AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES ÓPTICOS PARA A ATHEROSCLEROSE

LETÍCIA BONFANTE SICCHIERI

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:
Profa. Dra. Lilia Coronato Courrol

São Paulo
2016

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Estudo e Caracterização de Marcadores Ópticos para a Aterosclerose

LETÍCIA BONFANTE SICCHIERI

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Lilia Coronato Courrol**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2016

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Adevanir Sicchieri e Valda Aparecida Bonfante Sicchieri e meu irmão Alexandre Sicchieri Neto por todo apoio e suporte durante essa e todas as etapas da minha vida.

Ao meu noivo Leandro Matioli Machado por sempre estar ao meu lado.

A minha lindíssima avó Maria Raimundo Bonfante por todas as orações.

E a todos que contribuíram de alguma maneira para que eu conseguisse chegar até final desse trabalho.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus.

À Prof. Dra. Lilia Coronato Courrol, minha orientadora tanto no mestrado quanto no doutorado, muito obrigada por todo apoio e incentivo durante todos esses anos.

À Dra. Flávia Rodrigues de Oliveira Silva por todas as conversas sobre experimentos e artigos, muito obrigada.

À Dra. Andrea Moreira Monteiro por toda ajuda no laboratório com os experimentos e todo apoio.

Ao Dr. Laércio Gomes, ao Dr. Antônio M. Figueiredo Neto, pela disponibilização do tempo dos senhores e laboratórios para realização desse trabalho.

À Dra. Carolina Benetti por todo apoio e ajuda durante a experimentação animal e por estar sempre disponível a me ajudar e a tomar café comigo.

À MSc Maira F. de Andrade, por aceitar estar as seis horas manhã no biotério comigo, por me ensinar muito sobre experimentação animal e ser sempre uma amiga muito querida.

Ao MSc Cassio Lima por ser meu companheiro de caminhada até em casa, mesmo que tarde da noite, por todas as conversas e risadas.

À minha companheira de laboratório MSc Mônica Nascimento da Silva por toda ajuda com a experimentação animal e desenvolvimento dessa etapa importante do trabalho, você chegou no grupo na hora certa.

Ao Rodrigo de Andrade pela imensa ajuda com os experimentos em Campinas, por toda ajuda com as análises tanto do FLIM quanto do SHG.

A Dra. Marina Berardi Baroni, por toda ajuda com as medidas em Ribeirão Preto e análise dos dados, muito obrigada por toda a paciência em sempre responder aos meus e-mails.

Aos meus colegas de salinha, Tânia, Camila, Lucas, Caetano, Danilo, Débora, Cris, vocês deixavam minhas tardes bem mais felizes.

Aos meus amigos de faculdade Fernanda Cavalcante (Fee) e Tiago José Arruda (eterno Turco) que estiveram do meu lado durante todos esses anos.

Ao IPEN, aos pesquisadores do Centro de Lasers de Aplicações por contribuírem de alguma maneira nas várias etapas desse trabalho.

Aos demais funcionários e técnicos do CLA, em especial ao Sr. Luiz Rosa que estava sempre disposto a ajudar e sempre de bom humor.

Ao Biotério do IPEN e seus funcionários pelos serviços prestados.

Aos meus novos colegas de trabalho, Thaís, Alessandra, Clara, Santana, Marco, Jossiara, Eliane Melo, Júlio Cesar, Petta, Enzo, por deixarem meus dias mais contentes.

Ao pessoal da minha seção de trabalho Cel Paiva Neto, Cel Martha, Maj J. Passos, Cap Vander, por todo apoio nessa etapa final da minha tese.

Ao Cel Alex, chefe da divisão de ensino da Espcex, e ao Cel Ubaldo por apoiarem e me liberarem para o término dessa tese.

A Escola Preparatória de Cadetes do Exército (Espcex), meu local de trabalho atual, por me dispensar para término da tese.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

À FAPESP por financiar os projetos de pesquisa associados a este trabalho.

ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES ÓPTICOS PARA A ATEROSCLEROSE

LETÍCIA BONFANTE SICCHIERI

RESUMO

O presente trabalho buscou investigar a formação da placa de aterosclerose através de caracterização da autofluorescência do tecido e do plasma na presença de marcadores fluorescentes. Para realizar o estudo, coelhos foram divididos em dois grupos: um grupo controle onde os animais foram submetidos a uma dieta normal e um grupo experimental onde os animais foram submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica. Foram realizadas duas experimentações animais: na primeira os animais foram sendo eutanasiados ao longo do experimento e suas artérias foram coletadas. Na segunda os animais foram acompanhados por no máximo 80 dias. Durante o experimento apenas o sangue foi coletado e os animais foram eutanasiados no final do experimento. Dois marcadores fluorescentes foram utilizados no trabalho: o complexo európio-clorotetraciclina (EuCTc) e o corante tioflavina T (ThT). Analisou-se inicialmente a fluorescência dos marcadores na presença do plasma dos coelhos tanto para o grupo controle, quanto para o grupo experimental em função dos tempos de dieta. Para o complexo EuCTc observou-se duas bandas de emissão, com excitação em 400 nm, uma característica da clorotetraciclina, em 515 nm e uma em 617 nm característica do íon európio. A análise da banda do íon európio indicou um incremento da banda de emissão do complexo na presença do plasma do grupo experimental em relação ao grupo controle. Para o corante ThT também foi observado um aumento na banda de emissão em 480 nm, com excitação em 413 nm, para o grupo experimental em comparação com o grupo controle. A potencialidade de utilização do complexo EuCTc e EuCTcMg (EuCTc na presença do íon magnésio) para marcação da placa de aterosclerose nas artérias, foi estudada através da análise de microscopia de fluorescência. Observou-se que a emissão do complexo melhora muito a visualização da placa quando comparada com a autofluorescência.

Observou-se, através de microscopia de tempo de vida de fluorescência, que há uma transferência de energia entre os fluoróforos presentes na placa e os complexos EuCTc e EuCTcMg. Essa transferência de energia ocasionou em uma diminuição drástica no tempo de vida de fluorescência dos fluoróforos nessa região. Por fim, estudou-se a geração de segundo harmônico do colágeno na placa de aterosclerose, sendo obtidas diferenças na quantidade e organização do colágeno para os diferentes grupos experimentais.

STUDY AND CHARACTERIZATION OF OPTICAL MARKERS FOR ATHEROSCLEROSIS

LETÍCIA BONFANTE SICCHIERI

ABSTRACT

This study aimed to investigate the formation of atherosclerotic plaque by the characterization of the autofluorescence of the tissue and plasma in the presence of fluorescent markers. For this study, rabbits were divided into two groups: a control group and an experimental group submitted to a hypercholesterolemic diet. The animal experimentation was performed twice, the first animals were being euthanized during the experiment and their arteries were collected. In the second experiment, the animals were followed for a maximum of 80 days and only during the experiment the blood was collected. The animals were euthanized at the end of experimentation. Two fluorescent markers were used in this study: europium-chlortetracycline complex (EuCTc) and the dye Thioflavin T (ThT). Firstly, it was analyzed the marker's fluorescence in the presence of rabbit's plasma for both, the control and the experimental groups with different diet times. For EuCTc complex, it was observed two bands of emission with excitation at 400 nm, first, a characteristic of chlortetracycline at 515 nm and at 617 nm characteristic of the europium ion. Analyzing only the band of europium ion, it was observed a greater increase of the complex in the presence of plasma in the experimental group. For ThT dye the emission band at 480 nm with excitation at 413 nm for the experimental group, in comparison with the control group. I was analysed the possibility to use EuCTc and EuCTcMg complex (EuCTc the Mg ion present) for marking the atherosclerotic plaque in arteries by fluorescence microscopy analysis. The results showed that the emission of the complex increase dramatically compared to the autofluorescence. Also, there was evidence of energy transfer between the fluorophores present of the plaque and EuCTc and EuCTcMg complex by fluorescence lifetime microscopy. This energy

transfer generated a drastic decrease in the fluorescence lifetime of fluorophores. Finally, the generation of second harmonic of collagen in the atherosclerotic plaque was studied and it was obtained differences in the amount of collagen and organization in the different experimental groups.

Keywords: EuCTc complex, atherosclerosis, biosensors

Sumário

1	Introdução	20
2	Objetivos	23
3	Revisão da Literatura	24
3.1	Lipoproteínas	24
3.2	Estrutura das artérias	30
3.3	Alterações nas paredes das artérias decorrentes da aterosclerose	31
3.4	Aterosclerose em coelhos	34
3.5	Fluoróforos presentes nas artérias e nas placas de aterosclerose	37
3.6	Biomarcadores	38
3.6.1	Complexo Európio-Clorotetraciclina	38
3.6.2	Tioflavina T	44
3.7	Técnicas utilizadas	46
3.7.1	Fluorescência	47
3.7.2	Tempo de vida de fluorescência	48
3.7.3	Geração de segundo harmônico (SHG)	51
4	Materiais e Métodos	54
4.1	Experimentação Animal	54
4.2	Biomarcadores	57
4.2.1	Complexo Európio-Clorotetraciclina	57
4.2.2	Tioflavina T	57
4.3	Fluoróforos	57
4.4	Perfil Lipídico	57
4.5	Técnicas utilizadas	57

4.5.1	Microscopia.....	57
4.5.1.1	Coloração com Oil Red	57
4.5.1.2	Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)	58
4.5.1.3	Coloração com o complexo EuCTc e EuCTcMg	58
4.5.1.4	Microscopia de fluorescência	58
4.5.1.5	Microscopia de tempo de vida (FLIM)	58
4.5.1.6	Geração de Segundo Harmônico.....	59
4.5.2	Fluorescência, Absorção e tempo de vida de emissão	60
4.6	Análise Estatística.....	61
5	Resultados e discussão	62
5.1	Perfil lipídico.....	62
5.1.1	Análise do plasma dos animais do primeiro experimento	62
5.2	Biomarcadores na presença do Plasma	69
5.2.1	Análise do plasma dos animais do segundo experimento	69
5.2.2	Complexo EuCTc.....	71
5.2.3	Tioflavina T	74
5.3	Análises microscópicas.....	77
5.3.1	Coloração com HE.....	77
5.3.2	Coloração com Oil Red	80
5.3.3	Coloração com EuCTc, EuCTcMg	81
5.4	Análise de microscopia de tempo de vida de fluorescência.....	91
5.4.1	Análise da microscopia de tempo de vida de emissão dos fluoróforos (FLIM) presentes nas artérias	91
5.4.2	Análise dos fluoróforos presentes na artéria na presença com complexo EuCTc.	102

5.5	Análise do SHG	121
6	Conclusão	130
7	Trabalhos publicados.	132
8	Referências	134
9	Anexo A.....	145

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema básico da lipoproteína (15).....	24
Figura 2 - Classificação das classes de lipoproteínas baseada na densidade obtida através de ultracentrifugação. As porcentagens em vermelho indicam as porcentagens de lipídios totais e as porcentagens em azul as porcentagens de proteínas totais, em preto estão as variações de densidade de cada classe de lipoproteína (16). ..	25
Figura 3 – Subclasses quantificadas por RMN, o tamanho das subclasses foi determinado por eletroforese (21).	27
Figura 4 – Representação esquemática da origem metabólica das subclasses da LDL. CETP – proteína de transferência de colesterol esterificado; Lp – Lipoproteína; LH – Lipase hepática; TG – Triglicerídeos (22).	28
Figura 5 – Representação esquemática do metabolismo das subfrações de HDL. TG – Triglicerídeos; LH – Lipase Hepática; LCAT – Lecitina colesterol aciltransferase; CETP – proteína de transferência do colesterol esterificado; CE – colesterol esterificado (23).....	29
Figura 6 – Diagrama de uma artéria muscular (A) corada com HE (hematoxilina-eosina) e uma artéria elástica (B) corada pelo método de Weigert para estruturas elásticas, imagem da direita(26).....	31
Figura 7 - Esquema da progressão de um ateroma (27).....	33
Figura 8 - Espectro de luminescência de alguns lantanídeos tris(beta-dicetonatos) (36).....	39
Figura 9 – Estrutura básica e componentes da família das tetraciclinas (43). .	40

Figura 10 - Diagrama de Jablonski sobre o mecanismo de emissão do complexo EuCTc (54).	43
Figura 11 - Estrutura da Tioflavina T (66).	44
Figura 12 - Mecanismo de excitação e fluorescência da ThT (66).	45
Figura 13 – Geração de segundo harmônico é um processo óptico não linear. Dois fótons (em vermelho na imagem) interagem com um meio não linear, são “combinados” para formar um novo fóton (em azul na imagem) com o dobro da energia e metade do comprimento de onda (80).	52
Figura 14 – Divisão dos animais nos diferentes grupos experimentais e grupo controle ao longo do 1º experimento.	55
Figura 15 - Divisão dos animais entre o grupo controle e o grupo experimental ao longo do 2º experimento.	56
Figura 16 - Perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos) dos animais submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica ao longo do tempo de dieta (20, 40 e 60 dias).	62
Figura 17 - Espectro de absorção do complexo EuCTc na presença da VLDL diluída.	65
Figura 18 - Espectro de emissão do complexo EuCTc na presença de diferentes concentrações de VLDL.	66
Figura 19 - Área Integrada do espectro de emissão do EuCTc na presença da VLDL estimada para a amostra do grupo 60 dias.	66
Figura 20 - Emissão do complexo EuCTc na presença da VLDL de diferentes tempos de dieta (40 Dias e 60 Dias e Controle).	68
Figura 21 – Intensidade da emissão do Európio no complexo EuCTc na presença da VLDL de diferentes grupos.	68
Figura 22 – Comparação entre os valores para concentração de VLDL-TG obtidos através da emissão do complexo EuCTc (em preto) e através do Kit comercial (em vermelho).	69
Figura 23 - Perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos) dos animais submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica ao longo do tempo de dieta.	

Comparação entre os GC e GE foram feitas pelo teste não paramétrico Mann-Whitney com $p < 0,05$	70
Figura 24 – Absorção óptica do complexo EuCTc sozinho (vermelho) e do complexo EuCTc + plasma do coelho do GE – 60 Dias (preto).....	71
Figura 25 - Emissão do complexo EuCTc na presença do plasma dos coelhos dos diferentes grupos.....	72
Figura 26 – (A) - Área integrada do pico do Európio no complexo EuCTc na presença dos plasmas de cada grupo. A comparação entre os grupos foi feita através do teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney com $p < 0,05$, foram encontradas diferenças entre os grupos controle e experimental para 60 dias de dieta ($p = 0,0177$) e 80 dias de dieta ($p = 0,043$). (B) – Diferença em porcentagem entre os GC e GE para cada período de dieta.	73
Figura 27 - Média do espectro de absorção da ThT na presença do plasma do grupo controle e do grupo experimental. Medida realizada em um leitor de microplacas medido em triplicata.	74
Figura 28 – Subtração do espalhamento de luz dos espectros de absorção da ThT na presença do plasma do GE.	75
Figura 29 - Espectro de emissão do corante ThT na presença do plasma dos diferentes grupos.	76
Figura 30 – (A) Área Integrada do espectro de emissão da ThT na presença do plasma dos diferentes grupos. A comparação entre os grupos foi feita através do teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney com $p < 0,05$, foram encontradas diferenças entre os grupos controle e experimental para 40 dias de dieta ($p = 0,0357$), 60 dias de dieta ($p = 0,0159$) e para 80 dias de dieta ($p = 0,0079$). (B) Diferença em porcentagem entre os GC e GE para cada período de dieta.	77
Figura 31 – Imagens de microscopia de lâminas de arco aórtico coradas com HE com diferentes tempos de dieta. As imagens dos grupos GE – 20 Dias e GE – 40 Dias foram obtidas com aumento de 20x, as imagens do GE – 60 Dias, GE – 80 Dias e GC. SMC – Células do tecido muscular liso. Aumento de 10x.	79

Figura 32- Imagens de microscopia das lâminas de arco aórtico coradas com Oil Red em diferentes tempos de dieta (20 dias, 40 dias e 60 dias).	81
Figura 33 – Analise de microscopia de fluorescência da artéria de um animal do GE– 60 Dias, sem corar e coradas com EuCTc com diferentes razões molares. Magnificação de 20x, o traço em preto equivale a 200 µm.	83
Figura 34 – Histograma da distribuição de valores da escala de cinza de um ROI selecionado nas imagens coradas com diferentes razões molares de EuCTc.	84
Figura 35 - Analise de microscopia de fluorescência da artéria de um animal do GE – 60 Dias coradas com EuCTc com e sem o íon inorgânico Mg^{+3} e com o EuCTcMg com 0,375 mM, 0,75 mM e 1,5 mM de Mg^{+3} . Magnificação de 20x, o traço em preto equivale a 200 µm.	85
Figura 36- Histograma dos valores de tons de cinza nas imagens de microscopia de fluorescência coradas EuCTc com e sem o íon Mg^{+3} e com diferentes concentrações de Mg^{+3}	86
Figura 37 - Analise de microscopia de fluorescência da artéria de um animal do GC coradas com EuCTc, EuCTcMg e não corada. Magnificação de 20x.	87
Figura 38 - Analise de microscopia de fluorescência da artéria de um animal do GE – 60 Dias coradas com EuCTc, EuCTcMg e não corada. Magnificação de 20x.	88
Figura 39 - Análise de microscopia de fluorescência da artéria de um animal do GE – 60 Dias coradas com EuCTc, EuCTcMg e não corada. Magnificação de 100x.	89
Figura 40 - Análise de microscopia de fluorescência da artéria de um animal do GC coradas com EuCTc, EuCTcMg e não corada. Magnificação de 100x.	90
Figura 41 - Imagens de microscopia de tempo de vida (FLIM) das lâminas não coradas para os animais do GC e do GE com diferentes tempos de dieta. Dentro de cada grupo os diferentes animais foram identificados com diferentes letras, sendo de A – C animais do GE e a letra D o animal do GC. Excitação 440 nm, Emissão: > 460 nm. Magnificação de 60x.	94
Figura 42 - Histogramas das distribuições dos tempos de vida de emissão das imagens da Figura 41. I) Histogramas das imagens do grupo 20 Dias, os histogramas foram identificados com as mesmas letras das imagens, tanto para o GC quanto para	

o GE. II) Histogramas das imagens do grupo 40 Dias, os histogramas foram identificados com as mesmas letras das imagens, tanto para o GC quanto para o GE. III) Histogramas das imagens do grupo 60 Dias, os histogramas foram identificados com as mesmas letras das imagens, tanto para o GC quanto para o GE. IV) Histogramas das imagens do grupo 80 Dias, os histogramas foram identificados com as mesmas letras das imagens, tanto para o GC quanto para o GE. 95

Figura 43 - Curva do decaimento dos tempos de vida de emissão de todos os fótons das imagens. I) Decaimentos dos animais do grupo 20 dias. As curvas foram nomeadas com as letras das suas imagens de origem, sendo de A até C do GE e a letra D do GC. B) Decaimentos dos animais do grupo 40 dias. As curvas foram nomeadas com as letras das suas imagens de origem, sendo de A até C do GE e a letra D do GC. C) Decaimentos de todos os animais do grupo 60 dias. D) Decaimentos de todos os animais do grupo 80 dias. As curvas foram nomeadas com as letras das suas imagens de origem, sendo de A até C do GE e a letra D do GC. 99

Figura 44 – Valores em porcentagem da diferença entre os três tempos dos decaimentos entre o grupo controle e o grupo experimental com diferentes tempos de dieta. 101

Figura 45 - Imagens de FLIM obtidas de artérias do GC e do GE com 60 dias de dieta, foram feitas imagens tanto da camada média, quanto da camada íntima, coradas com EuCTc, EuCTcMg, Eu^{+3} e CTc. $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} > 415 \text{ nm}$. Magnificação de 40x. Tamanho da imagem 177 X 177 μm 104

Figura 46 – a) até d) Histogramas com a distribuição dos tempos de vida das imagens das artérias tanto para o GC quanto para o GE não coradas, coradas com EuCTc, EuCTcMg, Eu e CTc. 105

Figura 47 – Curvas de decaimento obtidas de um ponto específico nas imagens da Figura 45. 108

Figura 48 – (A) Espectro de absorção do complexo EuCTc, CTc e das camadas íntima e média de uma artéria (97). Espectro de emissão do complexo EuCTc, CTc, colesterol, triglicerídeos e colágeno obtidos com excitação de 400 nm. 111

Figura 49 – A) Espectro de emissão do colágeno sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc, quando excitados com 400 nm, espectro de excitação do complexo EuCTc+colágeno (curva em vermelho). B) Curvas de decaimento de emissão do colágeno sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc com excitação de 400 nm.	112
Figura 50 - (a) Espectro de emissão do colesterol sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc, excitando em 400 nm. (b) Curvas de decaimento de tempo de vida de emissão do colesterol sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc.	115
Figura 51 – (a) Espectro de emissão do triglicerídeos sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc, excitando em 400 nm. (b) Curvas de decaimento de tempo de vida de emissão do triglicerídeos sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc.	117
Figura 52 – Comparação entre os tempos de vida médio para o colágeno, colesterol, triglicerídeos na presença de diferentes quantidades do complexo EuCTc. ...	119
Figura 53 – Imagens de microscopia de SHG de uma lâmina por grupo experimental com diferentes tempos de dieta (20 Dias, 40 Dias e 60 Dias). Magnificação 40x.	122
Figura 54 – Valores médios obtidos a partir das imagens geradas por microscopia de SHG das lâminas dos grupos experimentais com diferentes tempos de dieta. (A) Valores médios obtidos por grupo para densidade de colágeno presente nas lâminas. (B) Valores médios obtidos por grupo para organização de colágeno presente nas lâminas, sendo que esse número quanto mais próximo de 1 mais organizado está o colágeno presente. (C) Valores médios obtidos por grupo para a quantidade de colágeno presente nas lâminas.	124
Figura 55 - Imagem de SHG do colágeno presente em um animal do grupo controle ao longo das diferentes camadas da artéria.	126
Figura 56 – Valores médios obtidos para densidade (A), organização (B) e quantidade (C) de colágeno ao longo da imagem da Figura 55. Em vermelho está representada a divisão entre a camada média e a camada adventícia.	127

Figura 57 - Imagem de SHG do colágeno presente ao longo das diferentes camadas da artéria de um animal do grupo experimental com 60 dias de dieta.	128
Figura 58 - Valores médios obtidos para densidade (A), organização (B) e quantidade (C) de colágeno ao longo da imagem da Figura 57. Em vermelho está representada a divisão entre a camada íntima, a camada média e a camada adventícia.	128

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Apolipoproteínas associadas as classes de lipoproteínas (19)	26
Tabela 2 – Composição das lipoproteínas presentes no soro de coelhos. Os valores da tabela foram apresentados em % por peso médio. As lipoproteínas foram separadas por ultracentrifugação sequencial (33). Cada coluna da tabela representa um subtipo da lipoproteína.	36
Tabela 3 – Principais características fluorescentes dos fluoróforos presentes nas placas de aterosclerose.	51
Tabela 4 - Diluições feitas a partir da amostra de VLDL do grupo 60 dias e concentração de triglicerídeos presentes as amostras. Para cada valor foi estimado um erro de 20%.	64
Tabela 5 - Quantificação de triglicerídeos presentes nas amostras de VLDL de cada grupo. Para cada valor foi estimado um erro de 20%.	67
Tabela 6 - Valores dos tempos de vida de emissão com maior frequência para os diferentes tempos de dieta. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste estatístico anova-one-way com $p < 0,05$. Foram encontradas diferenças estatísticas entre o GC e o GE – 40 Dias ($p = 0,02$), entre o GC e o GE – 60 Dias ($p = 0,005$), entre o GC e o GE – 80 Dias ($p = 0,0002$), não foram encontradas diferenças estatísticas entre o GC e o GE – 20 Dias ($p = 0,89$) e entre os grupos experimentais.	97
Tabela 7 – Valores dos parâmetros dos ajustes exponenciais das curvas mostradas na Figura 43.	100
Tabela 8 – Valores dos tempos de vida médios obtidos a partir dos histogramas de cada imagem. Para o cálculo do valor do tempo de vida médio utilizou-se uma aproximação por gaussiana e apresentou-se o valor do tempo de vida médio $\pm \sigma$	106
Tabela 9 – Valores dos parâmetros dos ajustes exponenciais das curvas mostradas na Figura 47.	109
Tabela 10 – Valores de tempo de vida médio $\pm$ erro do colágeno sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc.	114

Tabela 11 – Valores de tempo de vida médio $\pm$ erro do colesterol sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc.....	116
Tabela 12 - Valores de tempo de vida médio $\pm$ erro dos triglicerídeos sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc.....	118

Lista de principais Abreviações

LDL – lipoproteína de baixa densidade

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade

HDL – lipoproteína de alta densidade

TG - Triglicerídeos

EuCTc – európio-clorotetraciclina

EuCTcMg - európio-clorotetraciclina + magnésio

ThT – Tioflavina T

GC – grupo controle

GE – grupo experimental

FLIM – Microscopia de imagem de tempo de vida de fluorescência

SHG – Geração de segundo harmônico

ROI – região de interesse

1 Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte em mulheres e homens no Brasil. Segundo o Ministério da Saúde, as doenças cardiovasculares representaram 26,4% das mortes em homens e 31,8% em mulheres no ano de 2011 (1).

A aterosclerose é uma doença multifatorial, imunoinflamatória, que afeta à parede da artéria e normalmente inicia-se na juventude. Na idade adulta, a aterosclerose pode aparecer clinicamente nas seguintes formas: doença arterial coronariana (DAC), doença vascular cerebral ou doença arterial periférica (2).

Alguns fatores já foram identificados como influenciadores da progressão da aterosclerose: idade, sexo, hereditariedade, composição da dieta, tabagismo, diabetes *mellitus* e hipertensão (3). Altas concentrações de colesterol total, principalmente altas concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL) também estão relacionadas ao seu desenvolvimento.

A dosagem de lipídios juntamente com métodos tradicionais de seleção de fatores de risco é amplamente utilizada no diagnóstico da doença, embora estudos apontem que a conjunção com outros marcadores de aterosclerose possibilite um melhor diagnóstico da severidade da placa aterosclerótica. Ao mesmo tempo, marcadores de aterosclerose como proteína-C reativa, lipoproteína-A, fibrinogênio, homocisteína, entre outros, geralmente apresentam resultados controversos (4). Daí a necessidade da busca de novos e confiáveis marcadores.

A fluorescência para análise de tecidos biológicos já foi muito estudada, e atualmente a técnica de fluorescência resolvida no tempo (FRT) tem sido amplamente utilizada para aprimorar o estudo das moléculas biológicas. Na maioria das vezes, a absorção e a emissão dos fluoróforos estão na mesma região espectral, enquanto que a dinâmica do tempo de vida de emissão se altera dependendo da composição do tecido biológico. Desta forma a FRT ajuda

a distinguir os fluoróforos e pode ser utilizada no diagnóstico de diversas doenças.

Portanto as técnicas de imagens obtidas a partir da fluorescência, ou do tempo de vida de emissão dos fluoróforos, têm sido utilizadas para identificar os diferentes tipos de placa ateroscleróticas e ajudar no entendimento de sua formação (5–8). A luz de excitação utilizada nesses estudos está na região do ultravioleta e se baseia na autofluorescência dos componentes da placa.

Neste estudo, apresenta-se dois potenciais biossensores fluorescentes: O complexo Európio Clorotetraciclina (EuCTc) e o corante Tioflavina T. Em ambos, a técnica de fluorescência é a que permite a análise e estimativa do estadiamento da doença aterosclerótica.

O complexo európio-tetraciclinas já foi amplamente estudado na literatura para marcação de diferentes moléculas e componentes biológicos tais como: glicose (9), peróxido de hidrogênio (10) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) (11,12). Esses complexos apresentam propriedades óticas interessantes, como por exemplo, um grande deslocamento de Stokes, absorção na mesma região que os fluoróforos presentes nas artérias e tempo de vida de emissão na ordem de microssegundos.

A Tioflavina T (ThT) é um corante utilizado para marcar a formação de fibrilas de amiloidose, causadoras de doenças como Mal de Parkinson e Alzheimer (13), e em 2010 Griffin (14) e colaboradores estudaram a utilização do corante como uma forma de auxiliar no diagnóstico da aterosclerose.

O presente trabalho foi dividido em três etapas: a primeira etapa estudou a utilização do complexo Európio-Clorotetraciclina e a Tioflavina T na presença do plasma de coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica, nesses animais houve apenas o aumento da concentração das lipoproteínas VLDL e LDL, responsáveis pela formação da placa de aterosclerose.

Na segunda etapa do trabalho, avaliou-se a utilização do complexo EuCTc para análise da placa de aterosclerose através das imagens de microscopia de fluorescência dos coelhos submetidos à dieta rica em colesterol.

Na terceira etapa estudou-se a microscopia de fluorescência resolvida no tempo (FLIM) dos fluoróforos presentes nas artérias e uma possível transferência de energia entre eles e o complexo EuCTc. Nessa etapa, também se estudou a geração de segundo harmônico do colágeno presente nas artérias para analisar o desenvolvimento da placa de aterosclerose.

O estudo desses biossensores fluorescentes pode servir no futuro para aprimorar a utilização das técnicas óticas para o diagnóstico e progressão da aterosclerose.

2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo a investigação da formação da placa de aterosclerose através de caracterização da autofluorescência do tecido e da fluorescência do tecido e do plasma na presença de marcadores fluorescentes.

Para tanto foi necessário se realizar:

1. Indução de hipercolesterolêmia em coelhos submetidos a uma dieta rica em colesterol.
2. Estudo da emissão e dos marcadores EuCTc e ThT na presença do plasma dos coelhos.
3. Estudo da utilização do complexo EuCTc em microscopia de fluorescência para ajudar na visualização da placa de aterosclerose.
4. Estudo da microscopia de tempo de vida de emissão dos fluoróforos presentes nas artérias dos coelhos com aterosclerose
5. Estudo da Geração de Segundo Harmônio do colágeno presente em diferentes períodos do desenvolvimento da placa de aterosclerose.

3 Revisão da Literatura

3.1 Lipoproteínas

As lipoproteínas são complexos proteína:lipídios responsáveis pelo transporte de colesterol e ácidos graxos. São formadas por um núcleo lipídico de triglicerídeos e éster de colesterol e uma superfície anfifílica de colesterol livre e fosfolípidios (Figura 1), as apolipoproteínas estão interligadas em lipídios de superfície (15).

Figura 1 – Esquema básico da lipoproteína (15).

As lipoproteínas podem ser classificadas através da sua densidade, sendo a mais densa a lipoproteína de alta densidade (HDL), seguida da lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e os quilomicrons (CM) (16). A Figura 2 mostra as densidades de cada classe de lipoproteína e sua porcentagem de proteína total e lipídios totais.

Figura 2 - Classificação das classes de lipoproteínas baseada na densidade obtida através de ultracentrifugação. As porcentagens em vermelho indicam as porcentagens de lipídios totais e as porcentagens em azul as porcentagens de proteínas totais, em preto estão as variações de densidade de cada classe de lipoproteína (16).

Os CM são compostos por lipídios da dieta que correspondem a 90% de sua composição e são sintetizados pelo intestino (16,17).

A VLDL é sintetizada e secretada pelo fígado, e é responsável pela distribuição de lipídios para os tecidos periféricos, sua composição apresenta cerca de 50% de triglicerídeos. Na corrente sanguínea, a VLDL sofre modificações e remodelação para IDL e LDL, durante esse processo a LDL se torna rica em éster de colesterol (16,17).

A LDL é a lipoproteína mais rica em colesterol (~50%) e é responsável por entregar esse colesterol para os tecidos periféricos.

A HDL pode ser sintetizada pelo fígado e intestino ou ser derivada de outras lipoproteínas, é a lipoproteína com maior conteúdo proteico (16,17).

Cada lipoproteína pode ter associado à sua estrutura uma ou mais proteínas, que são chamadas de apolipoproteínas. As apolipoproteínas são anfipáticas portanto, apresentam tanto regiões hidrofóbicas como regiões hidrofílicas podendo interagir tanto com os lipídios das lipoproteínas quanto com o ambiente aquoso (18). As apolipoproteínas tem um papel fundamental na estabilidade e estrutura das partículas de lipoproteínas.

Durante percurso das lipoproteínas na corrente sanguínea pode haver intercâmbio ou mudança na apolipoproteína de algumas lipoproteínas, portanto as apolipoproteínas podem ser agrupadas em duas classes: as apolipoproteínas não trocáveis (ApoB-100, e apoB-48) e as apolipoproteínas trocáveis (apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoC-I, apoC-II, apoC-III e apoE) (Tabela 1) (18).

Tabela 1 - Apolipoproteínas associadas as classes de lipoproteínas (19)

Lipoproteína	Apolipoproteína
Quilomicrons	Principal: ApoB-48 Outras: A-I, A-IV, C-I, C-II, C-III.
Quilomicrons Remanescentes	Principal: ApoB-48 Outras: E, A-I, A-IV, C-I, C-II, C-III.
VLDL	Principal: ApoB-100 Outras: E, A-I, A-IV, C-I, C-II, C-III.
LDL	ApoB-100
IDL	Principal: ApoB-100, Outras: E, C-I, C-II, C-III
HDL	Principal: ApoA-I Outras: A-II, A-IV, E, C-III

As classes de lipoproteínas apresentam subfrações que variam levemente na densidade, tamanho, migração durante a eletroforese e composição proteica (19), além de apresentarem diferentes associações com o risco cardiovascular. As técnicas empregadas para separação das subfrações são: eletroforese, cromatografia ou ultracentrifugação (20).

Por ressonância nuclear magnética de prótons (RMN) é possível quantificar a concentração das subfrações das lipoproteínas sem a necessidade de separação, a medida da concentração de partículas é diretamente

proporcional ao número de núcleos de hidrogênio dos prótons nos grupos metil, sendo possível identificar um total de 15 diferentes subclasses de lipoproteínas, sendo 6 subfrações de VLDL, 4 de LDL e 5 de HDL são identificadas, conforme mostrado na Figura 3 (21).

Figura 3 – Subclasses quantificadas por RMN, o tamanho das subclasses foi determinado por eletroforese (21).

Existem 4 tipos diferentes de partículas de LDL possíveis de serem encontradas em cada indivíduo dependendo do estado metabólico dos lipídios. O grupo das LDLs grandes apresenta duas classes: Uma com um núcleo lipídico normal e outra com deficiência de colesterol e rica em triglicerídeos. O grupo das LDLs pequenas também apresenta duas classes: Uma com um núcleo lipídico normal e outra com deficiência de colesterol e rica em triglicerídeos (22).

As reações metabólicas responsáveis pela produção das partículas de LDL deficientes em colesterol podem ser observadas na Figura 4.

Quando os níveis de triglicerídeos no plasma são elevados, mesmo que modestamente, a reação de catálise através da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) se torna importante (22).

As moléculas de triglicerídeos do núcleo das moléculas ricas em triglicerídeos (principalmente VLDL) são trocadas uma por uma pelas moléculas de éster de colesterol no núcleo da LDL (22).

Quando as LDLs grandes se tornam deficientes em colesterol e ricas em triglicerídeos, a partícula se torna o substrato para a lipase hepática e pode, como resultado da hidrólise do triglicerídeo do núcleo e remodelação estrutural ser transformada em uma LDL menor e mais densa (22).

Dependendo dos níveis de triglicerídeos e da atividade da CETP, a LDL pequena pode ficar com a composição do núcleo lipídico normal ou ficar deficiente em colesterol (22).

Figura 4 – Representação esquemática da origem metabólica das subclasses da LDL. CETP – proteína de transferência de colesterol esterificado; Lp – Lipoproteína; LH – Lipase hepática; TG – Triglicerídeos (22).

As partículas de HDL podem ser divididas em três subfrações por ultracentrifugação: HDL₂, HDL₃ e a VHDL (HDL₂ mais densa). Já por eletroforese com sistema de gel poliacrilamida não-desnaturante as partículas de HDL, previamente separadas por ultracentrifugação, podem ser divididas em 5 subfrações: HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL_{3a}, HDL_{3b} e HDL_{3c} (23).

A primeira HDL é chamada de HDL nascente e é secretada pelo fígado apresentando uma estrutura em forma de disco.

A partir da circulação dessa partícula ela adquire colesterol não esterificado, com a ação da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) o colesterol é esterificado e entra no núcleo da HDL nascente. Conforme esse colesterol acumula no núcleo da HDL ela se torna esférica e passa a ser a HDL₃ (24).

Com o acúmulo de mais colesterol no núcleo da HDL₃, essa passa a ser a HDL_{2a}. A partícula de HDL_{2a} sofre mais transformações conforme interage com outras lipoproteínas e muda suas propriedades. Nesse processo, o éster de colesterol é transferido para a VLDL e triglicerídeos é adquirido, através da CETP. Essas partículas são transformadas na HDL_{2b}. As partículas de HDL_{2b}, são hidrolisadas pela lipase hepática e o triglicerídeo é liberado e a HDL volta a ser a HDL₃ (24), a representação esquemática do ciclo da HDL pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 – Representação esquemática do metabolismo das subfrações de HDL. TG – Triglicerídeos; LH – Lipase Hepática; LCAT – Lecitina colesterol aciltransferase; CETP – proteína de transferência do colesterol esterificado; CE – colesterol esterificado (23).

Durante muitos anos, a associação entre o risco de doença cardiovascular e a concentração das subfrações de HDL foi ignorado. Com o avanço nas técnicas de separação e classificação dessas subfrações, novas descobertas foram feitas.

A alta dosagem de LDLs pequenas e densas está relacionada à incidência de doença arterial coronariana e infarto agudo do miocárdio. Já subfrações de HDL obtidas por eletroforese HDL_{2b}, HDL_{2a} e HDL_{3a} apresentam correlação inversa com a progressão e gravidade da doença, entretanto as subfrações menores HDL_{3b}, e HDL_{3c} mostram uma correlação positiva (25).

3.2 Estrutura das artérias

As artérias são formadas por três camadas distintas: a túnica íntima, a túnica média e a túnica adventícia (26). Um diagrama de duas artérias, uma elástica e uma muscular pode ser observado na Figura 6.

A túnica íntima é composta por uma camada de células endoteliais, camada subendotelial, a qual pode conter células musculares lisas. A lâmina elástica interna é responsável pela separação da túnica íntima com a túnica média e é composta principalmente de elastina com aberturas que permitem a difusão de substâncias para nutrir as células situadas mais profundamente (26).

A túnica média é formada por camadas concêntricas de células musculares lisas. Entre as células musculares lisas existem fibras, lamelas elásticas, fibras reticulares compostas de colágeno tipo III, proteoglicanas e glicoproteínas. A presença da lâmina elástica externa mais delgada separa a túnica média da túnica adventícia (26).

A túnica adventícia é composta principalmente de colágeno tipo I e fibras elásticas (26).

Figura 6 – Diagrama de uma artéria muscular (A) corada com HE (hematoxilina-eosina) e uma artéria elástica (B) corada pelo método de Weigert para estruturas elásticas, imagem da direita(26).

3.3 Alterações nas paredes das artérias decorrentes da aterosclerose

O evento inicial do desenvolvimento da placa é uma lesão na parede endotelial da artéria, que pode ser desencadeada por diversos fatores de risco, como aumento da concentração de lipoproteínas aterogênicas, hipertensão, diabetes ou tabagismo. Essa agressão ao endotélio desencadeia a expressão de diferentes citocinas pro-inflamatórias, quimocinas e moléculas adesivas que levam a atração de monócitos e sua migração até a túnica íntima (2,27–29).

A disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima, promovendo um aumento na concentração e retenção das lipoproteínas no espaço subendotelial. As LDLs retidas sofrem modificações oxidativas provocadas por espécies reativas de oxigênio produzidas por células endoteliais e macrófagos ou até mesmo por enzimas presentes na íntima da artéria. Essa infiltração e retenção da LDL na parede arterial inicia uma resposta inflamatória (2,27–29).

Após a migração dos monócitos para a íntima arterial, estes adquirem características morfológicas de macrófagos levando a uma série de modificações que culminam na formação das células espumosas (27).

Os macrófagos dentro da íntima secretam citocinas e fatores de crescimento envolvidas no crescimento da placa, os macrófagos também se replicam dentro da íntima arterial (27).

Os monócitos aumentam a expressão de receptores *scavenger* para as lipoproteínas modificadas, como por exemplo, o receptor *scavenger* A (SRA) e CD36, e em seguida internalizam as lipoproteínas modificadas, os quais os ésteres de colesterol se acumulam em bolsas citoplasmáticas, formando assim as células espumosas (27).

Essas lesões iniciais são chamadas de estrias de gorduras e envolvem o crescimento de um núcleo lipídico extracelular nas placas (27).

Estrias de gorduras não necessariamente sofrem progressão para lesões mais avançadas, o crescimento das placas não é linear e depende muito do microambiente, podendo ser silenciosa por anos (2).

O próximo estágio da formação da placa envolve a proliferação e migração de células musculares lisas, acúmulo de colágeno e a formação de uma capa fibrosa na íntima (2).

As placas ateroscleróticas podem ser divididas em placas estáveis e placas instáveis. As placas estáveis são caracterizadas pelo acúmulo de colágeno organizado com uma capa fibrosa espessa, com poucas células inflamatórias e um núcleo lipídico menos proeminente. Já nas placas instáveis a atividade inflamatória é mais intensa, com grande atividade proteolítica e um núcleo lipídico aumentado (30). A Figura 7 mostra um esquema da progressão de um ateroma.

Figura 7 - Esquema da progressão de um ateroma (27).

De acordo com a Associação americana do coração, a progressão da placa de aterosclerose pode ser dividida em fases diferentes e vários tipos de lesão (5).

A primeira fase consiste nos precursores de lesões avançadas, e é subdividida em pequenas lesões distribuídas em três grupos morfolologicamente diferentes.

O Tipo I é caracterizada histopatologicamente por pequenos grupos isolados de macrófagos e células espumosas (5).

O Tipo II são as lesões precoces que contém um grande número de células espumosas estratificados em camadas adjacentes. A maior parte dos lipídios em lesões precoces estão dentro das células (5).

O Tipo III são as lesões intermediárias, que apresentam lipídios tanto dentro das células espumosas, quanto em gotículas de lipídios fora das células, essa é uma fase de transição para lesões mais avançadas (5).

A segunda fase consiste em lesões que levam a uma desorganização estrutural, reparo e espessamento da túnica íntima e deformação da parede da artéria, essas lesões são divididas em três grupos (Tipo IV, V e VI de lesão).

O Tipo IV de lesão apresenta alto teor de lipídios que pode predispor a placa à ruptura (5).

O Tipo V de lesão tem um tecido conjuntivo fibroso perceptível, tanto o núcleo da lesão quanto outras partes estão calcificadas, normalmente o Tipo V leva a vários graus de estreitamento das artérias (5).

O Tipo VI de lesão são as lesões mais complicadas e são devido a ruptura do tipo IV ou V, essas são associadas a formação de hematomas/hemorragia e trombose (5).

3.4 Aterosclerose em coelhos

O primeiro estudo com coelhos para desenvolvimento de aterosclerose foi realizado por Ignatowski, em 1908, através de uma dieta rica em proteínas animais (leite, ovo, carne) (31).

O coelho apresenta vários aspectos semelhantes ao humano em relação ao metabolismo de lipoproteínas e susceptibilidade para aterosclerose, exceto pela deficiência de lipase hepática (32).

As lipoproteínas contendo apoB são similares às vistas em humanos, o fígado produz VLDL contendo apoB-100 como em humanos e há alta concentração de proteína de transferência de ésteres de colesterol no plasma de coelhos (32).

A Tabela 2 mostra a composição das subfrações de lipoproteínas presentes no soro de coelhos.

Apesar das frações de VLDLs apresentarem porcentagem uniforme de triglicerídeos, as porcentagens de éster de colesterol e colesterol livre varia consideravelmente. Essas variações não aparentam ser devido a presença dos triglicerídeos, mas sim da variação de tamanho entre as partículas durante as separações e os diâmetros variam de 30 – 100 nm.

A aparência morfológica das VLDL se assemelham as humanas que sugeri uma organização molecular global semelhante. A VLDL de coelho e a de humano também apresentam semelhanças com relação a mobilidade eletroforética, o mesmo ocorre para a LDL e para HDL (33).

A LDL é caracterizada nos coelhos por uma alta concentração de proteína e éster de colesterol (33).

A contribuição de triglicerídeos é maior nos coelhos do que na LDL humana e a porcentagem de éster de colesterol menor. As partículas de LDL isoladas entre as densidades 1,020 – 1,050 g/mL apresentam diâmetro semelhante ao humano (33).

A HDL de coelho também é semelhante a HDL humana, embora apresente uma porcentagem lipídica diferente (33).

Tabela 2 – Composição das lipoproteínas presentes no soro de coelhos. Os valores da tabela foram apresentados em % por peso médio. As lipoproteínas foram separadas por ultracentrifugação sequencial (33). Cada coluna da tabela representa um subtipo da lipoproteína.

VLDL					
Limite Densidade (g/mL)	<1,006	<1,006	<1,006	<1,019	<1,019
Éster de colesterol	22,3	11,5	9,3	5,1	4,3
Colesterol Livre	4,5	11,5	10,7	9,1	8,9
Triglicerídeos	50	55,4	48	53	54,1
Fosfolípidios	14,5	21,6	17	17,3	17,2
Proteína	8,8	11,5	15	18,5	19,5
LDL					
Limite Densidade (g/mL)	1,006-1,063	1,006-1,063	1,006-1,063	1,019-1,063	
Éster de colesterol	35,7	25,1	43,4	24,4	
Colesterol Livre	5,4	11,1	43,4	9,1	
Triglicerídeos	19,4	12,3	11	11,9	
Fosfolípidios	15,8	25,8	17,2	26,5	
Proteína	24,9	29,5	28,4	28,1	
HDL					
Limite Densidade (g/mL)	1,006-1,070	1,063-1,21	1,063-1,21	1,070-1,21	
Éster de colesterol	29,7	20,8	10,7	15,5	
Colesterol Livre	9,8	2,5	10,7	2,3	
Triglicerídeos	13,3	8,2	17,9	11,6	
Fosfolípidios	18,8	16,5	26,4	19,4	
Proteína	28,4	51,9	45	51,2	

Coelhos machos são mais utilizados para o desenvolvimento de aterosclerose que coelhos fêmea. Devido ao aumento de óxido nítrico basal e vasodilatadores no endotélio dos anéis aórticos e sua dependência com a concentração de estradiol circulante, leva a uma menor inclinação à dieta para indução de lesões em fêmeas do que em machos (32).

A placa de aterosclerose em coelhos é diferente morfológicamente da placa de aterosclerose humana, devido ao fato que humanos não ingerem

grandes quantidades de colesterol e processam e toleram o consumo de colesterol melhor do que coelhos (32).

Apesar disso, o modelo continua a ser utilizado pelo rápido desenvolvimento de lesões aórticas. Normalmente se utilizam dietas com variação entre 0,5 % a 4 % de colesterol. O tempo utilizado nos experimentos varia de estudo para estudo, não sendo aconselhável longos períodos devido a hepatotoxicidade e à falência do animal (32).

3.5 Fluoróforos presentes nas artérias e nas placas de aterosclerose

Os principais fluoróforos presentes nas artérias são as proteínas estruturais incluindo elastina e colágeno.

Os primeiros estudos sobre as diferenças na fluorescência entre uma artéria normal e com placa de aterosclerose mostraram que a emissão em uma artéria normal era devida a presença das fibras de elastina nas lâminas elásticas internas ou na túnica média, enquanto que em placas fibrosas avançadas a emissão é associada a emissão do colágeno (34,35).

Laifer e colaboradores (35) mostraram em 1989 através de fotomicrografias que as artérias quando excitadas na região do ultravioleta apresentam fluorescência na região do azul e essa fluorescência é devida principalmente a presença das fibras elásticas e ao colágeno. Eles verificaram que as fibras elásticas apresentam uma emissão mais intensa na região da camada média das artérias normais e o colágeno apresenta uma emissão mais intensa na placa de aterosclerose.

As diferenças entre uma artéria normal e os diferentes estágios da placa de aterosclerose são caracterizados pelo acúmulo na túnica íntima de vários tipos e quantidades de lipídios (20-25% no tipo II, 35-30% tipo III, aproximadamente 60% no tipo IV), alterando assim a morfologia da túnica íntima (5).

As propriedades ópticas do tecido da artéria pode elucidar a sua composição. Quando não é possível realizar a excitação direta de determinados

fluoróforos do tecido, a caracterização da lesão necessita de um indicador ou biomarcador.

3.6 Biomarcadores

3.6.1 Complexo Európio-Clorotetraciclina

O complexo Európio-Clorotetraciclina é formado pelo íon európio e pelo antibiótico clorotetraciclina.

O íon európio (Eu, $Z = 63$) pertence à família dos lantanídeos. Os lantanídeos são elementos com número atômico começando no lantânio (La, $Z=57$) até o lutécio (Lu, $Z = 71$). Esses elementos apresentam configuração eletrônica semelhante e pode ser resumida em $[\text{Xe}] 4f^n 5s^2 5p^6 5d^{0-1} 6s^2$, ($n = 0 - 14$) (36,37).

A presença dos orbitais $4f^n$ dos íons lantanídeos gera uma grande variedade de níveis eletrônicos (36). Esses níveis energéticos são bem definidos devido à blindagem fornecida pelos orbitais $5s^2 5p^6$ e com isso sofrem pequena interferência do ambiente químico em que são inseridos (37).

As transições $4f^n$ variam do visível ao infravermelho próximo e são facilmente reconhecidas, conforme mostrado na Figura 8 (36). Como essas transições isoladas são proibidas por paridade, o tempo de vida de emissão é da ordem de milissegundos em cristais (38,39) e no caso com complexo EuCTc na ordem de microssegundos (40), o que permite sua utilização em técnicas de fluorescência resolvida no tempo para bioensaios, e microscopia de fluorescência.

Uma outra consequência das transições proibidas f-f é a baixa absorção direta da radiação eletromagnética. Entretanto quando coordenados com moléculas orgânicas que absorvem fortemente a radiação eletromagnética e transfiram essa energia de forma eficiente para os lantanídeos, esses emitem luz em seus comprimentos de onda característicos (36).

Figura 8 - Espectro de luminescência de alguns lantanídeos tris(beta-dicetonatos) (36).

Uma das moléculas orgânicas que podem ser complexadas com o íon lantanídeo Eu^{3+} são as que integram a família da tetraciclina.

As tetraciclinas foram descobertas nos anos 40 apresentam um amplo espectro de utilização com ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (41).

O primeiro membro descoberto da família das tetraciclinas foi a clorotetraciclina no ano de 1945 por Benjamin Duggar, e é produto da fermentação natural da bactéria do solo, *Streptomyces aureofaciens* (42).

As tetraciclinas possuem uma estrutura base comum formada por sistema de anéis tetracíclico naftaceno carboxamida, chamado de anéis DCBA, conforme indicado na Figura 9. Os radicais R_n variam entre os membros das famílias das tetraciclinas (43).

Produtos naturais das tetraciclinas					
	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Clorotetraciclina	N(CH ₃) ₂	H	CH ₃	H	Cl
Oxitetraciclina	N(CH ₃) ₂	OH	CH ₃	OH	H
Tetraciclina	N(CH ₃) ₂	H	CH ₃	H	H

Figura 9 – Estrutura básica e componentes da família das tetraciclinas (43).

A tetraciclina e a clorotetraciclina possuem pico de absorção em duas regiões, em torno de 270 nm e 370 nm (44). Carlotti, B. e colaboradores (44) mostraram que diluída em água deionizada com pH entre 2-5, a tetraciclina apresenta emissão em torno de 620 nm e a clorotetraciclina apresenta emissão em torno de 605 nm, quando excitadas em torno de 360 nm. Já quando diluída em DMSO (Dimetilsulfóxido) a clorotetraciclina não apresenta emissão e a tetraciclina apresenta emissão na região de 520 nm.

A tetraciclina em solução aquosa em pH 7,2 apresenta um tempo de vida de emissão médio em torno de 0,38 ns, já na presença do íon európio não pode ser medido devido à baixa intensidade do sinal da tetraciclina. Na presença da proteína albumina o tempo de vida passa para 1,46 ns (45).

Chi, Z. e colaboradores (46) mostraram que a tetraciclina e a clorotetraciclina interagem com a tripsina, uma proteína globular solúvel em água excretada pelo pâncreas, promovendo uma diminuição na banda de emissão da tripsina por expor a proteína a um ambiente hidrofóbico, apresentando uma transferência de energia da tripsina para as tetraciclinas, a interação ocorre

através de interação de van der Waals e ligação de hidrogênio com um sítio de ligação formando um complexo.

Em 1966, Lindgren and Raekallio (47) mostraram que a tetraciclina se liga seletivamente a placa de aterosclerose quando administrada oralmente em concentrações terapêuticas. Murphy-Chutorian D. e colaboradores (48) mostraram que a tetraciclina se acumula ao longo da placa e se concentra próximo, mas não dentro dos cristais de colesterol, esse trabalho também mostrou que a tetraciclina se liga seletivamente a placa de aterosclerose tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Miyagi, M. e colaboradores (49) mostraram que a doxiciclina, um outro membro da família das tetraciclinas, também apresenta uma seletividade com a placa de aterosclerose, apresentando um pico de emissão em torno de 532 nm, sendo o pico de emissão maior para o grupo sem placa calcificada.

Os membros da família das tetraciclinas podem ser complexados com o íon lantanídeo Európio, formando os complexos EuTcs. Nesse trabalho foi utilizado a clorotetraciclina. A ligação entre o íon lantanídeo e a molécula de tetraciclina ocorre em dois sítios preferenciais: o anel A nos grupos enol e carboxamida e o sistema β -dicetonatos (posições 11 e 12) (50,51).

Como dito anteriormente, a clorotetraciclina apresenta absorção ótica em torno de 370 nm, mas quando complexada com o íon lantanídeo Eu^{+3} sofre um deslocamento na absorção ótica para 400 nm (52).

O primeiro trabalho a respeito do európio-tetraciclina foi feito em 1980 por Sharov e colaboradores (51). Em 1984, Hirschy e colaboradores realizaram um estudo mostrando a dependência da emissão com complexo com o pH (53). A emissão do complexo é máxima com pH entre 6,7 – 8,5, sendo o pH 6,9 considerado ótimo.

A emissão do complexo é devida a um efeito conhecido como “Efeito Antena”, conforme mostrado na Figura 10. Com a absorção da energia fornecida na excitação do íon ligante (Tcs), este é elevado ao estado singlete excitado (S_1).

Através da conversão interna os elétrons decaem para o estado de menor energia dentro do estado excitado. Em seguida, ocorre o cruzamento intersistema, onde a energia é transferida do estado singleto S_1 para o estado excitado tripleto T_1 . Do estado T_1 da molécula da clorotetraciclina ocorre à transferência de energia para o íon európio trivalente. Com isso, o íon európio emite em suas transições eletrônicas $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$ ($j=0,1,2,3,4$) e $^5D_1 \rightarrow ^7F_j$ ($j=1,2,3,5,6$). As transições mais intensas para o complexo EuCTc são as $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (610 - 660nm) e $^5D_1 \rightarrow ^7F_1$ (585 – 600 nm) (54).

O complexo EuCTc apresenta algumas vantagens com relação a outros fluoróforos, como por exemplo o grande deslocamento Stokes, aproximadamente 220 nm, isso se deve a grande dissipação de energia durante a conversão interna, cruzamento intersistema, transferência de energia intramolecular, o que faz com que a luz de excitação seja diferente da luz de emissão, o que possibilita rápida diferenciação entre a excitação e a emissão (50).

Outra vantagem do complexo é a banda de emissão do íon európio bem definida (~10 nm), por conta da blindagem dos orbitais mais energéticos s e p totalmente preenchidos em torno dos orbitais f (50).

Por fim, o longo tempo de vida de emissão do complexo, na região de microssegundos, devido à natureza proibida das transições f-f do íon európio, e sua alta sensibilidade ao ambiente do ligante, principalmente com relação ao número de moléculas de água que ocupam locais internos da coordenação do íon, torna o complexo EuCTc excelente marcador para ser utilizado em técnicas de fluorescência resolvida no tempo (50).

Figura 10 - Diagrama de Jablonski sobre o mecanismo de emissão do complexo EuCTc (54).

O complexo EuTc já foi amplamente descrito na literatura como um biomarcador de lipoproteínas como a LDL (11,55,56), peróxido de hidrogênio (10,57–60), glicose (9,61), peróxido de carbamida (62).

Ghorai S.K. e colaboradores (45) mostraram que a tetraciclina no complexo Eu₃Tc, se liga em regiões internas da proteína, prevenindo perdas não radiativas por acoplamento com O-H, gerando um aumento na emissão do complexo, aumentando a eficiência do “efeito antena”.

Entretanto nesse mesmo estudo, os autores mostraram uma interação da tetraciclina com a fosfatase alcalina de *escherichia coli.*, mas essa interação não resultou em um aumento na eficiência do “efeito antena”, no caso dessa não houve uma blindagem do íon lantanídeo dos grupos O-H (45).

Foi observada que a presença de íons como magnésio aumenta a emissão do complexo EuCTc na presença da LDL oxidada (63).

Este aumento foi explicado a partir da equação de Fenton, no sentido oposto (63). A equação de Fenton (escrita no sentido oposto) descreve a oxidação de várias classes de compostos orgânicos em uma reação espontânea e pode ser exemplificada conforme mostrado abaixo:

A presença de magnésio gera peróxido de hidrogênio que aumenta o sinal do complexo EuCTc. Além disso, a presença do átomo de cloro na clorotetraciclina favorece a interação com os cátions que interagem com a molécula de LDL oxidada favorecendo a peroxidação da LDL oxidada, gerando mais peróxido de hidrogênio e com maior emissão do európio (63).

3.6.2 Tioflavina T

A Tioflavina T é um sal pertencente ao grupo dos corantes tiazol, muito utilizada para marcar fibrilas de amiloidose (13,64,65). A Figura 11 mostra a estrutura da ThT, que pode ser dividida em três fragmentos: um anel benzotiazol (1), um anel benzeno (2) e um grupo dimetilamino (3), (66).

Figura 11 - Estrutura da Tioflavina T (66).

A estrutura da Tioflavina T apresenta um ângulo de torção $\phi = 37^\circ$ entre os grupos benzotiazol e benzeno entre a ligação entre o C6 e C12 (67). No

estado excitado S_1 ocorre uma modificação nesse ângulo, passando de 37° para 90° . Essa mudança no ângulo de torção leva a uma modificação na densidade de carga da molécula no fragmento (1), passando de $Z = +0,7e$ para $Z = +0,8e$ no estado fundamental S_0 e de $Z = +0,3e$ para $Z = -0,1e$ no estado excitado S_1 . Essa transferência de carga intramolecular ocorre no estado excitado sendo uma transferência energeticamente favorável, o que leva a um estado de transferência intramolecular de carga torcido (TICT) (67). Portanto, a tioflavina T pertence ao grupo dos “*molecular rotors*”. (67,68).

O mecanismo de excitação da ThT pode ser observado na Figura 12, após a absorção de energia (1) o corante passa para um estado não-relaxado LE (Localmente Excitado). Após a relaxação para níveis vibracionais de menor energia, a molécula retorna para o estado fundamental pela emissão fluorescente (2). Além da emissão a molécula pode transferir energia para um estado excitado TICT (3), gerado devido a rotação ao longo da ligação C6-C12 entre os fragmentos (1)+(2 e 3), mostrados na Figura 11, retorna para o estado fundamental através de perdas não radiativas (4) (66–68).

Stsiapura V.I., e colaboradores (68) mostraram também que o processo de desativação do estado TICT não pode ser associado apenas com a torção entre os grupos, como no caso da transição $LE \rightarrow TICT$, mas também a uma flexão da molécula.

Figura 12 - Mecanismo de excitação e fluorescência da ThT (66).

Krebs e colaboradores (13) mostraram que na presença das fibrilas de amiloidose as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos de cada lado das folhas- β formam fileiras, na direção da folha- β e que o tamanho dessa fileira é compatível ao tamanho de uma molécula de ThT, portanto quando essa está nessas fileiras fica cercada pelas cadeias laterais, e isso gera uma restrição na rotação da molécula após a excitação do corante (67).

Morimoto K., e colaboradores (69) mostraram que as mudanças na intensidade da fluorescência da ThT poderiam ser utilizadas para monitorar a formação de fibrilas de colágeno.

Sen P., e colaboradores (70) mostraram que a ThT interage com a albumina, indicando que a ThT além de se ligar a estrutura de folha- β , também pode interagir com a estrutura α -hélice presente nas albuminas.

Griffin e colaboradores (14) mediram a emissão da ThT na presença do soro humano de 105 pacientes com risco cardiovascular. Os pacientes foram divididos em três grupos: 36 com artrite reumatóide e 34 com lúpus eritematoso sistêmico e 35 pacientes saudáveis. Em comparação entre as médias não foram obtidas diferenças estatísticas significativas, entretanto eles encontraram uma correlação negativa entre a emissão da ThT e a elasticidade das artérias e uma correlação com os valores de LDL-colesterol, colesterol total e proteína C-Reativa. Os autores mostraram que 94% do sinal da ThT na presença do soro estava associado as frações sem apoB, com maior associação a albumina.

3.7 Técnicas utilizadas

A caracterização das placas de aterosclerose pode ser obtida através de técnicas ópticas, como: fluorescência, microscopia de fluorescência e microscopia de fluorescência resolvida no tempo. Essas técnicas podem auxiliar no diagnóstico da doença como também ajudar no entendimento da sua progressão.

3.7.1 Fluorescência

De forma resumida, após um fóton de luz ser absorvido por uma molécula, um elétron é promovido do estado fundamental para um estado excitado. Em seguida, ocorre um relaxamento para o nível vibracional fundamental do estado excitado através da conversão interna, seguido pela emissão de luz devido ao retorno ao estado fundamental. Esse fenômeno descrito acima recebe o nome de fluorescência (71,72).

A análise da fluorescência apresenta vantagens em comparação a outras técnicas de espectroscopia, como por exemplo, alta sensibilidade às vizinhanças das moléculas. (71,72).

Entretanto, a fluorescência pode ter sua intensidade reduzida devido a interação da molécula emissora com outras moléculas do ambiente, ou devido a formação de dímeros, ocasionando uma modificação nos espectros de absorção e emissão (71,72).

A fluorescência pode ser medida através de um espectrofluorímetro, onde se obtém, um gráfico da intensidade de emissão *versus* comprimento de onda conhecido como espectro de emissão. Também pode ser obtido nesse equipamento o espectro de excitação fixando o comprimento de onda de emissão. Um espectrofluorímetro é composto por uma fonte de luz, um monocromador que separa o comprimento de onda de excitação, uma câmara da amostra, um monocromador que separa o comprimento de onda de emissão e uma fotomultiplicadora, e um computador onde são compilados os espectros.

A fluorescência também pode ser observada através de um microscópio de fluorescência, obtendo-se uma imagem formada a partir da emissão dos fluoróforos presentes na lâmina de microscopia ou a partir da emissão dos corantes fluorescentes utilizados para marcar alguma molécula presente na amostra. Um microscópio de fluorescência é composto por uma fonte de luz, um filtro de excitação, um espelho dicróico que direciona o comprimento de onda de excitação para amostra, uma objetiva que foca a luz na amostra, e também

coleta a luz emitida pela amostra, um filtro de emissão e um prisma que direciona a luz de emissão para a câmera e para ocular.

Vários componentes lipídicos são fluorescentes e podem também modular a emissão fluorescente das proteínas estruturais presentes nas artérias, como por exemplo as lipoproteínas, LDL, a VLDL e seus produtos oxidados, ésteres de colesterol como oleato e linoleato de colesterol, colesterol livre que acumula no núcleo necrótico da lesão e os lipopigmentos como ceróide e carotenóides (5).

3.7.2 Tempo de vida de fluorescência

O tempo que o elétron permanece no estado excitado é conhecido como tempo de vida de emissão. O estudo do tempo de vida é amplamente utilizado porque oferece informações sobre reações intermoleculares tais como: formação de dímeros, transferência de energia, distâncias moleculares (71). Esse valor depende do fluoróforo e do ambiente onde ele se encontra, o tempo de vida também ajuda a caracterizar qual o fluoróforo que está emitindo, já que muitas vezes apenas pelo espectro de emissão não é possível, pois vários fluoróforos emitem na mesma região.

O tempo de vida é obtido através da seguinte relação:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\sigma} \quad (2)$$

Onde, $I(t)$ é a intensidade no tempo t , σ é o tempo de vida de emissão e I_0 é a intensidade no tempo $t = 0$.

O método de medida do tempo de vida resolvido no tempo é feito através de um TCSPC (*time-correlated single photon counting*), contagem de fótons únicos correlacionados no tempo.

Esse método se inicia com o pulso de excitação, que excita a amostra e inicia a contagem do tempo. Cada pulso é opticamente monitorado, por um fotocatodo ou uma fotomultiplicadora, que produz um sinal inicial que é usado como um gatilho para a rampa de voltagem do TAC, esse último é um conversor

tempo-amplitude. Quando o primeiro fóton proveniente da amostra é detectado a rampa de voltagem é interrompida. O TAC fornece um sinal de saída que é proporcional ao tempo entre os sinais de partida e de interrupção. Um analisador multicanal converte essa voltagem para um canal de tempo através de um conversor analógico-digital. O analisador multicanal, somando sobre vários pulsos, constrói um histograma de contagens em função dos canais de tempo. Esse histograma representa o decaimento da intensidade da amostra (72,73).

A partir da reconvolução da função de resposta do instrumento (que é caracterizada por uma amostra com tempo de vida zero) com o decaimento obtido para a amostra é feito o ajuste da curva do decaimento (73).

Também é possível obter-se uma imagem a partir dos tempos de vida dos fluoróforos presentes nas amostras ou dos corantes utilizados para marcar alguma molécula, essa técnica é conhecida como FLIM (*Fluorescence lifetime imaging microscopy*), ou microscopia de imagem por tempo de vida de fluorescência. Essa técnica permite obter informações a respeito da microviscosidade do ambiente, pH, concentração iônica.

Um equipamento para obter uma imagem a partir dos tempos de vida é composto por um microscópio invertido, um feixe laser e componentes óticos. A amostra é excitada pelo laser através de uma objetiva, a emissão é coletada pela mesma objetiva e transmitida pelo espelho dicróico, a emissão é focalizada através de um grupo de lentes em um “pinhole”, o qual seleciona o plano da imagem e rejeita luz originada fora de foco. O feixe pode ser então direcionado para um detector ou ser dividido em dois feixes o que permite uma correlação cruzada entre dois detectores. A aquisição e análise é feita a partir de um software (73).

A análise da técnica de fluorescência resolvida no tempo tem sido amplamente estudada e é utilizada para melhorar a especificidade das medidas de fluorescência através do estudo dos tempos de vida de emissão e fornecer informações adicionais sobre as dinâmicas de fluorescência (74).

Como muitos fluoróforos apresentam espectros de absorção e emissão sobrepostos, as propriedades dos tempos de vida podem ser diferentes. O tempo de vida de emissão não depende da concentração do fluoróforo no meio e seu rendimento quântico, mas depende do ambiente molecular, como por exemplo, mudança de pH e concentração de pO_2 (74).

Os principais fluoróforos presentes nas artérias podem ser resumidos na Tabela 3.

Uma artéria saudável ou com lesões muito recentes apresentam uma camada íntima fina composta principalmente de uma camada de células endoteliais. A camada média é composta majoritariamente de elastina, que apresenta uma banda larga de emissão entre 360 e 600 nm com um pico em torno de 410 nm com um tempo de vida de 1,8 ns, quando excitado com 337 nm (5,75).

Uma placa fibrótica apresenta uma alta concentração de colágeno tipo I sob excitação de 337 nm apresenta uma banda de emissão entre 360 e 510 nm com um pico em 390 nm e tempo de vida médio entre 3-4 ns (5,75).

Placas inflamadas com núcleo necrótico é composta por colágeno tipo I, lipídios e colesterol. No núcleo necrótico está presente o ceróide, que é um lipopigmento, insolúvel em uma variedade de solventes lipídicos e apresenta afinidade com corantes para lipídios. Sob excitação no UV apresenta uma banda de emissão entre aproximadamente 360 nm até 600 nm, com pico em 450 nm (5,75).

As lipoproteínas VLDL e LDL apresentam um pico de fluorescência em 390 nm com um tempo de vida mais curto que o colágeno e a elastina. Os lipídios contidos nos macrófagos apresentam um pico de fluorescência em 450 nm e um tempo de vida em torno de 1,5 ns (5,75).

Tabela 3 – Principais características fluorescentes dos fluoróforos presentes nas placas de aterosclerose.

Fluoróforo	λ de excitação (nm)	λ de emissão (nm)	Tempo de vida (ns)
Elastina	337	360 – 600 Pico: 410	1,8
Colágeno Tipo I	337	360 – 510 Pico: 390	3 – 4 (75)
Ceroide (lipopigmentos)	Excitação UV	360 – 600 Pico: 450	~ 1,5 (75)
Lipídios	337	450	1,5 (75)
NADH	290, 351	440, 460	~0.5 (76)
FAD	450	535	~2,3 (76)
Porfirinas	400 – 450	630, 690	~17 (77)

3.7.3 Geração de segundo harmônico (SHG)

A geração de segundo harmônico é um processo elástico coerente que fornece informações a respeito da organização, concentração, densidade de algumas moléculas presentes na parede arterial como por exemplo o colágeno. O SHG só ocorre em materiais não isotrópicos, em interfaces e em cristais altamente organizados.

Em tecidos, algumas proteínas apresentam organização parecida com um cristal, como por exemplo, o colágeno, actina-miosina uma proteína motora das células musculares e tubulina, uma proteína de células do citoesqueleto (78) e cristais de colesterol (79).

O SHG é um processo elástico coerente onde dois fótons de excitação são combinados em um meio ótico não linear, para criar um fóton com um comprimento de onda igual a metade do comprimento de onda de excitação e com o dobro da energia (80), conforme indicado na Figura 13.

Figura 13 – Geração de segundo harmônico é um processo óptico não linear. Dois fótons (em vermelho na imagem) interagem com um meio não linear, são “combinados” para formar um novo fóton (em azul na imagem) com o dobro da energia e metade do comprimento de onda (80).

A intensidade da geração de segundo harmônico depende quadraticamente da intensidade da luz de excitação. O sinal é afetado pela polarização e comprimento de onda da excitação e também depende das propriedades do material, como a susceptibilidade não linear, da diferença de fase entre o SHG e a luz da excitação, da distribuição e orientação das fontes de SHG dentro do volume focal (80).

A intensidade do sinal de SHG gerado pelo colágeno é dependente da orientação do estado de polarização do laser de excitação com relação ao eixo da fibra. Para fibras que se encontram no plano perpendicular à direção de propagação do feixe laser, a quantidade de SHG produzido depende do ângulo entre o eixo da fibra e a polarização do laser. Se a luz for polarizada paralela ao longo do eixo da fibra, o sinal do SHG será observado com sua intensidade máxima, já se a polarização do laser estiver perpendicular ao eixo da fibra será observado um sinal fraco de SHG (80).

A intensidade do sinal SHG também depende do ângulo entre a fibra de colágeno e o plano da imagem. A intensidade do sinal é máxima quando a fibra de colágeno está no mesmo plano que a imagem e muito pequeno quando a fibra está perpendicular ao mesmo (80).

Já que o sinal de SHG gerado pelo colágeno e pelo colesterol não apresentam nenhuma diferença espectral, não sendo possível diferenciar os dois constituintes em uma imagem.

Cicchì, R. e colaboradores (81) fizeram um estudo mostrando que através da obtenção de dois sinais de SHG (*Forward-SHG signal* e *Backward SHG signal*) através de duas objetivas, é possível diferenciar o sinal do colesterol e do colágeno. A organização diferente dos emissores faz com que o padrão angular da radiação emitida seja diferente e pode ser considerada uma assinatura da orientação espacial dos emissores dentro do volume local (82).

A fibra de colágeno apresenta uma organização regular na parede de uma artéria normal, que consiste em feixes de fibras igualmente espaçados com uma orientação média perpendicular ao fluxo de sangue. Em um corte da fibra, o colágeno apresenta uma forma mais parecida com uma onda do que uma linha, essa conformação afeta as propriedades mecânicas e permite a dilatação fisiológica adequada e contração das artérias (81).

Já na placa de aterosclerose, o colágeno apresenta fibras desorganizadas com orientação que segue parcialmente o perfil de agregados lipídicos, em geral a orientação do colágeno na placa é mais aleatório do que no tecido normal (81).

4 Materiais e Métodos

Os materiais utilizados durante o experimento foram:

- 1- MOPs - ácido 3-(N- morfolino)-propanossulfônico
- 2- Cloridrato de Európio Hexahidratado
- 3- Cloridrato de Clorotetraciclina
- 4- Tioflavina T
- 5- Oil Red
- 6- Colesterol Total
- 7- Triglicerídeos
- 8- Colágeno Hidrolisado
- 9- Sulfato de Magnésio Heptahidratado

Todos os materiais utilizados apresentavam pureza analítica e foram obtidos da Sigma Aldrich, Stem Pharmaceutical e Elitech Clinal System.

4.1 Experimentação Animal

A experimentação animal foi dividida em duas etapas: Na primeira etapa 12 coelhos machos albinos (*Oryctolagus cuniculus*) da linhagem New Zealand, com os pesos aproximados de 2,5 Kg, apresentando idade média de 4 meses, foram divididos em dois grupos: um grupo controle (GC) com 3 animais e um grupo experimental (GE) com 9 animais, o esquema da divisão dos animais foi representado na Figura 14 . Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em estantes refrigeradas mantidas a 19 °C, a água e a ração eram *ad libitum*. A experimentação animal foi aprovada previamente pelo comitê de ética da UNIFESP, CEP Nº: 0327/2012.

A ração do grupo experimental a 1% de colesterol foi preparada em capela. Armazenou-se a ração comercial (Nuvital®) em uma caixa e regou-se com colesterol dissolvido em clorofórmio. Para cada 5 Kg de ração utilizou-se 50 g de colesterol dissolvidos em 200 mL de clorofórmio. Manteve-se a ração em capela por 48 hrs para total evaporação do clorofórmio. Na preparação da ração do grupo controle utilizou-se clorofórmio na mesma proporção que o grupo

experimental. A ração foi oferecida aos animais de maneira igual. A ração foi preparada a cada 15 dias.

A cada 20 dias dentro de 60 dias de experimento, coletou-se o sangue a partir da veia auricular de 4 animais (três do grupo experimental e um do grupo controle), em seguida fez-se a eutanásia desses animais através de sobredose de anestésico (associação de quetamina - 35 mg/kg e xilasina – 5 mg/kg) seguido de esxanguinação e depois fez-se a coleta dos arcos aórticos.

Acondicionou-se sangue coletado em dois tipos de tubo de coleta, um tubo de coleta para separação de plasma com EDTA e outro tubo de coleta para separação de soro (tubo com ativador de soro), mantidos em gelo até a centrifugação (1200 rpm, por 15 minutos).

As coletas foram feitas com 20, 40 e 60 dias. Os tecidos coletados foram divididos em duas partes, uma parte foi congelada em – 80 °C e a outra parte foi mantida em formol 10%. O tecido congelado foi utilizado para preparação das lâminas coradas com Oil Red e coradas com EuCTc, EuCTc + Sulfato de Magnésio Heptahidratado (EuCTMg), já os tecidos em formol foram utilizados para preparação das lâminas em HE.

Figura 14 – Divisão dos animais nos diferentes grupos experimentais e grupo controle ao longo do 1º experimento.

Para o segundo experimento, 12 animais foram novamente divididos em grupo controle e grupo experimental, com 6 animais em cada grupo, um esquema mostrando a divisão foi mostrado na Figura 15. O protocolo para

preparação da ração foi o mesmo que o do experimento anterior. As coletas de sangue foram feitas novamente a cada 20 dias (20 dias, 40 dias, 60 dias e 80 dias), mas dessa vez não foram feitas eutanásias ao longo do tempo, apenas no último dia de experimentação com 80 dias de dieta hipercolesterolêmica. A eutanásia foi realizada através de sobredose de anestésico (associação de quetamina - 35 mg/kg e xilasina – 5 mg/kg) seguido de cloreto de potássio intracardíaco. A experimentação animal foi aprovada previamente pelo comitê de ética da UNIFESP, CEP Nº: 0374/12.

O sangue coletado foi colocado em dois tipos de tubo de coleta, um tubo de coleta para separação de plasma com EDTA e outro tubo de coleta para separação de soro (tubo com gel separador de soro), os tubos foram mantidos em gelo até a centrifugação. Para o plasma utilizou-se 1200 rpm por 15 minutos e para o soro 3000 rpm por 15 minutos.

Figura 15 - Divisão dos animais entre o grupo controle e o grupo experimental ao longo do 2º experimento.

4.2 Biomarcadores

4.2.1 Complexo Európio-Clorotetraciclina

O complexo EuCTc foi preparado em solução tampão MOPs - ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico (pH ajustado para 6,9). Utilizou-se as seguintes concentrações molares de CTc: 21 $\mu\text{mol/L}$ e de Eu^{3+} : 21 $\mu\text{mol/L}$; 31,5 $\mu\text{mol/L}$; 42 $\mu\text{mol/L}$; 52,5 $\mu\text{mol/L}$; 63 $\mu\text{mol/L}$; 73,5 $\mu\text{mol/L}$.

Para a preparação do complexo EuCTcMg foram utilizadas as seguintes concentrações de Mg^{3+} : 0,375 mM; 0,75 mM e 1,5 mM. As soluções de magnésio foram preparadas em água bi-deionizada.

Os complexos foram armazenados em geladeira até sua utilização.

4.2.2 Tioflavina T

A Tioflavina T foi preparada com concentração de 8 μM em água bideionizada e armazenada em geladeira.

4.3 Fluoróforos

A solução de colágeno foi preparada com colágeno hidrolisado dissolvido em água milliQ com uma concentração de 1 g/L.

A solução de triglicerídeos (TGML-0515) e colesterol (CHSL-5710) foram obtidas da Elitech Clinal System.

4.4 Perfil Lipídico

As quantificações de colesterol total (CT), triglicerídeos (Tg), HDL e LDL foram feitas através de Kits comerciais da Labtest®, seguindo as instruções de procedimento de cada Kit, no laboratório do Prof Dr. Magnus Gidlund, sobre a supervisão e acompanhamento da Dra. Andrea Moreira Monteiro.

4.5 Técnicas utilizadas

4.5.1 Microscopia

4.5.1.1 Coloração com Oil Red

As imagens das lâminas coradas com Oil Red foram realizadas no laboratório da prof. Dra. Silvia Ihara, patologista da Unifesp. As imagens foram

obtidas em um microscópio Olympus BX 40 acoplado a uma vídeo-câmera digital QColor 3 – Olympus e utilizou-se um software de morfometria publicamente disponível pelo site do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Texas – UTHSCSA (Image Tool).

4.5.1.2 Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)

As imagens das lâminas coradas com HE foram realizadas no laboratório do prof. Dr. José Vassallo na UNICAMP, com ajuda do aluno de doutorado Rodrigo de Andrade Natal, sendo obtidas em um microscópio Nikon Eclipse E6000 acoplado a uma vídeo-câmera digital Moticam 5.0 MP, para as análises utilizou-se o software ImageJ.

4.5.1.3 Coloração com o complexo EuCTc e EuCTcMg

As lâminas para coloração com o complexo EuCTc e EuCTcMg foram preparadas a partir do tecido congelado, após o tecido ser fixado com formol nas lâminas, foi adicionado em cima de cada corte 1 mL de EuCTc, esperou-se um tempo de 15 minutos e foi retirado o excesso. Em seguida, a lâmina foi montada com a lamínula de vidro por cima. O mesmo procedimento foi realizado para as lâminas coradas com EuCTcMg.

4.5.1.4 Microscopia de fluorescência

As imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas em um microscópio invertido da Leica DMI600 CS, com câmera digital DFC450 e câmera branco e preta DFC360FX e software Leica AF6000, utilizou-se um filtro D com excitação entre 355 – 425 nm e emissão a partir de 470 nm e espelho dicróico 455 nm tanto para as lâminas coradas com EuCTc e EuCTcMg, quanto para as lâminas de autofluorescência. Durante obtenção das imagens utilizou-se as objetivas de 20x.

4.5.1.5 Microscopia de tempo de vida (FLIM)

Os experimentos de tempo de vida de emissão foram realizados em dois equipamentos.

O primeiro experimento foi realizado na Universidade de São Paulo no laboratório do prof. Dr. Amando Suito Ito pela Dra. Marina Berardi Barioni com o equipamento *MicroTime 200* da PicoQuant. O microscópio é um microscópio invertido (Olympus IX-71) com objetiva de imersão em água UPlanSApo 60x. A excitação é feita através de um laser de diodo em 440 nm direcionado por um espelho dicróico (z440bcm AHF/Chroma) em direção à objetiva. A emissão é obtida a partir de 460 nm. A área da imagem é de 80 x 80 μm^2 .

O segundo experimento foi realizado no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) na UNICAMP, com a ajuda do aluno de doutorado Rodrigo de Andrade Natal. Utilizou-se um confocal Zeiss LSM 780-NLO equipado com um sistema FLIM - Becker-Hickl TCSPC, com uma objetiva de 40x/1,3 NA em óleo de imersão. As imagens foram coletadas utilizando para excitação um laser de diodo em 405 nm (BDL-405-SMC, Becker&Hickl) com duração de pulso de 65 ps e 80 MHz de taxa de repetição, a emissão foi obtida a partir de 415 nm, com formato de 177 x 177 μm (256 x 256 pixels), as lâminas foram excitadas por 120 s a taxa de aproximadamente 1×10^5 ph/s. A detecção foi feita com um detector Becker Hickl, PMH-100. A taxa de contagem de fótons não mudou durante a aquisição, garantindo que não ocorressem problemas de “photobleaching”. As imagens foram analisadas pelo software SPCImage5.0. Os tempos de vida médios foram obtidos a partir dos histogramas das distribuições de tempo nas imagens.

4.5.1.6 Geração de Segundo Harmônico

As imagens dos sinais de SHG gerados pelo colágeno das artérias foram realizadas a partir das lâminas coradas com HE. As imagens foram obtidas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) na UNICAMP, com a ajuda do aluno de doutorado Rodrigo de Andrade Natal. A microscopia do SHG foi feita em um sistema confocal Zeiss LSM 780-NLO (Carl Zeiss AG, Göttingen, Alemanha) usando uma objetiva 40x/1,3 óleo de imersão EC Plan-Neofluar. A excitação foi obtida através de um laser Tsunami Ti:Safira (Spectra-Physics, Irvine, CA, EUA) com comprimento de

onda de 780 nm, com largura temporal de aproximadamente de 100 fs e taxa de repetição de 80 MHz.

Apenas o sinal SHG *forward* em 390 nm foi coletado, através de uma lente 0,55 NA-WD 26 mm. Um filtro passa-baixa SP690 (Omega Filters, Brattleboro, VT, EUA) foi utilizado para filtrar o comprimento de onda de excitação, seguido de um filtro cúbico passa alta LP490 a 45° para evitar a fluorescência por absorção de dois fótons e um filtro SP430 a 90° para filtrar apenas o sinal do SHG. De cada imagem foi retirado um sinal de fundo, obtido pela análise de uma região sem sinal de SHG.

4.5.2 Fluorescência, Absorção e tempo de vida de emissão

As medidas de fluorescência do complexo EuCTc + VLDL, EuCTc + Plasma e ThT + Plasma foram obtidas em um fluorímetro Fluorolog 3 da Horiba Jovin Yvon e os espectros obtidos pelo software FluorEssence. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 400 nm e o intervalo de medição foi de 420 nm até 750 nm. As medidas foram feitas em cubeta de vidro com quatro faces polidas com 1 mm de caminho ótico em temperatura ambiente.

As medidas de absorção foram obtidas em um espectrofotômetro da Varian Cary 5000. As medidas foram feitas em cubeta de quartzo com quatro faces polidas com caminho ótico de 10 mm em temperatura ambiente. A absorção da Tioflavina T foi realizada no leitor de microplacas da marca Molecular Devices, modelo Spectra Max M4.

Os espectros de absorção do complexo EuCTc na presença dos fluoróforos foram feitos em um espectrofotômetro Shimadzu MultiSpec-150 em uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho ótico. Os espectros de fluorescência foram obtidos em um fluorímetro RF-5301 – Shimadzu Scientific Instruments. As medidas foram feitas com excitação em 400 nm e a emissão de 415 – 780 nm, utilizando uma cubeta de 1 mm de caminho ótico.

As medidas de tempo de vida de emissão do complexo EuCTc e dos fluoróforos foram obtidas com um sistema equipado com um laser de diodo

pulsado ($\lambda_{exc} = 403 \text{ nm}$) e um driver (PDL 800-B) da PicoQuant, com taxa de repetição de 8 MHz. A potência média foi de 0.1 mW. A detecção foi feita por uma fotomultiplicadora (Hamamatsu PMA 182 – PM) e um filtro passa-alta colorido RG495 e um filtro refletor ND (ND30A). As curvas foram processadas pelo PicoQuant PicoHarp 300 e depois analisadas pelo software OriginLab8.5. As curvas de decaimento foram ajustadas através do software Origin 8.5 e o melhor ajuste foi obtido através da análise do R^2 . Os tempos de vida médios foram calculados através da equação 1:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i A_i \tau_i}{\sum_i A_i}$$

onde τ_i e A_i são o tempo de vida e fator pré-exponencial do i-ésimo componente.

4.6 Análise Estatística

Todos os resultados da tese foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão.

A comparação entre o GC e GE para o perfil lipídico foi feita através do teste não paramétrico Mann Whitney com $p < 0,05$.

A comparação entre os grupos GC e GE para as análises dos biomarcadores na presença do plasma, tanto para o EuCTc, quanto para a ThT foi feita através do teste não paramétrico Mann Whitney com $p < 0,05$.

A comparação entre os tempos de vida dos fluoróforos na análise de FLIM foi feita através o teste paramétrico one-way-anova com $p < 0,05$.

As comparações entre os valores obtidos para análise do SHG tanto para organização densidade e quantidade foram feitas através do teste não paramétrico kruskal-wallis seguido do teste Dunns com $p < 0,05$.

5 Resultados e discussão

5.1 Perfil lipídico

5.1.1 Análise do plasma dos animais do primeiro experimento

O perfil lipídico dos animais do primeiro experimento com coelhos mostrado conforme esquema da Figura 14 foi obtido a partir das quantificações realizadas com Kits comerciais (Labtest®) da maneira indicada pelo fabricante.

A Figura 16 mostra o perfil lipídico dos animais, tanto para o grupo controle, quanto para o grupo experimental.

Figura 16 - Perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos) dos animais submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica ao longo do tempo de dieta (20, 40 e 60 dias).

Analisando os resultados da Figura 16 observa-se um aumento do colesterol total, dos triglicerídeos e LDL, comparando-se o grupo experimental

com o grupo controle. Já não foi observada uma grande variação nos valores para a HDL.

Através do perfil lipídico foi possível concluir que o protocolo seguido para aumentar os valores do colesterol dos animais foi bem-sucedido. Esses animais foram eutanasiados ao longo do tempo e as artérias excisadas foram armazenadas para experimentos futuros.

Verificou-se que não foi possível se obter LDL do sangue dos coelhos por método de ultracentrifugação nesse experimento. Devido ao tamanho dos tubos utilizados no rotor da ultracentrífuga disponível seria necessária uma quantidade de sangue maior do que a que foi obtida. Entretanto foi possível separar a VLDL. Para a separação da VLDL, amostras dos animais de um mesmo grupo foram misturadas obtendo assim um *pool*.

Como não foi possível obter a concentração direta de VLDL presente nas amostras, optou-se por calcular a concentração de triglicérides presentes nas amostras de VLDL, já que os triglicerídeos são transportados em sua maioria pelas partículas de VLDL.

As concentrações de VLDL triglicerídeos presentes nas amostras de VLDL foram obtidas através de Kit enzimático (83).

Primeiro, diluiu-se uma amostra do grupo experimental 60 dias para estudar a resposta do complexo EuCTc na presença de diferentes concentrações de VLDL-TG. A Tabela 4 mostra as diluições feitas com a VLDL e a concentração de triglicerídeos presentes em cada diluição.

Tabela 4 - Diluições feitas a partir da amostra de VLDL do grupo 60 dias e concentração de triglicerídeos presentes as amostras. Para cada valor foi estimado um erro de 20%.

Amostra	Diluição	Concentração de triglicerídeos presentes (mg/dL)
VLDL I	100 µL de VLDL + 500 µL de Água	72 ± 14
VLDL II	200 µL de VLDL + 400 µL de Água	149 ± 30
VLDL III	300 µL de VLDL + 300 µL de Água	203 ± 41
VLDL IV	400 µL de VLDL + 200 µL de Água	306 ± 61
VLDL V	500 µL de VLDL + 100 µL de Água	347 ± 69
VLDL VI	600 µL de VLDL	473 ± 95

Mediu-se o espectro de absorção do complexo EuCTc sozinho e na presença da VLDL conforme mostrado na Figura 17.

Observa-se os espectros de absorção do complexo EuCTc sozinho e na presença da VLDL são semelhantes, sem a presença de deslocamento no pico de absorção e nota-se um espalhamento de luz devido provavelmente a presença das partículas de VLDL.

Figura 17 - Espectro de absorção do complexo EuCTc na presença da VLDL diluída.

A partir do espectro de absorção obteve-se o espectro de emissão do complexo na presença das diferentes diluições da VLDL, excitando as amostras em 400 nm. A leitura foi realizada no intervalo entre 430 e 750 nm.

A Figura 18 mostra o espectro de emissão do EuCTc na presença de diferentes concentrações de VLDL. A Figura 19 mostra a curva de calibração da emissão do EuCTc na presença de diferentes concentrações de VLDL, obtida a partir do ajuste da curva obtida da intensidade do sinal de emissão em $\lambda = 617$ nm em função da concentração de triglicerídeos.

Figura 18 - Espectro de emissão do complexo EuCTc na presença de diferentes concentrações de VLDL.

Figura 19 - Área Integrada do espectro de emissão do EuCTc na presença da VLDL estimada para a amostra do grupo 60 dias.

Para estudar o comportamento do complexo EuCTc na presença das amostras de VLDL de cada grupo experimental, primeiro calculou-se a concentração de VLDL-TG presente em cada amostra, a Tabela 5 mostra os

valores obtidos. Notou-se um valor muito acima dos demais para o grupo experimental 20 dias, isso pode ter ocorrido devido a algum erro experimental durante a medição de triglicerídeos presentes, portanto o grupo 20 dias foi excluído desse experimento.

Tabela 5 - Quantificação de triglicerídeos presentes nas amostras de VLDL de cada grupo. Para cada valor foi estimado um erro de 20%.

Amostra	Concentração de triglicerídeos (mg/dL)
VLDL Controle	58 ± 12
VLDL 40 Dias	428 ± 86
VLDL 60 Dias	473 ± 95

A Figura 20 mostra o sinal de emissão do complexo EuCTc na presença da VLDL dos diferentes grupos (cada amostra foi medida em triplicada, e foi apresentado o espectro médio). A Figura 21 mostra a intensidade máxima do sinal de emissão do európio no complexo EuCTc no intervalo de 550 – 720 nm.

A Figura 20 e Figura 21 mostra um aumento na emissão do európio no complexo com o aumento do tempo de dieta das amostras de VLDL.

Figura 20 - Emissão do complexo EuCTc na presença da VLDL de diferentes tempos de dieta (40 Dias e 60 Dias e Controle).

Figura 21 – Intensidade da emissão do Európio no complexo EuCTc na presença da VLDL de diferentes grupos.

A partir dos valores obtidos na Figura 21 e utilizando a curva de calibração mostrada na Figura 19 calculou-se a concentração de VLDL-TG presente nas

amostras dos diferentes grupos, em seguida comparou-se esses valores com os obtidos por Kit comercial, a comparação foi mostrada na Figura 22.

Figura 22 – Comparação entre os valores para concentração de VLDL-TG obtidos através da emissão do complexo EuCTc (em preto) e através do Kit comercial (em vermelho).

Observa-se que para o grupo controle e para o grupo experimental 60 dias os valores obtidos através do complexo EuCTc encontram-se próximos aos valores obtidos pelo kit comercial. Apesar da diferença encontrada para o grupo 40 dias, pode se dizer que os valores obtidos através do complexo EuCTc ficaram próximos ao esperado.

5.2 Biomarcadores na presença do Plasma

5.2.1 Análise do plasma dos animais do segundo experimento

O perfil lipídico dos animais do segundo experimento conforme esquema mostrado na Figura 15, foi obtido através das quantificações com Kits comerciais. Os valores encontrados para os grupos controle e experimental são mostrados na Figura 23.

Figura 23 - Perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos) dos animais submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica ao longo do tempo de dieta. Comparação entre os GC e GE foram feitas pelo teste não paramétrico Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Para comparar os grupos controles com os grupos experimentais realizou-se o teste estatístico Mann-Whitney, uma vez que o número de amostras era pequeno em alguns grupos. Para os valores obtidos para colesterol total, LDL e triglicerídeos foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$. Para os valores obtidos para quantificação do HDL, somente o grupo 20 dias apresentou diferença estatística significativa.

Verifica-se que os valores de colesterol total e triglicerídeos para o grupo experimental 20 dias encontram-se muito elevados devido ao início da ingestão

da dieta hipercolesterolêmica, que levou a possíveis erros experimentais com o plasma desse grupo e também se observou que com 20 dias de dieta não ocorreu à formação da placa de aterosclerose. Por isso os dados referentes a este grupo não foram considerados nas análises futuras dos biossensores na presença do plasma dos animais.

5.2.2 Complexo EuCTc

Primeiro se mediu a absorção óptica do complexo EuCTc sozinho e na presença do plasma de um animal do GE – 60 dias, conforme mostrado na Figura 24. Para o complexo EuCTc sozinho observou-se a banda característica do complexo em 400 nm, e na presença do plasma do GE – 60 dias não foi observado nenhum deslocamento na banda de absorção.

Figura 24 – Absorção óptica do complexo EuCTc sozinho (vermelho) e do complexo EuCTc + plasma do coelho do GE – 60 Dias (preto).

Em seguida, obteve-se a emissão do complexo EuCTc na presença do plasma sanguíneo de cada animal. Para isso, utilizou-se 1 mL de EuCTc e 20 µL de plasma e cada medida foi realizada em duplicata em uma cubeta com 1 mm de caminho óptico.

A Figura 25 mostra o espectro de emissão do complexo EuCTc na presença do plasma. Cada amostra foi medida em duplicata e foi feita a média dos espectros de cada grupo experimental e controle. Analisando o espectro de emissão nota-se além das bandas de emissão características do európio, uma banda larga centrada em 513 nm, provavelmente referente a emissão da clorotetraciclina.

Figura 25 - Emissão do complexo EuCTc na presença do plasma dos coelhos dos diferentes grupos.

Em seguida, se calculou as áreas integradas no intervalo de 585 -714 nm para cada espectro obtido e fez a média dos valores de cada animal. A Figura 26 (A) mostra os valores obtidos para cada grupo controle em relação ao seu grupo experimental e a Figura 26 (B) mostra a diferença em porcentagem entre os grupos controles e grupos experimentais.

Figura 26 – (A) - Área integrada do pico do Európio no complexo EuCTc na presença dos plasmas de cada grupo. A comparação entre os grupos foi feita através do teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney com $p < 0,05$, foram encontradas diferenças entre os grupos controle e experimental para 60 dias de dieta ($p = 0,0177$) e 80 dias de dieta ($p = 0,043$). (B) – Diferença em porcentagem entre os GC e GE para cada período de dieta.

Analisando a Figura 26 (A) observa-se para todos os grupos uma tendência de aumento da emissão do európio, entretanto só foi obtida diferença estatística entre o grupo controle e o grupo experimental para 60 dias ($p = 0,0177$) e 80 dias ($p = 0,043$). Já a Figura 26 (B) mostrou que a diferença em porcentagem entre os grupos controles e experimentais aumentam entre os diferentes períodos analisados, para o grupo 40 dias a diferença foi de ~ 21%, para o grupo 60 dias foi de ~ 29 % e para o grupo 80 dias a diferença foi de ~ 37%.

Esperava-se uma diferença maior entre o grupo controle e o grupo experimental, entretanto como o as amostras do grupo experimental ficam turvas por conta da alta concentração de colesterol e triglicerídeos, acredita-se que o alto espalhamento de luz possa interferir no sinal de emissão do complexo, diminuindo assim a diferença entre os grupos.

5.2.3 Tioflavina T

A emissão e a absorção do corante ThT na presença do plasma dos animais foram estudadas.

Figura 27 - Média do espectro de absorção da ThT na presença do plasma do grupo controle e do grupo experimental. Medida realizada em um leitor de microplacas medido em triplicata.

A Figura 27 mostra a média dos espectros de absorção na presença do plasma para os grupos controles e os grupos experimentais. Os espectros obtidos para os grupos experimentais apresentaram um alto espalhamento de luz.

A subtração do espalhamento de luz foi feita de acordo com (84,85) e mostrado na Figura 28. A curva em vermelho na Figura 28 apresenta a seguinte forma: $D(esp) = a\lambda^{-n}$. Primeiro obteve-se o espectro $\log(D)$ vs $\log(\lambda)$, depois selecionou-se uma região do espectro sem absorção e traçou-se uma reta, que foi extrapolada para todo o restante do espectro $\log(D)=f(\log(\lambda))$, por fim a curva em vermelho foi subtraída do espectro da ThT + EG plasma e comparada com o espectro de absorção da ThT + GC e da ThT sozinha. Para cada espectro a subtração do espalhamento foi realizado individualmente e depois obtido o espectro médio de cada grupo.

Figura 28 –Subtração do espalhamento de luz dos espectros de absorção da ThT na presença do plasma do GE.

De acordo com este método, após a subtração do espalhamento, e fazendo o espectro de subtração da ThT + fibrilas menos ThT sozinha, deveria ser observada uma banda de absorção na região de 450 nm. Esta banda está relacionada à incorporação das fibrilas com a tioflavina (85).

Apesar da subtração do espalhamento de luz dos espectros da ThT + EG não foi possível observar essa banda de absorção em 450 nm. Acredita-se que isso se deva ao fato de que no nosso caso as apolipoproteínas não formam fibrilas semelhantes as fibrilas de amiloidose.

Desta forma a análise da emissão da ThT na presença do plasma dos animais foi obtida utilizando o comprimento de onda de excitação em 413 nm e esses resultados são apresentados na Figura 29.

Figura 29 - Espectro de emissão do corante ThT na presença do plasma dos diferentes grupos.

A Figura 29 mostra o espectro de emissão do corante na presença dos plasmas dos diferentes grupos. Novamente, fez-se a média dos grupos controles para representar o grupo controle e a média dos animais dos grupos experimentais. Cada amostra foi lida em duplicata.

Analisando os grupos experimentais observa-se no início do espectro um alto espalhamento, esse comportamento foi observado para todas amostras do grupo experimental. Para o grupo controle esse comportamento não foi observado. Uma hipótese para isto, é que a presença das apolipoproteínas diminua a intensidade de absorção da tioflavina facilitando o espalhamento de luz.

Para comparar os diferentes grupos com seu grupo controle, fez-se a área integrada dos espectros. Para retirar a influência do espalhamento observado no início do espectro do grupo experimental selecionou-se o intervalo de 437 nm até 600 nm. Os valores obtidos encontram-se na Figura 30.

Figura 30 – (A) Área Integrada do espectro de emissão da ThT na presença do plasma dos diferentes grupos. A comparação entre os grupos foi feita através do teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney com $p < 0,05$, foram encontradas diferenças entre os grupos controle e experimental para 40 dias de dieta ($p = 0,0357$), 60 dias de dieta ($p = 0,0159$) e para 80 dias de dieta ($p = 0,0079$). (B) Diferença em porcentagem entre os GC e GE para cada período de dieta.

A comparação entre os grupos controles e grupos experimentais foram obtidos a partir do teste não paramétrico Mann-Whitney para $p < 0,05$. Foram obtidas diferenças estatísticas significantes para todos os grupos. Para o grupo 40 dias o valor de p foi de 0,0357, para o grupo 60 dias de 0,0159 e para o grupo 80 dias de 0,0079.

Analizando a diferença em porcentagem entre os grupos controles e experimentais para cada período de dieta (Figura 30 – (B)) mostra uma diferença em porcentagem crescente com o aumento do tempo de dieta, sendo de ~ 34% para o grupo 40 dias e de 54% para o grupo 60 dias, e para o grupo 80 dias a diferença encontrada foi de ~60%.

5.3 Análises microscópicas

5.3.1 Coloração com HE

Na Figura 31, observa-se a imagem histológica de arcos aórticos corados com HE de um animal de cada grupo de 20 a 60 dias de dieta.

GC

GE – 20 Dias

GE – 40 Dias

GE – 60 Dias

GE – 80 Dias

Figura 31 – Imagens de microscopia de lâminas de arco aórtico coradas com HE com diferentes tempos de dieta. As imagens dos grupos GE – 20 Dias e GE – 40 Dias foram obtidas com aumento de 20x, as imagens do GE – 60 Dias, GE – 80 Dias e GC. SMC – Células do tecido muscular liso. Aumento de 10x.

Nas imagens da Figura 31 observa-se que com 20 dias de dieta há presença de poucas células espumosas. Com aproximadamente 3 semanas de dieta, se observam alguns monócitos-macrófagos infiltrados na artéria (86). Com 40 dias é possível observar um espessamento da parede da camada íntima, e

com 60 dias de dieta, observa-se uma placa instaurada com presença de macrófagos e células espumosas. Com 80 dias de dieta se observa a infiltração de células do tecido muscular liso e uma placa bem espessa.

A concentração de colesterol e o tempo de dieta utilizados foram eficazes para obtenção de lesões ateroscleróticas. Coelhos alimentados com concentrações de colesterol entre 0,5 a 4 % apresentam uma rápida indução de placas ateroscleróticas (32).

Os animais não apresentaram lesões avançadas, isso pode ter acontecido devido à idade dos animais em torno de 4 meses. Lesões mais avançadas são obtidas em animais com idade entorno de 3 – 4,5 anos (32).

5.3.2 Coloração com Oil Red

A Figura 32 mostra as imagens obtidas das artérias coradas com Oil Red. É possível se observar a formação da placa ao longo do tempo da dieta. Nos animais do GE observa-se um espessamento da artéria e o acúmulo de lipídios caracterizado pela coloração avermelhada do Oil Red.

Figura 32- Imagens de microscopia das lâminas de arco aórtico coradas com Oil Red em diferentes tempos de dieta (20 dias, 40 dias e 60 dias).

5.3.3 Coloração com EuCTc, EuCTcMg

A utilização do complexo EuCTc como marcador da formação da placa de aterosclerose, foi estudada a partir da melhor concentração do complexo na presença da placa de aterosclerose. Para tanto, um animal do grupo 60 dias foi selecionado e foram obtidos cortes corados com diferentes razões molares do complexo EuCTc. As imagens (Figura 33) foram obtidas utilizando o Filtro D (exc: 355 – 425 nm e emissão superior a 470 nm) com câmera branco e preta e a cor (vermelha) foi definida pelo software. O brilho e contraste das imagens foram ajustados através do software ImageJ.

Para analisar qual a melhor razão molar de európio no complexo para marcação da placa de aterosclerose analisou-se os valores médios de escala de

cinza de um ROI (região de interesse) selecionado de mesmo tamanho em cada imagem. Sabe-se que os valores de escala de cinza são proporcionais a intensidade de fluorescência que chega na CCD.

A Figura 34 mostra a distribuição de tons de cinza de um ROI selecionado na placa de aterosclerose nas diferentes imagens coradas com EuCTc, o deslocamento para maiores valores para os tons de cinza indica uma maior intensidade de fluorescência.

Sem corar

1,0 Eu: 1,0 CTc

1,5 Eu: 1,0 CTc

2,0 Eu: 1,0 CTc

2,5 Eu: 1,0 CTc

3,0 Eu: 1,0 CTc

3,5 Eu: 1,0 CTc

Figura 33 – Análise de microscopia de fluorescência da artéria de um animal do GE– 60 Dias, sem corar e coradas com EuCTc com diferentes razões molares. Magnificação de 20x, o traço em preto equivale a 200 μm.

Figura 34 – Histograma da distribuição de valores da escala de cinza de um ROI selecionado nas imagens coradas com diferentes razões molares de EuCTc.

Analizando tanto as imagens ajustadas, quanto os histogramas de escala de cinza, observa-se que a melhor razão molar do complexo para visualização da placa de aterosclerose é 1,5 Eu: 1,0 CTc.

A formação da placa de aterosclerose é caracterizada pelo acúmulo de lipoproteínas na camada íntima da artéria (87). Em um estudo anterior do grupo observou-se que a melhor razão molar do complexo EuCTc para a análise das lipoproteínas é 1,5 Eu : 1,0 CTc (56). Portanto o resultado obtido nas lâminas está de acordo com os resultados anteriores do grupo.

Nesse mesmo estudo do grupo, observou-se a emissão do európio no EuCTc apresentava um aumento na presença da LDL oxidada quando o complexo estava conjugado com um íon inorgânico como magnésio, por exemplo, do que sem a presença do íon inorgânico (63).

Portanto, estudou-se a emissão do európio no complexo EuCTc na presença do íon inorgânico nas lâminas com placa de aterosclerose, para verificar uma possível influência na visualização da placa.

Para este estudo três concentrações de magnésio foram utilizadas, 0,375 mM, 0,75 mM e 1,5 mM (63). A Figura 35 mostra as imagens obtidas no estudo e a Figura 36 os histogramas com a distribuição da escala de cinza.

A- EuCTc

B- EuCTc + 0,375 mM Mg⁺³

C- EuCTc + 0,75 mM Mg⁺³

D- EuCTc + 1,5 mM Mg⁺³

Figura 35 - Análise de microscopia de fluorescência da artéria de um animal do GE – 60 Dias coradas com EuCTc com e sem o íon inorgânico Mg⁺³ e com o EuCTcMg com 0,375 mM, 0,75 mM e 1,5 mM de Mg⁺³. Magnificação de 20x, o traço em preto equivale a 200 μm.

Figura 36- Histograma dos valores de tons de cinza nas imagens de microscopia de fluorescência coradas EuCTc com e sem o íon Mg^{+3} e com diferentes concentrações de Mg^{+3} .

Comparando os valores de fluorescência relativa da imagem corada com EuCTc (Figura 35 –A) e as imagens coradas com EuCTcMg (Figura 35 – B,C,D) nota-se que na presença do íon interferente a emissão do európio é aumentada.

Na Figura 35 também se comparou diferentes concentrações de Mg^{+3} , e verifica-se que o complexo EuCTc com a concentração de 0,75 mM de Mg^{+3} (Figura 35-B) teve uma emissão aumentada quando comparada com as outras concentrações de Mg^{+3} utilizadas.

Portanto nas etapas seguintes utilizou-se sempre o complexo EuCTc na razão molar de 1,5:1 e na presença do íon inorgânico Mg^{+3} na concentração de 0,75 mM.

As emissões dos complexos EuCTc, EuCTcMg e autofluorescência foram comparadas em lâminas de um animal do grupo controle e um animal do grupo experimental 60 dias. Nesse estudo, utilizou-se a câmera colorida para fazer a comparação entre as imagens diretamente.

A-Não corada

B-EuCTcMg

C-EuCTc

Figura 37 - Análise de microscopia de fluorescência da artéria de um animal do GC coradas com EuCTc, EuCTcMg e não corada. Magnificação de 20x.

A- Não corada

B- EuCTcMg

C- EuCTc

Figura 38 - Análise de microscopia de fluorescência da artéria de um animal do GE – 60 Dias coradas com EuCTc, EuCTcMg e não corada. Magnificação de 20x.

A Figura 37 mostra as imagens obtidas para o grupo controle. Nota-se que, a emissão do complexo EuCTcMg novamente é maior quando comparada com o EuCTc e com a autofluorescência. Na Figura 37-B e na Figura 37-C a emissão do verde (autofluorescência) é mais intensa que a emissão do vermelho (európio).

A Figura 38 mostra as imagens obtidas para um animal do GE-60 Dias coradas com EuCTc, EuCTcMg e não corada. Na Figura 38–A, observa-se a autofluorescência da artéria não corada e com a placa de aterosclerose, apresentando uma emissão muito fraca, não sendo possível uma boa visualização do tamanho da placa. Nas imagens da Figura 38–B e C, onde as artérias foram coradas com EuCTcMg e EuCTc, respectivamente, é possível visualizar a placa de aterosclerose, bem como delimitar sua extensão. Novamente observa-se que na região da placa de aterosclerose a emissão do

europio na presença do íon inorgânico é maior. Observa-se também que a emissão no vermelho é mais intensa no grupo experimental do que no grupo controle.

As regiões com placas de aterosclerose apresentam pontos com fluorescência vermelha mais intensa. Para a caracterização desta fluorescência, foram obtidas imagens para um animal do grupo controle e um animal do GE – 60 Dias, utilizando uma objetiva maior. As imagens obtidas para o animal do GE foram mostradas na Figura 39 e para o animal do GC na Figura 40.

B- Não corada

C- EuCTcMg

C- EuCTc

Figura 39 - Análise de microscopia de fluorescência da artéria de um animal do GE – 60 Dias coradas com EuCTc, EuCTcMg e não corada. Magnificação de 100x.

C- Não corada

D- EuCTcMg

C- EuCTc

Figura 40 - Análise de microscopia de fluorescência da artéria de um animal do GC coradas com EuCTc, EuCTcMg e não corada. Magnificação de 100x.

Na Figura 39 observa-se na lâmina não corada uma emissão fraca na região do verde, sem nenhuma região em destaque. Já para a lâmina corada com EuCTcMg se observa regiões com aspecto arredondado com emissão mais intensa na região do vermelho. Essas regiões com vermelho mais intenso também são observadas na lâmina corada com EuCTc, entretanto com uma intensidade menor, quando comparada com a lâmina corada com EuCTcMg.

Trabalhos na literatura mostraram que o antibiótico tetraciclina se acumula próximo, mas não dentro dos cristais de colesterol em uma região com placa de aterosclerose e que a tetraciclina se liga seletivamente a placa de aterosclerose (47,49,88).

Portanto, pode-se dizer que o complexo EuCTc possui uma maior afinidade com as regiões com células espumosas que são ricas em colesterol. Essas regiões apresentam uma maior intensidade de emissão do complexo EuCTc. Essa afinidade provavelmente é aumentada na presença do íon Mg, levando assim a uma emissão mais intensa do complexo.

Já na Figura 40 se observa a emissão mais intensa dos fluoróforos presentes nas artérias do que do complexo EuCTc ou EuCTcMg, o que indica uma maior seletividade do complexo de apresentar uma maior emissão na presença da placa de aterosclerose.

Portanto baseado nas imagens apresentadas nesse capítulo, pode-se dizer que os complexos EuCTc e EuCTcMg auxiliam na análise da placa de aterosclerose e que possuem afinidade com as regiões com presença de células espumosas.

5.4 Análise de microscopia de tempo de vida de fluorescência

5.4.1 Análise da microscopia de tempo de vida de emissão dos fluoróforos (FLIM) presentes nas artérias

Estudou-se o tempo de vida de emissão dos fluoróforos presentes nas artérias com diferentes tempos de dieta.

A literatura mostra diferenças nos tempos de vida de emissão dos fluoróforos presentes nas artérias quando se utiliza excitação na região do ultravioleta (337 nm) (5,74,89,90). Sob a excitação de 337 nm, os picos de emissão se encontram em 290 nm para o triptofano, 390 nm para o colágeno, 410 nm para a elastina, 470 nm para o NADH, 520 nm para o beta-caroteno, e 540 nm para melanina (91).

Marcu, L. e colaboradores (5,92) mostram que as proteínas estruturais como elastina e colágeno tipo I e tipo II são os principais fluoróforos presentes nas artérias normais e com aterosclerose. A elastina apresenta uma banda de emissão em 400 nm com FWHM (largura a meia altura) de 70 nm e tempo de vida de emissão em torno de 2 ns. A elastina está presente nas camadas médias

e na lamina elástica interna e domina a fluorescência nas artérias normais e placas recentes, enquanto que o colágeno tipo I com pico de emissão em 385 nm com FWHM de 40 nm e tempo de vida de emissão em torno de 3-4 ns é o principal fluoróforo em placa fibrosa.

No presente estudo, analisou-se o tempo de vida de emissão dos fluoróforos presentes nas artérias, mas em outro comprimento de onda de excitação diferente da literatura em 440 nm.

As lâminas foram preparadas e fixadas em formol sem a adição de nenhum corante. As imagens foram obtidas utilizando filtro descrito anteriormente, com excitação em 440 nm e emissão acima de 460 nm. Nesse experimento foram feitas lâminas com 4 tempos diferentes de dieta: 20, 40, 60 e 80 dias. Foi preparada uma lamina por animal e de cada lâmina foram obtidas pelo menos 4 imagens de diferentes regiões da artéria.

Para ser mostrado aqui, selecionou-se uma imagem de cada lâmina, mas para as análises estatísticas todas as imagens com placa visível de aterosclerose para os grupos experimentais e todas as imagens do grupo controle foram utilizadas.

As imagens são apresentadas na Figura 41, os diferentes animais foram identificados por letras, sendo de A até C os animais do GE e a letra D o animal do GC, essa identificação foi feita para subgrupos (20 dias, 40 dias, 60 dias e 80 dias). O intervalo de tempo utilizado em cada imagem foi de 2,5 até 4 ns, sendo que os tempos mais curtos são representados com tons azuis e os tempos mais longos com tons avermelhados.

Grupo 20 Dias

GC – D

GE – A

GE – B

GE – C

Grupo 40 Dias

GC – D

GE- A

GE – B

GE – C

Grupo 60 Dias

GC – D

GE – A

GE – B

GE – C

Grupo 80 Dias

GC – D

GE – A

GE – B

GE – C

Figura 41 - Imagens de microscopia de tempo de vida (FLIM) das lâminas não coradas para os animais do GC e do GE com diferentes tempos de dieta. Dentro de cada grupo os diferentes animais foram identificados com

diferentes letras, sendo de A – C animais do GE e a letra D o animal do GC. Excitação 440 nm, Emissão: > 460 nm. Magnificação de 60x.

Das imagens mostradas na Figura 41, foram obtidos os histogramas com as distribuições dos tempos presentes, conforme indicado na Figura 42. Para uma melhor comparação entre os histogramas e as imagens, os histogramas foram nomeados com as letras das imagens correspondentes, por exemplo, o animal do GE – A do grupo 20 dias tem seu histograma identificado com a mesma letra A.

Figura 42 - Histogramas das distribuições dos tempos de vida de emissão das imagens da Figura 41. I) Histogramas das imagens do grupo 20 Dias, os histogramas foram identificados com as mesmas letras das imagens, tanto para o GC quanto para o GE. II) Histogramas das imagens do grupo

40 Dias, os histogramas foram identificados com as mesmas letras das imagens, tanto para o GC quanto para o GE. III) Histogramas das imagens do grupo 60 Dias, os histogramas foram identificados com as mesmas letras das imagens, tanto para o GC quanto para o GE. IV) Histogramas das imagens do grupo 80 Dias, os histogramas foram identificados com as mesmas letras das imagens, tanto para o GC quanto para o GE.

De acordo com os histogramas, observa-se que a partir de 40 dias de dieta os tempos de vida de emissão dos fluoróforos presentes nas placas sofrem uma diminuição no seu valor quando comparados com os tempos do grupo controle (curvas em preto na Figura 42).

Para analisar essa possível diferença nos tempos, obteve-se os tempos de cada imagem com maior frequência, através do ajuste de uma gaussiana em cada histograma.

De cada animal fez-se uma lâmina e de cada lâmina foram obtidas no mínimo quatro imagens, essas imagens foram consideradas independentes para o teste estatístico, pois em uma mesma lâmina é possível obter diferentes tamanhos de placa, bem como ter regiões sem a presença visível de placa, conforme já mostrado nas imagens feitas em lâminas coradas com HE (Figura 31).

Na Tabela 6 consta o número experimental utilizado em cada grupo, sendo que esse n experimental representa as imagens utilizadas para a análise e não o número de animais por grupo. Para os grupos experimentais apenas as imagens com placa de aterosclerose visível foram utilizadas na análise. Para o grupo controle os animais controles de cada grupo foram colocados juntos.

Tabela 6 - Valores dos tempos de vida de emissão com maior frequência para os diferentes tempos de dieta. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste estatístico anova-one-way com $p < 0,05$. Foram encontradas diferenças estatísticas entre o GC e o GE – 40 Dias ($p = 0,02$), entre o GC e o GE – 60 Dias ($p = 0,005$), entre o GC e o GE – 80 Dias ($p = 0,0002$), não foram encontradas diferenças estatísticas entre o GC e o GE – 20 Dias ($p = 0,89$) e entre os grupos experimentais.

Média dos tempos de decaimento de maior frequência por grupo (ns)	
GC (n = 26)	3,52 ± 0,09
GE – 20 Dias (n = 16)	3,61 ± 0,09
GE – 40 Dias (n = 9)	3,09 ± 0,05
GE – 60 Dias (n = 12)	3,07 ± 0,07
GE – 80 Dias (n = 11)	2,94 ± 0,11

Para comparação entre os valores mostrados na Tabela 6, utilizou-se o teste estatístico anova-one-way, com $p < 0,05$. Foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos 40, 60 e 80 dias com relação ao grupo controle, bem como diferença estatística entre os mesmos grupos em relação ao grupo 20 dias. Entretanto não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos 40, 60 e 80 dias, bem como entre o grupo 20 dias e o grupo controle.

O grupo 20 dias não apresenta regiões com placas de aterosclerose visíveis, sendo a maior parte das lâminas iguais às do grupo controle, o mesmo pode ser observado nas análises das lâminas coradas com HE (Figura 31), portanto não era de se esperar diferenças estatísticas com relação ao grupo controle. Já para as lâminas com 40 dias de dieta já era visível uma pequena região com modificação na parede da íntima, e essa modificação foi possível de se observar pelo tempo de vida de emissão, sendo o mesmo para o grupo 60 dias e para o grupo 80 dias.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos 40, 60 e 80 dias, os tempos de vida apresentaram uma tendência de diminuição com o aumento do tempo de dieta. Uma dificuldade para obtenção das imagens era a seleção da região no microscópio que era feita através de uma imagem em campo claro e como as lâminas não tinham nenhuma coloração para não influenciar no tempo, era difícil visualizar modificações nas placas presentes.

De cada imagem obteve-se o decaimento total da imagem, as curvas de decaimento foram mostradas na Figura 43. Para uma melhor comparação entre as imagens e as curvas de decaimento, as curvas também foram nomeadas com as letras correspondentes de suas imagens de origem.

Figura 43 - Curva do decaimento dos tempos de vida de emissão de todos os fótons das imagens. I) Decaimentos dos animais do grupo 20 dias. As curvas foram nomeadas com as letras das suas imagens de origem, sendo de A até C do GE e a letra D do GC. B) Decaimentos dos animais do grupo 40 dias. As curvas foram nomeadas com as letras das suas imagens de origem, sendo de A até C do GE e a letra D do GC. C) Decaimentos de todos os animais do grupo 60 dias. D) Decaimentos de todos os animais do grupo 80 dias. As curvas foram nomeadas com as letras das suas imagens de origem, sendo de A até C do GE e a letra D do GC.

As curvas acima foram ajustadas através de um decaimento exponencial. Os valores para os tempos de decaimento e os fatores pré-exponenciais foram mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores dos parâmetros dos ajustes exponenciais das curvas mostradas na Figura 43.

GE - 20 Dias					
	t_1 (ns)	t_2 (ns)	t_3 (ns)	τ_m (ns)	χ^2
GE - A	0.57 (0.40)	1.99 (0.44)	5.48 (0.16)	3.4	1.12
GE - B	0.55 (0.38)	1.99 (0.43)	5.58 (0.19)	3.6	0.99
GE - C	0.54 (0.41)	1.77 (0.44)	4.89 (0.15)	2.9	0.99
GC - D	0.66 (0.38)	2.35 (0.47)	6.21 (0.15)	3.8	1.06
GE - 40 Dias					
	t_1 (ns)	t_2 (ns)	t_3 (ns)	τ_m (ns)	χ^2
GE - A	0.58 (0.45)	1.88 (0.43)	5.06 (0.13)	2.9	0.99
GE - B	0.45 (0.44)	1.54 (0.41)	4.63 (0.15)	2.8	1.03
GE - C	0.48 (0.46)	1.67 (0.40)	4.78 (0.14)	2.9	1.04
GC - D	0.61 (0.36)	2.08 (0.46)	5.62 (0.18)	3.5	1.01
GE - 60 Dias					
	t_1 (ns)	t_2 (ns)	t_3 (ns)	τ_m (ns)	χ^2
GE - A	0.42 (0.44)	1.49 (0.40)	4.63 (0.16)	2.9	0.93
GE - B	0.50 (0.45)	1.68 (0.41)	4.70 (0.14)	2.7	1.11
GE - C	0.52 (0.44)	1.78 (0.42)	5.14 (0.13)	3.0	1.44
GC - D	0.55 (0.42)	1.95 (0.44)	5.49 (0.15)	3.3	1.19
GE - 80 Dias					
	t_1 (ns)	t_2 (ns)	t_3 (ns)	τ_m (ns)	χ^2
GE - A	0.48 (0.46)	1.69 (0.42)	4.78 (0.12)	2.7	1.14
GE - B	0.45 (0.48)	1.51 (0.41)	4.17 (0.11)	2.3	1.69
GE - C	0.48 (0.46)	1.60 (0.41)	4.38 (0.13)	2.5	1.06
GC - D	0.49 (0.42)	1.77 (0.41)	5.18 (0.17)	3.3	1.10

As curvas de decaimento foram ajustadas por uma exponencial tripla e os tempos podem ser separados em três grupos, um tempo mais curto de 0,42 – 0,66 ns, um tempo intermediário de 1,49 – 2,35 ns e um tempo mais longo de 4,17 – 6,21 ns. A contribuição desses tempos no tempo médio ocorre de maneira parecida entre o tempo mais curto e o tempo intermediário, sendo que o tempo mais longo apresenta a menor contribuição.

Para analisar uma possível diferença nos três tempos entre o grupo controle e o grupo experimental, obteve-se a média dos tempos para cada grupo

e fez a diferença em porcentagem entre os tempos do grupo controle e do grupo experimental, que pode ser vista na Figura 44.

Figura 44 – Valores em porcentagem da diferença entre os três tempos dos decaimentos entre o grupo controle e o grupo experimental com diferentes tempos de dieta.

Apesar de anteriormente não terem sido encontradas diferenças estatísticas entre os tempos dos histogramas para o grupo 20 dias com relação ao grupo controle, na análise dos tempos dos ajustes foram encontradas pequenas diferenças entre eles a maior diferença foi encontrada no tempo intermediário com uma redução de ~ 6% do valor. As maiores diferenças foram encontradas para o grupo 80 dias, sendo as maiores diferenças foram encontradas para o tempo intermediário e para o tempo mais longo.

Estudos mostram que os lipídios, apresentam tempos mais curtos quando comparados com proteínas estruturais como colágeno e elastina, e que a presença desses lipídios alteram a composição da íntima e consequentemente modulam os tempos de vida do colágeno e da elastina (5,7,93). A elastina e os lipídios poderiam compor a componente t₂. Já o colágeno tipo I poderia compor a componente t₃.

Haidar D. Abi e colaboradores (94) mostraram que o tempo de vida da protoporfirinas reduz de ~ 6,5 ns para 4,1 ns, em amostras de glioblastomas

retiradas de ratos. Em um trabalho do nosso grupo, observou-se o aumento da emissão da protoporfirina IX no sangue nos coelhos dos grupos experimentais quando comparados com o grupo controle, nesse mesmo estudo observou-se um aumento da emissão na artéria em torno de 630 nm, característico da protoporfirina IX (95). Provavelmente a componente t_3 é influenciada pela presença da protoporfirina.

O tempo de vida de emissão sofre influência do ambiente molecular como pH, concentração de O_2 , e não depende da concentração do fluoróforo ou do seu rendimento quântico (8).

A componente t_1 , muito curta, provavelmente reflete mudanças em proteínas presentes no tecido biológico que sofrem influência do ambiente. O dinucleótido de flavina e adenina (FAD), é um cofator capaz de sofrer ação redox, presente em diversas reações importantes no metabolismo. A reoxidação da forma reduzida, FADH₂, pelo oxigênio molecular resulta na formação de peróxido de hidrogênio. O FAD tem banda de absorção centrada em 450 nm e emissão em torno de 550 nm. Seu tempo de vida muda de acordo com o pH do meio e é provavelmente o responsável pela componente curta t_1 observada nas nossas análises (96).

Portanto as modificações encontradas nos tempos de vida de decaimento dos fluoróforos na placa de aterosclerose podem ser devido a presença de lipídios na camada intima que modificam os tempos dos fluoróforos presentes, bem como a presença da protoporfirina IX, sendo esse último só possível de se observar quando utilizados comprimentos de onda de excitação na região do visível.

5.4.2 Análise dos fluoróforos presentes na artéria na presença com complexo EuCTc.

Após estudar o tempo de vida dos fluoróforos presentes nas artérias e na placa de aterosclerose, estudou-se uma possível transferência de energia entre os fluoróforos e complexo EuCTc.

Para isso, lâminas do grupo controle e do grupo experimental com 60 dias de dieta tanto da camada íntima quanto da camada média coradas com EuCTc, EuCTcMg, Eu e CTc foram analisadas pela técnica FLIM com excitação em 405 nm e a emissão foi obtida a partir de 415 nm.

A Figura 45 mostra as imagens obtidas por FLIM. Cada pixel da imagem representa um tempo de vida médio, e foi selecionado o mesmo intervalo de tempo para todas as imagens de 130 – 2000 ps, sendo a cor vermelha para tempos mais curtos e a cor azul para tempos mais longos.

A partir das imagens foram obtidos os histogramas com a distribuição de tempos presentes nas imagens, conforme mostrado na Figura 46, e obteve-se o tempo de vida máximo em cada histograma.

Analisando os histogramas observa-se que para o GC, tanto para camada média quanto para a camada íntima, as distribuições de tempos de vida ficaram próximos, já para o GE observa-se uma separação entre as distribuições de tempos de vida. A Tabela 8 mostra os valores máximos de cada histograma.

Figura 45 - Imagens de FLIM obtidas de artérias do GC e do GE com 60 dias de dieta, foram feitas imagens tanto da camada média, quanto da camada íntima, coradas com EuCTc, EuCTcMg, Eu^{+3} e CTc. $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} > 415 \text{ nm}$. Magnificação de 40x. Tamanho da imagem 177 X 177 μm .

GC

Média

Íntima

a)

b)

GE

Média

Íntima

c)

d)

Figura 46 – a) até d) Histogramas com a distribuição dos tempos de vida das imagens das artérias tanto para o GC quanto para o GE não coradas, coradas com EuCTc, EuCTcMg, Eu e CTc.

Tabela 8 – Valores dos tempos de vida médios obtidos a partir dos histogramas de cada imagem. Para o cálculo do valor do tempo de vida médio utilizou-se uma aproximação por gaussiana e apresentou-se o valor do tempo de vida médio $\pm \sigma$.

Média	Íntima
CG	
Autofluorescência: 1.52 (1.32 – 1.70)	Autofluorescência: 1.31 (0.80 - 1.68)
EuCTcMg: 1.47 (1.27 – 1.67)	EuCTcMg: 1.20 (0.41 – 1.50)
EuCTc: 1.24 (0.70 – 1.62)	EuCTc: 1.02 (0.37 – 1.55)
CTc: 1.61 (1.37 – 1.74)	CTc: 1.60 (1.37 – 1.84)
Eu: 1.46 (1.32 – 1.58)	Eu: 1.25 (0.81 – 1.51)
GE	
Autofluorescência: 1.62 (1.44 – 1.76)	Autofluorescência: 1.36 (1.25 – 1.52)
EuCTcMg: 0.71 (0.44 – 1.00)	EuCTcMg: 0.31 (0.20 – 0.45)
EuCTc: 0.86 (0.46 – 1.23)	EuCTc: 0.23 (0.15 – 0.35)
CTc: 1.47 (1.23 – 1.65)	CTc: 1.13 (1.05 – 1.23)
Eu: 1.51 (1.18 – 1.75)	Eu: 1.08 (1.01 – 1.15)

Para o GC a camada média apresenta um tempo de vida de autofluorescência de 1,52 ns e a camada íntima apresenta um tempo de vida de 1,31 ns. Quando coradas com európio ou clorotetraciclina os valores permaneceram iguais tanto para a camada média quanto para a camada íntima.

Para o GE a camada média apresentou um tempo de vida de autofluorescência de 1,62 ns e a camada íntima um tempo de 1,36 ns, novamente para a camada média o tempo de vida das lâminas coradas com európio e clorotetraciclina permaneceram constantes, já para a camada íntima o tempo de vida das lâminas coradas com európio e clorotetraciclina apresentaram uma diminuição no tempo de vida, 1 ns para o európio e 1,13 ns para a clorotetraciclina.

Quando coradas com EuCTc e EuCTcMg o tempo de vida tanto para a camada média, quanto para a camada íntima apresentaram uma diminuição no tempo de vida, para o GC. A camada média para o GC apresentou tempos de 1,2 ns para EuCTc e 1,5 ns para EuCTcMg, para a camada íntima os tempos foram de 1,02 ns para EuCTc e 1,20 ns para EuCTcMg.

Para o GE, as lâminas coradas com EuCTc e EuCTcMg apresentaram uma diminuição maior para os tempos de vida quando comparados com o GC. Para a camada média os tempos de vida caíram para 0,86 ns para o EuCTc e 0,71 ns para o EuCTcMg e para a camada íntima os tempos caíram para 0,23 ns para o EuCTc e 0,31 ns para o EuCTcMg.

De cada imagem foi obtida uma curva exponencial descrevendo os decaimentos presentes nas imagens, conforme mostrado na Figura 47.

Figura 47 – Curvas de decaimento obtidas de um ponto específico nas imagens da Figura 45.

A partir das curvas mostradas Figura 47, ajustou-se duas exponenciais e calculou-se o tempo de vida médio a partir da equação 2. Os valores dos ajustes foram mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores dos parâmetros dos ajustes exponenciais das curvas mostradas na Figura 47.

Não corada	GC Média	GE Média	GC Íntima	GE Íntima
A1	0,33 ± 0,04	0,33 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,31 ± 0,02
t1 (ns)	0,38 ± 0,06	0,29 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,22 ± 0,02
A2	0,63 ± 0,03	0,61 ± 0,01	0,54 ± 0,02	0,61 ± 0,01
t2 (ns)	2,32 ± 0,20	2,19 ± 0,08	2,10 ± 0,12	1,76 ± 0,05
<t> (ns)	1,64	1,52	1,39	1,24
R²	0,98	0,99	0,99	0,99
Eu	GC Média	GE Média	GC Íntima	GE Íntima
A1	0,43 ± 0,03	0,37 ± 0,03	0,53 ± 0,03	0,52 ± 0,01
t1 (ns)	0,39 ± 0,04	0,44 ± 0,05	0,44 ± 0,03	0,31 ± 0,01
A2	0,51 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,47 ± 0,01
t2 (ns)	2,21 ± 0,20	2,46 ± 0,20	2,33 ± 0,23	1,75 ± 0,06
<t> (ns)	1,38	1,65	1,24	1,00
R²	0,99	0,99	0,99	0,99
CTc	GC Média	GE Média	GC Íntima	GE Íntima
A1	0,23 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,60 ± 0,01
t1 (ns)	0,32 ± 0,07	0,49 ± 0,05	0,31 ± 0,04	0,28 ± 0,01
A2	0,63 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,42 ± 0,01
t2 (ns)	1,92 ± 0,13	2,67 ± 0,27	1,99 ± 0,14	1,55 ± 0,4
<t> (ns)	1,48	1,71	1,27	0,81
R²	0,98	0,99	0,99	0,99
EuCTc	GC Média	GE Média	GC Íntima	GE Íntima
A1	0,34 ± 0,02	0,67 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,87 ± 0,01
t1 (ns)	0,22 ± 0,03	0,143 ± 0,006	0,28 ± 0,03	0,087 ± 0,001
A2	0,57 ± 0,02	0,325 ± 0,009	0,64 ± 0,02	0,135 ± 0,001
t2 (ns)	1,98 ± 0,10	1,70 ± 0,08	2,17 ± 0,11	0,87 ± 0,05
<t> (ns)	1,33	0,65	1,42	0,19
R²	0,99	0,99	0,99	0,99

EuCTcMg	GC Média	GE Média	GC Íntima	GE Íntima
A1	0,32 ± 0,03	0,66 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,764 ± 0,009
t1 (ns)	0,38 ± 0,05	0,134 ± 0,006	0,28 ± 0,02	0,141 ± 0,009
A2	0,61 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,61 ± 0,02	0,245 ± 0,009
t2 (ns)	2,49 ± 0,19	1,53 ± 0,07	1,65 ± 0,05	1,16 ± 0,04
<t> (ns)	1,77	0,65	1,15	0,39
R²	0,99	0,99	1,00	0,99

Analisando os valores mostrados na Tabela 9, se observa duas componentes para os tempos de vida, sendo a primeira uma componente mais curta e para a segunda uma componente mais longa. Para as lâminas não coradas os tempos para o grupo controle ficaram bem próximos, já para o grupo experimental se observa uma pequena diminuição nos tempos, resultado já observado nesse trabalho anteriormente.

Para as lâminas coradas com íon európio se observa apenas uma diminuição na componente mais longa para a íntima do grupo experimental o que leva a uma diminuição também no valor do tempo de vida médio. Sendo o mesmo observado para as lâminas coradas com a clorotetraciclina.

Já para o complexo EuCTc e EuCTcMg se observa uma diminuição tanto na componente mais curta quanto na componente mais longa para o grupo experimental em comparação com o grupo controle.

Para entender as modificações encontradas nos tempos de vida de emissão dos fluoróforos na presença do marcador EuCTc e EuCTcMg, estudou-se o comportamento do complexo na presença de alguns fluoróforos presentes na placa de aterosclerose: colágeno, colesterol e triglicerídeos.

O espectro de absorção do EuCTc, da clorotetraciclina e das camadas íntimas e média (97) e o espectro de emissão do complexo e dos fluoróforos (colágeno, colesterol e triglicerídeos) são mostrados na Figura 48.

A clorotetraciclina apresenta absorção na região do 370 nm, o complexo EuCTc apresenta absorção em 400 nm, o que indica a complexação entre o íon európio e a clorotetraciclina (56). As camadas íntima e média das artérias apresentam uma banda de absorção na mesma região do complexo EuCTc (97), conforme mostrado na Figura 48.

Figura 48 – (A) Espectro de absorção do complexo EuCTc, CTc e das camadas íntima e média de uma artéria (97). Espectro de emissão do complexo EuCTc, CTc, colesterol, triglicerídeos e colágeno obtidos com excitação de 400 nm.

A Figura 48 – (A) mostra a emissão dos principais fluoróforos presentes na placa aterosclerótica e do complexo EuCTc quando excitados com 400 nm. É possível observar a emissão dos fluoróforos na região de 450 nm e 515 nm, da clorotetraciclina em 515 m, e do complexo EuCTc em 617 nm.

Em seguida estudou-se a emissão dos fluoróforos quando adicionado diferentes quantidades do complexo EuCTc, também se analisou o tempo de vida de emissão dos fluoróforos na presença do EuCTc. A interação do colágeno com o complexo EuCTc pode ser observado na Figura 49 (A) e (B).

Figura 49 – A) Espectro de emissão do colágeno sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc, quando excitados com 400 nm, espectro de excitação do complexo EuCTc+colágeno (curva em vermelho). B)

Curvas de decaimento de emissão do colágeno sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc com excitação de 400 nm.

O colágeno sozinho apresenta uma banda de emissão em 462 nm quando excitado em 400 nm. Com a adição do complexo EuCTc é possível observar uma emissão em 617 nm devido a presença do európio. Essa banda aumenta conforme aumenta a quantidade do complexo. Simultaneamente observa-se a diminuição na banda de emissão do colágeno, o que indica uma transferência de energia entre o colágeno e o EuCTc.

Na Figura 49 – B obteve-se as curvas de decaimento do tempo de vida do colágeno na presença do complexo EuCTc. Para obter o tempo de vida médio de cada curva, as curvas foram normalizadas e ajustaram-se duas exponenciais e calculou-se o tempo de vida médio pela equação 1. Para cada tempo de vida médio calculou-se 5% de erro e os ajustes ficaram com R^2 de 0,99. A Tabela 10 mostra os tempos de vida médio do colágeno com diferentes quantidades de EuCTc.

A diminuição nos tempos de vida médio do colágeno indica uma transferência de energia via processos não radiativos de um doador para o aceitador EuCTc.

Tabela 10 – Valores de tempo de vida médio $\pm$ erro do colágeno sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc.

1 mL de colágeno + μL de EuCTc	Tempo de vida médio do colágeno (ns) $\pm$ Erro
0	3,7 $\pm$ 0,2
100	3,5 $\pm$ 0,2
200	3,2 $\pm$ 0,1
300	2,9 $\pm$ 0,1
400	2,5 $\pm$ 0,1
500	2,6 $\pm$ 0,1
600	2,1 $\pm$ 0,1
700	2,1 $\pm$ 0,1
800	2,1 $\pm$ 0,1
900	2,1 $\pm$ 0,1

A mesma análise da emissão do tempo de vida de emissão foi feita para o colesterol, os resultados estão na Figura 50.

Figura 50 - (a) Espectro de emissão do colesterol sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc, excitando em 400 nm. (b) Curvas de decaimento de tempo de vida de emissão do colesterol sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc.

A Figura 50 – a) mostra o espectro de emissão do colesterol sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc. O colesterol apresenta uma banda de emissão em torno de 480 nm. Quando na presença do complexo EuCTc, nota-se uma banda de emissão na região de 515 nm, característica da clorotetraciclina, e a banda em 617 nm característica do európio. Com o aumento

na quantidade do complexo EuCTc nota-se um aumento tanto na banda da clorotetraciclina, quanto do íon európio. A Figura 50 – b) mostra as curvas de decaimento para o colesterol na presença de diferentes quantidades de EuCTc e a Tabela 11 mostra os valores de tempo de vida médio obtidos através do ajuste de duas exponenciais, todos os ajustes apresentaram R^2 de 0,99.

Novamente, observa-se uma diminuição no tempo de vida de emissão do colesterol na presença do EuCTc, indicando uma transferência de energia do colesterol para a clorotetraciclina.

Tabela 11 – Valores de tempo de vida médio $\pm$ erro do colesterol sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc.

1 mL de colesterol + μL de EuCTc	Tempo de vida médio do colesterol (ns) $\pm$ Erro
0	0,96 $\pm$ 0,05
100	0,89 $\pm$ 0,04
200	0,76 $\pm$ 0,04
300	0,71 $\pm$ 0,03
400	0,65 $\pm$ 0,03
500	0,65 $\pm$ 0,03
600	0,62 $\pm$ 0,03
700	0,62 $\pm$ 0,03
800	0,61 $\pm$ 0,03
900	0,59 $\pm$ 0,03

Por fim, analisou-se a interação dos triglicerídeos com o complexo EuCTc, o espectro de emissão e as curvas de decaimento podem ser vistas na Figura 51.

Figura 51 – (a) Espectro de emissão do triglicerídeos sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc, excitando em 400 nm. (b) Curvas de decaimento de tempo de vida de emissão do triglicerídeos sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc.

Na Figura 51 observa-se o espectro de emissão dos triglicerídeos sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc. O triglicerídeo apresenta uma banda de emissão em torno de 515 nm, com o acréscimo do complexo EuCTc uma pequena diminuição na emissão do triglicerídeos e uma pequena emissão do európio são observadas, diferentemente do que foi encontrado para o colágeno e para o colesterol. A partir das curvas de decaimento dos

triglicerídeos foram obtidos os tempos de vida médio através do ajuste por duas exponenciais com R^2 de 0,99 e calculados a partir da equação 1. Os valores encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Valores de tempo de vida médio $\pm$ erro dos triglicerídeos sozinho e na presença de diferentes quantidades de EuCTc.

1 mL de triglicerídeos + μL de EuCTc	Tempo de vida médio dos triglicerídeos (ns) $\pm$ Erro
0	2,6 $\pm$ 0,1
100	2,3 $\pm$ 0,1
200	1,95 $\pm$ 0,09
300	1,64 $\pm$ 0,08
400	1,39 $\pm$ 0,07
500	1,32 $\pm$ 0,06
600	1,27 $\pm$ 0,06
700	1,25 $\pm$ 0,06
800	1,13 $\pm$ 0,06
900	1,07 $\pm$ 0,05

A partir do tempo de vida médio de emissão dos triglicerídeos, conforme mostrado na Tabela 12 observa-se uma diminuição no tempo de vida médio do triglicerídeos, mostrando uma transferência de energia entre os triglicerídeos e o complexo EuCTc.

Comparando os tempos de vida de todos os fluoróforos juntos, Figura 52, observa-se que para quantidades acima de 500 μ L de EuCTc os tempos de vida permanecem praticamente constantes para o colágeno e colesterol, já para os triglicerídeos os valores continuam caindo para quantidades acima de 500 μ L. Para quantidades abaixo de 500 μ L nota-se uma diminuição no tempo de vida médio linear, indicando uma transferência de energia dos fluoróforos para o

complexo EuCTc. Para os triglicerídeos houve uma maior diminuição no tempo de vida de emissão em torno de 60 % para maior quantidade de EuCTc (900 μ L), já para o colágeno a diminuição foi de 42 % e para o colesterol em torno de 39%. Os resultados acima mostram que a maior transferência de energia ocorre dos triglicerídeos para o complexo EuCTc.

Figura 52 – Comparação entre os tempos de vida médio para o colágeno, colesterol, triglicerídeos na presença de diferentes quantidades do complexo EuCTc.

A diminuição no tempo de vida médio das lâminas coradas com EuCTc e EuCTcMg pode ter acontecido devido a uma transferência de energia ressonante (FRET) entre o colágeno, o colesterol e os triglicerídeos com o complexo de európio, reduzindo a fluorescência residual do colágeno. Além disso, a emissão do colesterol e triglicerídeos pode ter sido transferida ao complexo EuCTc. Outros fluoróforos não identificados nesse trabalho também podem ter transferido energia para o complexo. Esses fluoróforos (doadores) devem exibir uma sobreposição entre seu espectro de emissão e o espectro de excitação do aceitador (EuCTc, EuCTcMg).

FRET é um processo onde um fluoróforo (doador) no estado excitado, transfere sua energia para uma molécula vizinha (aceitador), no nosso caso o aceitador seria o EuCTc e o doador os fluoróforos das artérias. Essa

transferência ocorre via interação não radiativa do tipo dipolo-dipolo. Quando ocorre FRET a emissão do doador diminui e a emissão do aceitador aumenta (98,99).

L. Dos Santos e colaboradores (98) estudaram a interação do colágeno com o complexo apatita-európio, e mostraram uma diminuição na banda de emissão do colágeno e aumento na banda do európio quando complexados, resultado semelhante ao encontrado nesse trabalho.

A principal transferência de energia entre os componentes da placa e o complexo EuCTc deve ser os triglicerídeos, porque separadamente ele foi o que apresentou a maior porcentagem de diminuição no tempo de vida de emissão. Sabe-se que em coelhos a VLDL apresenta um papel importante na formação da placa (86), além disso, a VLDL é a lipoproteína com maior concentração de triglicerídeos (19).

Alguns estudos na literatura mostram uma interação entre a tetraciclina e os fosfolipídios em estudos de biomembranas (100,101), portanto o complexo EuCTc pode ficar retido nas paredes das artérias facilitando diagnósticos óticos.

5.5 Análise do SHG

O colágeno é uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas.

As fibras colágenas podem ser visualizadas, quando excitadas pela luz UV, por geração de sinal de segundo harmônico (SHG). Rotineiramente o colágeno é analisado na microscopia de luz comum corado com picrossirius. A excitação da aorta com um laser em 780 nm, e através da análise da imagem gerada a partir da microscopia de SHG é possível obter informações importantes a respeito das fibras de colágeno, como: quantidade, organização, densidade. Esses dados podem fornecer informações importantes a respeito do desenvolvimento da placa de aterosclerose.

O SHG gerado pelo colágeno nas lâminas dos animais dos diferentes grupos experimentais, foi realizado para avaliar as modificações no colágeno presente na placa ao longo do tempo de dieta. As lâminas utilizadas nesse experimento foram as lâminas coradas com HE, essas lâminas foram preparadas a partir do tecido armazenado em blocos de parafina, portanto para desparafinização utilizou-se xilol, que é um solvente orgânico, que retira além da parafina o colesterol presente.

Portanto apesar do colesterol também apresentar sinal de SHG, conforme já mostrado na literatura (81) o sinal gerado nas lâminas era apenas devido à presença do colágeno.

A Figura 53 mostra as imagens de SHG obtidas para um animal de cada grupo experimental com diferentes tempos de dieta. O brilho e contraste das imagens foram ajustados de forma igual para uma melhor visualização das imagens.

Analisando a imagem Figura 53 (A) observa-se um sinal intenso e na região da camada média da artéria, onde se encontra colágeno organizado em fibras, que se estendem ao longo de toda camada, com espessamento similar entre si.

Para esse grupo, com 20 dias de dieta, como já observado na análise das imagens de HE, não foi observada placa de aterosclerose, portanto esse grupo não foi utilizado para as análises seguintes.

Figura 53 – Imagens de microscopia de SHG de uma lâmina por grupo experimental com diferentes tempos de dieta (20 Dias, 40 Dias e 60 Dias). Magnificação 40x.

A Figura 53 (B) mostra a imagem de uma lâmina do GE – 40 Dias. Nessa imagem se observa novamente um sinal intenso e organizado na camada média,

entretanto não é possível observar uma organização no colágeno, nem a presença de fibras na placa de aterosclerose.

Já nas Figura 53 (C) e Figura 53 (D) para os grupos 60 Dias e 80 Dias respectivamente, observa-se que o sinal do SHG, mostra-se menos intenso e podem se observar algumas fibras em regiões concentradas. A camada média das artérias encontra-se no canto superior esquerdo nas duas imagens, e as fibras de colágeno estão “crescendo” perpendicular à camada média, em direção ao lúmen.

Além de uma análise visual do sinal de SHG do colágeno, foram obtidos valores que representam a quantidade, a densidade e a organização das fibras de colágeno. As análises foram feitas através do software ImageJ, utilizando um plugin (Orientation J) desenvolvido por Daniel Sage no Biomedical Image Group (BIG) na Suíça (102).

Para obter os valores de quantidade, organização e densidade foram selecionados vários ROIs (Region of Interest), apenas na região da imagem com placa de aterosclerose.

Para o GE – 40 Dias, os três animais que compunham o grupo foram utilizados para as análises e de cada animal foi obtida uma lâmina com três cortes do tecido e dessa lâmina foram obtidas três imagens diferentes e de cada imagem foram selecionados de 15 – 20 ROIs, dependendo do tamanho da placa visível na imagem. Para o GE – 60 Dias e para o GE – 80 Dias foram utilizados dois animais e o procedimento foi igual ao grupo GE – 40 Dias. Para comparação entre os grupos, foi feito o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$, e os valores foram apresentados como média $\pm$ erro padrão e foram mostrados na Figura 54.

Figura 54 – Valores médios obtidos a partir das imagens geradas por microscopia de SHG das lâminas dos grupos experimentais com diferentes tempos de dieta. (A) Valores médios obtidos por grupo para densidade de colágeno presente nas lâminas. (B) Valores médios obtidos por grupo para organização de colágeno presente nas lâminas, sendo que esse número quanto mais próximo de 1 mais organizado está o colágeno presente. (C) Valores médios obtidos por grupo para a quantidade de colágeno presente nas lâminas.

A Figura 54 (A) mostra que os valores obtidos para a densidade de colágeno presente na região com placa de aterosclerose, cresce ao longo do tempo de dieta. Foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os três grupos.

A Figura 54 (B) mostrou a comparação entre os grupos experimentais com relação a organização do colágeno na placa. Esses valores ficam entre 0 e 1, sendo 0 não organizado e 1 totalmente organizado. Comparando-se os grupos encontrou-se diferença estatística entre os grupos GE – 40 Dias x GE – 60 Dias e GE – 40 Dias x GE - 80 Dias, entretanto não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos GE – 60 Dias e GE – 80 Dias.

Analisando a Figura 54 (C) observa-se que o aumento no tempo de dieta reflete um aumento na quantidade de colágeno nas placas de aterosclerose, entretanto não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos GE – 60 Dias e GE – 80 Dias. As placas encontradas em sua maioria para esses grupos eram bem parecidas.

O aumento de colágeno na placa de aterosclerose em coelhos já foi descrito anteriormente em outros trabalhos na literatura (103,104).

As placas de aterosclerose contêm principalmente colágeno intersticial tipo I e tipo III, sendo o colágeno tipo I responsável por aproximadamente dois terços do colágeno total. Sendo que o colágeno representa cerca de 60% do total de proteína presentes na placa de aterosclerose, e contribui para o crescimento da placa e estreitamento do lúmen da artéria (105). O colágeno também serve como um estimulante para a progressão da placa servindo como um depósito de moléculas aterogênicas como, por exemplo, lipoproteínas modificadas (106), fatores de crescimento (107), produtos finais de glicação (108).

As fibrilas de colágeno contribuem para a integridade estrutural e elasticidade, e uma falta de colágeno gera uma placa fraca e vulnerável. Uma grande quantidade de colágeno na placa leva a uma estenose arterial e pouco colágeno faz com que a placa fique mais propensa a romper (105).

O colágeno na placa é produzido em sua maioria pelas células do músculo liso (SMCs), mas o colágeno também pode ser produzido pelas células endoteliais (105). Jaeger e colaboradores (109) mostraram que a indução da síntese de colágeno nas placas de aterosclerose ocorre nas vizinhanças dos macrófagos.

Comparando os resultados obtidos pela imagem de SHG e as imagens das lâminas corada com HE, observa-se que com 60 e 80 dias de dieta ocorre a infiltração de células do tecido muscular liso nas placas de aterosclerose e isso deve ser responsável pelo aumento na quantidade de colágeno presente nas placas. Já o aumento na organização do colágeno nos grupos pode ser devido

à formação de fibras, auxiliando a manter a estrutura da placa e estreitar o lúmen arterial.

Analisou-se também o colágeno presente na artéria de uma imagem do grupo experimental GE – 60 Dias e o grupo controle, observando toda a extensão da artéria ao longo das diferentes camadas: adventícia, média e íntima. A Figura 55 mostra a imagem obtida para o animal do grupo controle.

Figura 55 - Imagem de SHG do colágeno presente em um animal do grupo controle ao longo das diferentes camadas da artéria.

Para analisar o colágeno ao longo da imagem, um ROI de tamanho de 41,5 X 41,5 µm foi selecionado ao longo de uma linha na imagem, começando da camada íntima até a camada adventícia. De cada ROI foram obtidos os valores de quantidade, densidade e organização do colágeno, os valores e a separação entre as camadas foram mostrados na Figura 56.

Figura 56 – Valores médios obtidos para densidade (A), organização (B) e quantidade (C) de colágeno ao longo da imagem da Figura 55. Em vermelho está representada a divisão entre a camada média e a camada adventícia.

Analisando os valores apresentados na Figura 56, se observa que a região da camada adventícia apresenta uma maior quantidade e densidade de colágeno que a camada média. Na imagem não foi possível visualizar a camada íntima da camada média, já que o tamanho da camada íntima em uma artéria normal é muito pequeno. Entretanto, ao analisar a organização do colágeno ao longo da artéria, nota-se que o mesmo se encontra mais organizado na camada média do que na camada adventícia.

Já a Figura 57 mostra a imagem de SHG obtida para um animal do grupo experimental com 60 dias de dieta. Analisando a imagem observa-se que a camada íntima agora se encontra espessa, com presença de colágeno distribuída em toda sua extensão, a camada média aparenta estar com a mesma organização que a camada média do grupo controle.

Figura 57 - Imagem de SHG do colágeno presente ao longo das diferentes camadas da artéria de um animal do grupo experimental com 60 dias de dieta.

Um ROI de mesmo tamanho que o utilizado na análise anterior do grupo controle foi selecionado ao longo de uma linha da camada íntima até a camada adventícia e foram obtidos os valores de quantidade, organização e densidade, esses valores foram mostrados na Figura 58.

Figura 58 - Valores médios obtidos para densidade (A), organização (B) e quantidade (C) de colágeno ao longo da imagem da Figura 57. Em vermelho está representada a divisão entre a camada íntima, a camada média e a camada adventícia.

Analisando a Figura 58, os valores obtidos foram separados pelas respectivas camadas, sendo que além de separar a camada íntima, da camada média e camada adventícia, foi separado mais uma região, a interface entre a camada íntima e a camada média.

Observa-se que a região com mais colágeno é a camada adventícia, sendo possível observar um aumento na quantidade e densidade do colágeno (Figura 58 – A e C) da íntima para a camada média.

A organização do colágeno ao longo da artéria também aumenta da camada íntima em direção à camada média, sendo essa a região com maior organização de colágeno, conforme observado na Figura 58 – (B). Da mesma forma que ocorreu para o animal do grupo controle a organização da camada média para a camada adventícia diminui.

Com relação à quantidade e densidade de colágeno, a região de interface entre a camada íntima e a camada média, apresenta mais colágeno que a camada íntima, mas menos que a camada média. E, com relação à organização de colágeno a interface apresenta uma organização mais próxima à da camada média do que da camada íntima.

Portanto, analisando todos os resultados juntos, é possível dizer que o colágeno na placa de aterosclerose aumenta em quantidade e densidade com o aumento no tempo de dieta, bem como tende a se organizar dentro da placa e essa organização já é possível de ser observada com 60 dias de dieta. Já ao longo da artéria, a placa apresenta uma menor organização e quantidade que a camada média e adventícia.

6 Conclusão

O modelo experimental em coelhos foi implementado com sucesso. As análises microscópicas das aortas dos coelhos mostraram um estadiamento da doença aterosclerótica. Com 20 dias de dieta hipercalórica, observou-se um início de formação da placa (Tipo I), que aumentou significativamente com 40 e 60 dias de dieta (Tipo III). Os resultados de 80 dias são coerentes com uma placa do tipo IV onde existem lesões que levam a uma desorganização estrutural, reparo e espessamento da túnica íntima e deformação da parede da artéria.

As análises do perfil lipídico também indicaram aumento dos valores de colesterol total e LDL ao longo do experimento. Notou-se que as amostras sanguíneas dos animais com 20 dias de dieta apresentavam valores alterados. Neste grupo em particular, observou-se uma grande turbidez nas amostras sugerindo uma grande quantidade de triglicerídeos. De fato, a quantificação de colesterol e suas frações, apresenta uma grande imprecisão nestas condições. Provavelmente, o aumento nas quantidades de VLDL no sangue, antecede a sua passagem para o endotélio e início do processo inflamatório e mostra um limiar no processo de formação da placa.

A partir dos resultados obtidos para os marcadores na presença do plasma, foi possível concluir que tanto o EuCTc quanto a Tioflavina T podem ser utilizados para avaliar o risco de desenvolver aterosclerose a partir da marcação das frações do colesterol no plasma. Entretanto não foram obtidas grandes diferenças entre os grupos controles e experimentais, talvez devido ao alto espalhamento de luz para as amostras do grupo experimental. Em humanos é esperado que as concentrações de colesterol e triglicerídeos fiquem abaixo do observado em coelhos, o que poderia resultar em maiores diferenças estatísticas. No entanto, a presença de interferentes, como glicose, proteínas e medicamentos poderia resultar em falsos positivos.

No estudo da microscopia de fluorescência, verificou-se que a melhor razão molar do complexo EuCTc para análise da placa de aterosclerose foi de 1,5 Eu : 1,0 CTc. Nas artérias o complexo apresentou emissão em toda

extensão da artéria, provavelmente devido a processos de transferência de energia entre os fluoróforos e o complexo EuCTc. Observou-se uma emissão do vermelho bem mais intensa na região da placa de aterosclerose, quando analisado apenas a autofluorescência observa-se uma diminuição na emissão nessa região. Desta forma o complexo melhora a visualização do processo aterogênico. Utilizando juntamente com o complexo EuCTc o íon magnésio, observou-se um incremento na fluorescência do complexo, sendo a melhor concentração do magnésio de 0,75 mM.

Na análise do tempo de vida de autofluorescência dos fluoróforos presentes nas artérias, a partir da excitação em 400 nm, observou-se uma diminuição nos tempos de vida nas regiões com placa de aterosclerose.

Já na presença dos complexos EuCTc e EuCTcMg os tempos de vida de fluorescência dos fluoróforos sofreram uma drástica redução nas regiões com placa de aterosclerose. Para estudar essa interação, foram analisados os tempos de vida de emissão de alguns fluoróforos (colágeno, colesterol e triglicerídeos) com o complexo e observou-se uma diminuição no tempo de vida dos mesmos, indicando uma transferência de energia entre esses fluoróforos e o complexo EuCTc.

A tetraciclina apresenta uma maior afinidade pela placa de aterosclerose, e tende a ficar próxima ao colesterol presente. Os triglicerídeos são principalmente transportados pela VLDL que apresenta um papel importante na formação da placa de aterosclerose nos coelhos. O colágeno tende a ser gerado próximo aos macrófagos, e conforme mostrado na análise do SHG tende a aumentar em quantidade e a se organizar em fibras nas placas de aterosclerose, o que faz com que o complexo EuCTc fique próximo desses fluoróforos aumentando a probabilidade de transferência de energia e, portanto, diminuição no tempo de vida dos mesmos.

Portanto o presente trabalho pode concluir que o complexo EuCTc e a ThT podem ser utilizados para auxiliar no estudo da formação da placa de aterosclerose.

7 Trabalhos publicados.

2013:

- 1- Proceedings SPIE: Cholesterol accumulation in the cornea and in the aorta: imaging using europium chlortetracycline complex fluorescent probe. Lilia C. Courrol, Leticia B. Sicchieri, Daliane C. Silva. *Proc. SPIE* 8591, Optical Diagnostics and Sensing XIII: Toward Point-of-Care Diagnostics, 85910C (February 25, 2013); doi:10.1117/12.2001546;
- 2- Artigo: "Liquid biopsy of atherosclerosis using protoporphyrin IX as a biomarker". Monica Nascimento da Silva, Letícia Bonfante Sicchieri, Flávia Rodrigues de Oliveira Silva,^c Maira Franco Andrade, Lilia Coronato Courrol. *Analyst*, 2014, 139, 1383-1388. doi:10.1039/C3AN0145D.
- 3- Artigo: "Synthesis of silver nanoparticles using agar-agar water solution and fentosencond pulse irradiation". de Matos, Ricardo Almeida; Cordeiro, Thiago da Silva; Samad, Ricardo Elgul; Sicchieri, Leticia Bonfante et al. *Colloids and surfaces a-physicochemical and engineering aspects*. 2013, 423, 58-62
- 4- Study of Tryptophan lifetime fluorescence following low-density lipoprotein modification. Sicchieri, Leticia Bonfante; Monteiro, Andrea Moreira; Samad, Ricardo Elgul; et al., *Applied Spectroscopy*, 2013, 67, 4, 379-384.

2014:

- 5- Proceedings SPIE: Atherosclerosis staging: imaging using FLIM technique. Leticia B. Sicchieri, Marina Berardi Barioni; Mônica Nascimento Silva; Andrea Moreira Monteiro; Antonio Martins F. Neto, Amando S. Ito, Lilia C. Courrol; *Proc. SPIE* 8947, Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XII, 89472B (March 4, 2014); doi:10.1117/12.2040139;
- 6- Proceedings SPIE: New blood markers for staging and prognostics of atherosclerosis. Leticia B. Sicchieri; Mônica Nascimento Silva; Andrea Moreira Monteiro; Antonio Martins F. Neto, Lilia C. Courrol; *Proc. SPIE* 8947, Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XII, 89472C (March 4, 2014); doi:10.1117/12.2040240;

2015:

- 7- Aminolevulinic acid with gold nanoparticles: a novel theranostic agent for atherosclerosis. Karina de Oliveira; da Silva, Monica Nascimento; Sicchieri, Letícia Bonfante; et. al. *Analyst*, 2015, 140, 6, 1974-1980.

2016:

- 8- Artigo publicado na The International Journal of Cardiovascular Imaging: Characterization of the Europium Chlortetracycline complex as a marker for atherosclerosis Letícia B. Sicchieri, Rodrigo Natal de Andrade, Lilia Coronato Courrol. pp. 1-10, 2016. DOI: 10.1007/s10554-016-0936-7
- 9- Artigo submetido para Journal of Luminescence. Can measurement of the fluorescence lifetime of extracted blood PPIX predict atherosclerosis? Courrol, Lilia; Sicchieri, Letícia, Silva Mônica, Samad Ricardo.
- 10- Artigo submetido para Applied Spectroscopy. "Optical properties of Europium-Tetracycline Complexes in the presence of HDL subfractions Sicchieri, Letícia; Monteiro, Andrea; Figueiredo-Neto, Antonio; Gomes, Laércio; Courrol, Lilia;

8 Referências

- 1 Elisabeth Carmen Duarte Brazil. In: **Health in the Americas**. v.Country VO.2012, p. 129–145.
- 2 Lakota, K., Artenjak, A., et al. Atherogenesis, Inflammation and Autoimmunity: An Overview. In: PSP (Ed.) (Ed.); **Atherogenesis**. 2012,
- 3 Maria, Y.; Alencar, G.; et al. Fatores de Risco para Aterosclerose em uma População Idosa Ambulatorial na Cidade de São Paulo. **Arq Bras Cardiol**, v. 74, n. 3, p. 181–188, 2000.
- 4 Gomes M. A. M. , Bispo I. G. A., Neto N. C. M. Marcadores Laboratoriais Não Tradicionais para Aterosclerose : revisão de literatura. **rev socerj**, v. 22, n. 5, p. 318–325, 2009.
- 5 Marcu, L., Grundfest, W.S., et al. Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy for Staging Atherosclerotic Lesions. In: BWR and M-A Mycek (Ed.); **Handbook of Biomedical Fluorescence**. 2003, p. Chapter 12.
- 6 Marcu L., Fang Q., JO J.A., Papaioannou T., et al. In vivo detection of macrophages in a rabbit atherosclerotic model by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy. **Atherosclerosis**, v. 181, n. 2, p. 295–303, 2009.
- 7 Marcu, L.; Jo, J.A.; et al. Detection of Rupture-Prone Atherosclerotic Plaques by Time- Resolved Laser Induced Fluorescence Spectroscopy. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 1, p. 156–164, 2010.
- 8 Marcu, L. Fluorescence Lifetime Techniques in Medical Applications. **Ann. Biomed Eng**, v. 40, n. 2, p. 304–331, 2012.
- 9 Schäferling, M.; Wu, M.; et al. Time-resolved fluorescent imaging of glucose. **Journal of fluorescence**, v. 14, n. 5, p. 561–8, 2004.
- 10 Grasso, A.N.; Teixeira, L.D.S.; et al. Optical properties of metacycline, oxytetracycline and chlortetracycline europium complexes in the presence of hydrogen peroxide. **Journal of fluorescence**, v. 19, n. 4, p. 715–21, 2009.

- 11 Oliveira Silva, F.R. De; Monteiro, A.M.; et al. Analytical quantification of low-density lipoprotein using europium tetracycline indicator. **Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence**, v. 24, n. 3, p. 189–93, 2009.
- 12 Teixeira, L.D.S.; Grasso, A.N.; et al. Enhancement on the Europium emission band of Europium chlortetracycline complex in the presence of LDL. **Analytical biochemistry**, v. 400, n. 1, p. 19–24, 2010.
- 13 Krebs, M.R.H.; Bromley, E.H.C.; et al. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. **Journal of structural biology**, v. 149, n. 1, p. 30–7, 2005.
- 14 Griffin, M.D.W.; Wilson, L.M.; et al. Thioflavin T fluorescence in human serum: correlations with vascular health and cardiovascular risk factors. **Clinical biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 278–86, 2010.
- 15 Frank S. et.al. Lipoproteins - Role in Health and Diseases. In: Saša Frank and Gerhard Kostner (Ed.); **Lipoproteins - Role in Health and Diseases**. InTech, 2012, p. XI–XIV.
- 16 Jairam, V., Uchida, K., et al. Pathophysiology of Lipoprotein Oxidation. In: **Lipoproteins - Role in Health and Diseases**. 2012, p. Chapter 16, 383-408.
- 17 Cavalcante, L. da S. **Otimização e aplicação da quantificação do colesterol da lipoproteína de baixa densidade pequena e densa (sd-LDL-C)**. **Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina**. 2011.
- 18 Segrest, J.P.; Jones, M.K.; et al. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. **Journal of lipid research**, v. 42, n. 9, p. 1346–67, 2001.
- 19 Daniel J. Rader, H.H.H. Disorders of lipoprotein metabolism. In: **Harrison's endocrinology**. p. 323–346.
- 20 Costa, P. de M. **Polimorfismo da Apolipoproteína E e Perfil de Distribuição de Subfrações de Lipoproteínas**. **Dissertação de mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**. 2004.

- 21 Silva, A.N. da **Quantificação de Lipoproteínas por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**. Dissertação de mestrado. **Universidade de São Paulo**. 2008.
- 22 Otvos, J.D.; Jeyarajah, E.J.; et al. Measurement issues related to lipoprotein heterogeneity. **The American journal of cardiology**, v. 90, n. 2, p. 22i–29i, 2002.
- 23 Forti, N.; Diament, J. Lipoproteínas de Alta Densidade: Aspectos Metabólicos, Clínicos, Epidemiológicos e de Intervenção Terapêutica. Atualização para os Clínicos. **Arq Bras Cardiol**, n. 87, p. 671–679, 2006.
- 24 Kokkinos, P. Dietary Concepts: The Essentials. In: **Physical Activity and Cardiovascular Disease Prevention**. Canada: Jones and Bartlett Publishers, 2010, p. 50–85.
- 25 Viera, J.L.C, Gomes, M.E.W, Almeida, A.B., Moriguchi, E.H. Alterações do Perfil das Subfrações de Lipoproteínas Associadas à Terapia de Reposição Hormonal. v. 76, n. nº 3, p. 10–14, 2001.
- 26 Junqueira L. C., Carneiro, J. **Histologia Básica**. 2004.
- 27 Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 32, n. 9, p. 2045–51, 2012.
- 28 Rios, F.J.O. **Sinalização intracelular e expressão de receptores mediados por LDL modificada e peptídeos da apolipoproteínaB-100 em monócitos / macrófagos humanos**. Tese de doutorado. **Universidade de São Paulo**. 2009.
- 29 Alves, A.C.; Soares, L.; et al. Desenvolvimento de placas de ateroma em pacientes diabéticos e hipertensos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 73–77, 2010.
- 30 Brotto, R.S. **Avaliação do risco cardiovascular em indivíduos com periodontite**. 2007. Dissertação Mestrado. **Universidade Estadual Paulista**

“Júlio de Mesquita Filho”. 2007.

31 Moghadasian, M.H. Experimental atherosclerosis: A historical overview. **Life Sciences**, v. 70, n. 8, p. 855–865, 2002.

32 Dornas, W.C. Aterosclerose Experimental em Coelhos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 272–278, 2009.

33 Chapman, M.J. Animal lipoproteins : chemistry , structure , and comparative aspects. **Journal of lipid research**, v. 21, p. 789–844, 1980.

34 Baraga, J.J.; Rava, R.P.; et al. Laser induced fluorescence spectroscopy of normal and atherosclerotic human aorta using 306-310 nm excitation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 10, n. 3, p. 245–261, 1990.

35 Laifer, L.I.; O'Brien, K.M.; et al. Biochemical basis for the difference between normal and atherosclerotic arterial fluorescence. **Circulation**, v. 80, n. 6, p. 1893–1901, 1989.

36 Bünzli, J.-C.G. Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. **Chemical reviews**, v. 110, n. 5, p. 2729–55, 2010.

37 Tereza S. Martins Terras Raras: Aplicações Industriais e Biológicas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 111–117, 2005.

38 Selvin, P.R.; Jancarik, J.; et al. Crystal Structure and Spectroscopic Characterization of a Luminescent Europium Chelate. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 700–705, 1996.

39 Leif, R.C.; Vallarino, L.M.; et al. Increasing the Luminescence of Lanthanide Complexes. **Cytometry Part A**, v. 778, p. 767–778, 2006.

40 Courrol, L.C.; Oliveira Silva, F.R. de; et al. Energy transfer study of europium–tetracycline complexes. **Journal of Luminescence**, v. 122–123, p. 288–290, 2007.

41 Chopra, I.; Roberts, M. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action ,

Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance
Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and
Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology
Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

42 Pereira-maia, E.C.; et.al Tetraciclina e Gliciliclinas: Uma visão geral.
Química Nova, v. 33, n. 3, p. 700–706, 2010.

43 Nelson, M.L. Chemical and Biological Dynamics of Tetracyclines. **Advances
in Dental Research**, v. 12, n. 1, p. 5–11, 1998.

44 Carlotti, B.; Fuoco, D.; et al. Fast and ultrafast spectroscopic investigation
of tetracycline derivatives in organic and aqueous media. **Physical chemistry
chemical physics : PCCP**, v. 12, n. 48, p. 15580–15591, 2010.

45 Ghorai, S.K.; Samanta, S.K.; et al. Tuning of “antenna effect” of Eu(III) in
ternary systems in aqueous medium through binding with protein. **Inorganic
chemistry**, v. 52, n. 3, p. 1476–87, 2013.

46 Chi, Z.; Liu, R.; et al. Binding of tetracycline and chlortetracycline to the
enzyme trypsin: Spectroscopic and molecular modeling investigations. **PLoS
ONE**, v. 6, n. 12, p. 1–9, 2011.

47 Lindgren, I.; Raekallio, J. Accumulation of tetracyclines in atherosclerotic
lesions of human aorta. **Acta pathologica et microbiologica**, 1965.

48 Murphy-Chutorian, D.; Kosek, J.; et al. Selective absorption of ultraviolet
laser energy by human atherosclerotic plaque treated with tetracycline. **The
American Journal of Cardiology**, v. 55, n. 11, p. 1293–1297, 1985.

49 Miyagi, M.; Nakajima, H.; et al. Fluorescence spectrum analysis of
atherosclerotic plaque using doxycycline. **Japanese circulation journal**, v. 63,
n. 5, p. 379–86, 1999.

50 Oliveira Silva, F.R. **Diagnóstico de câncer de próstata baseado nos
métodos de caracterização espectroscópica de porfirinas do sangue e de**

quantificação de citrato na urina através do complexo európio-oxitetraciclina. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Paulo. 2011.

51 Courrol, L.C.; Samad, R.E. Applications of Europium Tetracycline Complex: A Review. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 4, p. 238–248, 2008.

52 Sicchieri, L.B, Silva, D.C., Courrol, L.C. Atheroma optical imaging using europium Chlortetracycline complex fluorescent probe. In: **Latin America Optics and Photonics Technical Digest**. 2012, p. 3–5.

53 Hirsch, L.; Vangeel, T.; et al. Characteristics of the binding of europium(III) to tetracycline. **Analytica Chimica Acta**, v. 166, p. 207–219, 1985.

54 Oliveria Silva, F.R. **Desenvolvimento de um biossensor de peróxido de hidrogênio de baixo custo baseado na emissão do Európio III. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.**

55 Courrol, L.C.; Monteiro, a M.; et al. Novel fluorescent probe for low density lipoprotein, based on the enhancement of Europium emission band. **Optics express**, v. 15, n. 11, p. 7066–74, 2007.

56 Teixeira, L.D.S.; Grasso, A.N.; et al. Enhancement on the Europium emission band of Europium chlortetracycline complex in the presence of LDL. **Analytical biochemistry**, v. 400, n. 1, p. 19–24, 2010.

57 Dürkop, A.; Wolfbeis, O.S. Nonenzymatic direct assay of hydrogen peroxide at neutral pH using the Eu3Tc fluorescent probe. **Journal of fluorescence**, v. 15, n. 5, p. 755–61, 2005.

58 Rakicioglu, Y.; Perrin, J.H.; et al. Increased luminescence of the tetracycline-europium(III) system following oxidation by hydrogen peroxide. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 20, n. 1–2, p. 397–9, 1999.

59 Wu, M.; Lin, Z.; et al. Fluorescence imaging of the activity of glucose oxidase using a hydrogen-peroxide-sensitive europium probe. **Analytical biochemistry**,

v. 340, n. 1, p. 66–73, 2005.

60 Dürkop, A.; Wolfbeis, O.S. Nonenzymatic direct assay of hydrogen peroxide at neutral pH using the Eu3Tc fluorescent probe. **Journal of fluorescence**, v. 15, n. 5, p. 755–61, 2005.

61 Wu, M.; Lin, Z.; et al. Time-resolved enzymatic determination of glucose using a fluorescent europium probe for hydrogen peroxide. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 380, n. 4, p. 619–26, 2004.

62 Courrol, L.C.; Bellini, M.H.; et al. Urea hydrogen peroxide determination in whole blood using europium tetracycline probe. **Analytical biochemistry**, v. 355, n. 1, p. 140–4, 2006.

63 Teixeira, L.D.S. **Estudos das propriedades ópticas dos complexos európio tetraciclina e suas aplicações na detecção de lipoproteínas. 2010. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo. 2010.**

64 Groenning, M.; Norrman, M.; et al. Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils. **Journal of structural biology**, v. 159, n. 3, p. 483–97, 2007.

65 Khurana, R.; Coleman, C.; et al. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. **Journal of structural biology**, v. 151, n. 3, p. 229–38, 2005.

66 Stsiapura, V.I.; Maskevich, A. a; et al. Computational study of thioflavin T torsional relaxation in the excited state. **The journal of physical chemistry. A**, v. 111, n. 22, p. 4829–35, 2007.

67 Stsiapura, V.I.; Maskevich, A. a; et al. Thioflavin T as a molecular rotor: fluorescent properties of thioflavin T in solvents with different viscosity. **The journal of physical chemistry. B**, v. 112, n. 49, p. 15893–902, 2008.

68 Stsiapura, V.I.; Maskevich, A.A. Charge Transfer Process Determines Ultrafast Excited State Deactivation of Thioflavin T in Low-Viscosity Solvents. p. 8345–8350, 2010.

- 69 Morimoto, K.; Kawabata, K.; et al. Characterization of type I collagen fibril formation using thioflavin T fluorescent dye. **Journal of biochemistry**, v. 145, n. 5, p. 677–84, 2009.
- 70 Sen, P.; Fatima, S.; et al. Interactions of thioflavin T with serum albumins: spectroscopic analyses. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 74, n. 1, p. 94–99, 2009.
- 71 Guevara, E.A.C. **Fotodegradação de fenotiazinas e seus efeitos estruturais sobre a Na⁺,K⁺-ATPase: Estudo através da fluorescência. Tese de doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. 2010.**
- 72 Lakowicz, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 1999.
- 73 Barioni, M.B. **Propriedades estruturais de membranas modelo em interação com o composto anti- Leishmania miltefosina Propriedades estruturais de membranas modelo em interação com o composto anti- Leishmania miltefosina. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 2014.**
- 74 Marcu, L. Fluorescence lifetime in cardiovascular diagnostics. **Journal of biomedical optics**, v. 15, n. 1, p. 011106(1)-011106(10), 2010.
- 75 Phipps, J.E. **Time-resolved fluorescence techniques for atherosclerotic cardiovascular disease characterization. Tese de doutorado. University of Washington, Seattle. Estados Unidos da América. 2005.**
- 76 Thomas, P.; Pande, P.; et al. Biochemical imaging of human atherosclerotic plaques with fluorescence lifetime angioscopy. **Photochemistry and photobiology**, v. 86, n. 3, p. 727–31, 2010.
- 77 Rinco, O.; Brenton, J.; et al. The effect of porphyrin structure on binding to human serum albumin by fluorescence spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 208, n. 2–3, p. 91–96, 2009.

- 78 Ko, A.C.T.; Ridsdale, A.; et al. Nonlinear optical microscopy in decoding arterial diseases. **Biophysical Reviews**, v. 4, n. 4, p. 323–334, 2012.
- 79 Suhalim, J.L.; Chung, C.-Y.; et al. Characterization of cholesterol crystals in atherosclerotic plaques using stimulated Raman scattering and second-harmonic generation microscopy. **Biophysical journal**, v. 102, n. 8, p. 1988–95, 2012.
- 80 Leila, B. **Multimodal characterization of atherosclerotic cardiovascular disease with label-free non-linear optical imaging techniques. Tese de doutorado. University of Manitoba, Canadá.** 2015.
- 81 Cicchi, R.; Matthäus, C.; et al. Characterization of collagen and cholesterol deposition in atherosclerotic arterial tissue using non-linear microscopy. **Journal of Biophotonics**, v. 7, n. 1–2, p. 135–143, 2014.
- 82 Cicchi, R.; Vogler, N.; et al. From molecular structure to tissue architecture: Collagen organization probed by SHG microscopy. **Journal of Biophotonics**, v. 6, n. 2, p. 129–142, 2013.
- 83 Sacks, F.M.; Alaupovic, P.; et al. VLDL, Apolipoproteins B, CIII, and E, and Risk of Recurrent Coronary Events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Trial. **Circulation**, v. 102, n. 16, p. 1886–92, 2000.
- 84 Maskevich, A. a; Stsiapura, V.I.; et al. Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 4, p. 1392–401, 2007.
- 85 Sulatskaya, A.I.; Kuznetsova, I.M.; et al. Interaction of thioflavin T with amyloid fibrils: stoichiometry and affinity of dye binding, absorption spectra of bound dye. **The journal of physical chemistry. B**, v. 115, n. 39, p. 11519–24, 2011.
- 86 Hiltunen, T.P.; Luoma, J.S.; et al. Expression of LDL Receptor, VLDL Receptor, LDL Receptor Related Protein, and Scavenger Receptor in Rabbit Atherosclerotic Lesions: Marked Induction of Scavenger Receptor and VLDL Receptor Expression During Lesion Development. **Circulation**, v. 97, n. 11, p.

1079–1086, 1998.

87 Lusis, A.J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233–241, 2000.

88 Tony P. Smith, Andrew H. Cragg, Steve K. Landas, Kevin S. Berbaum Plaque Modification with Tetracycline: Enhanced Tissue Ablation with the Excimer Laser. **Radiology**, v. 174, n. 3, p. 1009–1011, 1990.

89 Jing Liu, Yang Sun, Jinyi Qi, L.M. A novel method for fast and robust estimation of fluorescence decay dynamics using constrained least-square deconvolution with Laguerre expansion. **Phys Med Biol**, v. 57, n. 4, p. 843–865, 2012.

90 Phipps, J.; Sun, Y.; et al. Fluorescence lifetime imaging for the characterization of the biochemical composition of atherosclerotic plaques. **Journal of biomedical optics**, v. 16, n. 9, p. 96018, 2011.

91 Andersson-Engels, S.; Johansson, J.; et al. Fluorescence imaging and point measurements of tissue: applications to the demarcation of malignant tumors and atherosclerotic lesions from normal tissue. **Photochemistry and photobiology**, v. 53, n. 6, p. 807–14, 1991.

92 Marcu, L.; Fishbein, M.C.; et al. Discrimination of Human Coronary Artery Atherosclerotic Lipid-Rich Lesions by Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, p. 1244–1250, 2001.

93 Marcu, L.; Fishbein, M.C.; et al. Discrimination of Human Coronary Artery Atherosclerotic Lipid-Rich Lesions by Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 7, p. 1244–50, 2001.

94 Haidar, D.A.; Leh, B.; et al. Spectral and lifetime domain measurements of rat brain tumors. **Biomedical Optics Express**, v. 6, n. 4, p. 1219, 2015.

95 Nascimento da Silva, M.; Sicchieri, L.B.; et al. Liquid biopsy of

atherosclerosis using protoporphyrin IX as a biomarker. **The Analyst**, v. 139, n. 6, p. 1383–1388, 2014.

96 Islam, M.S.; Honma, M.; et al. pH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 1, p. 1952–63, 2013.

97 Keijzer, M.; Richards-Kortum, R.R.; et al. Fluorescence spectroscopy of turbid media: Autofluorescence of the human aorta. Dados disponíveis no site <http://omlc.org/spectra/aorta/citations.html>. Disponível em: 07/08/2016. **Applied optics**, v. 28, n. 20, p. 4286–4292, 1989.

98 Santos, I. Dos; Mazères, S.; et al. FRET: A tool to study the interaction between apatite and collagen? **Materials Letters**, v. 62, n. 28, p. 4377–4379, 2008.

99 Chou, K.; Dennis, A. Förster Resonance Energy Transfer between Quantum Dot Donors and Quantum Dot Acceptors. **Sensors**, v. 15, n. 6, p. 13288–13325, 2015.

100 Mecheri, B.; Gambinossi, F.; et al. Modulation of tetracycline-phospholipid interactions by tuning of pH at the water-air interface. **Biophysical Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 15–26, 2004.

101 Caminati, G.; Focardi, C.; et al. Spectroscopic investigation of tetracycline interaction with phospholipid Langmuir–Blodgett films. **Materials Science and Engineering: C**, v. 22, n. 2, p. 301–305, 2002.

102 Daniel Sage ImageJ's plugin for directional analysis in images. Disponível em <http://bigwww.epfl.ch/demo/orientation/>. Data da visitao: 08/06/2016.

103 Fischer G Swain M Cherian K Increased vascular collagen and elastin synthesis in experimental atherosclerosis in the rabbit Variation in synthesis among major vessels. **Atherosclerosis**, v. 28, n. 1, p. 11–20, 1977.

104 Langner RO, M.J. Alteration of collagen synthesis in different tissues of the

atherosclerotic rabbit. **Artery**, v. 9, n. 4, p. 253–261, 1981.

105 Rekhter, M.D. Collagen snythesis in atherosclerosis: too much and not enough. **Cardiovascular Research**, v. 41, p. 376–384, 1999.

106 Greilberger, J.; Schmut, O.; et al. In Vitro Interactions of Oxidatively Modified LDL With Type I, II, III, IV, and V Collagen, Laminin, Fibronectin, and Poly-D-Lysine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, n. 11, p. 2721–2728, 1997.

107 Gospodarowicz, D.; Tauber, J.P. Growth factors and the extracellular matrix. **Endocrine Reviews**, v. 1, n. 3, p. 201–227, 1980.

108 Vlassara, H. Advanced glycation end-products and atherosclerosis. **Annals of medicine**, v. 28, n. 5, p. 419–26, 1996.

109 Jaeger, E.; Rust, S.; et al. Joint occurrence of collagen mRNA containing cells and macrophages in human atherosclerotic vessels. **Atherosclerosis**, v. 86, n. 1, p. 55–68, 1991.

9 Anexo A

Comitês de Ética anexado na página abaixo.

São Paulo, 28 de setembro de 2012

CEP Nº: **0327/12**

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): Letícia Bonfante Sicchieri

Disciplina/Departamento: Física

Pesquisadores associados: Lília Coronato Courrol (orientadora), Ricardo Elgul Samad, Monica Nascimento da Silva, Daliana Christine Silva

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

TÍTULO DO ESTUDO: Análise de Imagem Óptica para mapeamento de lipoproteínas utilizando sondas fluorescentes :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria B - estudo crônico

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: 1. Análises in-vitro: Síntese dos biossensores Európio-Clorotetraciclina (EuCTc) e Tioflavina T (ThT); e caracterização dos sensores na presença de LDL nativa ou modificada, por meio da espectroscopia óptica. 2. Modelo Animal: Indução de hipercolesterolemia em coelhos, extração de sangue e separação de LDL. Análise da evolução da intensidade do sinal de fluorescência dos biossensores com LDL em função do tempo de ingestão da dieta calórica. Comparação das análises do sinal de fluorescência dos biossensores com LDL extraída do plasma e na presença de sangue total. Verificação de alterações microscópicas das córneas (arcus corneus) e das artérias (placa de ateroma) em modelo experimental com coelhos alimentados com e sem restrição calórica, em diferentes tempos de tratamento utilizando os marcadores de fluorescência EuCTc e ThT.

RESUMO: Estudo com 20 coelhos Nova Zelândia, machos, com 4 semanas. Anestésico: quetamina e xilazina. Eutanásia: sobredose de anestésico e exsanguinação. Será estudada a emissão fluorescente de dois biossensores Európio-Clorotetraciclina (EuCTc) e Tioflavina T (ThT) na presença de pequenas quantidades de sangue, para obter assim uma metodologia da dosagem de LDL em tempo real e de baixo custo. O complexo Európio-Clorotetraciclina apresenta um aumento de até cinco vezes na banda de emissão do Európio quando na presença de pequenas quantidades de LDL. Foi demonstrado que há um aumento na emissão fluorescente Tioflavina T na presença de soro humano, demonstrando que a ThT pode ser um novo método para avaliação de risco cardiovascular. Tanto o complexo EuCTc como o corante ThT são de fácil síntese, operam em pH neutro, apresentam alta estabilidade e baixo custo. Nesse estudo será analisado o estadiamento da progressão da aterosclerose, bem como a formação do arco corneal e análise do plasma sanguíneo na presença dos biossensores EuCTc e ThT através de técnicas de fluorescência. Para isso será feita a análise de fluorescência do sangue de coelhos submetidos à dieta rica em colesterol e paralelamente as artérias e córneas destes animais serão caracterizadas por microscopia de fluorescência pela utilização do complexo EuCTc como marcador fluorescente, acompanhando o desenvolvimento do quadro de hipercolesterolemia. No estudo com animais, os coelhos serão divididos em 2 grupos: - Grupo 1 – Grupo normal – 2 animais receberão ração comercial molhada com clorofórmio. - Grupo 2 – Grupo experimental – 3 animais receberão alimentação rica (1% de colesterol diluído em clorofórmio). Os dois grupos receberão a mesma quantidade de ração por dia, cerca de 300g. Cada coelho será submetido às dosagens plasmáticas de glicemia, colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos. Em seguida será repetido o experimento descrito acima, alterando apenas o tempo de dieta dos animais. Na primeira etapa serão 15 dias de experimento, na segunda etapa 30 dias, na terceira etapa 45 dias de experimento e na última etapa 60 dias de experimento. Após eutanásia, serão coletados os órgãos: artérias e olhos.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: No Brasil, as doenças cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de morte. O aumento da concentração de partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para valores acima do considerado normal está relacionado ao desenvolvimento de aterosclerose. A principal motivação deste trabalho advém da idéia de que é importante se medir os níveis de colesterol, pois se estiverem fora das faixas adequadas, a correção dessa anormalidade leva a uma redução substancial de eventos patológicos. Nosso principal desafio é testar se a metodologia de quantificação de LDL, utilizando biossensores, é válida em sangue total, o que viabiliza uma forma simples e rápida de quantificação de LDL.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo. Apresenta carta de concordância com o estudo, do Centro de Laser e Aplicações - IPEN/CNEN e do Laboratório de Lasers e Óptica Biomédica Aplicada- LOBA da UNIFESP Campus Diadema.

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 36 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 23/09/2013 e 18/09/2014

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

São Paulo, 1 de fevereiro de 2013
CEP Nº: 0374/12

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): MÔNICA NASCIMENTO DA SILVA

Disciplina/Departamento Ciências da Sustentabilidade-CAMPUS DIADEMA

Pesquisadores associados: Letícia Bonfante Sicchieri, Lília Coronato Courrol (orientadora), Valéria Pereira Lanzoni

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

TÍTULO DO ESTUDO: Análise da fluorescência do sangue de coelhos com tumor hepático submetido à dieta hipercalórica :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria D - estudo crônico

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Análise do efeito da dieta hipercalórica no crescimento de tumor de fígado em coelhos. Análise e estudo da PPIX do sangue total de coelhos com câncer hepático (primário e metastático) através do método de Fluorescência. Específicos Indução da dieta hipercalórica em coelhos, extração de sangue e separação da LDL. Inoculação do tumor no fígado do coelho. Análise do sangue total com o grupo controle (GC- dieta normal e sem tumor); grupo com dieta hipercalórica (GE) e sem tumor e o grupo com tumor (GT1 com dieta normal e GT2 com dieta calórica) com o método da fluorescência. Estudo da influência da LDL no crescimento tumoral do hepatocarcinoma hepático.

RESUMO: Estudo com 30 coelhos Nova Zelândia, machos, com 4 semanas. Anestésico: cetamina com midazolan. Analgésico: tramadol com morfina. Eutanásia: sobredose de anestésico e cloreto de potássio. Indução de hipercolesterolemia em coelhos, extração de sangue e separação de LDL. Serão utilizados, 13 coelhos brancos, para o grupo (GC) e (GE), controle machos da Nova Zelândia, adultos pesando cerca de $2,5 \pm 0,5$ Kg. O experimento será dividido em etapas: 1ª Etapa – Os animais serão divididos em grupos: Grupo Controle (GC) – 4 animais receberão ração comercial molhada com clorofórmio. Grupo dieta hipercalórica (GE)– 9 animais receberão alimentação rica (1% de colesterol diluído em clorofórmio). Para esta etapa do grupo com tumor está previsto 30 coelhos brancos, machos da Nova Zelândia, adultos. Grupo Tumor (GT2C) – 9 animais receberão alimentação normal e indução de tumor hepático via inoculação de células humanas. Grupo Tumor (GT2E) – 9 animais receberão alimentação rica (1% de colesterol diluído em clorofórmio) e indução de tumor hepático via inoculação de células humanas. Os grupos GE e GT serão divididos em três subgrupos coelhos brancos que receberão a dieta por períodos diferentes. O primeiro grupo receberá a ração por 20 dias, o segundo grupo por 40 dias, e o terceiro grupo por 60 dias. Modelo animal com tumor. Para usar células humanas em coelhos os animais deverão ser imunossuprimidos diariamente com ciclosporina

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O fígado é um órgão bem vascularizado que circula corrente sanguínea, e desempenha várias funções. Por isto, é de extrema importância o estudo de câncer hepático e um método que possa diagnosticar estes tumores de forma não invasiva e de baixo custo para a população. As diferenças no acúmulo da PPIX nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais estão relacionadas às características fisiológicas diferenciadas do tumor: o microambiente do tumor, onde as células crescem desordenadamente, resultando em arranjos celulares de maior volume intersticial; o tumor apresenta uma drenagem linfática deficitária e hipervascularidade; uma concentração de receptores de LDL maior que no tecido normal (derivados porfirínicos exibem alta afinidade por lipoproteínas de baixa densidade) e pH inferior ao do tecido sadio. A fluorescência da PPIX poderia auxiliar no diagnóstico do câncer hepático. A PPIX é um fluoróforo endógeno que está presente em maiores quantidades em tecidos tumorais que sadios.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo e apresentada a planilha de custos adequadamente após solicitação do CEP/CEUA da Unifesp

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 24 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 27/01/2014 e 22/01/2015

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Comentários: Adequado

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo