MARIA CAROLINA AQUINO LUQUE

Papel de CD100 na patogênese da aterosclerose

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

Programa de: Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Jorge Kalil

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Luque, Maria Carolina Aquino
Papel de CD100 na patogênese da aterosclerose / Maria Carolina Aquino
Luque. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de .Alergia e Imunopatologia
Orientador: Jorge Kalil.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.CD100 antígeno 3.Células espumosas 4.Moléculas
de adesão celular 5.LDL oxidado

USP/FM/DBD-476/10

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26.10.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1007/06**, intitulado: **"Papel de CD100 na patogênese da aterosclerose"**, apresentado pelo Departamento de **Clínica Médica**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Pesquisador(a) Responsável: **Prof.Dr. Jorge Kalil**

Pesquisador(a) Executante(s): Maria Carolina Aquino Luque

CAPPesq, 26 de Outubro de 2006.

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

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se em
ver a vida passar.*

*É melhor tentar, ainda em vão, que sentar-se
fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes
me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco, que em
conformidade de viver”*

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

O que chamamos de inspiração é a capacidade de reter e ampliar, com um toque próprio e único, um flash ou insight, algo que atravessa o nosso pensamento, mas que também pode fugir dele. Porém, boa parte dessa inspiração é fruto da nossa capacidade de concentração, de disciplina, de esforço mental e até de teimosia. Precisamos não de um dia bonito de céu azul, mas de uma boa dose de paciência para produzir alguma coisa interessante, para organizar raciocínios, transformar barro em tijolos e tijolos em casas. E assim, com muita inspiração, é construída uma tese ao longo dos anos.

Durante o desenvolvimento desse projeto de doutorado, concluí que uma tese, apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne contribuições de várias pessoas, sem as quais a realização da mesma seria impossível. Assim meu único receio neste momento é não estender o meu obrigado à realmente todos que o merecem. Todavia, é com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho uma realidade.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil, orientador da tese, agradeço o apoio, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho. Acima de tudo, obrigada por me acompanhar nesta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica.

À Profa. Dra. Beatriz Stolf, na qualidade de orientadora e amiga, os tantos e inesquecíveis diálogos, a hospitalidade desde o acesso ao laboratório até a intimidade de sua família, e a paciência com as minhas desorganizações periódicas. Sou eternamente grata por essa orientação que ultrapassa a tese, bem como o imenso carinho nos momentos de dificuldade e de dor. Agradeço, sobretudo, o privilégio de haver trabalhado em um tema para o qual você tanto contribuiu no seu período de pós-doc no laboratório, e que

tanto me apaixonei. Certamente sua jornada é uma inspiração para quem atua nessa área, e teve uma grande influência sobre mim, mas não só...seus atuais e futuros alunos só têm a ganhar com a sua orientação.

À Dra. Verônica Coelho, agradeço as ricas sugestões a esse trabalho, assim como sua eterna compreensão e amizade, o acolhimento no seu grupo de pesquisa, que tanto me ajudou a superar situações limite, estimulando-me a seguir em frente.

À Dra. Luíza Guilherme e Dr. Edécio Cunha-Neto, meus agradecimentos pela disposição para discutir o projeto, bem como por seus questionamentos e contribuições em todas as etapas.

Às minhas amigas do coração do grupo da Vacina, Samar, Simonete e Raquelina, e também não deixando de incluir neste mesmo grupo, ainda que por caminhos tortos, Eliane (Lailai). Muito obrigada pela acolhida no grupo, e pela amizade inestimável desenvolvida durante esse tempo, pela convivência com vocês, pelo apoio e carinho de sempre, além dos momentos de risadas eternas. Espero contar com a presença de vocês na minha vida por muito tempo ainda.

À minha amiga Flávia por todos os momentos de reflexão e também descontração, por todos os almoços e desabafos! Obrigada pela sua compreensão singular e amizade, sempre!

À minha amiga Amanda pelo sorvete de açaí, farinha de tapioca, os momentos hã, as longas conversas regadas a muitas risadas e descontração, mas também aos papos filosóficos inacabáveis. Você sabe como é especial na minha vida.

Sou profundamente grata à amiga Georgia Porto, pela indescritível solidariedade e afeto inestimável, que se traduziram sempre em

entusiasmadas respostas, continuado estímulo e valiosa parceria. Sem mencionar os questionamentos existenciais e teóricos nas longas e cúmplices conversas, hoje materializados no aprender-fazer do cotidiano e na busca da construção de um futuro no tempo presente.

Um agradecimento especial aos amigos do Laboratório de Biologia Vascular, Victor, Marcus, Leo e Thalita pelo enorme interesse e disposição em colaborar sempre que solicitada ajuda, e claro, pelos intervalos regados a muita descontração e risadas sem fim. Especialmente ao Victor, meu muito obrigada pela ajuda, larga experiência e capacidade analítica nos experimentos que foram particularmente úteis nesse trabalho.

Às amigas da espécie *chayote* que tanto ajudaram, especialmente na fase final deste trabalho, com apoio, carinho e solicitude, além de consultorias científicas. Aos demais amigos do grupo da Bioquímica, Andréa Kuramoto e Carlos, meu muito obrigada!

Aos meus amigos do grupo de Transplante e Terapia Celular, com quem pude contar em inúmeras situações: Carolina Lavini, Sandra Maria, Hernandez, Nathália, Patrícia, Anninha e alguns que já partiram do laboratório: Pedro, Maísa, Adalberto, Kellen, Evelyn e Lin. A todos, obrigada pela oportunidade de aprender e contribuir.

Aos administradores e secretárias Jair, Andréia Verdille, Giselle, Sônia e Fernanda por todo o apoio, sorriso, bom humor e amizade. Às meninas da limpeza, Raimunda e Elaine. Sempre pude contar com vocês nas horas solicitadas.

À equipe de médicos e enfermeiros que participaram da coleta das amostras utilizadas nesse estudo.

À pós-graduação da Faculdade de Medicina da USP, aos responsáveis organizacionais que autorizaram a realização do estudo, e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos amigos fora do laboratório, que são em grande parte responsáveis pela manutenção da minha sanidade (ou não), e que eu amo incondicionalmente: Dani Courbis, Séco, Kaísa, Léo, Iuri, Bruno, Marcela, Titi, Mike e Celso. Muito obrigada por nunca me deixar desamparada nessa selva de pedra!

Ao Rafael, meu parceiro que traz tanta luz e gosto para minha vida, um amor especial! Você é a lição mais profunda que tenho de ética, dignidade e amor...obrigada por compreender todas as minhas buscas, existenciais e teóricas, sendo sempre atento, terno, companheiro.

Sou muito grata a todos os meus familiares pelo incentivo recebido ao longo destes anos. Ao Pedro, meu irmão, e ao meu pai, Luque, obrigada pelo amor, alegria e atenção sem reservas. Especialmente minha mãe, agradeço o tempo e o sorriso que sempre me dedicou. Com seu “saber da sabedoria” sempre me disse que a roda do tempo não volta para trás, ensinando-me a coragem de prosseguir, fazendo sempre o melhor possível. Obrigada pelo exemplo acadêmico e de vida que você foi, é, e sempre será na minha vida.

Enfim, o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta tese, estimulando-me intelectual e emocionalmente. Considero todos co-autores deste trabalho.

SUMÁRIO

Sumário	1
Lista de Figuras	13
Lista de Tabelas.....	19
Resumo.....	20
Summary	22
INTRODUÇÃO	24
1. Aterosclerose.....	24
2. Estabelecimento da doença	26
Alterações morfológicas.....	27
Alterações celulares	27
3. Composição celular da placa.....	29
4. Monócitos e macrófagos	30
5. Linfócitos T.....	34
6. Endotélio	35
7. Phage Display	38
8. Semaforinas.....	41
Plexinas	42
CD100	44
9. Receptores de CD100.....	47
10. Atividades biológicas de CD100.....	49
Aspectos moleculares das interações de CD100 em células do sistema imune	49
Atividades biológicas em outros sistemas	50
11. CD100 e aterosclerose.....	55
OBJETIVOS	58
Material e Métodos	59
1. Amostras de carótida normal e placa aterosclerótica de carótida	59
2. Amostras de baço e placa aterosclerótica de coronária.....	59
3. Anticorpos utilizados	60
4. Análises microscópicas em tecidos e células	61
5. Imunohistoquímica peroxidase	61
6. Imunohistoquímica fluorescência com dupla marcação	62
7. Imunocitoquímica fluorescência simples ou dupla marcação.....	62
8. Imunocitoquímica eletrônica.....	63
9. Separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) ...	64
10. Isolamento de monócitos com kit de seleção positiva por contas magnéticas e diferenciação em macrófagos	64
11. Cultura de monócitos e diferenciação em macrófagos e foam cells	65
Monócitos e macrófagos de PBMC	65
Cultura e ativação com vitamina D, LPS, oxLDL, IFN- γ , CD100, IL4 e IL10 para isolamento de RNA e Western Blot	65

Diferenciação em macrófagos M1 e M2	66
Cultura de células THP-1	66
Cultura e ativação com vitamina D, LPS e IFN- γ para isolamento de RNA e Western Blot.....	67
12. Diferenciação de macrófagos em células espumosas.....	67
Mensuração da incorporação de LDL oxidado	68
13. Coloração com Scarlet R ou Oil Red	68
14. Quantificação de proteína e Western Blot	69
15. Real Time RT-PCR.....	70
Extração de RNA	70
Quantificação do RNA.....	71
Transcrição reversa	72
Reação de RT-PCR em tempo real	72
Especificidade dos primers e qualidade da amplificação.....	73
Cálculo da eficiência de amplificação dos primers.....	73
Seqüência dos primers utilizados	74
16. Cultura e ativação de HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	74
17. Cultura e ativação de linfócitos T para Real-Time RT-PCR e Western Blot	75
18. Adesão de monócitos (THP-1) a células endoteliais (HUVECs).....	76
Resultados	78
1. Análises microscópicas em tecidos e células	78
Cortes histológicos em lâminas – imunohistoquímica peroxidase e de fluorescência	78
2. Experimentos de diferenciação monócito-macrófago-células espumosas in vitro	83
Cultura e diferenciação de células THP-1 e de monócitos de PBMC.....	83
Expressão de CD100 em células - imunocitoquímica de fluorescência	86
Expressão de CD100 na ultra-estrutura da placa aterosclerótica - imunocitoquímica eletrônica.....	89
3. Avaliação da expressão do transcrito de CD100.....	90
Expressão de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas de células THP-1 - Real-Time RT-PCR	90
Estímulo com LPS e vitamina D.....	90
Estímulo com IFN- γ	93
4. Cinética de estimulação e expressão de CD100 em macrófagos de PBMC - Real-Time RT-PCR	96
Estímulo com IFN- γ	98

5.	Expressão protéica de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas de THP-1 e PBMC -- Western Blot	101
6.	Diferenciação de macrófagos M1 e M2 de PBMC in vitro	103
	Análise da expressão de CD100 em macrófagos sob diferentes protocolos de ativação por Real-Time RT-PCR	105
7.	Expressão de CD100 em células endoteliais.....	108
	Cortes histológicos em lâminas – imunohistoquímica peroxidase	108
8.	Expressão de CD100 em HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) – imunocitoquímica de fluorescência.....	110
9.	Expressão do RNAm de CD100 em HUVECs --- Real-Time RT-PCR ..	110
10.	Expressão protéica de CD100 em HUVECs -- Western Blot.....	112
11.	CD100 na aterosclerose - experimentos funcionais	113
12.	Expressão de plexina B1 e B2 em monócitos, macrófagos e células espumosas de PBMC por imunocitoquímica de fluorescência com dupla marcação	114
13.	Expressão de plexinas B1 e B2 em monócitos, macrófagos e células espumosas por Western Blot.....	117
14.	Adesão monócitos-células endoteliais	119
15.	Incorporação de LDLox	123
16.	Modulação de CD36 por CD100	125
	Discussão	127
	Conclusões	145
	Referências Bibliográficas	147
	Anexo I – Abreviações dos Aminoácidos.....	167
	Anexo II – Artigo submetido	168

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Imunohistoquímica para CD100 em placa aterosclerótica (A e B) e na carótida normal (C e D). Aumentos: 100x (A, C) e 400x (B, D). (dados Proj. FAPESP 03/13521-7).40
- Figura 2:** Estrutura das oito subclasses de semaforinas e de seus receptores. Adaptado de Takegahara *et al.*,2001..... 42
- Figura 3:** Estrutura de CD100/SEMA4D demonstrando uma sequência amino-terminal, o domínio Sema, o domínio imunoglobulina e uma pequena cauda citoplasmática. CD100 possui sítios de N-glicosilação, além de vários sítios consenso para a fosforilação de serinas no domínio citoplasmático. Embora seja uma proteína transmembrana, pode sofrer clivagem proteolítica produzindo a forma solúvel. Adaptado de Kumanogoh & Kikutani, 2001. 45
- Figura 4:** Imunohistoquímica peroxidase de placa de carótida marcadas com CD100 (A e C) e CD68 (B e D). Em ambas amostras, marcação na camada íntima, na área da estria gordurosa, ocupada por células espumosas. Aumentos: 100x (A e B) e 400x (C e D) (dados Proj. Pós-Doc FAPESP 03/13521-7). 79
- Figura 5:** Imunofluorescência representativa da dupla marcação de macrófagos com CD68 e CD100 em placa de carótida. A: núcleos corados em azul com DAPI; B: marcação verde de CD68 (FITC); C: marcação vermelha de CD100 (Alexa 660); e D: sobreposição das imagens. Aumentos: 200x..... 80
- Figura 6:** Imunohistoquímica peroxidase de placa de coronária com anti-CD100. A e C: placa estável; B e D: placa rota. Em ambas as amostras, marcação na camada íntima, na área gordurosa, ocupada por células espumosas, como observado em placas de carótida. Algumas células da camada média também apresentam marcação. Aumentos: 100x (A e B) e 400x (C e D). 81
- Figura 7:** Imunohistoquímica peroxidase de baço com diferentes marcadores. A: controle negativo; B: CD68; C: CD100, marcação principalmente fora do folículo, mostrando grande quantidade de macrófagos; Aumentos: 100x (B e C) e 400x (A). 82

Figura 8: Imunofluorescência representativa da dupla marcação de macrófagos com CD68 e CD100 em baço. A: núcleos corados em azul com DAPI; B: marcação vermelha de CD100 (Alexa 660); C: marcação verde de CD68 (FITC) e D: sobreposição das imagens. Aumentos: 200x.	83
Figura 9 : Macrófagos (A e C) e células espumosas (B e D) de células THP-1 (A e B) coradas com Scarlet R e de células de PBMC (C e D) coradas com Oil Red O e contra-coradas com hematoxilina (núcleo em azul). Aumentos: 400x (A e B) e 100x (C e D).....	86
Figura 10: Imunocitoquímica de fluorescência representativa da dupla marcação de macrófagos (THP1) com CD68 e CD100. A: marcação vermelha de CD100 (Alexa 660); B: marcação verde de CD68 (FITC); C: núcleos corados em azul com DAPI e D: sobreposição das imagens. Aumentos: 1000x.	87
Figura 11: Imunocitoquímica de fluorescência representativa da dupla marcação de células espumosas (THP1) com CD68 e CD100. A: marcação vermelha de CD100 (Alexa 660); B: marcação verde de CD68 (FITC); C: núcleos corados em azul com DAPI e D: sobreposição das imagens. Aumentos: 1000x.	88
Figura 12: Imunocitoquímica de fluorescência representativa da dupla marcação de monócitos (A-D), macrófagos (E-H) e células espumosas (I-L) de PBMC aderidos em lamínula com CD68 e CD100. A, E, F: núcleos corados em azul com DAPI; B, F e J: marcação verde de CD68 (Alexa 488); C, G e K: marcação vermelha de CD100 (Alexa 660); D, H e L: sobreposição das imagens. Aumentos: 400x (A-H), 1000x (I-L).	89
Figura 13: A. Micrografia eletrônica de transmissão representativa da marcação de CD100 em carótida com placa de ateroma, na região de estria gordurosa. Observa-se o citoplasma de uma foam cell, com núcleo e nucléolo; B. Em detalhe, uma região do citoplasma da célula espumosa mostrando marcação nas vesículas lipídicas e também na membrana. C: controle negativo sem anticorpo primário. Aumentos: 2550x (A), 30000x (B e C).....	90
Figura 14: Razão entre os valores da expressão de CD100 em macrófagos THP-1 estimulados com LPS ou vitamina D por 6, 12, 24, 48 e 72h e não estimulados, normalizados pela expressão de GAPDH. Representativo de 4 experimentos.	91

Figura 15: Razão entre os valores normalizados da expressão de IL-1 β em macrófagos de THP-1 estimulados com vitamina D ou LPS durante 6, 12 ou 24 horas e não estimulados, utilizando o gene controle GAPDH.	92
Figura 16: Razão entre os valores da expressão de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas, estimulados ou não (+ ou -) com IFN- γ e normalizados pela expressão de GAPDH. O gráfico de dispersão foi escolhido para mostrar a grande variabilidade entre as amostras. Médias (vermelho) e os desvios-padrão (T) representativos de 5 experimentos...	94
Figura 17: Razão entre os valores da expressão de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas, estimulados ou não (+ ou -) com IFN- γ e normalizados pela expressão de GAPDH. Médias e desvios-padrão representativos de 5 experimentos.	95
Figura 18: Razões da expressão de CD100 ao longo da diferenciação de monócitos para macrófagos e de macrófagos para células espumosas (THP-1), em células estimuladas (+) ou não (-) com IFN- γ relativas à expressão de GAPDH. O gráfico de dispersão foi escolhido para mostrar a grande variabilidade entre as amostras. Médias (vermelho) e os desvios-padrão (T) de 5 experimentos.	96
Figura 19: Gráficos comparativos de 2 experimentos (2 indivíduos) mostrando a razão da expressão de CD100 em macrófagos de PBMC estimulados com vitamina D ou LDLox nos períodos de 10, 18, 24 ou 34 horas sobre não estimulados, normalizados com GAPDH. Média e desvios-padrão são mostrados.....	97
Figura 20: Razão da expressão de IL-1 β em macrófagos de PBMC estimulados com vitamina D ou LDLox (10, 18, 24 ou 34h) sobre não estimulados, normalizados com GAPDH e ciclofilina.....	98
Figura 21: Razão entre os valores da expressão de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas de PBMC, estimulados ou não (+ ou -) com IFN- γ por 24h e normalizados pela expressão de GAPDH. O gráfico de dispersão foi escolhido para mostrar a grande variabilidade entre as amostras. Médias (em vermelho) e desvios-padrão (T) representativos de 7 experimentos.	99

Figura 22: Razão entre os valores da expressão de STAT-1 em monócitos, macrófagos e células espumosas de PBMC, estimulados ou não (+ ou -) com IFN- γ por 24h e normalizados pela expressão de GAPDH. Médias e desvios-padrão representativos de 7 experimentos.....	100
Figura 23: Razão entre os valores da expressão de CD100 ao longo da diferenciação entre monócitos, macrófagos e células espumosas de PBMC, estimulados ou não (+ ou -) com IFN- γ por 24h e normalizados pela expressão de GAPDH. O gráfico de dispersão foi escolhido para mostrar a grande variabilidade entre as amostras. Médias (em vermelho) e desvios-padrão (T) representativos de 7 experimentos.....	101
Figura 24: Expressão de CD100 e β -actina em linfócitos T estimulados com beads CD3/CD28 (1), monócitos (2), macrófagos (3) e células espumosas (4) de PBMC e monócitos (5), macrófagos (6) e células espumosas (7) de THP-1 estimulados (5b, 6b e 7b) ou não com IFN- γ por 24h.	102
Figura 25: Densitometria das bandas de CD100 e β -actina, mostrando a razão CD100/ β -actina para cada tipo celular. Média e desvio-padrão de 3 experimentos são apresentados (*p<0.001, two-way ANOVA).	103
Figura 26: Macrófagos do tipo M2 (A) e M1 (B) de PBMC. M2 possuem morfologia arredondada, enquanto M1 são fusiformes. Aumentos: 200x.....	104
Figura 27: Razões entre a expressão de CD100 em macrófagos M1 ou M2 de PBMC e macrófagos não estimulados, utilizando o gene controle GAPDH como normalizador. Representativo de 4 experimentos.	105
Figura 28: Razões entre a expressão de CD100 em macrófagos de PBMC estimulados com protocolos distintos e macrófagos não estimulados, utilizando o gene controle GAPDH como normalizador. Representativo de 3 experimentos, com os valores de média e desvio-padrão representados.....	106
Figura 29: Imunohistoquímica peroxidase para CD100 em vaso normal, mostrando positividade no endotélio. Aumentos: A: 100x, B: 400x.....	108

Figura 30: Imunohistoquímica peroxidase para plexina B1 em vaso normal, mostrando positividade em células endoteliais, tanto do próprio vaso (A), quanto da vasa vasorum (B). Aumentos: 400x.....	109
Figura 31: Imunocitoquímica de fluorescência representativa da marcação de CD100 em HUVECs aderidas em lamínula. Observa-se marcação vermelha de anti-CD100 e anti-IgG Alexa 660 (B) e a coloração azul de núcleos com DAPI (A). Sobreposição das imagens em (C). Aumentos: 100x.....	110
Figura 32: Razão entre os valores da expressão de CD100 em HUVECs não estimuladas/estimuladas com LPS e TNF- α por 6h, utilizando o gene controle GAPDH como normalizador. Médias (em vermelho) e desvios-padrão (T) de 3 experimentos são apresentados.....	111
Figura 33: Expressão de CD100 e β -actina em HUVECs estimuladas (4) ou não (3) com TNF- α e LPS por 6h e de linfócitos T estimulados (2) ou não (1) com beads CD3/CD28. Representativo de 3 experimentos	112
Figura 34: Densitometria das bandas de CD100 e β -actina, mostrando a razão das bandas de 150kDa e 120kDa e soma das duas bandas de CD100/ β -actina para cada tipo celular. Média e desvio-padrão de 3 experimentos (*p<0.001, two-way ANOVA).....	113
Figura 35: Desenho esquemático representando o acoplamento de duas vias que possivelmente ocorre entre monócitos e células endoteliais através de CD100 e as plexinas B2 (?) e B1, respectivamente. Adaptado de Kumanogoh & Kikutani, 2001.	114
Figura 36: Imunocitoquímica por fluorescência com dupla marcação representativa de monócitos (A-D), macrófagos (E-H) e células espumosas (I-L) de PBMC. B, F, J: marcação vermelha (Alexa 660) de plexina B1; C, G, K: marcação verde (Alexa 488) de CD68; A, E e C: marcação nuclear azul com DAPI; D, H, L: sobreposição das imagens. Aumentos: A-D: 200x; E-L: 1000x.	115
Figura 37: Imunocitoquímica por fluorescência com dupla marcação representativa de monócitos (A-D), macrófagos (E-H) e células espumosas (I-L) de PBMC. B, F, J: marcação vermelha (Alexa 633) de plexina B2; C, G, K: marcação verde (Alexa 488) de CD68; A, E e	

C: marcação nuclear azul com DAPI; D, H, L: sobreposição das imagens. Aumentos: A-D: 200x; E-H: 400x, I-L: 1000x	116
Figura 38: Expressão de plexina B1 e β -actina em HUVECs (1), monócitos PBMC (2), monócitos PBMC ativados com IFN- γ por 24h (3) e monócitos THP-1 (4).	117
Figura 39: Expressão de plexina B2 e β -actina em linfócitos B (1), monócitos PBMC (2), monócitos PBMC ativados com IFN- γ por 24h (3) e monócitos THP-1 (4).	118
Figura 40: Densitometria das bandas de plexina B2 e β -actina, mostrando a razão plexinaB2/ β -actina para cada tipo celular. Valores de média e desvio padrão para 3 experimentos.	118
Figura 41: Poços com células endoteliais aderidas e células THP-1 coradas com BCECF (verde) aderidas às células endoteliais. A. Representativo de campo com bloqueio de plexina B2 (condição 4). B. Representativo de campo sem bloqueio (condição 10). Aumento: 100x.	120
Figura 42: Gráfico representativo do número de monócitos THP-1 aderidos em HUVECs estimuladas com LPS e TNF- α por 6h, colocadas sob diferentes condições de bloqueio de CD100 e seu receptor. Cada barra representa a média do número de células contadas em cada poço da triplicata. Representativo de 5 experimentos.	121
Figura 43: Razão entre o número médio de células aderidas tratadas com diferentes condições de bloqueio (1-9) sobre células aderidas sem bloqueio (10). Médias e desvios-padrão representativos de 4 experimentos.	122
Figura 44: Gráfico representativo da incorporação de LDLox por macrófagos de PBMC na presença ou não de CD100. Representativo de 5 experimentos.	124
Figura 45: Médias e desvios-padrão da D.O. da incorporação de LDLox em células espumosas. Representativo dos 5 experimentos.	125
Figura 46: Histogramas representativos da expressão de CD36 em macrófagos (acima) e células espumosas (abaixo), mostrando uma menor expressão do receptor após incubação com CD100 em termos de porcentagem de células positivas e média de intensidade de fluorescência (MIF).	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Semaforinas e plexinas encontradas como possíveis candidatas para os fagos analisados. Em negrito, os aminoácidos idênticos entre a sequência da semaforina/plexina e o peptídeo do fago; entre parênteses o nome do fago correspondente. (dados Proj. FAPESP 03/13521-7).....	39
Tabela 2: Volumes de cada reagente utilizado na dosagem de LDL incorporado	68

RESUMO

Luque, MCA. Papel de CD100 na patogênese da aterosclerose [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 155p.

A aterosclerose é uma doença degenerativa crônica dos vasos, com conseqüências clínicas agudas que incluem o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral, resultantes geralmente da ruptura da placa e trombose. É atualmente reconhecida como de característica inflamatória, iniciada e propagada no contexto da hipercolesterolemia.

Um trabalho de nosso grupo utilizou técnicas de *phage display* para comparar placas ateroscleróticas e carótidas normais objetivando a busca de proteínas alteradas potencialmente envolvidas na patogênese da doença. Diversas semaforinas e plexinas (receptores de semaforinas) foram identificadas dentre elas a plexina B1, que possui alta afinidade por CD100, sugerindo assim uma concentração aumentada de CD100 na placa aterosclerótica. CD100 foi a primeira semaforina descrita no sistema imune e a única até hoje descrita como possuidora de duas formas de funcionalidades distintas, sendo uma de membrana (mCD100) e outra solúvel (sCD100). Neste trabalho demonstramos a expressão da semaforina CD100 em macrófagos e células espumosas em placas ateroscleróticas humanas, assim como seu padrão de expressão ao longo da diferenciação monócito-macrófago-célula espumosa, e sob estímulos distintos. Além disso, identificamos pela primeira vez o receptor que medeia suas atividades nessas células, a plexina B2. Adicionalmente, detectamos também pela primeira vez

detectamos a expressão de CD100 em células endoteliais teciduais e cultivadas *in vitro*, o que sugere um papel significativo da semaforina em fenômenos vasculares. Com base nessas observações e nos resultados de experimentos de bloqueio de adesão constatamos que CD100 pode atuar na fase mais precoce da aterosclerose, como uma molécula de adesão envolvida na ligação entre monócitos e células endoteliais. Verificamos ainda que CD100 diminui a captação de LDLox em macrófagos e células espumosas.

Poucos estudos relatam a presença ou possível atividade biológica de CD100 tanto na aterosclerose quanto em macrófagos. Devido às já estabelecidas ações no sistema imune, acreditamos que a expressão diferencial dessa semaforina desempenha um papel amplificador na patogênese da aterosclerose. Posteriormente, essa proteína poderá servir como alvo de inibição da progressão da doença e de suas complicações.

Descritores: 1. aterosclerose; 2. CD100; 3. SEMA4D; 4. célula espumosa; 5. molécula de adesão; 6. LDL oxidado.

SUMMARY

Luque, MCA. Role of CD100 in the pathogenesis of atherosclerosis [thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2010. 155p.

Atherosclerosis is a chronic degenerative disease affecting vessels, with acute clinical consequences that include myocardium infarction or stroke, generally resulting from plaque rupture and thrombosis. It is now recognized as an inflammatory disease, initiated and developed in a hipercholesterolemic context.

A work in our lab has used phage display techniques to compare atherosclerotic plaques and normal carotids, searching for altered proteins potentially involved in the pathogenesis of the disease. Many semaphorins and plexins (semaphorin receptors) have been identified, among which plexin B1, a high affinity receptor for CD100, suggesting an augmented level of CD100 in the atherosclerotic plaques. CD100 is the first semaphorin described in the immune system, and the only to possess two forms with distinct functionalities, being one associated to the membrane, mCD100, and another soluble form, sCD100. In the present work we have demonstrated CD100 expression in macrophages and foam cells of human atherosclerotic plaques, as well as its pattern of expression along monocyte-macrophage-foam cell differentiation and under distinct stimuli. Furthermore, we have identified for the first time the receptor involved in CD100 activities in these cells, namely plexin B2. Additionally, we have detected CD100 expression in tissue as well as in *in vitro* cultured endothelial cells, also for the first time. According to these informations and adhesion blockage experiments we have shown that CD100 may act in the earliest phase of the establishment of atherosclerosis, as an adhesion

molecule involved in monocyte-endothelial cell association. We have also verified that CD100 diminishes the intake of oxLDL in macrophages and foam cells.

Only a few studies describe the presence or possible biological activity of CD100 in atherosclerosis or macrophages. Since the molecule has been shown to participate in the immune system, we believe that the differential expression of this semaphorin plays an amplifying role in the pathogenesis of atherosclerosis. In the future, this protein could act as an inhibition target of the disease progression as well as its complications.

Descriptors: 1. atherosclerosis; 2. CD100; 3. SEMA4D; 4. foam cell; 5. adhesion molecule; 6. oxidized LDL.

INTRODUÇÃO

1. Aterosclerose

A aterosclerose (do grego, *athero-* mingau e *sclerosis-* endurecimento) é uma doença degenerativa crônica que ocorre em artérias de médio e grande calibre, principalmente em locais de “stress” hemodinâmico. É a causa primária de doenças cardiovasculares e infarto (em grande parte resultantes da ruptura da placa e trombose (Lusis, 2000)), que por sua vez representam a principal causa de morte por doença no mundo (Hansson, 2005), bem como no Brasil, Estados Unidos, Europa e boa parte da Ásia (Ross, 1999). Somente no Brasil cerca de 400 mil mortes associadas a doenças cardiovasculares foram registradas pelo DATASUS no período de junho/2009 até julho/2010. Estimativas para os próximos quinze anos continuam apontando essas doenças como principal causa de morte global, devido à sua crescente prevalência em países em desenvolvimento e na Europa oriental, e à grande incidência de obesidade e diabetes nas sociedades ocidentais (Hansson, 2005).

A aterosclerose é uma doença multifatorial de grande complexidade e estudos epidemiológicos realizados nos últimos 50 anos revelam inúmeros fatores de risco, que podem ter natureza genética ou ambiental (Lusis, 2000). Altas concentrações sangüíneas de LDL (lipoproteína de baixa densidade) constituem o principal fator de risco, sendo condição *sine qua non* para a sua manifestação clínica (Steinberg, 2002). No entanto, combinações com outros fatores como altas concentrações sangüíneas de homocisteína, baixas concentrações sangüíneas de HDL (lipoproteína de alta densidade) (Lusis, 2000), obesidade (Lusis, 2000), fumo, hipertensão, diabetes

mellitus, sexo, alterações genéticas e presença de agentes infecciosos podem participar do desencadeamento e/ou progressão da doença (Ross, 1999).

As complicações clínicas da aterosclerose podem surgir de estenoses que bloqueiam parcialmente o fluxo sanguíneo; no entanto, os eventos clínicos mais severos surgem da ruptura da placa, que expõe material pró-trombótico no sangue, causando a formação de trombos que podem resultar em uma oclusão local súbita da artéria (Hansson e Libby, 2006). Algumas das consequências mais graves do desprendimento do trombo formado são o infarto do miocárdio, derrame e outros ataques isquêmicos transitórios; pode resultar ainda em comprometimento da função renal, hipertensão e aneurismas da aorta abdominal (Hansson e Libby, 2006).

Embora a hipercolesterolemia pareça ser o fator-chave no desenvolvimento da doença em aproximadamente 50% dos pacientes acometidos (Ross, 1999), pesquisas recentes indicam que a inflamação é um dos principais fatores moduladores da aterogênese (Binder *et al.*, 2002; Libby *et al.*, 2002), sendo principalmente evidenciada pela presença de um elevado número de células imunes desde os estágios iniciais da doença e consequente produção de moléculas efetoras, que aceleram e/ou retardam a progressão das lesões (Hansson, 2005). Trata-se de uma doença caracterizada por uma intensa atividade imunológica, envolvendo a formação de lesões arteriais caracterizadas por inflamação, acúmulo de lipídeos, morte celular e fibrose.

A descoberta de que a inflamação é um evento imprescindível para o estabelecimento da doença e que também participa da ruptura da placa mudou completamente a visão da patogênese da aterosclerose (Binder *et al.*, 2002). De fato, a doença é hoje reconhecida como de característica inflamatória, não resultando

simplesmente do acúmulo arterial de lipídeos (Libby *et al.*, 2002; Ross, 1999). No entanto, a patogênese da aterosclerose não deve ser dicotomizada: trata-se de uma doença inflamatória iniciada e propagada no contexto da hipercolesterolemia (Steinberg, 2002). Acredita-se que mecanismos imunes associam-se a fatores de risco metabólicos para iniciar e manter as lesões (Hansson, 2005).

Alguns trabalhos defendem a participação de linfócitos T no início do processo aterosclerótico, estabelecendo assim uma origem auto-imune para a doença. Até o momento, três proteínas foram reconhecidas como auto-antígenos: HSPs (*heat shock proteins*, proteínas de choque térmico) (Wick *et al.*, 2001; Pockley, 2002), oxLDL (McMurray *et al.*, 1993; Skalen *et al.*, 2002) e complexos formados entre oxLDL e β 2-GPI (β 2-glicoproteína I) (Matsuura *et al.*, 2003). Uma dessas linhas postula que a imunidade humoral e celular frente à HSP60 é o principal evento desencadeador dos primeiros estágios da aterosclerose (Wick *et al.*, 2004). Células endoteliais, quando submetidas aos fatores de risco clássicos da aterogênese expressam HSP60, que por sua vez pode servir como alvo de uma reação cruzada com HSP microbiana pré-existente ou reações auto-imunes induzidas por HSP60 autóloga bioquimicamente alterada (Wick *et al.*, 2004). As células endoteliais podem ainda se ligar à HSP60 microbiana ou autóloga via receptores Toll, o que constitui outra possibilidade de ação de mecanismos efetores imunológicos inatos ou adaptativos (Wick *et al.*, 2004). Já os complexos oxLDL- β 2-GPI são avidamente internalizados por macrófagos via fagocitose mediada por auto-anticorpos anti- β 2-GPI (Kobayashi *et al.*, 2001).

2. Estabelecimento da doença

Alterações morfológicas

Em humanos, inicialmente ocorrem acúmulos de colesterol na parede arterial que morfológicamente se apresentam como espessamentos focais da camada íntima. Esses acúmulos são compostos por células imunes e lipídeos, formando as estrias gordurosas. Essa lesão inicial é principalmente caracterizada pela abundância em macrófagos repletos de lipídeos intracelulares ou “*foam cells*” (células espumosas), sendo também possível a observação de infiltrados de linfócitos T. A estria gordurosa, embora clinicamente pouco importante, pode evoluir para as lesões mais complicadas. Em um segundo momento, a morte de um grande número de células espumosas resulta na formação de um centro necrótico rico em colesterol que, posteriormente, se torna envolto por uma capa fibrosa constituída células musculares lisas e proteínas de matriz extracelular, principalmente colágeno (Jonasson *et al.*, 1986), secretadas por essas células (Li & Glass, 2002). Com o tempo, as placas de ateroma se desenvolvem e ganham características específicas. Placas maduras possuem uma estrutura mais complexa e heterogênea, sendo observados em alguns casos pontos focais de deposição de cálcio (mineralização). Com a progressão da lesão, ocorre um remodelamento do vaso, causando estenose luminal e sintomatologia clínica (Binder *et al.*, 2002). A eventual ruptura desta lesão avançada resulta em complicações trombóticas adicionais (Binder *et al.*, 2002).

Alterações celulares

A nível celular, a aterosclerose é caracterizada pelo recrutamento de monócitos e linfócitos para a parede arterial modificada. O evento desencadeador desse processo é o acúmulo de oxLDL (LDL oxidado), que por sua vez estimula as células endoteliais subjacentes a produzir uma série de moléculas pró-inflamatórias,

incluindo moléculas de adesão como VCAM-1 (molécula de adesão de célula vascular-1), proteínas quimiotáticas como MCP-1 (proteína quimiotática de monócito-1) e fatores de crescimento como M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos), inibindo também a produção de óxido nítrico, que possui diversos efeitos anti-aterogênicos (Lusis, 2000). Monócitos e linfócitos possuem receptor para VCAM-1 e aderem aos sítios ativados. As quimiocinas produzidas na camada íntima estimulam as células sangüíneas aderidas a migrar através das junções celulares para o espaço subendotelial (Libby *et al.*, 2002). O M-CSF induz a entrada de monócitos na parede arterial e conseqüente diferenciação em macrófagos, passo crítico no desenvolvimento da aterosclerose. Além disso, um infiltrado de células T CD4⁺ Th1 está presente nas lesões ateroscleróticas iniciais; essas células efetoras produzem IFN- γ (interferon-gama), citocina ativadora de macrófagos, aumentando nestes a eficiência da apresentação de antígenos e a produção de TNF- α (fator de necrose tumoral α) e IL-1 β (interleucina-1 β) (Hansson, 2005). Monócitos recém recrutados da circulação sangüínea pelo endotélio ativado se diferenciam e se somam aos macrófagos residentes. Essas células ativadas modificam o LDL seqüestrado no espaço subendotelial (por processos de oxidação, principalmente) e expressam receptores do tipo *scavenger*, que reconhecem essas formas modificadas de LDL,

transformando-se em células espumosas. O acúmulo dessas células resulta na formação da estria gordurosa e das lesões ateroscleróticas subsequentes.

Diversas citocinas são produzidas pelos diferentes tipos celulares presentes nas placas. Atuando sinergicamente, essas citocinas estimulam a produção, amplificada em cada passo, de muitas moléculas inflamatórias e citotóxicas tanto em macrófagos quanto em células vasculares, estabelecendo um ciclo promotor da aterogênese (Hansson, 2005). No entanto, algumas citocinas como IL-10 e TGF- β (fator de crescimento transformador β) assim como anticorpos produzidos por linfócitos B atuam como possíveis reguladores do processo, possuindo atividade anti-aterosclerótica (Hansson, 2005). As citocinas produzidas pelas células T induzem ainda a produção de IL-6 e CRP (*C-reactive protein*, proteína C-reativa), participantes da inflamação e que podem ser detectadas na circulação periférica. Assim, a ativação focal de um número limitado de células imunes pode iniciar uma potente cascata inflamatória, tanto local como sistêmica. A mensuração de níveis plasmáticos de CRP é particularmente útil no diagnóstico clínico de lesões avançadas (Libby *et al.*, 2002; Hansson, 2005).

3. Composição celular da placa

As placas ateroscleróticas humanas são muito heterogêneas, e contêm principalmente macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, células musculares lisas, matriz extracelular, lipídeos e debris celulares (Jonasson *et al.*, 1986). Outros tipos celulares encontrados são células dendríticas (DCs), mastócitos, poucos linfócitos B e possivelmente células NKT. As células imunes presentes encontram-se ativadas e produzem moléculas pró-inflamatórias (Hansson e Libby, 2006).

Diversos estudos enfatizam a heterogeneidade de células inflamatórias envolvidas na aterogênese, e detalhes sobre o envolvimento de subpopulações distintas de leucócitos na patologia dessa doença foram recentemente descritos (Weber *et al.*, 2008). O papel central dos macrófagos advém de sua abundância nas placas de ateroma; adicionalmente, o reconhecimento gradual de sua importância na aterogênese constitui a ponte entre o envolvimento do colesterol e a biologia da doença.

4. Monócitos e macrófagos

Os macrófagos são as células mais abundantes nas lesões ateroscleróticas, estando presentes desde eventos iniciais até os estágios mais tardios (Hansson e Libby, 2006), o que justifica um especial interesse nesse tipo celular. Nesse contexto, a avaliação das moléculas produzidas por essas células, assim como sua função dentro do ambiente subendotelial pode ser de grande utilidade para uma maior compreensão dos fatores determinantes no estabelecimento e progressão da doença. Essas células apresentam um fenótipo bastante heterogêneo e são originadas de monócitos circulantes, que por sua vez também apresentam particularidades.

Monócitos circulantes normalmente infiltram tecidos e órgãos linfóides, onde se diferenciam em macrófagos ou subpopulações específicas de células dendríticas (DCs). Em condições homeostáticas, os monócitos trafegam para os tecidos mantendo as populações de macrófagos teciduais, mas também o fazem em resposta a estímulos inflamatórios, auxiliando nas respostas imunes. No entanto, a retenção excessiva dessas células nestes tecidos pode contribuir para a patogênese de desordens inflamatórias como a aterosclerose (Tacke e Randolph, 2006).

Estudos realizados em camundongos demonstraram que monócitos apresentam diferenças funcionais entre subpopulações caracterizadas principalmente por marcadores de superfície. Essas subpopulações parecem ser comprometidas a destinos distintos enquanto ainda no sangue, e exibem mecanismos diferentes de recrutamento e funções na placa (Swirski *et al.*, 2007; Tacke *et al.*, 2007). O mesmo é observado em humanos (com diferenças nos marcadores de superfície celular quando comparados às subpopulações monocíticas murinas), sendo que monócitos CD14^{hi}CD16⁻ infiltram-se mais facilmente nos locais de lesão (monócitos inflamatórios, de vida curta) enquanto que monócitos CD14⁺CD16⁺ possuem função de patrulhamento para manutenção da homeostase (monócitos residentes). No entanto, a contribuição relativa de cada subpopulação para a aterogênese ainda não está clara. Além disso, uma vez diferenciados, esses monócitos também dão origem a macrófagos polarizados, M1 e M2 (Duan *et al.*, 2009). Macrófagos M1 são diferenciados na presença de estímulos como IFN- γ e outras citocinas do perfil Th1. Em contrapartida, quando monócitos são estimulados com citocinas Th2 (IL-4 e IL-13) eles se tornam macrófagos M2, de natureza anti-inflamatória, promovendo fibrose e associados com processos de reparo tecidual (Gordon, 2003). Ainda não está claro até que ponto essas subpopulações se diferenciam de precursores distintos ou se surgem por interconversão (Arnold *et al.*, 2007), no entanto é bem provável que ambas subpopulações atuem nas diferentes fases da doença.

Em linhas gerais, os macrófagos são células que apresentam alta capacidade de fagocitose de patógenos, produção de citocinas, proteases e espécies reativas de oxigênio, e são ainda células apresentadoras de antígenos, possuindo assim atividades importantes tanto na imunidade inata quanto na adquirida (Li & Glass,

2002). Embora essas funções tenham sido descritas em condições de defesa do hospedeiro, elas são também centrais nos mecanismos pelos quais essas células contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose (Li & Glass, 2002). Os macrófagos contribuem para o crescimento e vulnerabilidade da placa através da secreção de inúmeros fatores de crescimento, citocinas e metaloproteases e também pela interação com células endoteliais, linfócitos e células musculares lisas (Trogan *et al.*, 2002).

Macrófagos presentes na camada íntima do vaso fagocitam avidamente LDL, principalmente oxidado, e podem seguir destinos distintos, que vão desde promover dano vascular local através da secreção de mediadores, até a apoptose celular que pode contribuir para a progressão do ateroma através da adição de debris antigênico e trombogênico à lesão (Rocha&Libby, 2009). Além disso, os macrófagos podem apresentar partículas provenientes do processamento de LDL oxidado como antígenos para linfócitos T recrutados para o sítio da lesão, uma atividade que reforça o papel crucial de lipídeos na aterosclerose não somente na resposta imune inata, mas também em aspectos imunológicos adaptativos (Rocha&Libby, 2009).

Adicionalmente, macrófagos de diversos fenótipos são encontrados nas placas de ateroma. Dentre eles destacam-se os macrófagos inflamatórios infiltrantes da camada íntima do vaso e as células espumosas diferenciadas no espaço subendotelial (Hansson e Libby, 2006). O colesterol acumulado nessas células é proveniente de lipoproteínas que sofreram oxidação ou modificação enzimática no tecido, o que as torna mais passíveis da fagocitose por macrófagos ativados que expressam receptores *scavenger*, uma família de proteínas que inclui CD36, CD68, CXCL16, LOX1 (*lectin-type oxidized low-density lipoprotein receptor 1*), SR-A (*scavenger receptor*

A) e SR-B1 (Steinberg, 1997; Binder *et al.*, 2002). Esses receptores reconhecem padrões (*PRRs* - *pattern-recognition receptors*) que medeiam a internalização e degradação lisossomal de partículas fagocitadas, tendo um importante papel na imunidade inata (Peiser *et al.*, 2002). Na aterosclerose, a internalização acelerada de LDL leva à formação da estria gordurosa, passo crítico no estabelecimento da placa de ateroma (Binder *et al.*, 2002). Curiosamente, a fagocitose de partículas de LDL em si não leva diretamente a inflamação, mas pode levar a apresentação desses antígenos via MHC II, conectando assim a imunidade inata e adaptativa neste processo (Nicoletti *et al.*, 1999). Por outro lado, alguns receptores como os Toll (TLRs) podem elicitar repostas inflamatórias diretamente (Janeway e Medzhitov, 2002), e são expressos principalmente por macrófagos e células endoteliais (Edfeldt *et al.*, 2002).

Embora na aterosclerose diversos aspectos fenotípicos e funcionais de macrófagos tenham sido explorados, ainda restam muitos questionamentos, principalmente no que se refere aos mecanismos envolvidos na diferenciação das células espumosas. Estudos de populações de macrófagos *in vitro* têm sido muito informativos e auxiliam na análise de diversos fenômenos relacionados à biologia dessas células. Mais especificamente, tais estudos têm sido muito úteis na compreensão dos mecanismos subjacentes a formação das placas de ateroma. Diversos protocolos de diferenciação a partir de monócitos circulantes vêm sendo testados, procurando mimetizar o que ocorre *in vivo* com o maior grau de fidelidade. A diferenciação com M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) consiste em um dos métodos mais convencionais (Brugger *et al.*, 1991), mas outros protocolos testados envolvem moléculas como a vitamina D (Kreutz e Andreessen, 1990). A

vitamina D induz a diferenciação de monócitos para macrófagos *in vitro* e também sua ativação, promovendo a expressão de moléculas como a fibronectina e lisozima e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 (Kreutz e Andreessen, 1990). Fagócitos humanos são capazes de produzir o metabólito ativo da vitamina D, o 1,25-dihidroxi-vitaminaD₃, além de expressarem seu receptor, sendo assim alvos da ação desta molécula (Kreutz *et al.*, 1993).

Apesar de todos os avanços na cultura de macrófagos, uma limitação significativa se deve à dificuldade de obtenção de populações puras de monócitos a partir de PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*). Por esse motivo, foram desenvolvidas linhagens celulares que apresentam características semelhantes aos macrófagos convencionais. Dentre elas, a linhagem leucêmica humana THP-1 é a que mais se aproxima de macrófagos derivados de monócitos de PBMC, principalmente quando comparada a outras linhagens de células mielóides humanas como a HL-60, U937, KG-1 ou HEL (Auwers, 1991). Devido a essas características, a linhagem THP-1 fornece um modelo valioso para o estudo de mecanismos envolvidos na diferenciação de macrófagos, e para explorar a regulação de genes específicos de macrófagos que se relacionam com as funções fisiológicas ou patológicas apresentadas por essas células (Auwers, 1991).

5. Linfócitos T

Linfócitos T modulam fortemente a resposta imune na aterogênese, embora presentes em menor número nas placas. Através da interação com macrófagos e do conseqüente reconhecimento de antígenos apresentados por essas células, linfócitos T assumem programas distintos de ativação, sendo que a diferenciação de células

Th1 ou Th2 afeta a evolução da placa de diferentes maneiras (Hansson & Libby, 2006; Hansson, 2005). A preponderância do perfil Th1 foi evidenciada tanto na aterosclerose murina quanto na humana, caracterizada pela secreção de mediadores pró-inflamatórios e dano tecidual (Frostegard *et al.*, 1999; Hansson, 2005; Hansson & Libby, 2006). De fato, interferon- γ (IFN- γ), que é uma citocina clássica de linfócitos Th1, induz a ativação de macrófagos e conseqüentemente a secreção de proteases, mediadores vasoativos como óxido nítrico (NO) e outras citocinas pró-inflamatórias como TNF, perpetuando a inflamação local (Gordon, 2003). O IFN- γ também inibe fortemente a proliferação de alguns tipos celulares como células endoteliais e células musculares lisas, assim como a produção de colágeno por essas células (Friesel *et al.*, 1987; Amento *et al.*, 1991; Hansson *et al.*, 1998), contribuindo assim para a instabilidade da placa. Essas e outras propriedades do IFN- γ , juntamente com o achado de que camundongos deficientes em IFN- γ ou em seu receptor desenvolvem lesões ateroscleróticas muito reduzidas (Gupta *et al.*, 1997; Buono *et al.*, 2003), evidenciam o importante papel de linfócitos Th1 e sua conseqüente produção de IFN- γ como um potente mediador pró-aterogênico.

6. Endotélio

Como já se sabe há pelo menos duas décadas, a aterosclerose é iniciada por uma disfunção endotelial, que resulta no tateamento e posterior rolamento de leucócitos ao longo do endotélio, por meio de moléculas de adesão expressas na superfície dessas células (Paez *et al.*, 2005). A expressão das moléculas de adesão, que definem o tipo celular a ser recrutado (Butcher, 1991), é induzida e regulada por citocinas liberadas no *milieu* (Mehta *et al.*, 1998). Assim, a formação de lesões

ateroscleróticas características é secundária a um mecanismo de migração altamente regulado de monócitos e linfócitos sangüíneos para a camada íntima arterial, o que demonstra o papel significativo das células endoteliais no desenvolvimento da doença (Steinberg, 2002; Dzau *et al.*, 2002; Mehta *et al.*, 1998; Flores-Romo *et al.*, 1993). De maneira geral, o endotélio vascular está criticamente envolvido na resposta biológica à inflamação, por consistir na interface entre o sangue e todos os demais tecidos. Sendo assim, a célula endotelial tem um papel central na determinação e manutenção de reações subjacentes a vários estímulos inflamatórios (Mehta&Li, 1999). O motivo pelo qual as células endoteliais respondem de maneira tão heterogênea aos diversos estímulos ainda é desconhecido (Ribatti *et al.*, 2002). No entanto, em modelos animais a super-expressão de VCAM-1 e ICAM-1 foi observada em áreas susceptíveis ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Iiyama *et al.*, 1999). Ao longo dos anos tem havido um grande esforço para compreensão da heterogeneidade das células endoteliais e sua contribuição tanto na manutenção de processos adaptativos como no desenvolvimento de desordens restritas a leitos vasculares específicos (Cines *et al.*, 1998).

Na aterosclerose, evidências mostram que tanto estímulos bioquímicos como citocinas inflamatórias quanto forças mecânicas fluidas regulam aspectos chave da função endotelial (Gimbrone *et al.*, 2000). O *shear stress* pode ser de natureza laminar em pontos não bifurcados da árvore vascular, mas é de natureza turbulenta e de fluxo reverso nos pontos de bifurcação (Gimbrone *et al.*, 2000). O *shear stress* laminar (LSS) induz a expressão de produtos gênicos específicos como a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que confere propriedades anti-inflamatórias e anti-trombóticas ao endotélio, tendo assim um efeito atero-protetor (Topper *et al.*, 1996;

Lin *et al.*, 2000). A habilidade do fluxo laminar em induzir fatores genéticos que forneçam propriedades favoráveis ao endotélio é particularmente relevante em estados inflamatórios como a aterosclerose (Libby, 2002; Traub&Berk, 1998). De fato, as lesões ateroscleróticas se desenvolvem preferencialmente em pontos de ramificação que não estão submetidos ao LSS (Gimbrone *et al.*, 2000; Libby, 2002; Garcia-Cardena *et al.*, 2001). Essas regiões normalmente apresentam níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios como NF- κ B e moléculas de adesão (Hajra *et al.*, 2000; Iiyama *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1993).

Assim como para macrófagos, estudos *in vitro* auxiliam na análise funcional e da biologia das células endoteliais. Até o momento, a apreciação da função endotelial tem sido amplamente baseada no comportamento de células endoteliais umbilicais humanas (HUVECs). Essas células são primárias, isoladas de cordões umbilicais frescos e postas em cultura, onde se tornam aderentes. Embora muito utilizadas e de relativo fácil manuseio e manutenção, alguns pontos devem ser considerados. Primeiramente, essas células são derivadas de um tipo de vaso que raramente é afetado pela maioria das disfunções vasculares humanas mais comuns. Outro ponto é que geralmente condições de cultura não reproduzem exatamente a situação *in vivo*, tão fundamental para que a heterogeneidade dessas células seja corretamente acessada (Cines *et al.*, 1998). Embora muitos dados estejam disponíveis na literatura sobre a importância das células endoteliais no estabelecimento da aterosclerose, não existem relatos sobre a expressão da semaforina CD100 nessas células. Ao contrário, o transcrito (RNAm) dessa semaforina não foi detectado em células endoteliais (Bougeret *et al.*, 1992).

7. Phage Display

Com o objetivo de compreender mais profundamente as alterações envolvidas na formação da placa aterosclerótica e identificar proteínas aumentadas especificamente nessa doença que possam facilitar o entendimento sobre a patogênese, assim como aprimorar táticas para diagnóstico ou tratamento, foi elaborado um projeto em nosso laboratório que comparou proteínas de carótidas normais e placas ateroscleróticas (Proj. Pós-Doc FAPESP 03/13521-7).

O projeto utilizou a técnica de *phage display*, um sistema composto por fagos filamentosos que apresentam seqüências aleatórias de DNA inseridas em um dos genes de seu genoma, apresentando assim seqüências também randômicas de peptídios em uma das proteínas do seu capsídeo (pIII ou pVIII). A biblioteca de fagos (peptídeos) é incubada com o alvo de estudo (células, tecidos, receptores imobilizados, anticorpos purificados, entre outros) em um processo denominado *panning*, que permite a seleção de fagos expressando peptídeos que mimetizam ligantes naturais dessas moléculas-alvo (Barbas III *et al.*, 2001). Dessa maneira, o *phage display* permite a identificação de peptídios ligantes de virtualmente qualquer alvo biológico, tendo como um dos pontos fortes a rapidez de translocação dos resultados obtidos no laboratório para a clínica. Diversos marcadores órgão-específicos têm sido identificados de forma sistemática, na grande maioria utilizando *phage display in vivo* (Pasqualini & Ruoslahti, 1996, Rajotte *et al.*, 1998, Essler & Ruoslahti, 2002, Arap *et al.*, 2002).

Nesse projeto, a técnica de *phage display* com biblioteca de peptídios foi utilizada para selecionar clones de fagos que se ligam às placas ateroscleróticas, mas

não aos vasos normais. As seqüências de 38 dos fagos assim selecionados foram comparadas com bancos de dados para determinação da proteína que estava sendo “mimetizada” pelo fago, a qual reconheceria um ligante ou receptor da placa. Dentre as possíveis proteínas candidatas para esses fagos, diversas semaforinas e plexinas (receptores de semaforinas) foram identificadas (tabela 1).

Tabela 1: Semaforinas e plexinas encontradas como possíveis candidatas para os fagos analisados. Em negrito, os aminoácidos idênticos entre a seqüência da semaforina/plexina e o peptídeo do fago; entre parênteses o nome do fago correspondente. (dados Proj. FAPESP 03/13521-7).

PROTEÍNA	AAs IDÊNTICOS	FAGO
semaforina 3F	VRGRG	(c5)
semaforina 5A	GVWSC	(d5)
semaforina 5B	CAGNS	(c4)
semaforina W	ADVSSL	(g2)
semaforina 3D	CWDI	(g4)
semaforina Y	CAVR	(h3)
plexina C1	CEVRP	(d2)
plexina B3	HLYC	(e2)
plexina D1	GGAGRGD	(e5)
plexina B1	ELGC	(b6)
plexina A4	GSNVVV	(g5)

Um dos receptores detectados corresponde à plexina B1, receptor de alta afinidade de CD100, a primeira semaforina descrita no sistema imune (Bougeret et al., 1992). O isolamento de um fago correspondente à plexina B1 sugeriu, assim, a presença de uma alta concentração de CD100 nas placas ateroscleróticas. Essa hipótese foi inesperada, uma vez que essa semaforina é expressa preferencialmente em linfócitos e plaquetas ativadas (Elhabazi *et al.*, 2003; Yhu *et al.*, 2007) os quais

não estavam presentes em quantidades significativas nas placas utilizadas para a seleção. De fato, em estágios avançados da doença costuma-se encontrar plaquetas nos casos em que há formação de trombo, mas linfócitos (T e B) são raros. Para confirmar essa hipótese, a expressão de CD100 foi avaliada em uma carótida normal e uma placa aterosclerótica por imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti-CD100 BD16 (Herold et al., 1995). Os resultados obtidos (fig. 1) mostraram que há expressão de CD100 em células de aspecto xantomatoso na placa aterosclerótica, próximas ao centro lipídico, mas não no vaso normal.

Figura 1: Imunohistoquímica para CD100 em placa aterosclerótica (A e B) e na carótida normal (C e D). Aumentos: 100x (A, C) e 400x (B, D). (dados Proj. FAPESP 03/13521-7).

O aspecto e localização das células marcadas sugeriam que fossem macrófagos. A identificação de CD100 em placas ateroscleróticas humanas e sua provável expressão em um tipo celular na qual a molécula nunca havia sido estudada motivaram a elaboração desse projeto e a execução dos experimentos que serão mostrados no corpo desta tese.

8. Semaforinas

A extensa família das semaforinas compreende um grande número de proteínas filogeneticamente conservadas, divididas em oito subclasses de acordo com sua origem, ancoragem à membrana e presença de grupos conservados adicionais (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999). Comumente, possuem um domínio Sema e uma porção C-terminal classe-específica, podendo existir nas formas secretada, transmembrana ou ligada a GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) (fig.2). Embora tenham sido primeiramente identificadas como guias quimio-repelentes do crescimento axonal de neurônios, pesquisas indicam o envolvimento das semaforinas em diversos fenômenos fisiológicos e patológicos fora do sistema nervoso, como na organogênese, vascularização e angiogênese (em especial as de subclasse 3), carcinogênese, artrite e, mais recentemente, no sistema imune (Behar *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 1998; Miao *et al.*, 1999). Plexinas e neuropilinas são alguns dos receptores de semaforinas.

Figura 2 : Estrutura das oito subclasses de semaforinas e de seus receptores. Adaptado de Takegahara *et al.*, 2001.

Plexinas

De maneira geral, a maior parte dos efeitos das semaforinas é alcançada via ativação de receptores transmembrana denominados plexinas (Tamagnone *et al.*, 1999). Baseado nas similaridades das seqüências, as plexinas foram divididas em quatro subfamílias, sendo elas de A-D. A ativação das plexinas pelas semaforinas ativa diversas vias de sinalização intracelular que envolvem pequenas GTPases das famílias Ras e Rho. Em camundongos, a plexina B2 é ativada pela tanto por Sema4C quanto por Sema4D, com alta e baixa afinidade, respectivamente. Durante o desenvolvimento murino, as plexinas B1 e B2 são amplamente expressas tanto dentro quanto fora do sistema nervoso, onde foram primeiramente descritas (Worzfeld *et*

al., 2004). Em estudos recentes, a utilização de camundongos geneticamente modificados tem elucidado a questão do significado biológico das plexinas da família B durante o desenvolvimento embrionário murino. Camundongos deficientes em plexina B1 exibem defeitos moderados como anormalidades na morfogênese das ramificações epiteliais durante o desenvolvimento do renal (Korostylev *et al.*, 2008) e defeitos na migração de neurônios durante o desenvolvimento do sistema nervoso (Giacobini *et al.*, 2008). Já camundongos deficientes de plexina B2 mostram sérios defeitos em diversos processos de desenvolvimento, incluindo proliferação, migração e formação de padrões no cérebro e cerebelo murinos (Deng *et al.*, 2007; Friedel *et al.*, 2007; Hirschberg *et al.*, 2010). Além disso, falham no fechamento do tubo neural cefálico apresentando assim o fenótipo exencefálico. No córtex e cerebelo em desenvolvimento, os neurônios apresentam migração defeituosa e empilhamento alterado.

Em contraste com o sistema nervoso em desenvolvimento, muito pouco se sabe a respeito da significância funcional da plexina B2 em tecidos adultos não neuronais. Um estudo recente mostra que a plexina B2 (e seu ligante de alta afinidade, Sema4C) não tem sua expressão restrita só ao camundongo em desenvolvimento, mas é amplamente expressa também no animal adulto, inclusive em células endoteliais e endócrinas. De fato, as plexinas B1 e B2 apresentam um vasto padrão de expressão não redundante no murino adulto. Durante o desenvolvimento, os RNAs das plexinas B1 e B2 são amplamente expressos tanto dentro quanto fora do sistema nervoso em desenvolvimento (Worzfeld *et al.*, 2004; Peralá *et al.*, 2005; Korostylev *et al.*, 2008), no entanto a distribuição da plexina B2 no adulto é muito maior do que a plexina B1. A plexina B2 é expressa no epitélio

brônquico, vênulas endoteliais altas (HEVs) encontradas nos linfonodos e na zona fasciculata do córtex da adrenal, mas também no fígado, pâncreas e rins. Os endotélios descontínuos (sinusóides hepáticos e vênulas de endotélio alto) possuem diferentes funções *scavenger* e de apresentação de antígenos, como observado em macrófagos, que também expressam a plexina B2 (Zielonka *et al.*, 2010). Além disso, a plexina B2 é expressa em subpopulações de linfócitos B (Yu *et al.*, 2008), sugerindo uma possível ação no *homing* de linfócitos. A distribuição da plexina B2 no pâncreas (presente nas ilhotas de Langerhans, mas ausente nas células exócrinas) sugere que sistemas ligante-receptor observados inicialmente no sistema nervoso, que operam guiando axônios, podem também regular a comunicação célula-célula entre as células beta pancreáticas (Konstantinova *et al.*, 2007; Zielonka *et al.*, 2010).

CD100

Em 1992, Boumsell e colaboradores imunizaram camundongos com clones de linfócitos T humanos ativados e isolaram dois anticorpos monoclonais (mAc) denominados BD16 e BB18, que reconheciam dois epitopos distintos da mesma molécula. Essa molécula foi posteriormente denominada CD100/SEMA4D (ou Sema4D em camundongos) e constitui uma glicoproteína transmembrana de 150kDa, pertencente à subclasse IV da família das semaforinas (Kumanogoh *et al.*, 2000). Essa foi a primeira evidência de que as semaforinas estavam também presentes no sistema imune (Hall *et al.*, 1996; Delaire *et al.*, 1998). CD100 é amplamente expressa por células de origem hematopoiética, com exceção de células-tronco CD34+, eosinófilos e eritrócitos (Elhabazi *et al.*, 2003). Até o início deste trabalho não existiam relatos de sua expressão por macrófagos. Além disso, o RNAm da

CD100 humana foi detectado em uma grande variedade de tecidos embrionários e adultos como timo, baço, músculo esquelético, cérebro, rins, coração, testículos e pulmões, não sendo observado no fígado, pâncreas ou cólon (Furuyama *et al.*, 1996; Hall *et al.*, 1996; Elhabazi *et al.*, 2003). Estruturalmente, CD100 contém uma seqüência amino-terminal seguida de um domínio Sema, um domínio do tipo C2 imunoglobulina, uma cauda de poli-lisina, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática atípica sem similaridade com nenhuma proteína conhecida (Elhabazi *et al.*, 2003) (fig. 3).

Figura 3: Estrutura de CD100/SEMA4D demonstrando uma seqüência amino-terminal, o domínio Sema, o domínio imunoglobulina e uma pequena cauda citoplasmática. CD100 possui sítios de N-glicosilação, além de vários sítios consenso para a fosforilação de serinas no domínio citoplasmático. Embora seja uma proteína transmembrana, pode sofrer clivagem proteolítica produzindo a forma solúvel. Adaptado de Kumanogoh & Kikutani, 2001.

Diferentemente de outras semaforinas, CD100 está presente em duas formas, ambas possuidoras de atividades distintas, sendo uma solúvel (sCD100) e outra de

membrana (mCD100) (fig. 3). A forma de membrana está presente como homodímeros de 300kDa em linfócitos T quiescentes; mediante a ativação dessas células, uma forma monomérica de mCD100 é detectada e sCD100 é prontamente liberada (principalmente na forma homodimérica) após clivagem proteolítica de mCD100 por metaloproteases de superfície (Elhabazi *et al.*, 2001). A dimerização de mCD100 é regulada pela fosforilação de resíduos específicos de serina e parece ser pré-requisito para seu reconhecimento e processamento pela protease (Elhabazi *et al.*, 2001). Além disso, a estabilidade de mCD100 advém do acoplamento com uma PSTK (proteína serina-treonina quinase) celular, que fosforila a molécula evitando seu reconhecimento por metaloproteases (Elhabazi *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001; Elhabazi *et al.*, 2003). Dessa maneira, a complexa regulação da liberação de sCD100 faz dessa molécula uma semaforina solúvel ativa dentro do sistema imune, com longo espectro de ação (Elhabazi *et al.*, 2001).

A expressão de CD100 na superfície celular é fortemente induzida mediante a ativação de linfócitos T quiescentes com mitógenos; no entanto, sua concentração diminui na superfície de células mononucleares do sangue periférico após a ligação dos mAc BD16 e BB18 (Elhabazi *et al.*, 2003). O *crosslinking* desses anticorpos com a molécula alvo produzem efeitos distintos: enquanto a ligação com BB18 estimula o acoplamento com a quinase e internalização da molécula, BD16 provoca a liberação desta, levando à liberação de sCD100 (Hérolde *et al.*, 1995; Hérolde *et al.*, 1996; Elhabazi *et al.*, 2001). Em ensaios de ativação de células T a ligação de BB18, mas não de BD16, aumenta a proliferação dessas células (Hérolde *et al.*, 1995).

Embora algumas atividades biológicas exercidas pelas diferentes formas de CD100 sejam conhecidas, muitas ainda precisam ser elucidadas, principalmente

devido à grande discrepância funcional entre CD100 humana e murina, especialmente no que se refere aos receptores utilizados (Elhabazi *et al.*, 2003).

9. Receptores de CD100

Inicialmente dois receptores distintos foram identificados para CD100: plexina B1 (Tamagnone *et al.*, 1999; Tamagnone & Comoglio, 2000) em humanos e CD72 (Kumanogoh *et al.*, 2000) em camundongos.

A plexina B1 é um receptor de semaforina de alta afinidade (Granziero *et al.*, 2002), sendo expressa em diversos tecidos fetais e adultos. Fora do sistema imune, o acoplamento entre CD100-plexina B1 resulta em reorganização do citoesqueleto (Swiercz *et al.*, 2002). No entanto, ainda não existem estudos sobre os mecanismos subjacentes às diferentes respostas observadas em células do sistema imunológico (Elhabazi *et al.*, 2003). Nesse sistema, a plexina B1 é expressa em alguns tipos de células hematopoiéticas, como células dendríticas foliculares, células estromais da medula óssea e células T ativadas, mas não em monócitos e linfócitos T e B quiescentes. Esse padrão de expressão sugeriu a existência de outro receptor para sCD100 em monócitos humanos, já que essas células são responsivas à molécula em ensaios de migração (Delaire *et al.*, 2001). Estudos do mesmo grupo identificaram posteriormente a plexina C1 como um mediador de superfície necessário para os efeitos de sCD100 sobre esses monócitos (Chabbert-de Ponnat *et al.*, 2005), embora essa molécula não seja capaz de se ligar diretamente à sCD100 (Chabbert-de Ponnat *et al.*, 2005). No entanto, ainda não havia resposta quanto ao receptor definitivo de CD100 nessas células ou em outras do sistema imune. Uma hipótese levantada foi de

que, como em camundongos, elas respondessem a CD100 via CD72 (Kumanogoh *et al.*, 2000), o receptor de baixa afinidade.

Recentemente a plexina B2 foi descrita como receptor de CD100 em alguns subtipos de células B (Yu *et al.*, 2008). Nesse trabalho foram realizados experimentos de imunohistoquímica em cortes esplênicos de camundongo e, surpreendentemente, além da marcação de células B no centro germinativo, foi possível observar positividade em algumas áreas esparsas na polpa vermelha e zonas T esplênicas, sugerindo que outros tipos celulares, possivelmente células dendríticas e/ou macrófagos, expressassem essa proteína (Yu *et al.*, 2008). Sendo assim, mesmo fora do sistema nervoso, as plexinas parecem ser o principal receptor de CD100.

Em camundongos a molécula CD72 é o principal receptor para sCD100; possui baixa afinidade e é encontrada na superfície de células B, monócitos e células dendríticas (Kumanogoh *et al.*, 2000). Nestes animais, a ligação CD100-CD72 cessa os efeitos inibitórios de CD72 na proliferação e maturação de linfócitos B (Kumanogoh *et al.*, 2000).

Em humanos não se sabe ao certo se CD100 atua principalmente como ligante, na sua forma solúvel, ou como receptor, na forma de membrana. Aparentemente, ambas as formas de CD100 são funcionais, fazendo dessa molécula a única semaforina em que as duas formas possuem propriedades funcionais distintas. Alguns fatores apontam para a função de mCD100 como receptor, como a sua internalização mediada por BB18, a associação com moléculas-chave da ativação de linfócitos T (Elhabazi *et al.*, 2003) e a sinalização de sobrevivência para linfócitos B (Granziero *et al.*, 2002), descritos a seguir. Nesses casos, a plexina B1 poderia ser clivada e liberada da superfície celular, atuando como um potente ligante de

mCD100 (Elhabazi *et al.*, 2003) ou ligar CD100 no contexto de interação célula-célula (Granziero *et al.*, 2002).

10. Atividades biológicas de CD100

Aspectos moleculares das interações de CD100 em células do sistema imune

Em relação à função, a mCD100 humana atua na produção de sinais co-estimulatórios para células B e T. A interação com CD45, uma proteína tirosina fosfatase de membrana, contribui para a indução desses sinais durante a ativação dos linfócitos (Hérolde *et al.*, 1996), com exceção de plasmócitos (Billard *et al.*, 2000). A ativação de CD45 induz a produção de moléculas de adesão (Bernard *et al.*, 1994) e liberação de sCD100 criando um ambiente favorável a interação celular e agregação (Elhabazi *et al.*, 2003). Um mecanismo alternativo de co-estimulação de mCD100 é o acoplamento desta com uma PSTK celular; tal associação parece estar envolvida na montagem ou funcionamento de complexos multi-moleculares formados durante a ativação de células T (Elhabazi *et al.*, 2003). Outra função da mCD100 humana é a promoção de agregação de células B assim como sua sobrevivência e viabilidade (Hall *et al.*, 1995). Ela interage com um receptor na superfície dessas células e fortalece a sinalização promovida pela ligação entre CD40-CD40L através do aumento da agregação e aumento da forma solúvel de CD23 que, por sua vez, funciona como um potente fator de crescimento para células B (Hall *et al.*, 1995).

A forma homodimérica da sCD100 humana é ativa na migração de células imunes, inibindo a migração espontânea ou induzida por quimiocinas de monócitos,

células dendríticas imaturas e células B, no entanto sem efeitos sobre células T ou células dendríticas maduras (Chabbert-de Ponnat *et al.*, 2005). A pré-incubação de sCD100 com BD16 inibe esse efeito (Elhabazi *et al.*, 2003). Curiosamente, uma outra semaforina, SEMA3A, possui esse mesmo efeito paralisante em células imunes (Delaire *et al.*, 2001). A sCD100 é também moduladora da produção de citocinas em monócitos e células dendríticas imaturas, reduzindo citocinas pró-inflamatórias e induzindo um perfil regulador (Chabbert-de Ponnat *et al.*, 2005).

Em camundongos, a ligação de CD100 a CD72 atua na interação entre as células T e B, aumentando significativamente a proliferação e diferenciação de células B induzidas por CD40 e/ou IL-4 (Kumanagoh *et al.* 2000; Wang *et al.*, 2001). Além disso, sCD100 melhora a produção de anticorpos contra antígenos T-dependentes *in vivo* (Elhabazi *et al.*, 2003). A CD100 murina é também requerida na interação entre células T e APCs (*antigen presenting cells*, células apresentadoras de antígenos) e entre células B (Kumanagoh & Kikutani, 2001).

Atividades biológicas em outros sistemas

Os diferentes papéis da semaforina CD100/SEMA4D vêm sendo amplamente investigados nas últimas décadas. O interesse é crescente, como demonstrado pelo número de artigos publicados desde sua primeira descrição (126 publicações, das quais 23 revisões - dados obtidos no site Pubmed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>, em outubro/2010). Embora inicialmente descrita no sistema nervoso, artigos mais recentes exploram o papel da semaforina em diferentes sistemas (sistema imune, reprodutor, etc) e em mecanismos fisiológicos ou patológicos (desenvolvimento ovariano, câncer, etc). Além disso, a

sinalização intracelular proveniente da interação CD100-plexina B1 em diferentes células tem sido alvo de muitos trabalhos (Püschel, 2007; Basile *et al.*, 2007 ; Lin *et al.*, 2007 ; Swiercz *et al.*, 2008, Janssen *et al.*, 2010, dentre outros).

No sistema imune, o papel de CD100 vem sendo investigado em diversos tipos celulares desde a primeira identificação da molécula em linfócitos T (Bougeret *et al.*, 1992). Tal fato demonstra que as funções dessa semaforina permeiam vários níveis da resposta imune, desempenhando papéis distintos nas interações entre as células componentes desse sistema. Um artigo recente mostra uma função importante de CD100 na mediação de respostas alogeneicas tanto *in vitro* como *in vivo* em camundongos (Duran-Struuck *et al.*, 2008). Nesse trabalho é demonstrado que o bloqueio ou ausência de CD100 regula as respostas alo-proliferativas *in vitro*, reduz GVHD (*graft versus host disease*) *in vivo*, não afeta as respostas citolíticas de linfócitos T, e atenua sinais de GVL (*graft versus leukemia*). Foi também demonstrado o importante papel de CD100 na inflamação decorrente da glomerulonefrite experimental (modelo murino). Nesse estudo foi observado que CD100 promove dano glomerular e recrutamento de macrófagos para os túbulos renais. Esse trabalho é inovador na elucidação das diversas funções de CD100 no sistema imune, pois demonstra que o acoplamento Sema4D/plexina B1 influencia a migração e localização celular. Nos animais estudados, foi observado que CD100 presente nos macrófagos se acopla com a plexina B1 presente nos glomérulos, fazendo assim com que essas células sejam recrutadas e se acumulem neste local (Li *et al.*, 2009).

Para determinar a importância de CD100 nos diversos mecanismos imunes, o fenótipo de camundongos CD100 *knockout* foi comparado com o de camundongos

transgênicos que expressam uma forma truncada de CD100. Camundongos deficientes em CD100 possuem fenótipo de imunodeficiência humoral; apresentam diminuição da capacidade proliferativa de células B em resposta a diferentes estímulos fisiológicos como LPS e CD40 e grande disfunção na produção de anticorpos (Shi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Esse fenótipo é decorrente de um defeito na ativação de linfócitos T; na ausência de CD100, essas células antígeno-específicas não se diferenciam em células produtoras de citocinas na presença de APCs profissionais (Kumanogoh *et al.*, 2002). Células dendríticas, por sua vez, também apresentam problemas no seu potencial co-estimulatório e baixa eficiência na apresentação de antígenos, o que ocasiona graves defeitos no priming antigênico de linfócitos T. Adicionalmente, esses camundongos não desenvolvem EAE (encefalomielite auto-imune experimental) (Kumanogoh & Kikutani, 2001). Assim, é possível concluir que, em camundongos, CD100 possui papel essencial na ativação, maturação e diferenciação de células B, T e dendríticas, sendo pré-requisito para resposta e cooperação apropriada entre células imunes (Kumanogoh & Kikutani, 2001).

Por outro lado, a super-expressão de CD100 produz fenótipos de auto-imunidade mediada por anticorpos (Watanabe *et al.*, 2001). Camundongos que superexpressam sCD100 desenvolvem encefalite experimental mais rapidamente do que camundongos normais, e a concentração sérica e em fluidos corporais da molécula foi positivamente relacionada com a progressão e gravidade da doença (Kumanogoh & Kikutani, 2001; Watanabe *et al.*, 2001). Existe ainda uma correlação positiva entre o nível de sCD100 e o título de auto-anticorpos no soro de

camundongos MRL/lpr, que desenvolvem doenças auto-imunes espontaneamente (Wang *et al.*, 2001).

Embora até o início desse projeto não houvesse relatos da expressão de CD100 em macrófagos, em 2008 um estudo de Sierra e colaboradores relatou sua expressão nesse tipo celular no ambiente tumoral. Nesse trabalho foi demonstrado que a ausência de CD100 prejudica o processo de metástase e a formação de massas tumorais por afetar a vascularização dentro do tumor. As principais células produtoras de CD100 nesse ambiente são os TAM (*tumor-associated macrophages*) ou macrófagos peri-tumorais. CD100 é apontada como uma molécula crítica na angiogênese tumoral e na maturação de vasos. Os autores demonstram assim o papel angiogênico pró-tumoral exercido por células inflamatórias nesse ambiente, e sugerem CD100 como um novo alvo terapêutico (Sierra *et al.*, 2008).

Também na área de biologia de tumores, um trabalho de outro grupo mostrou que o acoplamento de CD100 com a plexina B1 presente em células endoteliais promove angiogênese, contribuindo para o crescimento invasivo e proliferação de alguns tumores. Nesses casos, a expressão de CD100 é aumentada em resposta à hipóxia, e interfere na migração de células endoteliais e conseqüente neovascularização do tumor (Sun *et al.*, 2009). Além desse estudo, diversos outros demonstraram a importância funcional da sinalização resultante do acoplamento entre Sema4D-plexina B1 na angiogênese em tumores (Basile *et al.*, 2004; Basile *et al.*, 2005; Basile *et al.*, 2006, Basile *et al.*, 2007; Conrotto *et al.*, 2005; Sierra *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009), o que permite especular sobre uma expressão aumentada da plexina B1 em vasos de tumores em relação a vasos de tecidos normais. Com base

nessas conclusões, é possível especular que CD100 de fato exerça funções importantes no contexto da aterosclerose.

Na área vascular foi demonstrado que plaquetas expressam SEMA4D e ambos receptores CD72 e plexina B1, e que essas moléculas promovem agregação e formação de trombos. A expressão de CD100 e CD72 aumenta na ativação plaquetária, seguida da liberação gradual de sCD100 a partir do domínio extracelular de mCD100. Assim, foi possível concluir que a semaforina desempenha um papel duplo nas respostas à injúria vascular. No início da formação do trombo, a mCD100 presente nas plaquetas ativadas pode se ligar aos seus receptores em plaquetas vizinhas, promovendo agregação e formação do trombo. À medida que esse processo se perpetua, sCD100 é liberada das plaquetas ativadas, tornando-se disponível para interagir com seus receptores em células endoteliais e monócitos, assim como em outras plaquetas. Desse modo, a adesão plaquetária é diminuída, contribuindo para que os trombos não sejam mais formados (Zhu *et al.*, 2007). Nessa mesma linha, foi demonstrado pelo mesmo grupo mais recentemente que em estados dislipidêmicos a plaquetas tornam-se hiper-reativas, secretando moléculas que promovem a aterosclerose. Levando em consideração os dados já demonstrados de CD100 na formação de trombos (interação de plaquetas entre si e com células endoteliais) foi testada a hipótese de que a deleção de CD100 poderia atenuar as consequências adversas da dislipidemia em plaquetas e na parede vascular. Para isso foram utilizados camundongos LDLR^{-/-} e Sema4D^{-/-} LDLR^{-/-}, nos quais foi mensurada a função plaquetária e formação de lesão aterosclerótica. As duas linhagens de camundongos desenvolveram a dislipidemia esperada após a administração de dieta rica em gordura. No entanto, camundongos Sema4D^{-/-} LDLR^{-/-} mostraram deposição

reduzida de lipídeos na aorta, diminuição na frequência de oclusão arterial e redução no acúmulo de plaquetas após injúria vascular. Esses resultados mostram que a perda da expressão de CD100 reduz a hiperreatividade plaquetária outrora vista na dislipidemia, e confere proteção contra o desenvolvimento da aterosclerose (Zhu *et al.*, 2009). O artigo traz pela primeira vez uma atuação direta de CD100 nessa doença. É possível que efeitos de mesma relevância sejam também encontrados em macrófagos e monócitos.

Além do trabalho citado acima, outro trabalho demonstrou o papel do acoplamento entre CD100 e seus receptores mediando interação celular em células NK. Quando ativadas, essas células expressam mCD100 na forma de homodímeros, como descrito em linfócitos T, que medeia a citotoxicidade através da ligação com o receptor CD72 presente nas células-alvo. CD100 não está diretamente envolvida na morte celular, mas atua como uma molécula de adesão, estabilizando o contato célula-célula, resultando em aumento de toxicidade e maior produção de IFN- γ pelas células NK (Mizrahi *et al.*, 2007). Tendo em vista os dados previamente apresentados, é possível que CD100 expressa em monócitos sanguíneos também encontre seu receptor plexina B1 em células endoteliais e que essa ligação faça parte do amplo rol de moléculas de adesão responsáveis pelo recrutamento e diapedese dessas células para o espaço subendotelial, contribuindo assim para o estabelecimento e progressão das lesões ateroscleróticas.

11. CD100 e aterosclerose

Em julho de 2010 foi publicado o primeiro artigo sobre as possíveis funções de CD100 no contexto da aterosclerose. Para elucidar o papel de CD100 na doença e na

neovascularização da placa de ateroma, Yukawa e colaboradores (2010) analisaram o efeito da deleção do gene *Sema4D* em camundongos *ApoE^{-/-}* (que desenvolvem aterosclerose espontaneamente), gerando assim uma linhagem duplo *knockout* *Sema4D^{-/-}ApoE^{-/-}*. Foi observado (através da análise histológica das aortas, marcando lipídeos) que a ausência de CD100 nesses camundongos retarda a progressão das lesões e diminui significativamente o grau de neovascularização das placas e o número de macrófagos infiltrantes. A hipótese levantada pelo grupo é de que CD100 está envolvida na fase de progressão da doença, acelerando a neovascularização e conseqüentemente aumentando o influxo de macrófagos no sítio da lesão.

Como já mencionado, CD100 é uma molécula expressa em alguns tipos celulares comumente encontrados nas placas de ateroma, como plaquetas e linfócitos T e B, especialmente quando ativados. No entanto, as regiões de placa utilizadas no estudo não são regiões de trombo (ausência de plaquetas) e representam estágios mais avançados da doença (quando a remoção cirúrgica se fez necessária), nos quais a infiltração linfocitária é bastante baixa, como observado nas imunohistoquímicas (Proj. Pós-Doc FAPESP 03/13521-7). Através de experimentos de imunohistoquímica em placas de ateroma realizados em nosso laboratório foi possível observar a presença de CD100 na região da estria gordurosa, ocupada principalmente por macrófagos e células espumosas. Existe assim uma forte sugestão de que, nas placas analisadas, CD100 está sendo expressa por essas células. No entanto, pouco se sabe sobre a presença ou ação de CD100 sobre esses tipos celulares, já que o único relato de expressão em macrófagos trata de células do estroma tumoral.

Até o presente momento, somente esse estudo relata a presença e participação de CD100 na aterosclerose, no modelo murino. Devido às estabelecidas ações da molécula no sistema imune e aos fenótipos de camundongos deficientes em CD100, acreditamos que essa semaforina pode possuir um papel amplificador significativo no estabelecimento de lesões ateroscleróticas. Um maior entendimento das complexas respostas inflamatórias deve permitir a identificação de processos-chave na evolução da doença, que podem posteriormente ser alvos de inibição tanto da sua progressão como de suas complicações.

OBJETIVOS

- Identificar o tipo celular envolvido na expressão de CD100 na placa aterosclerótica;
- Investigar o potencial envolvimento de CD100 na aterosclerose humana, avaliando sua atividade biológica na ativação e propagação das lesões.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras de carótida normal e placa aterosclerótica de carótida

As amostras de carótida normal foram provenientes de doadores de Transplante de Órgãos do Hospital das Clínicas da FMUSP (controle sem indício de doença vascular), enquanto que as amostras de carótidas com placa aterosclerótica foram retiradas de pacientes do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP encaminhados para endarterectomia de carótida. Foram excluídos pacientes com doenças infecciosas (incluindo AIDS), câncer, hipertensão arterial maligna, intervenção cirúrgica prévia no mesmo local, transplantados prévios ou pacientes imunossuprimidos. No caso do vaso normal, um trecho de ~2cm (~1/3 da amostra) foi imerso em meio DME gelado suplementado com 5% de soro fetal bovino e utilizado para a técnica de *phage display*. Da mesma forma, metade da amostra proveniente de endarterectomia foi imersa em meio DME gelado suplementado com 5% de soro fetal bovino e utilizada para a técnica de *phage display*. Um fragmento de cada amostra foi fixado por 24 ou 48 horas em solução tamponada com 10% de formalina para posterior inclusão em parafina.

2. Amostras de baço e placa aterosclerótica de coronária

As lâminas com cortes histológicos de baço provenientes de autópsia foram obtidas a partir do banco de tecidos do Departamento de Anatomia Patológica (Incor). Lâminas com cortes histológicos de placas ateroscleróticas de coronárias com diferentes graus de obstrução foram gentilmente doadas pela Prof. Lourdes Higuchi (Depto. Anatomia Patológica Incor).

3. Anticorpos utilizados

Anticorpos primários

Anti-CD100: Três remessas (*a*, *b*, *c*) enviadas pelo grupo de Laurence Boumsell (Créteil, França)

- BB18*a* (177µg/µl), BB18*b* (0,63µg/µl)
- BD16*a* (1,2mg/ml), BD16*b* (1,16µg/µl)
- BB18*c* (1,4mg/ml), BD16*c* (1,16mg/µl)

Anti-CD100 comercial:

- Abnova - clone 3B4
- BD Transduction (lote 610670)
- BD Pharmingen (lote 55499)

Anti-CD68:

- Mouse: clone PG-M1, DAKO – cat. M0876; clone KP1, DAKO – cat. M0814
- Rabbit: clone H-255, Santa Cruz – cat. sc-9139

Anti-plexina B1 mouse, clone A-8, Santa Cruz – cat.sc-28372

Anti-plexina B2 goat, clone I-16, Santa Cruz – cat. sc-34504

Anti-β-actina mouse, clone AC-15, Sigma – cat. A5441

Anticorpos secundários

Cy3 conjugate anti-mouse IgG (Sigma, cat. C2181)

FITC anti-rabbit IgG (Vector, cat. FI-1000)

FITC anti-mouse polyvalent Igs conjugate (Sigma, cat. F1010)

FITC anti-mouse IgG (DAKO)

Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, cat. A-11003)

Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, cat. A-11008)

Alexa Fluor 633 rabbit anti-goat IgG (Invitrogen, cat. A- 21086)

Alexa Fluor 660 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, cat. A-21054)

Peroxidase HRP anti-mouse IgG (BD Pharmingen, cat. 554002)

4. Análises microscópicas em tecidos e células

O preparo das lâminas com cortes de tecido, assim como a desparafinização e recuperação antigênica das mesmas foram realizados no setor de Anatomia Patológica do Incor. As lâminas foram desparafinizadas por 3 incubações de 10 min em xileno, 3 passagens de 10 segundos em etanol 100%, 3 passagens em etanol 95%, uma passagem em etanol 70% e lavagem em água. A recuperação antigênica foi realizada por incubação em TE (Tris 10mM EDTA 1mM) em banho a 95°C por 25min e à TA por 20 min ou com panela de Pascal no mesmo tampão.

5. Imunohistoquímica peroxidase

Após hidratação dos cortes, foi realizado o bloqueio de peroxidase endógena por três incubações de 10 min em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 volumes em PBS. Após 1 hora de bloqueio em Protein Block (DAKO), o anticorpo primário (anti-CD100, anti-CD68) foi adicionado em diferentes diluições em PBS 1% BSA e mantido a 4°C por 18 horas. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com reagente A (biotina) por 1h a 37°C e com reagente B (streptavidina) por 30 min a 37°C com lavagens com PBS entre as duas soluções. As lâminas foram incubadas com DAB (DAKO) por 1 minuto e meio e lavadas com água. Foram posteriormente incubadas com hematoxilina filtrada por 30 seg e lavadas em água, e incubadas com água Scott por 30 seg. Após lavagens com água, os cortes foram desidratados por passagens em álcool e xileno e as lâminas foram montadas com Entellan (Merck) e lamínula. A digitalização da imagem foi feita com o programa AxioVision (Zeiss).

6. Imunohistoquímica fluorescência com dupla marcação

Após hidratação dos cortes, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS e bloqueadas por 1 hora com Protein Block (DAKO). Os anticorpos primários (CD100 mouse e CD68 rabbit) foram adicionados em diferentes diluições em PBS 1% BSA e mantidos a 4°C por 18 horas. Após esse período, foram feitas três lavagens em PBS 1% BSA e em seguida a incubação com os anticorpos secundários conjugados (FITC e diferentes Alexas) foi realizada por 90 minutos a 4°C. As lâminas foram então lavadas quatro vezes com PBS e montadas com DAPI (10ug/ml em glicerol: PBS 1:1). As lâminas foram guardadas ao abrigo da luz e refrigeradas até o momento de serem fotografadas, geralmente no mesmo dia. A digitalização da imagem foi feita com o microscópio confocal Zeiss laser-scanning.

7. Imunocitoquímica fluorescência simples ou dupla marcação

Células THP-1 (5×10^5 células/poço) foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 poços com meio RPMI (LGC) com 10% FCS e PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate- Sigma) 40nM por 24 horas. Foram posteriormente incubadas com LDL oxidado (50µg/ml, obtido e cedido pelo laboratório do Prof. Francisco Laurindo) por 48h para a diferenciação em células espumosas (adaptado de Banka *et al.*, 1991).

Monócitos isolados de PBMC (5×10^5 células/poço) foram cultivados sobre lamínulas em placas de 24 poços com meio RPMI 10% FCS (1ml) por 24 horas. Para diferenciação em macrófagos, foram cultivados por 6 dias com M-CSF (20ng/ml), e para diferenciação em células espumosas foram incubados com LDLox como descrito para células THP-1.

Células HUVECs (5×10^4 células/poço) foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 poços com 500µl de meio 199 (Earle) com 10% FCS por poço por 24 horas.

Para as reações de marcação, o meio de cultura foi aspirado, e as lamínulas lavadas por três vezes com PBS. Foi feita a fixação com solução de paraformaldeído 2% por 30 min à TA ou por 15 min a 37°C. As lamínulas foram então lavadas duas vezes com PBS e as células foram permeabilizadas em PBS nonidet P40 0,1% por 30 min a TA ou 15 min a 37°C. Foram feitas novas lavagens com PBS e bloqueio com PBS 1% BSA ou com Protein Block (DAKO) por 30 min a 37°C. As lamínulas foram então incubadas com os anticorpos primários (anti-CD100 e/ou anti-CD68) diluídos em PBS 1% BSA por 18h a 4°C.

No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas quatro vezes com PBS e incubadas com os anticorpos secundários a 4°C por 90min, protegidas da luz. Após esse período, foram lavadas quatro vezes com PBS e montadas em lâminas de vidro com DAPI (10ug/ml em glicerol: PBS 1:1). As lâminas foram guardadas ao abrigo da luz e refrigeradas até o momento de serem fotografadas, geralmente no mesmo dia.

8. Imunocitoquímica eletrônica

Amostras de placas ateroscleróticas foram pré-fixadas em solução fixadora (glutaraldeído 1% + paraformaldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2) por 24h. Após a pré-fixação, foram encaminhadas ao setor de Anatomia Patológica do Incor, onde foram processadas e seccionadas em cortes semi-finos (3-5µm) e posteriormente em cortes ultra-finos (~70nm). Os cortes ultra-finos foram coletados em grade de níquel. Para a reação foi realizado bloqueio de sítios de reação inespecíficos com PBS 1% BSA durante 30 min. As grades foram imersas em gotas

de anti-CD100 comercial (Abnova), na diluição 1:400, durante 8h, acondicionadas em câmara úmida, sob parafilm. Após esse período, as amostras foram lavadas com PBS e posteriormente transferidas para gotas diluídas (1:50) de proteína A conjugada com partículas de ouro coloidal em reagente comercial (Sigma Chemical Co.), sendo incubadas por 1h à temperatura ambiente. Foram realizadas novas lavagens e fixação com solução aquosa de glutaraldeído 1% por 10 min. Para contrastação, foram imersas em solução de acetato de uranila 3% e em seguida em citrato de chumbo 0.2% durante 5 min. A análise das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Panasonic, no mesmo setor.

9. Separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

O sangue heparinizado (1:10.000) foi utilizado para a separação das células mononucleares. As amostras de sangue foram diluídas 1:2 em solução salina isotônica e separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque Plus. Após centrifugação a 1800 rpm por 25 min, o anel de células mononucleares foi retirado, diluído em solução salina e centrifugado a 2000rpm por 10 min. O botão celular foi ressuspensão em solução salina e lavado por duas vezes para retirada completa do Ficoll, com centrifugações a 2000 rpm por 10 min. Para a retirada de plaquetas, foi feita uma centrifugação a 1000 rpm por 8 min. As células foram ressuspensas em meio RPMI e contadas em câmara de Neubauer.

10. Isolamento de monócitos com kit de seleção positiva por contas magnéticas e diferenciação em macrófagos

O isolamento de monócitos a partir de células mononucleares do sangue periférico por com kit de seleção positiva MACS CD14+ microbeads (Miltenyi

Biotech, cat. 130-091-301, Germany) foi realizado seguindo as especificações do fabricante. Resumidamente, após a separação do sangue e isolamento de PBMC, as células foram incubadas CD14 microbeads (anticorpos anti-CD14 conjugados com contas magnéticas) e separadas por seleção positiva após passagem por coluna magnética. As células CD14⁺ magneticamente imobilizadas foram coletadas por eluição fora do campo magnético. Para obter maior pureza, a fração de células positivamente selecionadas foi submetida a uma segunda passagem frente ao campo magnético, e novamente eluída. Os monócitos foram distribuídos nas concentrações de $2,0 \times 10^6$ /poço em placas de cultura de 6 poços (2ml) ou de 5×10^5 /poço em placas de cultura de 24 poços (1ml).

11. Cultura de monócitos e diferenciação em macrófagos e células espumosas

Monócitos e macrófagos de PBMC

Monócitos purificados foram cultivados em placas de 6 ou 24 poços contendo 2ml ou 1ml (respectivamente) de meio RPMI 1640 10% FCS. Para diferenciação em macrófagos, o meio foi acrescido de M-CSF (Peprotech, lote 050685) na concentração de 25ng/ml por 7 dias, com troca de meio no terceiro dia.

Cultura e ativação com vitamina D, LPS, oxLDL, IFN- γ , CD100, IL4 e IL10 para isolamento de RNA e Western Blot

Após diferenciação em macrófagos, essas células foram incubadas com vitamina D (1mM, Sigma C-9756), LDL oxidado (40 μ g/ml) ou somente meio de cultura por 10, 18, 24 e 34h. Em outro set de experimentos, utilizamos para ativação dos macrófagos diferenciados LPS (200ng/ml), vitamina D (Sigma C-9756) 10 μ M e

em alguns casos, ambos estímulos nessas mesmas concentrações. Os estímulos foram realizados por períodos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas em estufa a 37°C. Para ativação com IFN- γ (Peprotech, lote 016CY2701) foi utilizada a concentração de 100U/ml por 24h.

Outro protocolo de ativação foi realizado utilizando LPS (Sigma) 200ng/ml; IL-4 (Peprotech) 40ng/ml; IL-10 (Peprotech) 40ng/ml; CD100 (Abnova), 10ug/ml; CD100 + LPS; CD100 + IFN- γ ; LPS + IFN- γ por 24hs.

Em todos os experimentos listados, após o período de estímulo os poços foram lavados com PBS e as células lisadas com 1ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) por poço, sendo o lisado armazenado a -80°C para posterior isolamento do RNA total.

Diferenciação em macrófagos M1 e M2

Os macrófagos (diferenciados com M-CSF) foram submetidos ao protocolo de diferenciação M1 e M2 adaptado de (Martinez *et al.*, 2006). As células foram cultivadas em placas de 6 wells na densidade de $1,5 \times 10^6$ células por poço. Após os 7 dias da diferenciação com M-CSF, todo o meio foi removido e as macrófagos foram submetidos a 18h de cultura com 100ng/ml LPS (Sigma); 20ng/ml IFN- γ (Peprotech) para polarização M1 e com 20ng/ml IL-4 (Peprotech), para polarização M2.

Cultura de células THP-1

As células THP-1 foram cultivadas em placas de 6 wells ($1,5 \times 10^6$ células/poço) em 2ml de meio RPMI (LGC ou Gibco) com 10% FCS. Para diferenciação em macrófagos, foi realizado um tratamento com 40nM PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) por 24 horas a 37°C.

Cultura e ativação com vitamina D, LPS e IFN- γ para isolamento de RNA e Western Blot

As células THP-1 foram cultivadas em placas de 6 wells ($2,0 \times 10^6$ células/poço) em 2ml de meio RPMI 1640 completo (acrescido de penicilina 0,6 μ g/ml, estreptomicina 60 μ g/ml, glutamina 2mM, HEPES 20mM e 10% FCS). Para diferenciação em macrófagos e células espumosas, procedeu-se como descrito no item 10.3, que se segue.

Para ativação dessas células foi utilizado IFN- γ 100U/ml (Peprotech, lote 016CY2701) e para os experimentos de Real-Time RT-PCR foi também utilizado LPS 200ng/ml (0111:B4, Sigma, lote 066K4142) ou vitamina D 10 μ M (Sigma C-9756). A incubação com IFN- γ foi feita por 24h, enquanto que o estímulo com LPS e vitamina D foi realizado por 12h. Após o período de ativação, os poços foram lavados com PBS e as células lisadas com 1ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) por poço, sendo o lisado armazenado a -80°C para posterior isolamento do RNA total. Para os experimentos de Western Blot, foi utilizado um volume de 120 μ l de tampão de lise para cada $2-4 \times 10^6$ células.

12. Diferenciação de macrófagos em células espumosas

O protocolo de diferenciação de células THP-1 em células espumosas (Banka *et al.*, 1991) foi realizado nessas mesmas células e também adaptado para macrófagos de sangue periférico. Monócitos (2×10^6) obtidos através do kit de seleção positiva foram diferenciados em macrófagos em placa de cultura de 6 poços como descrito anteriormente. No sexto dia de diferenciação, os macrófagos foram incubados por 48 horas com LDL oxidado na concentração de 50 μ g/ml.

Mensuração da incorporação de LDL oxidado

Após o cultivo e diferenciação em macrófagos em placas de 6 ou 24 poços como anteriormente descrito, os macrófagos foram incubados com 50µg/ml de oxLDL para diferenciação em células espumosas na presença ou não de 10µg/ml de CD100 (Abnova,) por 48h. O meio foi removido e as células fixadas com 10% formalina, por 5min à RT. Após a fixação as células foram lavadas com 60% isopropanol e deixadas para secar. O Oil Red (Sigma O-0625) foi então adicionado, evitando-se ao máximo tocar as paredes dos poços, incubado por 10min e removido. Para lavagem água destilada foi adicionada imediatamente aos poços, repetindo-se o processo por mais 4 vezes. Após a lavagem o Oil Red foi eluído pela adição de 100% isopropanol e incubação por 10min. O isopropanol foi pipetado “*up and down*” diversas vezes nos poços para que todo o Oil Red ficasse na solução. A DO da solução foi então mensurada a 500nm, leitura de 0.5 seg. Como branco foi utilizado 100% isopropanol e como controle a solução de isopropanol de um poço vazio (sem células), mas corado como os demais. Os volumes utilizados são mostrados na tabela a seguir:

Tabela 2: Volumes de cada reagente utilizado na dosagem de LDL incorporado

Placa	Formalina 10%	Isopropanol 60%	Oil Red O	Isopropanol 100%
24 poços	500µl	500µl	200µl	750µl
12 poços	1ml	1ml	400µl	1.5ml
6 poços	2,4ml	2,4ml	1ml	3.6ml

13. Coloração com Scarlet R ou Oil Red

As lamínulas foram lavadas e fixadas como para imunofluorescência, em seguida incubadas com ~ 400µl de Scarlet R (Anatomia Patológica - InCor) ou Oil Red (Sigma, cat. O-0625) por 10 min. Após esse período o corante foi aspirado e os

poços lavados com água destilada por 3 vezes de 10 min. As lamínulas foram então montadas em lâminas de vidro com meio de montagem (1:1 PBS glicerol) e fotografadas ao microscópio óptico, ou então fotografadas diretamente das placas de cultura.

14. Quantificação de proteína e Western Blot

As células foram lisadas para Western Blot em tampão de lise (HEPES 20mM, NaCl 150mM, glicerol 10%, Triton 1%, EGTA 1mM, MgCl₂ 1,5mM) com os inibidores de protease PMSF (100μM), aprotinina (1mg/ml) e leupeptina (1mg/ml) por 30 min em gelo. Foi utilizado um volume de 120μl de tampão de lise para cada 2x 10⁶ células e o cell scraper para auxiliar na remoção das células da placa. Após 30 min o lisado foi centrifugado a 12000xg por 10 min, o sobrenadante recuperado e armazenado a -80°C. Para as amostras de PBMC, quando foi necessária a concentração de proteína do lisado, foi utilizado o mesmo volume de tampão de lise para 4x10⁶ células, além da utilização de colunas Microcon de 5kDa, com duas centrifugações de 15 minutos cada.

A quantificação de proteína dos lisados utilizados nos experimentos de Western Blot foi realizada tanto pelo método de BCA como pelo de Bradford, seguindo as especificações do fabricante. A leitura foi feita em leitor de Elisa (Microplate Manager 4.0, BioRad) a 595nm por 1 segundo.

A eletroforese foi realizada com 30-45μg de proteína por poço em gel de SDS-PAGE 8% (plexinas) e 10% (CD100) a 200V por ~1h. As amostras foram então transferidas para membrana de nitrocelulose por sistema semi-úmido (Amersham Pharmacia) por 1h a 200V. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau e descorada com água. As membranas foram então bloqueadas com TBS

3% Molico 0,05% Tween-20 por 2 horas à temperatura ambiente (TA) sob agitação e incubadas com anticorpo primário (anti-CD100 da BD Transduction, anti-plexina B1, anti-plexina B2 e anti- β -actina) na diluição 1:1000 em TBS 0,05% Tween-20 (e 2% Molico para anti-plexina B2) por 18 horas a 4°C sob agitação. No dia seguinte, a membrana foi lavada com TBS 0,05% Tween-20 por 5 vezes de 10 minutos sendo então incubada com anticorpo secundário-peroxidase em TBS 0,05% Tween-20 sob agitação a TA por 2 horas. A membrana foi então lavada 3 vezes de 5 min com TBS-0,05% Tween20, seca e montada no cassete. Para revelação utilizamos o kit ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences Buckinghamshire, England cat RPN2209), seguindo as indicações do fabricante. A membrana foi incubada com o reagente ECL por 2 min, exposta em filme de raio X por tempos variados (de 30 seg a 5 min) e revelada.

As alterações realizadas neste protocolo durante o período, buscando melhores resultados foram:

- Solução para diluição do anticorpo primário: TBS 0,05% Triton X100 0,03% Tween-20; TBS 1% Molico 0,05% Tween-20; TBS 1% Molico, TBS 5% Molico 0,1% Tween-20.
- Bloqueio: TBS 5% Molico 0,05% Tween-20, TBS 10% Molico 0,05% Tween-20, TBS 5% Molico 0,1% Tween-20.
- Lavagens: TBS 1% Molico 0,05% Tween-20, TBS 0,1% Tween-20
- Revelador. ECL produzido no laboratório.

15. Real Time RT-PCR

Extração de RNA

O RNA total foi extraído pelo método de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), adaptado a partir de Chomzynski *et al.* (1987). Este método consistiu da homogeneização das amostras em solução de Trizol, incubação por 5 min a temperatura ambiente, adição de 0,2 ml de clorofórmio para cada ml de Trizol, seguido de agitação vigorosa por aproximadamente 15 segundos. O material foi posteriormente incubado por 2 a 3 min à TA e centrifugado por 15 min a 12000g a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 0,5 ml de álcool isopropílico para cada ml de Trizol, a mistura foi homogeneizada por inversão, seguida de incubação por 10 min à TA e centrifugação a 12000 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet de RNA lavado com etanol 75% em água DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) seguido de centrifugação a 12000g por 5 min a 4°C. O RNA assim obtido foi deixado para secar por 5 min para evaporação do etanol e então ressuspensão em 10 µl de água DEPC. Este material foi mantido a -80°C até o momento da transcrição.

Quantificação do RNA

Após extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura em Nanodrop nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280 nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores 260/280 entre 1,8 e 2,0. Para o cálculo da concentração da amostra considerou-se que a absorbância igual a 1 corresponde a 40ng de RNA/ml no comprimento de onda de 260 nm (Sambrook, 1989).

Uma alíquota de aproximadamente 0,5µg de cada RNA foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% para visualização da integridade das amostras

(relação entre intensidade das bandas de rRNA 28 e 18S entre 2 e 1) e de contaminações com DNA.

Transcrição reversa

A transcrição reversa do RNA foi feita com 2-5 µg de RNA total utilizando a enzima transcriptase reversa (Super-script II™ Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para este protocolo foi adicionado ao RNA 1 µl de oligodT (500 µg/ml), 1 µl de dNTP (10 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e água DEPC q.s.p. 12 µl. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 min e depois a 42°C por 2 min em termociclador (MJ research, Inc., Watertown, MA, EUA). Foram adicionados a cada tubo de reação 4 µl de tampão de transcrição 5x (Tris-HCl 250mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de inibidor de RNase (40 U/µL) (RNase OUT™, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 1 µl da Super Script (200 U/µL). As amostras foram então incubadas a 42°C por 50 min seguidos de 70°C por 15 minutos.

Reação de RT-PCR em tempo real

Os primers utilizados nas reações para amplificação do gene alvo CD100 e dos genes endógenos GAPDH e ciclofilina foram desenhados pelo programa Primer Express (Applied Biosystems, EUA). O tamanho dos primers variou de 20 a 25 bases, a temperatura de anelamento (T_m, do inglês *melting temperature*) de 59-62°C, o conteúdo de GC de 45-60% e o tamanho dos produtos de amplificação gerados de 90 a 110pb . Após padronização da concentração de primers (reações com 100, 200, 300 e 400nM de cada par de primers) foram selecionadas as concentrações de 200

nM (ciclofilina) e 300nM (GAPDH e CD100). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, usando o reagente SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o equipamento Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System. A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual de instruções do fabricante ABI PRISM 7500. Para a quantificação relativa, foi usada a linha de corte (Threshold) automática do programa para cada curva de amplificação de um dado par de primers. O número do ciclo em que a ΔRn (medida de fluorescência) cruza o threshold corresponde ao Ct (cycle threshold) da amostra. O valor de Ct é preditivo da quantidade de RNAm alvo presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método de descrito por Pfaffl, 2001.

Especificidade dos primers e qualidade da amplificação

A especificidade dos primers desenhados pelo Primer Express e a qualidade da amplificação foram avaliados pela curva de dissociação. Para isso, após a reação a placa foi submetida a um segundo programa: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto. A presença de um único pico de fluorescência em uma dada temperatura significa que houve amplificação de um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento ou melting point (T_m) do produto de amplificação (amplicon).

Cálculo da eficiência de amplificação dos primers

Para o cálculo da eficiência foi utilizada a equação $E = 10(-1/\text{slope})$, onde E corresponde à eficiência e slope corresponde ao coeficiente de angulação (inclinação) da curva (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al, 2002). Para cada gene estudado foi

realizada uma reação com diluições seriadas de amostra de cDNA (pool das amostras a serem comparadas) de 1/5 a 1/625 e o primer de interesse na concentração ideal pré-determinada (item 13.4). Os valores de Ct obtidos foram plotados em gráfico para cálculo do slope e da eficiência. As eficiências de amplificação foram: 2,02 para CD100, 2,35 para GAPDH e 2,33 para ciclofilina, portanto próximas ao valor ideal de 2.

Seqüência dos primers utilizados

- GAPDH: (F)- TGGTCTCCTCTGACTTCAACA /
(R)-GCCAAATTCGTTGTCATACC
- IL-1 β :(F)- AGGATATGGAGCAACAAGTGGTG /
(R)- ATTCTTTTCCTTGAGGCCCAAG
- CD100:(F)- CGAGAAGCAGCATGAGGTGTATTG /
(R)-CGGATGTAGTTGAGGCACTCTGTC
- STAT-1:(F): CAAGGTGGCAGGATGTCTCAG
(R): TTCCATGGGAAAACCTGTCATCAT
- Plexina B1:(F):ATGCCATTCCGGCACAAG
(R):TCCCCTATCATAGCCACCACC
- Plexina B2: (F):CCATGACCCAGGACAAGGTGTT
(R):GACTCGACAGTGAACACCCGAT

16. Cultura e ativação de HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

As células HUVECs foram cultivadas em meio 199 (Earle) acrescido de penicilina 0,6 μ g/ml, estreptomicina 60 μ g/ml, glutamina 2mM, HEPES 20mM e 10% FCS sobre lamínulas em placas de 24 poços (5x10⁴ células/poço, 500 μ l de meio) para os experimentos de imunocitoquímica com fluorescência ou em placas de 6

poços (4×10^5 células/poço, 2 ml de meio) para experimentos de Real-Time RT-PCR e Western Blot.

Para ativação das HUVECs em cultura (placas de 6 poços) foram testados dois protocolos distintos:

- LPS (Sigma) nas concentrações 1, 2, 4, 6, 8 e $10 \mu\text{g/ml}$ por 6h em estufa a 37°C e 5% de CO_2
- LPS (Sigma, 1 ng/ml) + $\text{TNF-}\alpha$ (Peprotech, 10 ng/ml) por 6h em estufa a 37°C e 5% de CO_2

Para Real-Time RT-PCR, após o período de ativação os poços foram lavados com PBS e as células lisadas com 1ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) por poço, sendo o lisado armazenado a -80°C para posterior isolamento do RNA total.

Para Western Blot foi utilizado um volume de $120 \mu\text{l}$ de tampão de lise (1% Nonidet P-40 (v/v), 50 mM Tris (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA) para cada 4×10^5 células e o cell scraper para auxiliar na remoção das células da placa. Após 30 min, o lisado foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 10 min para retirada de debris celulares.

17. Cultura e ativação de linfócitos T para Real-Time RT-PCR e Western Blot

O sangue heparinizado (1:10.000) foi utilizado para a separação das células mononucleares com protocolo utilizando gradiente de Ficoll-Hypaque Plus (descrito anteriormente).

O isolamento de linfócitos a partir de células mononucleares do sangue periférico foi realizado com o kit de seleção negativa MACS Pan T (Miltenyi Biotec, Germany) seguindo as especificações do fabricante. Resumidamente, após a separação do sangue e isolamento de PBMC as células foram incubadas com

microbeads (anticorpos conjugados com contas magnéticas) e separadas por seleção negativa após passagem por coluna magnética. Os linfócitos que não foram magneticamente imobilizados foram coletados por eluição.

Os linfócitos foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços, na concentração de $2,0 \times 10^6$ células/poço e cultivados em 1ml de meio DMEM (Invitrogen) 10% FCS acrescido de IL-2, IL-7 e IL-15 (R&D) na concentração de 40U/ml para cada uma. Para ativação, foram utilizadas beads CD3/CD28 (MACS, Myilteni), no volume de 0,625µl/poço. Após 5 dias mantidas em estufa, as células foram lisadas com Trizol para RT ou tampão de lise já mencionado para WB.

18. Adesão de monócitos (THP-1) a células endoteliais (HUVECs)

O protocolo de adesão foi adaptado de Hwang et al., 2003. HUVECs foram cultivadas em placas de 24 wells (5×10^4 células/poço) até a confluência em meio 199 (Earle) acrescido de 10% FCS (entre 24-48 horas). Após esse período, as células foram estimuladas como descrito anteriormente em estufa a 37°C por 6h. Durante o período de estimulação das HUVECs, células THP-1 na densidade de 5×10^5 em 1ml de meio RPMI foram incubadas com BCECF-AM (Invitrogen) 1µg/µl a 4 °C por 1h. Após esse período foram centrifugadas (500xg, por 10min) e ressuspensas em meio RPMI 10% FCS com os seguintes tratamentos na concentração final de 10µg/ml, em triplicata, na concentração final de 10µg/ml: anti-CD100 (Abnova); BD16 + BB18 (Dra. Laurence Boumsell); anti-plexina B1 (Santa Cruz); anti-plexina B2 (Santa Cruz); CD100 recombinante (Abnova); anti-plexina B1 + anti-plexina B2; anti-plexina B1 + anti-plexina B2 + CD100 recombinante; anti-CD100 + anti-plexina B1 + anti-plexina B2 + CD100 recombinante; IgG murina total (controle isotópico).

As células THP-1 foram incubadas com cada tratamento por 10 minutos a 4°C. Após esse período, foram colocadas sobre as HUVECs já estimuladas e lavadas com meio RPMI nas placas de 24 poços. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C por 45 min. Após esse período, cada poço foi lavado por 7 vezes com PBS. A análise foi feita em microscópio de fluorescência Zeiss, com auxílio do programa AxioVision. Foram fotografados 6 campos por poço para posterior contagem.

RESULTADOS

1. Análises microscópicas em tecidos e células

Cortes histológicos em lâminas – imunohistoquímica peroxidase e de fluorescência

O principal objetivo das análises em lâminas foi a avaliação comparativa da marcação de CD100 em cortes histológicos de vasos normais e vasos com placa de ateroma, e a posterior identificação das células positivas. Experimentos de imunohistoquímica (marcação por peroxidase) já haviam sido previamente realizados em algumas amostras de vasos normais e de placas (Proj. Pós-Doc FAPESP 03/13521-7); enquanto no vaso normal a marcação observada era restrita ao endotélio, as placas mostraram uma forte marcação de CD100 nas áreas de hiperplasia da íntima, na região de estria gordurosa, ocupada principalmente por macrófagos modificados ou *foam cells*. A partir desses resultados, realizamos experimentos adicionais de imunohistoquímica peroxidase em algumas das placas ateroscleróticas coletadas desde o início do projeto (n total = 42, sendo que 27 foram testadas nesses experimentos). A realização desses experimentos visava principalmente confirmar, através da ampliação do número de amostras, o resultado inicialmente obtido. Em todas as amostras testadas foi observado o mesmo padrão de marcação previamente citado: positividade na área de hiperplasia da íntima, na região gordurosa ocupada por células espumosas (fig.4).

Adicionalmente, foram realizados em algumas placas com marcação para CD100 experimentos com anti-CD68, marcador de macrófagos teciduais (dados Proj.

Pós-Doc FAPESP 03/13521-7). Esses experimentos foram realizados com o objetivo de identificação das células positivas na placas, já que por sua localização e morfologia havia uma forte sugestão de que fossem macrófagos. Os resultados obtidos utilizando os marcadores CD100 e CD68 mostraram o mesmo padrão de marcação, ou seja, as células positivas para CD100 foram também positivas para CD68, mais uma vez sugestivo de que fossem macrófagos (fig. 4).

Figura 4: Imunohistoquímica peroxidase de placa de carótida marcadas com CD100 (A e C) e CD68 (B e D). Em ambas amostras, marcação na camada íntima, na área da estria gordurosa, ocupada por células espumosas. Aumentos: 100x (A e B) e 400x (C e D) (dados Proj. Pós-Doc FAPESP 03/13521-7).

Para avaliar a co-localização dos dois marcadores, experimentos de imunofluorescência foram realizados em cortes histológicos de placas de carótida. No vaso com placa observamos marcação na região gordurosa, ocupada principalmente por macrófagos, como mostrado na figura 5. A sobreposição das duas marcações mostrou que na placa aterosclerótica as células que expressam CD100 são macrófagos. Esses mesmos experimentos foram realizados também em cortes de

vaso normal, onde não foi observada marcação significativa, com exceção do endotélio e da camada adventícia, onde podem ser encontrados macrófagos residentes (dados não mostrados).

Figura 5: Imunofluorescência representativa da dupla marcação de macrófagos com CD68 e CD100 em placa de carótida. A: núcleos corados em azul com DAPI; B: marcação verde de CD68 (FITC); C: marcação vermelha de CD100 (Alexa 660); e D: sobreposição das imagens. Aumentos: 200x.

Para uma análise comparativa da marcação de CD100 entre placas de vasos distintos, realizamos experimentos de imunohistoquímica peroxidase em cortes seriados de placas de coronária (gentilmente cedidos pela Prof. Lourdes Higuchi, Depto. De Anatomia Patológica Incor). Esses experimentos foram realizados para uma análise comparativa da marcação de CD100 entre placas de vasos distintos. Os cortes seriados foram realizados a partir de uma área sadia do vaso, progredindo para a placa e depois saindo desta, de volta para uma área sadia posterior à lesão. Assim pudemos avaliar a marcação ao longo da lesão aterosclerótica, o que não pode ser realizado com as amostras de carótida. A avaliação desses cortes mostrou um padrão similar ao observado nas placas de carótida, ou seja, marcação para CD100 na camada íntima, na área gordurosa, ocupada por células espumosas (fig.6). A mesma marcação foi observada tanto em placas estáveis (na qual não há ruptura ou formação

de trombos) quanto em placas rotas (com ruptura). Algumas células musculares da camada média do vaso também apresentaram marcação (fig.6).

Figura 6: Imunohistoquímica peroxidase de placa de coronária com anti-CD100. A e C: placa estável; B e D: placa rota. Em ambas as amostras, marcação na camada íntima, na área gordurosa, ocupada por células espumosas, como observado em placas de carótida. Algumas células da camada média também apresentam marcação. Aumentos: 100x (A e B) e 400x (C e D).

Para avaliar se a positividade para CD100 era restrita aos macrófagos de placas, partimos então para alguns testes com anti-CD100 e anti-CD68 em cortes de baço, que apresenta abundância de macrófagos.

Figura 7: Imunohistoquímica peroxidase de baço com diferentes marcadores. A: controle negativo; B: CD68; C: CD100, marcação principalmente fora do folículo, mostrando grande quantidade de macrófagos; Aumentos: 100x (B e C) e 400x (A).

A avaliação de CD100 em cortes esplênicos evidenciou marcação de linfócitos na polpa vermelha (área ocupada principalmente por linfócitos T, que expressam CD100), e pouca marcação na polpa branca (linfócitos B) (fig.7). Além disso, foi possível a observação de marcação em macrófagos espalhados no parênquima esplênico e mais raramente dentro da polpa branca, coincidindo com a marcação observada para CD68, marcador de macrófagos (fig. 7).

Realizamos então experimentos de imunofluorescência com dupla marcação, utilizando anticorpos anti-CD100 e anti-CD68. Nesses cortes foi possível observar a co-localização das duas marcações. Embora a maior parte dos macrófagos esplênicos CD68 positivos também foram positivos para CD100 (fig. 8), algumas populações apresentaram apenas marcação positiva para CD68.

Figura 8: Imunofluorescência representativa da dupla marcação de macrófagos com CD68 e CD100 em baço. A: núcleos corados em azul com DAPI; B: marcação vermelha de CD100 (Alexa 660); C: marcação verde de CD68 (FITC) e D: sobreposição das imagens. Aumentos: 200x.

2. Experimentos de diferenciação monócito-macrófago-células espumosas *in vitro*

Cultura e diferenciação de células THP-1 e de monócitos de PBMC

Células da linhagem pré-monocítica leucêmica humana THP-1 foram cultivadas e diferenciadas em macrófagos aderentes e células espumosas *in vitro* sobre lamínulas, conforme descrito posteriormente. Essa linhagem de células monocíticas leucêmicas humanas foi escolhida para a padronização dos experimentos com macrófagos em cultura por ser imortalizada e, portanto de mais fácil manutenção.

Paralelamente utilizamos monócitos separados de PBMC com kit de seleção positiva e também diferenciados em macrófagos e células espumosas *in vitro*. Para esse fim incubamos células mononucleares de sangue periférico obtidas após separação de sangue com gradiente de Ficoll-Hypaque com anticorpos anti-CD14 conjugados com contas magnéticas. A suspensão de células foi passada por uma coluna magnética onde todas as células marcadas são retidas, o que permite a posterior coleta de uma população de monócitos com mais de 95% de pureza.

A análise da eficiência de diferenciação de macrófagos humanos de PBMC é bem complexa, tendo em vista que a maior parte dos marcadores de superfície se mantém ao longo da diferenciação a partir de monócitos, não existindo na literatura um marcador específico de um ou outro tipo celular. Para análise de diferenciação, convencionalmente se utiliza a técnica de citometria de fluxo (FACs), avaliando por meio desta a intensidade de marcação de CD14, pois monócitos apresentam maior expressão dessa molécula quando comparados a macrófagos. Deste modo, em um protocolo bem sucedido de diferenciação de monócitos para macrófagos, deve haver uma queda no nível de expressão desse marcador. Nas culturas realizadas neste trabalho foi observada uma queda significativa na expressão de CD14 nos macrófagos, o que confirma a eficiência do protocolo de diferenciação (dados não mostrados).

Diferenciação de macrófagos em células espumosas

A diferenciação de macrófagos em células espumosas é especialmente interessante por esse tipo celular ser geralmente o mais abundante nas placas de ateroma incluindo as utilizadas para esse estudo. Assim essas células são bastante informativas, e mais próximas de mimetizar a situação in vivo das placas do que macrófagos convencionais.

As células espumosas geradas através dessa metodologia foram utilizadas tanto para experimentos de imunocitoquímica de fluorescência com dupla marcação (CD100 e CD68, como havia sido realizado com cortes de tecido), quanto para experimentos de Real-Time RT-PCR, Western Blot, além de outros experimentos funcionais.

Testamos um protocolo de diferenciação em células espumosas adaptado de Banka et al. (1991) primeiramente em células THP-1. Embora essas células fagocitem mais avidamente LDL acetilado (aLDL) do que o oxidado (Via et al., 1989), utilizamos o LDL oxidado (LDLox, cordialmente cedido pelo prof. Francisco Laurindo, Laboratório de Biologia Vascular) por sua disponibilidade no laboratório. Os monócitos foram diferenciados em macrófagos com PMA e posteriormente cultivados por 48h com LDLox para diferenciação em células espumosas. Após esse período foi possível notar que a maioria das células apresentava morfologia compatível à de células espumosas, adquirindo citoplasma expandido, de aspecto vacuolizado e gorduroso. Posteriormente, testamos o mesmo protocolo em células de PBMC. Para isso, utilizamos monócitos de PBMC obtidos com o kit de seleção positiva, diferenciados em macrófagos com M-CSF e cultivados com LDLox por 48 horas. Da mesma forma que para células THP-1, as células diferenciadas permaneceram aderidas e adquiriram um aspecto gorduroso e vacuolizado no citoplasma, o que é compatível com a morfologia de células espumosas (fig. 9).

Para análise da diferenciação, os critérios utilizados foram a morfologia celular (principalmente tamanho e granulosidade do citoplasma) e a coloração com Oil Red O ou Scarlet R, ambos corantes de lipídeos, marcando-os positivamente em vermelho. Observou-se nas células espumosas uma coloração citoplasmática vermelha mais intensa nas gotículas preenchidas com gordura, além de outras diferenças morfológicas como um maior tamanho (citoplasma expandido) em relação aos macrófagos não diferenciados.

Figura 9: Macrófagos (A e C) e células espumosas (B e D) de células THP-1 (A e B) coradas com Scarlet R e de células de PBMC (C e D) coradas com Oil Red O e contra-coradas com hematoxilina (núcleo em azul). Aumentos: 400x (A e B) e 100x (C e D).

Como podemos observar, as células espumosas apresentam citoplasma mais expandido e granuloso, além de uma quantidade de gordura significativamente maior do que os macrófagos. Consideramos a partir dessa análise que as células haviam sido de fato diferenciadas.

Expressão de CD100 em células - imunocitoquímica de fluorescência

Para confirmar os resultados observados em tecidos e para avaliar a expressão de CD100 ao longo da diferenciação monócito-macrófago-foam cell foram realizados experimentos de imunocitoquímica de fluorescência usando dupla marcação em células aderidas a lamínulas. Assim como em tecidos, foram usados os anticorpos primários anti-CD100 e anti-CD68, analisando a co-localização das marcações.

Nos experimentos de imunocitoquímica fluorescência com células THP-1, as células monocíticas não foram avaliadas por não serem aderentes. No entanto, nos outros dois tipos celulares marcados (macrófagos e células espumosas), foi possível observar a sobreposição da marcação de CD100 e CD68, como havia sido observado em tecidos (figs. 10 e 11).

Figura 10: Imunocitoquímica de fluorescência representativa da dupla marcação de macrófagos (THP1) com CD68 e CD100. A: marcação vermelha de CD100 (Alexa 660); B: marcação verde de CD68 (FITC); C: núcleos corados em azul com DAPI e D: sobreposição das imagens. Aumentos: 1000x.

Figura 11: Imunocitoquímica de fluorescência representativa da dupla marcação de células espumosas (THP1) com CD68 e CD100. A: marcação vermelha de CD100 (Alexa 660); B: marcação verde de CD68 (FITC); C: núcleos corados em azul com DAPI e D: sobreposição das imagens. Aumentos: 1000x.

Após a avaliação em células de linhagem, analisamos a expressão de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas de PBMC para avaliar se a mesma marcação observada em células THP-1 seria observada em células de PBMC, tendo em vista que células de linhagem podem apresentar expressão diferencial de algumas moléculas. Além disso, células derivadas de sangue periférico mimetizam mais fielmente o que ocorre in vivo. Outro ponto importante foi a avaliação da expressão de CD100 em monócitos, visto que monócitos de PBMC são aderentes, permitindo a execução do experimento.

Os experimentos de imunofluorescência dupla marcação com essas células mostraram marcação forte tanto de CD100 quanto de CD68 (fig. 12), confirmando os resultados obtidos nos experimentos em tecidos e em células THP-1.

Figura 12: Imunocitoquímica de fluorescência representativa da dupla marcação de monócitos (A-D), macrófagos (E-H) e células espumosas (I-L) de PBMC aderidos em lamínula com CD68 e CD100. A, E, F: núcleos corados em azul com DAPI; B, F e J: marcação verde de CD68 (Alexa 488); C, G e K: marcação vermelha de CD100 (Alexa 660); D, H e L: sobreposição das imagens. Aumentos: 400x (A-H), 1000x (I-L).

Expressão de CD100 na ultra-estrutura da placa aterosclerótica - imunocitoquímica eletrônica

Para verificar a localização intracelular específica da marcação de CD100 nas placas realizamos análises por microscopia eletrônica de transmissão, técnica que permite o uso de cortes ultrafinos do tecido/célula alvo em grandes aumentos e alta resolução. Como esperado e confirmando os achados da microscopia óptica, observamos marcação específica nas células espumosas, localizadas na região de

estria gordurosa (camada íntima do vaso) (fig. 13). Nessas células, a marcação se mostrou forte em estruturas celulares como as áreas de citoplasma e membrana. Nos vacúolos citoplasmáticos, previamente ocupados por gordura, as marcações se mostram mais evidentes. Não foi detectada marcação no controle negativo.

Figura 13: A. Micrografia eletrônica de transmissão representativa da marcação de CD100 em carótida com placa de ateroma, na região de estria gordurosa. Observa-se o citoplasma de uma foam cell, com núcleo e nucléolo; B. Em detalhe, uma região do citoplasma da célula espumosa mostrando marcação nas vesículas lipídicas e também na membrana. C: controle negativo sem anticorpo primário. Aumentos: 2550x (A), 30000x (B e C).

3. Avaliação da expressão do transcrito de CD100

Expressão de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas de células THP-1 - Real-Time RT-PCR

Estímulo com LPS e vitamina D

Tendo em vista que o RNA mensageiro (RNAm) de CD100 tem sua expressão aumentada na ativação de linfócitos T com PHA (phytohemagglutinin, fitohemaglutinina) (Elhabazi et al., 2001) e também em monócitos de PBMC com IFN- γ (Hu et al., 2008), buscamos avaliar se macrófagos e células espumosas ativados também apresentariam o mesmo padrão de resposta. Para esse fim,

utilizamos inicialmente células THP-1 cultivadas e diferenciadas em macrófagos e tratadas com LPS e/ou vitamina D por períodos de 24, 48 e 72 horas como estímulos de ativação. Macrófagos expressam o receptor Toll-4, que se liga e sinaliza a presença de LPS, induzindo uma potente cascata inflamatória intracelular (Stoll et al., 2006). A vitamina D foi utilizada por sua já bem estabelecida capacidade de ativação de monócitos e macrófagos (Kreutz et al., 1990; Kreutz et al., 1993). Nossa hipótese era de que, tal como em monócitos, estímulos pró-inflamatórios aumentariam a expressão de CD100 nessas células. Após os períodos de ativação a expressão de CD100 foi analisada, sendo a normalização feita com o gene endógeno GAPDH (fig. 14).

Figura 14: Razão entre os valores da expressão de CD100 em macrófagos THP-1 estimulados com LPS ou vitamina D por 6, 12, 24, 48 e 72h e não estimulados, normalizados pela expressão de GAPDH. Representativo de 4 experimentos.

Como podemos observar na figura 14, a expressão de CD100 variou significativamente entre os estímulos e tempos avaliados. Considerando aumento de expressão para razões acima de 2, podemos observar que a vitamina D foi melhor indutor da expressão de CD100, com aumentos nos períodos de 6, 12, 24 e 48h, em

experimentos distintos. Já na ativação com LPS só foi observado aumento de CD100 no tempo de 12h, em dois dos quatro experimentos.

Incluímos a avaliação da expressão de IL-1 β nesses experimentos para 6, 12 e 24h de estímulo. A IL-1 β é uma das primeiras citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos ativados. A verificação de sua expressão foi realizada a fim de demonstrar a ativação dos macrófagos e correlacionar seus picos de expressão com os de CD100.

Figura 15: Razão entre os valores normalizados da expressão de IL-1 β em macrófagos de THP-1 estimulados com vitamina D ou LPS durante 6, 12 ou 24 horas e não estimulados, utilizando o gene controle GAPDH.

Na figura 15 observamos que a expressão de IL-1 β apresentou um padrão um pouco mais consistente, apresentando-se elevada e crescente nos períodos testados frente a ambos os estímulos. Além disso, considerando as médias dos experimentos os picos de expressão de CD100 e IL-1 β geralmente coincidiram, demonstrando uma relação direta entre o grau de ativação e a expressão de CD100 sob esse estímulo em macrófagos THP-1. Um dado interessante é que embora a estimulação com vitamina D tenha induzido uma maior expressão de CD100 nessas células (fig. 14), a ativação

com LPS resultou em uma expressão significativamente maior de IL-1 β em dois dos três períodos de estímulo.

Estímulo com IFN- γ

Uma vez observado que a expressão do RNAm de CD100 aumentava sob ativação com estímulos pró-inflamatórios (vitamina D e LPS), decidimos analisar a expressão de CD100 sob a ativação com IFN- γ , um estímulo inflamatório clássico. Esses experimentos tiveram como objetivo principal não só a avaliar a modulação da expressão dessa molécula mediante ativação com IFN- γ , mas também a expressão diferencial de CD100 entre os tipos celulares (monócitos, macrófagos e células espumosas) analisados, ao longo de sua diferenciação. Optamos por estimular com IFN- γ ao invés de outros estímulos inflamatórios usados anteriormente devido à disponibilidade de dados de expressão de CD100 em monócitos após estímulo com IFN- γ na literatura (Hu et al., 2008), e principalmente por essa ser uma citocina muito abundante nas lesões ateroscleróticas (Hansson et al., 1998). Como controle da ativação, foi analisada a expressão de STAT-1, por essa ser uma das principais moléculas aumentadas após o acoplamento de IFN- γ com seu receptor (Schroder et al., 2004).

Células THP-1 foram cultivadas, diferenciadas em macrófagos e em células espumosas e ativadas com IFN- γ . Como anteriormente, foi avaliada a expressão de CD100 e STAT-1 em relação à expressão de GAPDH por Real-Time RT-PCR. Na análise da expressão de CD100 em cada tipo celular após ativação (fig. 16), observamos que os transcritos de CD100 se mantiveram inalterados em todos os

tipos celulares testados, embora os resultados sejam muito variáveis entre os experimentos.

Figura 16: Razão entre os valores da expressão de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas, estimulados ou não (+ ou -) com IFN- γ e normalizados pela expressão de GAPDH. O gráfico de dispersão foi escolhido para mostrar a grande variabilidade entre as amostras. Médias (vermelho) e os desvios-padrão (T) representativos de 5 experimentos.

No entanto, quando analisamos a expressão de STAT-1 (fig. 17), observamos que monócitos e macrófagos foram ativados, enquanto que as células espumosas mostraram um baixo nível de ativação, não significativo. Esses resultados mostram que não houve modulação da expressão de CD100 nessas células sob esse estímulo pró-inflamatório em específico.

Figura 17: Razão entre os valores da expressão de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas, estimulados ou não (+ ou -) com IFN- γ e normalizados pela expressão de GAPDH. Médias e desvios-padrão representativos de 5 experimentos.

Na análise da expressão de CD100 ao longo da diferenciação, mostrada na figura 18, observamos grande variabilidade na expressão de CD100 na transição de monócitos para macrófagos, que diminui quando essas células são ativadas. Monócitos expressam 2,5 vezes menos RNAm de CD100 quando comparados a macrófagos, diferença que diminui na ativação dessas células. Já na transição de macrófagos para células espumosas há uma diminuição de 10 vezes na expressão de CD100, que é mantida após ativação. Embora alguns valores não sejam significativos diante do desvio, podemos observar que macrófagos THP-1 possuem maior quantidade relativa de transcritos de CD100 quando comparados aos outros dois tipos celulares analisados.

Figura 18: Razões da expressão de CD100 ao longo da diferenciação de monócitos para macrófagos e de macrófagos para células espumosas (THP-1), em células estimuladas (+) ou não (-) com IFN- γ relativas à expressão de GAPDH. O gráfico de dispersão foi escolhido para mostrar a grande variabilidade entre as amostras. Médias (vermelho) e os desvios-padrão (T) de 5 experimentos.

4. Cinética de estimulação e expressão de CD100 em macrófagos de PBMC - Real-Time RT-PCR

Células de PBMC mimetizam com maior fidelidade a condição *in vivo*. Assim, experimentos de expressão de CD100 semelhantes aos realizados com células THP-1 foram também feitos com monócitos separados de PBMC e diferenciados *in vitro* em macrófagos e células espumosas. Esperávamos que essas células apresentassem um perfil de expressão gênica mais consistente, ou seja, menor variabilidade quando comparados com células de linhagem.

Estímulo com Vitamina D e LDLox

Inicialmente realizamos experimentos ($n = 2$) de cinética de estimulação em macrófagos de PBMC. Para isso, os macrófagos diferenciados foram submetidos a

diferentes condições de cultura, por períodos de 10, 18, 24 e 34h com vitamina D (estímulo pró-inflamatório) e com LDL oxidado (estímulo pró-aterogênico). Após os períodos estipulados, os lisados foram avaliados quanto à expressão de CD100 e IL-1 β em relação à expressão de GAPDH.

Como pode ser observado na figura 19, houve aumento da expressão de CD100 com vitamina D no período de 24h, e mais tardiamente com LDLox, em 34h. Esse aumento coincidiu com a expressão aumentada de IL-1 β apenas no período de 24h com vitamina D (fig. 20). A não coincidência entre o aumento da expressão dos dois genes em todas as situações pode decorrer de diferenças do tempo necessário para ativação e/ou meia-vida dos RNAs.

Figura 19: Gráficos comparativos de 2 experimentos (2 indivíduos) mostrando a razão da expressão de CD100 em macrófagos de PBMC estimulados com vitamina D ou LDLox nos períodos de 10, 18, 24 ou 34 horas sobre não estimulados, normalizados com GAPDH. Média e desvios-padrão são mostrados.

Figura 20: Razão da expressão de IL-1 β em macrófagos de PBMC estimulados com vitamina D ou LDLox (10, 18, 24 ou 34h) sobre não estimulados, normalizados com GAPDH e ciclofilina.

Estímulo com IFN- γ

Monócitos, macrófagos e células espumosas de PBMC foram ativados com IFN- γ por 24h e a expressão do RNAm de CD100 foi avaliada, como realizado em células THP-1. Da mesma forma, como controle da ativação foi analisada a expressão de STAT-1.

Na figura 21 observamos que monócitos e macrófagos apresentaram um aumento do RNAm de CD100 após ativação, ao contrário do observado para células THP-1 e semelhante ao já descrito para monócitos (Hu et al, 2008). No entanto, podemos também observar que a ativação com IFN- γ não modula a expressão de CD100 em células espumosas de PBMC. Esse resultado está de acordo com o observado para células espumosas de THP-1.

Figura 21: Razão entre os valores da expressão de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas de PBMC, estimulados ou não (+ ou -) com IFN- γ por 24h e normalizados pela expressão de GAPDH. O gráfico de dispersão foi escolhido para mostrar a grande variabilidade entre as amostras. Médias (em vermelho) e desvios-padrão (T) representativos de 7 experimentos.

Quando analisamos a expressão de STAT-1, é possível constatar que todas as células foram eficientemente ativadas, principalmente macrófagos, seguido de monócitos (fig. 22). As células espumosas apresentaram o menor índice de ativação (embora ainda com expressão relativa superior a 2x), o que também pode explicar a sua baixa expressão de CD100 mediante ativação.

Figura 22: Razão entre os valores da expressão de STAT-1 em monócitos, macrófagos e células espumosas de PBMC, estimulados ou não (+ ou -) com IFN- γ por 24h e normalizados pela expressão de GAPDH. Médias e desvios-padrão representativos de 7 experimentos.

Na análise ao longo da diferenciação vemos que os monócitos são as células que mais expressam CD100, principalmente quando ativadas (fig. 23), diferentemente do observado em células THP-1, e de acordo com o observado por Hu e colaboradores (2008). A expressão de CD100 é ainda menor em células espumosas quando comparados com macrófagos (fig. 23), mostrando um declínio da expressão de CD100 ao longo da diferenciação dessas células.

Figura 23: Razão entre os valores da expressão de CD100 ao longo da diferenciação entre monócitos, macrófagos e células espumosas de PBMC, estimulados ou não (+ ou -) com IFN- γ por 24h e normalizados pela expressão de GAPDH. O gráfico de dispersão foi escolhido para mostrar a grande variabilidade entre as amostras. Médias (em vermelho) e desvios-padrão (T) representativos de 7 experimentos.

5. Expressão protéica de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas de THP-1 e PBMC -- Western Blot

Para complementar os dados de expressão gênica, realizamos a análise da expressão protéica de CD100. Assim como anteriormente, utilizamos monócitos, macrófagos e células espumosas diferenciadas de células THP-1 e de PBMC. Adicionalmente, incluímos linfócitos T ativados ou não com beads CD3/CD28 como controle positivo.

Os resultados desses experimentos mostraram duas bandas, de tamanhos aproximados de 150kDa e 120kDa (como já observado em linfócitos T por Elhabazi et al., 2001) em todos os tipos celulares avaliados (fig. 24). É provável que a banda de 150kDa corresponda a forma de membrana e a de 120kDa resulte do “shedding” da molécula após ativação, como ocorre em linfócitos (Bougeret et al., 1992).

Figura 24: Expressão de CD100 e β -actina em linfócitos T estimulados com beads CD3/CD28 (1), monócitos (2), macrófagos (3) e células espumosas (4) de PBMC e monócitos (5), macrófagos (6) e células espumosas (7) de THP-1 estimulados (5b, 6b e 7b) ou não com IFN- γ por 24h.

Na figura 24 pode ser observado ainda que a expressão de CD100 diminui tanto nas células THP-1 (principalmente) quanto nas de PBMC à medida que elas se diferenciam de monócitos para macrófagos e células espumosas. No entanto, há uma diferença na expressão das duas bandas (150 e 120kDa) de acordo com o tipo celular avaliado. Nas células THP-1, macrófagos tem a banda de 120kDa mais evidente, enquanto que monócitos e células espumosas expressam principalmente a de 150kDa.

Para estímulo com IFN- γ utilizamos apenas as células de THP-1, já que o baixo rendimento de monócitos, macrófagos e células espumosas de PBMC não permitiu obtenção de extratos protéicos com e sem estímulo. Na análise da densitometria (fig. 25), observamos o oposto ao observado nos experimentos de expressão gênica: exceto por linfócitos T, não houve aumento da expressão protéica de CD100 mediante ativação com IFN- γ em nenhum tipo celular analisado, nem mesmo em células de PBMC, as quais apresentaram aumento do RNAm de CD100 sob essa estimulação. Outro ponto é que apenas para células THP-1 foi observado um declínio significativo ($p < 0.001$) da expressão de CD100 ao longo da diferenciação, contrastando com os resultados obtidos com Real-Time RT-PCR para a mesma linhagem de células. Monócitos THP-1 expressam os maiores níveis protéicos de CD100 dentre os tipos celulares avaliados, inclusive em relação aos macrófagos, os

quais possuem os maiores níveis de transcritos de RNAm de CD100 (fig. 18). Já para células de PBMC, não houve diferenças estatísticas entre os diferentes tipos celulares analisados, embora seja possível notar uma maior expressão em monócitos, que cai à medida que estes se diferenciam em macrófagos e células espumosas.

Figura 25: Densitometria das bandas de CD100 e β -actina, mostrando a razão CD100/ β -actina para cada tipo celular. Média e desvio-padrão de 3 experimentos são apresentados (* $p < 0.001$, two-way ANOVA).

Os dados dos experimentos mostrados até agora estão representados no artigo, já submetido na revista International Journal of Cardiology (Anexo II).

6. Diferenciação de macrófagos M1 e M2 de PBMC in vitro

Recentemente foi demonstrado que monócitos humanos também dão origem à macrófagos polarizados M1 e M2 (Duan et al., 2009), assim como ocorre com linfócitos T. Macrófagos M1 são diferenciados a partir de estímulos como IFN- γ e outras citocinas do perfil Th1. Em contrapartida, quando monócitos são estimulados

com citocinas Th2 como a IL-4 e a IL-13 eles se diferenciam em macrófagos M2, de natureza anti-inflamatória, promovendo fibrose e associados com processos de reparo tecidual (Gordon, 2003).

Levando em consideração a grande diferença no fenótipo e atividade dessas células, nos perguntamos qual seria o perfil de expressão de CD100 nas mesmas. Para esse fim, cultivamos monócitos separados de sangue e os diferenciamos em macrófagos com M-CSF, adicionando posteriormente as citocinas necessárias para a diferenciação em M1 ou M2 no meio de cultura, como descrito por Martinez et al., 2006 (ver Material e Métodos). Após o período de cultura a morfologia das células era completamente distinta: enquanto macrófagos M1 apresentavam citoplasma espalhado com grânulos no interior e formato fusiforme, as células M2 se mostravam mais redondas e com poucos grânulos (fig. 26).

Figura 26: Macrófagos do tipo M2 (A) e M1 (B) de PBMC. M2 possuem morfologia arredondada, enquanto M1 são fusiformes. Aumentos: 200x

Análise da expressão de CD100 em macrófagos M1 e M2 por Real-Time RT-PCR

Após o período de diferenciação, as amostras foram usadas para Real-Time, avaliando-se a expressão de CD100 em relação à expressão de GAPDH. A figura 27

apresenta os valores da expressão de CD100 nas células M1 e M2 em relação ao controle (macrófagos não diferenciados), em quatro experimentos distintos.

Figura 27: Razões entre a expressão de CD100 em macrófagos M1 ou M2 de PBMC e macrófagos não estimulados, utilizando o gene controle GAPDH como normalizador. Representativo de 4 experimentos.

Podemos observar que o nível de expressão de CD100 aumentou em ambos os tipos polarizados de macrófagos; no entanto, esse aumento foi significativamente maior em macrófagos M1. Dessa maneira, os resultados indicam que nesse tipo celular a expressão de CD100 pode estar mais vinculada a um perfil inflamatório.

Análise da expressão de CD100 em macrófagos sob diferentes protocolos de ativação por Real-Time RT-PCR

Além da diferenciação de macrófagos polarizados M1 e M2, também testamos protocolos de ativação ou regulação distintos utilizando diferentes citocinas após a diferenciação de monócitos de PBMC em macrófagos (ver Material e Métodos). O objetivo principal desses experimentos foi avaliar a expressão de CD100 nos diferentes protocolos utilizados, seguindo a análise previamente realizada para macrófagos M1 e M2. Além disso, foi levantada a hipótese de que CD100 poderia

ser uma molécula expressa em condições de regulação, i.e., sob estímulos como IL-10 e IL-4, baseada principalmente no fato de células THP-1 não terem o RNAm de CD100 aumentado na estimulação com IFN- γ , e por a expressão de CD100 ser gradativamente reduzida ao longo da diferenciação de monócitos até células espumosas, tanto de células THP-1 quanto de PBMC.

Foram realizados os protocolos de estímulo: mac + LPS; mac + IL-4; mac + IL-10; mac + CD100; mac + CD100 + LPS; mac + CD100 + IFN- γ ; mac + LPS + IFN- γ , por 24h. Os resultados da expressão de CD100 em relação à condição controle sem estímulo, após normalização por GAPDH encontram-se na figura 28.

Figura 28: Razões entre a expressão de CD100 em macrófagos de PBMC estimulados com protocolos distintos e macrófagos não estimulados, utilizando o gene controle GAPDH como normalizador. Representativo de 3 experimentos, com os valores de média e desvio-padrão representados.

Como podemos observar a ativação com LPS aumentou a expressão de CD100 em macrófagos. Quando o LPS foi combinado com CD100 (proteína recombinante) ou com IFN- γ , esse aumento foi ainda mais pronunciado. Embora a estimulação com CD100 isoladamente não tenha tido esse efeito, a presença da proteína juntamente

com o LPS faz com que a razão da expressão de CD100 aumente mais de 2 vezes relação às células não estimuladas, demonstrando um sinergismo que confere uma atividade de feedback positivo para CD100. Ainda nesse raciocínio, em experimentos descritos anteriormente em que utilizamos IFN- γ isoladamente na ativação dessas células observamos um aumento na expressão de CD100, embora com grande variabilidade entre as amostras analisadas. Dessa forma, os resultados obtidos indicam que o LPS (isoladamente) pode ser um potente ativador de CD100 em macrófagos de PBMC, e adicionalmente, que CD100 pode apresentar um sistema de feedback positivo quando combinado com outros estímulos pró-inflamatórios.

Outro resultado interessante é o aumento da expressão de CD100 na estimulação com IL-10, citocina de natureza anti-inflamatória. Embora sejam necessários mais experimentos para avaliar se esse resultado é significativo, podemos prematuramente sugerir um papel duplo de CD100 em macrófagos, sendo expresso tanto em condições inflamatórias (na presença de LPS) quanto de regulação (com IL-10). Esses dados são interessantes principalmente porque com base na literatura disponível até o momento CD100 é considerada uma molécula de natureza basicamente inflamatória.

O estímulo com IL-4 também aumentou a expressão de CD100 em macrófagos, como anteriormente mostrado na diferenciação em M2 (fig. 27). No entanto o tempo de ativação com essa citocina foi maior nesse experimento (24h vs. 18h para diferenciação em macrófagos M2). A diferença de 6h foi o suficiente para diminuir a expressão de CD100 de ~ 4 vezes para ~ 2 vezes, o que indica uma tendência à diminuição da expressão do RNAm de CD100 ao longo do tempo.

7. Expressão de CD100 em células endoteliais

Cortes histológicos em lâminas – imunohistoquímica peroxidase

Paralelamente aos ensaios de imunohistoquímica realizados para a confirmação da positividade de CD100 nas placas de ateroma coletadas, foram também realizados experimentos comparativos com vasos normais, que não mostraram marcação exceto em células endoteliais (fig. 29).

Figura 29: Imunohistoquímica peroxidase para CD100 em vaso normal, mostrando positividade no endotélio. Aumentos: **A:** 100x; **B:** 400x.

O achado de CD100 no endotélio dos vasos normais foi inesperado, visto que sua expressão em células endoteliais já havia sido testada, com resultados negativos (Bougeret et al., 1992). Monócitos de PBMC apresentam um aumento na expressão do RNAm de CD100 quando ativados (Hu et al., 2008) assim como macrófagos cultivados *in vitro*, conforme apresentado anteriormente; dessa maneira, monócitos ativados circulantes se ligariam a plexina B1 expressa no endotélio, facilitando e estabilizando o contato entre células. Especulamos que CD100 expresso em células endoteliais também poderia fazer parte do amplo rol de moléculas de adesão que promove o seqüestro e subsequente diapedese de monócitos do fluxo sanguíneo para o espaço subendotelial. Para isso, o CD100 expresso pelo endotélio ativado se ligaria

a seu receptor em monócitos, ainda desconhecido, mas possivelmente plexina B2, constituindo uma ligação de duas vias entre os dois tipos celulares.

Procuramos realizar o mesmo experimento de imunohistoquímica para CD100 em amostras de placas que apresentassem o endotélio preservado, no entanto, não encontramos nenhuma amostra em que isso pudesse ser observado. Na grande maioria dos casos, o endotélio não estava mais presente (havia sido totalmente destruído no processo de aterogênese) ou estava presente em apenas pequenos trechos, nos quais ficou difícil a interpretação da marcação.

Nesse mesmo contexto, confirmamos a já descrita expressão de plexina B1, receptor de CD100 de alta afinidade (Tamagnone et al., 1999) no endotélio, sustentando a hipótese de que CD100 presente em monócitos ativados se acoplaria na plexina B1 presente no endotélio. Para isso, utilizamos cortes de carótidas normais e de placas de ateroma. Observamos marcação positiva para plexina B1 no endotélio dos vasos normais (fig. 30) e também no endotélio dos vasos da vasa vasorum (vasos da camada adventícia, que nutrem os vasos). Já para os cortes de placa, não foi possível observar marcação (o endotélio não se encontrava preservado).

Figura 30: Imunohistoquímica peroxidase para plexina B1 em vaso normal, mostrando positividade em células endoteliais, tanto do próprio vaso (A), quanto da vasa vasorum (B). Aumentos: 400x

8. Expressão de CD100 em HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) – imunocitoquímica de fluorescência

Experimentos funcionais com células endoteliais geralmente utilizam células primárias de cordão umbilical humano (HUVECs). Para confirmar se essas células expressavam CD100 como visto no endotélio dos cortes histológicos dos vasos normais, foram realizados experimentos de imunocitoquímica fluorescência nas células aderidas a lamínulas. A figura 31 mostra que as HUVECs apresentaram forte marcação para CD100, portanto podem ser usadas para experimentos funcionais avaliando o papel da molécula nesse tipo celular.

Figura 31: Imunocitoquímica de fluorescência representativa da marcação de CD100 em HUVECs aderidas em lamínula. Observa-se marcação vermelha de anti-CD100 e anti-IgG Alexa 660 (B) e a coloração azul de núcleos com DAPI (A). Sobreposição das imagens em (C). Aumentos: 100x.

9. Expressão do RNAm de CD100 em HUVECs --- Real-Time RT-PCR

Para avaliar a resposta de células endoteliais a fatores comuns ao longo da aterogênese, analisamos a expressão de CD100 em células endoteliais (HUVECs)

submetidas a diferentes estímulos: 1) concentrações crescentes de LPS (estímulo pró-inflamatório); 2) LPS + TNF (estímulo pró- inflamatório) e 3) sem estímulo.

A expressão de CD100 em células estimuladas vs. não estimuladas foi quantificada por Real-Time RT-PCR e normalizada em relação à expressão de GAPDH. Visto que o nível de expressão de CD100 se manteve constante ou diminuiu mediante ativação mesmo nas concentrações mais elevadas de LPS (dados não mostrados), apresentamos na figura 32 os dados da maneira inversa, i.e., HUVECs não ativadas/ HUVECs ativadas. Observamos que as células não ativadas apresentam altos níveis de expressão de CD100 quando comparadas às células ativadas, assim como observado nos experimentos realizados em células THP-1 (fig. 16). O resultado foi confirmado em três experimentos distintos (HUVEC1, HUVEC2 e HUVEC3) (fig. 32).

Figura 32: Razão entre os valores da expressão de CD100 em HUVECs não estimuladas/estimuladas com LPS e TNF- α por 6h, utilizando o gene controle GAPDH como normalizador. Médias (em vermelho) e desvios-padrão (T) de 3 experimentos são apresentados.

10. Expressão protéica de CD100 em HUVECs -- Western Blot

Para auxiliar na interpretação dos dados obtidos sobre a expressão de CD100 em células endoteliais por análises microscópicas de tecidos e células e também por Real-Time RT-PCR, avaliamos a expressão protéica de CD100 em HUVECs. Para isso, utilizamos HUVECs estimuladas ou não com LPS e TNF, em três experimentos distintos. Os resultados obtidos foram semelhantes aos observados para células THP-1. Foram detectadas duas bandas de tamanhos aproximados de 150kDa e 120kDa, tanto nas células ativadas quanto nas não ativadas (fig. 33).

Figura 33: Expressão de CD100 e β -actina em HUVECs estimuladas (4) ou não (3) com TNF- α e LPS por 6h e de linfócitos T estimulados (2) ou não (1) com beads CD3/CD28. Representativo de 3 experimentos

As células HUVECs não ativadas expressam maiores níveis de CD100 do que as ativadas, o que está de acordo com os resultados obtidos com Real-Time RT-PCR para essas células (fig. 32).

No gráfico de densitometria (fig. 34) podemos observar que os três experimentos realizados tiveram resultados bastante semelhantes. Podemos concluir que em células endoteliais a expressão de CD100 é diminuída em ambientes inflamatórios, o que sugere um papel potencialmente regulatório dessa molécula nesse tipo celular. Essa hipótese é interessante principalmente por contrastar com a

informação disponível na literatura sobre a natureza inflamatória de CD100 no modelo murino e também em humanos.

Figura 34: Densitometria das bandas de CD100 e β -actina, mostrando a razão das bandas de 150kDa e 120kDa e soma das duas bandas de CD100/ β -actina para cada tipo celular. Média e desvio-padrão de 3 experimentos (* $p < 0.001$, two-way ANOVA).

11. CD100 na aterosclerose - experimentos funcionais

O segundo principal objetivo deste trabalho é estabelecer uma função para CD100 na aterosclerose. Para isso, foi realizada inicialmente a análise da expressão de dois possíveis receptores de CD100, plexina B1 e plexina B2, em monócitos de células THP-1 e de PBMC. A análise das plexinas busca responder duas questões principais:

- 1) avaliar se algum dos dois receptores está presente nessas células e efetivamente medeia as ações de CD100 nesse tipo celular;
- 2) avaliar a participação da plexina em questão (definida após responder à primeira pergunta) na adesão entre células endoteliais e monócitos.

Para os experimentos de adesão, partimos do conhecimento que CD100 é expresso por ambos os tipos celulares e que provavelmente há uma diferença nos

receptores utilizados para o acoplamento dessa molécula nas células em questão: células endoteliais ligam-se ao CD100 dos monócitos através da plexina B1, e monócitos ligam-se ao CD100 de células endoteliais através de outro receptor que não a plexina B1 (provavelmente a plexina B2), já que essas células não expressam esse receptor (Chabbert-de Ponnat et al., 2005) (fig. 35).

Figura 35: Desenho esquemático representando o acoplamento de duas vias que possivelmente ocorre entre monócitos e células endoteliais através de CD100 e as plexinas B2 (?) e B1, respectivamente. Adaptado de Kumanogoh & Kikutani, 2001.

Além da análise dos receptores e dos experimentos de adesão de monócitos a células endoteliais foram também realizados experimentos de incorporação de LDLox, descritos a seguir.

12. Expressão de plexina B1 e B2 em monócitos, macrófagos e células espumosas de PBMC por imunocitoquímica de fluorescência com dupla marcação

Avaliamos a expressão das plexinas B1 e B2 em monócitos, macrófagos e células espumosas de PBMC em experimentos de imunocitoquímica de

fluorescência. Para isso, monócitos de PBMC foram separados com kit de seleção positiva, cultivados e diferenciados (ou não) sobre lamínulas, conforme descrito em Material e Métodos. As células foram incubadas com anti-plexina B1 ou anti-plexina B2 e anti-CD68, marcador desses tipos celulares.

Nesses experimentos de dupla marcação observou-se o mesmo padrão de marcação para os três tipos celulares avaliados. Houve forte marcação para plexina B2 e CD68, que co-localizaram nessas células (fig. 37), e ausência de marcação para plexina B1 (fig. 36).

Figura 36: Imunocitoquímica por fluorescência com dupla marcação representativa de monócitos (A-D), macrófagos (E-H) e células espumosas (I-L) de PBMC. B, F, J: marcação vermelha (Alexa 660) de plexina B1; C, G, K: marcação verde (Alexa 488) de CD68; A, E e C: marcação nuclear azul com DAPI; D, H, L: sobreposição das imagens. Aumentos: A-D: 200x; E-L: 1000x.

Figura 37: Imunocitoquímica por fluorescência com dupla marcação representativa de monócitos (A-D), macrófagos (E-H) e células espumosas (I-L) de PBMC. B, F, J: marcação vermelha (Alexa 633) de plexina B2; C, G, K: marcação verde (Alexa 488) de CD68; A, E e I: marcação nuclear azul com DAPI; D, H, L: sobreposição das imagens. Aumentos: A-D: 200x; E-H: 400x, I-L: 1000x

Esses experimentos mostraram que o receptor de CD100 nessas células é a plexina B2 e não a plexina B1 (como é o caso de HUVECs e outras células do sistema nervoso). A ausência de plexina B1 nestas células mielóides é coerente com os dados de Chabbert-de Ponnat et al., 2005, que mostraram o efeito de CD100 sobre monócitos mas não identificaram o receptor envolvido.

13. Expressão de plexinas B1 e B2 em monócitos, macrófagos e células espumosas por Western Blot

Na busca de dados quantitativos sobre a expressão das plexinas B1 e B2 avaliamos a expressão protéica dessas moléculas em monócitos de THP-1 e de PBMC por Western blot. Para isso, utilizamos lisados desses dois tipos de monócitos e de monócitos de PBMC estimulados com IFN- γ . Para cada um dos anticorpos, foram utilizados controles positivos, sendo eles HUVECs para plexina B1 (Basile *et al.*, 2004) e linfócitos B para plexina B2 (Yu *et al.*, 2008).

A plexina B1 foi detectada como uma banda única de 240kDa, aparecendo somente no controle positivo (HUVECs), mas ausente em todas as demais amostras analisadas (fig. 38). Esse resultado está de acordo com o observado nos dados de imunofluorescência apresentados nas figuras 32 e 33.

Figura 38: Expressão de plexina B1 e β -actina em HUVECs (1), monócitos PBMC (2), monócitos PBMC ativados com IFN- γ por 24h (3) e monócitos THP-1 (4).

Para plexina B2 foram detectadas nas amostras duas bandas de tamanhos distintos, sendo elas de 300kDa e 200kDa, representando o precursor e a forma ativa da proteína, respectivamente (fig. 39). Nos monócitos de PBMC, ativados ou não, a banda presente foi a de 200kDa, enquanto que nos monócitos de THP-1, só se observou a banda de 300kDa. Esse resultado é interessante e demonstra a complexidade das alterações pós-traducionais dessa proteína nos diferentes tipos

celulares analisados. Não foi detectada nenhuma banda no controle positivo, o que indica que linfócitos B não são bons controles para essa proteína, ao contrário do observado por Yu e colaboradores (2008).

Figura 39: Expressão de plexina B2 e β-actina em linfócitos B (1), monócitos PBMC (2), monócitos PBMC ativados com IFN-γ por 24h (3) e monócitos THP-1 (4).

Na análise da densitometria (fig. 40) observamos que há pouca diferença na expressão protéica da plexina B2 mediante ativação com IFN-γ nos monócitos de PBMC. Os monócitos THP-1 são os que expressam maior nível de plexina B2 quando comparados aos demais, no entanto apenas a forma precursora da proteína.

Figura 40: Densitometria das bandas de plexina B2 e β-actina, mostrando a razão plexinaB2/β-actina para cada tipo celular. Valores de média e desvio padrão para 3 experimentos.

14. Adesão monócitos-células endoteliais

Levando em consideração o fato de que CD100 atua como uma molécula de adesão em algumas situações, umas das hipóteses levantadas é que CD100 seja importante numa das primeiras etapas do processo de aterogênese, atuando como uma das moléculas de adesão que estabiliza o contato entre monócitos recrutados da circulação e o endotélio ativado. Para verificar essa hipótese realizamos ensaios de adesão entre monócitos-células endoteliais com bloqueio de CD100 ou de seus receptores.

O experimento de adesão utilizou monócitos THP-1 corados com o corante vital BCECF (Invitrogen), um corante que fica fluorescente somente sob a ação de esterases presentes em células vivas, sendo assim muito utilizado como indicador de viabilidade celular. HUVECs foram cultivadas em placas até a confluência, e depois ativadas com LPS + TNF- α por 6h. Após esse período, as células THP-1 já marcadas foram incubadas com as HUVECs já estimuladas nas seguintes condições de bloqueio de CD100 ou de seus receptores:

- 1) anti-CD100;
- 2) BD16 + BB18;
- 3) anti-plexina B1;
- 4) anti-plexina B2;
- 5) CD100 recombinante;
- 6) anti-plexina B1 + anti-plexina B2;
- 7) anti-plexina B1 + anti-plexina B2 + CD100 recombinante;
- 8) anti-CD100 + anti-plexina B1 + anti-plexina B2 + CD100 recombinante;
- 9) IgG murina total (controle isotípico);
- 10) sem bloqueio;

Após a incubação e as lavagens, fez-se a contagem das células marcadas (THP-1 aderidas) de seis campos aleatórios por poço, fotografados utilizando o

microscópio de fluorescência (fig. 41). Após a contagem e soma dos seis campos, foi feita uma média com a soma dos dois outros poços de cada triplicata.

Figura 41: Poços com células endoteliais aderidas e células THP-1 coradas com BCECF (verde) aderidas às células endoteliais. A. Representativo de campo com bloqueio de plexina B2 (condição 4). B. Representativo de campo sem bloqueio (condição 10). Aumento: 100x.

Nos experimentos representados na figura 42, observamos que as condições 4-7 foram as que mais bloquearam a interação THP-1/HUVEC, com destaque para a condição 7 (anti-plexinas + proteína CD100). Esse bloqueio foi quase o mesmo obtido somente com a utilização de anti-plexina B2 (condição 4), sugerindo que esse seja o principal receptor que medeia a atividade de CD100 como molécula de adesão. Para os anticorpos anti-CD100 utilizados (condições 1 e 2), observamos que apenas a condição 1 teve um efeito bloqueador (anti-CD100 comercial), embora menor do que o dos bloqueios já discutidos, e que a combinação de BD16 e BB18 não reduziu mas sim aumentou a adesão em comparação com a condição sem bloqueio (condição 10). Os experimentos foram realizados de maneira semelhante, somente alterando a “condição controle”, que apresentava alto nível de adesão. No experimento 1, o controle utilizado foi IgG murina purificada não relacionada; nos experimentos 2 e 3 foi utilizado um anticorpo anti-Fc nas condições 4-7 e no controle, que nesse caso foi

soro total murino; no experimento 4 foi utilizado como controle uma IgG total de cabra.

Figura 42: Gráfico representativo do número de monócitos THP-1 aderidos em HUVECs estimuladas com LPS e TNF- α por 6h, colocadas sob diferentes condições de bloqueio de CD100 e seu receptor. Cada barra representa a média do número de células contadas em cada poço da triplicata. Representativo de 5 experimentos.

Embora a condição controle tenha permanecido um problema em todos esses experimentos, na análise geral observamos que os resultados obtidos nos experimentos 1-4 indicam que o melhor bloqueio foi mediado por anticorpos que reconhecem as plexinas e não pela molécula de CD100 em si. A presença da proteína recombinante CD100, que ocuparia as plexinas presentes tanto nas HUVECs (plexina B1) quanto nas células THP-1 (plexina B2) exacerba esse efeito, reforçando o importante papel das plexinas na adesão monócito-célula endotelial. Tal

resultado é mais nitidamente observado quando avaliamos a razão entre as diferentes condições de tratamento (bloqueio) e a condição não tratada (condição 10), mostrando a modulação da adesão por cada condição de bloqueio (fig. 43).

No entanto, o bloqueio observado na condição 9 (controle isotípico), bem semelhante ao observado nas condições 1 e 3, é um fator limitante para conclusões mais definitivas nesses experimentos.

Figura 43: Razão entre o número médio de células aderidas tratadas com diferentes condições de bloqueio (1-9) sobre células aderidas sem bloqueio (10). Médias e desvios-padrão representativos de 4 experimentos.

Em experimentos subsequentes (5-7), mudamos a condição controle (9) e foi mantida as demais condições. As mudanças nessa condição foram: mix de IgG purificada murina e de goat; IgG purificada murina e de goat mais anti-FcR e novo soro total murino. No entanto, em todos os casos a condição controle continuou bloqueando a adesão, o que foi indesejado.

Diante da variabilidade dos experimentos e do “bloqueio” pelas condições de controle, precisamos realizar mais experimentos de adesão monócitos-células

endoteliais para confirmar a nossa hipótese de que as plexinas, em especial a plexina B2, e a sua ligação com CD100, atuam na importante fase de interação entre esses dois tipos celulares levando ao início do processo aterosclerótico.

15. Incorporação de LDLox

Além da adesão, outro questionamento relevante foi se a proteína CD100 teria algum efeito na captação de LDLox pelas células espumosas. Esse outro aspecto funcional de CD100 foi abordado principalmente pela grande importância da geração de células espumosas no contexto do estabelecimento das placas de ateroma. Para responder essa pergunta, diferenciamos macrófagos de PBMC em células espumosas na presença ou não de CD100 recombinante e avaliamos a captação de gordura quantificando a marcação com Oil Red O (fig. 44).

Figura 44: Gráfico representativo da incorporação de LDLox por macrófagos de PBMC na presença ou não de CD100. Representativo de 5 experimentos.

Como podemos observar nas figuras 44 e 45, a captação de LDLox foi reduzida na presença de CD100 em todos os experimentos, mostrando que CD100 tem efeito na diferenciação macrófagos-células espumosas. Na figura 45, média e desvios-padrão dos experimentos são representados. Esse resultado é muito interessante principalmente tendo em vista que o acúmulo das células espumosas que dá origem à estria gordurosa, lesão inicial da aterosclerose. Isso significa que qualquer intervenção que previna a formação e acúmulo dessas células na parede arterial é de extremo valor clínico.

Figura 45: Médias e desvios-padrão da D.O. da incorporação de LDLox em células espumosas. Representativo dos 5 experimentos.

16. Modulação de CD36 por CD100

Para avaliar o mecanismo pelo qual a incorporação de LDLox foi menor na presença de CD100, analisamos a expressão de CD36 por citometria de fluxo (FACs) em macrófagos e células espumosas tratados com a proteína recombinante. O CD36 foi analisado por ser um dos principais receptores scavenger envolvidos na incorporação de LDL modificado nas células espumosas.

Apenas um experimento preliminar foi realizado, e os dados são mostrados na figura 46. Observamos que a expressão de CD36 é ligeiramente menor quando as células são incubadas na presença de CD100. Outros experimentos serão realizados para avaliar a consistência dessas observações.

Figura 46: Histogramas representativos da expressão de CD36 em macrófagos (acima) e células espumosas (abaixo), mostrando uma menor expressão do receptor após incubação com CD100 em termos de porcentagem de células positivas e média de intensidade de fluorescência (MIF).

DISCUSSÃO

Neste trabalho mostramos pela primeira vez a expressão da semaforina CD100 em macrófagos e células espumosas presentes em placas ateroscleróticas humanas, assim como seu padrão de expressão em células cultivadas ao longo da diferenciação monócito-macrófago-célula espumosa e sob estímulos distintos. Além disso, identificamos o receptor que medeia suas atividades nessas células, a plexina B2. Adicionalmente, detectamos sua expressão em células endoteliais teciduais e cultivadas *in vitro*, o que sugere um papel significativo da semaforina em fenômenos vasculares. Na busca de um papel funcional da proteína na aterosclerose, constatamos que CD100 pode atuar na fase mais precoce de estabelecimento da doença, como uma molécula de adesão. Verificamos ainda que CD100 atua diminuindo a captação de LDLox em macrófagos e células espumosas.

Embora primeiramente identificadas como proteínas filogeneticamente conservadas do sistema nervoso central, as semaforinas foram posteriormente associadas a diversos processos biológicos, incluindo orientação axonal, angiogênese, desenvolvimento cardíaco, osteogênese (Kruger *et al.*, 2005) e também na resposta imune, atuando principalmente na fase efetora da lesão tecidual (Suzuki *et al.*, 2008). CD100/SEMA4D foi a primeira semaforina caracterizada no sistema imune (Bougeret *et al.*, 1992; Hall *et al.* 1996; Delaire *et al.*, 1998), no qual possui um amplo espectro de atividades biológicas já descritas tanto no modelo murino como em humanos (Ishida *et al.*, 2003). Evidências crescentes demonstram um importante papel de CD100 na imunidade humoral e celular (Shi *et al.*, 2000; Kikutani &

Kumanogoh, 2003; Suzuki *et al.*, 2008). Em camundongos, CD100 foi relacionada a respostas patogênicas humorais e a glomerulonefrite conseqüente da deposição de complexos imunes (Li *et al.*, 2006), além da indução de alo-respostas (Duran-Struuck *et al.*, 2007). Em humanos, estudos recentes indicam papel na apoptose de oligodendrócitos (Giraudon *et al.*, 2004) e na formação de trombos (Zhu *et al.*, 2007).

CD100 também tem sido associada a uma gama de eventos vasculares, apresentando um papel importante na angiogênese de tumores (Basile *et al.*, 2006; Sierra *et al.*, 2008) e na resposta plaquetária ao dano vascular (Zhu *et al.*, 2007). Além disso, mais especificamente na aterosclerose, dois trabalhos realizados com camundongos mostraram possíveis atividades da proteína no estabelecimento da doença. Foi demonstrado que a perda da expressão de Sema4D reduz a hiperatividade plaquetária e confere proteção contra o desenvolvimento da aterosclerose nesses animais (Zhu *et al.*, 2009). Adicionalmente, um trabalho recente mostrou que o bloqueio da expressão de CD100 (i.e., *knocking down*) diminui a progressão da aterosclerose em camundongos ApoE^{-/-}, devido principalmente a uma menor neovascularização da placa e conseqüente redução da infiltração de macrófagos na mesma (Yukawa *et al.*, 2010).

Um estudo em nosso laboratório detectou a presença de CD100 em amostras de placas de ateroma humanas através de técnicas de *phage display*. Esse achado foi de grande relevância, principalmente considerando as atividades distintas da molécula no sistema imune e sua associação com fenômenos vasculares. Nosso estudo é o primeiro a descrever a presença de

CD100 em placas ateroscleróticas humanas, avaliar o tipo celular envolvido na sua secreção e buscar um papel funcional para a mesma na doença.

Nas amostras de placas ateroscleróticas avaliadas foi observada marcação positiva para CD100 na área de estria gordurosa, ocupada principalmente por macrófagos modificados ou células espumosas. Embora linfócitos T esparsos também fossem positivos para CD100, a maior fonte da proteína nas lesões pareciam ser de fato as células espumosas, principalmente devido ao maior conteúdo dessas células em relação aos demais tipos celulares encontrados nos cortes histológicos avaliados. Experimentos adicionais utilizando o marcador de macrófagos CD68 confirmaram essa observação inicial, co-localizando a expressão das duas proteínas. Resultados similares foram obtidos em placas de carótida e de coronária, pois ambas são ricas em células espumosas, evidenciando mais uma vez o importante papel dessas células na produção de CD100. Por outro lado, nas amostras de vasos normais a marcação positiva detectada se restringiu ao endotélio, mostrando que a expressão de CD100 é aumentada na parede arterial das placas infiltradas por células imunes, mais especificamente macrófagos.

Para avaliar se a expressão de CD100 em macrófagos era um evento relacionado a sua localização na placa de ateroma e/ou à sua diferenciação em células espumosas, analisamos a expressão de CD100 em macrófagos presentes em cortes histológicos de baço. A positividade observada nos macrófagos esplênicos demonstrou que CD100 é expresso por esse tipo celular fora do microambiente da placa, ou seja, possivelmente trata-se de uma molécula expressa por macrófagos convencionais. De fato, a expressão de CD100 já foi descrita em monócitos ativados com IFN- γ (Hu *et al.*, 2008)

e em macrófagos associados a tumores (TAMs) (Sierra *et al.*, 2008), mas até o momento não foi descrita em macrófagos de outros tecidos ou diferenciados em cultura. No entanto, nem todas as populações CD68 positivas do baço foram também positivas para CD100, sugerindo uma expressão diferencial da molécula nas diferentes subpopulações desse tipo celular.

Monócitos, macrófagos e células espumosas diferenciadas *in vitro*, tanto de células THP-1 quanto de PBMC, mostraram marcação positiva para CD100, confirmando os resultados obtidos nos tecidos. A marcação positiva de CD100 nas células cultivadas nos fez questionar sobre o padrão de expressão da molécula ao longo da diferenciação, bem como a sua modulação sob diferentes estímulos.

Embora a via de sinalização que resulta do acoplamento de CD100 com dois de seus bem estabelecidos receptores - plexina B1 e CD72 – já tenha sido descrita (Bismuth & Boumsell, 2002), as vias que resultam na indução de CD100 são ainda desconhecidas. Buscando avaliar a modulação da expressão de CD100 sob diferentes estímulos, analisamos padrões de expressão gênica em monócitos, macrófagos e células espumosas de células THP-1 ou de PBMC, com resultados significativamente divergentes. Quando comparada a outras linhagens de células mielóides humanas como HL-60, U937, KG-1 ou HEL, células THP-1 diferenciadas são as que mais se aproximam de macrófagos derivados de monócitos de PBMC (referindo-se a características morfológicas, fenotípicas, dentre outras) (Auwers, 1991). Ainda assim, estudos mostram algumas diferenças no perfil de expressão gênica entre os dois tipos celulares (Kohro *et al.*, 2004). Isso sugere a

necessidade de cuidado ao interpretar resultados de experimentos feitos com THP-1, que são, todavia, consideradas representativas de macrófagos.

Macrófagos de THP-1 mostraram níveis de RNAm de CD100 aumentados sob estimulação com LPS e vitamina D, embora um padrão muito heterogêneo de expressão tenha sido observado considerando os diferentes experimentos. A heterogeneidade observada pode advir do fato de se tratar de uma linhagem tumoral, e pelas mudanças - dentre elas, expressão gênica - consequentes dos repiques na cultura. A vitamina D foi o maior indutor da expressão de CD100 nessas células, mostrando que uma das ativações das vias mais clássicas de macrófagos, ou seja, o acoplamento de LPS ao seu receptor central de sinalização, o receptor Toll-like 4 (TLR4) (Stoll *et al.*, 2006) não resulta em um aumento significativo de CD100. A IL-1 β , no entanto, se mostrou mais aumentada na ativação com LPS. Contrastando ainda com os resultados obtidos com a vitamina D, inesperadamente IFN- γ também não aumentou a expressão de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas de THP-1, o que foi discrepante de dados da literatura para monócitos de PBMC (Hu *et al.*, 2008). Essa diferença pode ser consequente, mais uma vez, do perfil heterogêneo de expressão gênica das células de linhagem utilizadas. É possível ainda que as moléculas envolvidas na modulação de CD100 (comuns ou não às vias dos já mencionados estímulos) possam interagir com moléculas de outras vias, e a natureza e o tempo dessa interação deve ser determinante para a expressão de CD100 em dado tipo celular. Outra possibilidade é que IFN- γ não module a transcrição de CD100, mas aumente sua abundância no nível protéico.

Embora os três estímulos utilizados (LPS, vitamina D e IFN- γ) sejam ativadores da cascata inflamatória, as vias sinalização são muito distintas entre si. Ambos IFN- γ e vitamina D usam seus próprios receptores (IFN- γ R e VDR, respectivamente), enquanto o LPS sinaliza principalmente através do TLR4. No entanto, os acoplamentos entre IFN- γ / IFN- γ R e LPS/TLR4 apresentam muitos pontos de integração em macrófagos, com sinergismos ocorrendo em múltiplos níveis, indo desde o reconhecimento do sinal até a convergência dos sinais nos promotores dos genes alvo (Schroder *et al.*, 2004). A ocorrência de tantos pontos de cruzamento entre as duas vias de sinalização pode explicar porque tanto o LPS quanto o IFN- γ não são eficientes em induzir um aumento significativo no RNAm de CD100 nessas células. Assim, é possível que CD100 seja somente expresso sob ativação com estímulos inflamatórios específicos. No caso da vitamina D, seu receptor (VDR) faz parte de uma superfamília de receptores nucleares esteróides que necessitam dimerização (com outro VDR ou outro receptor nuclear) para que migrem para o núcleo, onde se ligam aos seus elementos responsivos, VDRE (*vitamin D responsive elements*). A forma ativa da vitamina D (1,25-dihidroxitamina D₃) se liga a DBP (*vitamin D binding protein*), sendo esse complexo o único reconhecido pelo VDR e internalizado por macrófagos. Os genes ativados pela vitamina D podem estar associados tanto a um perfil inflamatório quanto regulador dependendo do tipo celular e dos receptores nucleares envolvidos; no entanto, em monócitos e macrófagos a vitamina D parece resultar em um perfil predominantemente inflamatório (Riek *et al.*, 2010). No presente estudo, a expressão de CD100 pela vitamina D parece estar associada também a esse perfil.

Quando comparamos os níveis de RNAm de CD100 ao longo da diferenciação monócito-macrófago-células espumosas, monócitos e macrófagos THP-1 apresentaram resultados variáveis, não mostrando uma modulação significativa. No entanto, dentre os tipos celulares avaliados, macrófagos parecem expressar mais transcritos de CD100 do que os demais. Por outro lado, uma redução expressiva de CD100 foi detectada durante a transição de macrófagos para células espumosas, sendo mantida após ativação. Muito provavelmente as células espumosas têm sua maquinaria de expressão gênica inteira “*on hold*”, pois a fagocitose desenfreada de LDL modificado consome a maior parte da energia da célula, comprometendo funções celulares como a expressão de outras proteínas. Nesse sentido, elas podem na realidade representar um estado menos complexo de ativação em relação aos macrófagos.

Diferentemente de células THP-1, células diferenciadas a partir de monócitos de PBMC e cultivadas na presença de estímulos pró-aterogênicos (LDLox) e pró-inflamatórios (vitamina D e IFN- γ) mostraram aumento na expressão de CD100, fortalecendo a hipótese de um papel para CD100 na aterosclerose. Ao contrário do observado em células THP-1, houve uma indução significativa da expressão de CD100 nas células ativadas com IFN- γ , especialmente em monócitos, como já observado em estudos prévios (Hu *et al.*, 2008). A expressão de CD100 ao longo da diferenciação de monócitos para macrófagos pode ser um indicador da participação da molécula em diferentes estágios da doença, no compartimento sangüíneo e na placa. No entanto, assim como já observado em células THP-1, as células espumosas são as que menos expressam CD100, mesmo sob ativação.

A nível protéico, CD100 foi detectada como duas bandas, de 150kDa e 120kDa em monócitos, macrófagos e células espumosas de THP-1 e de PBMC, como previamente descrito em linfócitos T (Elhabazi *et al.*, 2001). Não foi detectado aumento da expressão protéica nas células derivadas de THP-1 estimuladas com IFN- γ , indicando diferenças na modulação de CD100 sob estimulação nas células derivadas dessa linhagem de monócitos quando comparadas a linfócitos T (que por sua vez apresentam aumento significativo da proteína sob ativação). No entanto, esse resultado está de acordo com o observado para o RNAm de CD100 nas células THP-1, ou seja, a ativação com IFN- γ pareceu de fato não modular a expressão de CD100, nem mesmo no nível protéico. Em termos de proteína, monócitos de THP-1 apresentam os maiores níveis de CD100 dentre as células analisadas, diferentemente do observado nos experimentos de expressão gênica, que apontam macrófagos como os maiores produtores do transcrito de CD100 nessas células. Tais variações poderiam ser explicadas por diferenças na meia-vida do RNA e/ou eficiência da tradução. Outra explicação seria a rápida liberação de CD100 em macrófagos, dificultando sua obtenção na forma de membrana (duas moléculas de 150kDa ou uma de 150 associada a uma de 120kDa, já clivada). Para termos uma quantificação precisa da proteína CD100 produzida em cada célula teríamos que somar as formas solúvel e de membrana. Infelizmente não há até o momento anticorpos eficientes para dosagem por ELISA de CD100 no sobrenadante de culturas (Laurence Boumsell, comunicação pessoal).

Na transição de monócitos para macrófagos, o quadro se reverte, com uma maior produção da mensagem de CD100 e menor tradução, resultando

em menor produção da proteína. Esse resultado mostra a complexa regulação da produção de CD100 em células THP-1 durante a sua diferenciação. Já para células de PBMC, a estimulação com IFN- γ aumenta o RNAm (exceto nas células espumosas), o que não se confirma a nível protéico. Tal fato pode ser decorrente de uma tradução mais tardia desses transcritos do que o tempo observado (24h), ou da imprecisão da dosagem da proteína CD100, que, como já mencionado não inclui a forma solúvel. Além disso, pudemos observar que em termos de RNAm tem-se o declínio da expressão de CD100 ao longo da diferenciação em células de PBMC. No entanto, quando a proteína é analisada, isso ocorre apenas em células THP-1. Uma explicação para esse dado seria que transcritos de CD100 são instáveis nessas células, sendo assim mais sujeitos à variações de viabilidade (e conseqüentemente quantidade) do que a proteína em si.

Recentemente uma subpopulação de monócitos caracterizada por altos níveis do marcador antigênico LY-6C (que corresponde aos monócitos humanos CD14^{hi}CD16⁻) foi demonstrada por dominar a monocitose associada a hipercolesterolemia em camundongos e dar origem aos macrófagos nas lesões ateroscleróticas (Swirski *et al.*, 2007; Tacke *et al.*, 2007). Essa observação indica que a heterogeneidade celular de monócitos circulantes influencia na formação e fenótipo dessas células na placa. Além disso, macrófagos teciduais maduros também exibem um nível de heterogeneidade que reflete a plasticidade e versatilidade dessas células em resposta a sinais microambientais (Gordon, 2007); o LPS, assim como citocinas Th1 (especialmente IFN- γ) ativam macrófagos para um estado inflamatório M1, enquanto que citocinas Th2 como IL-4 polarizam as células

para um fenótipo M2 com funções imunoreguladoras, de reparo e anti-inflamatórias (Gordon, 2003), ambas as subpopulações sendo encontradas nas lesões ateroscleróticas humanas (Bouhlef *et al.*, 2007). A expressão do RNAm de CD100 nessas subpopulações mostrou que macrófagos M1 apresentam maior expressão da molécula do que macrófagos do tipo M2, vinculando assim a expressão de CD100 a um perfil mais inflamatório nessas células. No entanto, observamos que macrófagos M2 também apresentam níveis elevados da expressão de CD100, o que sugere que a proteína pode estar sendo produzida em diferentes contextos da resposta inflamatória. Além disso, é possível que a expressão de CD100 dentro do ambiente da placa possa ser influenciada por essas subpopulações de macrófagos e que também exerça efeitos distintos sobre as mesmas.

Na avaliação da indução de CD100 em diversos protocolos de ativação, observamos que a molécula pode apresentar um sistema de *feedback* positivo quando combinada a outros estímulos pró-inflamatórios. A ativação combinada de CD100 (proteína recombinante) com LPS ou com IFN- γ gerou grandes aumentos do RNAm de CD100, embora a estimulação com CD100 isoladamente não tenha tido o efeito de *feedback* positivo na sua transcrição. Adicionalmente, a combinação de CD100 com LPS resultou nos maiores aumentos observados, demonstrando sinergismo entre os dois estímulos. Como mencionado anteriormente, o LPS sinaliza através do TLR4. Como a via de sinalização intracelular resultante do acoplamento de CD100 com seu aparente receptor nessas células, a plexina B2, ainda não foi descrita, não é possível esclarecer exatamente em que pontos essa interação acontece. O aumento da expressão de CD100 na estimulação com IL-10 e com IL-4,

citocinas de natureza anti-inflamatória, sugere um papel duplo de CD100 em macrófagos, sendo expresso tanto em condições inflamatórias quanto de regulação, já observado na expressão de CD100 em macrófagos M1 e M2. Esses dados são interessantes principalmente porque com base na literatura disponível até o momento CD100 é considerada uma molécula de natureza basicamente inflamatória.

O encontro de CD100 tanto no endotélio dos vasos normais quanto em HUVECs cultivadas foi inesperado, visto que sua expressão em células endoteliais já havia sido testada, com resultados negativos (Bougeret *et al.*, 1992). Estudos publicados no decorrer deste trabalho mostraram a expressão do receptor de CD100 de alta afinidade, a plexina B1, nessas células, e também a sua associação com fenômenos vasculares em microambientes tumorais (Basile *et al.*, 2004). A interação CD100-plexina B1 desempenha um importante papel na regulação das funções biológicas das células endoteliais, especificamente no controle de angiogênese. A ativação com CD100 induz tubulogênese e migração celular nessas células, sendo ainda pró-angiogênica *in vivo*, especialmente na angiogênese promovida por tumores, onde há uma grande expressão dessa proteína (Basile *et al.*, 2004). No ambiente tumoral foi proposto um mecanismo pró-angiogênico no qual linfócitos e outras células tumorais presentes nas áreas de inflamação e crescimento tumoral facilitam a angiogênese através da expressão de mCD100 e sCD100, promovendo por sua vez o recrutamento de células endoteliais (que expressam a plexina B1) para o microambiente do tumor (Basile *et al.*, 2004). Neste cenário, é possível supor que SEMA4D fornece as referências direcionais necessárias para guiar as células endoteliais

especificamente para as células cancerígenas dentro do microambiente tumoral. O motivo da super-expressão de CD100 em alguns tipos de tumores é ainda desconhecido; no entanto, como ocorre com outros fatores pró-angiogênicos, plexinas e semaforinas podem ser reguladas por mudanças na tensão de oxigênio (Sun *et al.*, 2007). De fato, a expressão de CD100 foi detectada em HUVECs sob condições de hipóxia (Sun *et al.*, 2007), o que evidenciou sua grande influência no crescimento e vascularização de tumores. Considerando o papel de CD100 no crescimento tumoral, essa molécula pode representar um novo alvo para terapia anti-angiogênica no tratamento de diferentes tipos de câncer. Entretanto, CD100 também atua como um importante quimio-atraente de células endoteliais em condições de normóxia. Assim, SEMA4D também pode promover a quimiotaxia continuada de células endoteliais para áreas cancerosas ativas (proliferativas), mesmo quando a tensão normal de oxigênio foi restaurada (Basile *et al.*, 2007).

Nos experimentos de expressão gênica, pudemos observar que o estímulo de células endoteliais com citocinas ativadoras clássicas para esse tipo celular (i.e., TNF- α e/ou LPS) não resultaram no aumento da mensagem de CD100, sendo o mesmo padrão observado nos experimentos de avaliação protéica. No entanto, como todas as concentrações de LPS utilizadas foram altas quando comparadas às concentrações normalmente presentes no contexto da aterosclerose, os efeitos *in vivo* podem divergir dos observados nesses experimentos. É provável que outros estímulos de ativação presentes no contexto da aterosclerose aumentem CD100 nas células endoteliais, como já observado no ambiente tumoral.

A maioria dos efeitos das semaforinas é alcançada através da ativação de receptores transmembrana denominados plexinas (Tamagnone *et al.*, 1999). Até recentemente acreditava-se que as ações de CD100 na resposta imune fossem decorrentes somente de interações com CD72, seu receptor predominante em tecidos linfóides, já que a plexina B1 funciona como receptor apenas em tecidos não-linfóides (Kumanogoh *et al.*, 2000; Tamagnone, 1999). A plexina B2 liga-se à SEMA4C e SEMA4D (CD100) com alta e baixa afinidade, respectivamente (Deng *et al.*, 2007), mostrando que as plexinas podem se ligar a mais de uma semaforina. De fato, foi demonstrado recentemente que CD100 aumenta a migração radial e tangencial no desenvolvimento neurônios de maneira plexina B2-dependente (Hirschberg *et al.*, 2010). Além disso, a co-expressão de plexinas e seus respectivos ligantes semaforinas foi descrita em vários tipos celulares, incluindo células granulosas cerebelares (Renaud *et al.*, 2008), plaquetas (Zhu *et al.* 2007), e células cancerígenas (Capparuccia & Tamagnone, 2009). Assim, um ponto muito importante na avaliação da função de CD100 foi a definição do seu receptor nas células estudadas.

Como pudemos observar, a plexina B2 parece ser o receptor efetivo de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas. Esse resultado foi confirmado em experimentos de imunofluorescência, nos quais foi possível observar marcação positiva somente para plexina B2 e não para plexina B1. Além disso, nos experimentos de avaliação protéica observamos nessas células duas bandas de tamanhos distintos para a plexina B2, de 300kDa e 200kDa, representando o precursor e a forma ativa da proteína, respectivamente. Assim como anteriormente, observou-se uma diferença no

padrão de expressão entre células de PBMC e THP-1: nos monócitos de PBMC, ativados ou não, a banda presente foi a de 200kDa, enquanto que nos monócitos de THP-1 só se observou a banda de 300kDa. Esse resultado é interessante e demonstra a complexidade das alterações pós-traducionais dessa proteína nos diferentes tipos celulares analisados. A expressão da plexina B2 já foi relatada em sinusóides e vênulas endoteliais altas hepáticas, que por sua vez realizam uma variedade de funções semelhantes a macrófagos, como funções *scavenger* e de apresentação de antígenos (Enomoto *et al.*, 2004).

Enquanto muitos estudos têm como foco principal as “semaforinas imunes” e suas funções no sistema imune adaptativo, as interações plexina B1/CD72-CD100 também medeiam alguns eventos mecanísticos cruciais da resposta imune. De maneira geral, as plexinas e semaforinas são expressas em uma variedade de tecidos fora do sistema nervoso, o que sugere que essas proteínas podem fazer parte de um sistema que controla eventos de migração em vários tipos de células (Raper, 2000), como é o caso de células endoteliais, mencionado anteriormente. Mais especificamente, já foi demonstrado que a ativação de CD45 (molécula com a qual CD100 se associa em linfócitos T) induz a produção de moléculas de adesão (Bernard *et al.*, 1994) e liberação de sCD100 criando um ambiente permissivo de interação celular e agregação (Elhabazi *et al.*, 2003). Já a forma homodimérica da sCD100 humana é ativa na migração de células imunes, inibindo a migração espontânea ou induzida por quimiocinas de monócitos, células dendríticas imaturas e células B, no entanto sem efeitos sobre células T ou células dendríticas maduras (Chabbert-de Ponnat *et al.*, 2005).

De acordo com essas observações, o potencial das interações entre a plexina B1 tecidual e CD100 de leucócitos também já foi demonstrado e exerce uma influência importante na migração celular em tumores (Kruger *et al.*, 2005). Da mesma forma, no modelo de glomerulonefrite murino foi mostrado recentemente que CD100 induz o recrutamento de macrófagos (Li *et al.*, 2009), sendo a plexina B1 glomerular ativa na atração de leucócitos CD100 positivos (Li *et al.*, 2008). Além disso, o papel de CD100 em interações intercelulares foi demonstrado em dois trabalhos recentes. Plaquetas expressam SEMA4D e ambos receptores CD72 e plexina B1, sendo que a semaforina desempenha um papel duplo nas respostas à injúria vascular: o acoplamento dessas moléculas promove tanto agregação e formação de trombos, quanto diminuição da adesão plaquetária através da liberação de sCD100, que atua bloqueando esses receptores, contribuindo para que trombos não sejam mais formados (Zhu *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado um fenômeno semelhante em células NK, onde mCD100 medeia a citotoxicidade através da ligação com o receptor CD72 presente nas células-alvo, estabilizando o contato célula-célula e resultando num aumento de toxicidade e maior produção de IFN- γ (Mizrahi *et al.*, 2007). Assim, consideramos relevante testar a hipótese de que CD100 presente em monócitos (Hu *et al.*, 2008) poderia contribuir para a adesão dos mesmos no endotélio ativado, positivo para plexina B1, contribuindo para o evento mais inicial da aterosclerose.

Observamos que as células THP-1 aderiram menos à HUVECs nas condições de bloqueio em que anticorpos anti-plexinas foram utilizados em conjunto com a proteína recombinante CD100. O bloqueio foi quase o

mesmo obtido somente com a utilização isolada de anti-plexina B2, sugerindo que esse seja o principal receptor que medeia a atividade de CD100 como molécula de adesão. Esses dados são muito interessantes, pois podem ser transferidos para clínica, constituindo uma terapia que visa impedir o crescimento e/ou formação da placa de ateroma. Entretanto, apesar de uma lista crescente de moléculas implicadas no tráfego de monócitos, ainda há muito a ser determinado sobre a coordenação de suas funções e, em particular, como estas se tornam desreguladas durante o desenvolvimento de doenças inflamatórias como a aterosclerose (Kamei & Carman, 2010).

Como já mencionado, macrófagos expressam pelo menos seis tipos de receptores *scavenger* que reconhecem formas modificadas de LDL, contribuindo para a formação de células espumosas na aterosclerose. Além disso, foi mostrado recentemente que o metabólito ativo da vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) suprime a expressão dos receptores *scavengers* CD36 e SRA-1 em macrófagos, com conseqüente menor formação de células espumosas. Esses dados confirmam a importância da sinalização resultante da ativação do VDR na regulação da expressão de ambos os receptores *scavenger* e das vias de sinalização celular envolvidas na formação das células espumosas (Riek *et al.*, 2010). Considerando o envolvimento dessas células na formação da placa, resolvemos testar a influência de CD100 na captação de LDLox por macrófagos de PBMC. Surpreendentemente, observamos que a presença de CD100 diminui a retenção de LDLox nessas células. O mecanismo envolvido nessa modulação ainda é desconhecido, mas pode estar associado a uma menor expressão de CD36 nessas células, tendo em vista que esse é o principal receptor responsável pela captação de LDLox em macrófagos e

células espumosas. Por essas e outras observações decorrentes deste trabalho pode-se especular que CD100 exerce um papel importante, se não crucial, na aterogênese.

Considerados conjuntamente, esses resultados mostram pela primeira vez que CD100 é expresso por macrófagos e células espumosas nas placas de ateroma humanas. Como CD100 participa na comunicação entre células diversas e na agregação plaquetária, uma possível função para a molécula em monócitos no início do desenvolvimento da doença pode ser a adesão às células endoteliais, sabidamente positivas para plexina B1, um dos receptores de CD100. Ao mesmo tempo, na parede arterial, CD100 é expressa por células T recém-chegadas na íntima, que são ativadas e produzem IFN- γ . Outros tipos celulares, como células NK, também expressam CD100 e estão geralmente presentes em números menores nesse estágio. CD100 produzido por todos esses tipos celulares atua na neovascularização da íntima e pode recrutar mais monócitos/macrófagos para o sítio da lesão. Na segunda fase da doença, monócitos que atravessam parede arterial se diferenciam em macrófagos e células espumosas, todos positivos para CD100. A expressão de CD100 em macrófagos e células espumosas sugere funções importantes para CD100 também nessas células, especialmente considerando que células espumosas deixam de expressar várias proteínas. Uma das funções de CD100 poderia ser evitar uma fagocitose muito intensa de LDLox por essas células, reduzindo assim seu acúmulo na lesão. No terceiro estágio da doença CD100 pode exercer seu efeito pró-angiogênico principalmente através da apoptose das células espumosas e liberação massiva de CD100 solúvel.

A relevância dessas observações é sustentada pelas já bem estabelecidas funções da CD100 humana no sistema imune e em outros fenômenos fisiológicos e patológicos como angiogênese, carcinogênese e apoptose. Além disso, a aterosclerose envolve alteração na expressão de muitas moléculas por células imunes, como moléculas de adesão de leucócitos, quimiocinas e citocinas (Hansson&Libby, 2006), que poderiam fornecer alvos para manipulação terapêutica. A descoberta de uma nova molécula que é amplamente expressa pelos tipos celulares mais importantes no estabelecimento da placa, i.e., células derivadas de monócitos circulantes, pode ser de grande valor. Nesse sentido, CD100 pode fornecer uma ferramenta poderosa para uma intervenção mais seletiva na terapia anti-aterosclerótica. Mais experimentos devem ser realizados para confirmar essas observações e para ajudar a determinar os inúmeros papéis da molécula na doença.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o presente trabalho permitiram concluir que:

1. CD100 é expressa em placas ateroscleróticas humanas, na área de estria gordurosa da camada íntima. Sua expressão nas placas está associada a macrófagos e células espumosas presentes em grandes quantidades nesse tecido.
2. A expressão de CD100 é aumentada em células THP-1 sob estímulos como LPS e vitamina D. Já para células derivadas de monócitos de PBMC, esse aumento foi observado com a estimulação com LDL oxidado, vitamina D e IFN- γ . O aumento da expressão de CD100 sob estímulos que são comuns nas placas sugere que essa molécula tenha um papel importante na aterosclerose.
3. Macrófagos M1 diferenciados *in vitro* apresentam maior expressão do RNAm de CD100 do que macrófagos do tipo M2, e ambos expressam mais CD100 do que macrófagos não estimulados.
4. O receptor que medeia as atividades de CD100 em monócitos, macrófagos e células espumosas é a plexina B2.
5. A expressão de CD100 foi detectada em células endoteliais teciduais e nas cultivadas *in vitro*, mostrando um outro papel dessa semaforina em fenômenos vasculares.

6. CD100 pode atuar na fase mais precoce de estabelecimento da doença, atuando como uma molécula de adesão entre monócitos e células endoteliais. O bloqueio dos receptores de CD100 em ambos os tipos celulares reduziu a adesão entre eles.

7. CD100 atua diminuindo a captação de LDL na sua forma oxidada em macrófagos e células espumosas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amento, E.P., Ehsani, N., Palmer, H., Libby, P. (1991) Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 11, 1223-1230.

Aurandt, J., Li, W., and Guan, K. L. (2006) Semaphorin 4D activates the MAPK pathway downstream of plexin-B1. *Biochem. J.* 394, 459-464.

Arnold, L., Henry, A., Poron, F., *et al.* (2007) Inflammatory monocytes recruited after eskeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 204:1057-1069.

Auwers, J. (1991). The human leukemia cell line THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 47:22-31

Banka C.L.; Black, A.S.; Dyer, C.A.; Curtiss, L. (1991). THP-1 cells form foam cells in response to coculture with lipoproteins but not platelets. *J Lipid Research* 32: 35-43.

Basile, J.R.; Barac, A.; Zhu, T.; Guan, K.L.; Gutkind, J.S. (2004) Class IV semaphorins promote angiogenesis by stimulating Rho-initiated pathways through plexin-B. *Cancer Res.* (64): 5212–5224.

Basile, J.R.; Afkhami, T.; Gutkind, J.S. (2005) Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase–Akt pathway. *Mol. Cell. Biol.* (25):6889–6898.

Basile, J.R.; Castilho, R.M.; Williams, V.P.; Gutkind, J.S. (2006) Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (103):9017–9022.

Basile, J.R.; Gavard, J.; Gutkind, J.S. (2007) Plexin-B1 utilizes RhoA and Rho kinase to promote the integrin-dependent activation of Akt and ERK and endothelial cell motility, *J. Biol. Chem.* (282):34888–34895.

Behar, O.; Golden, J.A.; Mashimo, H.; Schoen, F.J.; Fishman, M.C. (1996) Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature*, 383(6600):525-8.

Brugger, W.; Kreutz, M.; Andreesen, R. (1991). Macrophage colony-stimulating factor is required for human monocyte survival and acts as a cofactor for their terminal differentiation to macrophages in vitro. *Blood*, 76(12):2547-61

Billard, C.; Delaire, S.; Raffoux, E.; Bensussan, A.; Boumsell, L. (2000) Switch in the protein tyrosine phosphatase associated with human CD100 semaphorin at terminal B-cell differentiation stage. *Blood* 95(3):965-72.

Binder, C.J.; Chang, M.K.; Shaw, P.X.; Miller, Y.I.; Hartvigsen, K.; Dewan, A.; Witztum, J.L. (2002) Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nature Medicine*, 8:1218-1226.

Bismuth G., Boumsell L. (2002) Controlling the immune system through semaphorins. *Sci STKE*. 2002(128): RE4.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Ann. Rev. Immunol.* 15, 749-795.

Bougeret, C.; Mansur, I.G.; Dastot, H.; Schmid, M.; Mahouy, G.; Bensussan, A.; Boumsell, L. (1992) Increased surface expression of a newly identified

150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation. *The Journal of Immunology*, 148:318-323.

Bouhlef, M.A.; Derudas, B.; Rigamonti, E.; Dievart, R.; Brozek, J.; Haulon, S.; Zawadski, C.; Jude, B.; Torpier, G.; Marx, N.; Staels, B.; Chinetti-Gbaguidi, G. (2007) PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties, *Cell Metab.* (6):137–143.

Buono, C *et al.* (2003) Influence of interferon-gamma on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDL-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 454-460.

Butcher, E.C. (1991) Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036.

Capparuccia L., and Tamagnone L. (2009) Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment—two sides of a coin. *J. Cell Sci.* 122, pp. 1723–1736.

Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S.H., Beavis, A., Koezuka, Y., Bendelac, A. (1999) Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol.* 163, 4647-4650.

Chabbert-de Ponnat, I.; Cardine, A.M.; Pasterkamp, R.J.; Schiavon, V.; Tamagnone, L.; Thomasset, N.; Bensussan, A.; Boumsell, L. (2005) Soluble CD100 functions on human monocytes and immature dendritic cells through plexin C1 and plexin B1, respectively. *International Immunology* 17(4):439-447.

Christensen, C.R.; Klingelhofer, J.; Tarabykina, S.; Hulgaard, E.F.; Kramerov, D.; Lukanidin, E. (1998) Transcription of a novel mouse

semaphorin gene, M-semaH, correlates with the metastatic ability of mouse tumor cell lines. *Cancer Res.* 58(6):1238-44.

Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., Barnathan, E.S., McCrae, K.R., Hug, B.A., Schmidt, A.M., Stern, D.M. (1998) Endothelial cells in physiology and in pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 10:3527-3561.

Conrotto, P.; Valdembri, D.; Corso, S.; Serini, G.; Tamagnone, L.; Comoglio, P.M.; Bussolino, F.; Giordano, S. (2005) Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood* (105):4321–4329.

Dai *et al.*, (2004) Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and resistant region of human vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 14871-14876.

Delaire, S.; Elhabazi, A.; Bensussan, A.; Boumsell, L. (1998) CD100 is a leukocyte semaphorin. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:1265.

Delaire, S.; Billard, C.; Tordjman, R.; Chedotal, A.; Elhabazi, A.; Bensussan, A.; Boumsell, L. (2001) Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration. *J Immunol.* 166(7):4348-54.

Deng, S.; Hirschberg, A.; Worzfeld, T.; Penachioni, J.Y.; Korostylev, A.; Swiercz, J.M.; Vodrazka, P.; Mauti, O.; Stoeckli, E.T.; Tamagnone, L.; Offermanns, S.; Kuner, R. (2007) Plexin-B2, but not Plexin-B1, critically modulates neuronal migration and patterning of the developing nervous system in vivo. *J. Neurosci.* (27):6333–6347.

Duan, S.Z., Usher, M.G., Mortensen, R.M. (2009) PPARs: the vasculature, inflammation and hypertension. *Curr. Opinion Nephrol. Hypertension* 18:128-133

Duran-Struuck R, Tawara I, Lowler K, Clouthier SG, Weisiger E, Rogers C, Luker G, Kumanogoh A, Liu C, Ferrara JL, Reddy P. (2007) A novel role for the semaphoring Sema4D in the induction of allo-responses. *Biol Blood Marrow Transplant.* 13:1294-1303.

Dzau, V.J., Braun-Dullaeus, R.C., Sedding, D.G. (2002) Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 8:1249-1256.

Edfeldt, K.; Swedenborg, J.; Hansson, G. K.; Yan, Z. Q. (2002) Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 105: 1158–1161.

Elhabazi, A.; Delaire, S.; Bensussan, A.; Boumsell, L.; Bismuth, G. (2001) Biological activity of soluble CD100. I. The extracellular region of CD100 is released from the surface of T lymphocytes by regulated proteolysis. *The Journal of Immunology*, 166(7):4341-7.

Elhabazi, A.; Marie-Cardine, A.; Ponnat, I.C.; Bensussan, A.; Boumsell, L. (2003) Structure and function of the immune semaphoring CD100/SEMA4D. *Rev. Immunology*, 23(1-2):65-81.

Enomoto, K., Nishikawa, Y., Omori, Y., Tokairin, T., Yoshida, M., Ohi, N., Nishimura, T., Yamamoto, Y., Li, Q. Cell biology and pathology of liver sinusoidal endothelial cells. *Med. Electron Microsc.* 37 (2004), pp. 208–215.

Finkelman, F.D., Katona, I.M., Mosmann, T.R., Coffman, R.L. (1988) IFN-gamma regulates the isotype of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.* 140, 258-267.

Flores- Romo, L., Estoppey, D., Bacon, K.B. (1993) Anti-CD40 antibody stimulates the VLA-4-dependent adhesion of normal and LFA-1-deficient B cells to endothelium. *Immunol.* 79: 445-451.

Friedel, R.H.; Kerjan, G.; Rayburn, H.; Schüller, U.; Sotelo, C.; Tessier-Lavigne, M.; Chedotal, A. (2007) Plexin-B2 controls the development of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* (27)3921–3932.

Friesel, R., Komoriya, A., Maciag, T. (1987) Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon. *J. Cell Biol.* 104, 689-696.

Frostegard, J. *et al.* (1999) Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 145, 33-43

Furuyama, T.; Inagaki, S.; Kosugi, A.; Noda, S.; Saitoh, S.; Ogata, M.; Iwahashi, Y.; Miyasaki, N.; Hamaoka, T.; Tohyama, M. (1996) Identification of a novel transmembrane semaphorin expressed on lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 271:33376-33381.

Garcia-Cardena, G., J.I. Comander, K.R. Anderson, B.R. Blackman, and M.A.J. Gimbrone, Jr. 2001. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:4478–4485

Giacobini, P.; Messina, A.; Morello, F.; Ferraris, N.; Corso, S.; Penachioni, J.; Giordano, S.; Tamagnone, L.; Fasolo, A. (2008). Semaphorin 4D regulates gonadotropin hormone-releasing hormone-1 neuronal migration through PlexinB1–Met complex. *J. Cell Biol.* (183):555–566.

Gitler A.D., Lu, M.M., Epstein, J.A. (2004) PlexinD1 and semaphorin signaling are required in endothelial cells for cardiovascular development. *Dev. Cell.* (1):107-16.

Giraudon P., Vincent P., Vauillat C., Verlaeten O., Cartier L., Marie-Cardine A., Mutin M., Bensussan A., Belin M.F., Boumsell L. (2004) Semaphorin CD100 from activated T lymphocytes induces process extension collapse in oligodendrocytes and death of immature neural cells. *J. Immunol.* 172(2):1246-55.

Gimbrone, M.A., Jr., T. Nagel, and J.N. Topper. 1997. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J. Clin. Invest.* 100:S61–S65.

Gordon, S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23-25.

Gordon, S. (2007) The macrophage: past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1:S9-17.

Granziero, L.; Circosta, P.; Scielzo, C.; Frisaldi, E.; Stella, S.; Geuna, M.; Giordano, S.; Ghia, P.; Caligaris-Cappio, F. (2003) CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5+ B lymphocytes. *Blood*, 101(5):1962-9.

Gu C., Rodriguez E.R., Reimert D.V., Shu T., Fritzsche B., Richards L.J., Kolodkin A.L., Ginty D.D. (2003) Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev. Cell.* 5(1):45-57.

Gu C., Yoshida Y., Livet J., Reimert D.V., Mann F., Merte J., Henderson C.E., Jessell T.M., Kolodkin A.L., Ginty D.D. (2005) Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science* 14; 307(5707):265-8.

Gupta, S. *et al.* (1997) IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J. Clin. Invest.* 99, 2752-2761.

Hajra, L., A.I. Evans, M. Chen, S.J. Hyduk, T. Collins, and M.I. Cybulsky. 2000. The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:9052–9057.

Hall, K.T.; Boumsell, L.; Schultze, J.L.; Boussiotis, V.A.; Dorfman, D.M.; Cardoso, A.A.; Bensussan, A.; Nadler, L.M.; Freeman, G.J. (1996) Human CD100, a novel leucocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:11780-11785.

Hansson, G.K., Hellstrand, M., Rymo, L., Rubbia, L., Gabbiani, G. (1989) Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial muscle cells. *J. Exp. Med.* 170, 1595-1608.

Hansson, G.K. (2005) Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, 352(16):1685-1695.

Hansson, G.K.; Libby, P. (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Rev Immunol* (6):508-519.

Hérolde, C.; Bismuth, G.; Bensussan, A.; Boumsell, L. (1995) Activation signals are delivered through two distinct epitopes of CD100, a unique 150 kDa human lymphocyte surface structure previously defined by BB18 mAb. *Int. Immunol.* 7(1):1-8.

Hérolde, C.; Elhabazi, A.; Bismuth, G.; Bensussan, A.; Boumsell, L. (1996) CD100 is associated with CD45 at the surface of human T lymphocytes. Role in T cell homotypic adhesion. *J. Immunol.*, 157(12):5262-8.

Hirschberg, A.; Deng, S.; Korostylev, A.; Paldy, E.; Costa, M.R.; Worzfeld, T.; Vodrazka, P.; Wizenmann, A.; Götz, M.; Offermanns, S.; Kuner, R. (2010) Gene deletion mutants reveal a role for semaphorin receptors of the

Plexin-B family in mechanisms underlying corticogenesis. *Mol. Cell. Biol.* (30):764–780.

Hu Y., Hu, X., Boumsell, L., Ivashkiv L.B. (2008) IFN-gamma and STAT1 arrest monocyte migration and modulate RAC/CDC42 pathways. *J. Immunol.* 180(12):8057-8065.

Iiyama, K., L. Hajra, M. Iiyama, H. Li, M. DiChiara, B.D. Medoff, and M.I. Cybulsky. (1999). Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ. Res.* 85:199–207.

Ishida I., Kumanogoh A., Suzuki K., Akahani S., Noda K., Kikutani H. (2003) Involvement of CD100, a lymphocyte semaphorin, in the activation of the human immune system via CD72: implications for the regulation of immune and inflammatory responses. *Int Immunol.*;15:1027–34.

Janeway, C. A. Jr; Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197–216.

Ji J.D., Park-Min K.H., Ivashkiv L.B. (2009) Expression and function of semaphorin 3A and its receptors in human monocyte-derived macrophages. *Hum. Immunol.* 70(4):211-7.

Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Gabbiani, G., Hansson, G.K. (1985) Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 76, 125-131.

Jonasson, L.; Holm, J.; Skalli, O.; Bondjers, G.; Hansson, G. K. (1986) Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6:131–138.

Kikutani H., Suzuki K., Kumanogoh A. (2007) Immune semaphorins: increasing members and their diverse roles. *Adv. Immunol.* 93:121-43.

Kobayashi, K.; Matsuura, E.; Liu, Q.; Furukawa, J.; Kaihara, K.; Inagaki, J.; Atsumi, T.; Sakairi, N.; Yasuda, T.; Voelker, D.R.; Koike, T. (2001) A specific ligand for β 2-glycoprotein I mediates auto-antibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. *J. Lipid Res.*, 42:697.

Kohro, T.; Tanaka, T.; Murakami, T.; Wada, Y.; Aburatani, H.; Hamakubo, T.; Kodama, T. (2004). A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheros Thromb*, 11(2): 88-97.

Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., Goodman, C.S. (1993) The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.

Konstantinova, I.; Nikolova, G.; Ohara-Imaizumi, M.; Meda, P.; Kucera, T.; Zarbalis, K.; Wurst, W.; Nagamatsu, S.; Lammert, E. (2007) EphA–Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell* (129):359–370.

Korostylev, A.; Worzfeld, T.; Deng, S.; Friedel, R.H.; Swiercz, J.M.; Vodrazka, P.; Maier, V.; Hirschberg, A.; Ohoka, Y.; Inagaki, S.; Offermanns, S.; Kuner, R. (2008) A functional role for semaphoring 4D/plexin B1 interactions in epithelial branching morphogenesis during organogenesis. *Development* (135):3333–3343.

Kreutz, M.; Andreessen, R. (1990) Induction of human monocyte to macrophage maturation in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood*, 76 (12):2457-61.

Kreutz, M.; Andreesen, R.; Krause, S.W.; Szabo, A.; Ritz, E.; Reichel, H. (1993). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production and vitamin D₃ receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood*, 82(4):1300-7.

Kruger R.P., Aurandt J., Guan K.L. (2005) Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:789–800.

Kumanagoh, A.; Watanabe, C.; Lee, I.; Wang, X.; Shi, W.; Araki, H.; Hirata, H.; Iwarohi, K.; Uchida, J.; Yasui, T.; Matsumoto, M.; Yoshida, K.; Yakura, H.; Pan, C.; Parnes, J.R.; Kikutani, H. (2000) Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity*, 13:621-631.

Kumanagoh, A.; Kikutani, H. (2001) The CD100-CD72 interaction: a novel mechanism of immune regulation. *Trends in Immunology*, 22(12):670-676.

Kumanogoh, A.; Suzuki, K.; Ch'ng, E.; Watanabe, C.; Marukawa, S.; Takegahara, N.; Ishida, I.; Sato, T.; Habu, S.; Yoshida, K.; Shi, W.; Kikutani, H. (2002) Requirement for the lymphocyte semaphorin, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells. *J. Immunol.*, 169(3):1175-81.

Lehtonen, A.; Matikainen, S.; Miettinen, M.; Julkunen, I. (2002) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation. *J Leukocyte Biol.*, 71: 511-519.

Li, H., M.I. Cybulsky, M.A.J. Gimbrone, Jr., and P. Libby (1993) An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 13:197–204.

Li, A.C.; Glass, C.K. (2002) The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature Medicine*, 8:1235-1242.

Li M., O'Sullivan K.M., Jones L.K., Semple T., Kumanogoh A., Kikutani H., Holdsworth S.R., Kitching A.R. (2006) CD100 enhances dendritic cell and CD4+ cell activation leading to pathogenetic humoral responses and immune complex glomerulonephritis. *J. Immunol.* 177(5):3406-12.

Li M, O'Sullivan KM, Jones LK, Lo C, Semple T, Kumanogoh A, Kikutani H, Holdsworth SR, Kitching R. (2009) Endogenous CD100 promotes glomerular injury and macrophage recruitment in experimental crescentic glomerulonephritis. *Immunol.* 128(1):114-22.

Libby, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 420:868–874

Libby, P.; Ridker, P.M.; Maseri, A. (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105:1135-1143.

Lin, K., P.P. Hsu, B.P. Chen, S. Yuan, S. Usami, Y.J. Shyy, Y.S. Li, and S. Chien. (2000). Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:9385–9389.

Lin X., Ogiya M., Takahara M., Yamaguchi W., Furuyama T., Tanaka H., Tohyama M., Inagaki S. (2007) Sema4D-plexin-B1 implicated in regulation of dendritic spine density through RhoA/ROCK pathway. *Neurosci Lett* 428(1)1-6.

Lusis, A.J. (2000) Atherosclerosis. *Nature*, 407:233-241.

Martinez, O.F.; Gordon, S.; Locati, M.; Mantovani, A. (2006) Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J. Immunol.* (177):7303-7311

Matsuura, E.; Kobayashi, K.; Koike, T.; Shoenfeld, Y.; Khamashta, M.A.; Hughes, G.R.V. (2003) Atherogenic autoantigen: oxidized LDL complexes with β 2-glycoprotein I. *Immunobiol.*, 207:17-22.

McMurray, H.F.; Parthasarathy, S.; Steinberg, D. (1993) Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 92: 1004-1008.

Mehta, J.L., Saldeen, T.G., Rand, K. (1998) Interactive role of infection, inflammation, and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31:1217-1225.

Mehta, J.L. & Li, D.Y. (1999) Inflammation in ischemic heart disease: response to tissue injury or a pathogenetic villain? *Cardiovasc. Res.* 43:291-299.

Miao, H.Q.; Soker, S.; Feiner, L.; Alonso, J.L.; Raper, J.A.; Klagsbrun, M. (1999) Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J. Cell Biol.*, 146(1):233-42.

Mizrahi S, Marcel G, Porgador A, Bushkin Y, Mandelboim O. (2007) CD100 on NK cells enhance IFN γ secretion and killing of target cells expressing CD72. *PLoS ONE* 2(9):e818.

Nicoletti, A. *et al.* (1999) The macrophage scavenger receptor type A directs modified proteins to antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* 29: 512–521.

Paez, A., Méndez-Cruz, A.R., Varela, E., Rodriguez, E., Guevara, J., Flores-Romo, L., Montañó, L.F., Massó, F.A. (2005). HUVECs from newborns with strong family history of myocardial infarction overexpress adhesion molecules and react abnormally to stimulating agents. *Clin. Exp. Immunol.* 141:449-458.

Pasterkamp, R.J., Kolodkin, A.L. (2003) Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 79-89.

Peiser, L.; Mukhopadhyay, S.; Gordon, S (2002). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 123–128.

Perälä, N.M.; Immonen, T.; Sariola, H. (2005) The expression of plexins during mouse embryogenesis. *Gene Expr. Patterns* (5):355–362.

Perussia, B., Dayton, E.T., Fanning, V., Thiagarajan, P., Hoxie, J., Trincheri, G. (1983). Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. *J. Exp. Med.* 158, 2058-2080.

Pockley, A.G. (2002) Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation*, 105(8):1012-7.

Püschel AW. (2007) GTPases in semaphorin signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 600:12-23.

Raper J.A. (2000) Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol*, 10: 88-94.

Renaud, J., Kerjan, G., Sumita, I., Zagar, Y., Georget, V., Kim, D., Fouquet, C., Suda, K., Sanbo, M., Suto, F., Ackerman, S.L., Mitchell, K.J., Fujisawa, H. and Chédotal, A. (2008) Plexin-A2 and its ligand, Sema6A, control nucleus-centrosome coupling in migrating granule cells. *Nat. Neurosci.* 11, pp. 440–449.

Ribatti, D., Nico. B., Vacca, A., Roncali, R., Dammacco F. (2002) Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 11:81-90.

Riek, A.E., Oha, J. and Bernal-Mizrachi, C. (2010) Vitamin D regulates macrophage cholesterol metabolism in diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol* Vol. 121, 1-2: 430-433.

Rocha VZ, Libby P (2009) Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat. Reviews Cardiol.* 6, 399-409.

Ross R. (1999) Atherosclerosis – an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, 340(2):1012-1017.

Sekido Y., Bader S., Latif F., Chen J.Y., Duh F.M., Wei M.H., Albanesi J.P., Lee C.C., Lerman M.I., Minna J.D. (1996) Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93(9): 4120-5.

Semaphorin Nomenclature Committee, Unified nomenclature for semaphorins/collapsins. (1999) *Cell*, 97:551-552

Serini G., Valdembri D., Zanivan S., Morterra G., Burkhardt C., Caccavari F., Zammataro L., Primo L., Tamagnone L., Logan M., Tessier-Lavigne M., Taniguchi M., Püschel A.W., Bussolino F. (2003) Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature*.24; 424(6947): 391-7.

Shi, W.; Kumanogoh, A.; Watanabe, C.; Uchida, J.; Wang, X.; Yasui, T.; Yukawa, K.; Ikawa, M.; Okabe, M.; Parnes, J.R.; Yoshida, K.; Kikutani, H. (2000) The class IV semaphorin CD100 plays nonredundant roles in the immune system: defective B and T cell activation in CD100-deficient mice. *Immunity*, 13(5):633-42.

Schroder K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukocyte Biol.* 75, 163-189.

Sierra J.R., Corso S., Caione L., Cepero V. *et al.* (2008) Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *J. Exp. Med.* 205: 1673-1685.

Skalen, K.; Gustafsson, M.; Rydberg, E.K; Hultén, L.M.; Wiklund, O.; Innerarity, T.L.; Borén, J. (2002) Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherogenesis. *Nature*, 417:750-754.

Steinberg, D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272: 20963–20966.

Steinberg, D. (2002) Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Medicine*, 8:1211-1217.

Steinberg, D. (2004) Thematic Review Series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy: part I. *J. Lipid Res.* 45, 1583-1593.

Steinberg, D. (2005a) Thematic Review Series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy: part II: the early evidence linking hypercholesterolemia to coronary disease in humans. *J. Lipid Res.* 46, 179-190.

Steinberg, D. (2005b) Thematic Review Series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy: part III: mechanistically defining the role of hyperlipidemia. *J. Lipid Res.* 46, 2037-2051.

Steinberg, D. (2006a) Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. *J. Lipid Res.* 47, 1339-1351

Steinberg, D. (2006b) The pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part IV: the 1984 coronary primary prevention trial ends it – almost. *J. Lipid Res.* 47, 1-14.

Stoll L., Denning, G. M. L., and Weintraub, N. (2006) Endotoxin, TLR4 signaling and vascular inflammation: potential therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Curr. Pharm. Des.* 12 :4229-4245.

Sun, Q.; Zhou, H.; Binmadi, N.O.; Basile, J.R. (2009) Hypoxia-inducible factor-1-mediated regulation of semaphorin 4D affects tumor growth and vascularity. *J. Biol. Chem.*, 284(46):32066-74.

Swiercz, J.M.; Kuner, R.; Behrens, J.; Offermanns, S. (2002) Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. *Neuron*, 35(1):51-63.

Swirski, FK *et al.* (2007) Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J. Clin. Invest.* 117, 195-205.

Tacke, F.; Randolph, G.J. (2006) Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*, 211: 609-18.

Tacke F., Alvarez D., Kaplan T.J., Jakubzick C., Spanbroek R., Llodra J., Garin A., Liu J., Mack M., van Rooijen N., Lira S.A., Habenicht A.J., Randolph G.J. (2007) Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 117(1):185-94.

Tamagnone L, Artigiani H, Chen Z, He GI, Ming H, Song A, Chedotal ML, Winberg CS, Goodman M, Poo *et al* (1999) Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99:71-80.

Tamagnone, L.; Comoglio, P.M. (2000) Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol.*, (9):377-83.

Tomizawa Y., Sekido Y., Kondo M., Gao B., Yokota J., Roche J., Drabkin H., Lerman M.I., Gazdar A.F., Minna J.D. (2001) Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(24):13954-9.

Topper, J.N., J. Cai, D. Falb, and M.A. Gimbrone, Jr. 1996. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:10417–10422.

Toyofuku T., Zhang H., Kumanogoh A., Takegahara N., Yabuki M., Harada K., Hori M., Kikutani H. (2004a) Guidance of myocardial patterning in cardiac development by Semaphorin 6D reverse signalling. *Nat. Cell Biol.* 6(12):1204-11.

Toyofuku T, Zhang H, Kumanogoh A, Takegahara N, Suto F, Kamei J, Aoki K, Yabuki M, Hori M, Fujisawa H, Kikutani H.(2004b) Dual roles of Semaphorin 6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev.* 15; 18(4):435-47.

Traub, O., & Berk, B.C. (1998) Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:677–685.

Trogan, E.; Choudhury, R.P.; Dansky, H.M; Rong, J.X.; Breslow, J.L.; Fisher, E.A. (2002) Laser capture microdissection analysis of gene expression in macrophages from atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:2234-2239.

Tse C., Xiang R.H., Bracht T., Naylor S.L. (2002) Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line. *Cancer Res.* 62(2):542-6.

Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T., Konno, and K. Tada. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26: 171-176.

Tsuchiya, S., Y. Kobayashi, Y. Goto, H. Okumura, S., Nakae, T. Konno, and K. Tada. (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 42: 1530-1536.

Van Gool S.W., Vandenberghe P., de Boer M., Ceuppens J.L. (1996) CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol Rev.* 153:47-83.

Via DP, Pons L, Dennison DK, Fanslow AE, Bernini F (1989) Induction of acetyl-LDL receptor activity by phorbol ester in human monocyte cell line THP-1. *J. Lipid Research* 30: 1515-1524.

Wang, X.; Kumanogoh, A.; Watanabe, C.; Shi, W.; Yoshida, K.; Kikutani, H. (2001) Functional soluble CD100/Sema4D released from activated lymphocytes: possible role in normal and pathologic immune responses. *Blood*, 97(11):3498-3504.

Watanabe, C.; Kumanogoh, A.; Shi, W.; Suzuki, K.; Yamada, S.; Okabe, M.; Yoshida, K.; Kikutani, H. (2001) Enhanced immune responses in transgenic mice expressing a truncated form of the lymphocyte semaphorin CD100. *The Journal of Immunology*, 167:4321-4328.

Weber, C., Zernecke, A., Libby, P. (2008) The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat. Rev. Immunol.* 8 (10): 802-815.

Wick, G.; Perschinka, H.; Millonig, G. (2001) Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol.* 22(12):665-9.

Wick, G.; Knoflach, M.; Xu, Q. (2004) Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol.*, 22:361-403.

Worzfeld, T.; Püschel, A.W.; Offermanns, S.; Kuner, R. (2004) Plexin-B family members demonstrate non-redundant expression patterns in the developing mouse nervous system: an anatomical basis for morphogenetic effects of Semaphorin 4D during development. *Eur. J. Neurosci.* (19):2622–2632.

Xiang R., Davalos A.R., Hensel C.H., Zhou X.J., Tse C., Naylor S.L. (2002) Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer Res.* 62(9):2637-43.

Young, H.A., Hardy, K.J. (1995) Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J. Leukoc. Biol.* 58, 373-381.

Yu, D., Cook, MC, Shin, D-M, Silva, DG *et al.* (2007) Axon growth and guidance genes identify T-dependent germinal centre B cells. *Immunology and Cell Biology*, 1-12.

Zhou, Y., Gunput, R.A. and Pasterkamp, R.J. (2008) Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem. Sci.* 33: 161–170.

Zhu L.; Bergmeier W.; Wu J.; Jiang H.; Stalker T.J.; Cieslak M.; Fan R.; Boumsell L.; Kumanogoh A.; Kikutani H.; Tamagnone L.; Wagner D.D.; Milla M.E.; Brass L.F. (2007) Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury. *Proc Natl Acad Sci.* 104(5):1621-6.

Zhu, L., Stalker, T.J., Fong, K.P., Jiang, H., Tran, A., Crichton, I., Lee, E.K., Neeves, K.B., Maloney, S.F., Kikutani, H., Kumanogoh, A., Pure, E., Diamond, S.L., Brass, L.F. (2009) Disruption of SEMA4D ameliorates platelet hypersensitivity in dyslipidemia and confers protection against the development of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29(7):1039-1045.

ANEXO I – ABREVIações DOS AMINOácIDOS

1 letra	3 letras	Nome dos aminoácidos	Estrutura da cadeia lateral
A	Ala	Alanina	- CH ₃
C	Cys	Cisteína	- CH ₂ - SH
D	Asp	Ácido Aspártico
E	Glu	Ácido Glutâmico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina	- H
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina	- CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - NH ₂
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina	- CH ₂ - CH ₂ - S - CH ₃
N	Asn	Asparagina
P*	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina	- CH ₂ - OH
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

* a cadeia lateral da prolina forma um amino grupo secundário (α-imino ácido).

ANEXO II – ARTIGO SUBMETIDO

Title: CD100 expression in macrophages and foam cells of atherosclerotic plaques.

Luque, M.C.A.^{1,2}, Gutierrez, P.S.¹, Debbas, V.¹, Puech-Leao, P.¹, Porto, G.¹,
Coelho, V.^{1,2,3}, Boumsell, L.⁴, Kalil, J.^{1,2,3} Stolf, B.S.^{1,2}

¹Heart Institute of São Paulo (InCor), HC-FMUSP, São Paulo, SP, Brazil

²Clinical Immunology and Allergy, Department of Clinical Medicine,
University of São Paulo Medical School - HC-FMUSP, São Paulo, SP, Brazil

³Institute for Investigation in Immunology – INCT – National Institute of
Science and Technology, São Paulo, SP, Brazil.

⁴Inserm U567, Institut Cochin, University Paris Descartes, 75014 Paris,
France.

Keywords: atherosclerosis, CD100, SEMA4D, macrophage, foam cell

ABSTRACT

Atherosclerotic plaques comprise dysfunctional endothelium, monocyte derived lipid laden foam cells, smooth muscle cells and according to the stage, various subsets of activated lymphocytes. This study analyzed atherosclerotic tissue specimens and monocytes differentiated *in vitro* into macrophages and foam cells for the expression of CD100/SEMA4D. CD100 is a member of the semaphorin family, expressed by most hematopoietic cells and particularly activated T cells. It is found in the cell membrane and also in a soluble form following proteolytic cleavage upon cell activation. Soluble

CD100 was previously shown to inhibit migration of human monocytes and to be responsible for a proangiogenic response of endothelial cells.

The expression of CD100 was analyzed in human plaque and normal carotid samples by immunohistochemistry and double staining immunofluorescence (CD100 and CD68). Carotid plaques showed strong labeling in foam cells and macrophages, whereas no labeling was detected in the normal samples with the exception of endothelial cells. Electronic immunocytochemistry confirmed these results. The same observations were obtained by immunohistochemistry of tissue sections from coronary plaques. To evaluate whether macrophages from other tissues expressed the molecule, double staining immunofluorescence was performed in splenic tissue sections, showing positive results. Staining was also observed in monocytes and in *in vitro* differentiated macrophages and foam cells. Real-time results have shown that macrophages cultured under inflammatory conditions (LPS, vitamin D and oxLDL) present augmented expression of CD100, although THP-1 cells showed diminished CD100 expression upon stimulation with IFN- γ . Western Blot analyses of monocytes, macrophages and foam cells confirmed CD100 expression, though not increased after stimulation with IFN- γ . These results show for the first time that CD100 is expressed by macrophages and foam cells in atherosclerotic plaques.

Given the abundance of CD100 produced by various cell types at all stages of development of atherosclerotic plaque we propose a major role for CD100 in the disease. Early in the development of the plaque it is secreted by monocytes, activated lymphocytes and platelets. Soluble CD100 together with IFN- γ arrest migration of monocytes that differentiate into macrophages, which become loaded with lipids, accumulate in the evolving lesion and transform into foam cells. Fatty streaks then progress into mature plaques and soluble CD100 exerts its proangiogenic effect on endothelial progenitor cell migration and proliferation.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is one of the most prevalent diseases worldwide and one of the most common cause of death globally (Ross, 1999; Hansson, 2005). It is an inflammatory disease characterized by intense immunological activity. The lesions are present as asymmetrical focal thickenings of the intima, the innermost layer of the artery, and result from focal accumulation of blood-borne inflammatory and immune cells as well as vascular endothelial cells, extracellular matrix, lipids and acellular lipid-rich debris (Hansson&Libby, 2006).

The development of atherosclerosis is initiated by the activation and dysfunction of endothelial cells, promoting the adhesion of leukocytes and an increase in the permeability of blood vessels for immune cells and lipid components such as low-density lipoprotein (LDL). After becoming loaded with cell-activating oxidized LDL (oxLDL), monocytes turn into lipid-laden macrophages, known as foam cells, which accumulate in the evolving lesion to form the fatty streaks, or early plaques. As the disease develops, the lesions take on a complex structure, with a core region that is usually surrounded by a fibrous cap of smooth muscle cells (SMCs) and a collagen-rich matrix constituting the atheromas, or mature plaques (Hansson&Libby, 2006; Rocha&Libby, 2009).

Macrophages are the most abundant cell type in the lesions throughout its course of development, although T cells are also present in a significant number especially at the early stages. Previous studies have identified the presence and role of activated M1 macrophages in atherosclerosis (Ross, 1999). Recently, it has been shown that M2 macrophages are also present in human atherosclerotic lesions, where expression of M2 markers, such as MR (Mannose Receptor; also called CD206) and IL-10 positively correlate with the expression levels of the nuclear receptor PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) γ (Bouhlef et al., 2007). In addition to the several phenotypes of macrophages found in plaques, inflammatory lipid-laden foam cells outnumber other cell types, especially in early plaques. Foam cells are differentiated from activated macrophages that express scavenger receptors which uptake cholesteryl esters that accumulate in the cytosol of these cells (Steinberg, 1997).

The development of the disease is determined by the production of a variety of molecules by immune and other cell types, such as endothelial cells. These molecules are involved in events such as the regulation of cell adhesion, movement, migration and

activation of different cell types. In animal models of the disease, it was possible to verify the expression of several leukocyte adhesion molecules by endothelial cells exposed to shear stress (Dai et al., 2004). In addition, chemokines are produced by distinct cell types, and guide the recruitment of immune cells to the artery wall. Most of these immune cells show signs of activation and produce pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF (Jonasson et al., 1985).

Semaphorins are secreted and membrane-associated proteins characterized by a conserved amino-terminal Sema domain, and are divided in eight subclasses (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999). They are widely expressed in a variety of tissues and were identified as guidance factors during neuronal development (Kolodkin et al., 1993; Pasterkamp&Kolodkin, 2003). Since then, they have been shown to have diverse and important functions in other physiological processes, including heart morphogenesis (Behar et al., 1996; Gu et al., 2003; Gitler et al., 2004; Toyofuku et al., 2004a; Toyofuku et al., 2004b), vascular growth (Gu et al., 2003; Serini et al., 2003; Gitler et al., 2004; Gu et al., 2005), tumor progression (Sekido et al., 1996; Tomizawa et al., 2001; Tse et al., 2002; Xiang et al., 2002) and immune cell regulation (Kikutani et al., 2007), and the understanding of the latter has advanced considerably over the past several years. CD100 or SEMA4D belongs to the class 4 of semaphorins, and is expressed by many different cell types. In the hematopoietic system it is expressed on the majority of cells (B, T, NK and myeloid cells), with exception of early stem cells and erythrocytes, and generally increases after activation (Elhabazi et al., 2003). It is known that human blood monocytes express CD100 (Hu et al., 2008; Ji et al., 2009), but at lower levels compared to activated T lymphocytes (Bougeret et al., 1992). CD100 has been shown to influence monocyte migration, T cell activation and B cell survival in humans, as well as T/B and T/dendritic cells cooperation in mice (Elhabazi et al., 2003). It is the only semaphorin for which membrane and soluble forms endow distinct functional properties. A recent report has shown that TAMs (tumor associated macrophages) express CD100, which in this context has been associated with tumor vascularization and consequent growth and metastases (Sierra et al., 2008). However, there are still no reports about CD100 expression in macrophages of other tissues, particularly in atherosclerotic plaques. Interestingly, it has been recently shown that the loss of sema4D expression in mice reduces platelet hyperactivity otherwise found in dyslipidemia, thus conferring protection against the development of atherosclerosis (Zhu et al., 2009).

Activated T lymphocytes express high levels of CD100, and are one of the cell types thought to play an important role in the development of the plaques. In addition, CD100 has been identified as a potent proangiogenic molecule (Conrotto et al., 2005; Basile et al., 2004; Basile et al., 2005; Basile et al., 2006; Basile et al., 2007). Furthermore, platelets, also present in many plaques, express CD100 (Zhu et al., 2007; Zhu et al., 2009). Considering this, we sought to evaluate whether T cells and platelets present in atherosclerotic lesions expressed CD100. Immunohistochemical analysis indicated significant CD100 expression in macrophages and foam cells, whereas almost no T cells and platelets could be detected in the samples analyzed. CD100 expression was further confirmed in cultured macrophages and in *in vitro* differentiated foam cells.

Real-time results have shown that cultured macrophages present augmented CD100 expression under specific pro-inflammatory stimuli and Western Blot analyses of monocytes, macrophages and foam cells confirmed CD100 expression in these three cells types, though not increased after stimulation with IFN- γ . Furthermore, CD100 was shown to decrease in the differentiation from macrophages to foam cells. These results show for the first time that CD100 is expressed by macrophages and foam cells in atherosclerotic plaques, suggesting a role for the molecule in the different phases of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Human Specimen Collection

The normal carotid samples were obtained from donors of the Organ Transplantation of the Hospital das Clínicas of the São Paulo School of Medicine (controls with no vascular disease). Carotid plaques were removed of patients from the Heart Institute of São Paulo scheduled for endarterectomy, after providing informed consent. Patients with infectious diseases (including AIDS), cancer, malignant arterial hypertension, previous surgical intervention in the same local, previously transplanted or immunosuppressed were excluded from this study. The artery fragments were fixed for 24 or 48h in buffered solution with 10% formalin for posterior inclusion in paraffin and preparation of tissue sections (~7 μ m).

Cell culture

PBMCs were obtained by density gradient centrifugation with Ficoll (Invitrogen, Carlsbad, CA) and human monocytes were purified from PBMCs by positive selection using anti-CD14 magnetic beads, as recommended by the manufacturer (Miltenyi Biotec, Germany). Purity of monocytes was above 97% as verified by FACS analysis. Human T lymphocytes were purified by negative selection, using Pan T Isolation kit (Miltenyi Biotec, Germany). PBMC and THP-1 monocytes (ATCC, Manassas, VA), macrophages and foam cells were cultured in RPMI-1640 (Gibco, NY) containing 10% calf serum (Hy Clone, Utah), 10mM HEPES, 1mM glutamine, 200U/ml penicillin, 2mg/ml streptomycin, 1mM sodium pyruvate. T lymphocytes were cultured in DMEM (Gibco, NY) with 10% calf serum (Hy Clone, Utah), 10mM HEPES, 1mM glutamine, 200U/ml penicillin, 2mg/ml streptomycin, 1mM sodium pyruvate and IL-2, IL-7 e IL-15 (R&D, Minneapolis, MN) 40U/ml each.

For stimulation, monocytes, macrophages and foam cells were seeded at $1,5 \times 10^6$ in 1,5 ml per well in 6-well tissue culture dishes (Costar, Cambridge, MA). T lymphocytes were seeded at $2,0 \times 10^6$ in 1,0ml per well in 24-well tissue culture dishes (Costar, Cambridge, MA).

PBMC macrophages were stimulated with vitamin D 10mM (Sigma, St. Louis, MO), oxLDL 40 μ g/mL or IFN- γ 100U/ml (Peprotech, Rocky Hill, NJ).

THP-1 macrophages, monocytes and foam cells were stimulated with LPS 4,8mg/mL (Sigma, St. Louis, MO), vitamin D 10mM (Sigma, St. Louis, MO) or IFN- γ 100U/ml (Peprotech, Rocky Hill, NJ).

T lymphocytes were activated CD3/CD28 beads (MACS, Miltenyi Biotec, Germany), at the volume of 0,625 μ l/well.

Macrophage differentiation and foam cell formation

THP-1 cells were differentiated into macrophages with 40nM PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma, St. Louis, MO) for 24h, whereas PBMC macrophages were differentiated with 20ng/ml GM-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ) for 72h.

THP-1 macrophages were differentiated into foam cells by incubation with oxLDL (50 μ g/ml) for 72h.

Immunohistochemistry

Tissue sections were submitted to antigen recovery with Tris-EDTA buffer in Pascal pan. The sections were blocked with Protein Block (DAKO, Glostrup, Denmark) and incubated with the primary antibody in PBS 1% BSA for 18h at 4°C. Anti-CD100 was purchased from BD Transduction (San Jose, CA) and anti-CD68 from Santa Cruz (Santa Cruz, CA). The samples were then submitted to LSAB (DAKO, Glostrup, Denmark) procedure, being incubated with reagent A (biotin) for 1h and with reagent B (streptavidin) for 30min, both at 37°C. The glass slides were next incubated with DAB (DAKO, Glostrup, Denmark) for 1min30s and in Scott water for 30s. The tissue sections were then dehydrated through passages in alcohol and xylol and mounted with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). The digitalization of the images was made with the program AxioVision (Carl Zeiss Inc., Jena, Germany).

Immunofluorescence

Tissue sections were blocked for 1h at room temperature with Protein Block (DAKO, Glostrup, Denmark) and incubated with the primary antibodies (anti-CD100 and anti-CD68 in PBS 1% BSA) at 4°C for 18h. The secondary antibodies (Alexa 660 and FITC, Invitrogen, Carlsbad, CA) were added for 90min at 4°C. The glass slides were mounted with DAPI (Sigma, St. Louis, MO) (10ug/ml in glycerol: PBS 1:1) and analyzed in the confocal microscope Zeiss laser scanning.

Immunocytochemistry

Tissue samples were fixed in glutaraldehyde 3% (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington) in phosphate buffer (0,1M pH 7.3) for 3h at 4°C. After fixation, the samples were incubated for 18 to 24h in uranyl acetate (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington) with 13.3% sucrose at 4°C. Dehydration was carried out with increasing series of ethanol solution (70, 95, 100%) and propylene oxide. Infiltration was performed with a mixture of propylene oxide and aradilt (Huntsman, São Paulo, Brazil) 1:1 for 3h, and then the mixture was discarded and replaced by pure resine.

Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

Cultured cells were lysed with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) and total RNA was extracted as described by the manufacturer. 2µg of RNA were reverse transcribed to cDNA using random primers and oligodT and Superscript II reverse transcriptase

(Invitrogen, Carlsbad, CA). Relative mRNA levels were assessed by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction in SyBR Green master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) in triplicates using an ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers for CD100, GAPDH, IL-1 β and STAT-1 (see below) were designed using primerexpress software and purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Results were normalized for GAPDH.

Primers:

CD100(F): 5'CGAGAAGCAGCATGAGGTGTATTG 3'

CD100(R): 5' CGGATGTAGTTGAGGCACTCTGTC 3'

IL1 β (F): 5'AGGATATGGAGCAACAAGTGGTG 3'

IL1 β (R): 5'ATTCTTTTCCTTGAGGCCCAAG 3'

GAPDH(F): 5'TGGTCTCCTCTGACTTCAACA 3'

GAPDH(R): 5'AGCCAAATTCGTTGTCATACC 3'

STAT1(F): 5' CAAGGTGGCAGGATGTCTCAG 3'

STAT1(R): 5' TTCCATGGGAAAACGTGCATCAT 3'

Western Blot

Cultured cells were washed with PBS and lysed with lysis buffer (1% Nonidet P-40 (v/v) detergent buffer containing 50mM Tris (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 50 U/ml aprotinin and 1mM leupeptin) for 30 min at 4°C. After centrifugation at 12000g to remove cellular debris, the protein was measured with BCA (Pierce, Rockford, IL). Approximately 30 μ g of solubilized protein was separated by SDS-PAGE and electro transferred to nitrocellulose membranes (Amersham, Paris, France). The membranes were blocked and incubated with the primary antibody anti-CD100 (BD Transduction, San Jose, CA), overnight at 4°C. After washing, the membranes were incubated with anti-mouse HRP-conjugated secondary antibody for 1h at room temperature. Blots were developed using chemiluminescence detection system ECL (Amersham, Paris, France) followed by autoradiography on x-ray film (Kodak, Cedex, France) and scanning densitometry. The same blots were incubated with anti- β -actin mouse anti-human antibody (Sigma, St. Louis, MO) and developed as described.

RESULTS

Expression of CD100 in atherosclerotic plaques

We investigated CD100 expression in human arteries, using for this evaluation tissue sections from both carotid plaques and normal carotid arteries. In most of the plaque tissue sections analyzed there were practically no T cells. This was probably due to the fact that the lesions were already in an advanced stage, when macrophages, or foam cells, are the most abundant cell type. Interestingly, we observed positive cytoplasmic staining for CD100 in the vast majority of the cells in the area occupied by foam cells (fig.1). These results were confirmed in other 17 samples. On the other hand, there was no staining in the normal carotid samples with the exception of endothelial cells.

To ascertain whether the stained cells were in fact macrophages we performed the same experiments using anti-CD68, a common marker for this cell type. The area stained with this antibody was the same as the one observed for CD100 (data not shown). Double staining immunofluorescence experiments confirmed that the CD100 positively stained cells were in fact macrophages (fig.2).

To evaluate whether plaques originated in other arteries presented the same pattern of CD100 expression we performed immunohistochemistry experiments in plaques from coronary arteries. The same results were observed, with positive staining of foam cells, mostly in the fatty streak area (fig.3).

Transmission electron microscopy of atherosclerotic plaques and immunocytochemistry

To precisely confirm the observations made in atherosclerotic plaque tissue sections we employed immunocytochemistry with electron microscopy. Due to its great power of magnification, this technique enables not only the confirmation of positivity but also the identification cell type showing the positive labeling, through analysis of the cell morphology. We used CD100 antibody in ultra-thin sections of atherosclerotic plaques. As expected, and confirming the previously made observations, we observed positive and specific labeling of foam cells, located at the fatty streak area of the lesion. In these cells, there was labeling of both cytoplasm and membrane. In the many

cytoplasmic vacuoles present in these cells, mostly occupied by fat, the labeling was more evident (fig.4A, B). No labeling could be seen in the negative control (fig.4C).

Expression of CD100 in macrophages from other tissues

The next question that emerged was if macrophages resident in organs elsewhere would also express CD100, such as the ones present in the atherosclerotic plaques. To answer this question, we performed double staining immunofluorescence experiments in human spleen tissue sections for both CD100 and CD68. The results showed that most (but not all) spleen macrophages stained with CD68 also expressed CD100 (fig.5).

Expression of CD100 in cultured cells

After detecting CD100 in macrophages from plaques and spleen, we sought to analyze its expression in cultured cells. We used THP-1 cells because it is a highly differentiated monocytic cell line that takes on macrophage-like characteristics when stimulated with phorbol-ester (Tsuchiya et al., 1980; Tsuchiya et al., 1982) and for which a *in vitro* foam cell differentiation protocol is well established (Banka et al., 1991). Foam cells are the most abundant cell type in atherosclerotic lesions, and could give us more accurate information about atherogenesis when compared to regular undifferentiated macrophages. After differentiation in macrophages, cells were cultured in the presence of oxLDL to obtain foam cells. We performed double staining immunofluorescence with macrophages and foam cells using again the antibodies for CD68 and CD100. The results showed expression and co-localization of both markers in both cells (fig.6).

CD100 mRNA in cultured cells

To obtain quantitative results of CD100 expression we investigated CD100 expression in terms of mRNA in cultured cells using Real-Time RT-PCR. For this purpose, fresh PBMC monocytes and THP-1 cells were cultured and differentiated into macrophages, then submitted to distinct stimulation protocols. THP-1 macrophages were additionally differentiated into foam cells. The final aim was to verify whether activation of these cell types would modulate CD100 transcript levels.

In the first set of experiments, we evaluated the modulation of CD100 expression with inflammatory or pro-atherogenic stimuli in cells isolated from PBMC. Macrophages differentiated *in vitro* from PBMC monocytes were stimulated with either vitamin D or oxLDL for 10, 18, 24 and 34 hours. CD100 expression was augmented approximately 2 times with both types of stimuli at least in one time point, generally in the longer periods tested (24h and 34h) (data not shown).

In a second set of experiments, THP-1 cells were differentiated into macrophages, but stimulated with LPS or vitamin D for different periods of time (6, 12, 24, 48 and 72h), in a time-course experiment. The expression of CD100 and IL-1 β was assessed relative to the expression of GAPDH. IL-1 β was analyzed to assure that the macrophages were in fact activated, and to correlate the peaks of expression of CD100 and IL-1 β . The results showed a variable increase in CD100 expression under the two different types of stimuli in different periods of time (fig.7A), whereas IL-1 β showed a more consistent pattern, with peaks at 24h (fig.7B). Thus, we observed the same pattern of augmentation in CD100 expression under pro-inflammatory stimuli in THP1-differentiated macrophages as previously seen in PBMC macrophages.

We then tested the activation of these cells with IFN- γ , another central cytokine in atherosclerosis (Hansson&Libby, 2006), because it was recently shown to augment CD100 expression in human monocytes (Hu et al., 2008). For this purpose, PBMC monocytes and macrophages were stimulated for 24 hours and CD100 expression was evaluated. There was an increase on CD100 expression upon stimulation in both cell types, of up to ~ 5 times on monocytes and ~10 times on macrophages (fig.8A), and although individual variability was still observed in these experiments, the average of all experiments showed an increase of at least ~ 2 times relative to non stimulated cells (fig.8A). When analyzing CD100 expression along the monocyte-macrophage differentiation, the CD100 transcript could still be detected in both cell types, showing a higher level of expression in monocytes in relation to macrophages (average increase of ~ 3 times) which remained constant with or without activation (fig 8B). To assure the activation of monocytes and macrophages by IFN- γ we evaluated STAT-1 expression (Schroder et al, 2004). As seen in figure 9, STAT-1 levels were significantly increased after stimulation in both cell types.

THP-1 monocytes, macrophages and foam cells were also stimulated with IFN- γ and tested for CD100 expression. Interestingly, opposite to what was observed for PBMC monocytes and macrophages, CD100 mRNA levels in THP-1 cells were either

unchanged or diminished in all cell types tested after stimulation (fig.10), demonstrating a distinct behavior upon IFN- γ stimulation between these cells. For activated monocytes there was either no change or decrease in expression, while for macrophages and foam cells no significant changes could be observed (fig.10).

We also compared CD100 expression during the differentiation from THP-1 monocytes to macrophages and from macrophages to foam cells. The results were highly variable for the transition from monocytes to macrophages, although this variability decreased after the cells were activated with IFN- γ (fig.11). In the differentiation from macrophages to foam cells there was a decrease in CD100 expression, which was also detected when the cells were stimulated with IFN- γ (fig.11).

CD100 protein in cultured cells

Changes in RNA expression are not always reproduced at protein levels, so we wondered whether activating pro-inflammatory stimuli would exert the same effect in monocytes, macrophages and foam cells. We compared CD100 protein abundance in lysates of THP-1 cells, PBMC monocytes and macrophages and T lymphocytes under the same culture conditions analyzed in the Real-Time experiments. T lymphocytes stimulated or not with CD3/CD28 beads were included as a positive control, since this cell type is known to respond with CD100 protein increase after stimulation (Elhabazi et al., 2003).

In Jukart cells, mCD100 migrates as a 150kDa monomeric form and the soluble form (sCD100) as 120kDa form, under reducing conditions (Elhabazi *et al.*, 2001). Similar results were consistently observed with other CD100-positive cell lines, and other cell types transfected with the molecule (Elhabazi *et al.*, 2001). Accordingly, under the reducing experimental conditions tested, we could detect two bands of approximately 150kDa and 120kDa in all cell types tested, consistent with results obtained by other groups for T cells (Elhabazi *et al.*, 2001). PBMC monocytes and macrophages had similar levels of CD100 protein, with a small decrease in macrophages (fig 12A, 12B). The level of expression did not seem to be affected by stimulation with IFN- γ .

THP-1 cells showed more variable results. As observed in PBMC cells, the band intensity did not show a significant increase after stimulation in monocytes, macrophages and foam cells, in contrast to the observed for T cells (figs. 12A and 12B).

We observed that THP-1 monocytes express the highest levels of CD100 when compared to all other cell types tested, except T lymphocytes. However, there seemed to be no detectable change on CD100 expression after treatment with IFN- γ (fig. 12B). CD100 expression decreased in THP-1-derived macrophages and even more in foam cells, although in macrophages the 120kDa band is the most evident and while in foam cells, the 150kDa predominates.

DISCUSSION

CD100 is the first human semaphorin described in the immune system (Bougeret et al., 1992; Delaire et al., 1998). At the cellular level, human CD100 triggers co-stimulatory signals to T cells promoting their proliferation and priming (Herold et al., 1996), B cell survival, aggregation, antibody production and also cytokine secretion in response to T-dependent antigens (Billard et al., 2000), as well as enhancement of NK cells killing of target cells (Mizrahi et al., 2007). In addition, human soluble CD100 induces monocyte paralysis and arrest of its spontaneous and chemokine-induced migration (Chabbert-de Ponnat et al., 2005). In mice CD100 has been linked to pathogenic humoral responses and immune complex glomerulonephritis (Li et al., 2006) and induction of allo-responses (Duran-Struuck et al., 2007); in the glomerulonephritis model it has been recently shown that CD100 induces macrophage recruitment (Li et al., 2009). In humans, recent studies have indicated important role for the molecule in tumor angiogenesis (Basile et al., 2006; Sierra et al., 2008), in apoptosis of oligodendrocytes (Giraudon et al., 2004) and in platelet responses to vascular injury (Zhu et al., 2007). More specifically, it has been shown that the loss of sema4D expression in mice reduces platelet hyperactivity and confers protection against the development of atherosclerosis (Zhu et al., 2009).

Considering the distinct activities of CD100 in the immune system and the significant association of the molecule in vascular phenomena, we evaluated the expression of CD100 in atherosclerotic plaques. Our study is the first to describe it in atherosclerotic plaques and to speculate a role for the molecule in the disease.

We observed remarkable CD100 expression in atherosclerotic plaques in the fatty streak area, mostly occupied by modified macrophages or foam cells. Additional experiments using CD68 confirmed the initial observation. Scarce T cells present in the samples were also positive. In any case, foam cells seem to be the major source of

CD100 in the lesions, due to the much higher number of these cells in the tissue sections analyzed. Similar results were obtained in plaques from coronary and carotid arteries, since both were foam cell-rich plaques. On the other hand, no staining could be detected in the normal samples with the exception of endothelial cells, showing that CD100 expression is enhanced in the artery wall infiltrated by immune cells, more specifically, macrophages.

CD100 expression had already been described in monocytes (Ji et al., 2009) and tumor associated macrophages (TAMs) (Sierra et al., 2008), but not so far in macrophages from other tissues or in culture differentiated macrophages. Cultured macrophages and *in vitro* differentiated foam cells showed positive staining for CD100, confirming the results obtained in tissues. We have also observed CD100 expression in human splenic macrophages, what demonstrates that the expression of the molecule is not limited to macrophages or foam cells in the artery wall or from tumors. However, not all of the macrophages showed positive labeling, probably because the spleen accommodates many different phenotypes of these cells.

In order to evaluate CD100 expression under different stimuli, analyses of gene expression patterns in cultured THP-1 and PBMC monocytes and macrophages and THP-1 foam cells were performed. CD100 mRNA levels were increased in THP-1 differentiated macrophages stimulated with LPS and vitamin D, although a heterogeneous pattern of expression was observed considering different experiments. This could be due to the fact that it is tumoral cell lineage, and might undergo many changes (among them, gene expression) over the passages in culture and under minimal culture variations. Nevertheless, THP-1 cells are reported to be the most similar to PBMC derived macrophages when compared to other myeloid cell lineages, such as HL-60, U937, KG-1 or HEL (Auwers, 1991).

In contrast to these results, IFN- γ unexpectedly did not augment CD100 expression in THP-1 monocytes, macrophages and foam cells. Even though the three stimuli are activating in nature (LPS, vitamin D and IFN- γ), the signaling pathways are indeed very distinct from each other. Both IFN- γ and vitamin D use their own receptors (IFN- γ R and VDR, respectively), while LPS signals mainly through TLR2 and TLR4. Nevertheless, the coupling IFN- γ / IFN- γ R and LPS/TLR present several points of integration in macrophages. Synergy occurs at multiple levels, ranging from signal recognition to convergence of signals at the promoters of target genes (Schroder et al, 2004). The fact that the two signaling pathways cross talk, but only LPS is able to

induce an increase of CD100 mRNA in the cells analyzed suggests that CD100 is only expressed under specific inflammatory stimuli (in this case, LPS and vitamin D).

When comparing CD100 mRNA levels in THP-1 monocytes and macrophages, variable results were observed showing no clear modulation. On the other hand, significant reduction of CD100 expression was detected during the transition from macrophages to foam cells, even though the latter could be considered a more activated stage of macrophage. Most likely foam cells have their entire gene expression machinery “on hold”, because the ongoing phagocytosis of modified LDL takes up most of the cell energy. Therefore they may show a less complex state of activation in relation to macrophages.

Although the signaling pathway which results from the coupling of CD100 with its two well known receptors - plexin B1 and CD72 - is already described (Bismuth&Boumsell, 2002), the pathways that result in CD100 induction are yet unknown. It is possible that the molecules involved in CD100 modulation (common or not to the already mentioned stimuli) could interact with molecules from other pathways, and the nature or timing of this interaction should be determinant for the expression of CD100 in a given cell type. Another possibility could be that IFN- γ does not modulate CD100 transcription, but could augment its abundance at the protein level.

Different from THP-1 cells, PBMC macrophages exposed to pro-atherogenic (oxLDL) and all pro-inflammatory (LPS, vitamin D and IFN- γ) stimuli showed increased CD100 expression, which further supports a role for CD100 in atherosclerosis. The sustained expression of CD100 along the differentiation from PBMC monocytes to macrophages could be an indication of the participation of the molecule in the different stages of the disease, in the blood and plaque compartments.

At the protein level, CD100 was detected as both 150kDa and 120kDa bands in THP-1 and PBMC monocytes and macrophages, and in THP-1 foam cells, as well as in T cells, although there was no increase in monocyte-derived cells upon IFN- γ stimulation. This was unexpected, since activated T cells show a significant increase in CD100 expression. It is possible that CD100 translation is differentially modulated upon IFN- γ stimulation in monocytes, macrophages and foam cells when compared to lymphocytes.

Very recently, a monocyte subpopulation characterized by high levels of the LY-6C marker antigen (which corresponds to human CD14^{hi}CD16⁻ monocytes) has been shown to dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis in mice and to give

rise to the macrophages in atherosclerotic lesions (Swirski et al., 2007; Tacke et al., 2007). This observation indicates that cell heterogeneity of circulating monocytes influences plaque formation and phenotype. Moreover, mature tissue macrophages also exhibit a level of heterogeneity reflecting the plasticity and versatility of these cells in response to microenvironmental signals (Gordon, 2007). Microbial stimuli, such as LPS as well as Th1 cytokines, activate macrophages into an M1 inflammatory state, while Th2 cytokines such as IL-4 polarize cells to an M2 phenotype with immunoregulatory, repairing, and anti-inflammatory functions (Gordon, 2003), both of which are found in human atherosclerotic lesions (Bouhrel et al., 2007). It is possible that CD100 expression within the plaque environment might be influenced and also exerts distinct effects on these macrophage subpopulations.

Taken together, these results show for the first time that CD100 is expressed by macrophages and foam cells in atherosclerotic plaques. Since CD100 participates in the communication between diverse cells and in platelet aggregation, a possible function for the molecule in monocytes early in the development of the disease could be adhesion to endothelial cells, known to express plexinB1, a CD100 receptor. At the same time, in the artery wall, CD100 is expressed by T cells that arrived in the intima, which are activated and produce IFN- γ . Other cell types, such as NK cells also express CD100 and are usually present at lower numbers in this stage. The CD100 produced by these different cell types may recruit more macrophages to the lesion site. In the second phase of the disease, monocytes which entered the arterial wall differentiate into macrophages and foam cells, all of which are CD100 producing cells. The maintained expression of CD100 in macrophages and foam cells, the latter known to shut-off the expression of several proteins, suggest important functions of CD100 in these cells too. In the third stage of the disease CD100 may exert its proangiogenic effect mainly through the apoptosis of foam cells and massive release of soluble CD100, which couples to its plexinB1-Met receptor present in these cells.

The relevance of these observations lies in the already well established functions of human CD100 in the immune system and in other physiological and pathological phenomena such as angiogenesis, carcinogenesis and apoptosis. Furthermore, as atherosclerosis involves the expression of many molecules by immune and other cell types, such as leukocyte adhesion molecules, chemokines and cytokines (Hansson&Libby, 2006), which could furnish targets for therapeutic manipulation, the discovery of a new molecule which is highly expressed by the most abundant cell type

in the lesions might be of great value. In this way, CD100 could provide a powerful tool for more selective intervention in anti-atherosclerotic therapy. Further experiments will be performed to confirm these observations and to help determine the role of the molecule in the disease.

REFERENCES

- Auwers, J. (1991). The human leukemia cell line THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 47:22-31
- Basile J.R., Barac A., Zhu T., Guan K.L., Gutkind J.S. (2004) Class IV semaphorins promote angiogenesis by stimulating Rho-initiated pathways through plexin-B. *Cancer Res.* 64(15):5212-24.
- Basile J.R., Afkhami T., Gutkind J.S. (2005) Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Mol. Cell Biol.* 25(16):6889-98.
- Basile J.R., Castilho R.M., Williams V.P., Gutkind J.S. (2006) Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(24):9017-9022.
- Basile J.R., Holmbeck K., Bugge T.H., Gutkind J.S. (2007) MT1-MMP controls tumor-induced angiogenesis through the release of semaphorin 4D. *J. Biol. Chem.* 282(9):6899-905.
- Behar O., Golden J.A., Mashimo H., Schoen F.J., Fishman M.C. (1996) Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* 383(6600): 525-8.
- Billard C., Delaire S., Raffoux E., Bensussan A., Boumsell L. (2000) Switch in the protein tyrosine phosphatase associated with human CD100 semaphorin at terminal B-cell differentiation stage. *Blood* 95(3):965-72.
- Bismuth G., Boumsell L. (2002) Controlling the immune system through semaphorins. *Sci STKE*. 2002(128): RE4.
- Bougeret, C.; Mansur, I.G.; Dastot, H.; Schmid, M.; Mahouy, G.; Bensussan, A.; Boumsell, L. (1992) Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation. *The Journal of Immunology*, 148:318-323.
- Bouhrel, M.A.; Derudas, B.; Rigamonti, E.; Dievart, R.; Brozek, J.; Haulon, S.; Zawadzki, C.; Jude, B.; Torpier, G.; Marx, N.; Staels, B.; Chinetti-Gbaguidi, G. (2007) PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties, *Cell Metab.* (6):137–143.

Chabbert-de Ponnat, I.; Cardine, A.M.; Pasterkamp, R.J.; Schiavon, V.; Tamagnone, L.; Thomasset, N.; Bensussan, A.; Boumsell, L. (2005) Soluble CD100 functions on human monocytes and immature dendritic cells plexin C1 and plexin B1, respectively. *International Immunology* 17(4):439-447.

Conrotto P., Valdembri D., Corso S., Serini G., Tamagnone L., Comoglio P.M., Bussolino F., Giordano S. (2005) Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood* 105(11):4321-9.

Dai *et al.*, (2004) Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and resistant region of human vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 14871-14876.

Delaire, S.; Elhabazi, A.; Bensussan, A.; Boumsell, L. (1998) CD100 is a leukocyte semaphorin. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:1265.

Duran-Struuck R, Tawara I, Lowler K, Clouthier SG, Weisiger E, Rogers C, Luker G, Kumanogoh A, Liu C, Ferrara JL, Reddy P. (2007) A novel role for the semaphoring Sema4D in the induction of allo-responses. *Biol Blood Marrow Transplant.* 13:1294-1303.

Elhabazi A, Delaire S, Bensussan A, Boumsell L, Bismuth G. (2001) Biological activity of soluble CD100. I. The extracellular region of CD100 is released from the surface of T lymphocytes by regulated proteolysis. *J. Immunol.* 166(7):4341-7.

Elhabazi A., Marie-Cardine A., Chabbert-de Ponnat I., Bensussan A., Boumsell L. (2003) Structure and function of the immune semaphorin CD100/SEMA4D. *Crit. Rev. Immunol.* 23(1-2):65-81.

Kikutani H., Suzuki K., Kumanogoh A. (2007) Immune semaphorins: increasing members and their diverse roles. *Adv. Immunol.* 93:121-43.

Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., Goodman, C.S. (1993) The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.

Gitler A.D., Lu, M.M., Epstein, J.A. (2004) PlexinD1 and semaphorin signaling are required in endothelial cells for cardiovascular development. *Dev. Cell.* (1):107-16.

Giraudon P, Vincent P, Vuillat C, Verlaeten O, Cartier L, Marie-Cardine A, Mutin M, Bensussan A, Belin MF, Boumsell L. (2004) Semaphorin CD100 from activated T lymphocytes induces process extension collapse in oligodendrocytes and death of immature neural cells. *J. Immunol.* 172(2):1246-55.

Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3(1):23-35.

Gordon S (2007) The macrophage: past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1:S9-17.

- Gu C., Rodriguez E.R., Reimert D.V., Shu T., Fritzsche B., Richards L.J., Kolodkin A.L., Ginty D.D. (2003) Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev. Cell.* 5(1):45-57.
- Gu C., Yoshida Y., Livet J., Reimert D.V., Mann F., Merte J., Henderson C.E., Jessell T.M., Kolodkin A.L., Ginty D.D. (2005) Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science* 307(5707):265-8.
- Hansson, G.K. (2005) Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, 352(16):1685-1695.
- Hansson, G.K.; Libby, P. (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Rev Immunol* (6):508-519.
- Herold C., Elhabazi A., Bismuth G., Bensussan A., Boumsell L. (1996) CD100 is associated with CD45 at the surface of human T lymphocytes. Role in T cell homotypic adhesion. *J. Immunol.* 157(12):5262-8.
- Hu Y., Hu, X., Boumsell, L., Ivashkiv L.B. (2008) IFN-gamma and STAT1 arrest monocyte migration and modulate RAC/CDC42 pathways. *J. Immunol.* 180(12):8057-8065.
- Ji J.D., Park-Min K.H., Ivashkiv L.B. (2009) Expression and function of semaphorin 3A and its receptors in human monocyte-derived macrophages. *Hum. Immunol.* 70(4):211-7.
- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Gabbiani, G., Hansson, G.K. (1985) Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 76, 125-131.
- Li M, O'Sullivan KM, Jones LK, Semple T, Kumanogoh A, Kikutani H, Holdsworth SR, Kitching AR. (2006) CD100 enhances dendritic cell and CD4+ cell activation leading to pathogenetic humoral responses and immune complex glomerulonephritis. *J. Immunol.* 177(5):3406-12.
- Li M, O'Sullivan KM, Jones LK, Lo C, Semple T, Kumanogoh A, Kikutani H, Holdsworth SR, Kitching R. (2009) Endogenous CD100 promotes glomerular injury and macrophage recruitment in experimental crescentic glomerulonephritis. *Immunol.* 128(1):114-22.
- Mizrahi S, Marcel G, Porgador A, Bushkin Y, Mandelboim O. (2007) CD100 on NK cells enhance IFN γ secretion and killing of target cells expressing CD72. *PLoS ONE* 2(9):e818.
- Pasterkamp, R.J., Kolodkin, A.L. (2003) Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 79-89.
- Rocha VZ, Libby P (2009) Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat. Reviews Cardiol.* 6, 399-409.

Ross R (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 138(5Pt 2):S419-20.

Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75(2):163-89.

Sekido Y., Bader S., Latif F., Chen J.Y., Duh F.M., Wei M.H., Albanesi J.P., Lee C.C., Lerman M.I., Minna J.D. (1996) Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93(9): 4120-5.

Semaphorin Nomenclature Committee (1999) Unified nomenclature for semaphorins / collpasins. *Cell* 97, 551-552.

Serini G, Valdembrì D, Zanivan S, Morterra G, Burkhardt C, Caccavari F, Zammataro L, Primo L, Tamagnone L, Logan M, Tessier-Lavigne M, Taniguchi M, Püschel AW, Bussolino F. (2003) Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature*.24; 424(6947): 391-7.

Sierra JR, Corso S, Caione L, Cepero V. *et al.* (2008) Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *J. Exp. Med.* 205: 1673-1685.

Steinberg, D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272, 20963-20966.

Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ. (2007) Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest.* 117(1):195-205.

Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. (2007) Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 117(1):185-94.

Tomizawa Y., Sekido Y., Kondo M., Gao B., Yokota J., Roche J., Drabkin H., Lerman M.I., Gazdar A.F., Minna J.D. (2001) Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(24):13954-9.

Toyofuku T., Zhang H., Kumanogoh A., Takegahara N., Yabuki M., Harada K., Hori M., Kikutani H. (2004a) Guidance of myocardial patterning in cardiac development by Sema6D reverse signalling. *Nat. Cell Biol.* 6(12):1204-11.

Toyofuku T, Zhang H, Kumanogoh A, Takegahara N, Suto F, Kamei J, Aoki K, Yabuki M, Hori M, Fujisawa H, Kikutani H.(2004b) Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev.* 15; 18(4):435-47.

Tse C., Xiang R.H., Bracht T., Naylor S.L. (2002) Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line. *Cancer Res.* 62(2):542-6.

Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T., Konno, and K. Tada. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26: 171-176.

Tsuchiya, S., Y. Kobayashi, Y. Goto, H. Okumura, S., Nakae, T. Konno, and K. Tada. (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 42: 1530-1536.

Zhu, L.; Bergmeier, W.; Wu, J.; Jiang, H.; Stalker, T.J.; Cieslak, M.; Fan, R.; Boumsell L.; Kumanogoh A.; Kikutani H.; Tamagnone L.; Wagner D.D.; Milla M.E.; Brass L.F.(2007) Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury. *Proc Natl Acad Sci.* 104(5):1621-6.

Zhu, L., Stalker, T.J., Fong, K.P., Jiang, H., Tran, A., Crichton, I., Lee, E.K., Neeves, K.B., Maloney, S.F., Kikutani, H., Kumanogoh, A., Pure, E., Diamond, S.L., Brass, L.F. (2009) Disruption of SEMA4D ameliorates platelet hypersensitivity in dyslipidemia and confers protection against the development of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29(7):1039-1045.

Xiang R., Davalos A.R., Hensel C.H., Zhou X.J., Tse C., Naylor S.L. (2002) Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer Res.* 62(9):2637-43.

FIGURES

Figure 1. A-B: Immunohistochemistry for CD100 of plaques in 100 and 400x showing labeling of foam cells in the lipid core region. A: 100x, B: 400x

Figure 2. A-D: Immunofluorescence of plaques, showing blue nuclei in DAPI (A), CD68 staining in FITC (green, B), CD100 staining in Alexa 660 (red, C) and co-localization of both markers (D), 200x.

Figure 3. A-B: Immunohistochemistry for CD100 of coronary plaques showing positivity in the lipid core region. A: 100x, B: 400x

Figure 4. A-C: Immunoelectron micrography of plaque macrophages (foam cells) showing labeling of the cytoplasm (**A**), most visible in the vesicles (**B**). No labeling in the negative control (**C**). **A:** 2550x; **B-C:** 30000x

Figure 5. A-D: Immunofluorescence of spleen, showing blue nuclei in DAPI (**A**), CD68 staining in FITC (green, **B**), CD100 staining in Alexa 660 (red, **C**) and co-localization of all markers (**D**), 200x.

Figure 6. Immunofluorescence of macrophages (**A-D**) and foam cells (**E-H**) from THP-1 showing blue nuclei in DAPI (**C, G**), labeling of CD100 with Alexa 660 (red; **A, E**) and CD68 with FITC (green; **B, F**). Co-localization of all markers in **D, H**. **A-H:** 1000x.

A

B

Figure 7: Relative Real-time RT-PCR for CD100 (**A**) and IL-1 β (**B**) in THP-1 macrophages stimulated with LPS or vitamin D for different periods of time (6, 12, 24, 48 and 72h) relative to non stimulated cells. Values were normalized using GAPDH and are shown as individual results (left) and as average of 4 subjects (right). **A.** The graph represents the highest values of CD100 mRNA found in each of four independent experiments. **B.** IL-1 β expression was increased under the two stimuli, especially LPS, with peaks at 24h. Representative of 4 experiments.

A

Figure 8A: Real-time RT-PCR for CD100 in PBMC monocytes and macrophages stimulated (+) with IFN- γ relative to non stimulated (-) cells. CD100 values were normalized using GAPDH and are shown as individual results (left) and as average of 4 subjects (right). CD100 expression was augmented in monocytes and macrophages, but not in foam cells.

B

Figure 8B: Relative Real-time RT-PCR for CD100 along the differentiation from PBMC monocytes to macrophages, and from macrophages to foam cells stimulated (+) or not (-) with IFN- γ , normalized with GAPDH, shown as individual results (left) and as average of 4 individuals (right). The results show high variability in CD100 expression along the transition between the cell types, which is maintained after activation. CD100 expression decreases along differentiation.

Figure 9: Real-time RT-PCR for STAT-1 in PBMC monocytes and macrophages stimulated with IFN- γ (+) relative to non stimulated cells (-), normalized with GAPDH. STAT-1 expression was increased in both cell types, as shown in individual results (left) and in average of 3 individuals (right).

Figure 10: Real-time RT-PCR for CD100 in THP-1 monocytes, macrophages and foam cells stimulated with IFN- γ (+) relative to non stimulated cells (-). Data was normalized with GAPDH. CD100 expression was either unchanged or diminished in all cell types tested after stimulation. For activated foam cells there was either no change or decrease in expression, while for monocytes and macrophages no changes could be observed. Representative of 3 experiments.

Figure 11: Relative Real-time RT-PCR for CD100 mRNA along the differentiation from THP-1 monocytes to macrophages and from macrophages to foam cells (stimulated + or not - with IFN- γ) normalized with GAPDH. The results show high variability in the transition from monocytes to macrophages, which is diminished when the cells are activated. In the transition from macrophages to foam cells, there is a decrease in CD100 expression, which is maintained after activation. Representative of 3 experiments.

A **B**

Figure 12: CD100 and β-actin expression in monocytes and macrophages stimulated or not with IFN-γ. **A.** Western blot showing CD100 and β-actin in T lymphocytes (1), PBMC monocytes (2) and macrophages (3), THP-1 monocytes (4), macrophages (5) and foam cells (6) stimulated (1b, 4b, 5b, 6b) or not with IFN-γ. **B:** Densitometry of CD100 and β-actin protein bands, showing CD100/β-actin ratio for each cell type. Representative of three experiments.