metodologia:

4.1. Amostras de pacientes com SM

Este estudo foi realizado com o consentimento informado obtido de todos os indivíduos e obedecido às regulamentações brasileiras e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (número do protocolo, CAAE: 25639513.9.0000.0067) de acordo com a Declaração de Helsinque. As amostras de plasma e soro utilizadas foram obtidas a partir de banco de material biológico conservado em freezer -80°C, que foi estabelecido na realização do Projeto de Pesquisa intitulado “Avaliação de Ateromatose Subclínica em Pacientes HIV/aids: Determinação da Velocidade de Onda de Pulso e da Espessura Média Íntima de Carótidas” (Registro CEP-HU/USP: 807/08, Registro SISNEP-CAAE: 0019.0.198.015-08, Anexo II-B). Foram utilizadas 32 amostras de plasma humano, previamente armazenadas a -80 ° C. As amostras foram divididas em controle (22) e síndrome metabólica (10). A caracterização quanto aos parâmetros metabólicos e

inflamatórios, assim como os níveis de IgG e IgM anti LDL eletronegativa podem ser conferidos no Anexo II.

4.2. Conjugação do peptídeo com ovalbumina

Foram utilizadas diferentes proporções de peptídeo/ovalbumina, concentrações de glutaraldeído e temperatura, como mostrado no ANEXO I. De forma sucinta, a reação foi testada tanto em geladeira (4°C) como sob aquecimento (37°C), sempre com agitação constante. Em todos os casos, as reações foram adaptadas de Carter, 1996 e Kerr MA et al., 1994. Preparamos inicialmente, uma solução de ovalbumina em PBS, pH 7, dissolvendo 3 mg de ovalbumina em 1 mL de PBS (3 ug/mL) e, após completa dissolução, a solução foi filtrada em filtros com poro de 0,45 um. A concentração final, medida pela metodologia de Bradford, foi de 2700 ug/mL. A solução filtrada foi então fracionada e armazenada em freezer (-20°C). Para o peptídeo utilizamos a concentração de 1 ug/uL, também fracionados e armazenados em freezer (-20°C).

Para a conjugação, fixamos a quantidade de 100 ug de ovalbumina e as devidas proporções de peptídeo. Em um tubo eppendorf de 2 mL foram adicionados os volumes correspondentes de ovalbumina e peptídeo e, após homogeneizar a solução, foi adicionado glutaraldeído 2,3% v/v (5 uL para cada 100 uL de reação), gota a gota e PBS q.s.p 200 uL finais. Para encerrar a reação foi utilizado Tris 1M, pH 9 (10 uL para cada 100 uL de reação).

4.3. ELISA para detecção do peptídeo mimotopo

O peptídeo p2C7, na forma livre ou conjugado com ovalbumina, foi adicionado (5 ug/mL em PBS, 100 uL/poço) em placa de poliestireno de 96 poços de fundo plano (Nunc Immobilizer™, 436006), incubando-se overnight (16 horas) à 4°C. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS-Tween 0,5% pH 7,4, 250 uL/poço e bloqueados com 200 uL/poço de solução PBS contendo 10% de soro fetal bovino (FBS). A incubação para o bloqueio foi realizada por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, a solução de bloqueio foi descartada e foram adicionados 100 uL/poço de diluições seriadas do anticorpo

monoclonal 2C7 (que reconhece o peptídeo p2C7). A incubação foi realizada por 90 minutos, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e, então, adicionados 100 uL/poço de anticorpo anti-IgG/IgM+HRP (Thermo) 1:5000 em solução PBS com 10% de FBS. A incubação foi realizada por 90 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. As placas foram lavadas novamente e adicionados 70 uL/poço de TMB (Sigma-Aldrich). Após o desenvolvimento da cor por 10 minutos, em temperatura ambiente, a reação foi interrompida com 100 uL/poço de ácido sulfúrico 0,5 M, medindo-se a absorbância (450 nm) em uma leitora de placas (Synergy™ Mx, Biotek instruments Inc).

4.4. Detecção de p2C7 em amostras humanas

Para a detecção de p2C7 nas amostras de plasma humano, foi sensibilizada placa de poliestireno de 96 poços de fundo plano com q.s.p. 10 ug de LDL (-), previamente quantificada, totalizando 100 uL/poço em PBS. Após incubação overnight (16 horas) a 4°C, Os poços foram lavados 3 vezes com PBS-Tween 0,5% pH 7,4, 250 uL/poço e bloqueados com 200 uL/poço de solução PBS contendo 10% de soro fetal bovino (FBS). A incubação para o bloqueio foi realizada por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, a solução de bloqueio foi descartada e foram adicionados 100 uL/poço do anticorpo monoclonal 2C7 (que reconhece o peptídeo p2C7), a 1 ug/mL em PBS 10% FBS. A incubação foi realizada por 90 minutos, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e, então, adicionados 100 uL/poço de anticorpo anti-IgG HRP (Thermo) 1:5000 em solução PBS com 10% de FBS. A incubação foi realizada por 90 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. As placas foram lavadas novamente e adicionados 70 uL/poço de TMB (Sigma-Aldrich). Após o desenvolvimento da cor por 15 minutos, em temperatura ambiente, a reação foi interrompida com 100 uL/poço de ácido sulfúrico 0,5 M, medindo-se a absorbância (450 nm) em uma leitora de placas (Synergy™ Mx, Biotek instruments Inc). O resultado obtido foi então utilizado para a razão entre a D.O. obtida e a concentração plasmática de LDL (-) da respectiva amostra.

4.5. ELISA para TNF e IL-6 Humanas

Human TNF- α DuoSet® ELISA kit e Human IL-6 DuoSet® ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) foram utilizados de acordo com as especificações do fabricante para analisar as amostras de plasma humano.

4.6. Protocolo de imunização

Foram utilizados 28 camundongos C57BL/6 LDLr $-/-$ (aprovado pelo CEUA FCF- 552) com aproximadamente 24 semanas de vida, sem restrições de água ou ração. A ração utilizada nesta etapa foi a padrão do biotério, a qual não induz aterosclerose. Os animais foram divididos em 5 grupos, com 4 camundongos cada e receberam as diferentes formulações descritas na Tabela I. Para a formulação contendo Alum (Hidróxido de alumínio – Imject® Alum – Thermo Scientific, USA), os peptídeos foram diluídos em PBS na concentração de 0,2 ug/uL, onde 50 uL desta solução foram adicionados lentamente a 50 uL de Alum. A dispersão foi mantida em agitação por 1 hora a 4°C antes de ser utilizada para a imunização.

| <i>Grupo</i> | <i>PBS</i> | <i>P2C7</i> | <i>Alum</i> | <i>Montanide ISA 720</i> |
|--------------|------------|-------------|-------------|--------------------------|
| 1 | 100 uL | x | x | x |
| 2 | 50 uL | x | 50 uL | x |
| 1 | 50 uL | 10 ug | 50 uL | x |
| 4 | 30 uL | x | x | 70 uL |
| 5 | 100 uL | x | x | x |

Tabela I: Formulações utilizadas nas imunizações. Os camundongos C57BL/6 receberam 100 uL da formulação, de acordo com o grupo designado. O grupo 1 recebeu uma injeção intramuscular de PBS. Os grupos 2 e 3 receberam vacinas com o adjuvante Alum. Grupos 4 e 5 receberam vacinas com o adjuvante Montanide ISA 720.

A formulação contendo Montanide ISA 720 (Montanide TM ISA 720 VG – SEPPIC - França) foi preparada utilizando os peptídeos diluídos em PBS na concentração de 16,7 ug/uL e emulsionada com 70 uL do adjuvante com auxílio de uma seringa de vidro. As formulações que continham Alum como adjuvante foram administradas por via intramuscular, as formulações com Montanide foram administradas por via subcutânea, por fim, o grupo controle, o qual recebeu apenas PBS, foi administrado via intramuscular (Figura 3).

Um dia antes de cada imunização foram coletados cerca de 70 uL de sangue pela via do plexo ocular. Os camundongos receberam as imunizações e 4 reforços. Após duas semanas do último reforço, os animais foram anestesiados com a administração intraperitoneal de cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), o sangue foi coletado por punção cardíaca e, em seguida, foram eutanasiados para coleta do baço, linfonodos inguinais, fígado e rins.

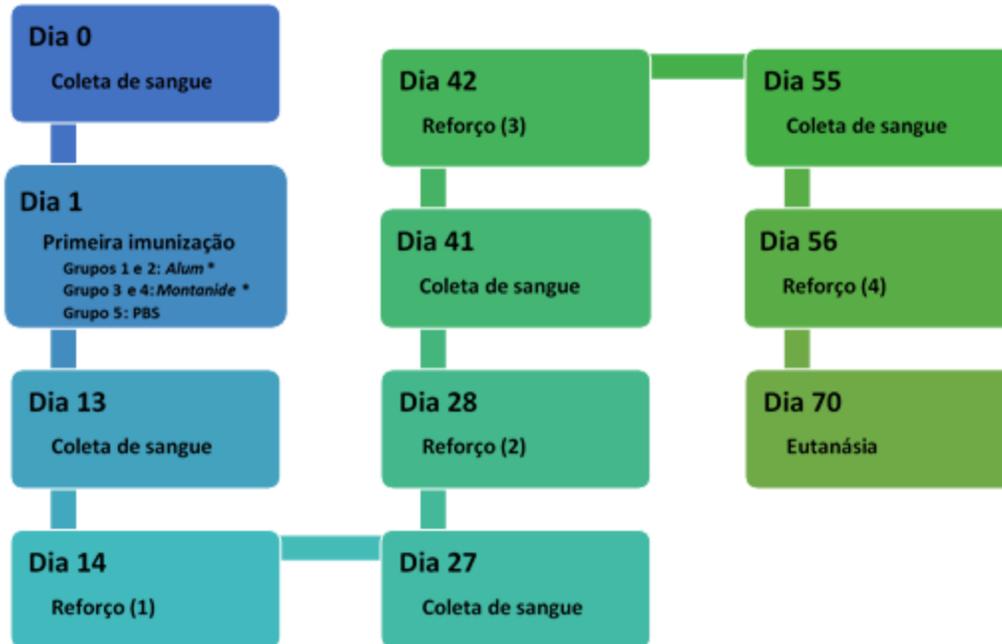


Figura 3: Protocolo de imunização. Os camundongos C57BL/6 LDLr ^{-/-} foram divididos em 5 grupos com 4 animais cada. As coletas de sangue e as imunizações foram feitas de acordo com o esquema, com um espaçamento de 2 semanas entre os reforços. * A composição das formulações e grupos correspondem aos descritos na Tabela I.

4.7. Detecção de IgE total

Para a detecção de IgE total do soro dos camundongos imunizados com o adjuvante Alum, foi utilizado o kit Mouse IgE ELISA set (BD OptEIA™ – BD Bioscience – USA, de acordo com as especificações do fabricante, em colaboração com o professor Dr. Momtchilo Russo, do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.8. ELISPOT

Para o ensaio de ELISPOT, foram utilizadas placas de nitrocelulose de 96 poços (Multiscreen HA, Milipore) cobertas com 100 uL/poço contendo 1 ug/mL de LDL (-) humana. Após incubação por 16 horas, 4°C, a solução contendo a LDL (-) foi removida e as placas lavadas por 3 vezes com RPMI 1640. As placas foram bloqueadas com 100 uL de RPMI 1640 contendo 10% de FBS por 2 horas à 37°C. As

células respondedoras foram obtidas tanto do baço quanto da medula óssea dos camundongos previamente imunizados.

Assim que coletado, o baço foi armazenado em RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS e banho de gelo até ser processado. Os órgãos foram, então, macerados e o conteúdo centrifugado a 800g, por 10 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, o pellet, assim como a medula óssea, foram ressuspensos em tampão de lise (NH₄Cl - 0,15M; KHCO₃ - 0,1M; Na₂EDTA - 0,1M) e novamente centrifugados. As células foram diluídas 1:100 em azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer. Foram plaqueadas 1 x 10⁶ e 1 x 10⁵ células em RPMI 1640 contendo 10% de FBS e 1% de antibiótico (Antibiotic-Antimycotic 100X, Thermo Scientific, USA) por poço e mantidas por 24 horas em estufa umidificada, 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Os poços foram lavados 3 vezes com 250 µL de PBS-Tween 0,05%, pH 7,4 e 3 vezes apenas com PBS. As placas foram incubadas por 2h com anticorpo anti-IgG de camundongo HRP (Sigma), quando então, os poços foram novamente lavados. As placas foram reveladas adicionando 100 µL do substrato da peroxidase (50 mM Tris HCl, pH 7.5, contendo 1 mg/mL de DAB e 1 µL/mL de peróxido de hidrogênio 30%). Depois de incubada por 15 minutos em temperatura ambiente, a reação foi interrompida descartando-se o sobrenadante e lavando a placa com água corrente. As placas então foram secas e o número de células produtoras de anticorpos foram estimadas com ajuda de uma lupa, levando em consideração o tamanho e aparência de cada spot.

4.9. Detecção de citocinas (CBA)

O soro dos camundongos imunizados foi analisado através da tecnologia de beads BD® CBA – Cytometric Bead Array. O ensaio consiste na incubação da amostra com beads de tamanho conhecido, contendo anticorpos primários marcados com PE que promovem a quantificação dos analitos em questão através da detecção de um sinal fluorescente. O ensaio foi realizado com kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine que analisa IL-4, TNF-α, INF-γ, IL-17A, IL-10, IL-6 e IL-2 ou Mouse Inflammation kit que analisa IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, IFN-γ e TNF.

4.10. Protocolo de Tolerização

Foram utilizados 20 camundongos machos, C57BL/6 LDLr *-/-*, com 8 semanas de vida, recebendo dieta padrão e sem restrições de comida ou água. Os animais foram divididos em 3 grupos discriminados na tabela II. As injeções intravenosas foram administradas nos dias 1, 4 e 7. No dia 9 foi feita uma coleta de sangue pela via do plexo ocular, e no dia 10 foi realizada a imunização com a partícula de LDL (-) + Alum, a fim de testar o protocolo de tolerização (Figura 4). Foi realizada nova coleta no dia 23 para que no dia 24 fosse feito o reforço da imunização (LDL (-) + Alum). Por fim, foi administrada uma injeção intraperitoneal de LDL (-) no dia 38, como desafio, e a coleta foi realizada no dia 51 (figura 4). Após o dia 51, iniciou-se a dieta hipercolesterolêmica por 2 meses. Ao final desse período, os animais foram eutanasiados e coletados sangue, aorta abdominal e coração.

| Grupo | Tolerização |
|-----------------|--|
| <i>Controle</i> | Injeção I.V. de 80 uL de PBS + 20 uL DMSO; |
| <i>Tpep</i> | Injeção I.V. de 80 uL de PBS + 20 uL DMSO + 300 ug peptídeo aleatório; |
| <i>Tp2C7</i> | Injeção I.V. de 80 uL de PBS + 20 uL DMSO + 300 ug p2C7; |

Tabela II: Formulações utilizadas na avaliação da tolerização. Foram utilizados 4 grupos para o protocolo de tolerização. Controle: foi administrado apenas o veículo (DMSO + PBS); Tpep (peptídeo scramble): camundongos tolerizados com 300 ug/dose de peptídeo aleatório; Tp2C7: camundongos tolerizados com 300 ug/dose de p2C7;

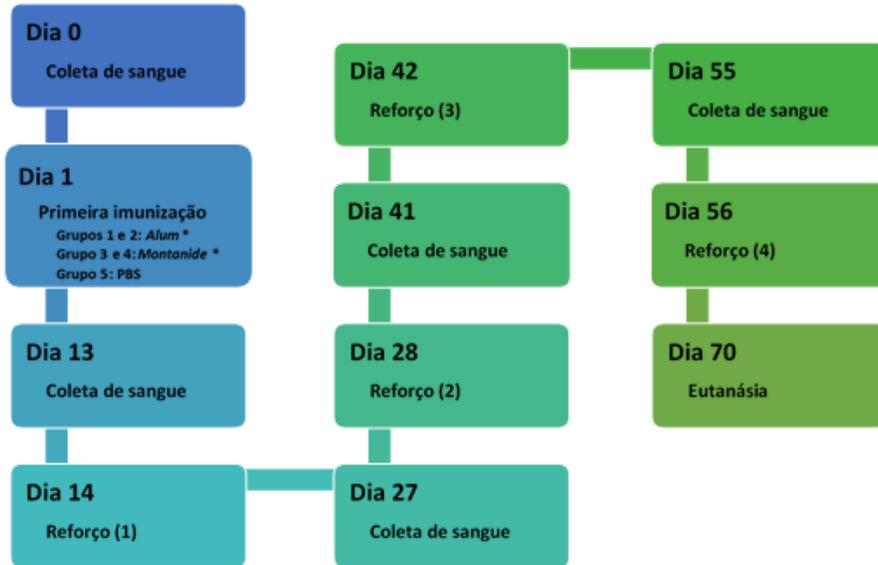


Figura 4: Protocolo de tolerização. Os camundongos C57BL/6 LDLr ^{-/-} foram divididos em 3 grupos com 5 animais cada, conforme a tabela IV. A administração intravenosa foi feita através da veia caudal e as coletas, assim como a imunização com a LDL (-) foi realizada conforme esquema apresentado.

4.11. PET/CT

Foi avaliada a captação do ¹⁸F (Flúor-18) conjugado à molécula FDG (Fluordesoxiglicose). O ¹⁸F-FDG foi fornecido pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) do Estado de São Paulo.

Tomografia por Emissão de Pósitrons associada à Tomografia Computadorizada

Esses experimentos foram realizados no Centro de Radiofarmácia do IPEN. Para essa análise, os animais foram mantidos em jejum durante a noite anterior à obtenção das imagens, recebendo apenas água até o momento do início do ensaio. Os animais foram pesados em balança semi-analítica (Mettler- Toledo, BR), e seus níveis plasmáticos de glicose foram aferidos com auxílio de sistema

medidor de glicose portátil Contour TS (Bayer, Alemanha). Em seguida, os camundongos foram inseridos na câmara do sistema de anestesia (Summit Anesthesia Support, MIP Anesthesia Technologies) e anestesiados com 2% de Isoflurano (Cristália, BR) (98% de O₂, com fluxo de 2 L/min). Após alguns minutos, os animais receberam uma dose única de 18F-FDG ($19,35 \pm 4,19$ MBq) diluído em solução salina, contidos em aproximadamente 50 a 100 μ L de solução, via endovenosa pelo plexo ocular e retornaram às suas gaiolas, onde permaneceram por 3 horas antes do início das aquisições das imagens.

Para dar continuidade ao ensaio, os animais foram novamente anestesiados em câmara de anestesia com 2% de Isoflurano (98% de O₂, com fluxo de 2 L/min) e, em sequência, acondicionados e posicionados dentro do equipamento Albira micro PET-SPECT-CT (Bruker Biospin, Billerica, EUA), onde permaneceram anestesiados durante 30 minutos de aquisição. Após a aquisição das imagens por PET, os animais receberam 200 μ L de agente de contraste radiográfico baseado em iodo (Omnipaque, Ioxol, GE HealthCare, RU) via endovenosa (veia lateral da cauda). Imediatamente a essa administração, foi realizada aquisição da imagem de tomografia computadorizada durante 15 minutos, constituída de 400 projeções adquiridas com 400 μ A e 45 keV.

Reconstrução de imagens

As imagens obtidas na tomografia computadorizada foram reconstruídas usando algoritmo FBP (Filtered BackProjection), resultando em voxels de 125x125x125 mm. O algoritmo utilizado para reconstrução das imagens PET foi o MLEM, com 12 interações, utilizando correções de decaimento e eventos coincidentes, mas sem correção de atenuação, resultando voxels de 125 μ m.

Processamento e análise de imagens

Todos os dados das imagens foram analisados com software PMOD (PMOD Technologies, versão 3.307, Suíça). Inicialmente, foi confirmado o corregristo entre os arquivos de PET e CT. Posteriormente, foram usados volumes de interesse (VOI) em arquivos de CT, com objetivo de selecionar

o arco aórtico de cada animal. Finalmente, os volumes obtidos foram colocados em arquivos PET e a atividade, em SUV (do inglês, standardized uptake value ou valor padronizado de captação) no arco aórtico, foi calculada em porcentagem da dose injetada por centímetro cúbico (%ID/cm³).

5. Resultados

5.1. O epitopo p2C7 é alvo para a produção de anticorpos em indivíduos com síndrome metabólica

Primeiramente verificamos se os pacientes com síndrome metabólica apresentaram níveis detectáveis de IgM e IgG anti-p2C7. Interessantemente, a produção de anticorpos IgM (Fig 5A) e IgG anti-p2C7 (Fig 5B) foi constatada em ambos os grupos. Entretanto, pacientes com síndrome metabólica apresentaram 70% mais IgM anti-p2C7 (Fig 5A) e 50% mais IgG anti-p2C7 (Fig 5B), em comparação aos controles. Este resultado indica uma produção específica de anticorpos contra o p2C7, mostrando assim que este epítipo da LDL eletronegativa está presente no decorrer da SM.

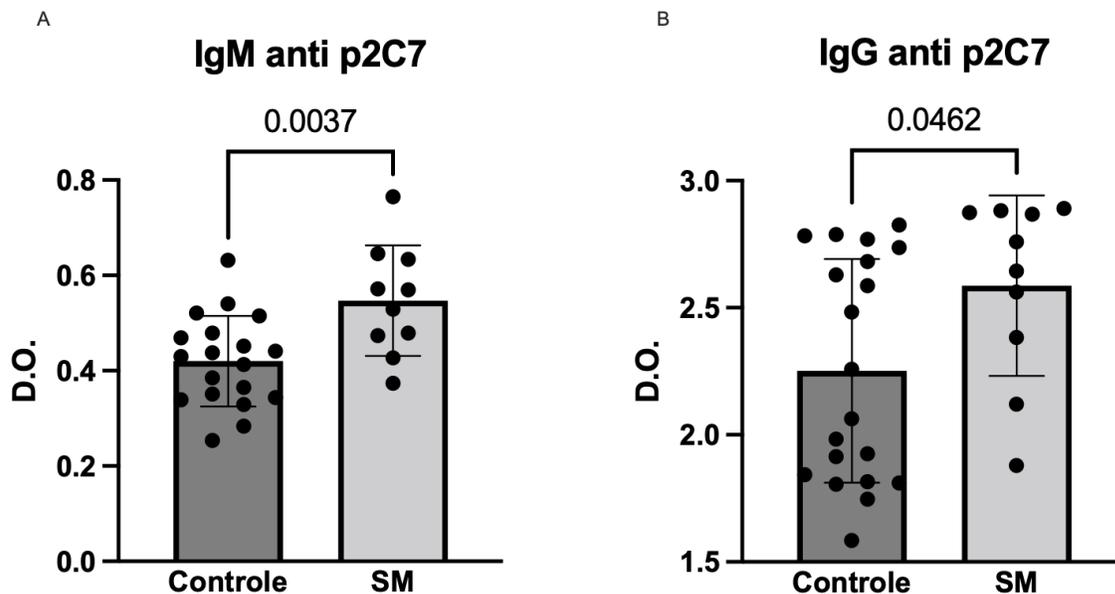


Figura 5: Anticorpos anti-p2C7 nos pacientes com síndrome metabólica. As amostras foram selecionadas e divididas em dois grupos: Controle (n = 22) ou Síndrome Metabólica (SM) (n = 10). Foi utilizado o teste de ELISA para detecção de anticorpos IgM (A) e IgG (B) nas amostras de plasma humano. O resultado é mostrado como a densidade óptica (D.O.) obtida \pm SD. Foi utilizado o *student T test* para análise estatística.

Como esclarecido anteriormente, o p2C7 é um epítipo originado por mudanças conformacionais sofridas pela ApoB-100 da LDL. Embora não tenham sido detectadas diferenças para os níveis de LDL, LDL (-) ou LDLox (Fig 1 do Anexo 1) entre os grupos estudados (controle x SM), pudemos verificar a presença de reatividade para o p2C7 da LDL (-) nas amostras analisadas, constatando-se maior produção de anticorpos anti-p2C7 nos pacientes com SM comparados aos controles (Fig 5). Notavelmente, a LDL (-) do grupo SM parece conter cerca de 4,5 vezes mais p2C7 do que o grupo controle (Fig 6A). Os dados sugerem que a presença do epítipo p2C7 foi quase irrelevante no grupo controle, o que poderia explicar a menor resposta de anticorpos anti-p2C7. Corroborando com o resultado anterior, foi possível verificar, através de regressão linear, a associação positiva entre a produção de IgG anti-p2C7 e a expressão de p2C7 na LDL (-) (Fig 6B).

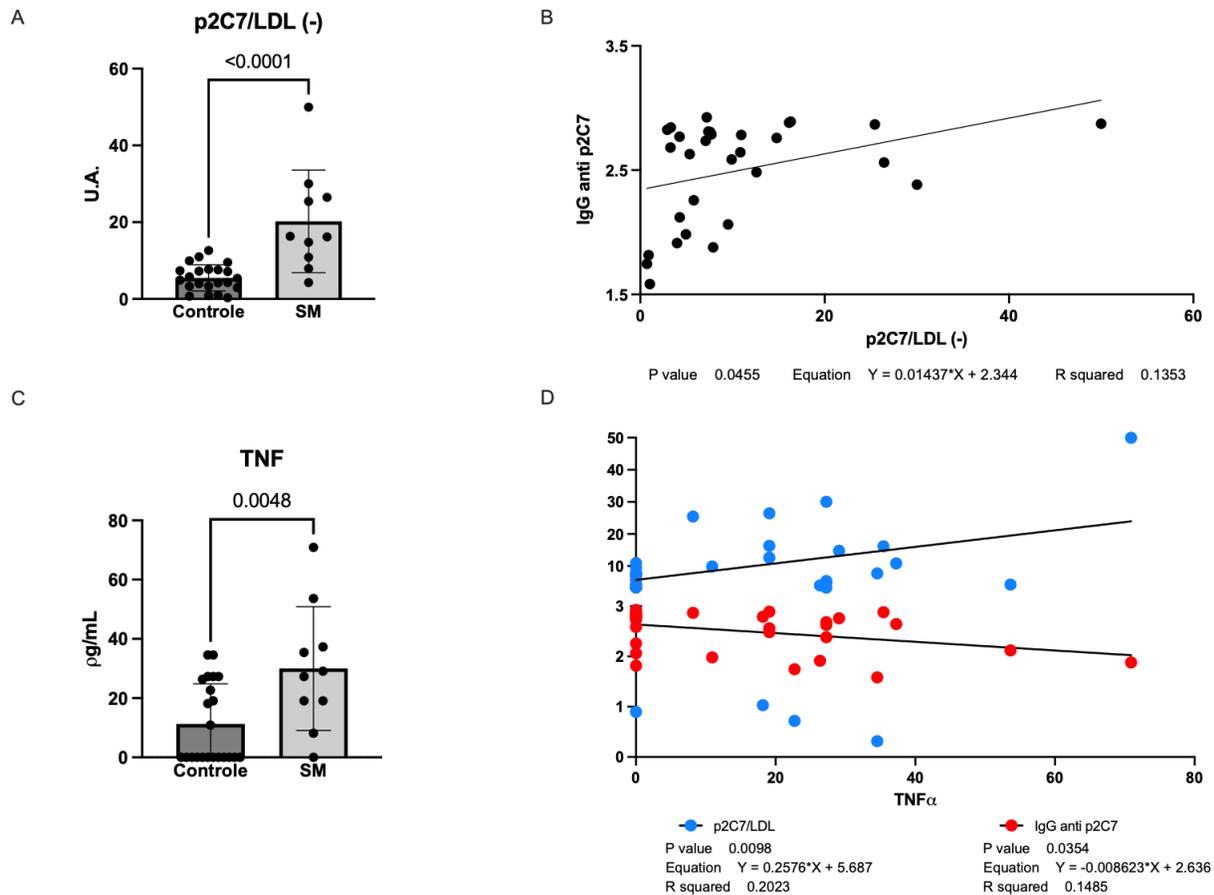


Figura 6: IgG anti-p2C7 e TNF nos grupos estudados. Concentração de p2C7 por LDL (-) expressa em unidade arbitrária (U.A.), definida como a razão entre a densidade óptica obtida pelo ELISA anti p2C7/ concentração plasmática de LDL (-) (A); Análise de regressão linear avaliou a associação de IgG anti-p2C7 e p2C7/LDL (-) (B); Concentração de TNF (pg/mL) em amostras de plasma do grupo Controle vs SM (B); Análise de regressão linear avaliou a associação do TNF com IgG anti-p2C7 (vermelho) ou p2C7 / LDL (-) (azul) (C). Foi utilizado o teste T de *Student* para a análise estatística em A e B e os resultados estão expressos como média \pm SD.

O p2C7 é um epítipo pró-inflamatório já conhecido da LDL (-), que desencadeia a produção de TNF (Faulin et al, 2019; Tripodi et al, 2020). Por esse motivo, foi medida a concentração de TNF nas amostras de plasma. De fato, os níveis de TNF foram mais elevados no grupo SM (Fig 6C). Isso já era esperado, visto que a síndrome metabólica ocasiona uma inflamação crônica. No entanto, detectamos uma correlação positiva do TNF com a razão p2C7/LDL (-), que representa o conteúdo de p2C7 na partícula de LDL (-), além de uma correlação inversa entre IgG anti-p2C7 e TNF (Fig 6D). Estes dados

sugerem um possível efeito neutralizante do IgG anti-p2C7 na inflamação induzida por TNF, o que será averiguado posteriormente.

5.2. O p2C7 induz TNF in vivo

Considerando que a análise das amostras humanas indicaram a correlação entre a presença de p2C7 e TNF e que nossos estudos anteriores demonstraram que o p2C7 representa um epítipo pró-inflamatório in vitro (Faulin et al, 2019; Tripodi et al, 2020), expusemos camundongos C57BL/6 a doses intramusculares (Hidróxido de Alumínio) ou subcutâneas (Montanide ISA 720) de p2C7 (Fig 3A) e analisamos os parâmetros inflamatórios (Fig 9) para confirmar a indução de TNF, indicada nas correlações anteriores no plasma humano.

Os camundongos foram imunizados e receberam quatro reforços. No último reforço (dia 56), dois camundongos do grupo controle Montanide ISA 720 vieram a óbito. Possivelmente, a aplicação foi muito profunda, danificando alguma vértebra do camundongo, visto que, imediatamente após a injeção, os 2 animais não apresentavam movimento das patas traseiras. Mesmo com o grande número de reforços, não foi possível a detecção de anticorpos anti-LDL (-) (Tabela III).

Alum

| Dia | Diluição | Grupo 1 (p2C7) | | | | Grupo 2 (PBS) | | | |
|-----|----------|----------------|------|------|------|---------------|------|------|------|
| | | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 13 | 1:50 | 0,06 | 0,05 | 0,06 | 0,08 | 0,12 | 0,06 | 0,07 | 0,07 |
| | 1:200 | 0,06 | 0,05 | 0,05 | 0,06 | 0,07 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| 27 | 1:50 | 0,08 | 0,09 | 0,08 | 0,11 | 0,09 | 0,15 | 0,07 | 0,06 |
| | 1:200 | 0,06 | 0,06 | 0,05 | 0,08 | 0,06 | 0,11 | 0,05 | 0,05 |
| 41 | 1:50 | 0,09 | 0,07 | 0,09 | 0,07 | 0,07 | 0,18 | 0,08 | 0,06 |
| | 1:200 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,05 | 0,05 | 0,12 | 0,06 | 0,05 |
| 55 | 1:50 | 0,07 | 0,09 | 0,07 | 0,09 | 0,09 | 0,06 | 0,2 | 0,07 |
| | 1:200 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,06 | 0,05 | 0,05 | 0,1 | 0,05 |

Montanide

| Dia | Diluição | Grupo 5 (p2C7) | | | | Grupo 6 (PBS) | | | |
|-----|----------|----------------|------|------|------|---------------|------|------|------|
| | | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| 13 | 1:50 | 0,05 | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,06 | 0,06 | 0,05 | 0,06 |
| | 1:200 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| 27 | 1:50 | 0,07 | 0,08 | 0,1 | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,06 | 0,06 |
| | 1:200 | 0,05 | 0,05 | 0,07 | 0,05 | 0,05 | 0,06 | 0,05 | 0,05 |
| 41 | 1:50 | 0,08 | 0,1 | 0,11 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,06 |
| | 1:200 | 0,05 | 0,07 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,07 | 0,05 | 0,05 |
| 55 | 1:50 | 0,06 | 0,06 | 0,08 | 0,1 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 |
| | 1:200 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,07 | 0,05 | 0,05 | 0,1 | 0,06 |

Controle

| Dia | Diluição | Grupo 7 (PBS) | | | |
|-----|----------|---------------|-------|-------|-------|
| | | 25 | 26 | 27 | 28 |
| 13 | 1:50 | 0,062 | 0,068 | 0,054 | 0,057 |
| | 1:200 | 0,054 | 0,059 | 0,049 | 0,051 |
| 27 | 1:50 | 0,062 | 0,079 | 0,067 | 0,08 |
| | 1:200 | 0,06 | 0,072 | 0,055 | 0,061 |
| 41 | 1:50 | 0,071 | 0,084 | 0,084 | 0,06 |
| | 1:200 | 0,052 | 0,065 | 0,064 | 0,049 |
| 55 | 1:50 | 0,056 | 0,091 | 0,061 | 0,07 |
| | 1:200 | 0,047 | 0,049 | 0,046 | 0,049 |

Tabela III: Detecção de anticorpos anti-LDL (-) em camundongos imunizados com p2C7. Dados representados pela densidade óptica obtida pelo ensaio ELISA com os soros nas diluições 1:50 e 1:200. Os dias compreendem as coletas de sangue dos camundongos (apresentados na Figura 3).

Verificamos também a possível presença de células secretoras de anticorpos anti-LDL (-) (do baço e da medula óssea) por ELISPOT (Figura 7) e, em concordância com os dados de ELISA (tabela III), não foi possível a detecção de células secretoras de anticorpos em nenhum grupo avaliado.

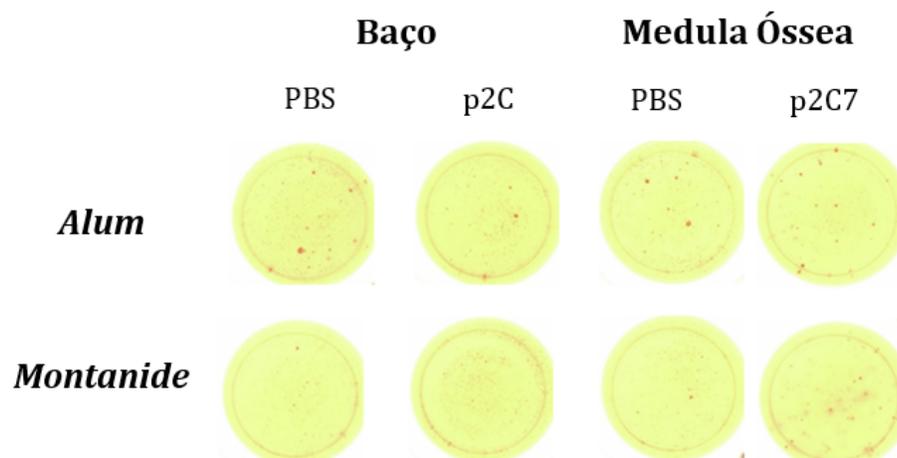


Figura 7: Detecção de células secretoras de anticorpos responsivas a LDL (-). Imagens representativas das células da (A) medula óssea e (B) baço dos camundongos imunizados com p2C7 ou PBS.

Adicionalmente, avaliou-se a concentração total de IgE no soro dos camundongos imunizados com o adjuvante Alum (Figura 8). Podemos observar um aparente aumento tardio de IgE total no grupo que recebeu a formulação contendo p2C7.

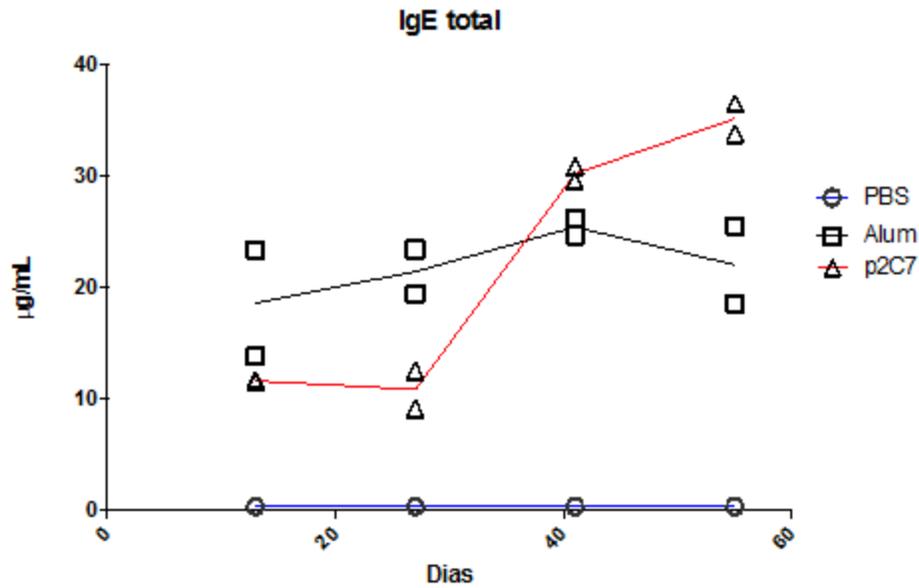


Figura 8: Detecção de IgE total em camundongos imunizados com o adjuvante Alum. IgE total no soro dos camundongos imunizados com Alum (n=2).

Por fim, verificamos as concentrações plasmáticas de citocinas envolvidas nas respostas celulares dependentes de linfócitos T e a resposta inata (Figura 11). Vários parâmetros inflamatórios, analisados no ponto final (dia 70), se alteraram em ambos os grupos expostos ao p2C7 (Fig. 11). Para o TNF não se observou diferença (Fig. 11 A) entre os grupos que receberam p2C7 administrado com hidróxido de alumínio ou Montanide, mas houve aumento de 3 e 2 vezes em relação aos respectivos grupos controle. Detectou-se um aumento em IL-6 (Fig. 11 B), IL-17 (Fig. 11 C) e IL-10 (Fig. 11 D) apenas com o p2C7 combinado com hidróxido de alumínio, mas não com Montanide. Em relação a IL-4 (Fig. 11 E), IFN (Fig. 11 F) e IL-2 (Fig. 11 G), o p2C7 não teve efeito na produção dessas citocinas. Em resumo, o p2C7 modulou principalmente as citocinas da imunidade inata e, sem indução de anticorpos, o peptídeo aumentou a inflamação, na maior parte, de modo dependente do TNF.

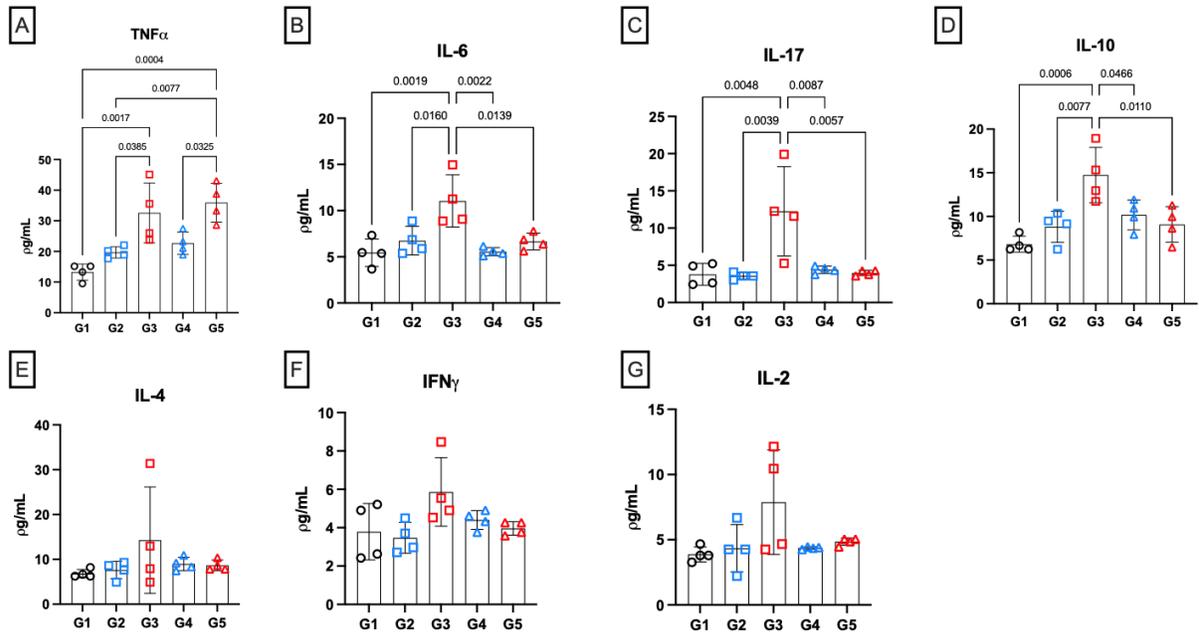


Figura 9: Detecção de citocinas no soro de camundongos C57BL/6 imunizados com p2C7 e Alum ou Montanide como adjuvantes. Dados representados pela média \pm SD. O soro dos camundongos imunizados com o adjuvante Alum ou Montanide foram armazenados congelados (-80°C) até o dia da análise. Foi realizado o CBA com o soro coletado no dia da eutanásia (dia 70); G1: Controle (PBS), G2: Alum+PBS, G3: Alum+p2C7, G4: Montanide+PBS, G5: Montanide+p2C7. $n = (4)$. A análise estatística foi realizada por OneWay Anova com Tukey como pós teste.

5.3. A ausência de IgG anti-p2C7 agrava a inflamação

Em seguida, testamos como a ausência de IgG anti-p2C7 poderia agravar a inflamação promovida pela dieta hipercolesterolêmica. Para isso, tolerizamos previamente camundongos C57BL/6 LDLr $-/-$ com 3 doses intravenosas de p2C7, por 3 dias consecutivos, seguido de imunização com LDL (-) adsorvida em hidróxido de alumínio (Fig. 10A). Como pode ser visto, mesmo após a imunização com LDL (-) não foram encontrados títulos significativos de anticorpos no dia 09 (Fig. 10B, 10C). Porém, nos dias seguintes (23,37 e 51) obtivemos títulos crescentes de IgG anti-LDL (-) em todos os grupos avaliados, mas níveis mais baixos de IgG anti-p2C7 para o grupo Tp2C7 (tolerizado para p2C7). Também fica claro que a produção total de IgG anti-LDL (-) não foi modificada pelo protocolo de tolerização, como mostramos na figura 10 D, não se observando nenhuma diferença entre os grupos.

Entretanto, os níveis de IgG anti-p2C7 foi três vezes menor quando comparado ao grupo Tpep (peptídeo scramble) ou PBS (Fig 10 E).

Como a tolerância ao p2C7 foi bem-sucedida, todos os grupos foram submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica por mais 12 semanas (Fig. 10 A). Após a dieta, medimos os níveis de IgG anti-LDL (-) e IgG anti-p2C7 (Fig. 10 F, 10 G). A dieta induziu uma maior produção de IgG anti-p2C7 nos grupos PBS e Tpep, mas não afetou o grupo Tp2C7, mostrando a eficiência do protocolo de tolerização. Novamente, os títulos de IgG anti-LDL (-) não diferiram entre os grupos testados (Fig. 10 G). Como era esperado, os parâmetros inflamatórios, após a dieta hipercolesterolêmica, estavam alterados (Fig. 10 H-M). Não foram observadas diferenças entre o peptídeo *scramble* e o grupo controle com PBS para qualquer uma das citocinas testadas, mostrando a especificidade do protocolo (Fig. 10 H-M). Para o TNF, a ausência de IgG anti-p2C7 induziu um aumento de nove vezes na sua produção após a dieta (Fig. 10 H), com cerca de duas vezes para IL-6 e CCL2 (Fig. 10 I, 10 J). Não se detectou IL-10, IFN e IL-12 para o peptídeo scramble ou grupo controle com PBS, entretanto os camundongos tolerizados com p2C7 tiveram uma produção aumentada dessas citocinas (Fig. 10 K, 10 L, 10 M).

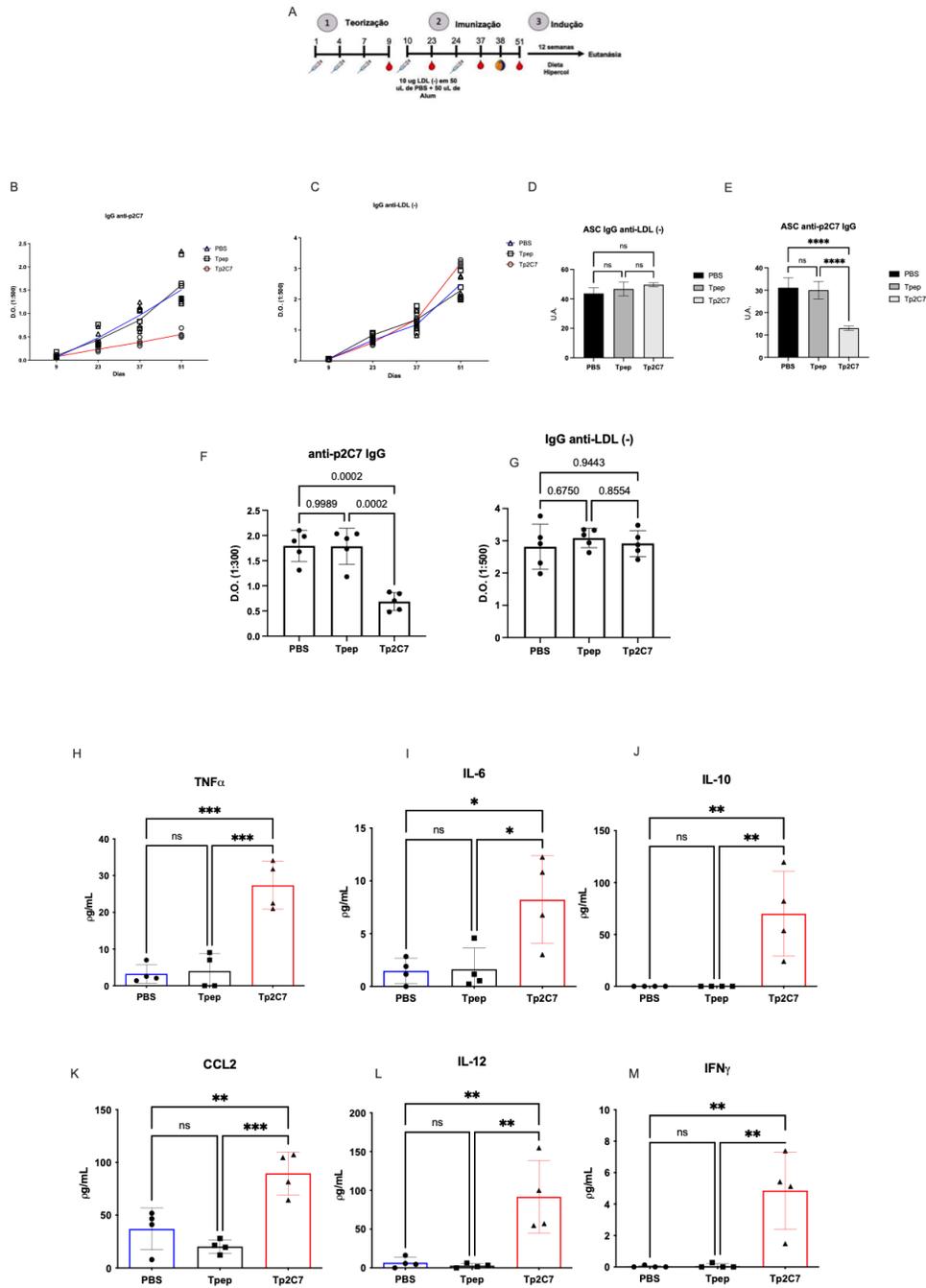


Figura 10: A ausência de anticorpos anti-p2C7 agrava a inflamação na aterosclerose. (A) Esquema de tolerização e imunização, seguido pela dieta hipercolesterolêmica por mais 12 semanas. (B) IgG anti-p2C7 após imunização com LDL (-). (C) IgG anti-LDL (-) após imunização com LDL (-). (D) Área sob a curva (ASC) representando a produção de IgG anti-LDL (-) após a imunização. (E) Área sob a curva (ASC) representando a produção de IgG anti-p2C7 (-) após a imunização. (F) IgG anti-p2C7 após HFD. (G) IgG anti-LDL (-) após HFD. (H-M) Produção de citocinas após HFD. A análise estatística foi realizada por OneWay Anova com Tukey como pós teste.

5.4. A IgG anti-p2C7 pode reduzir a inflamação *in vivo*

Por fim, imunizamos os camundongos C57BL/6 LDLr -/- com p2C7 ligado à ovalbumina, LDL (-) ou ovalbumina (controle), visando a produção ativa de IgG anti-p2C7 (Fig. 11). Após quatro doses intramusculares dentro de 14 dias de intervalo, os camundongos receberam uma dieta hipercolesterolêmica por 12 semanas adicionais (Fig 11 A). Como mostrado na Fig. 11B e Fig. 11C, a imunização com p2C7 aumentou com sucesso a produção de IgG anti-p2C7 (Fig 11 B), sendo que estes anticorpos gerados também foram capazes de reconhecer a LDL (-) (Fig 11 C). Entretanto, a imunização com p2C7 promoveu valores mais baixos de IgG anti-p2C7 quando comparados aos níveis totais de IgG anti-LDL (-) (Fig. 11 E). Como esperado, a imunização com LDL (-) pode induzir um amplo repertório de anticorpos. No entanto, como evidenciado na Fig. 11 D, a produção de anticorpos nos camundongos imunizados com p2C7 foi especificamente direcionada a este peptídeo, sendo que os níveis de IgG anti-p2C7 para este grupo foi maior do que nos camundongos imunizados com LDL (-).

Após a dieta hipercolesterolêmica, detectamos níveis aumentados de IgG anti-p2C7 em todos os grupos, embora os camundongos imunizados com p2C7 e LDL (-) apresentassem níveis superiores aos do grupo controle (Fig. 11 F, 11 H). Ressalta-se que não detectamos nenhuma diferença nos níveis totais de IgG anti-LDL (-) entre o grupo controle e o grupo dos camundongos imunizados com p2C7, mas o grupo imunizado com LDL (-) mostrou uma capacidade aumentada para a produção de IgG anti-LDL (-) (Fig. 11 H). Não pudemos detectar qualquer diferença em relação ao IgM anti-p2C7 ou IgM anti-LDL (-) para nenhum dos grupos estudados (Fig. 11 G e 11 I).

Os parâmetros inflamatórios analisados estavam novamente alterados (Fig. 11 J e 11 K), com redução nos níveis de TNF para ambos os grupos imunizados, em comparação com o controle (Fig. 11 J). Entretanto, houve maior redução de IL-6 para o grupo imunizado com LDL (-), embora os camundongos imunizados com p2C7 também tenham mostrado cerca de 16% de redução na produção de IL-6 (Fig. 11 K).

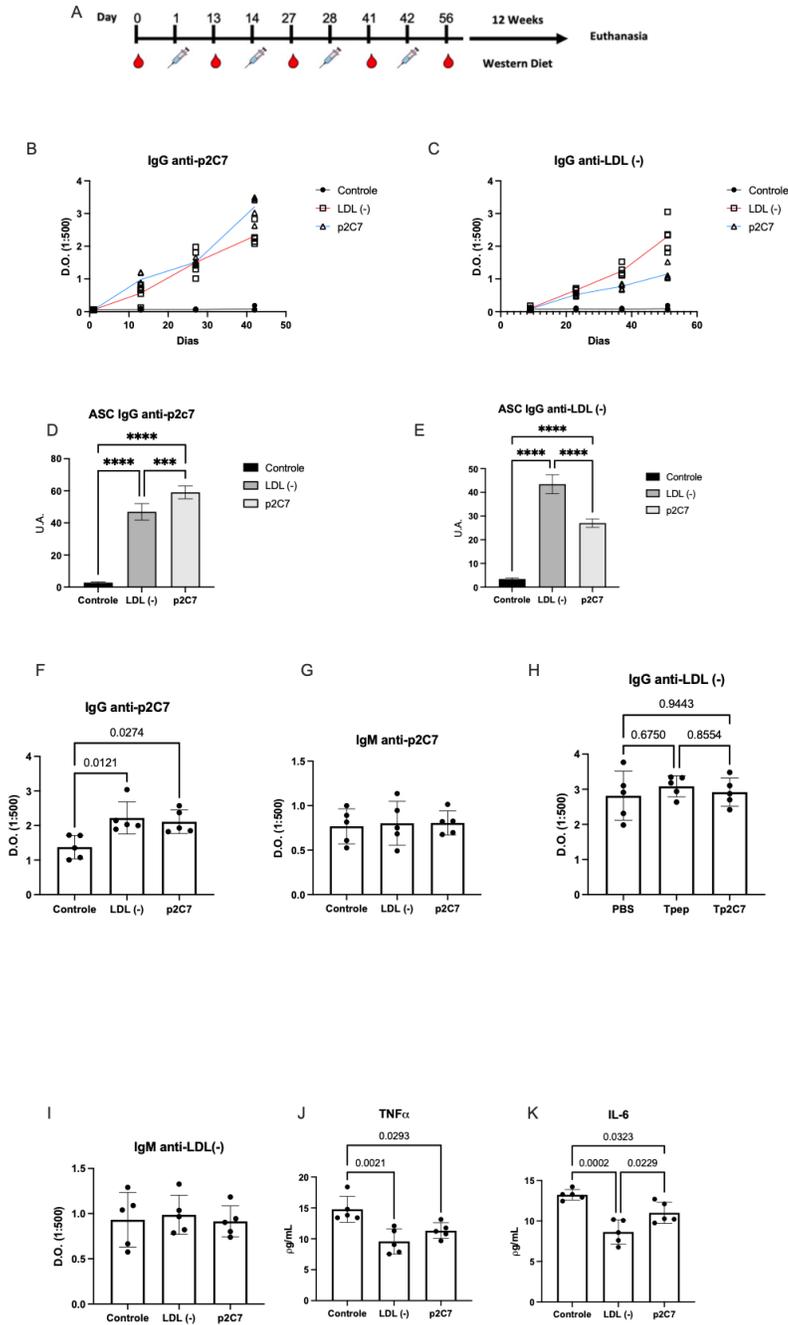


Figura 11: Imunização ativa com p2C7. (A) Esquema de imunização, seguido pela dieta hipercolesterolêmica por mais 12 semanas. (B) IgG anti-p2C7 após a imunização. (C) IgG anti-LDL (-) após a imunização. (D) Área sob a curva (ASC) representando a produção de IgG anti-p2C7 (-) após a imunização. (E) Área sob a curva (ASC) representando a produção de IgG anti-LDL (-) após a imunização. (F,G) IgG e IgM anti-p2C7 após HFD. (H,I) IgG e IgM anti-LDL (-) após HFD. (J,K) Concentração plasmática de TNF e IL-6 após HFD. A análise estatística foi realizada por OneWay Anova com Tukey como pós teste.

Finalmente, medimos a captação de 18F-FDG na região do arco aórtico dos camundongos imunizados e, não surpreendentemente, tanto os camundongos imunizados com LDL (-) quanto com p2C7 tiveram captação de 18F-FDG cerca de 2,5 vezes menor, em relação ao controle não imunizado, sugerindo uma inflamação mais branda nas placas ateroscleróticas (Fig 12A, B).

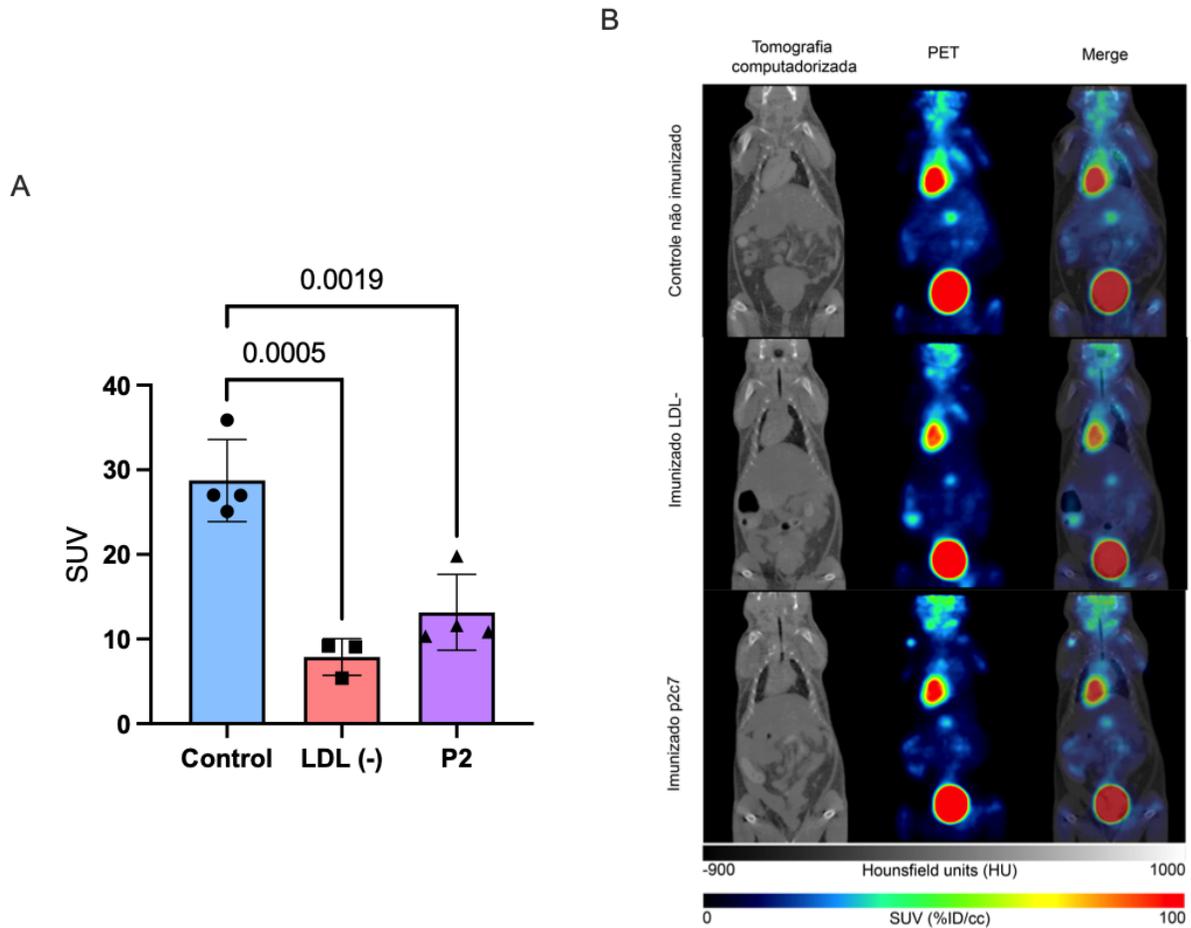


Figura 12: FDG-PET/CT dos animais imunizados. Os camundongos C57BL/6 LDLr $-/-$ foram imunizados e posteriormente mantidos por 12 semanas em dieta hipercolesterolêmica. A inflamação foi estimada através da internalização do 18F-FDG na região do coração. (A) Medida da SUV de cada camundongo (n= 3-4) e (B) Figura representativa. A análise estatística foi realizada por OneWay Anova com Tukey como pós teste.

6. Discussão

A síndrome metabólica compreende um conjunto de condições que aumentam em 50-60 % o risco cardiovascular (Qiao et al, 2007), tendo um forte componente inflamatório. Em estudo anterior do nosso grupo (Cicarelli, 2016) verificou-se que pacientes com síndrome metabólica não apresentaram aumento das concentrações séricas de colesterol total, LDL-colesterol, LDL (-) e oxLDL, em relação ao grupo controle (Anexo I). Nesta tese, verificamos inicialmente os níveis de anticorpos anti-p2C7 nessas amostras para investigar se uma das alterações qualitativas da LDL, especificamente o microdomínio 2C7, estaria presente e se poderia estar relacionado ao processo inflamatório. De fato, a LDL (-) é considerada como uma fração heterogênea de LDL modificada in vivo, por diferentes processos fisiopatológicos, que resultam em modificação estrutural ou conformacional da ApoB-100, bem como de seu conteúdo lipídico, que alteram seu reconhecimento por receptores B / E (Faulin et al, 2008). Dentre as propriedades aterogênicas já descritas para a LDL (-) podemos citar a modulação da atividade de metaloproteinases, como MMP 9 em monócitos (Ligi et al, 2018), disfunção mitocondrial e senescência em células endoteliais (Chen et al, 2018), aumento da produção de fatores de diferenciação como M-CSF e GM-CSF por macrófagos (Lu et al, 2017), inflamação do tecido adiposo (Ke et al, 2017) e ativação de NLRP3- Inflamassoma em macrófagos (Estruch et al, 2015).

Levando em consideração o rearranjo da ApoB-100 na LDL (-), nosso grupo descreveu, pela primeira vez, um epítipo denominado p2C7 (Faulin et al, 2019) que poderia mimetizar os efeitos pró-inflamatórios da LDL (-) in vitro. No presente estudo, verificamos que a presença de p2C7 na LDL (-) pode ser um componente relevante para a inflamação, mesmo sem o aumento da concentração total de LDL (-).

A relevância da imunidade humoral na aterosclerose tem sido discutida ao longo dos anos, incluindo o papel da IgM na ateroproteção. Anticorpos IgM protetores podem ser regulados pela dislipidemia. Recentemente, mostrou-se que camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura exibem níveis aumentados de c-Myb na medula óssea, limitando as respostas ateroprotetoras da IgM

diretamente por meio de seus efeitos sobre os linfócitos B (Shikatani et al, 2019). Esse dado corrobora a correlação inversa observada entre os níveis de IgM anti-LDL (-) e as concentrações de triglicérides e ApoE, assim como a correlação positiva com os níveis de HDL-colesterol (Anexo I). Nas amostras humanas utilizadas, a dislipidemia é caracterizada por concentrações aumentadas de triglicérides e níveis baixos de HDL-colesterol. Lipoproteínas com conteúdo elevado de triglicérides e enriquecidas com apoC-III afetam as vias de sinalização que ativam o NF- κ B e aumentam mediadores inflamatórios, o que contribuiria para o desenvolvimento da aterosclerose avançada (Luo et al, 2016).

Dentre as propriedades antiaterogênicas da HDL, incluem-se os efeitos antioxidantes (protegendo as lipoproteínas apoB-100 da oxidação) (Soran et al, 2015), às propriedades antitrombóticas (Mineo et al, 2006) e anti inflamatórias (Barter et al, 2004) e a manutenção da função endotelial (Mineo et al, 2006). Assim, a associação entre a IgM anti-LDL (-) e a HDL (Anexo I) poderia estar relacionada à sua maior produção no grupo controle com perfil normolipidêmico e, portanto, a menores níveis de c-Myb (Shikatani et al, 2019).

A dislipidemia e a inflamação são altamente correlacionadas. A ativação da cascata inflamatória diminui o HDL-colesterol, com prejuízo no transporte reverso do colesterol e alterações paralelas nas apolipoproteínas, enzimas, capacidade antioxidante e do efluxo de colesterol (Feingold, et al 2019). Essa diminuição do HDL-colesterol pode estimular alterações compensatórias, como a síntese e o acúmulo de VLDL, rica em fosfolípidios, que se liga a produtos bacterianos e outras substâncias tóxicas, estimulando a inflamação (Tall and Yvan-Charvet, 2015). Portanto, controlar a inflamação nos distúrbios metabólicos é primordial.

Demonstramos, nas amostras de plasma humano, que o IgG anti-p2C7 é produzido em níveis elevados apenas quando a LDL (-) apresenta conteúdo elevado deste epítipo e, ainda, uma correlação positiva entre a razão de p2C7/LDL (-) com a concentração de TNF na circulação, assim como a relação inversa entre a IgG anti-p2C7 e o TNF.

Com essas associações, demonstradas por regressões lineares, direcionamos o estudo para investigar o efeito do p2C7 na regulação do TNF e as propriedades de neutralização da IgG anti-p2C7.

Para uma resposta humoral e produção de anticorpos contra epítomos de proteínas, a ativação de ambos os linfócitos (T e B) é necessária. Os linfócitos B naive têm em sua membrana celular o BCR (receptor de células B), que é uma imunoglobulina capaz de reconhecer epítomos conformacionais e lineares. A população de linfócitos T CD4 + possui o TCR (receptor de células T), que reconhece apenas os peptídeos processados ligados ao receptor MHC (classe I e classe II). Assim, células apresentadoras de antígenos, como macrófagos, células dendríticas, ou o próprio linfócito B, apresentam peptídeos para os linfócitos T CD4, que se diferenciam em células Th2, secretam principalmente IL-4 e outras citocinas necessárias para a maturação das células B nas células plasmáticas (Harris et al, 1996).

No protocolo de imunização utilizado neste estudo, com o peptídeo p2C7 livre, uma provável explicação para a ausência de resposta humoral seria a falta de reconhecimento do peptídeo pelo MHC-II e a não ativação dos linfócitos T CD4+, o que levaria à falta de maturação das células B, acarretando na ausência de anticorpos, mesmo após 4 reforços. Essa hipótese também é apoiada pelo fato de que nenhum aumento significativo de IL-4, IL-2 ou IFN foi observado no plasma dos camundongos imunizados (Li et al. , 2014). Um fato relevante foi o aumento da concentração plasmática de TNF- α para camundongos imunizados com p2C7 com Alum ou Montanide. Dados publicados pelo grupo mostraram, *in vitro*, que o peptídeo p2C7 é capaz de induzir a produção de TNF por macrófagos derivados da medula óssea (BMDM), assim como macrófagos derivados de monócitos humanos (Faulin et al, 2019; Tripodi et al, 2020). O grupo de camundongos imunizados com p2C7 e com ausência de resposta humoral anti-p2C7, aumentou a produção de TNF mesmo sem a dieta aterogênica, sugerindo que o aumento da concentração deste epítomo no animal poderia aumentar a inflamação.

Na camada subendotelial, os macrófagos reconhecem LDL (-) como uma partícula contendo DAMP através do complexo receptor TLR4 / CD14 / MD2 (Miller et al, 2003) e, portanto, levam à ativação de vias de sinalização intracelular, incluindo a via de NF- κ B / AP -1 (fator nuclear kappa B / proteína

ativadora 1) (Estruch et al, 2013), culminando em um evento inflamatório (Janabi et al, 2000). No entanto, a LDL modificada é reconhecida por várias classes de linfócitos T (Ketelhuth, DFJ e Hansson, GK, 2011) e B (Caligiuri et al, 2002) que contribuem para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Ketelhuth, DFJ e Hansson, GK, 2016). Em condições fisiológicas, a autotolerância é estabelecida e mantida, evitando doenças autoimunes. Por sua vez, a tolerância a autoantígenos pode ser induzida experimentalmente por várias estratégias, incluindo administração intravenosa sistêmica de proteínas ou peptídeos solúveis (Dresser DW, 1962; Getts DR et al, 2012). O protocolo desenvolvido para gerar tolerância periférica contra p2C7 foi adaptado de Rosenberg et al (2010), que utilizou peptídeos de tamanho semelhante aos utilizados neste trabalho. Conforme observado pela concentração total de anticorpos anti-LDL (-), os camundongos, mesmo que tolerizados, foram capazes de ativar a resposta humoral contra o antígeno utilizado na imunização, no caso, a LDL (-). Portanto, assumimos que os anticorpos produzidos nos grupos tolerizados são contra epítomos subdominantes, ou seja, normalmente não são produzidos devido a resposta imune ser gerada contra os epítomos dominantes (no caso, o p2C7). Assim, quando inibimos a produção de anticorpos anti-p2C7 e introduzimos a dieta hipercolesterolêmica, foi possível verificar a importância desses anticorpos no curso da resposta imune adaptativa. Curiosamente, a não produção do anticorpo anti-p2C7 aumentou consideravelmente o processo inflamatório no grupo tolerizado, quando comparado aos demais grupos. Esse resultado corrobora com o que foi mostrado por Kazuma et al (2013) e Cavalcante et al (2016) com o anticorpo monoclonal anti-p2C7 (ou o ScFv correspondente), que reduziu o processo aterogênico em camundongos LDLr/-.

Pequenos peptídeos que não têm a capacidade de ativar receptores de células B ou recrutar células T podem ser conjugados a proteínas transportadoras para que possam ser usados como antígenos de vacina (Gefen et al, 2015). Assim, a conjugação do peptídeo p2C7 com ovalbumina é uma estratégia plausível para contornar a não ativação da resposta humoral descrita acima. De fato, os haptenos, que são compostos de baixo peso molecular, são capazes de produzir uma resposta imune-humoral apenas quando são derivatizados a uma proteína carreadora (Erkes e Senthamil, 2014).

Nesse caso, optamos pela albumina, proteína já amplamente descrita por sua capacidade de induzir a formação de anticorpos. Na verdade, isso pode ser observado na maior produção de IgG anti-p2C7 após a imunização com a formulação OVA-p2C7. Ao mesmo tempo, o repertório de anticorpos gerado para a formulação OVA-p2C7 é claramente limitado, uma vez que os títulos de IgG anti-LDL (-) não foram mais elevados do que no grupo de animais imunizados com LDL (-).

Levando em consideração a diferença conformacional da LDL (-), é claro que a imunização com a partícula inteira de LDL (-) poderia induzir um repertório de anticorpos mais abrangente. Porém, é importante destacar a alta produção de IgG anti-p2C7 com a imunização com LDL (-), mostrando que esse epítipo é imunodominante.

As células B também desempenham um papel na fisiopatologia da aterosclerose, sendo os subconjuntos de células B descritos como anti ou pró-aterogênicos. Na verdade, a produção de anticorpos contra epítipos da LDL é observada em humanos e camundongos. Não surpreendentemente, após a dieta, todos os grupos desenvolveram um alto título de IgG anti-LDL (-), mas a imunização com LDL (-) e OVA-p2C7 resultou em títulos de anticorpos mais elevados do que no grupo controle.

O IgG anti-p2C7 foi previamente descrito como um anticorpo antiinflamatório. Uma formulação contendo nanocápsulas lipídicas adsorvidas com o fragmento scFv anti-p2C7 diminuiu a inflamação em camundongos LDLr^{-/-} e a formação de células espumosas (Cavalcante et al, 2021). Corroborando com o resultado anterior, a imunização ativa também diminuiu a inflamação no arco aórtico, evidenciada pela menor captação de 18F-FDG nos grupos imunizados, além da menor produção de TNF e IL-6.

7. Conclusão

Os dados aqui apresentados demonstraram que o epítopo p2C7 é altamente expresso na LDL (-) de pacientes com maior risco cardiovascular e a importância de neutralizar o epítopo p2C7 para combater a inflamação. Além disso, a imunização ativa com p2C7 também se mostra uma ferramenta promissora para prevenir e regular a inflamação causada pela LDL (-) no curso da aterosclerose.

8. Bibliografia

- Ait-Oufella, H., Herbin, O., Bouaziz, J.-D., Binder, C. J., Uyttenhove, C., Laurans, L., ... Mallat, Z. (2010). B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(8), 1579–1587. <https://doi.org/10.1084/jem.20100155>
- Andican, G., Seven, A., Uncu, M., Cantaşdemir, M., Numan, F., & Burçak, G. (2008). Oxidized LDL and anti-oxLDL antibody levels in peripheral atherosclerotic disease. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 68(6), 473–478. <https://doi.org/10.1080/00365510701842996>
- Avogaro, P., Bon, G. B., & Cazzolato, G. (n.d.). Presence of a Modified Low Density Lipoprotein in Humans. Retrieved from <http://ahajournals.org>
- Benitez, S., & Ordoñez-Llanos, J. (2015). Electronegative LDL induces priming and inflammasome activation leading to IL-1 β release in human monocytes and macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(11), 1442–1449. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.08.009>
- Barros, M. R. A. C., Bertolami, M. C., Abdalla, D. S. P., & Ferreira, W. P. (2006). Identification of mildly oxidized low-density lipoprotein (electronegative LDL) and its auto-antibodies IgG in children and adolescents hypercholesterolemic offsprings. *Atherosclerosis*, 184(1), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.027>
- Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*. 2004 Oct 15;95(8):764-72. doi: 10.1161/01.RES.0000146094.59640.13. PMID: 15486323.
- Brant LCC, Nascimento BR, Teixeira RA, Lopes MACQ, Malta DC, Oliveira GMM, Ribeiro ALP. Excess of cardiovascular deaths during the COVID-19 pandemic in Brazilian capital cities. *Heart*. 2020 Dec;106(24):1898-1905. doi: 10.1136/heartjnl-2020-317663. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33060261; PMCID: PMC7565269.
- Blanco, F. J., Villegas, S., Benítez, S., Bancells, C., Diercks, T., Ordóñez-Llanos, J., & Sánchez-Quesada, J. L. (2010). 2D-NMR reveals different populations of exposed lysine residues in the apoB-100 protein of electronegative and electropositive fractions of LDL particles. *Journal of Lipid Research*, 51(6), 1560–1565. <https://doi.org/10.1194/jlr.D002642>
- Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest*. 2002;109(6):745-753. doi:10.1172/JCI7272
- Cazzolato, G., Avogaro, P., & Bittolo-Bon, G. (1991). Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. *Free Radical Biology & Medicine*, 11(3), 247–253. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1937142>
- Chang, Y. H., Abdalla, D. S., & Sevanian, A. (1997). Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Radical Biology & Medicine*, 23(2), 202–214. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9199882>
- Chang, P.-Y., Chen, Y.-J., Chang, F.-H., Lu, J., Huang, W.-H., Yang, T.-C., ... Chen, C.-H. (2013). Aspirin protects human coronary artery endothelial cells against atherogenic electronegative LDL via an epigenetic mechanism: a

novel cytoprotective role of aspirin in acute myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 99(1), 137–145. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt062>

Cheng X, Yu X, Ding YJ, Fu QQ, Xie JJ, Tang TT, Yao R, Chen Y, Liao YH. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol*. 2008 Apr;127(1):89-97. doi: 10.1016/j.clim.2008.01.009. Epub 2008 Feb 21. Erratum in: *Clin Immunol*. 2009 Dec;133(3):447. PMID: 18294918.

Chyu, K.-Y., Zhao, X., Reyes, O. S., Babbidge, S. M., Dimayuga, P. C., Yano, J., ... Shah, P. K. (2005). Immunization using an Apo B-100 related epitope reduces atherosclerosis and plaque inflammation in hypercholesterolemic apo E (-/-) mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(4), 1982–1989. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.141>

Cicarelli, L.M. Biomarcadores de risco cardiovascular em pacientes HIV positivos tratados e não tratados com terapia antirretroviral 2016. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.

DRESSER, D. W. (1962). Specific inhibition of antibody production. II. Paralysis induced in adult mice by small quantities of protein antigen. *Immunology*, 5, 378–388. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13887798>

Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch Med Sci*. 2017;13(4):851-863. doi:10.5114/aoms.2016.58928

Erkes, D. A., & Selvan, S. R. (2014). Hapten-induced contact hypersensitivity, autoimmune reactions, and tumor regression: plausibility of mediating antitumor immunity. *Journal of Immunology Research*, 2014, 175265. <https://doi.org/10.1155/2014/175265>

Estruch, M., Rajamäki, K., Sanchez-Quesada, J. L., Kovanen, P. T., Öörni, K., Benitez, S., & Ordoñez-Llanos, J. (2015). Electronegative LDL induces priming and inflammasome activation leading to IL-1 β release in human monocytes and macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(11), 1442–1449. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.08.009>

Estruch, M., Bancells, C., Beloki, L., Sanchez-Quesada, J. L., Ordóñez-Llanos, J., & Benitez, S. (2013). CD14 and TLR4 mediate cytokine release promoted by electronegative LDL in monocytes. *Atherosclerosis*, 229(2), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.011>

Falk, E. (2006). Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(8), C7–C12. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.068>

Faulin, T. do E. S., et al. Recent advances on detection of modified forms of low-density lipoproteins. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*. 2008

Faulin TDES, Kazuma SM, Tripodi GL, Cavalcante MF, Wakasuqui F, Oliveira CLP, Degenhardt MFS, Michaloski J, Giordano RJ, Ketelhuth DFJ, Abdalla DSP. Proinflammatory Action of a New Electronegative Low-Density Lipoprotein Epitope. *Biomolecules*. 2019 Aug 20;9(8):386. doi: 10.3390/biom9080386. PMID: 31434316; PMCID: PMC6723646.

Feingold KR, Grunfeld C. The Effect of Inflammation and Infection on Lipids and Lipoproteins. [Updated 2019 Jan 8]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326741/>

Fredrikson, G. N., Björkbacka, H., Söderberg, I., Ljungcrantz, I., & Nilsson, J. (2008). Treatment with apo B peptide vaccines inhibits atherosclerosis in human apo B-100 transgenic mice without inducing an increase in peptide-specific antibodies. *Journal of Internal Medicine*, 264(6), 563–570. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01995.x>

Fredrikson, G. N., Hedblad, B., Berglund, G., Alm, R., Ares, M., Cercek, B., ... Nilsson, J. (2003). Identification of Immune Responses Against Aldehyde-Modified Peptide Sequences in ApoB Associated With Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(5), 872–878. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000067935.02679.B0>

Gefen, T., Vaya, J., Khatib, S., Rapoport, I., Lupo, M., Barnea, E., ... Pitcovski, J. (2015). The effect of haptens on protein-carrier immunogenicity. *Immunology*, 144(1), 116–126. <https://doi.org/10.1111/imm.12356>

Getts, D. R., Martin, A. J., McCarthy, D. P., Terry, R. L., Hunter, Z. N., Yap, W. T., ... Miller, S. D. (2012). Microparticles bearing encephalitogenic peptides induce T-cell tolerance and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature Biotechnology*, 30(12), 1217–1224. <https://doi.org/10.1038/nbt.2434>

Geysen, H. M., Rodda, S. J., & Mason, T. J. (1986). A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Molecular Immunology*, 23(7), 709–715. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(86\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0161-5890(86)90081-7)

Giordano, R. J., Anobom, C. D., Cardó-Vila, M., Kalil, J., Valente, A. P., Pasqualini, R., ... Arap, W. (2005). Structural Basis for the Interaction of a Vascular Endothelial Growth Factor Mimic Peptide Motif and Its Corresponding Receptors. *Chemistry & Biology*, 12(10), 1075–1083. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.07.008>

Harris, D. P., Vordermeier, H. M., Arya, A., Bogdan, K., Moreno, C., & Ivanyi, J. (1996). Immunogenicity of peptides for B cells is not impaired by overlapping T-cell epitope topology. *Immunology*, 88(3), 348–354. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8774349>

Hsiung, P.-L., & Wang, T. (2008). In vivo biomarkers for targeting colorectal neoplasms. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, 4(6), 329–340. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19126961>

Janabi, M., Yamashita, S., Hirano, K., Sakai, N., Hiraoka, H., Matsumoto, K., ... Matsuzawa, Y. (2000). Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(8), 1953–1960. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10938017>

Ke, L.-Y., Chan, H.-C., Chan, H.-C., Kalu, F. C. U., Lee, H.-C., Lin, I.-L., ... Shin, S.-J. (2017). Electronegative Low-Density Lipoprotein L5 Induces Adipose Tissue Inflammation Associated With Metabolic Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102(12), 4615–4625. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01657>

Ketelhuth, D. F. J. J., & Hansson, G. K. (2016). Adaptive Response of T and B Cells in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 668–678. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306427>

- Khaodhiar L, Ling PR, Blackburn GL, Bistran BR. Serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein correlate with body mass index across the broad range of obesity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2004 Nov-Dec;28(6):410-5. doi: 10.1177/0148607104028006410. PMID: 15568287.
- Knittelfelder, R., Riemer, A. B., & Jensen-Jarolim, E. (2009). Mimotope vaccination – from allergy to cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(4), 493–506. <https://doi.org/10.1517/14712590902870386>
- Kyaw, T., Tay, C., Khan, A., Dumouchel, V., Cao, A., To, K., ... Toh, B.-H. (2010). Conventional B2 B Cell Depletion Ameliorates whereas Its Adoptive Transfer Aggravates Atherosclerosis. *The Journal of Immunology*, 185(7), 4410–4419. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000033>
- Kyaw, T., Tay, C., Hosseini, H., Kanellakis, P., Gadowski, T., MacKay, F., ... Toh, B.-H. (2012). Depletion of B2 but Not B1a B Cells in BAFF Receptor-Deficient ApoE^{-/-} Mice Attenuates Atherosclerosis by Potently Ameliorating Arterial Inflammation. *PLoS ONE*, 7(1), e29371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029371>
- Kyaw, T., Tipping, P., Bobik, A., & Toh, B.-H. (2017). Opposing roles of B lymphocyte subsets in atherosclerosis. *Autoimmunity*, 50(1), 52–56. <https://doi.org/10.1080/08916934.2017.1280669>
- Li, W., Joshi, M. D., Singhanian, S., Ramsey, K. H., & Murthy, A. K. (2014). Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines*, 2(3), 515–536. <https://doi.org/10.3390/vaccines2030515>
- Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgözoğlu L, Lewis EF. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2019 Aug 16;5(1):56. doi: 10.1038/s41572-019-0106-z. PMID: 31420554.
- Libby, P. (2009). Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), S352–S357. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800099-JLR200>
- Lin, J., Kakkar, V., & Lu, X. (2015). The role of interleukin 35 in atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, 21(35), 5151–5159. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26530251>
- Ligi, D., Benitez, S., Croce, L., Rivas-Urbina, A., Puig, N., Ordóñez-Llanos, J., ... Sanchez-Quesada, J. L. (2018). Electronegative LDL induces MMP-9 and TIMP-1 release in monocytes through CD14 activation: Inhibitory effect of glycosaminoglycan sulodexide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(12), 3559–3567. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.022>
- Lund-Katz, S., Ibdah, J. A., Letizia, J. Y., Thomas, M. T., & Phillips, M. C. (1988). A ¹³C NMR characterization of lysine residues in apolipoprotein B and their role in binding to the low density lipoprotein receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(27), 13831–13838. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3138240>
- Luo M, Peng D. The emerging role of apolipoprotein C-III: beyond effects on triglyceride metabolism. *Lipids Health Dis.* 2016;15(1):184. Published 2016 Oct 22. doi:10.1186/s12944-016-0352-y
- Major, A. S., Fazio, S., & Linton, M. F. (2002). B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(11), 1892–1898. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426221>
- Macdougall, I. C., Rossert, J., Casadevall, N., Stead, R. B., Duliege, A.-M., Froissart, M., & Eckardt, K.-U. (2009). A Peptide-Based Erythropoietin-Receptor Agonist for Pure Red-Cell Aplasia. *New England Journal of Medicine*, 361(19), 1848–1855. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa074037>

McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol*. 2018 Jan-Feb;36(1):14-20. doi: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.004. Epub 2017 Sep 8. PMID: 29241747.

Mello, A. P. Q., da Silva, I. T., Abdalla, D. S. P., & Damasceno, N. R. T. (2011). Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis*, 215(2), 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.028>

Miller, Y. I., Choi, S.-H., Wiesner, P., Fang, L., Harkewicz, R., Hartvigsen, K., ... Witztum, J. L. (2011). Oxidation-Specific Epitopes Are Danger-Associated Molecular Patterns Recognized by Pattern Recognition Receptors of Innate Immunity. *Circulation Research*, 108(2), 235–248. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223875>

Miller, Y. I., Viriyakosol, S., Binder, C. J., Feramisco, J. R., Kirkland, T. N., & Witztum, J. L. (2003). Minimally Modified LDL Binds to CD14, Induces Macrophage Spreading via TLR4/MD-2, and Inhibits Phagocytosis of Apoptotic Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1561–1568. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209634200>

Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res*. 2006 Jun 9;98(11):1352-64. doi: 10.1161/01.RES.0000225982.01988.93. PMID: 16763172.

Niccoli, G., Bacà, M., De Spirito, M., Parasassi, T., Cosentino, N., Greco, G., ... Crea, F. (2012). Impact of electronegative low-density lipoprotein on angiographic coronary atherosclerotic burden. *Atherosclerosis*, 223(1), 166–170. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.04.005>

Pande, J., Szewczyk, M. M., & Grover, A. K. (2010). Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances*, 28(6), 849–858. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.004>

Qiao Q, Gao W, Zhang L, Nyamdorj R, Tuomilehto J. Metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Ann Clin Biochem*. 2007 May;44(Pt 3):232-63. doi: 10.1258/000456307780480963. PMID: 17456293.

Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*. 2018;18(4):e27. Published 2018 Aug 13. doi:10.4110/in.2018.18.e27

Rosenfeld, S. M., Perry, H. M., Gonen, A., Prohaska, T. A., Srikakulapu, P., Grewal, S., ... McNamara, C. A. (2015). B-1b Cells Secrete Atheroprotective IgM and Attenuate Atherosclerosis. *Circulation Research*, 117(3), e28-39. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.306044>

Rosenberg, C. S., Martin, D. L., & Tarleton, R. L. (2010). CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(1), 560–568. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000432>

Sánchez-Quesada, J. L., Benítez, S., & Ordóñez-Llanos, J. (2004). Electronegative low-density lipoprotein. *Current Opinion in Lipidology*, 15(3), 329–335. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15166790>

Sánchez-Quesada, J. L., Benítez, S., Otal, C., Franco, M., Blanco-Vaca, F., & Ordóñez-Llanos, J. (2002). Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *Journal of Lipid Research*, 43(5), 699–705. Retrieved from <http://www.jlr.org/content/43/5/699.full>

Sánchez-Quesada, J. L., Pérez, A., Caixàs, A., Ordóñez-Llanos, J., Carreras, G., Payés, A., ... de Leiva, A. (1996). Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control. *Diabetologia*, 39(12), 1469–1476. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8960828>

Sevanian, A., Bittolo-Bon, G., Cazzolato, G., Hodis, H., Hwang, J., Zamburlini, A., ... Ursini, F. (1997). LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 38(3), 419–428. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9101423>

Shikatani EA, Besla R, Ensan S, Upadhye A, Khyzha N, Li A, Emoto T, Chiu F, Degousee N, Moreau JM, Perry HM, Thayaparan D, Cheng HS, Pacheco S, Smyth D, Noyan H, Zavitz CCJ, Bauer CMT, Hilgendorf I, Libby P, Swirski FK, Gommerman JL, Fish JE, Stampfli MR, Cybulsky MI, Rubin BB, Paige CJ, Bender TP, McNamara CA, Husain M, Robbins CS. c-Myb Exacerbates Atherosclerosis through Regulation of Protective IgM-Producing Antibody-Secreting Cells. *Cell Rep*. 2019 May 21;27(8):2304-2312.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.090. PMID: 31116977.

Silva, I. T. da, Mello, A. P. de Q., Sanches, L. B., Abdalla, D. S. P., & Damasceno, N. R. T. (2013). Is plasma alpha-tocopherol associated with electronegative LDL in obese adolescents? *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 59(2), 100–107. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727639>

Smith, A. D., Arnold, E., & Arnold, G. F. (1997). Protein engineering to create biologically active peptides: recombinant human rhinoviruses that display peptide sequences. *Behring Institute Mitteilungen*, (98), 229–239. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382744>

Soran H, Schofield JD, Durrington PN. Antioxidant properties of HDL. *Front Pharmacol*. 2015;6:222. Published 2015 Oct 16. doi:10.3389/fphar.2015.00222

Steinberg, D. (2009). The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), S376–S381. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800087-JLR200>

Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2):104-116. doi:10.1038/nri3793

Tse, K., Gonen, A., Sidney, J., Ouyang, H., Witztum, J. L., Sette, A., ... Ley, K. (2013). Atheroprotective Vaccination with MHC-II Restricted Peptides from ApoB-100. *Frontiers in Immunology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00493>

Tsiantoulas, D., Sage, A. P., Mallat, Z., & Binder, C. J. (2015). Targeting B Cells in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(2), 296–302. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303569>

Toth, P. P., Grabner, M., Puneekar, R. S., Quimbo, R. A., Cziraky, M. J., & Jacobson, T. A. (2014). Cardiovascular risk in patients achieving low-density lipoprotein cholesterol and particle targets. *Atherosclerosis*, 235(2), 585–591. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.05.914>

Tripodi GL, Prieto MB, Abdalla DSP. Inflammasome Activation in Human Macrophages Induced by a LDL (-) Mimetic Peptide. *Inflammation*. 2020 Apr;43(2):722-730. doi: 10.1007/s10753-019-01159-y. PMID: 31858317.

Shah, P. K. (2003). Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(4 Suppl S), 15S–22S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644336>

Siqueira, A. F. A., Abdalla, D. S. P., & Ferreira, S. R. G. (2006). LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 50(2), 334–343. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302006000200020>

Steinberg, D. (2009). The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), S376–S381. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800087-JLR200>

St-Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR, Mauriège P, Bernard PM, Després JP, Lamarche B. Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13-year follow-up data from the Québec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Mar;25(3):553-9. doi: 10.1161/01.ATV.0000154144.73236.f4. Epub 2004 Dec 23. PMID: 15618542.

Sniderman, A. D., Tremblay, A., De Graaf, J., & Couture, P. (2012). Phenotypes of hypertriglyceridemia caused by excess very-low-density lipoprotein. *Journal of Clinical Lipidology*, 6(5), 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2012.04.081>

Sniderman, A., & Kwiterovich, P. O. (2013). Update on the detection and treatment of atherogenic low-density lipoproteins. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 20(2), 140–147. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32835ed9cb>

Tong, A. H. Y., Drees, B., Nardelli, G., Bader, G. D., Brannetti, B., Castagnoli, L., ... Cesareni, G. (2002). A Combined Experimental and Computational Strategy to Define Protein Interaction Networks for Peptide Recognition Modules. *Science*, 295(5553), 321–324. <https://doi.org/10.1126/science.1064987>

Tsiantoulas, D., Diehl, C. J., Witztum, J. L., & Binder, C. J. (2014). B Cells and Humoral Immunity in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 114(11), 1743–1756. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301145>

Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Kupka MJ, Manning WJ, Clouse ME, D'Agostino RB, Wilson PW, O'Donnell CJ. C-reactive protein is associated with subclinical epicardial coronary calcification in men and women: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2002 Sep 3;106(10):1189-91. doi: 10.1161/01.cir.0000032135.98011.c4. PMID: 12208790.

Wang LJ, Song BL. Niemann-Pick C1-Like 1 and cholesterol uptake. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jul;1821(7):964-72. doi: 10.1016/j.bbali.2012.03.004. Epub 2012 Mar 28. PMID: 22480541.

Wang, Y.-C., Lee, A.-S., Lu, L.-S., Ke, L.-Y., Chen, W.-Y., Dong, J.-W., ... Chen, C.-H. (2018). Human electronegative LDL induces mitochondrial dysfunction and premature senescence of vascular cells in vivo. *Aging Cell*, 17(4), e12792. <https://doi.org/10.1111/acer.12792>

Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M., & Murphy, K. M. (2006). Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity*, 24(6), 677–688. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.002>

Wolf, D., Zirlik, A., & Ley, K. (2015). Beyond vascular inflammation – recent advances in understanding atherosclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 72(20), 3853. <https://doi.org/10.1007/S00018-015-1971-6>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (Genova). Cardiovascular diseases (CVDs). 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>.

Yeang, C., Hung, M. Y., Pattison, J., Bowden, K., Dalton, N., Peterson, K. L., ... Que, X. (2016). Expression of E06, a natural monoclonal antibody targeted to oxidized phospholipids (OXPL), attenuates the progression of aortic sclerosis in aged hyperlipidemic mice. *Atherosclerosis*, 252, e229. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.212>

Yang, T.-C., Chang, P.-Y., Kuo, T.-L., & Lu, S.-C. (2017). Electronegative L5-LDL induces the production of G-CSF and GM-CSF in human macrophages through LOX-1 involving NF- κ B and ERK2 activation. *Atherosclerosis*, 267, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.016>

Yoshida, H., & Kisugi, R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta*, 411(23–24), 1875–1882. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.038>

Parte II: Estágio no exterior. Resultados obtidos no estágio realizado no Karolinska Institutet - Suécia.

Nas próximas seções são apresentadas as atividades referentes ao período do estágio BEPE realizado no Karolinska Institutet (dezembro/2019 a março 2021). Na parte II-A, estão descritos os resultados do estudo inicialmente proposto. Na parte II-B, apresenta-se os resultados que foram desenvolvidos posteriormente, com ampliação do escopo do projeto, abordando-se a inflamação vascular envolvida no aneurisma de aorta abdominal através de ferramentas de bioinformática. Na parte II-C, são apresentados os resultados do estudo do envolvimento da enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) na esteatohepatite não-alcoólica (NASH) e aterosclerose em camundongos ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-}IDO^{-/-}double-knockout.

Infelizmente, o p2C7 não foi capaz de estimular os linfócitos in vitro (Fig 1) como propusemos no projeto inicial; no entanto, conseguimos avaliar a ativação de macrófagos. Além disso, nos primeiros 3 meses do estágio, não foi possível iniciar o projeto devido a várias introduções e palestras obrigatórias sobre o Karolinska Institutet, como protocolos de segurança, instalações e biotério. Finalmente, eu fui certificado com a permissão da União Europeia antes de começar a trabalhar com animais.

Não pude ir ao laboratório por mais de 3 meses, começando em março de 2020, devido à pandemia e ao lockdown. Na verdade, o COVID19 também afetou diretamente o projeto em andamento devido aos seguintes aspectos:

- 1- Trazer os anticorpos (que reconhecem o p2C7) do Brasil não era viável;
- 2 -Trabalhar com material humano (por exemplo, LDL; sangue humano) também não foi permitido;

Com isso em mente, procuramos continuar no assunto do imunometabolismo e da regulação imunológica, mas com uma abordagem diferente. Nesse momento, pudemos entender melhor o projeto como “Imunometabolismo como mediador de Doenças Cardiovasculares”, o que gerou diversos resultados com manuscritos em andamento.

II-A: Immunometabolism as a new approach to development of “natural adjuvants”

Introduction:

Continuous nutrient supply is essential for cell proliferation and adapting to the nutrient demand is a primordial strategy that, as mentioned before, may regulate immune response. In this context, tryptophan metabolism is emerging as a new target to immunomodulation (Cole et al, 2015; Criado et al, 2009; Fallarino et al, 2006; Moffett and Namboodiri, 2003; Zhang et al, 2012). The enzyme indoleamine 2, 3- dioxygenase (IDO) catalyzes the initial and rate-limiting step of the tryptophan degradation pathway and is expressed in all APC (antigen presenting cells), T lymphocytes and other immune cells (Mbongue et al 2015; Ketelhuth, 2019). IDO degrades tryptophan and other indoleamine compounds via oxidative cleavage of the pyrrole ring, resulting in kynurenine accumulation, one of its metabolites, which have been constantly reported to exhibit activity in the immune system (Polyzos et al, 2015). Beyond the immune system, IDO is intrinsically correlated with atherosclerosis. Atherosclerosis is the major cause of cardiovascular disease and inflammation plays a crucial role in all steps of this physiopathology. Novel insight into the molecular mechanism driving immune response in the vessel wall shows that IDO, via kynurenine pathway, it's a checkpoint regulating innate and adaptive response in the plaque (Ketelhuth, 2019). In fact, IDO1 ablation in mice causes a significant increase in lesion size and markers of plaque vulnerability (Cole et al, 2015).

Methodology:

Bone marrow-derived macrophages:

Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were obtained by extracting bone marrow cells from femurs of mice according to Weischenfeldt, J., & Porse, B. (2008). Further, bone marrow cells were differentiated to macrophages through incubation with DMEM medium with 20% of L929 media and 10% fetal bovine serum at 37° C, 5% CO₂ in humidified air. The medium was replaced on the third day and BMDMs will be ready after 7 days of incubation.

For the ELISA, 100.000 cells/well were plated in a 96 well plate and treated with 200 uM of 1MT (DL, D or L) or 10 mM of DCA for 1 hour for them be treated with 100 ug/mL of p2C7 or 100 and 10 ng/mL of LPS. The supernatant was collected for posterior analysis and the RNA was extracted for qPCR. The IL-10, TNF-a and IL-6 were analyzed in the supernatant of treated cells with ELISA kits, as manufacturer's instructions.

Splenocytes:

Spleens from mice were homogenized to single-cell suspensions in cold RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum. The red blood cells were removed using a hypotonic 0.3M ammonium chloride solution (lyse buffer) and the cells plated in a 96 well plate (500.000 cells/well). The splenocytes were treated with LPS (5 ng/mL), p2C7 (100 ug/mL) in presence of 200 uM of 1MT (DL, D or L) or 10 mM of DCA. The proliferation was measured by WST1 kit, as manufacturer's instructions, after 72 hours.

Results:

DCA inhibits splenocyte proliferation.

Mouse (WT or IDO KO) splenocytes were stimulated with p2C7 or LPS in presence of IDO1 inhibitors (1MT DL, D or L) and DCA, a glycolysis inhibitor. The peptide did not induce splenocyte proliferation, otherwise, we could see a decrease in the proliferation of the LPS control group treated with DCA. In fact, even the basal condition treated with DCA, without any stimulus, showed less proliferation when compared with the control group. This data indicates a strong effect of DCA under lymphocyte activation (Figure 1A). The splenocytes derived from the IDO1 KO mouse did not show any difference if compared with the WT group (Figure 1B).

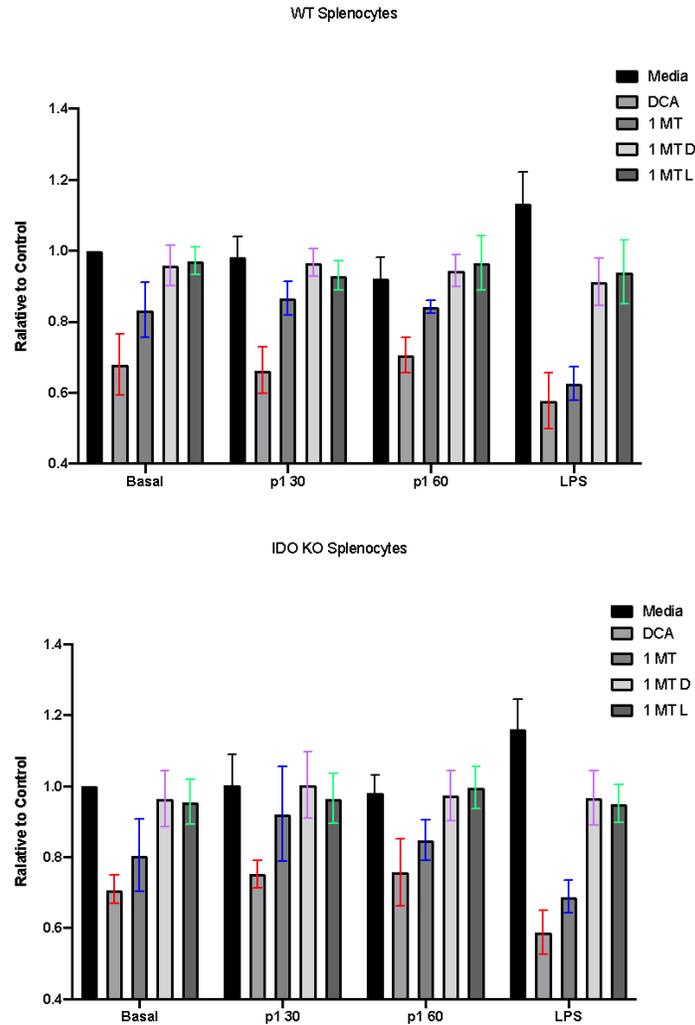


Figure 1: Splenocyte proliferation. The splenocytes from WT or IDO1 KO mice were plated in a 96 well plate (500.000 cells/well) and stimulated with p2c7 or LPS. The cells were treated with the IDO1 inhibitors 1MT (D, L and DL) or the glycolysis inhibitor DCA. After 72 hours, the proliferation was measured with the WST1 kit.

IDO1 regulates macrophage TNF α production.

The macrophages were generated from bone marrow derived cells, and then treated with 100 ng/mL of LPS or 100 ug/mL of p2C7. The supernatant of the macrophage culture was collected after 18 hours (overnight). It was measured TNF, IL6 and IL10. After the treatment, as expected, DCA drastically decrease the TNF and IL6 production by macrophages in both cases (LPS or p2C7 treated

macrophages), although it was not observed any difference in IL10 production by macrophages treated with 10 mM of DCA and 100 ng/mL of LPS, we could see a higher production of IL10 by macrophages treated with DCA in concomitant with p2C7. Surprisingly, the TNF cytokine seems to be directly regulated by IDO1. In both cases, LSP or p2c- treated macrophages, was observed a decrease in the TNF production by IDO KO macrophages or 1MT (DL and L) treated cells.

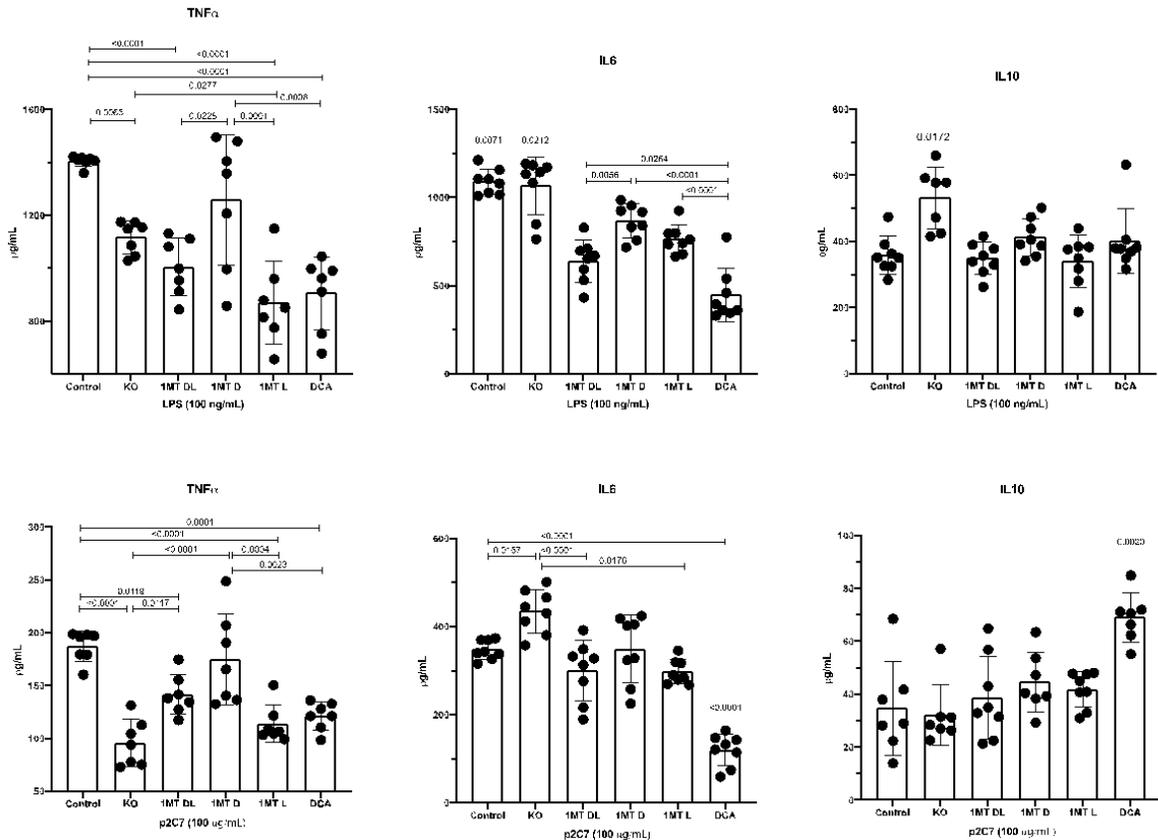


Figure 2: Macrophage activation. Macrophage activation was measured through cytokine production. The IL10, TNF and IL6 concentrations were measured in the supernatant of BMDM from IDO1 WT or KO mouse after 18 hours of incubation with LPS or p2C7.

Next, the macrophages were treated for 3, 18 or 24 hours with 10 ng/mL of LPS or 100 μ g/mL of p2c7. Consistent with the previous result, IDO1 KO mice showed less production of TNF α when compared with the control group. Although IL6 was not affected, IL10 seems to have a slow response (Fig 3).

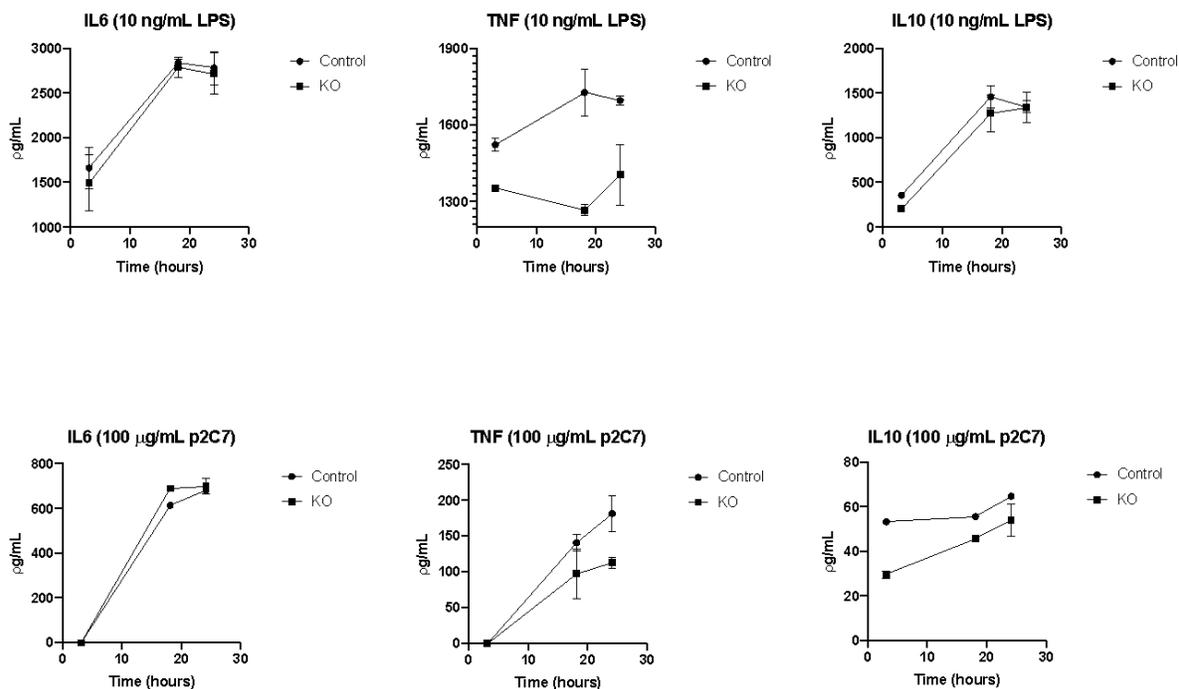


Figure 3: Cytokine's kinetics. The IL10, TNF and IL6 concentrations were measured in the supernatant of BMDM from the IDO1 WT or KO mouse after 3, 18 or 24 hours of incubation with LPS or p2C7.

The dual role of IDO1 in macrophage activation

Although IDO1 seems to have a deleterious effect on TNF production by macrophages, almost no effect was detected for IL6. Next, we accessed the role of IDO1 for IL1B. Surprisingly, IDO1 KO macrophages exhibited a higher production of IL1B when compared with the WT group, suggesting a protective effect of IDO1 (Fig 4).

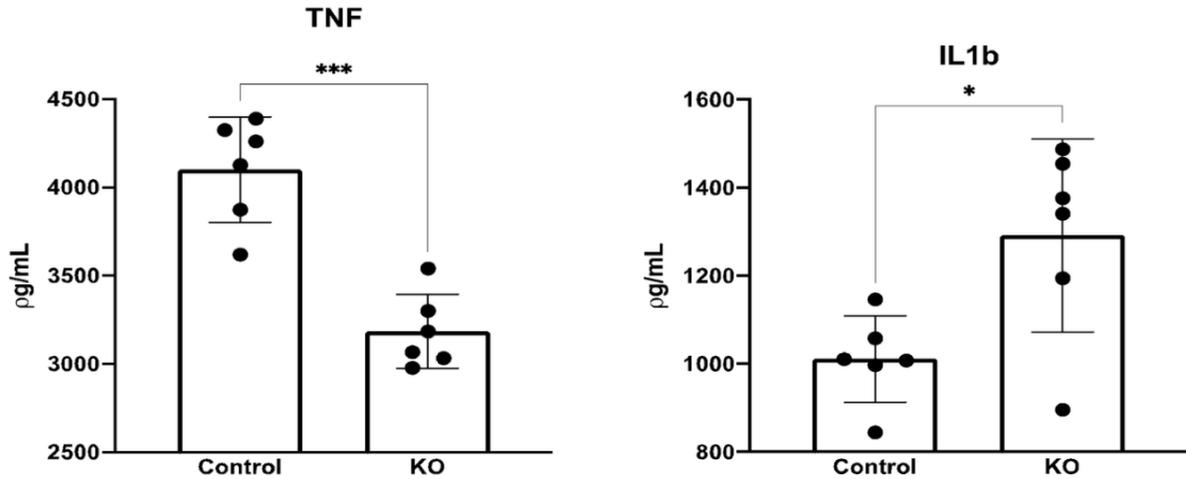


Figure 4: The dual role of IDO1. BMDM obtained from WT or IDO1 KO mice were treated with 10 ng/mL LPS for 4 hours and immediately after 5 mM ATP for an additional 1 hour. The concentrations of TNF and IL1B were measured by ELISA in the supernatant.

Under inflammatory conditions, IDO1 is the main source of tryptophan consumption. We hypothesized that the tryptophan depletion by IDO1 could affect the cytokines production by BMDM. To test that, BMDM were supplemented with tryptophan (0, 12.5, 25 or 50 μ M) and treated as described before. An opposite effect of tryptophan can be seen on WT and KO BMDM (Fig 5). In the presence of IDO1, the tryptophan supplementation increased the production of TNF; by the other side, it was protective for IL1B synthesis. For the IDO1 KO BMDM tryptophan supplementation decreased TNF but increased IL1B concentrations in the supernatant of the treated cells.

We next tested if IDO1 regulates the cytokines production at transcriptional or post translational level. For this, BMDM were treated with tryptophan (50 μ M) and LPS (10 ng/mL) for 4 hours and the RNA was isolated for qPCR analysis. As shown in figure 6, the transcription of IL1B was upregulated in the IDO1 KO BMDM; otherwise TNF was decreased.

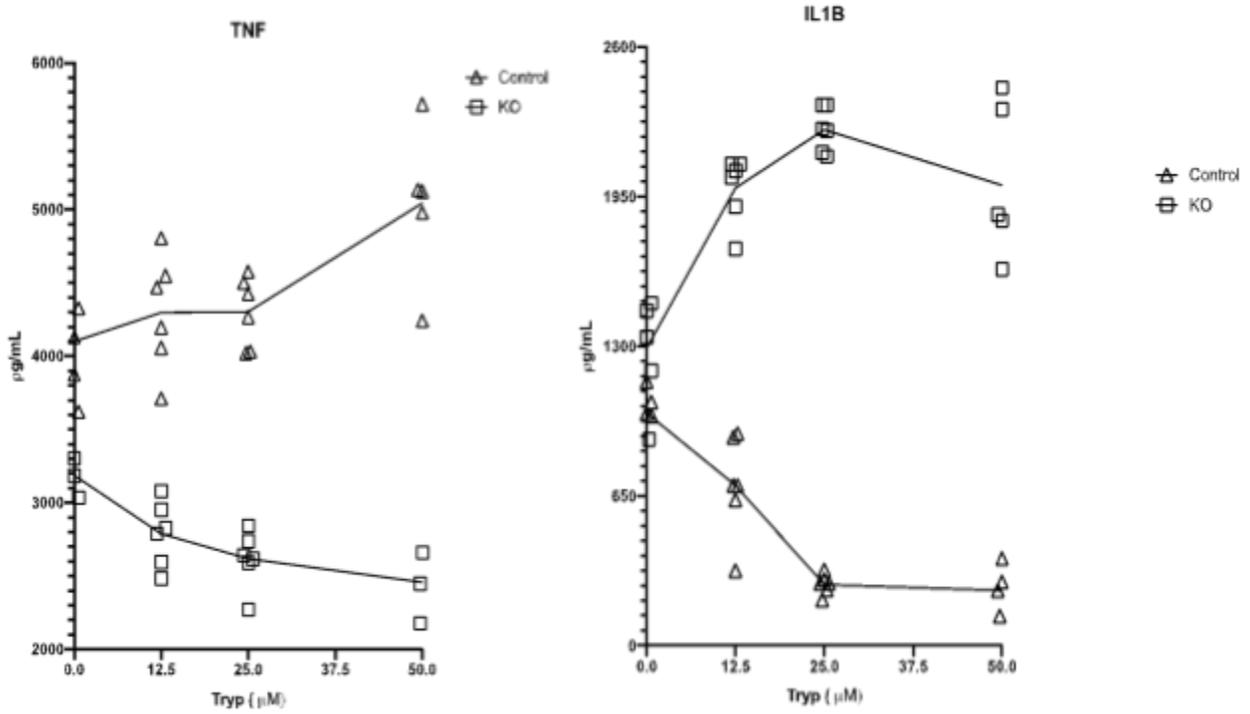


Figure 5: Tryptophan supplementation. BMDM obtained from WT or IDO1 KO mice were treated with 10 ng/mL of LPS plus different concentrations of tryptophan (0, 12.5, 25 or 50 μM) for 4 hours and immediately after 5 mM ATP for an additional 1 hour. The concentrations of TNF and IL1B were measured by ELISA in the supernatant. Interestingly, the tryptophan supplementation did not affect the TNF transcription but increased IL1b transcription. We did not see a clear effect of the pharmacological inhibition of IDO1 with 1MT DL in the mRNA levels of tested genes.

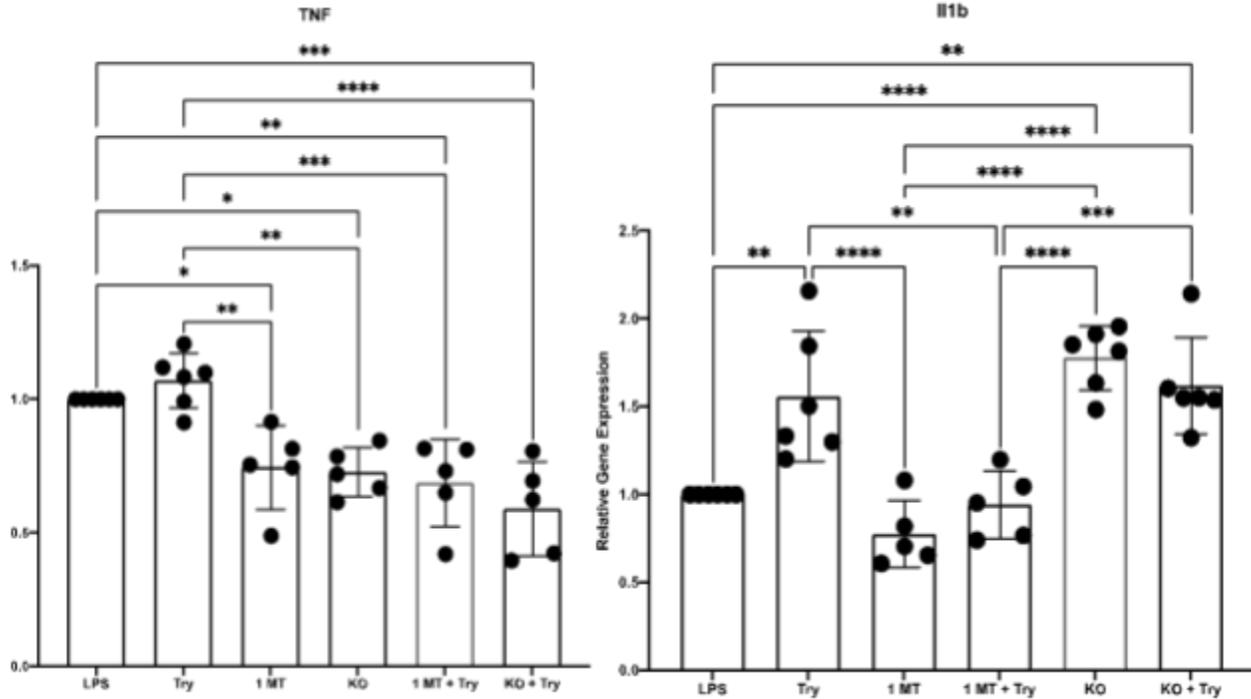


Figure 6: TNF and IL1B gene expression. BMDM obtained from WT or IDO1 KO mouse were treated with 10 ng/mL LPS plus different concentrations of tryptophan (0, 12.5, 25 or 50 μ M) for 4 hours. WT BMDM were also treated with 500 μ M of the IDO1 inhibitor 1MT DL.

Partial conclusion:

At the moment, we observed a dual role of IDO1 in macrophage activation. As shown before, the gene expression levels of IL1B and TNF were directly modulated by IDO1. Otherwise, only the tryptophan supplementation was not able to affect TNF gene expression, although the protein levels were modulated. These findings suggest that IDO1 modulates macrophage activation not only by depletion of tryptophan, but the tryptophan metabolites might also be involved. In fact, when the BMDM were treated with 3HAA the production of TNF and IL1B were drastically reduced (data not shown).

In a next step, the Karolinska group intends to access how IDO1 is involved in a NASH (non-alcoholic steatohepatitis)/atherosclerosis model and the mechanism behind the regulation of TNF and IL1B.

II-B: Bioinformatic metabolic gene profiling of mouse and human AAA

Introduction:

Abdominal aortic aneurysm (AAA or Triple A) is an enlargement of the abdominal aorta. This process usually has no symptoms, unless during the rupture, and the common risk factors are associated with genetic disorders and family history (including Marfan Syndrome), smoking, high blood pressure and other blood vessel diseases. The formation of an aneurysm is a complex multifactorial process, involving destructive remodeling of the connective tissue around the affected segment of the aorta wall (Sakalihasan et al, 2005).

Vascular inflammation is the main initial and propagating factor of aortic aneurysm. In this process, a large number of immune cells, including lymphocytes, macrophages, mast cells, neutrophils, and natural killer cells, infiltrate into the tissue from adventitia to intima gradually, evoking a series of inflammatory responses. Infiltration of immune cells and their secreted mediators stimulate smooth muscle cells (SMCs) to secrete matrix metalloproteinases (MMPs), which are considered key enzymes directly related to AAA formation and progression. These enzymes destroy the stability and mechanical property of the aortic walls by modulating interstitial elastin and collagen, resulting in loss of smooth muscle cells in the aortic media and destruction of extracellular matrix (ECM) (Shaw et al, 2021).

Immune cells constantly patrol the body via the bloodstream and migrate into multiple tissues where they face variable and sometimes demanding environmental conditions. Nutrient and oxygen availability can vary during homeostasis, and especially during the course of an immune response, creating a demand for immune cells that are highly metabolically dynamic. As an evolutionary response, immune cells have developed different metabolic programmes to supply them with cellular energy and biomolecules, enabling them to cope with changing and challenging metabolic conditions. Recent research indicates that alterations in the metabolic configurations of cells during different states of

activation, skewed metabolic enzyme activities, differences in metabolites and intermediates, and key metabolic checkpoint molecules can contribute to aberrant immune cell behavior (MA3RS Study Investigators, 2017).

Here, using bioinformatics approaches on public transcriptomic data of human and mouse samples, we explored major metabolic patterns and genes that could be involved in AAA.

Methodology:

Datasets:

In this study, different datasets were analyzed from Gene Expression Omnibus (GEO) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Human and mouse datasets were included as described below (Fig.1). The study type was described as “expression profiling by array”. All datasets include a control group vs AAA at least.

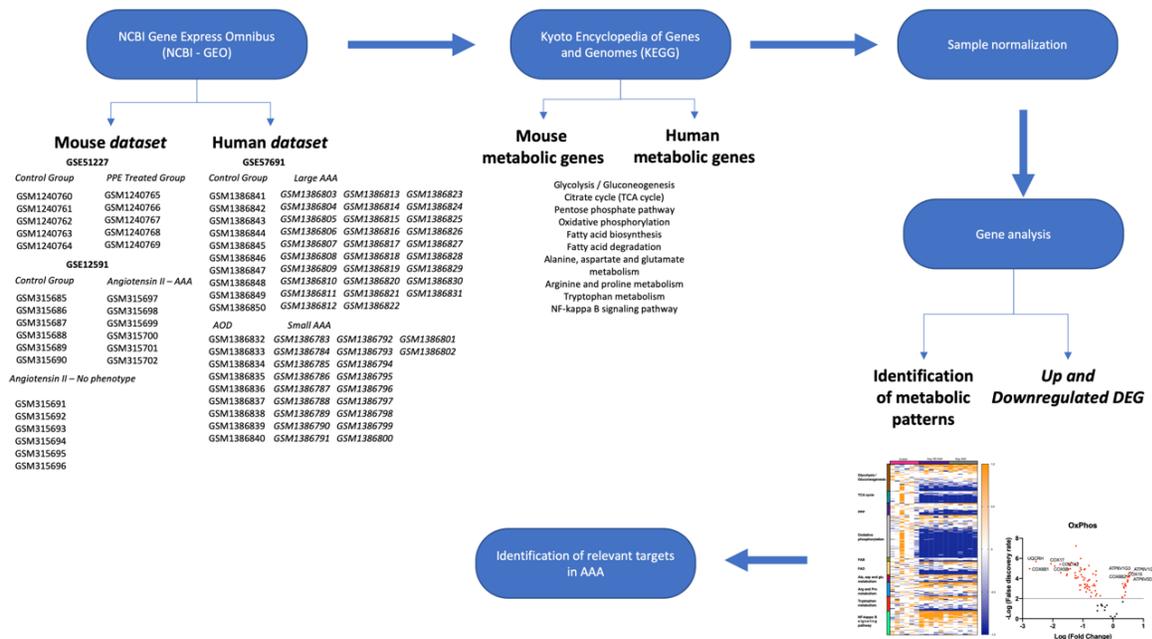


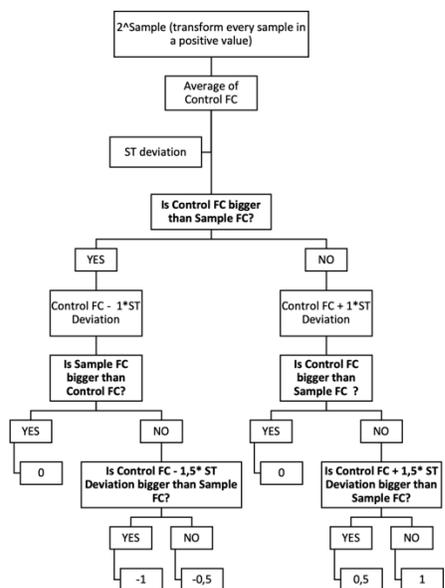
Fig.1: Methodology. We first selected the datasets on NCBI – GEO and also the metabolic genes on KEGG. After the normalization of the data, the genes were analyzed and the most relevant selected as new targets.

Selection of the metabolic genes:

All genes from 9 different metabolic pathways selected from Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) PATHWAY Database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) were analyzed. The metabolic pathways comprehended Glycolysis/Gluconeogenesis; Citrate Cycle (TCA); Pentose Phosphate Pathway; Oxidative Phosphorylation (OxPhos); Fatty Acid Biosynthesis (FAB); Fatty Acid Degradation (FAD); Alanine, Aspartate and Glutamate Metabolism; Arginine and Proline metabolism. The NF-kappa B signaling pathway was included as an inflammation parameter control. All selected genes, with the respective pathways, are described in tables I and II.

Data Normalization:

To be able to compare different studies, all the samples compared as the control group were normalized. To do so, it was used the logical_test (IF function) to attribute values between -1 and +1 as described below, maintaining the standard deviation (Fig.2).



Download "Series Matrix" from Geo-NCBI
 ↓
 Selected all metabolic genes expression
 ↓
 Selected all metabolic genes expression

| Metabolic Genes | Average CONTROL | Desv Pad | GSM315685 | GSM315686 | GSM315687 |
|-----------------|-----------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| Hk2 | 5,531989442 | 1,99437493 | 0 | -0,5 | 0,5 |
| Hk3 | 2,024121868 | 0,188795466 | 0 | 1 | 0 |

```

IF
Logical_test = TRUE
$BH3 >= 2*A03
Value_if_true = 0
IF(-$BI3+$BH3 <= 2*A03; 0; IF((-1,5*$BI3+$BH3) >= 2*A03; -1; -0,5))
Value_if_false = 0
IF($BI3+$BH3 >= 2*A03; 0; IF((1,5*$BI3+$BH3) >= 2*A03; 0,5; 1))
  
```

Fig. 2. Organogram. The data was normalized and transformed in a qualitative method.

TABLE I: HUMAN. Human metabolic genes analyzed.

| Glycolysis / Gluconeogenesis | Citrate cycle (TCA cycle) | Pentose phosphate pathway | Oxidative phosphorylation | Fatty acid biosynthesis | Fatty acid degradation | Alanine, aspartate and glutamate metabolism | Arginine and proline metabolism | Tryptophan metabolism | NF-kappa B signaling pathway | | |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------|---------|
| HK3 | CS | GPI | ND1 | COX5A | ACACA | ACAT2 | GOT1 | GATM | TDO2 | LCK | PIDD1 |
| HK1 | ACLY | G6PD | ND2 | COX5B | ACACB | ACAT1 | GOT2 | GAMT | IDO1 | ZAP70 | ERC1 |
| HK2 | ACO2 | PGLS | ND3 | COX6A1 | ACSF3 | ACAA1 | IL4I1 | CKM | IDO2 | LAT | NFKBIA |
| HKDC1 | ACO1 | H6PD | ND4 | COX6A2 | MCAT | ACAA2 | DDO | CKMT1A | AFMID | PLCG1 | NFKB1 |
| GCK | IDH1 | PGD | ND4L | COX6B1 | FASN | HADHB | ASRGL1 | CKMT2 | KMO | PRKCQ | RELA |
| GPI | IDH2 | RPE | ND5 | COX6B2 | OXSM | HADH | ASNS | CKB | KYNU | IGH | CFLAR |
| PFKM | IDH3B | RPEL1 | ND6 | COX6C | CBR4 | HADHA | NIT2 | CKMT1B | HAAO | SYK | XIAP |
| PFKP | IDH3G | TKT | NDUFS1 | COX7A1 | HSD17B8 | EHHADH | GPT2 | AZIN2 | ACMSD | LYN | BCL2L1 |
| PFKL | IDH3A | TKTL2 | NDUFS2 | COX7A2 | HTD2 | ECHS1 | GPT | AGMAT | ALDH8A1 | BLNK | BCL2 |
| FBP1 | OGDHL | TKTL1 | NDUFS3 | COX7A2L | MECR | ACOX3 | AGXT | ODC1 | DHTKD1 | BTK | GADD45A |
| FBP2 | OGDH | TALDO1 | NDUFS4 | COX7B | OLAH | ACOX1 | AGXT2 | SRM | DLST | PLCG2 | GADD45B |
| ALDOC | DLST | RPIA | NDUFS5 | COX7B2 | ACSL6 | ACADS | ASS1 | SMS | DLD | PRKCB | GADD45G |
| ALDOA | DLD | DERA | NDUFS6 | COX7C | ACSL4 | ACADM | ASL | AMD1 | GCDH | CARD10 | TRAF1 |
| ALDOB | SUCLG1 | RBKS | NDUFS7 | COX8C | ACSL1 | ACADL | ADSS1 | AOC1 | HADHA | CARD11 | BCL2A1 |
| TP11 | SUCLG2 | PGM1 | NDUFS8 | COX8A | ACSL5 | ACADSB | ADSS2 | SMOX | EHHADH | CARD14 | NFKB2 |
| GAPDH | SUCLA2 | PGM2 | NDUFV1 | COX11 | ACSL3 | ACADVL | ADSL | ALDH2 | ECHS1 | BCL10 | CXCL8 |
| GAPDHS | SDHA | PRPS1L1 | NDUFV2 | COX15 | ACSBG1 | GCDH | NAT8L | ALDH3A2 | HADH | MALT1 | TNFAIP3 |
| PGK2 | SDHB | PRPS2 | NDUFV3 | COX17 | ACSBG2 | ACSL6 | RIMKLB | ALDH1B1 | ACAT2 | IL1B | PTGS2 |
| PGK1 | SDHC | PRPS1 | NDUFA1 | ATP5F1A | | ACSL4 | RIMKLA | ALDH7A1 | ACAT1 | IL1R1 | CCL4 |
| PGAM1 | SDHD | RGN | NDUFA2 | ATP5F1B | | ACSL1 | FOLH1 | ALDH9A1 | KYAT3 | MYD88 | CCL4L2 |
| PGAM2 | FH | IDNK | NDUFA3 | ATP5F1C | | ACSL5 | ASPA | CNDP1 | KYAT1 | IRAK1 | CCL4L1 |
| PGAM4 | MDH1 | GLYCK | NDUFA4 | ATP5F1D | | ACSL3 | GAD1 | CNDP2 | AADAT | IRAK4 | CXCL1 |
| ENO3 | MDH2 | ALDOC | NDUFA4L2 | ATP5F1E | | ACSBG1 | GAD2 | CARNS1 | TPH2 | TRAF6 | CXCL2 |
| ENO2 | PC | ALDOA | NDUFA5 | ATP5PO | | ACSBG2 | ABAT | SAT2 | TPH1 | TNF | CXCL3 |
| ENO1 | PCK1 | ALDOB | NDUFA6 | ATP6 | | CPT1A | ALDH5A1 | SAT1 | DDC | TNFRSF1A | VCAM1 |
| ENO4 | PCK2 | FBP1 | NDUFA7 | ATP5PB | | CPT1B | GLUD2 | MAOB | MAOB | RIPK1 | PLAU |
| PKM | PDHA2 | FBP2 | NDUFA8 | ATP5MC1 | | CPT1C | GLUD1 | MAOA | MAOA | TRADD | CSNK2A1 |
| PKLR | PDHA1 | PFKM | NDUFA9 | ATP5MC2 | | CPT2 | ALDH4A1 | NOS1 | ALDH2 | TRAF2 | CSNK2A2 |
| PDHA2 | PDHB | PFKP | NDUFA10 | ATP5MC3 | | ECI1 | GLUL | NOS2 | ALDH3A2 | TRAF5 | CSNK2A3 |
| PDHA1 | DLAT | PFKL | NDUFAB1 | ATP5PD | | ECI2 | CAD | NOS3 | ALDH1B1 | BIRC2 | CSNK2B |

| | | | | | | | | |
|---------|-------------------|----------|---------|-------|----------|---------|-----------|--------|
| PDHB | NDUFA11 | ATP5ME | CYP4A11 | GLS2 | ARG2 | ALDH7A1 | BIRC3 | RELB |
| DLAT | NDUFA12 | ATP5MF | CYP4A22 | GLS | ARG1 | ALDH9A1 | EDA | CCL13 |
| DLD | NDUFA13 | ATP5MG | ADH1A | CPS1 | OAT | AOX1 | EDAR | CCL19 |
| LDHAL6A | NDUFB1 | ATP5PF | ADH1B | GFPT2 | PYCR3 | ASMT | EDARADD | CCL21 |
| LDHAL6B | NDUFB2 | ATP8 | ADH1C | GFPT1 | PYCR2 | AANAT | CYLD | CXCL12 |
| LDHA | NDUFB3 | ATP6V1A | ADH7 | PPAT | PYCR1 | CYP1A1 | EDA2R | ICAM1 |
| LDHB | NDUFB4 | ATP6V1B1 | ADH4 | | PRODH | CYP1A2 | DDX58 | |
| LDHC | NDUFB5 | ATP6V1B2 | ADH5 | | proline | CYP1B1 | TRIM25 | |
| ADH1A | NDUFB6 | ATP6V1C2 | ADH6 | | ALDH4A1 | INMT | LBP | |
| ADH1B | NDUFB7 | ATP6V1C1 | ALDH2 | | ALDH18A1 | IL4I1 | CD14 | |
| ADH1C | NDUFB8 | ATP6V1D | ALDH3A2 | | LAP3 | AOC1 | TLR4 | |
| ADH7 | NDUFB9 | ATP6V1E2 | ALDH1B1 | | P4HA2 | CAT | LY96 | |
| ADH4 | NDUFB10 | ATP6V1E1 | ALDH7A1 | | P4HA3 | | TIRAP | |
| ADH5 | NDUFB11 | ATP6V1F | ALDH9A1 | | P4HA1 | | TICAM2 | |
| ADH6 | NDUFC1 | ATP6V1G1 | | | PRODH2 | | TICAM1 | |
| AKR1A1 | NDUFC2 | ATP6V1G3 | | | GOT1 | | CD40LG | |
| ALDH2 | NDUFC2-K CTD14 | ATP6V1G2 | | | GOT2 | | CD40 | |
| ALDH3A2 | SDHA | ATP6V1H | | | HOGA1 | | TRAF3 | |
| ALDH1B1 | SDHB | TCIRG1 | | | DAO | | TNFSF11 | |
| ALDH7A1 | SDHC | ATP6V0A2 | | | L3HYPDH | | TNFRSF11A | |
| ALDH9A1 | SDHD | ATP6V0A4 | | | | | LTA | |
| ALDH3B1 | UQCRC1 | ATP6V0A1 | | | | | LTB | |
| ALDH3B2 | CYTB | ATP6V0C | | | | | TNFSF14 | |
| ALDH1A3 | CYC1 | ATP6V0B | | | | | LTBR | |
| ALDH3A1 | UQCRC1 | ATP6V0D1 | | | | | MAP3K14 | |
| ACSS1 | UQCRC2 | ATP6V0D2 | | | | | MAP3K7 | |
| ACSS2 | UQCRH | ATP6V0E1 | | | | | TAB1 | |
| GALM | UQCRHL | ATP6V0E2 | | | | | TAB2 | |
| PGM1 | UQCRB | ATP6AP1 | | | | | TAB3 | |
| PGM2 | UQCRQ | ATP4A | | | | | TNFSF13B | |
| G6PC | UQCR10 | ATP4B | | | | | TNFRSF13C | |
| G6PC2 | UQCR11 | ATP12A | | | | | IKBK | |
| G6PC3 | COX10 | PPA2 | | | | | CHUK | |
| ADPGK | COX3 | PPA1 | | | | | IKKB | |
| BPGM | COX1 | LHPP | | | | | PARP1 | |

| | | | | |
|--------|--|--------|--|-------|
| MINPP1 | | COX2 | | PIAS4 |
| PCK1 | | COX4I2 | | UBE2I |
| PCK2 | | COX4I1 | | ATM |

TABLE II: MOUSE. Mouse metabolic genes analyzed.

| Glycolysis / Gluconeogenesis | Citrate cycle (TCA cycle) | Pentose phosphate pathway | Oxidative phosphorylation | Fatty acid biosynthesis | Fatty acid degradation | Alanine, aspartate and glutamate metabolism | Arginine and proline metabolism | Tryptophan metabolism | NF-kappa B signaling pathway | | |
|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|----------|---------|
| Hk2 | Cs | Gpi1 | ND1 | Cox4i2 | Acaca | Acat2 | Got1 | Gatm | Tdo2 | Lck | Atm |
| Hk3 | Csl | G6pd2 | ND2 | Cox5a | Acacb | Acat1 | Got2 | Gamt | Ido1 | Zap70 | Pidd1 |
| Hk1 | Acly | G6pdx | ND3 | Cox5b | Acsf3 | Acaa1a | Il4i1 | Ckmt1 | Ido2 | Lat | Erc1 |
| Hkdc1 | Aco2 | Pgls | ND4 | Cox6a1 | Mcat | Acaa1b | Lao1 | Ckb | Afmid | Plcg1 | Nfkbia |
| Gck | Aco1 | H6pd | ND4L | Cox6a2 | Fasn | Acaa2 | Il4i1b | Ckm | Kmo | Prkcq | Nfk1 |
| Gpi1 | ldh1 | Pgd | ND5 | Cox6b1 | Oxsm | Hadhb | 4930438A08Rik | Ckmt2 | Kynu | Syk | Rela |
| Pfkl | ldh2 | Rpe | ND6 | Cox6b2 | Cbr4 | Hadh | Ddo | Azin2 | Hao | Lyn | Cflar |
| Pfkm | ldh3g | Tkt | Ndufs1 | Cox6c | H2-Ke6 | Hadha | Asrgl1 | Agmat | Acmsd | Gm11787 | Xiap |
| Pfcp | ldh3a | Tkt1 | Ndufs2 | Cox7a2 | Htd2 | Ehhadh | Asns | Odc1 | Aldh8a1 | Blnc | Bcl2l1 |
| Fbp1 | ldh3b | Tkt2 | Ndufs3 | Cox7a1 | Mecr | Echs1 | Nit2 | Ldc1 | Dhtkd1 | Btk | Bcl2 |
| Fbp2 | 4933405O20Rik | Taldo1 | Ndufs4 | Cox7a2l | Olah | Acox3 | Gpt2 | Srm | Dlst | Plcg2 | Gadd45a |
| Aldoa | Ogdh | Rpia | Ndufs5 | Cox7b | Acs1 | Acox1 | Gpt | Sms | Dld | Prkcb | Gadd45b |
| Aldob | Ogdhl | Dera | Ndufs6 | Cox7b2 | Acs14 | Acads | Agxt | Amd1 | Gcdh | Card10 | Gadd45g |
| Aldoc | Dlst | Rbks | Ndufs7 | Cox7c | Acs16 | Acadm | Agxt2 | Amd2 | Hadha | Card11 | Traf1 |
| Aldoart1 | Dld | Pgm1 | Ndufs8 | Cox8a | Acs13 | Acadl | Ass1 | Doxl2 | Ehhadh | Card14 | Bcl2a1d |
| Tpi1 | Suc1g1 | Pgm2 | Ndufv1 | Cox8b | Acs15 | Acadsl | Asl | Svs1 | Echs1 | Bcl10 | Bcl2a1a |
| Gapdh | Suc1g2 | Prps1 | Ndufv2 | Cox8c | Acsbg2 | Acadvl | Adssl1 | Doxl1 | Hadh | Malt1 | Bcl2a1b |
| Gapdhs | Suc1a2 | Prps2 | Ndufv3 | Cox11 | Acsbg1 | Gcdh | Adss | Aoc1 | Acat2 | Il1b | Bcl2a1c |
| Pgk1 | Sdha | Prps13 | Ndufa1 | Cox15 | Acsbg3 | Acs1 | Adsl | Smox | Acat1 | Il1r1 | Nfk2 |
| Pgk2 | Sdha | Prps11 | Ndufa2 | Cox17 | | Acs14 | Nat8l | Aldh2 | Kyat3 | Myd88 | Tnfaip3 |
| Pgam1 | Sdhc | Rgn | Ndufa3 | Atp5a1 | | Acs16 | Rimklb | Aldh3a2 | Kyat1 | Irak1 | Ptgs2 |
| Pgam2 | Sdhd | Idnk | Ndufa4 | Atp5b | | Acs13 | Rimkla | Aldh1b1 | Aadat | Irak4 | Ccl4 |
| Eno1 | Fh1 | Glyctk | Ndufa4l2 | Atp5c1 | | Acs15 | Folh1 | Aldh7a1 | Tph1 | Traf6 | Cxcl1 |
| Eno2 | Mdh1 | Aldoa | Ndufa5 | Atp5d | | Acsbg2 | Aspa | Aldh9a1 | Tph2 | Tnf | Cxcl2 |
| Eno3 | Mdh2 | Aldob | Ndufa6 | Atp5e | | Acsbg1 | Gad1 | Cndp1 | Ddc | Tnfrsf1a | Cxcl3 |
| Eno1b | Pcx | Aldoc | Ndufa7 | Atp5o | | Acsbg3 | Gad2 | Cndp2 | Maoa | Ripk1 | Vcam1 |
| Eno4 | Pck1 | Aldoart1 | Ndufa8 | ATP6 | | Cpt1a | Abat | Carns1 | Maob | Tradd | Plau |
| Pkm | Pck2 | Fbp1 | Ndufa9 | Atp5pb | | Cpt1b | Aldh5a1 | Sat1 | Aldh2 | Traf2 | Csnk2a1 |
| Pklr | Pdha1 | Fbp2 | Ndufa10 | Atp5g1 | | Cpt1c | Glud1 | Sat2 | Aldh3a2 | Traf5 | Csnk2a2 |

| | | | | | | | | | | |
|---------|-------|------|---------|----------|----------|---------|----------|---------------|-----------|---------|
| Pdha1 | Pdha2 | Pfkl | Ndufab1 | Atp5g2 | Cpt2 | Aldh4a1 | Maoa | Aldh1b1 | Birc2 | Csnk2b |
| Pdha2 | Pdhb | Pfkm | Ndufa11 | Atp5g3 | Eci1 | Glul | Maob | Aldh7a1 | Birc3 | Relb |
| Pdhb | Dlat | Pfkp | Ndufa12 | Atp5h | Eci2 | Cad | Nos1 | Aldh9a1 | Eda | Ccl19 |
| Dlat | | | Ndufa13 | Atp5k | Eci3 | Gls2 | Nos2 | Aox2 | Edar | Gm2023 |
| Dld | | | Ndufb2 | Atp5j2 | Cyp4a12b | Gls | Nos3 | Aox1 | Edaradd | Gm2457 |
| Ldha | | | Ndufb3 | Atp5l | Cyp4a10 | Cps1 | Arg1 | Aox4 | Cyld | Ccl21d |
| Ldhb | | | Ndufb4 | Atp5j | Cyp4a14 | Gfpt1 | Arg2 | Aox3 | Eda2r | Gm13304 |
| Ldhc | | | Ndufb4b | ATP8 | Cyp4a30b | Gfpt2 | Oat | Asmt | Ddx58 | Gm10591 |
| Ldhal6b | | | Ndufb4c | Atp6v1a | Cyp4a29 | Ppat | Pycr1 | Aanat | Trim25 | Ccl21b |
| Adh1 | | | Ndufb5 | Atp6v1b2 | Cyp4a31 | | Pycr2 | Cyp1a1 | Lbp | CCL21 |
| Adh7 | | | Ndufb6 | Atp6v1b1 | Cyp4a32 | | Pycr1 | Cyp1a2 | Cd14 | Ccl21c |
| Adh4 | | | Ndufb7 | Atp6v1c1 | Cyp4a12a | | Prodh | Cyp1b1 | Tlr4 | Gm1987 |
| Adh5 | | | Ndufb8 | Atp6v1c2 | Adh1 | | Aldh4a1 | Inmt | Ly96 | Ccl21a |
| Akr1a1 | | | Ndufb9 | Atp6v1d | Adh7 | | Aldh18a1 | Il4i1 | Tirap | Cxcl12 |
| Aldh2 | | | Ndufb10 | Atp6v1e1 | Adh4 | | Lap3 | Lao1 | Ticam2 | Icam1 |
| Aldh3a2 | | | Ndufb11 | Atp6v1e2 | Adh5 | | P4ha2 | Il4i1b | Ticam1 | |
| Aldh1b1 | | | Ndufc1 | Atp6v1f | Aldh2 | | P4ha1 | 4930438A08Rik | Cd40lg | |
| Aldh7a1 | | | Ndufc2 | Atp6v1g2 | Aldh3a2 | | P4ha3 | Doxl2 | Cd40 | |
| Aldh9a1 | | | Sdha | Atp6v1g1 | Aldh1b1 | | Prodh2 | Svs1 | Traf3 | |
| Aldh3a1 | | | Sdhb | Atp6v1g3 | Aldh7a1 | | Got1 | Doxl1 | Tnfsf11 | |
| Aldh1a3 | | | Sdhc | Atp6v1h | Aldh9a1 | | Got2 | Aoc1 | Tnfrsf11a | |
| Aldh3b1 | | | Sdhd | Atp6v0a1 | | | Hoga1 | Cat | Lta | |
| Aldh3b2 | | | Uqcrcf1 | Atp6v0a2 | | | Dao | | Ltb | |
| Aldh3b3 | | | CYTB | Tcirg1 | | | L3hypdh | | Tnfsf14 | |
| Accs1 | | | Cyc1 | Atp6v0a4 | | | | | Ltbr | |
| Accs2 | | | Uqcrc1 | Atp6v0c | | | | | Map3k14 | |
| Galm | | | Uqcrc2 | Atp6v0b | | | | | Map3k7 | |
| Pgm1 | | | Uqcrc3 | Atp6v0d1 | | | | | Tab1 | |
| Pgm2 | | | Uqcrc4 | Atp6v0d2 | | | | | Tab2 | |
| G6pc | | | Uqcrc5 | Atp6v0e | | | | | Tab3 | |
| G6pc2 | | | Uqcrc10 | Atp6v0e2 | | | | | Tnfsf13b | |
| G6pc3 | | | Uqcrc11 | Atp6ap1 | | | | | Tnfrsf13c | |
| Adpgk | | | Cox10 | Atp4a | | | | | lkbkg | |
| Bpgm | | | COX3 | Atp4b | | | | | Chuk | |
| Minpp1 | | | COX1 | Atp12a | | | | | lkbkb | |
| Pck1 | | | COX2 | Ppa1 | | | | | Parp1 | |

Principal Component Analysis:

The Qlucore Omics Explorer was used to generate a PCA plot of GSE57691 dataset. The groups were defined as Control, AOD (aortic obstructive disease), Large AAA and Small AAA.

Heatmap and color quantification:

All the normalized samples were plotted in heatmaps through GraphPad Prism 8.0; the genes were displayed in the pathway groups and organized from the highest expressed (orange) to the lower expressed (blue). Besides that, the Image Color Summarizer (<http://mkweb.bcgsc.ca/color-summarizer/>) was used to quantify the percentage of each color/pathway. The parameters were set as “color clusters”, 5 clusters and “vhigh (200 px)”. The results are shown as score vs percentage (all scores) or in bars to analyze only the +1/-1 score.

Volcano Plots:

A volcano plot was generated by using the -Log of false discovery rate vs Log of fold change (no normalized data) using the GraphPad Prism 8.0 for the genes on OxPhos and TCA pathway. At the same time, a Venn diagram (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) was used to compare the Small AAA vs Large AAA group. The selected genes are shown as individual gene expression (Log FC).

Transcription Factor enrichment:

The WebGestalt (WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit) was used to predict possible transcription factors involved in AAA regulation. For this, the parameters: Homo sapiens to Organism, GSEA were set as method and network/Transcription Factor for functional Database. The gene list was used to comprehend all genes with adjusted p value > 2 (<http://www.webgestalt.org>).

Results:

The AAA generates distinct metabolic patterns.

Previously, the selected 555 genes (488 different genes) (table I) were divided in 10 pathways; then the raw expression dataset of AAA patients was downloaded from GEO database and, after normalizing all samples (described in methods), it was possible to visualize the metabolic patterns in the heatmap (Fig3.A). Interestingly, a group of samples clearly differed from the others since they have a unique pattern; more than that, it was not clear the inflammation in these specific samples. Next, in order to observe trends, we analyzed the samples using a PCA plot and it was possible to confirm that 3 samples of Small AAA and 9 samples from Large AAA were skewed compared to other samples (Fig3. B) and lacking the inflammatory component of AAA (NF-kB pathway). For the following analyses, those samples were excluded.

As a semi-quantitative method, the percentage of each color/pathway was measured. The representative graphs are shown in Figure 4A and B. It was possible to see a difference in the intensity of regulated genes between small AAA and large AAA in all pathways analyzed. This result is shown as the percentage of each color by field (Fig 4). It is possible to notice a difference between the gene modulation during AAA vs AOD but interestingly it was evidenced that the small AAA shows a less intense modulation of the gene expression than large AAA (Fig 4A, B).

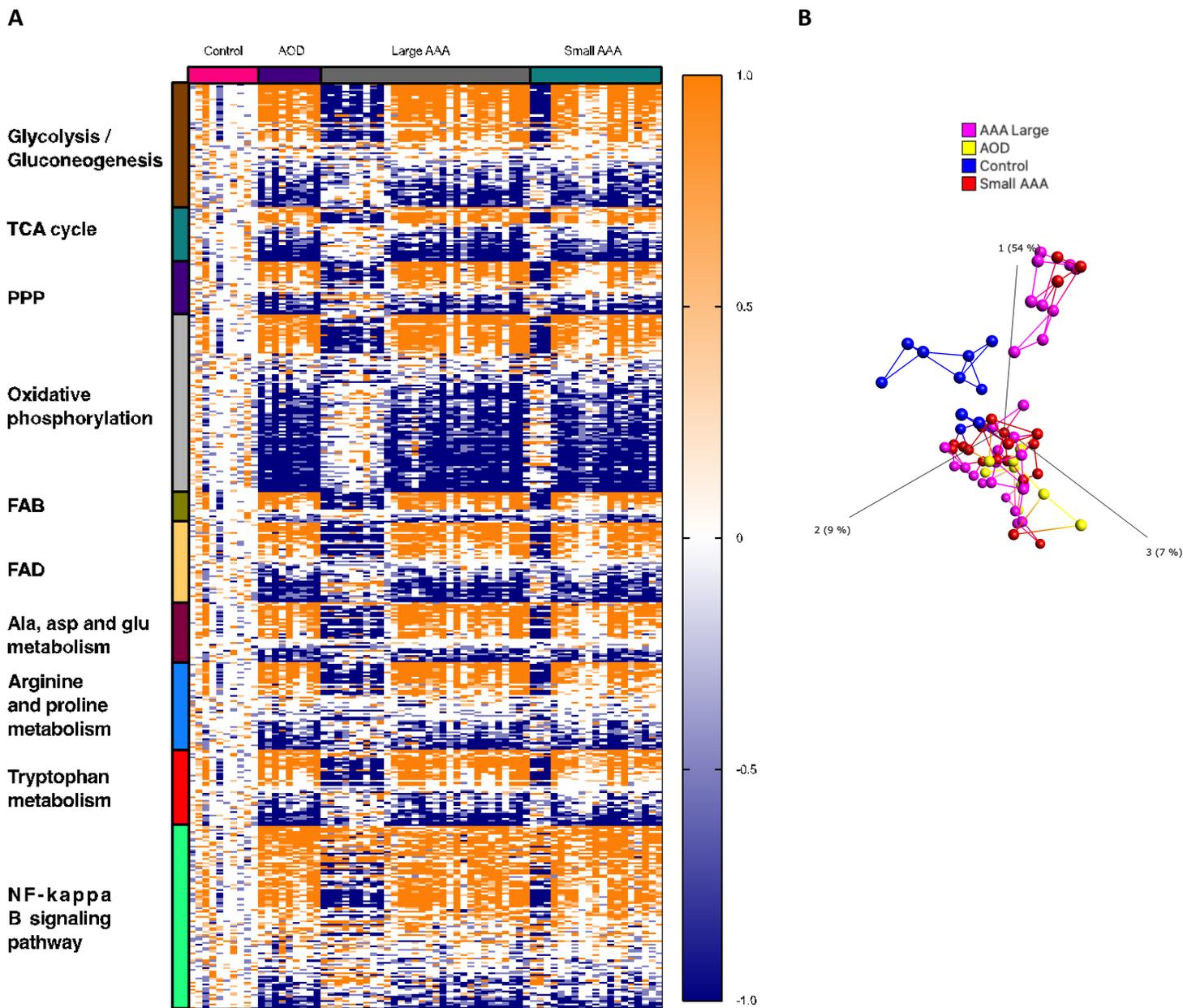


Figure 3: Heatmap of metabolic genes. (A) The heatmap represents the expression of all 555 genes divided into 10 pathways delimited in the left side of the graph. The group of samples were divided as control (no AAA), AOD (aortic obstructive disease), Large AAA and Small AAA. (B) All samples were analyzed using the PCA method.

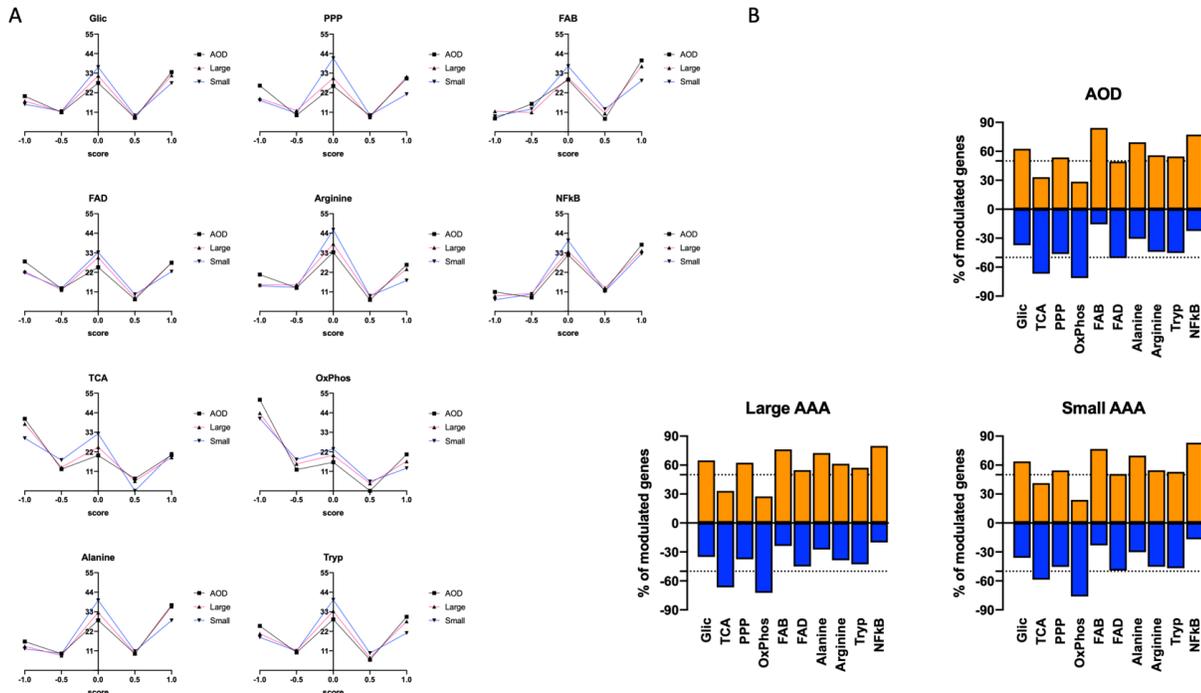


Figure 4: Metabolic Pathways in AAA. Using the previous heatmap, the percentage of each color in the specific clusters was measured, as shown (A). The percentage of modulated genes in each cluster was calculated considering only the up or down regulated genes (The positive number consist in +1 cluster genes; negative numbers consist in -1 cluster genes), a line in the graph shows $y=50\%/ -50\%$ (B).

The TCA and OxPhos pathways in AAA are downregulated

Since TCA and OxPhos were the most modulated between the analyzed pathways, both were chosen for the following analyzes. First, to select the DEG (differentially expressed genes) we generated a volcano plot with all genes from TCA and OxPhos to small and Large AAA groups (Fig 5A and C, 6A and C). In both cases, the top 5 genes upregulated and downregulated are evidenced (Fig 4C, 5A and C). A representation of the TCA was generated for small AAA and large AAA (Fig. 5B and 6C) where we could evidence the up or downregulated genes. As shown, the only gene that was modulated in large AAA but not in small AAA was DLAT (Fig. 4D). Lastly, we estimated the percentage of genes up or downregulated in each mitochondrial complex (OxPhos). Interestingly, the complex II and complex III

were the most affected by AAA (Fig. 5D and 6E). These findings suggest an accumulation of succinate/succinyl-CoA during the AAA pathogenesis

We compared the modulated Oxphos genes between Large and Small AAA (Fig 7A). Among the 83 analyzed genes, 7 genes were modulated only in the large AAA. All genes modulated during the small AAA are modulated during the large AAA, showing the progression of the disease. We used the gene expression data to confirm the previous results (Fig 7B, C). Interestingly, COX7B2 and NDUFA5 were only upregulated during large AAA but not in AOD or small AAA (Fig 7B) and COX10, ATP6V1A and NDUFC1 were downregulated in the same way (Fig 7C).

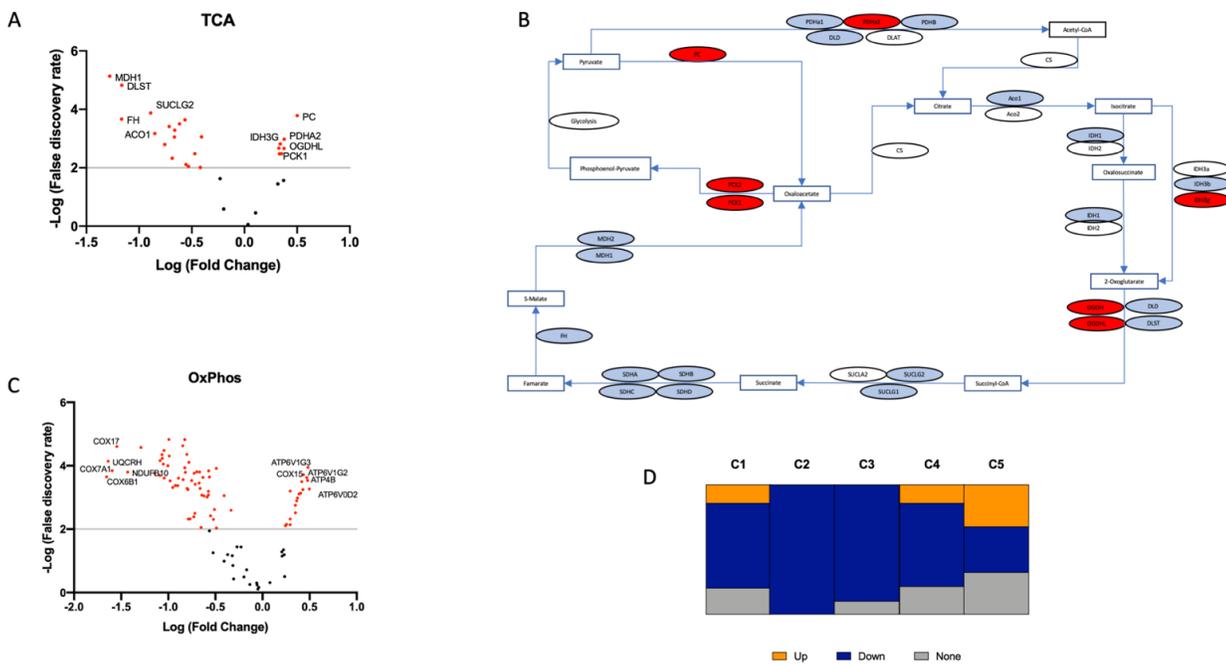


Figure 5: Mostly differentiated pathways for Small AAA. The Log (FC) and $-\text{Log}_{10}$ (FDR) was calculated to create the volcano plot (A,C); Using the adjusted p value, the TCA pathway obtained from Kegg was colored (B); The percentage of genes up, down or non-regulated was calculated and expressed as a pizza graph (D). C1: Complex 1; C2: Complex 2; C3: Complex 3; C4: Complex 4; C5: ATP synthase.

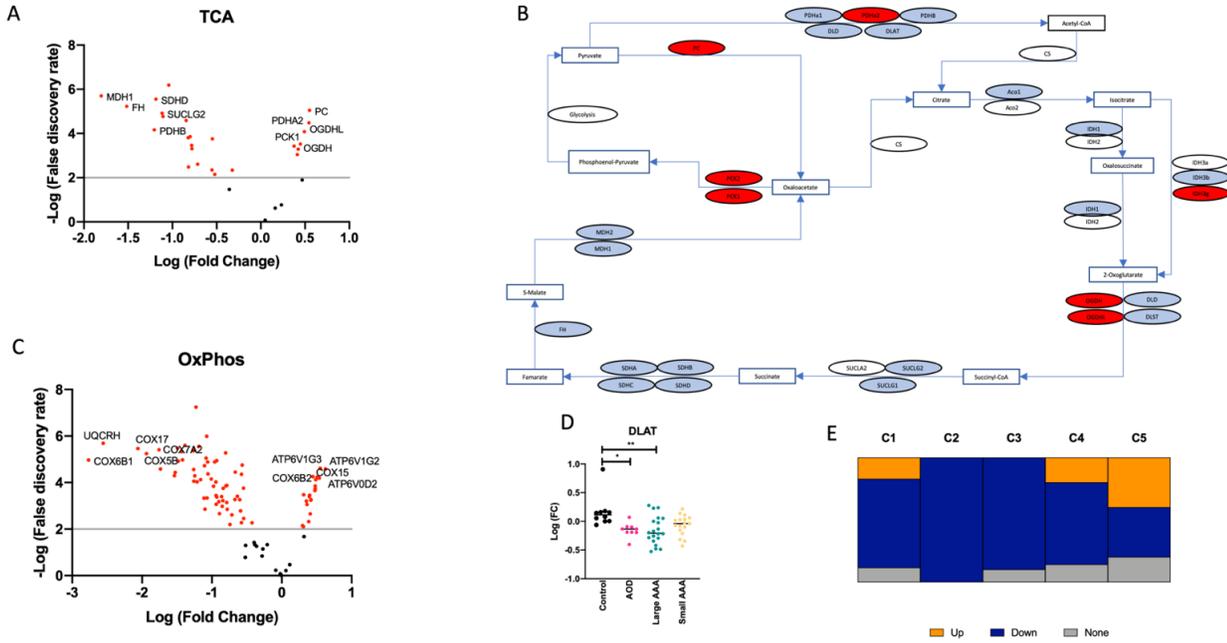


Figure 6: Mostly differentiated pathways for Large AAA. The Log (FC) and $-\text{Log}_{10}$ (FDR) was calculated to create the volcano plot (A,C); Using the adjusted p value it was colored the TCA pathway obtained from Kegg (B); Gene expression of DLAT (D); The percentage of genes up, down or non-regulated was calculated and expressed as a pizza graph (E). C1: Complex 1; C2: Complex 2; C3: Complex 3; C4: Complex 4; C5: ATP synthase.

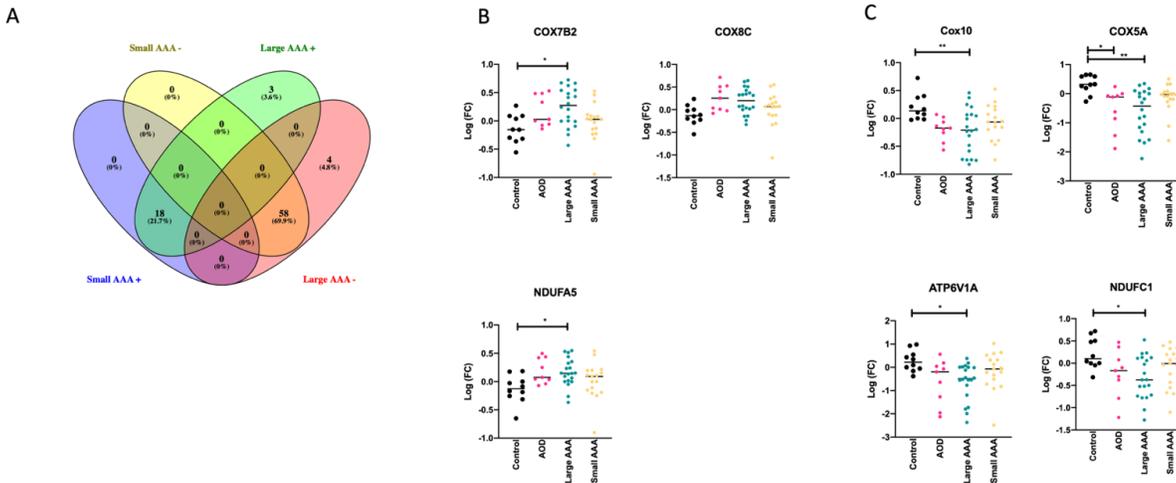


Figure 7: Comparison between Large and Small AAA OxPhos genes. A Venn diagram was used to compare the similarities and differences between Large and Small AAA in OxPhos genes(A). (B) Up and (C) downregulated genes selected from the Venn diagram.

Different animal models of AAA present similar metabolic gene profiles

The mouse model of AAA can be generated by PPE (porcine pancreatic elastase) or Angiotensin II infusion. We used the database of these two models (GSE51227 and GSE12591, respectively) to compare the gene modulation during AAA (Fig 8). Surprisingly, in both cases, mostly OxPhos and TCA genes were downregulated, similarly with the human AAA shown before (Fig 8B, C). Although both models have a very similar metabolic pattern, the AAA generated using the PPE seems to be more inflamed, compared with the Angiotensin II model.

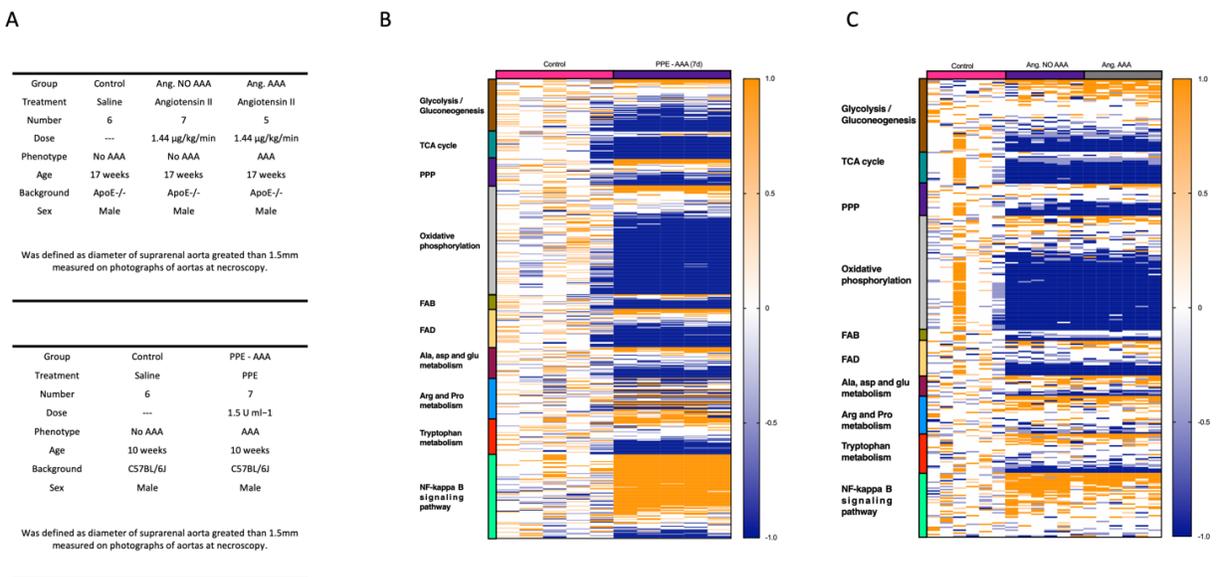


Figure 8: Comparison between different animal models of AAA. (A) Description of the groups analyzed in both datasets (GSE51227 and GSE12591). (B, C) The heatmap represents the expression of all genes (Table II) divided between 10 pathways delimited in the left side of the graph. The group of samples were divided as control (no AAA) or PPE AAA(7d) and control (no AAA), Ang NO AAA (no AAA) and Ang AAA.

Next, it was matched at the same position as the genes from the mouse models and excluded the genes that were found only in one of each database. After the normalization, we generated a heatmap to compare the modulation of the metabolic genes on AAA of Angiotensin II and PPE model (Fig 9A). As we suspected before, both are very similar although it was evidenced that glycolysis/gluconeogenesis and

inflammation are not. When comparing the AAA generated from mouse and human, after the same process of normalization, the PPE model looks a better choice to study AAA. Otherwise, the TCA and OxPhos genes were equally downregulated in all cases (Fig 9B). We validated the 5 genes that were only modulated in large AAA using both mouse models, but Cox7B2 and NDUFA5 were only upregulated in human AAA (Fig 9C). Otherwise, NDUFC1 and COX10 were downregulated in all AAA samples, ATP6V1A were not included in the Angiotensin II database but were moderated downregulated in PPE model.

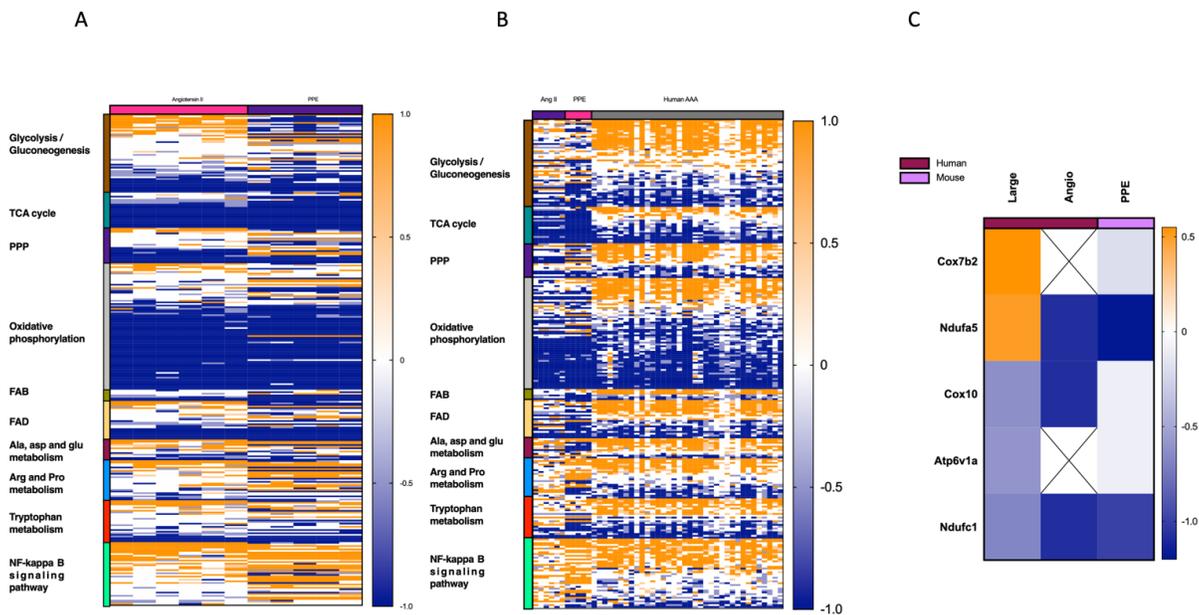


Figure 9: Similarities between different AAA models. The metabolic patterns between PPE or Angio II model of AAA in the animal model were compared with human samples (A,B). Exclusive large human AAA modulated genes were compared with the mouse model of AAA (C).

The transcription factors ESRRA and TCF3 may be involved in AAA.

Lastly, we analyzed the possible transcription factors that could be involved in AAA. Using the FDR, we could select two transcription factors, ESRRA (estrogen related receptor alpha) for the downregulated genes; and TCF3 (Transcription factor 3) for the upregulated genes, both with FDR < 0,05

(Fig 10A). The ESRRA is known to directly regulate MAOA and MAOB genes, both downregulated, as OxPhos and TCA (Fig 10B). On the other hand, TCF3 should suppress MYC and tightly regulate ESSRA activity. Although these genes are not modulated, we speculated that a mechanism could be involved (Fig 10B). Interestingly, PROX1 gene, a well known suppressor of ESRRA and NCOR1 were both upregulated in human AAA. For TCF3, the accessory protein CTNNB1 is upregulated, suggesting a higher activity of the transcription factor.

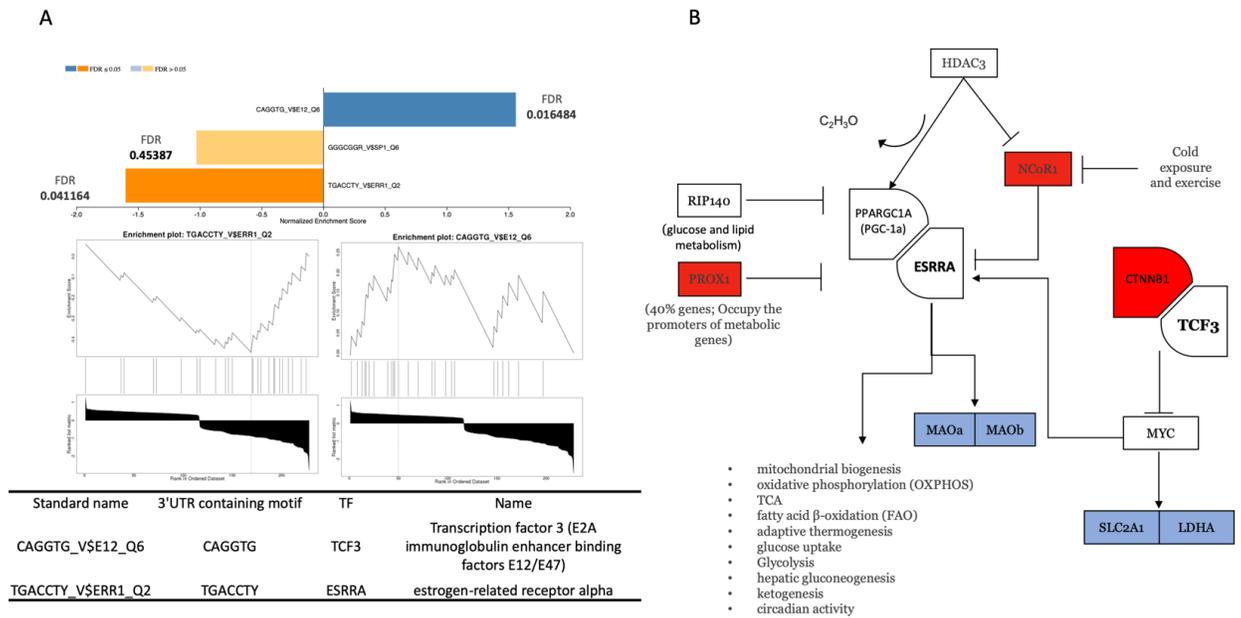


Figure 10: Transcription factor Enrichment. The human AAA data was used to analyze the transcription factors that could be modulated in AAA.

Discussion and Conclusions:

In spite of all the improvement in the past years on AAA treatment, we still have a high mortality (Bartek et al, 2019). Saying that, using bioinformatic approaches for the discovery of new relevant genes on AAA have been shown to be a great tool, helping to elucidate AAA pathogenesis or developing novel diagnose and therapeutic targets. On the other side, inflammation and metabolism are always side by side, and the immunometabolism emerges everyday more. With that in mind, we focused on elucidating the metabolic patterns of AAA, merging several transcriptome data. As expected, the NF- κ B pathway was upregulated, indicating an inflammatory process in the human arteries, but the glycolysis and TCA were also modulated.

In accordance with the inflammatory condition, we clearly showed an upregulation of genes involved in glycolysis and a downregulation on TCA genes. The major dogma on immunometabolism is the duality of TCA and Glycolysis on inflammation. It is already well established that most of the cells undergo the Warburg effect on inflammation, that is, a preference, especially on immune cells, to metabolize glucose as a main source of energy even with oxygen available (Palsson-McDermott et al, 2013). Interestingly, the small AAA appears to be an intermediated stage. Although the patterns are the same, we showed that the intensity of the modulation is different between the small and large AAA. As demonstrated on figure 4A, we also can distinguish the large and small AAA from AOD. Using a semiquantitative analysis allowed us to compare the percentage of genes being up or downregulated, this could be used as a new approach in order to clinical diagnosis.

Analyzing the DEG (differentially expressed genes) we demonstrated a high suppression on the TCA cycle. However, DLAT was the only difference between small AAA and large AAA. The DLAT gene encodes the protein pyruvate dehydrogenase complex component E2 (PDCE2), this complex is responsible for the pyruvate decarboxylation step that links glycolysis to the citric acid cycle and might be

a link between the downregulation of TCA/OxPhos and the upregulation of Glycolysis (Goh et al, 2015). Interestingly, it was already reported an increase in lactate and pyruvate content on AAA sites (6.73 ± 0.40 cm size).

Another metabolic deficit is shown on mitochondrial biogenesis. Although all the complexes were affected by AAA, it is important to highlight that the C2 complex was completely downregulated, supporting glycolysis as a major source of energy. This process could be related with the mitochondrial fission and fusion. The mitochondrial fission and fusion play critical roles in maintaining functional mitochondria when cells experience metabolic or environmental stresses. Fusion helps mitigate stress by mixing the contents of partially damaged mitochondria as a form of complementation. Fission is needed to create new mitochondria, but it also contributes to quality control by enabling the removal of damaged mitochondria and can facilitate apoptosis during high levels of cellular stress. Some cancer cells exhibit high levels of mitochondrial fission and have associated decreases in respiratory capacity, undergoing through the Warburg effect. In summary, the OxPhos is supported by mitochondrial fusion; on the other hand, fission is known to promote the Warburg effect, not surprisingly, mitochondrial fission mediates hypertensive AAA development (Gao et al, 2017).

The OxPhos also play a critical role during the AAA. Here, we compared the evolution of AAA and found 7 exclusive genes only modulated on large AAA (upregulated: Cox7b2, Cox8c and NDUFA5; downregulated: Cox10, Cox5a, Atp6v1a, Ndufc1). The NDUFA5 are required for assembly and/or stability of the electron transferring Q module in the peripheral arm of the complex I and depletion of this gene leads to the impaired function of the complex, the upregulation of this gene could be related with a compensatory mechanism to mitochondrial dysfunction (Rak et al, 2014). The genes Cox7b2 and Cox8c are not described yet.

The nuclear gene Cox10 is required for the proper function of Cox and mutations on this gene are associated with cytochrome c oxidase deficiency. Interestingly, the Cox10 KO mouse develops several

muscle related problems such as decline in muscle force, fatigue, smaller and atrophic fibers (Diaz et al, 2015). The Cox5A is related to the complex 4 but is also related to AAA, mutation on this gene causes pulmonary arterial hypertension (Baertling et al, 2017). Another interesting gene is Atp6v1A, mutations on this gene are associated with reduced and fragmented elastic fibers and also pronounced changes in the structure and organization of the collagen fibers (Van Damme et al, 2020). All together, these genes are not only related to the energy metabolism, but clearly they have a role in the musculature and collagen structure and function.

Since most of the studies are conducted on animal models, we compared two widely used models of AAA. The PPE and Angio II have very similar patterns but with more prominent inflammation on PPE – AAA. Although they both have a very good similarity with the human AAA, none of the exclusive genes on large AAA followed the same pattern as in the mouse model. This find suggests that the mechanism underlying mouse AAA and human AAA might be distinct. At least, we used the gene expression data to identify the transcription factors involved in the AAA pathology. Although TCF3 and ESSRa do not have a direct correlation, they both are connected through MYC that is already being described in AAA pathology.

III-C: The interplay of IDO1, NASH and Atherosclerosis

Introduction:

Atherosclerosis is a complex inflammatory disease comprising multiple plaque phenotypes. The development of advanced atheromatous plaques with necrotic core represents the result of the invasion of lipid pools by macrophages (Tabas et al, 2016). The release of activated proteolytic enzymes degrades the surrounding tissue and contributes to the formation of vulnerable plaque. Thinning of the fibrous cap and necrotic core expansion are considered to be critical for the progression toward plaque rupture and acute thrombosis. The pathogenic mechanisms leading the progression of atherosclerotic lesions are various and involve endothelial cells, inflammatory cells, and platelets (Hansson and Hermansson, 2011) . Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) includes a spectrum of diseases ranging from simple fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and may progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The prevalence of this pathology is quite high in the general population and is one of the most important causes of liver-related morbidity and mortality in children. NAFLD is considered the hepatic feature of metabolic syndrome and this has stimulated interest in its possible role in the atherosclerosis development. Clinical observations indicated that NAFLD might be an independent risk factor for coronary artery disease (Roeb and Geier, 2019). Moreover, NASH may increase atherosclerotic and cardiovascular risks by local overexpression of inflammatory mediators, endothelial damage, and regulators of blood pressure but the correlation between these two diseases is still unclear; for example, macrophage infiltration into the atherosclerotic lesion is known to play a central role in the initiation of atherosclerosis. In contrast, the role of macrophages during the etiology of NASH has been merely a late consequence of steatosis (Leonardo et al, 2018). Here, we evaluated how IDO1 could modulate a mice model with NASH and atherosclerosis.

Methodology:

Animals:

10 weeks old, ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-}-IDO^{-/-}-double-knockout littermate mice (C57BL/6J background), housed in specific pathogen-free conditions with a 12 hours light/dark cycle were used for the study. Mice were fed with water and standard chow or high fat/high cholesterol NASH inducing diet ad libitum for 3.5 or 7 weeks. An early time point of 3.5 weeks was included to understand the correlation between the two diseased states by studying the kinetics of disease progression simultaneously in the liver and the arteries.

General physiological parameters:

Total body and liver weight were measured for calculating the liver weight index.

Tissue collection:

Mice were euthanized by CO₂ asphyxiation. After blood collection by cardiac puncture and perfusion with cold, RNase free PBS, excised hearts along with the aortic arch were frozen in composite OCT, while liver samples in liquid nitrogen for storage at -80°C or fixed in 10% buffered formalin for further analysis of various parameters of lipid metabolism, inflammation and atherosclerosis.

Metabolic parameters:

Blood glucose levels and insulin tolerance test were performed before sacrificing at each time point.

Liver pathophysiological parameters:

Plasma and hepatic lipid profile, liver enzyme activities (ALT, AST), inflammatory mediators & liver hydroxyproline content were analyzed with commercially available kits. The severity of hepatic histologic changes, immune cell infiltration and oxidative stress were assessed by H&E staining and IHC in paraffin embedded liver sections. Hepatic lipogenic and fatty acid oxidation gene expression were analyzed by Realtime quantitative PCR.

Atherosclerotic parameters:

Evaluation of atherosclerotic plaque development was done by measuring lesion size in Oil Red-O stained cryo-sections of the aortic root and en face staining of aortic arch by Sudan IV.

Results:

IDO1 ablation accelerates the progression of Atherosclerosis

We first analyzed the plaque formation during an early time point (3,5-weeks of diet), as shown in Fig 1, IDO1 KO mice started to develop atheroma plaques earlier than control and also have more lesions also in the 7-week time point.

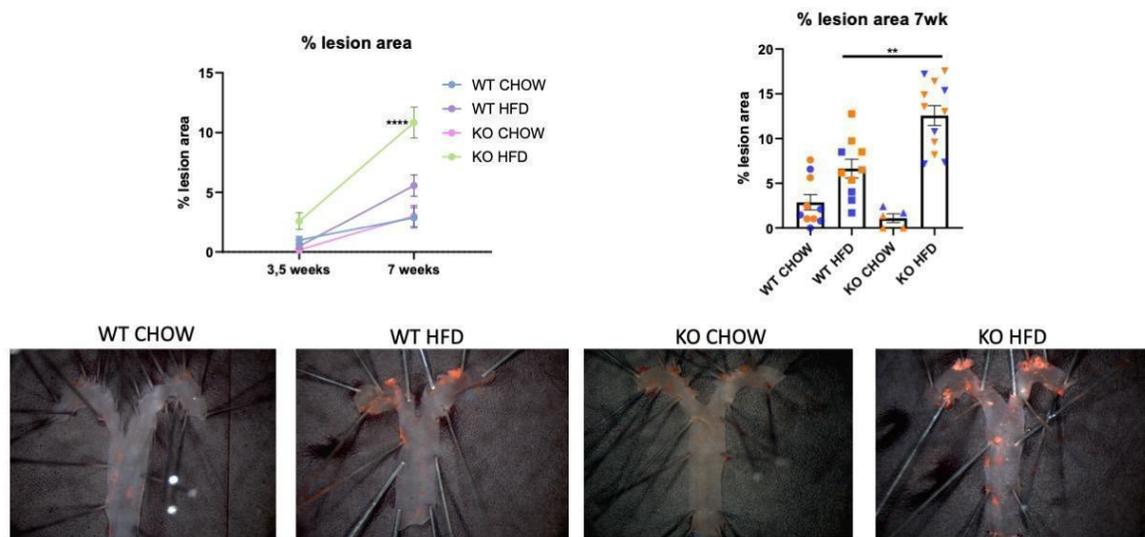


Figure 1: Atheroma plaque formation in IDO1 KO mice. The IDO1/ApoE KO mice or ApoE KO mice were fed with chow or HFD for 3,5 weeks or 7 weeks. The lesions were measured using ORO staining. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$

IDO1 ablation does not influence NAFLD/NASH

Surprisingly, the IDO1 KO mice did not show any difference with the control (ApoE KO), when compared lipid deposition, cholesterol, triglycerides, immune cells infiltration, inflammation or fibrosis (Fig 2-7). Although the IDO1 was relevant for the atherosclerosis progression, when analyzed the liver of the same mice they did not show a more aggressive NASH phenotype exemplified for the enzymes ALT/AST

and lipid deposition (Fig2-3). However, the animal model was working since it was possible to see NASH in HFD vs Chow. We also could detect a macrophage infiltration (Fig3) with mice fed with HFD with an increase of M1 and reduction of M2 markers (Fig 4), characterizing a typical NASH progression. The cytokines were also detectable, with an upregulation expression of MCP1, TNF and IL1B for mice fed with HFD (Fig5). We looked for fibrosis parameters, but 7 weeks were not enough to start the last step of NASH, although we could see a clear tendency on HFD mice (Fig6).

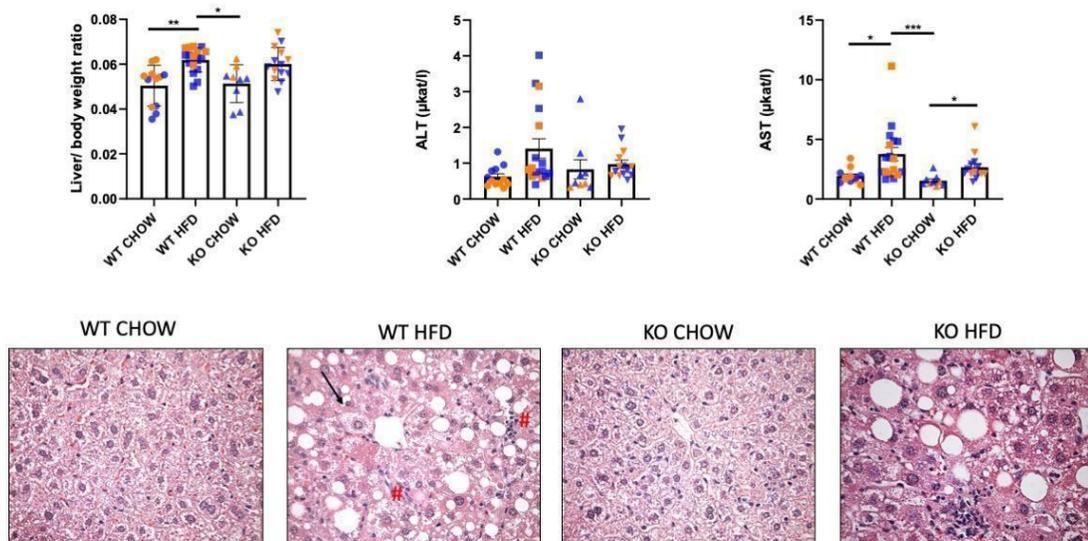


Figure 2: Lipid deposition on liver of NASH mice model. The liver weight and the hepatic enzymes (ALT and AST) were evaluated as also the Immunohistochemistry to confirm the NASH phenotype. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$

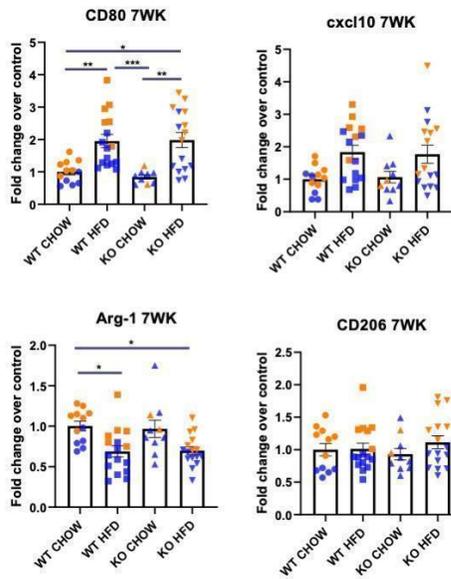


Figure 3: Gene expression of M1 and M2 markers. The gene expression of M1 markers (CD80, Cxcl10) and M2 markers (Arg1 and CD206) were evaluated on the liver of mice fed with the HFD or CHOW for 7 weeks. The IDO1 KO vs WT mice were also compared. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$

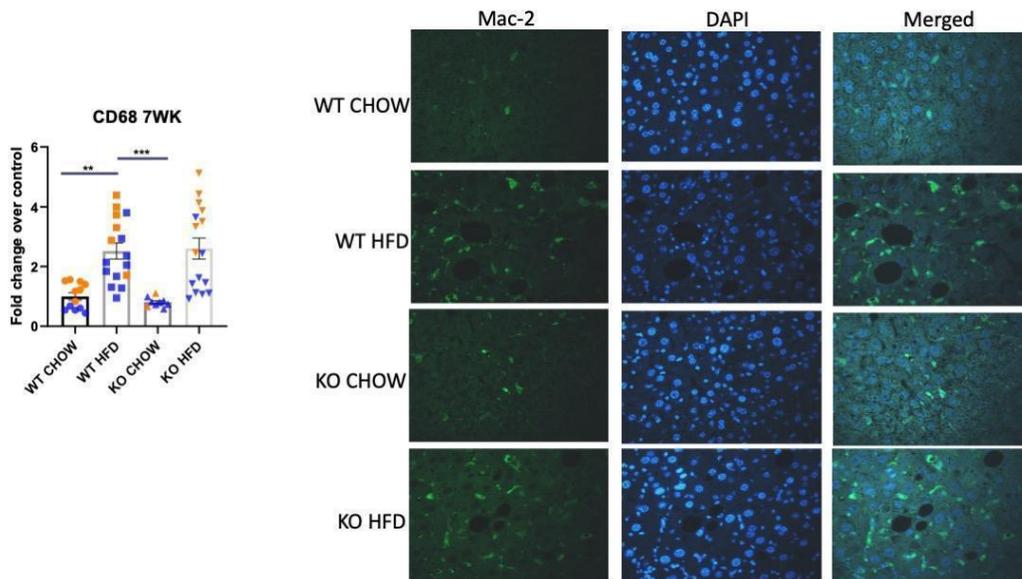


Figure 4: Macrophage infiltration in NASH liver. Using immunofluorescence, we could detect a high infiltration of macrophages in livers of HFD mice (IDO1 KO and WT) but not in the chow diet. ** p < 0,01; *** p < 0,005

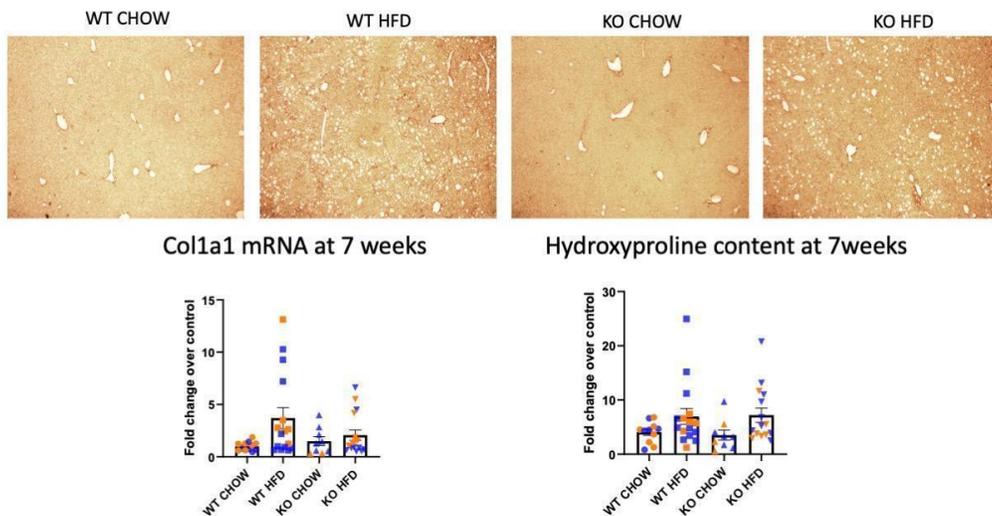


Figure 5: Fibrosis in NASH liver. Sirius red staining at 7 weeks is shown as representative figures and also the gene expression of Col1a1 and the hydroxyproline content

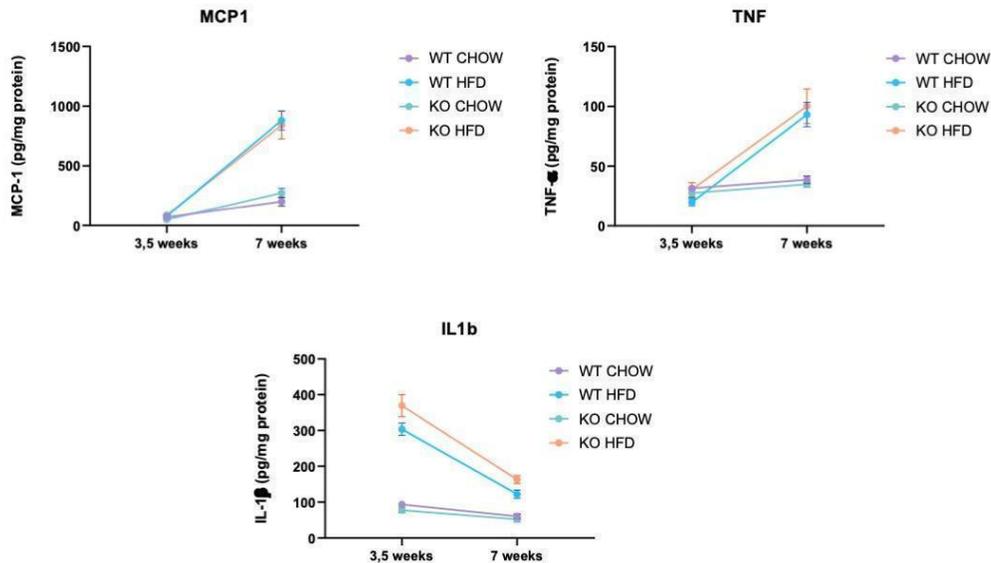


Figure 6: Pro-inflammatory cytokines. Liver concentration of the pro-inflammatory cytokines MCP1, TNF and IL1B on 3,5 and 7 weeks of HFD (IDO1 KO vs WT).

The IDO1 is inversely correlated with IL1b expression in mice liver during NASH.

The lesions were aggravated with the absence of IDO1, but no changes were seen in NASH. So, we looked for the Kynurenine/tryptophan concentrations in liver, plasma and arteries of the mice (Fig 7). As expected, lower concentrations of Kyn were detected in IDO1 KO mice for plasma and arteries but the concentrations of Kyn in the liver were not changed. From the macrophage assays (II: The interplay of IDO1 in macrophage activation) we know that IDO1 suppresses IL1B production. The next step was to generate a database from 4 different datasets of transcriptomes of livers with or without NASH. As shown in Fig 8, the IDO1 expression on the merged transcriptome was upregulated but also inversely correlated with IL1B. Interestingly, not only does IDO1 seem to suppress IL1B production, but we could also detect TDO2 as a new regulator of IL1B.

We speculated that TDO2 could compensate for IDO1 absence of IDO1 in liver. In fact, the transcription of TDO2 is suppressed in the early stages of NASH (3,5w) but is only upregulated in the HFD group (7w). We also looked for the TDO2 global expression using a single cell database and confirmed that TDO2 is majorly expressed in the liver, more specifically in hepatocytes. Because of that, it couldn't compensate for the lack of IDO1 on arteries.

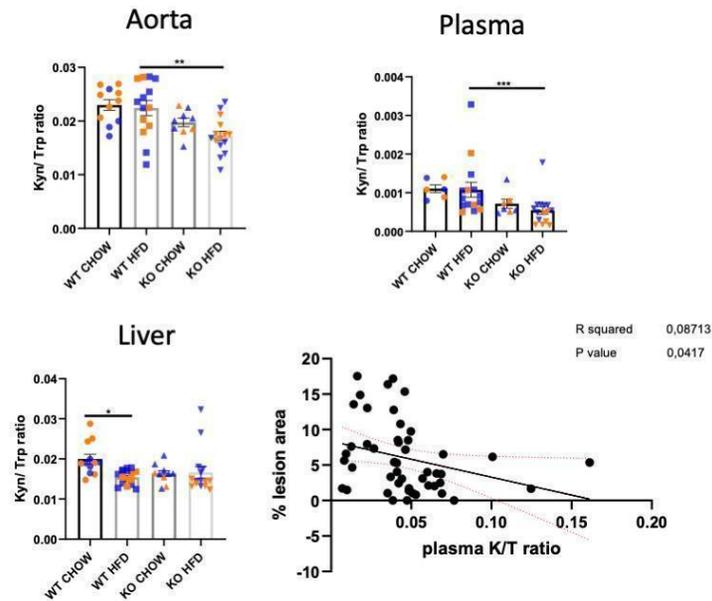


Figure 7: Pro-inflammatory cytokines. Liver concentration of the pro-inflammatory cytokines MCP1, TNF and IL1B on 3,5 and 7 weeks of HFD (IDO1 KO vs WT).

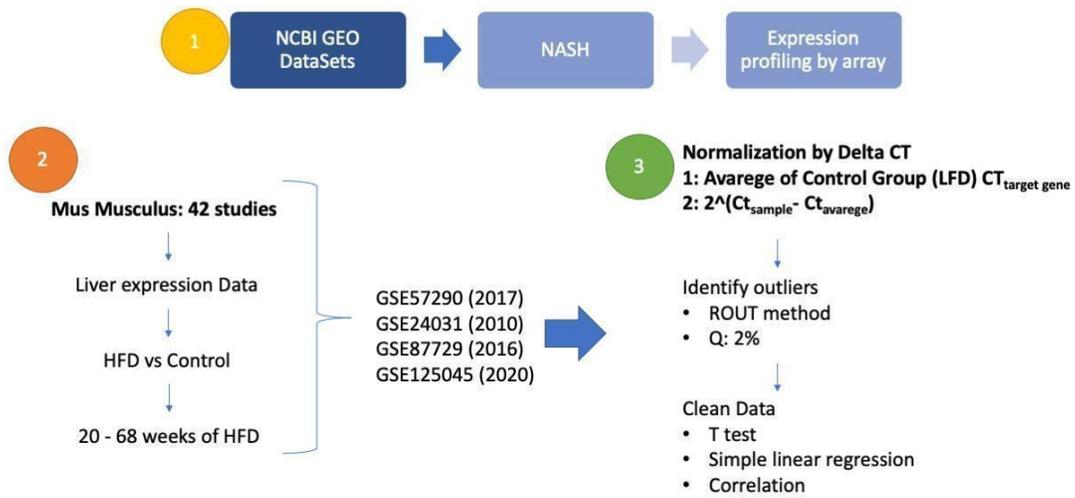


Figure 8: Transcriptomics analysis in NASH. Datasets of 4 different transcriptomes of NASH were analyzed as shown above, the dataset was chosen based on the presence of a control group, liver expression data, HFD and weeks of diet. The normalization of the gene expression is described on topic 3.

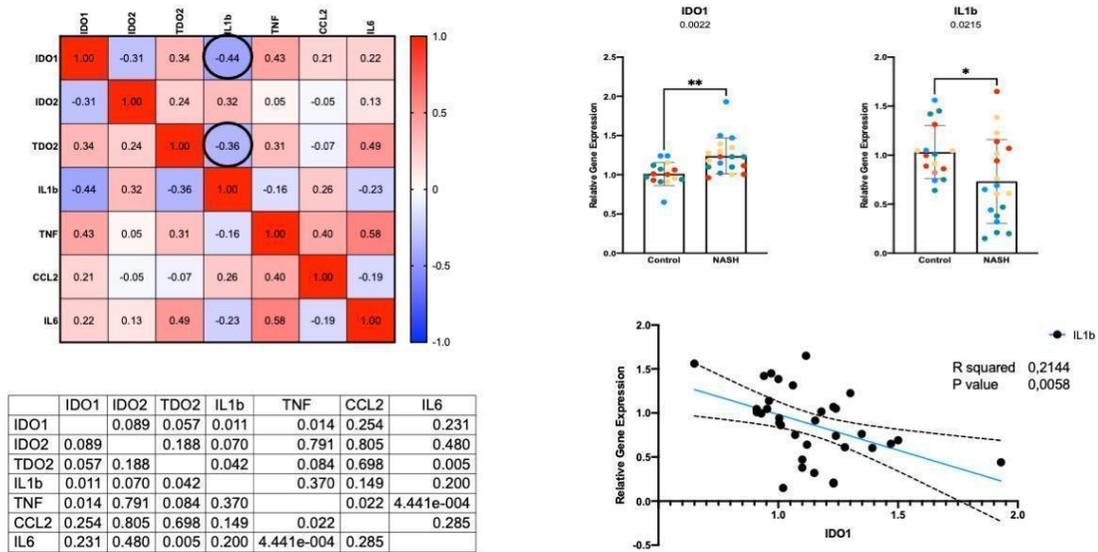


Figure 9 IL-1 β is significantly correlated with IDO-1 gene expression in NASH. Using Pearson correlation, we identified that IDO1 is inversely correlated with IL1B expression in NASH; also, IDO1 and IL1B expression is shown with an upregulation of IDO1 and a downregulation of IL1B gene expression. The Linear regression also shows the inverse correlation between IDO1 and IL1B.

TDO2 is regulated during NASH and controls IL1b production.

We next developed an in vitro strategy to evaluate the TDO2 regulation on hepatocytes but also the interaction with macrophages. The HepG2 and THP1 cells were cultivated and treated as described on fig 9. The NASH pathology is characterized by the lipid deposition in the liver in an early phase but also a dysregulation of the iron metabolism which leads to a deposition also of iron in several organs, including liver. When the HepG2 cells were treated with palmitate (PA), as a model of lipid deposition, the TDO2 gene expression was downregulated and, in contrast, the cells treated with Fe2SO4 had an upregulation of TDO2. In fact, when the HepG2 cells were treated with the combination of PA and Fe2SO4, the TDO2 expression was in an intermediated expression between PA and Iron treatment (Fig 10).

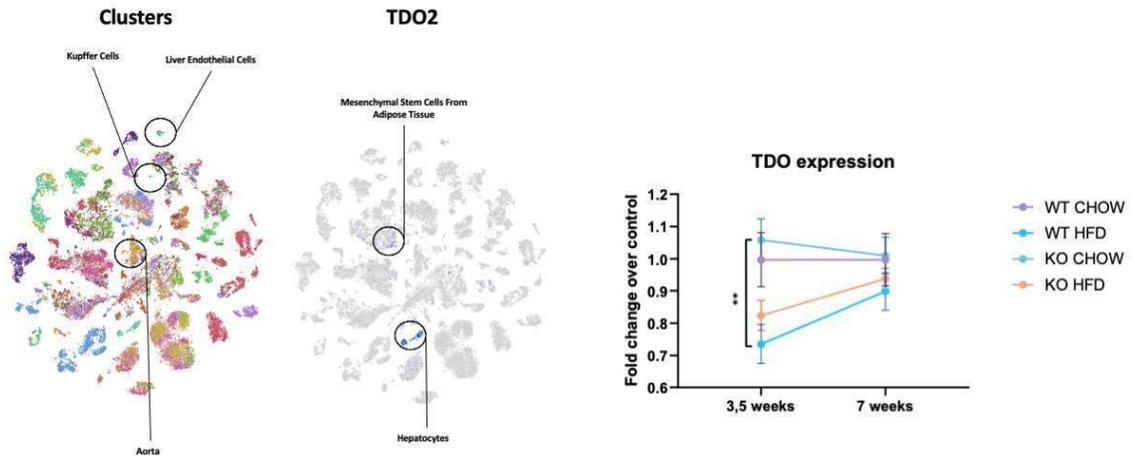


Figure 10: TDO2 induction in liver. Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs were used to analyse the global TDO2 expression (Software: Single Cell Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/sc/home>) – t SNE Perplexity 50; Colour plot by Organism part). The gene expression of TDO2 was measured in the livers of the experimental mice (3,5w and 7w on HFD – IDO1 KO vs WT).

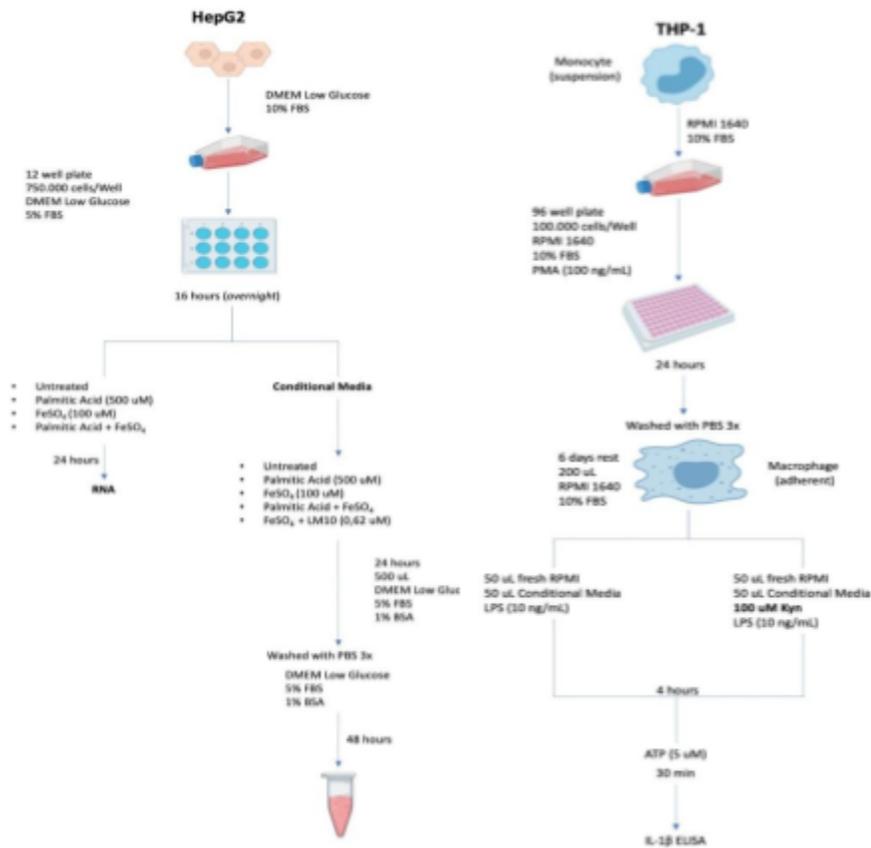


Figure 11: In vitro study with HepG2 and THP-1 cells. Experimental design of interaction between hepatocytes (HepG2) and macrophages (TDO2). The TDO2 inhibitor LM10 was also used.

At last, we treated the THP1 cells with the conditional media from HepG2 to evaluate if the TDO2 upregulation or downregulation would affect the IL1b production. As expected, in the absence of TDO2 or using a TDO2 specific blocker (LM 10), the macrophages produced more IL1B but the result could be reverted with the supplementation of Kyn (Fig 11).

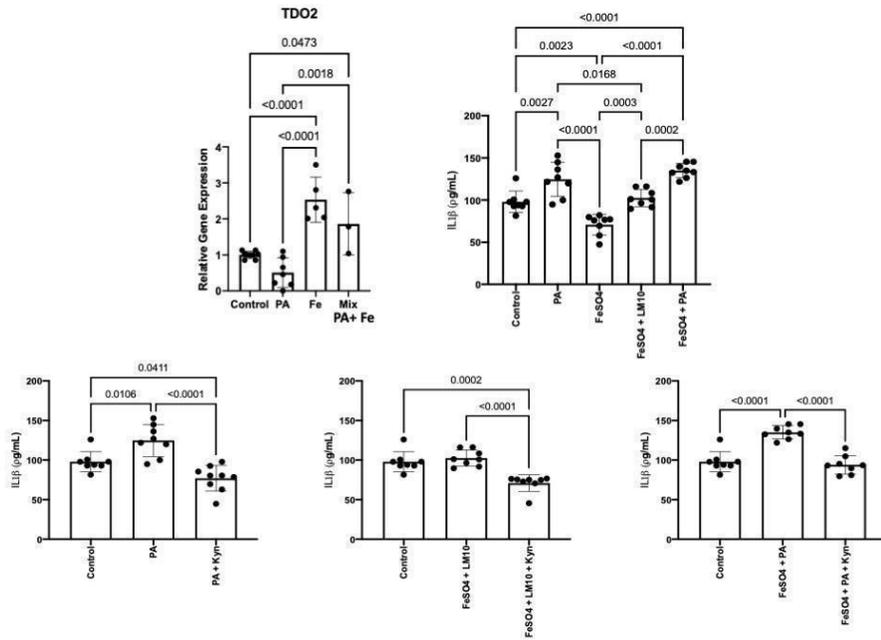


Figure 11: TDO2 crosstalk with macrophages. The gene expression of TDO2 was analysed on HepG2 cells treated with iron (Fe₂SO₄), Palmitate (PA) or the mix of both. The IL1B production on macrophages treated with the conditional media with or without the Kyn supplementation was measured by ELISA.

Conclusions:

- IDO1 deficiency aggravates atherosclerosis
- IDO1 deficiency does not affect NASH as it is compensated for by TDO, thereby regulating the inflammatory responses of macrophages in the liver
- Kynurenine/ tryptophan ratio is an important determinant of the disease outcome in different tissues
- Kyn (TDO) mediates the hepatocyte-macrophage crosstalk in the liver, thereby limiting the inflammatory response of macrophages

Bibliography:

- Baertling F, Al-Murshedi F, Sánchez-Caballero L, Al-Senaidi K, Joshi NP, Venselaar H, van den Brand MA, Nijtmans LG, Rodenburg RJ. Mutation in mitochondrial complex IV subunit COX5A causes pulmonary arterial hypertension, lactic acidemia, and failure to thrive. *Hum Mutat.* 2017 Jun;38(6):692-703.
- Bartek MA, Kessler LG, Talbott JM, Nguyen J, Shalhub S. Washington State abdominal aortic aneurysm-related mortality shows a steady decline between 1996 and 2016. *J Vasc Surg.* 2019 Oct;70(4):1115-1122. doi: 10.1016/j.jvs.2018.12.040. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30850292; PMCID: PMC6728234.
- Cole, J. E., Astola, N., Cribbs, A. P., Goddard, M. E., Park, I., Green, P., ... Monaco, C. (2015). Indoleamine 2,3-dioxygenase-1 is protective in atherosclerosis and its metabolites provide new opportunities for drug development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(42), 13033–13038. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517820112>
- Criado, G., Šimelyte, E., Inglis, J. J., Essex, D., & Williams, R. O. (2009). Indoleamine 2,3 dioxygenase-mediated tryptophan catabolism regulates accumulation of Th1/Th17 cells in the joint in collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 60(5), 1342–1351. <https://doi.org/10.1002/art.24446>
- Diaz F, Thomas CK, Garcia S, Hernandez D, Moraes CT. Mice lacking COX10 in skeletal muscle recapitulate the phenotype of progressive mitochondrial myopathies associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet.* 2005 Sep 15;14(18):2737-48. doi: 10.1093/hmg/ddi307.
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., ... Puccetti, P. (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(11), 6752–6761. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6752>
- Gao T, Zhang X, Zhao J, Zhou F, Wang Y, Zhao Z, Xing J, Chen B, Li J, Liu S. SIK2 promotes reprogramming of glucose metabolism through PI3K/AKT/HIF-1 α pathway and Drp1-mediated mitochondrial fission in ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2020 Jan 28;469:89-101. doi: 10.1016/j.canlet.2019.10.029. Epub 2019 Oct 19. PMID: 31639424.
- Goh WQ, Ow GS, Kuznetsov VA, Chong S, Lim YP. DLAT subunit of the pyruvate dehydrogenase complex is upregulated in gastric cancer-implications in cancer therapy. *Am J Transl Res.* 2015 Jun 15;7(6):1140-51. PMID: 26279757; PMCID: PMC4532746.
- Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011 Mar;12(3):204-12. doi: 10.1038/ni.2001. PMID: 21321594.
- Ketelhuth, D. F. J. (2019). The immunometabolic role of indoleamine 2,3-dioxygenase in atherosclerotic cardiovascular disease: immune homeostatic mechanisms in the artery wall. *Cardiovascular Research*. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz067>
- Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J Hepatol.* 2018 Feb;68(2):335-352. doi: 10.1016/j.jhep.2017.09.021. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29122390.
- MA3RS Study Investigators. Aortic Wall Inflammation Predicts Abdominal Aortic Aneurysm Expansion, Rupture, and Need for Surgical Repair. *Circulation.* 2017 Aug 29;136(9):787-797. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028433. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28720724; PMCID: PMC5571881.
- Mbongue, J. C., Nicholas, D. A., Torrez, T. W., Kim, N.-S., Firek, A. F., & Langridge, W. H. R. (2015). The Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity. *Vaccines*, 3(3), 703. <https://doi.org/10.3390/VACCINES3030703>
- Moffett, J. R., & Nambodiri, M. A. (2003). Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology*, 81(4), 247–265. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2003.t01-1-01177.x>
- Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *Bioessays.* 2013 Nov;35(11):965-73. doi: 10.1002/bies.201300084. Epub 2013 Sep 20. PMID: 24115022.
- Polyzos, K. A., & Ketelhuth, D. F. J. (2015). The role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in cardiovascular disease. *Hämostaseologie*, 35(02), 128–136. <https://doi.org/10.5482/HAMO-14-10-0052>

Rak M, Rustin P. Supernumerary subunits NDUFA3, NDUFA5 and NDUFA12 are required for the formation of the extramembrane arm of human mitochondrial complex I. *FEBS Lett.* 2014 May 2;588(9):1832-8. doi: 10.1016/j.febslet.2014.03.046. Epub 2014 Apr 6. PMID: 24717771.

Roeb E, Geier A. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) - current treatment recommendations and future developments. *Z Gastroenterol.* 2019 Apr;57(4):508-517. English. doi: 10.1055/a-0784-8827. Epub 2019 Apr 9. PMID: 30965381.

Sakalihan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet.* 2005 Apr 30-May 6;365(9470):1577-89. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66459-8. PMID: 15866312.

Shaw PM, Loree J, Gibbons RC. Abdominal Aortic Aneurysm. 2021 Jan 3. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 29262134.

Tabas I, Bornfeldt KE. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):653-67. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306256. PMID: 26892964; PMCID: PMC4762068.

Van Damme T, Gardeitchik T, Mohamed M, Guerrero-Castillo S, Freisinger P, Guillemyn B, Kariminejad A, Dalloyaux D, van Kraaij S, Lefeber DJ, Syx D, Steyaert W, De Rycke R, Hoischen A, Kamsteeg EJ, Wong SY, van Scherpenzeel M, Jamali P, Brandt U, Nijtmans L, Korenke GC, Chung BHY, Mak CCY, Hausser I, Kornak U, Fischer-Zirnsak B, Strom TM, Meitinger T, Alanay Y, Utine GE, Leung PKC, Ghaderi-Sohi S, Coucke P, Symoens S, De Paepe A, Thiel C, Haack TB, Malfait F, Morava E, Callewaert B, Wevers RA. Mutations in ATP6V1E1 or ATP6V1A Cause Autosomal-Recessive Cutis Laxa. *Am J Hum Genet.* 2017 Feb 2;100(2):216-227. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.12.010. Epub 2017 Jan 5. Erratum in: *Am J Hum Genet.* 2020 Aug 6;107(2):374. PMID: 28065471; PMCID: PMC5294668.

Zhang, L., Ovchinnikova, O., Jönsson, A., Lundberg, A. M., Berg, M., Hansson, G. K., & Ketelhuth, D. F. J. (2012). The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid lower plasma lipids and decreases atherosclerosis in hypercholesterolaemic mice. *European Heart Journal*, 33(16), 2025–2034. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs175>

Anexo I

As amostras de pacientes sem HIV foram divididas entre os grupos *Controle* e Síndrome Metabólica. (Fig 1 A, B). O grupo SM apresenta glicemia de jejum e insulinemia aumentadas em comparação com o grupo Controle (2 e 3 vezes mais, respectivamente). No entanto, sem alterações para as concentrações séricas de colesterol total (Fig 1 C) e LDL-colesterol. O grupo SM apresentou hipertrigliceridemia e concentrações mais baixas de HDL-colesterol (Fig 1 D, E). Quanto aos níveis de LDL (-) e oxLDL (LDL eletronegativa; LDL oxidada), não foi observada diferença entre os grupos (Fig 1 G, H). O perfil inflamatório foi estimado pelos níveis séricos da proteína C reativa ultra-sensível (US-CRP, Fig 1 I), mieloperoxidase (MPO; Fig 1 J) e amilóide sérica A (SAA, Fig 1 K), sem ter sido detectado observadas diferenças entre os grupos. As concentrações de IgM e IgG anti-LDL (-) foram inferiores no grupo SM.

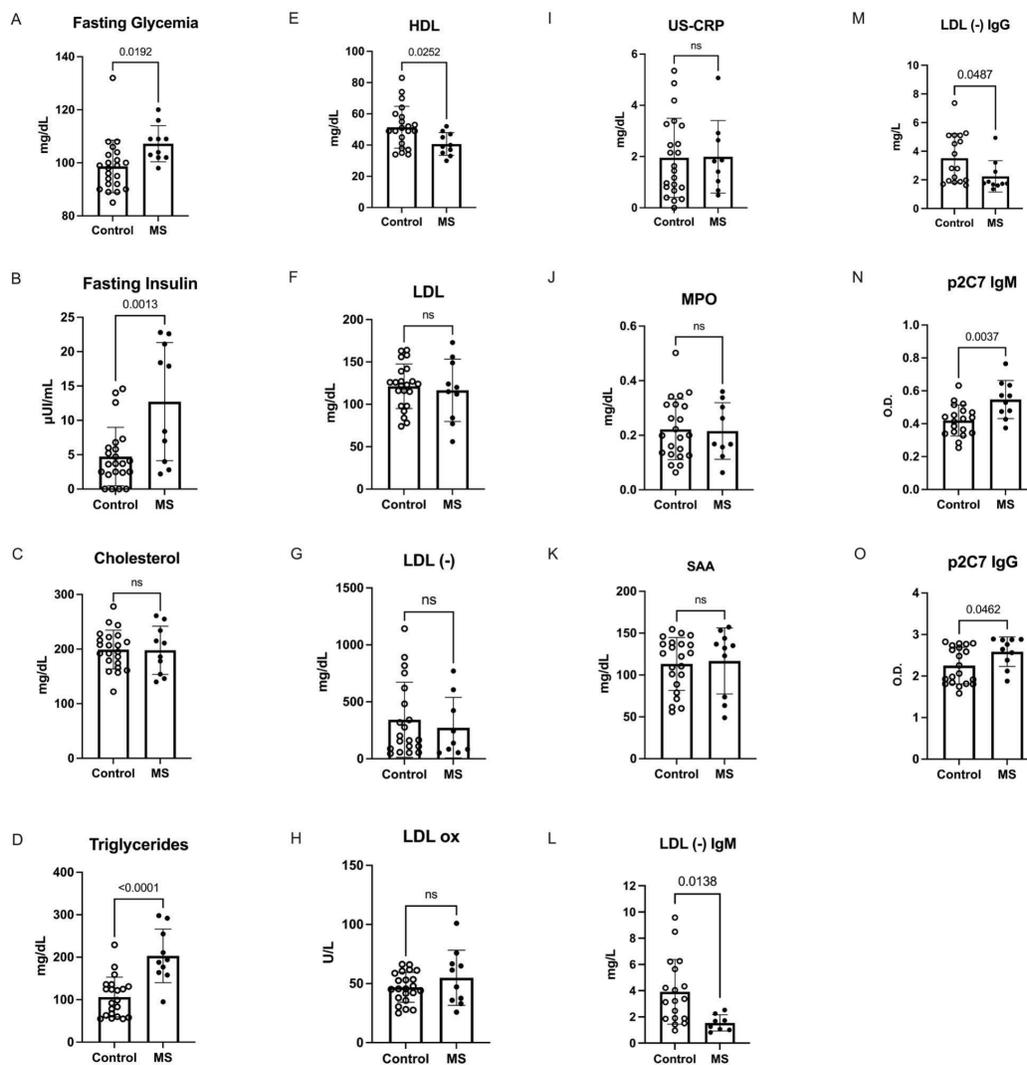


Figura 1: Perfil metabólico de amostras humanas. As amostras do biobanco AGATA foram selecionadas e divididas entre Control (n = 22) ou Metabolic Syndrome (MS) (n =10). O padrão metabólico é mostrado em A-H. O perfil inflamatório foi também analisado (I-J) e os anticorpos contra LDL (-) ou p2C7 (L-O). oxLDL: LDL oxidada; LDL (-): LDL eletronegativa; MPO: mieloperoxidase; US-CRP: Proteína C-Reactiva Ultra-Sensível; SAA: Amilóide sérica A. Os outliers foram excluídos com o método ROUT (Q=1%); As amostras foram analisadas com o teste T.

Para caracterizar a relevância desses anticorpos no perfil do colesterol e inflamação (Fig. 2 e 3), foram analisadas as regressões lineares entre os anticorpos anti-LDL (-) e p2C7 versus o perfil lipídico / inflamatório. O IgM anti-LDL (-) (Fig 2 A) e IgG (Fig 2 G) correlacionam-se positivamente com os níveis de LDL (-), embora esses anticorpos não estejam correlacionados

com ApoB100 ou concentrações de colesterol total (Fig 2 A e 2 G). Além disso, o IgM anti-LDL (-) está inversamente correlacionado com as concentrações de ApoE e TG e diretamente correlacionado com os níveis de HDL (Fig. 2B e 2C). Curiosamente, o IgM anti-p2C7 não se correlacionou com nenhum dos parâmetros avaliados, nem mesmo com os níveis de LDL (-) (figs. 2 D, 2 E e 2 F). Uma possível explicação para este achado poderia ser o fato de a IgM anti-LDL (-) ter como alvo a fração lipídica da LDL (-) e não a porção da proteína. Isso fica mais evidente quando se considera a ausência de correlação entre os níveis de IgM anti-LDL (-) e a ApoB100 (Fig. 2 A). Embora tenha sido observada uma correlação significativa com os níveis de ApoE e IgG anti-LDL (-) (Fig. 2H), não observamos o mesmo padrão para a IgG anti-LDL (-) versus LDL (-), ApoB-100, colesterol total, ApoE, TG, ApoA1 ou HDL-colesterol apresentados anteriormente para o isotipo IgM. As mesmas análises foram feitas utilizando a IgG anti-p2C7 e nenhuma correlação foi encontrada (Fig. 2 G-L).

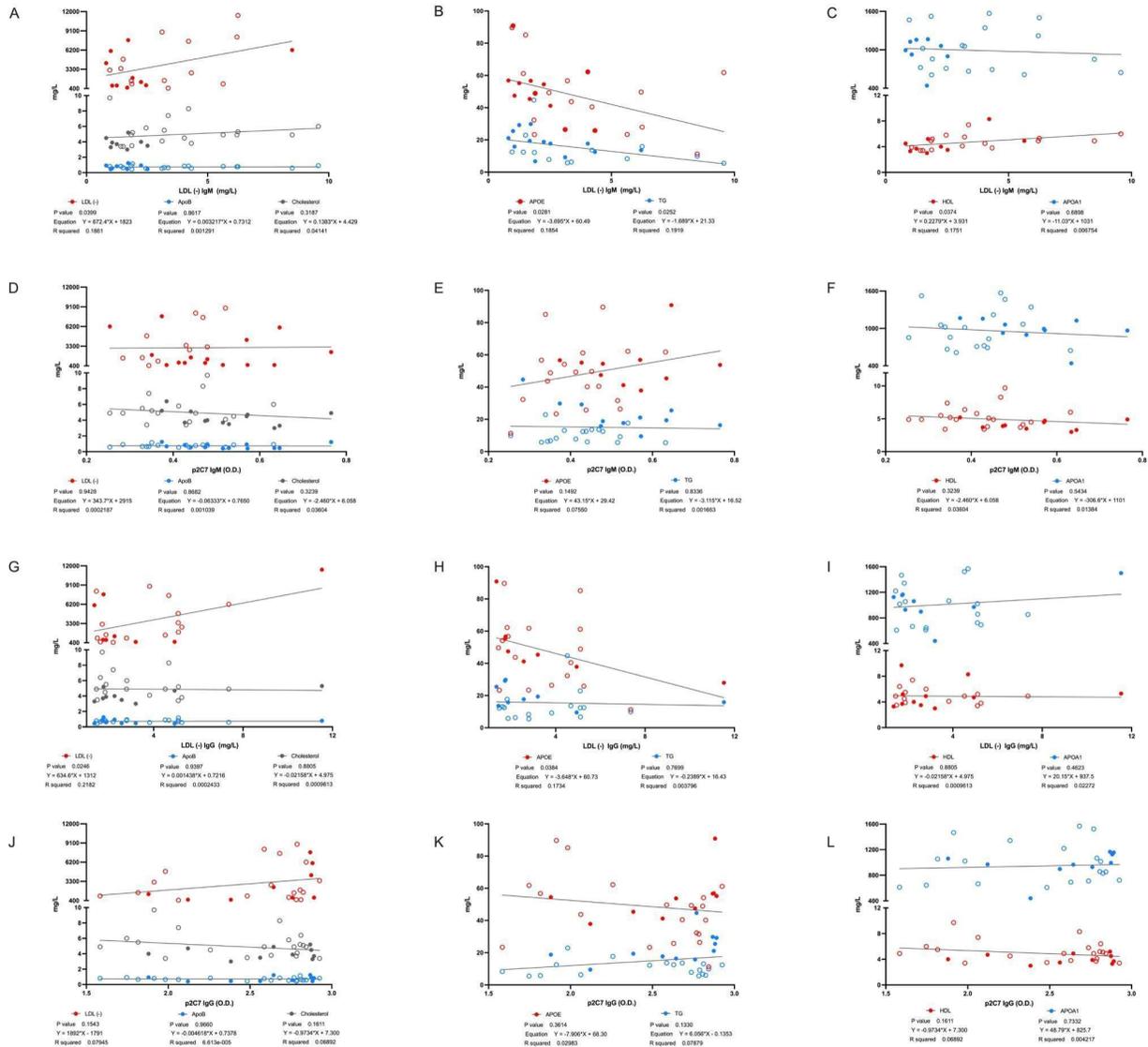


Figura 2: Correlações dos anticorpos anti-LDL (-) e anti-p2C7 com perfil lipídico. A análise de regressão linear avaliou a associação de IgM anti-LDL (-) com LDL (-), ApoB100, Colesterol (A); ApoE, TG (B); HDL, APOA1 (C). A análise de regressão linear avaliou a associação de IgM anti-p2C7 com LDL (-), ApoB100, Colesterol (D); ApoE, TG (E); HDL, APOA1 (F). A análise de regressão linear avaliou a associação de IgG anti-LDL (-) com LDL (-), ApoB100, Colesterol (G); ApoE, TG (H); HDL, APOA1 (I). A análise de regressão linear avaliou a associação de IgG anti-p2C7 com LDL (-), ApoB100, Colesterol (J); ApoE, TG (K); HDL, APOA1 (L). Para MS representado como pontos vazados e pontos preenchidos como Controle.

Para entender os possíveis efeitos do anti-p2C7 ou anti-LDL (-) no processo inflamatório, foi realizada a regressão linear dos anticorpos (anti-p2C7 ou anti-LDL (-)) com US-CRP, MPO e SAA (Fig 3 A-D). Não foram observadas correlações para ambos os isotipos analisados (IgG ou IgM) e as proteínas inflamatórias SAA, US-CRP ou MPO utilizando todas as amostras em

conjunto. No entanto, desmembrando os grupos Controle e SM, observamos um padrão divergente na regressão linear IgG anti-p2C7 versus US-CRP (Fig. 3 E). Curiosamente, o IgG anti-p2C7 parece estar relacionado a uma ação pró-inflamatória no grupo *Controle*, mas anti-inflamatória na SM. Este efeito contraditório pode ser explicado pela observação do perfil de produção de anticorpos dos grupos Controle versus SM e, para analisar essa hipótese, foi feita uma matriz de correlação de Pearson. Como mostrado nas Fig 3 F e 3 G, os níveis de IgM anti-LDL (-) foram inversamente correlacionados com o IgG anti-p2C7.

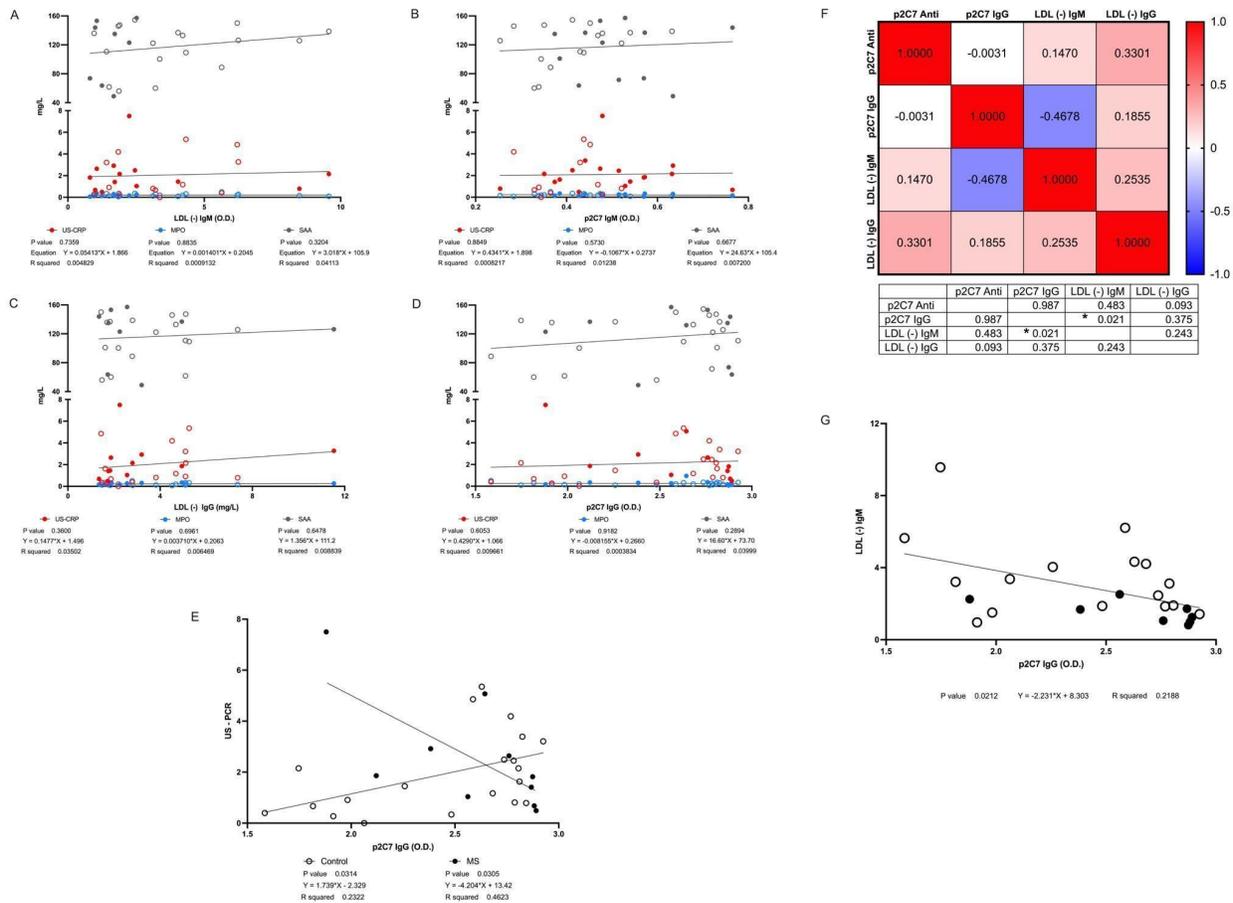


Figura 3: Correlações dos anticorpos anti-LDL (-) e anti-p2C7 com marcadores inflamatórios. A análise de regressão linear avaliou a associação de IgM anti-LDL (-) com US-CRP, MPO, SAA (A); IgM anti-p2C7 (-) com US-CRP, MPO, SAA (B); IgG anti-LDL (-) com US-CRP, MPO, SAA (C); IgG anti-p2C7 (-) com US-CRP, MPO, SAA (D); A análise de regressão linear avaliou a associação de IgG anti-p2C7 com US - CRP (Para MS representado como pontos vazados e pontos preenchidos como Control) (E); Visualização da Correlação de Pearson entre a IgG e IgM anti-LDL (-) ou anti-p2C7 e uma tabela descritiva com os valores de p (F); A análise de regressão linear avaliou a associação de IgM anti-LDL (-) com IgG anti-p2C7.

Anexo II

Conjugação dos peptídeos com ovalbumina

Foram utilizadas diferentes proporções de peptídeo/ovalbumina, concentrações de glutaraldeído e temperatura. Primeiramente, foi calculada a molaridade da ovalbumina e dos peptídeos e, em seguida, foi feita a relação massa molar/massa molar entre os peptídeos e a ovalbumina (Tabela I). Aceitando a relação de mm (massa molar) 1:1, podemos assumir que para cada 1 grama de ovalbumina, sua correspondente equimolar de peptídeo será de 0,024g para p2C7. A partir desta correlação foram avaliadas as proporções de 1:1, 1:10, 1:40 e 1:50.

| Amostra | g/Mol | Relação 1:1 |
|------------|--------|-------------|
| Ovalbumina | 44300 | 1 |
| p2C7 | 1047,3 | 0,024 |

Tabela I: Dados de massa molar. Foram tabelados os dados de massa molar e calculada a relação de massa molar/massa molar (1:1) entre os peptídeos e a ovalbumina.

Escolhemos o glutaraldeído pela disponibilidade de uma amina primária dos peptídeos, a qual estaria disponível para reagir com o grupo aldeídico do linker. Por sua vez, o glutaraldeído, de fórmula molecular $C_5H_8O_2$, possui dois grupos aldeídos; sendo assim, buscamos os possíveis sítios de ligação com a molécula de ovalbumina, que possui diversas lisinas disponíveis para conjugação (visto que a lisina possui uma amina primária na sua cadeia lateral). A reação foi testada tanto em geladeira ($4^\circ C$) como sob aquecimento ($37^\circ C$), sempre

com agitação constante. Em todos os casos, as reações foram adaptadas de Carter, 1996 e Kerr MA et al., 1994. Preparou-se, inicialmente, uma solução de ovalbumina em PBS, pH 7, dissolvendo 3 mg de ovalbumina em 1 mL de PBS (3 ug/mL) e, após completa dissolução do pó, foi filtrada em poro de 0,45 um. A concentração final, medida pela metodologia de Bradford, foi de 2700 ug/mL. A solução filtrada foi então alíquotada e armazenada em freezer (-20°C). Para os peptídeos, utilizou-se a concentração de 1 ug/uL, também alíquotadas e armazenadas em freezer (-20°C).

Para a reação utilizou-se a quantidade fixa de 100 ug de ovalbumina e as devidas proporções de peptídeo, descritas anteriormente. Em um tubo eppendorf de 2 mL foram adicionados os volumes correspondentes de ovalbumina e peptídeo e, após homogeneizar a solução, foi adicionado glutaraldeído 2,3% v/v (5 uL para cada 100 uL de reação), gota a gota e PBS q.s.p 200 uL finais. A reação foi mantida na geladeira por 1 hora ou a 37°C por 15 minutos, sob agitação. Para parar a reação foi utilizado Tris 1M, pH 9 (10 uL para cada 100 uL de reação).

Inicialmente foi constatado que não era possível sensibilizar a placa para realização do ensaio de ELISA com os peptídeos livres (Figura 1A). Mesmo em altas concentrações (100 ug/mL), não foi possível detectar nenhum sinal (absorbância) após a revelação com os anticorpos monoclonais 1A3 e 2C7. Entretanto, com a conjugação dos peptídeos à ovalbumina foi possível detectar o sinal, em todas as condições testadas para a conjugação do p1A3 e com melhores resultados para o p2C7, tanto em temperatura ambiente quanto à 37°C (Figuras 1B, C e D). De fato, a temperatura da reação e a concentração de peptídeo utilizada influencia diretamente na eficiência da conjugação com a proteína carreadora (Figura 2).

O p2C7 possui menor solubilidade em meio aquoso, devido à presença de aminoácidos de caráter apolar em sua estrutura primária. Sendo assim, a reação somente pode ser

observada com a relação de massa molar 1:30 (ovalbumina: p2C7) em temperatura ambiente, mas com resultados pouco satisfatórios (Figura 1C). Foi possível detectar a conjugação de p2C7 com ovalbumina com a reação a 37°C, por 15 min, e sua eficiência máxima na razão de 1:40.

Após a padronização do protocolo de conjugação, verificamos a sensibilidade do ensaio de ELISA para detecção de anticorpos anti-p2C7. Para isso, utilizamos diferentes concentrações do Mab 2C7 como anticorpo primário no ensaio (Figura 2). Para o p2c7-ova, notamos que as razões 1:20 e 1:30 não apresentaram diferença e com um pequeno aumento para a razão 1:50. Sendo assim, é possível afirmar que apenas amostras com concentrações superiores a 0,01 ug/mL de anticorpos anti-p2C7 serão consideradas positivas (Figura 2).

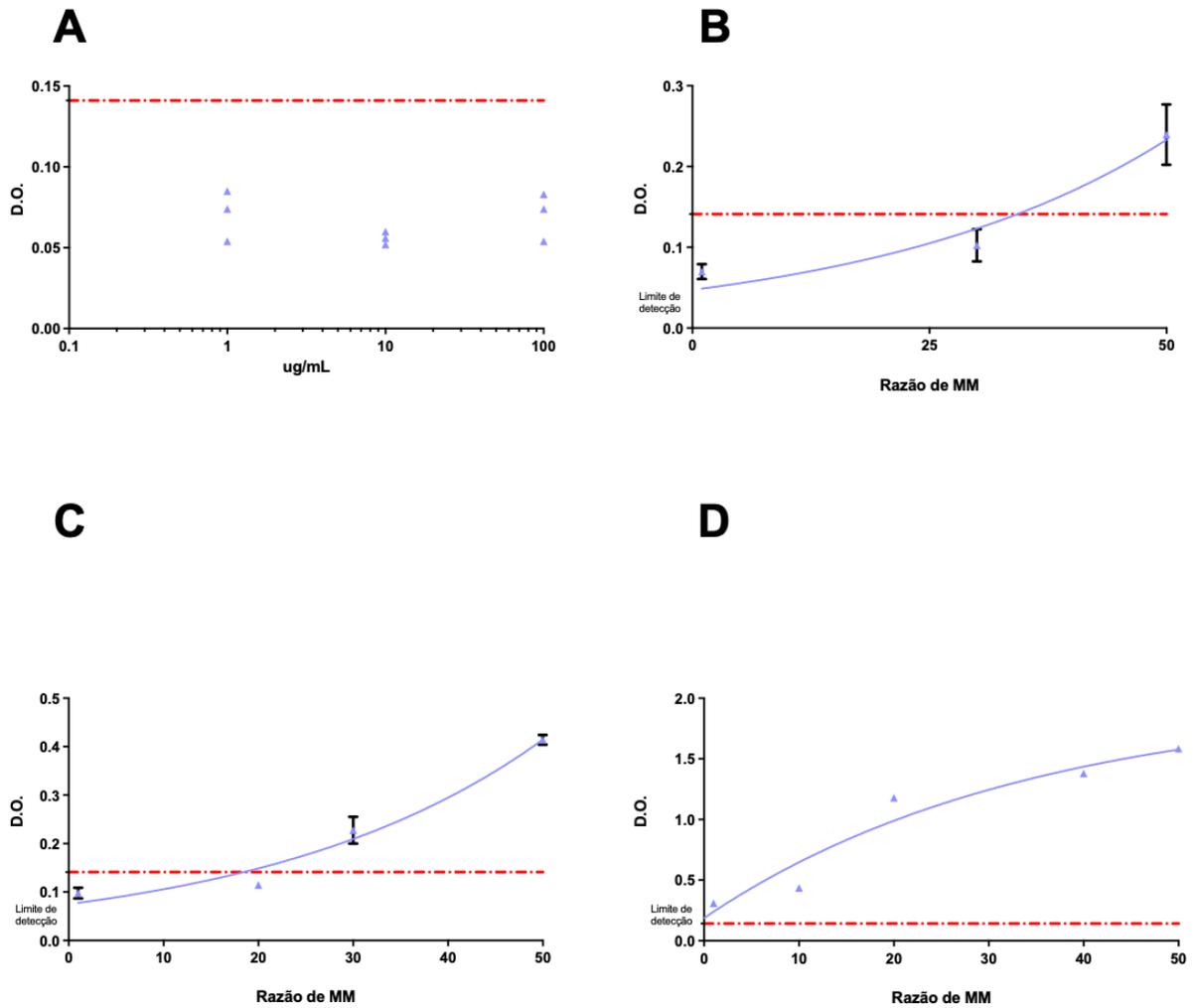


Figura 1: Avaliação das condições da reação de conjugação do peptídeo à ovalbumina. ELISA para detecção da reatividade do peptídeo com o respectivo anticorpo monoclonal. Foram testadas diferentes condições para as reações de conjugação dos peptídeos com a ovalbumina, sendo (A) 4°C por 1 hora, (B) Temperatura ambiente por 1 hora e (C) 37°C por 15 min. Para a linha em vermelho: Absorbância do branco.

p2C7-Ova

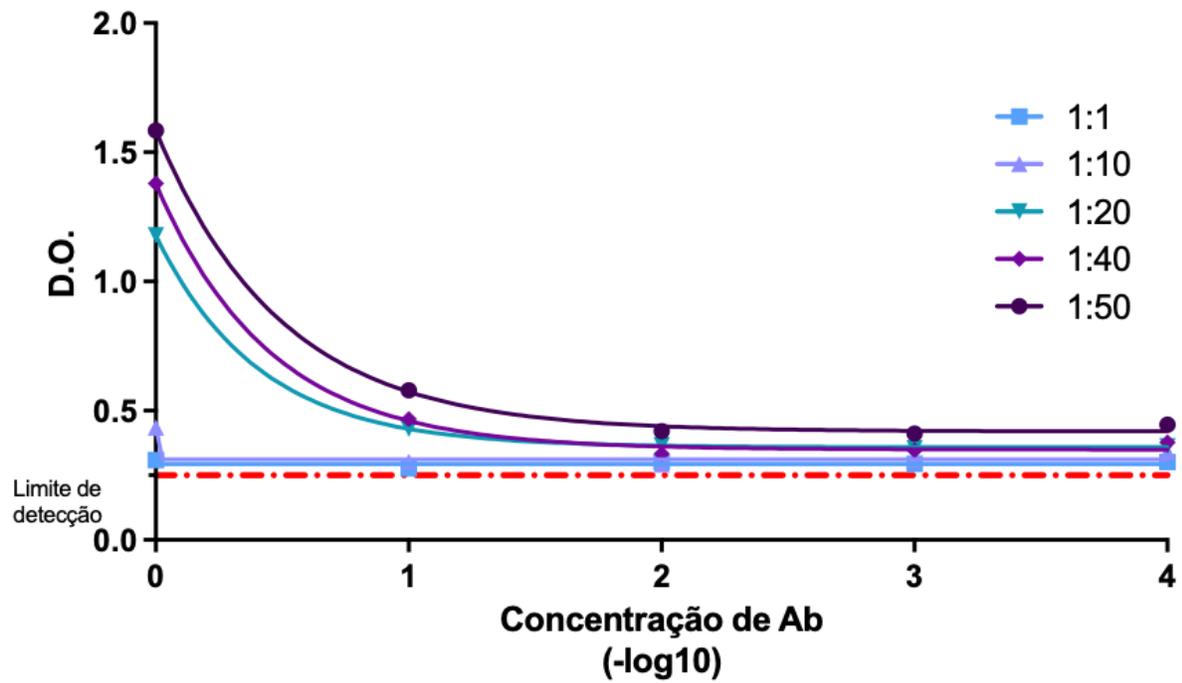


Figura 2: Avaliação das diferentes razões molares peptídeo:ovalbumina para a reação de conjugação dos peptídeos à ovalbumina. ELISA para detecção da reatividade do p2C7 com o respectivo anticorpo monoclonal. Foram testadas diferentes concentrações do MAb 2C7, assim como diferentes relações de molaridade entre ovalbumina e p2C7.

9142 - 9123806 / 1 - Gustavo Luis Tripodi

Email: gustavolt90@usp.br
Data de Nascimento: 02/09/1990
Cédula de Identidade: RG - 35.259.003-8 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Farmácia - Universidade Cruzeiro do Sul - São Paulo - Brasil - 2013
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2016

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 07/04/2017
Início da Contagem de Prazo: 07/04/2017
Data Limite para o Depósito: 04/04/2022
Orientador: Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 07/04/2017 até o presente Email: dspa@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Eduardo Lani Volpe da Silveira - 05/07/2017 até o presente Email: eduardosilveira@usp.br
Proficiência em Línguas:
 Inglês, Aprovado em 07/04/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 02/05/2019
Estágio no Exterior: Karolinska Institutet, Suécia - Período de 01/12/2019 até 30/11/2020

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências:

Primeira Matrícula em 07/04/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência:

Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2021

| Sigla | Nome da Disciplina | Início | Término | Carga Horária | Cred. | Freq. | Conc. | Exc. | Situação |
|-----------------------|---|------------|------------|---------------|-------|-------|-------|------|-----------|
| BMI5902-1/1 | Interações Imuno-Metabólicas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo) | 03/08/2017 | 09/11/2017 | 60 | 4 | 75 | B | N | Concluída |
| FBC5766-6/1 | Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia IV | 15/08/2017 | 27/11/2017 | 15 | 1 | 85 | B | N | Concluída |
| FBC5710-7/1 | Vacinas e Adjuvantes | 13/11/2017 | 17/12/2017 | 60 | 4 | 77 | B | N | Concluída |
| Atividade do Programa | Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0416 Fisiopatologia II, ministrada aos alunos de graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1) | 01/02/2018 | 30/06/2018 | - | 3 | 100 | A | - | - |
| FBC5792-5/1 | Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III | 05/03/2018 | 19/06/2018 | 15 | 1 | 88 | A | N | Concluída |
| FBC5954-1/1 | Redação de Trabalhos Científicos | 12/04/2018 | 18/04/2018 | 15 | 1 | 100 | A | N | Concluída |
| ICB5771-1/1 | Vivências na Aplicação de Bioinformática à Imunologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo) | 13/08/2018 | 19/08/2018 | 30 | 2 | 80 | B | N | Concluída |

| Sigla | Nome da Disciplina | Início | Término | Carga Horária | Cred. | Freq. | Conc. | Exc. | Situação |
|-------------|--|------------|------------|---------------|-------|-------|-------|------|-----------|
| FBC5707-7/2 | Biologia de Sistemas para Ciências da Vida | 02/10/2018 | 24/12/2018 | 60 | 4 | 90 | A | N | Concluída |

| | Créditos mínimos exigidos | | Créditos obtidos |
|---------------------|----------------------------|-----------------------|------------------|
| | Para exame de qualificação | Para depósito de tese | |
| Disciplinas: | 0 | 20 | 20 |
| Estágios: | | | |
| Total: | 0 | 20 | 20 |

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto no Artigo 65 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 13/03/2019

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.



Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo: <https://uspdigital.usp.br/iddigital>

Documento emitido às 18:52:02 horas do dia 14/10/2021 (hora e data de Brasília)

Código de controle: EQBJ-JJ5G-61JT-F77D

Código de controle válido até: 14/11/2021