

FRANCISCO JOSÉ OLIVEIRA RIOS

Sinalização intracelular e expressão de receptores mediados por LDL modificada e peptídeos da apolipoproteínaB-100 em monócitos/macrófagos humanos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**São Paulo
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FRANCISCO JOSÉ OLIVEIRA RIOS

Sinalização intracelular e expressão de receptores mediados por LDL modificada e peptídeos da apolipoproteínaB-100 em monócitos/macrófagos humanos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Magnus Ake Gidlund
Co-orientadora: Profa. Dra. Sonia Jancar

**São Paulo
2009**



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 286, referente ao projeto intitulado: “*Efeito de formas modificadas da LDL e de suas frações sobre monócitos/macrófagos: receptores envolvidos e indução de citocinas, óxido nítrico e prostaglandinas* ” sob a responsabilidade de **Francisco José Oliveira Rios**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 24 de março de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coodenador da CEPsh - ICB/USP

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPESP.

Processo: 04/15545-3

Parte deste projeto foi feita no Instituto Karolinska, Estocolmo-Suécia,
com financiamento da CAPES para estágio de doutorado no exterior.

Processo: BEX4690/06-0

Aos meus pais, Simão e Maria das Neves, por sempre me apoiarem na caminhada do aprendizado.

A tia Liduína, por todo apoio, dedicação e amizade.

AGRADECIMENTOS

Os dias que antecedem à finalização de uma tese são sempre cheios de uma grande carga de *stress*. Não teria como ser diferente. São nesses dias que começamos a avaliar o nosso trabalho. Qual seria a importância do mesmo na nossa formação. Assim, os momentos vividos chegam como um relâmpago na memória e me pego a pensar em quantas pessoas foram importantes, não só para o trabalho, mas também para a formação humana. Este é o momento de deixar registrado todo o meu agradecimento.

Para uma tese necessita-se de orientador. Não satisfeito apenas com um, eu tive dois orientadores: Magnus Gidlund e Sonia Jancar. A vocês minha admiração e gratidão pela confiança em mim depositada. Aprendi bastante com vocês e espero continuar aprendendo.

Ao Prof. Zhong-qun Yan e Prof. Goran Hansson pela orientação durante a meu estágio de doutorado sanduíche no Instituto Karolinska, Suécia.

À FAPESP pelo apoio financeiro no doutorado.

À Capes pelo apoio financeiro durante o estágio de doutorado sanduíche em Estocolmo-Suécia.

Aos professores que participaram da banca de qualificação: Profa. Dulcinéia Abdalla, Profa. Regina Lima e Prof. Francisco Fonseca. As discussões e sugestões foram essenciais para o enriquecimento do trabalho.

Ao time do Laboratório de Imunofisiopatologia: Gabriela, Eduardo, Andréa, Ivo, Ronald. A Silvana, por seu apoio técnico e por sempre nos ajudar quando precisamos. Vocês foram necessários em todos os momentos.

Ao time do Laboratório de Imunofarmacologia: Mariana, Luciano, Joilson, Matheus, Marina. Obrigado por terem me deixado invadir o espaço de vocês.

Aos integrantes do laboratório de pesquisa cardiovascular do Instituto Karolinska, Estocolmo-Suécia. Em especial a Daniel Ketelhuth, que muito ajudou durante a meu estágio no laboratório.

A profa Hiro Goto e todos os integrantes LIM-38: Célia, Prianti, Ângelo, Edna, Edite e Fabrício.

Às amigadas que começaram no laboratório, e que mesmo não estando mais presentes, me ajudaram bastante: Karla, Márcia, Milca, Ellena e Henrique.

Ao grupo da secretaria do departamento de Imunologia – ICB: Jotelma, Amarildo, Amanda e Eni.

Aos amigos do departamento de Imunologia do ICB.

A Maxuel e Claudinei, grandes amigos que já me aturam por tanto tempo dividindo apartamento de uma maneira tão divertida. Vocês são demais!

Aos meus pais, Maria das Neves e Simão Pedro. A meus irmãos, Júnior e Gilberto. À minha avó Maria, sempre abençoando meu caminho. À tia Liduína, sempre tão presente na minha caminhada. A todos os outros da minha família, que sempre se empenharam em torcer pelas realizações, que vibram com as conquistas e que me trazem o conforto que preciso, mesmo longe de casa. Sou imensamente grato por todos os instantes em que nos dedicamos um ao outro e por me darem a força que preciso com palavras de perseverança.

A Deus, por ter me presenteado com tantas pessoas boas em meu caminho.

"A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar noutra lugar o que ela não nos pode dar."

Sigmund Freud

"Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber."

Confúcio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Características inflamatórias na aterosclerose.....	22
1.2 A patogênese da aterosclerose.....	24
1.3 Lipoproteína de baixa densidade (LDL)	26
1.4 Modificação da partícula de LDL.....	28
1.5 Função dos macrófagos no desenvolvimento da aterosclerose.....	30
1.6 Receptor <i>scavenger</i> CD36.....	33
1.7 <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor - γ</i> (PPARγ).....	35
1.8 Receptores Fcγ	37
1.9 Receptor para o Fator Ativador de Plaquetas (PAF-R).....	38
2 HIPÓTESE DE TRABALHO E OBJETIVOS GERAIS.....	42
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Material.....	49
4.1.1 Animais.....	49
4.1.2 Reagentes.....	49
4.2 Metodologia.....	51
4.2.1 Obtenção da LDL.....	51
4.2.2 Modificação da LDL.....	52
4.2.3 Determinação de TBARS, Dienos conjugados e Hidroperóxidos lipídicos totais.	52
4.2.4 Cromatografia de Troca iônica.....	53
4.2.5 Cromatografia de Exclusão Molecular (Filtração em gel).....	54
4.2.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	54
4.2.7 Síntese de peptídeos derivados da Apolipoproteína B-100.....	55
4.2.8 Cultura das células de linhagem monocítica humana THP-1.....	55
4.2.9 Obtenção das células mononucleares e neutrófilos do sangue periférico.....	56
4.2.10 Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6.....	57
4.2.11 Células Endoteliais de Aorta Humana (HAEC).....	57
4.1.12 Células HEK293 hTLR4.....	58
4.3 Protocolos experimentais utilizados nos experimentos com as formas oxidadas da LDL.....	58
4.3.1 Citometria de Fluxo.....	59
4.3.2 Dosagem de IL-6, IL-8, TNF-α, IL-10 e TGF-β em células THP-1 estimuladas com as LDL's modificadas.....	60
4.4 Protocolos experimentais utilizados nos experimentos com p216	60
4.4.1 Verificação da presença de contaminação por LPS em p216.....	61

4.4.2 Tratamento de monócitos e neutrófilos humanos, células endoteliais de aorta humana e macrófagos murinos com p216.....	61
4.4.3 Análise da expressão de mRNA para IL-8 em células mononucleares humanas.....	62
4.4.4 Análise da fosfoliração de ERK1/2, p38 MAP quinase e JNK em células THP-1.....	61
4.4.5 Leitura do fluxo de Cálcio intracelular.....	64
4.5 Análise Estatística.....	67
5 RESULTADOS	69
CAPÍTULO 5.1 CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS OXIDADAS DA LDL E SEU EFEITO NA EXPRESSÃO DE RECEPTORES CD36 E FCγRII EM MONÓCITOS/MACRÓFAGOS HUMANOS E ENVOLVIMENTO DE PPARγ.....	69
5.1.1 Cromatografia de troca iônica das formas oxidadas da LDL	69
5.1.2 Eletroforese em gel de agarose das formas oxidadas da LDL	70
5.1.3 Cromatografia de Exclusão Molecular das formas oxidadas da LDL	71
5.1.4 Microscopia eletrônica das diferentes formas oxidadas da LDL.....	73
5.1.5 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), dienos conjugados e hidroperóxidos lipídidos totais das LDL's com diferentes graus de oxidação.	73
5.1.6 Expressão de CD36, Fc γ RII e CD11b/CD18 (mac-1) em células THP-1..	74
5.1.7 Efeitos de formas oxidadas da LDL na expressão de CD36 e Fc γ RII em células THP-1.....	76
5.1.8 Envolvimento de PPAR γ na expressão de CD36 e Fc γ RII induzida por formas oxidadas de LDL.....	80
CAPÍTULO 5.2 A EXPRESSÃO DE CD36 INDUZIDA POR LoxLDL e HoxLDL EM MONÓCITOS/ MACRÓFAGOS HUMANOS É PARCIALMENTE DEPENDENTE DE PAF- R.....	83
5.2.1 Ativação do PAF-R induz a expressão de CD36 em células THP-1.....	83
5.2.2 A expressão de CD36 por formas oxidadas da LDL em células THP-1 é dependente de PAF-R.....	85
CAPÍTULO 5.3 EFEITOS DE FORMAS MODIFICADAS DA LDL NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS THP-1.....	88
5.3.1 Produção de IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10 e TGF- β induzidas por formas modificadas da LDL em macrófagos.....	88
CAPÍTULO 5.4 CARACTERÍSTICAS DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA APOB-100 E SEU EFEITO EM MONÓCITOS HUMANOS.....	92
5.4.1 <i>Screening</i> de peptídeos da ApoB-100.....	92
5.4.2 Verificação da contaminação por LPS em p216.....	94
5.4.3 <i>Screening</i> de fragmentos do p216 responsáveis pela indução de IL-8.	95

5.4.4 Expressão de mRNA para IL-8 em PBMC induzido por p216.....	96
5.4.5 Citocinas e quimiocinas induzidas pelo p216.....	98
5.4.6 Ativação de MAP quinases por p216 e sua relevância para a produção de IL-8 em monócitos humanos.....	101
5.4.7 Mobilização de Cálcio por p216 em monócitos humanos.....	104
CAPITULO 5.5 CARACTERISTICAS GERAIS DO PEPTÍDEO p216.....	106
5.5.1 Antigenicidade de p216.....	106
5.5.2 Análise da sequência de aminoácidos de p216 por BLAST.....	108
5.5.3 Clivagem Proteolítica da ApoB-100 e liberação de p216.....	109
6 DISCUSSÃO.....	112
7 CONCLUSÕES.....	129
REFERÊNCIAS	131
ANEXOS.....	146
ANEXO A – ANALISE DE HOMOLOGIA DE p216 POR BLAST.....	
ANEXO B – ARTIGO: Role of PPAR-gamma in the Modulation of CD36 and FcγR2b induced by LDL with Low and High Degrees of Oxidation During the Differentiation of the Monocytic THP-1 Cell Line.....	
ANEXO C – ARTIGO: Differential expression of cytokines, chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease.....	
ANEXO D – ARTIGO: Effect of insulin-like growth factor-I on Leishmania amazonensis promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage in vitro	

1 INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma das principais causas das doenças cardiovasculares responsáveis pela morte prematura atualmente. Durante muitos anos foi considerada um problema de saúde pública referente principalmente às sociedades mais desenvolvidas, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade nesses países (Wick et al., 2001). Entretanto, nos dias atuais, devido principalmente a mudanças no padrão de vida social e costumes alimentares, os países em processo de desenvolvimento vêm apresentando um quadro diferente, chamando a atenção das organizações de saúde locais e até mesmo da Organização Mundial da Saúde, a qual já considera as doenças cardiovasculares como a principal causa das mortes no mundo (World Health Organization, 2009). No Brasil, são responsáveis por cerca de 27% dos óbitos, consideradas as principais causas de mortalidade na população adulta (Ministério da Saúde, 2009).

A pesquisa relacionada às doenças cardiovasculares tem direcionado de maneira significativa as considerações clínicas dos fatores e/ou situações de risco responsáveis pelo seu desenvolvimento. O diagnóstico atual utilizado como marcador para a aterosclerose leva em consideração a obesidade, hipertensão e diabetes, além da concentração elevada de colesterol sanguíneo. Entretanto, dados recentes mostraram que indivíduos com ausência destes “marcadores” podem desenvolver uma doença cardiovascular grave, podendo ocasionar infarto do miocárdio e choque hemodinâmico, dificultando assim o diagnóstico precoce (Ridker et al., 2008).

A aterosclerose é uma doença complexa, influenciada por fatores genéticos e ambientais. Trata-se de um processo progressivo, silencioso, cujas lesões iniciam-se na primeira década de vida. Nesta fase ocorre a formação das estrias gordurosas (do inglês *fatty streak lesions*) nas células endoteliais. Estas pequenas lesões consistem principalmente de macrófagos cheios de gordura, chamados de células espumosas. Com o avanço da idade, a lesão progride para uma placa fibrosa, contendo células de

músculo liso, calcificação, deposição de lipídeo extracelular e a presença de um núcleo necrótico denso, caracterizando uma lesão aterosclerótica no seu estágio avançado, que acarreta no aparecimento dos sintomas (Hansson e Libby, 2006) .

Embora a presença celular e a resposta inflamatória característica da lesão aterosclerótica seja bem estabelecida, os eventos bioquímicos que levam a formação das estrias gordurosas, com subsequente progressão da lesão ainda não foram completamente elucidados. Inicialmente foi observado que a lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *Low Density Lipoprotein*) poderia induzir uma injúria em células de músculo liso e endoteliais humanas (Hessler et al., 1979). Entretanto, mesmo em altas concentrações de LDL não induz a transformação de macrófagos em células espumosas (Henriksen et al., 1983). Em seguida, foi demonstrado que uma modificação da partícula de LDL seria responsável por induzir uma resposta inflamatória na intima arterial, atraindo monócitos para o espaço subendotelial, transformando-os em células espumosas (Henriksen et al., 1981; Hessler et al., 1983).

1.1 Características inflamatórias na aterosclerose

A aterosclerose afeta as artérias de médio e grande calibre, sendo encontrada mais raramente em pequenos vasos (VanderLaan et al., 2004). As pesquisas em doenças cardiovasculares têm crescido de maneira considerável concentrando os esforços principalmente na concentração sérica de lipídeos e nas lipoproteínas modificadas como responsáveis pelo desenvolvimento da doença cardiovascular (Fraleley et al., 2009). Com efeito, os resultados destas pesquisas podem ser apreciados em pacientes que fazem uso das atuais drogas capazes de diminuir o colesterol sanguíneo, as estatinas, as quais têm reduzido índices de morbidade e mortalidade em indivíduos de alto risco para doenças cardiovasculares (Ridker et al., 2008). Esses resultados se acentuam quando o tratamento é acompanhado de mudanças nos hábitos alimentares e da prática de exercícios físicos. Os efeitos farmacológicos das

estatinas não são completamente claros, entretanto já se sabe que não estão concentrados apenas ao controle dos níveis de colesterol, mas também na diminuição da resposta inflamatória (Jain e Ridker, 2005) característica de uma lesão aterosclerótica .

As células inflamatórias constituem a maior parte das lesões ateroscleróticas e muitas destas células possuem sinais de ativação (Hansson, 2005). Foi demonstrado que o risco de ruptura da placa aterosclerótica com formação subsequente de trombos é elevado em regiões de grande concentração de células inflamatórias ativadas (Jonasson et al., 1986; Hansson, 2005). Sub-populações de células T inflamatórias circulantes são elevadas em pacientes com síndromes coronarianas agudas (van der Wal et al., 1993; Hansson, 2005). Além disso, foi demonstrado que concentrações elevadas de proteína C reativa (PCR), um marcador inflamatório, está mais relacionada a ativação inflamatória vascular que à isquemia do miocárdio (Paoletti et al., 2004; Hansson, 2005). Concentrações elevadas de Interleucina (IL) -6 e PCR também têm sido associadas com um pior prognóstico para angina instável e para infarto agudo do miocárdio (Paoletti et al., 2004). Há também evidências mostrando que doenças inflamatórias sistêmicas estão associadas ao desenvolvimento da aterosclerose (ex.: lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide) (George et al., 1999; Wallberg-Jonsson et al., 2002). Além disso, estudos em animais mostram a importância da resposta inflamatória na patogênese da aterosclerose, uma vez que animais deficientes de alguns receptores semelhantes ao Toll (TLR, do inglês *Tol-like receptor*), moléculas de adesão, citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas reduzem a lesão aterosclerótica em camundongos (Hansson, 2005; Ait-Oufella et al., 2006; Yan e Hansson, 2007).

1.2 A patogênese da aterosclerose

O processo aterosclerótico tem início quando o endotélio dos vasos sofre algum tipo de lesão, induzindo um processo inflamatório. Como consequência disso, ocorrem alterações na permeabilidade vascular, levando à saída de macromoléculas e a migração de monócitos e linfócitos T e B para a região subendotelial (Hansson e Libby, 2006). O enrijecimento da parede arterial é devido à deposição de várias moléculas na placa, incluindo lipídeos, cristais de colesterol e sais de cálcio. A consequente alteração na estrutura da parede endotelial leva a um aumento da adesão plaquetária, contribuindo para a formação de trombos. As células musculares lisas, as quais são produtoras de matriz extracelular, também passam a proliferar na área da lesão, constituindo o maior volume da placa ateromatosa no estado avançado (Munro e Cotran, 1988). Embora a proliferação de células musculares lisas ocorra de forma gradual, pequenas rupturas de placas em formação podem gerar surtos proliferativos desencadeados pela trombina ou pelo PDGF (do inglês *platelet-derived growth factor*) (Schini-Kerth et al., 1997). Esta proliferação também é observada nos macrófagos presentes nas placas de ateroma, sendo este efeito ocasionado por fatores de crescimento como *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) e o *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) (Devaraj et al., 2009) (Sakai et al., 2000).

No estado avançado da placa aterosclerótica estão presentes dois componentes estruturais distintos: um núcleo lipídico, pouco denso, e a capa fibrosa. O núcleo lipídico é rico em lipídios extracelulares, principalmente cristais e ésteres de colesterol. Enquanto a capa fibrosa, a qual compreende cerca de 70% do tamanho total da placa é formada basicamente por células musculares lisas, matriz extracelular e células inflamatórias (Glass e Witztum, 2001).

Os eventos iniciais da aterosclerose vêm sendo alvo de diversas hipóteses ao longo dos anos. Em 1973, Russel Ross divulgou a hipótese da "resposta à injúria tecidual", a qual foi constantemente revisada (Ross e Glomset, 1973; Ross e Glomset,

1976; Ross, 1993; Bachem et al., 1999). Esta hipótese considera como evento inicial uma lesão no endotélio da parede arterial associada a uma resposta inflamatória acarretando em uma lesão degenerativa. Esta resposta inflamatória é caracterizada pela migração de células musculares lisas da camada íntima e média arterial. As manifestações desta resposta ocorrem principalmente nas regiões de bifurcações e ramificações das artérias, onde o fluxo sanguíneo é distribuído. Estas áreas mostram um aumento da permeabilidade para macromoléculas como a LDL e um aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, possibilitando a migração de monócitos para a lesão.

Entretanto, uma outra hipótese importante foi proposta por Witztum; Steinberg (1991). Trata-se da hipótese da "modificação oxidativa", onde uma modificação por processos oxidativos da partícula de LDL poderia gerar substâncias capazes de causar um dano nas células endoteliais e iniciar o desenvolvimento da lesão. A participação da LDL oxidada (oxLDL) na aterogênese ocorreria através do recrutamento de monócitos circulantes para o espaço subendotelial, com consequente diferenciação em macrófagos, que se acumulariam na camada íntima arterial. Estes macrófagos aumentariam a captação da oxLDL, levando a formação de células espumosas (*foam cells*). Além disso, a citotoxicidade da oxLDL levaria a perda da integridade endotelial (Witztum e Steinberg, 1991).

Uma terceira hipótese foi proposta por Williams e Tabas (1995): a "reposta à retenção lipídica". Segundo os pesquisadores, em condições fisiológicas, a LDL transita entre a corrente sanguínea e o espaço subendotelial. No espaço subendotelial, ocorre a ligação da partícula de LDL, mas especificamente da Apolipoproteína-B 100 a proteoglicanos. Esta ligação induz a formação de agregados aumentando a susceptibilidade ao processo oxidativo. A LDL oxidada é capaz de ativar monócitos, induzindo a formação de células espumosas. Ativa também linfócitos T, células endoteliais e de músculo liso, contribuindo assim para o avanço da placa aterosclerótica. O principal fator responsável por esta retenção de lipoproteínas não está elucidado, porém acredita-se que características bioquímicas

da LDL, tais como tamanho, carga e a composição química, estejam relacionadas com a suscetibilidade a retenção (Williams e Tabas, 1995).

1.3 Lipoproteína de baixa densidade (LDL)

A LDL é a lipoproteína mais abundante no plasma, sendo responsável pelo transporte de colesterol para células em processo ativo de divisão, na síntese de membrana ou por tecidos que utilizam colesterol na síntese de hormônios esteróides ou sais biliares (Brown et al., 1981; Brown e Goldstein, 1986).

É constituída principalmente por lipídios, vitaminas lipossolúveis e uma parte protéica, a apolipoproteína B-100 (apoB-100). Trata-se de uma partícula esférica com um diâmetro entre 180 a 280 Å e densidade entre 1,019 a 1,063 g/mL. A partícula de LDL contém cerca de 2.700 moléculas de ácidos graxos, onde a maior parte é poliinsaturada com predominância de ácido linoléico e ácido araquidônico. O antioxidante associado mais abundante é o α -tocoferol, com cerca de 6 a 8 moléculas por partícula de LDL. Outros antioxidantes também estão presentes como o γ -tocoferol, ubiquinol-10, α -caroteno, β -caroteno, licopeno e criptoxantina, entretanto em baixas concentrações na partícula de LDL (Hevonoja et al., 2000).

As partículas de LDL interagem com receptores específicos presentes na superfície celular, são os receptores do tipo B/E, os quais reconhecem apolipoproteína B da LDL. Estes receptores regulam a captação do colesterol pela célula. Desta forma, quando o conteúdo de colesterol intracelular atinge concentrações ótimas, ocorre a inativação dos receptores para LDL (Moghadasian et al., 2001).

Cada partícula de LDL contém uma única molécula de ApoB-100, a qual é uma proteína de 500 kDa, constituída de uma única cadeia polipeptídica, contendo 4.536 resíduos de aminoácidos. De acordo com análises estruturais obtidas por Segrest et al (2001), a ApoB-100 é composta por duas regiões de folhas beta anfipáticas e três

regiões contendo domínios de hélice alfa, constituindo um modelo estrutural pentapartite: $\text{NH}_3\text{-}\alpha_1\text{-}\beta_1\text{-}\alpha_2\text{-}\beta_2\text{-}\alpha_3\text{-COOH}$ (Figura 1). A região de interação com o receptor de LDL localiza-se entre os aminoácidos 3.359-3.369. Além disso, na molécula de ApoB-100 foi detectada a presença de uma ponte dissulfeto entre as cisteínas 3.167 e 3.297, formando um *loop* em sua estrutura terciária (Segrest et al., 2001).

Diversas metodologias já foram aplicadas com a finalidade de determinar a estrutura tridimensional da partícula de LDL. Entretanto, a complexidade e o tamanho da partícula vêm sendo uma grande barreira, impedindo a obtenção da real disposição da parte lipídica e proteica da LDL. Assim sendo, os estudos com esta finalidade são baseados em clivagens proteicas e análises obtidas por programas de bioinformática específicos. Com o uso dessas ferramentas, se pode chegar a um conhecimento estrutural, a respeito da disposição de aminoácidos da ApoB-100. Apesar das limitações, este conhecimento pode contribuir de maneira significativa para o entendimento do processo patológico inicial, responsável pela migração de células inflamatórias e formação das estrias gordurosas no início da lesão (Segrest et al., 1994; Segrest et al., 1998).

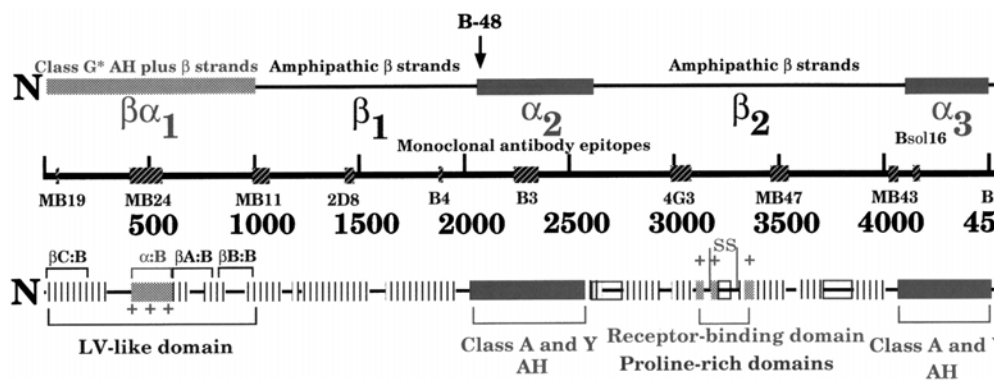


Figura 1- Diagrama esquemático do modelo pentapartite da estrutura de ApoB-100. : $\text{NH}_3\text{-}\alpha_1\text{-}\beta_1\text{-}\alpha_2\text{-}\beta_2\text{-}\alpha_3\text{-COOH}$ (Segrest et al., 1994).

1.4 Modificação da partícula de LDL

Apesar das diferentes hipóteses propostas para explicar os eventos iniciais da aterosclerose, a modificação oxidativa da partícula de LDL parece ser um fenômeno comum às hipóteses descritas acima, onde os componentes lipídicos e proteicos da partícula de LDL modificada são os principais responsáveis pelo início da resposta inflamatória na lesão.

Com o processo de oxidação, ocorrem mudanças na composição da partícula de LDL, que podem variar de acordo com o tipo, concentração e tempo de exposição ao agente oxidante utilizado no experimento (Stocker, 1994; Berliner e Heinecke, 1996; Jessup et al., 2002). Dessa forma, em um processo extenso de oxidação, que chega a atingir lipídeos internos e a parte proteica da partícula, ocorre um aumento de subprodutos tóxicos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), os quais podem servir como marcadores do processo de oxidação (Requena et al., 1997)

A LDL pode ser oxidada *in vivo* por diferentes mecanismos, entretanto ainda não está claro qual seria o mecanismo mais importante. A modificação envolve espécies reativas de oxigênio produzidas por células endoteliais e macrófagos. Além disso, algumas enzimas presentes na íntima arterial podem induzir um processo de modificação da LDL, tais como mieloperoxidases (Daugherty et al., 1994), 15-lipoxigenases (Yla-Herttuala et al., 1990) e heme-oxigenases I (Wang et al., 1998) .

Para modelos de estudo, utilizamos uma LDL extraída do plasma de indivíduos clinicamente saudáveis e oxidada *in vitro*. Este método é baseado em evidências experimentais, as quais mostram que essa LDL possui propriedades físicas, químicas e biológicas semelhantes a LDL extraída de lesões ateroscleróticas, tanto de humanos quanto de coelhos (Yla-Herttuala et al., 1989).

O processo de oxidação *in vitro* ocorre na presença de íons metálicos, como ferro ou cobre, os quais funcionam como catalisadores da decomposição de lipoperóxidos. Dessa forma a oxidação é obtida em três fases principais: uma fase

inicial, chamada fase *lag*, onde ocorre o consumo dos antioxidantes endógenos (α -tocoferol e o β -caroteno); uma segunda fase chamada de propagação, caracterizada por uma formação linear de produtos derivados da peroxidação lipídica (dienos conjugados, hidroperóxidos lipídicos e oxysteróis); e uma terceira fase chamada de terminação, caracterizada por uma concentração constante de dienos conjugados (Zarev et al., 2003).

Dependendo do grau de oxidação, também ocorre a modificação da ApoB-100, por oxidação direta ou por reagir com os produtos resultantes da oxidação lipídica. Embora a LDL pouco modificada seja ainda reconhecida pelos receptores B/E, cuja expressão é regulada negativamente pela concentração de colesterol intracelular, a modificação extensa da proteína da partícula de LDL impede a captação por estes receptores, levando a alterações da carga total da superfície passando a ser reconhecida pelos receptores *scavengers* (SR) (Endemann et al., 1993; Hevonoja et al., 2000), os quais serão comentados com mais detalhes em seguida.

O processo oxidativo da partícula de LDL gera diversos compostos, que podem interagir com diferentes receptores, gerando diversos efeitos. Estes compostos podem induzir ativação e proliferação das células de músculo liso, expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, recrutando monócitos e linfócitos T para o espaço subendotelial, iniciando assim uma resposta imunológica que será responsável pelo avanço da lesão aterosclerótica (Hansson et al., 2006). Trabalhos do nosso laboratório mostraram que oxLDL e peptídeos derivados da partícula da LDL são capazes de aumentar a permeabilidade vascular em bolsa da bochecha de hamster (Svensjo et al., 2003). Além disso, a separação cromatográfica da oxLDL (LDL oxidada) mostrou a presença de compostos proteicos de baixo peso molecular capazes de interferir com a expressão de iNOS (do inglês *inducible Nitric Oxide Synthase*) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em macrófagos (Rios, 2004). Esta separação cromatográfica também identificou produtos proteicos da oxLDL, os quais podem ser correlacionados com o prognóstico para doença cardiovascular (Ketelhuth et al., 2008).

Além das substâncias oxidantes, diversas enzimas proteolíticas e lipolíticas presentes na íntima arterial podem modificar a partícula de LDL. Diferentes proteases têm sido estudadas nesse processo, incluindo plasmina, calicreína, trombina, as quais podem induzir uma pequena fragmentação da ApoB-100. Enquanto que a tripsina, α -quimotripsina e pronase podem induzir uma degradação extensiva da ApoB-100, a qual pode resultar na formação de agregados e fusão das partículas de LDL (Piha et al., 1995). Esta fragmentação da ApoB-100 influencia na ligação com proteoglicanos, promovendo assim, a retenção da LDL na íntima arterial, contribuindo para a patogênese da aterosclerose (Pentikainen et al., 1997). Entretanto, para que ocorra fusão das partículas, é necessária não apenas a fragmentação da ApoB-100, mas também a perda de fragmentos, a qual contribuirá para a perda da estabilidade de toda a partícula de LDL, alterando assim a sua hidrofobicidade, o que permitirá a fusão entre elas (Piha et al., 1995). Além disso, anticorpos que reagem contra fragmentos da LDL gerados após a clivagem por tripsina, também mostraram reatividade contra epítopos presentes na íntima arterial (Torzewski et al., 1998). Dessa forma, a fragmentação da ApoB-100 pela ação de enzimas pode induzir a liberação de alguns fragmentos protéicos, os quais podem interagir com as células desempenhando funções biológicas e/ou ativando o sistema imunológico. Entretanto, pouco se sabe a respeito das funções biológicas desses fragmentos.

1.5 Função dos macrófagos no desenvolvimento da aterosclerose

Com o acúmulo de oxLDL na íntima dos vasos, ocorre ativação das células endoteliais, as quais expressam moléculas de adesão, favorecendo a migração de monócitos circulantes para o espaço subendotelial. Os monócitos captam oxLDL, diferenciando-se em macrófagos e, em seguida transformando-se em células espumosas, constituindo a maior população celular encontrada na maioria das placas ateroscleróticas (Hansson e Libby, 2006). Estas células são formadas devido a sua

grande capacidade de captar ésteres de colesterol, onde os receptores *scavenger* desempenham um papel fundamental no reconhecimento de fosfolípidos oxidados (Brown e Goldstein, 1983) (Figura 2). Os SR de maior importância na captação de oxLDL pelos macrófagos são os receptores *scavenger* – A (SR-A), CD36, CD68, CXCL16 enquanto que o *lectin-like oxidized LDL receptor* (LOX-1) está presente nas células endoteliais (Mehta e Li, 1998; Collot-Teixeira et al., 2007). Atualmente, estas moléculas são consideradas receptores reconhecedores de padrões, os quais mediam a internalização e degradação lisossomal de lipoproteínas modificadas, lipopolissacarídeos, fragmentos de parasitos causadores da malária e também de células apoptóticas (Silverstein e Febbraio, 2009). Ao contrário da resposta mediada por outros receptores, a captação por receptores *scavenger* não leva a uma inflamação direta, entretanto pode induzir a apresentação antigênica restrita ao MHC-II (Nicoletti et al., 1999) e até mesmo participar da apresentação cruzada de antígenos à linfócitos T citotóxicos (Albert et al., 1998) podendo assim, estabelecer um elo de ligação entre a imunidade inata e adquirida .

Os macrófagos expressam diversos receptores que podem interagir com as diferentes formas de LDL modificada. A prova da importância desses receptores é a variedade de fatores inflamatórios estudados que têm sido descritos como moduladores na formação das células espumosas (Fragopoulou et al., 2006; Choi et al., 2009; Yun et al., 2009). Esses estudos são importantes para o entendimento da formação destas células, na intenção de propor mecanismos futuros que previnam a captação de oxLDL. Entretanto, a própria LDL modificada pode interagir com os macrófagos induzindo um potencial inflamatório, contribuindo para o avanço da lesão (Yan e Hansson, 2007; Choi et al., 2009). Há evidências de que a LDL minimamente modificada (mmLDL) estimula macrófagos através de receptores TLR4 (do inglês *Toll-like receptor 4*) induzindo a secreção de mediadores pró-inflamatórios, os quais podem induzir uma resposta inflamatória na parede dos vasos sanguíneos (Miller et al., 2005; Choi et al., 2009). Por outro lado, a interação de macrófagos com

oxLDL também pode inibir a ativação de macrófagos, como mostramos em resultados anteriores (Rios, 2004).

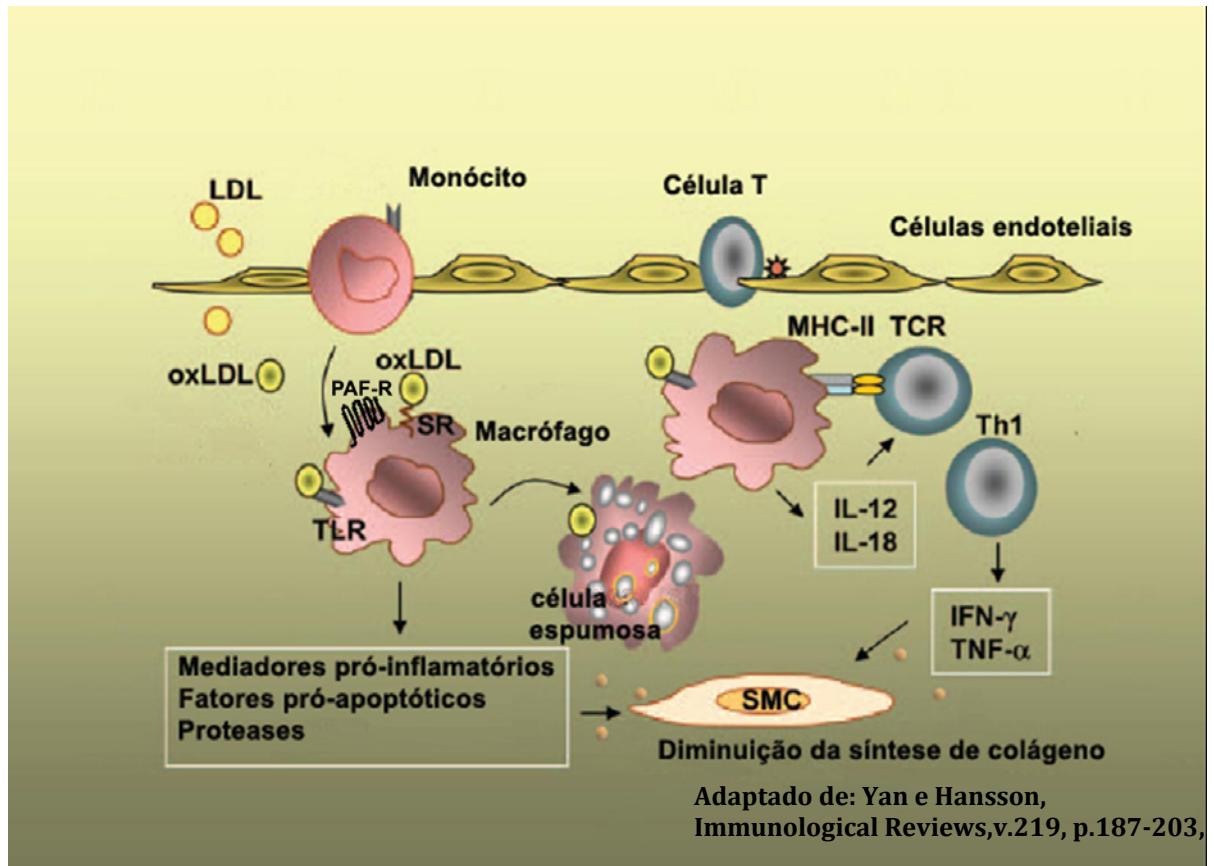


Figura 2. Função dos macrófagos na aterosclerose. A aterosclerose é iniciada quando a LDL entra no espaço subendotelial, sofrendo oxidação e formando a oxLDL. A oxLDL pode estimular as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão e produzirem quimiocinas, as quais recrutam os monócitos para a íntima arterial. Nesse espaço, os monócitos diferenciam-se em macrófagos, aumentando a expressão de receptores *scavengers* e de receptores da imunidade inata, tais como o TLR. Os SR mediam a captação de oxLDL, levando ao acúmulo de colesterol intracelular, acarretando na formação de células espumosas. Os receptores da imunidade inata e para o PAF também são capazes de interagir com a oxLDL, resultando na ativação dos macrófagos e produção de mediadores pró-inflamatórios. Os macrófagos e células dendríticas apresentam antígenos para as células T, ativando-as e induzindo a produção de citocinas, as quais contribuem para o processo inflamatório, estimulando a progressão da lesão e ruptura da placa aterosclerótica. SR, *scavenger receptor*; TLR, *toll-like receptor*; PAF-R, *Platelet-activating Factor Receptor*.

Além de reagir com receptores presentes na membrana, os produtos da oxidação lipídica têm sido atribuídos como reguladores de fatores de transcrição, agindo numa família de receptores nucleares que controlam o metabolismo lipídico, são eles: *liver X receptor* (LXR) e o *peroxisome proliferator-activated receptor - γ* (PPAR γ) (Laffitte et al., 2001; Bishop-Bailey e Wray, 2003; Lee et al., 2008).

Além dos macrófagos e células espumosas participarem da progressão da placa aterosclerótica, eles também contribuem para o estágio mais avançado, onde ocorre a ruptura da placa. Essas células espumosas sintetizam enzimas proteolíticas capazes de degradar componentes macromoleculares da matriz extracelular como proteoglicanos, elastina e fibronectina (Lee e Libby, 1997; Singh et al., 2008). As enzimas que mais participam deste processo são as metaloproteinases (MMP). A participação das MMP é um evento importante na instabilidade da placa aterosclerótica, contribuindo para a sua ruptura, levando a um quadro clínico de angina, infarto do miocárdio e choque hemodinâmico (Newby, 2008).

Os macrófagos expressam uma grande quantidade de receptores que ao serem ativados contribuem para o processo inflamatório. A LDL modificada é formada de um macroagregado de moléculas capazes de interagir com diferentes receptores presentes nas membranas dessas células contribuindo para a formação e estabelecimento do microambiente inflamatório no espaço subendotelial. Neste trabalho concentramos nossos estudos na ação da LDL modificada em macrófagos humanos, observando a participação dos receptores CD36, PPAR γ , PAFR (do inglês *platelet-activating factor receptor*) e receptores Fc γ , os quais serão detalhados a seguir:

1.6 Receptor *scavenger* CD36

O receptor CD36 foi inicialmente descrito em plaquetas e chamado de glicoproteína IV (GPIV) (Rhinehart-Jones e Greenwalt, 1996). Em seguida, foi

caracterizada a sua função como receptor para a oxLDL presente em macrófagos (Endemann et al., 1993) e também como um transportador de ácido graxo para adipócitos (FAT) (Ibrahimi et al., 1996). Apesar de suas funções serem geralmente atribuídas ao processo aterosclerótico, também foi observada sua participação em câncer, Alzheimer, angiogênese, diabetes e também na agregação plaquetária (Febbraio e Silverstein, 2007). Trata-se de uma proteína transmembrânica com peso molecular de 53 kDa contendo um largo domínio hidrofóbico extracelular. Estas características fazem com que seu domínio imunodominante (aminoácidos 155-183) se ligue a ácidos graxos, oxLDL e também a células apoptóticas (Febbraio e Silverstein, 2007).

O reconhecimento e captação de oxLDL pelo CD36 em macrófagos têm sido considerados como os principais eventos do processo aterogênico. Ao contrário dos receptores para LDL, este receptor não possui *feed back* negativo. Dessa forma, o fenômeno de captação da oxLDL é um processo progressivo com conseqüente transformação dos macrófagos em células espumosas, as quais estão presentes em grandes quantidades em todas as fases do processo aterosclerótico (Yan e Hansson, 2007). Estes fatos foram confirmados em estudos utilizando camundongos duplo *knockout* (KO) para CD36 e ApoE, os quais apresentaram uma diminuição na quantidade de células espumosas e no tamanho das lesões ateroscleróticas, comparados com o grupo controle *knockout apenas* para ApoE, que desenvolvem aterosclerose de maneira espontânea (Nicholson et al., 2001).

Dados recentes mostram que o CD36 pode ser também considerado uma molécula reconhecidora de padrões moleculares associados a patógenos, possuindo baixa especificidade e que geralmente interage com moléculas não proteicas, as quais também podem ser encontradas na parede de bactérias e fungos. Dados obtidos nos últimos quatro anos mostram a sua importância no sistema imune inato, contribuindo para a resistência a infecções por *Staphylococcus aureus* (Stuart et al., 2005), *Cryptococcus neoformans* e *Cândida albicans*. Triantafilou et al (2006) mostrou que a ativação por ácido lipoteicoico (LTA) (componente da parede celular de

bactérias gram positivas) é dependente da ligação com CD36 e que heterodímeros de TLR2/6, CD14 e CD36 são recrutados para o mesmo microdomínio de membrana (Triantafyllou et al., 2006).

Em experimentos *in vitro*, a adição de oxLDL a monócitos/macrófagos induz um aumento na expressão de CD36. Entretanto os mecanismos responsáveis por este aumento ainda não foram completamente elucidados. Dados mostrados por Nagy et al (1998), sugerem que essa indução é dependente da ativação de PPAR γ (Nagy et al., 1998). Entretanto, foi demonstrado que células deficientes de PPAR γ também expressam CD36 após o tratamento com oxLDL. Entretanto, Ishii et al (2004) mostraram que a expressão de CD36 induzida por oxLDL pode ocorrer de maneira dependente de um outro fator nuclear chamado Nrfe2 [do inglês *Nuclear factor erythroid 2* (NF-E2) - *Related Factor 2*] (Ishii et al., 2004). Dados posteriores mostraram que este mecanismo é dependente da ativação de PKC (do inglês *Protein kinase C*) (D'Archivio et al., 2008) .

1.7 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor - γ (PPAR γ)

Os PPAR's são fatores de transcrição pertencentes a uma superfamília de receptores nucleares que heterodimerizam com RXR (do inglês *retinoid X receptor*), se ligando ao gene promotor alvo. Foram descritas 3 (três) isoformas de PPAR: α , β/δ e γ . Dessas, o PPAR γ tem chamado mais a atenção da comunidade científica, principalmente porque a sua ativação foi inicialmente associada a produção de citocinas anti-inflamatórias. O PPAR γ foi primeiramente associado a diferenciação de adipócitos e homeostase de glicose. Entretanto, hoje se sabe que esse receptor é expresso em vários outros tipos celulares, tais como macrófagos, células de músculo liso vascular, células endoteliais e cardiomiócitos (Takano e Komuro, 2009).

O primeiro ligante endógeno descoberto para o PPAR γ foi a 15d-PGJ2 (15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandina J2), um metabólito da PGD2 (prostaglandina D2)

da via das ciclo-oxigenases (Hertzel e Bernlohr, 1998). A interação de ligantes com o PPAR γ pode inibir a produção de citocinas pro-inflamatórias como *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6) e IL-1 β (Jiang et al., 1998; Meier et al., 2002) e de genes responsáveis pela *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) (Ricote et al., 1998). Estes efeitos chamaram a atenção da comunidade científica e também das indústrias farmacêuticas, as quais observando a ação antiinflamatória dos agonistas de PPAR γ associada a ação no metabolismo de glicose, lançaram um grupo de fármacos antidiabéticos chamados de tiazolidinedionas (TZD), utilizados na clínica atualmente (Day, 1999).

Diversos efeitos benéficos têm sido observados com o uso dos agonistas de PPAR γ , tais como retardando o desenvolvimento da aterosclerose, melhorando o quadro de hipertensão, hipertrofia do músculo cardíaco (Takano e Komuro, 2009) e até mesmo na polarização de macrófagos para um perfil anti-inflamatório (Bouhrel et al., 2007). Entretanto, o uso destes fármacos ainda requer uma certa atenção da comunidade científica e clínica, uma vez que a ativação de PPAR γ em macrófagos no contexto da doença cardiovascular tem mostrado resultados conflitantes. Foi demonstrado que a ativação de PPAR γ interfere com a liberação de citocinas ou na expressão de genes inflamatórios (Li et al., 2000; Joseph e Tontonoz, 2003). Entretanto, a ativação de macrófagos com agonistas de PPAR γ induz um aumento na expressão de CD36, o qual é o principal receptor responsável pela formação da células espumosas (Nagy et al., 1998). Além disso, foi observado que lesões ateroscleróticas expressam altos níveis de PPAR γ (Ricote et al., 1998). Dessa forma, até o momento não se sabe a real reação função desse receptor na placa aterosclerótica. Hoje se sabe que a oxidação da LDL leva a formação de dois componentes capazes de ativar PPAR γ , são eles: ácidos 9-hidroxi e 13-hidroxi octadecadienóicos (9-HODE e 13-HODE) (Nagy et al., 1998). Esta complexidade de resultados obtidos com pesquisa básica são refletidos na pesquisa clínica, uma vez que até o momento não há um consenso a respeito do tratamento de pacientes utilizando agonistas de PPAR γ . Pois há estudos clínicos mostrando que o uso destes

fármacos pode tanto diminuir (Dormandy et al., 2005) quanto aumentar o risco para o infarto do miocárdio (Nissen e Wolski, 2007; Singh et al., 2007). Estes dados mostram que mais estudos são necessários para esclarecer a participação de PPAR γ no contexto da doença aterosclerótica.

1.8 Receptores Fc γ

Os receptores Fc são proteínas de membrana que se ligam a porção Fc da imunoglobulina IgG. Estes receptores podem ser divididos em duas classes específicas, os ativadores e os inibidores, os quais transmitem o sinal através de Imuno-receptores de ativação baseados em tirosinas (ITAM) ou Imuno-receptores de inibição baseados em tirosinas (ITIM), respectivamente. Os receptores Fc γ ativadores, que possuem a sequência ITAM são os Fc γ RIIA (não encontrados em camundongos), Fc γ RI, Fc γ RIIIA e o Fc γ RIV, que são receptores conservados em humanos e camundongos. Já o Fc γ RIIB é o receptor inibitório com sequência ITIM (Ravetch e Bolland, 2001).

São poucos os estudos relacionando os receptores Fc γ com a doença aterosclerótica, entretanto, existem evidências de sua importância nesta doença. Foi demonstrado que camundongos deficientes de receptores Fc γ desenvolvem menos proliferação células associada a hiperplasia neointimal após injúria endotelial experimental (Konishi et al., 2002). Além disso, resultados recentes encontrados por Hernández- Vargas et al, mostraram que camundongos deficientes de ApoE e de receptores Fc γ não desenvolvem aterosclerose (Hernandez-Vargas et al., 2006).

A proteína C-reativa (CPR, do inglês *C-reactive protein*) é uma proteína de fase aguda da inflamação, com função de opsonina, utilizada na clínica como marcador pro-inflamatório e preditivo para doença cardiovascular. É capaz de se ligar ao Fc γ RIIB com alta afinidade, e esta ligação pode inibir a expressão da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), contribuindo para o enrijecimento endotelial (Mineo et al., 2005).

A CPR também pode promover ativação celular através dos outros receptores Fc γ , especialmente Fc γ RI e Fc γ RIIA aumentando a liberação de citocinas inflamatórias (Marnell et al., 2005). Uma outra proteína de fase aguda, a pentraxina PTX3, também está aumentada em placas ateroscleróticas humanas (Rolph et al., 2002) e dados experimentais sugerem que ativação de células endoteliais e células de músculo liso com formas modificadas de LDL pode induzir um aumento de PTX3 (Klouche et al., 2004; Gustin et al., 2008), a qual também podem se ligar a receptores Fc γ (dados não mostrados). Entretanto, não se sabe quais as conseqüências desta ligação na aterosclerose.

Sabe-se que os receptores para oxLDL são, principalmente os receptores *scavenger*, em especial o CD36. Entretanto, a CRP é capaz de se ligar com alta afinidade aos lipídios oxidados presentes na oxLDL, e, este complexo, CRP-oxLDL é captado tanto por receptores CD36, quando por receptores Fc γ (van Tits et al., 2005). A captação de oxLDL por macrófagos através dos receptores Fc foi demonstrada também após a formação de imunocomplexos (Oksjoki et al., 2006). A oxLDL é capaz de ativar a resposta imune adaptativa, induzindo a formação de anticorpos que vão se ligar a oxLDL formando imunocomplexos. Estes complexos podem ser captados pelos macrófagos presentes na lesão aterosclerótica através dos receptores Fc γ . Entretanto não se sabe se esta captação pode levar a formação de células espumosas. Além disso, a ligação destes complexos aos macrófagos induz a produção de mediadores e citocinas que promovem a migração de monócitos e amplifica o processo inflamatório na lesão aterosclerótica (Singh et al., 2008).

1.9 Receptor para o Fator Ativador de Plaquetas (PAF-R)

O PAF-R (do inglês *Platelet-Activating Factor receptor*) é um receptor acoplado a proteína G, com sete domínios transmembrânicos, que ao ser ativado induz a sinalização intracelular envolvendo fosfolipase C (PLC), canais de cálcio e cascatas de quinases. Após o estímulo, o PAF-R é fosforilado, internalizado e logo em

seguida degradado tanto no proteossomo, quanto no lisossomo (Dupre et al., 2003). Embora grande parte dos receptores acoplados a proteína G, ativando PLC β , sejam sensíveis a toxina pertussica (Ptx), o PAF-R está acoplado a receptores sensíveis e não-sensíveis a Ptx, chamados de Gi e Gq respectivamente (Brown et al., 2006).

O fator ativador de plaquetas é um fosfolípido biologicamente ativo, estruturalmente denominado 1-0-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina, que mesmo em baixas concentrações é capaz de ativar seu receptor exercendo funções inflamatórias, tais como agregação plaquetária, anafilaxia, aumento da permeabilidade vascular e ativação de neutrófilos (Honda et al., 2002).

Os produtos formados durante o estágio inicial da oxidação da LDL são derivados da fosfatidilcolina por oxidação e subsequente fragmentação de ácidos graxos poli-insaturados localizados na posição *sn*-2, os quais foram identificados como potentes mediadores da resposta inflamatória vascular. Estes lipídeos bioativos possuem características estruturais semelhantes ao PAF, chamados de lipídeos PAF-*like* com propriedades proinflamatórias (Marathe et al., 2001). São menos potentes que o PAF, porém, são formados em grandes quantidades por um processo de oxidação irreversível e não controlado (Marathe et al., 1999). São capazes de ativar monócitos e células vasculares por sua interação com PAFR, promovendo a secreção de quimiocinas e citocinas (Huang et al., 1999; Beaudoux et al., 2004; Jurado, 2006). Estes compostos PAF-*like* também podem ser hidrolisados a lisofosfatidilcolina pela PAF-acetilhidrolase (PAF-AH)/ LDL-phospholipase A2, associada a LDL, HDL e também a LDL eletronegativa (Benitez et al., 2003). Entretanto, ainda não está claro se esta ação da PAF-AH sobre a oxLDL é anti- ou pró-aterogênica (Karasawa, 2006).

Uma vez que esses fosfolípidos oxidados são provenientes da oxidação da LDL, pode-se assumir que a ação destes compostos em PAF-R pode ocorrer durante todos os estágios na placa aterosclerótica, contribuindo para o recrutamento de células para o espaço subendotelial (Lehr et al., 1993). De fato, dados da literatura mostram que estes compostos induzem a migração de monócitos e a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais através da ativação de PAFR (Beaudoux

et al., 2004). Além disso, o tratamento com um antagonista de PAFR diminuiu a formação de estrias gordurosas de animais LDLR^{-/-} (Subbanagounder et al., 1999), entretanto não há resultados mostrando o efeito em lesões ateroscleróticas avançadas.

2 HIPÓTESE DE TRABALHO E OBJETIVOS GERAIS

Os compostos presentes na partícula da LDL modificada são capazes de ativar o sistema imune, induzindo a produção de anticorpos contra esses compostos (Fernvik et al, 2004), ativando células T (Yan e Hansson, 2007) ou estimulando as células apresentadoras de antígenos (Zaguri et al, 2007). Os complexos imunes formados pelas partículas de oxLDL ligadas aos anticorpos anti-oxLDL podem ser removidos da circulação pelos receptores Fc γ II presentes em células do sistema fagocítico ou então ativar estas células infiltradas na placa aterosclerótica, contribuindo para a inflamação da parede vascular (Hammad et al, 2006). Além disso, a oxLDL também pode se ligar a algumas proteínas de fase aguda, como a PCR, induzindo a ativação celular através dos receptores Fc γ II (Singh et al, 2008). Entretanto, até o momento não se sabe se a expressão destes receptores é regulada pela oxLDL, como ocorre com o receptor CD36.

De acordo com o grau de oxidação da oxLDL, diferentes compostos podem ser gerados. Assim, espera-se que uma LDL com baixa oxidação (LoxLDL) possa desencadear tanto ações similares a LDL altamente oxidada (HoxLDL), como também, ações distintas, devido à heterogeneidade de compostos formados (Itabe, 1998). Na placa aterosclerótica, essas duas formas de LDL modificada interagem tanto com monócitos quanto com macrófagos, os quais diferem na expressão de receptores, assim como no potencial inflamatório após a ativação (Mosser e Edwards, 2008).

A oxidação da LDL leva a formação de compostos capazes de ativar receptores nucleares envolvidos na transcrição de genes, como o PPAR γ (Nagy et al, 1998). A ativação desses receptores parece induzir a polarização de macrófagos para um perfil anti-inflamatório (Bouhlef et al, 2007), o que explicaria um efeito benéfico de agonistas desses receptores na aterosclerose. Por outro lado, esses agonistas aumentam a expressão de CD36, o qual é o principal receptor responsável pela formação das células espumosas (Nagy et al, 1998). Além disso, foi também demonstrado que os agonistas de PPAR γ induzem um aumento na fagocitose

mediada por receptores $Fc\gamma$ (Aronoff et al, 2007). Dessa forma, mais estudos são necessários para esclarecer o papel das diferentes formas oxidadas da LDL na função de monócitos/macrófagos. Assim, na **primeira etapa (Capítulo 1)** deste estudo investigamos os efeitos de LoxLDL e HoxLDL na expressão de CD36 e de receptores $Fc\gamma$ II em células da linhagem monocítica humana THP-1, não diferenciadas e diferenciadas para macrófagos e o envolvimento de $PPAR\gamma$ na expressão desses receptores.

Devido à heterogeneidade dos compostos formados no processo de oxidação da LDL, diversos são os receptores que podem ser ativados. Evidências da literatura, juntamente com dados obtidos por nosso grupo de pesquisa mostram que compostos presentes na oxLDL ativam os receptores do PAF em macrófagos e isto é responsável por uma parte da resposta inflamatória na lesão aterosclerótica (Marathe et al, 2001; Jurado, 2006). Dentre os compostos formados estão fragmentos protéicos da ApoB-100, que não são expostos na partícula de LDL íntegra, e fosfolipídios oxidados, os quais mostram similaridade estrutural e funcional com o PAF (Svensjo et al, 2003). Estes dados foram comprovados, pela inibição de diversos efeitos da oxLDL por antagonistas do receptor de PAF (Marathe et al, 2001; Svensjo et al, 2003). Em resultados obtidos anteriormente, mostramos fragmentos proteicos da oxLDL podem aumentar a permeabilidade vascular por mecanismo dependente de PAFR (Svensjo et al, 2003). Além disso, mostramos que fosfolipídios oxidados purificados da oxLDL interagem com PAFR induzindo a produção de $TNF-\alpha$ por monócitos humanos (Jurado, 2006). Recentemente, mostramos que tanto o PAF como a oxLDL induzem a expressão de ciclo-oxigenase (COX)-2, sendo este efeito inibido por um antagonista de PAFR. Nesse mesmo estudo foi também mostrado que PAF e oxLDL causam a dessensibilização do mesmo receptor (de Oliveira et al, 2006), interferindo com a fagocitose de células apoptóticas, a qual é uma ação mediada principalmente por receptores CD36 (Greenberg et al, 2006). Desta forma, na **segunda etapa (Capítulo 2)** deste estudo investigamos se formas de LDL com baixo ou alto grau de oxidação influenciam na expressão de receptores CD36 em células da linhagem monocítica

humana THP-1, não diferenciadas e diferenciadas em macrófagos, e se este efeito ocorre através do PAFR.

Comentamos anteriormente que as diferentes formas de LDL oxidada podem atuar por receptores distintos em macrófagos. Esta interação pode induzir os macrófagos a adquirem características pró ou anti-inflamatórias (Lipton et al, 1995; Han et al, 2000; Mikita et al, 2001; Pasini et al, 2007) . Curiosamente, essas duas populações de macrófagos foram observadas na placa aterosclerótica humana (Bouhlef et al, 2007). Essas células possuem características distintas na produção de citocinas, onde os macrófagos anti-inflamatórios secretam IL-10 e TGF- β , enquanto que os pró-inflamatórios produzem mais TNF- α , IL-6, IL-8 (Mosser e Edwards, 2008). Desta forma, acredita-se que um desbalanço no microambiente, levando a uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias pode contribuir para a progressão da aterosclerose (Tedgui e Mallat, 2006). Baseados nessas observações, na **terceira etapa (Capítulo 3)** deste estudo, investigamos a produção de citocinas induzidas por LoxLDL e HoxLDL em células THP-1 diferenciadas para macrófagos.

Na lesão aterosclerótica a modificação da LDL é um fenômeno recorrente devido à presença de radicais livres no microambiente inflamatório. Além disso, diversas enzimas proteolíticas, tais como tripsina, quimotripsina ou lipoxigenases, também estão presentes neste microambiente, as quais podem atuar sobre a partícula de LDL (Hevonoja et al, 2000). Desta forma, a LDL pode sofrer clivagem, perda da integridade estrutural e até mesmo degradação devido a ação proteolítica destas enzimas, o que gera fragmentos proteicos, resultantes da fragmentação da ApoB-100 (Piha et al, 1995).

Enquanto que os efeitos celulares de compostos fosfolipídicos oxidados presentes na oxLDL são os mais estudados, os efeitos de fragmentos proteicos da ApoB-100 são pouco conhecidos. Demonstramos anteriormente que a porção proteica é capaz de ativar células endoteliais, induzindo aumento da permeabilidade vascular (Svensjo et al, 2003) e, em macrófagos, interfere com a ativação induzida pelo LPS (Rios, 2004). Além disso, mostramos a presença de anticorpos contra

fragmentos protéicos da oxLDL que podem ser associados ao prognóstico da doença cardiovascular (Ketelhuth et al, 2008). Ainda, a imunização com peptídeos da ApoB-100 foi capaz de impedir o processo aterosclerótico (Fredrikson et al, 2003a; Fredrikson et al, 2003b; Chyu et al, 2005). Por conseguinte, na **quarta etapa (Capítulos 4 e 5)** deste estudo, investigamos os efeitos de peptídeos de toda a sequência de aminoácidos da ApoB-100 capazes de induzir uma ativação inflamatória em monócitos/macrófagos humanos.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) estabelecer protocolos para obtenção de oxLDL e HoxLDL a partir de uma LDL humana, avaliando o grau de oxidação por:
 - Substâncias Reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
 - Presença de dienos conjugados;
 - Cromatografias por exclusão molecular e de troca iônica;
 - Presença de dienos conjugados;
 - Gel de eletroforese;

- b) estabelecer protocolo de diferenciação das células de linhagem monocítica humana THP-1 para macrófagos, observando o aumento de CD11b/CD18 (mac-1) por citometria de fluxo;

- c) estudar os efeitos de LoxLDL e HoxLDL na expressão de FcγRII e CD36 em células da linhagem monocítica humana THP-1 não diferenciadas e diferenciadas para macrófagos;

- d) estudar o envolvimento da PPAR γ na expressão de FcγRII e CD36 induzida por LoxLDL e HoxLDL em células THP-1 não diferenciadas e diferenciadas para macrófagos;

- e) estudar o envolvimento da PAFR na expressão de CD36 induzida por LoxLDL e HoxLDL em células THP-1 não diferenciadas e diferenciadas para macrófagos;

- f) investigar os efeitos de LoxLDL e HoxLDL na produção de IL-6, IL-8, TNF α , IL-10 e TGF- β por THP-1 diferenciadas para macrófagos;

g) estudar os efeitos biológicos de uma biblioteca contendo 302 peptídeos derivados da ApoB-100 capazes de induzir a produção de citocinas e quimiocinas em células humanas, pesquisando:

- Produção inicial de IL-8;
- Produção das proteínas humanas: IL-8, IL-6, RANTES, MCP-1, IL-1 β , IP-10, TNF- α , IL-12p70, IFN- γ , MIG e IL-10 por citometria de fluxo;
- Expressão de mRNA para IL-8 por PCR quantitativo;
- A ativação da via das MAP quinases (ERK1/2, p38 e JNK);
- Fluxo de Cálcio intracelular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Animais

Os animais mantidos em condições livres de patógenos foram adquiridos do Biotério do Departamento de Microbiologia, Tumor e Biologia Celular (MTC), do Instituto Karolinska, Estocolmo, Suécia. Foram utilizados nos experimentos camundongos machos da linhagem C57Bl/6 (H-2b), com idade entre 8 a 10 semanas.

4.1.2 Reagentes

O meio de cultura RPMI-1640, Soro Fetal Bovino (SFB), HEPES ácido foram adquiridos da GIBCO Co-USA. PMA (Acetado de Phorbol Miristato), Penicilina G potássica, Sulfato de Estreptomicina, Aprotitina, Leupeptina, Cloranfenicol, Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF), os inibidores de fosfatases (fluoreto de Sódio e ortovanadato de Sódio) o c16 PAF, o GW9662, o DMSO e o gradiente Histopaque de Ficoll-Hipaque 1119 foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA). As placas estéreis para cultura de células foram adquiridas da Corning Costar, Co, Cambridge, MA, USA ou TPP (Suíça). Os filtros estéreis Millex[®] com poros de 0,45 e 0,20 micra de diâmetro foram adquiridos da Millipore Corporation (Belford, MA, USA). O WEB2170 foi adquirido da Boehringer-Mannheim (Mannheim, Alemanha). A Rosiglitasona foi adquirida da Cayman-Chemical (Michigan USA). foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA). Os inibidores para p38 (SB203580 10 µM), ERK1/2 (PD98059 10 µM) e JNK (SP600125 40 µM) foram adquiridos da Calbiochem (Merk, Alemanha). Os coquetel de inibidores de protease foi adquirido da Roche (Complete[™] Protease Inhibitor Cocktail Tablet).

O teste PYROGENT® Single Test Gel Clot LAL Assay para verificação de contaminação por LPS foi adquirido da Lonza (Basel, Switzerland).

O Fluo-4 AM e a Probenecida foram adquiridos Invitrogen. O reagente para purificação de células mononucleares humanas Linfoprep® foi adquirido da Nycomed (Oslo, Noruega).

O reagente para dosagem de proteína Bio-Rad *protein assay*, o tampão de amostra Laemmli e os géis de eletroforese (PROTEAN II, Precast Gel, Tris-HCl, 8–16% gel de separação, 4% gel de empilhamento) foram adquiridos da Bio-Rad laboratories (USA). O marcador de peso molecular PageRuler™ Plus *Prestained Protein Ladder* foi adquirido da Fermentas life sciences (MD, USA).

As células da linhagem monocítica humana THP-1 foram adquiridas da ATCC.

Os peptídeos da sequência da ApoB-100 foram sintetizados pela empresa K.J. Ross Petersen AS (Klampenborg, Denmark)

Quanto ao material para biologia molecular: As colunas de purificação de RNA (RNeasy) foram adquiridas da Qiagen (Valencia, CA). Os kits para síntese de cDNA e transcriptase reversa-Superscript II foram adquiridos da Life Technologies (Rockville, MD). Os primers (assay on demand) da IL-8 humana para PCR quantitativo, TaqMan® Universal PCR Master Mix foram adquiridos da Applied biosystems (Foster City, CA).

Os anticorpos monoclonais marcados para citometria e os kits para dosagem de citocinas por FACS (CBA) foram adquiridos da BD Biosciences, EUA. Os kits para dosagem de hIL-8, hMCP-1 e mL-6 foram adquiridos da R&D systems (Minnieapolis, MN, USA). As placas de Elisa Maxisorb foram obtidas da Nunclon (Roskilde, Dinamarca) ou da Corning Costar, Co, Cambridge, MA, USA.

4.2 Metodologia

4.2.1 Obtenção da LDL

A LDL foi obtida de *pool* de plasma fresco de voluntários saudáveis em jejum com concentrações plasmáticas de Colesterol (CT) e Triacilglicerol (TG) nas faixas consideradas normais (CT < 240 mg/dL e TG < 150 mg/dL) confirmadas em nosso laboratório por método enzimático com *kits* comerciais utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

O sangue dos doadores foi colhido em tubos contendo EDTA (1 mg/mL) e imediatamente centrifugado (4 °C, 10 minutos, 1000 x *g*) para obtenção do plasma, onde foram acrescentados os seguintes conservantes aprotinina 0,1 unidade/mL, benzamidina 2 mM, gentamicina 0,5%, cloranfenicol 0,25% e PMSF 0,5 mM (Sparrow et al., 1989)

A fração LDL foi obtida por ultracentrifugação sequencial (Havel et al., 1955; Kesaniemi et al., 1983), utilizando-se rotor 50 Ti, a 4 °C, 100.000 x *g*. Inicialmente o plasma foi centrifugado durante 12 horas, para obtenção da VLDL (densidade = 1,006 g/mL). Após este período a densidade do infranadante foi acertada para 1,063 com a adição de KBr e em seguida centrifugado durante 20 horas (100.000 x *g*), para obtenção da LDL (densidade <1,063 g/mL). A LDL, presente no sobrenadante, foi retirada e dialisada durante 48 horas, em PBS 0,05 M, pH 7,4, contendo EDTA 1mM para evitar o processo de oxidação. Após este processo a LDL foi esterilizada com filtro de 0,22 µm de diâmetro. As proteínas foram quantificadas utilizando o kit BCA de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.2 Modificação da LDL

Para a oxidação da LDL, uma parte da amostra foi dialisada em PBS por 24 h, a 4 °C, para retirada do EDTA. Em seguida, para a obtenção da LoxLDL e HoxLDL foram utilizados os protocolos a seguir:

a) Obtenção da LoxLDL: 1 mL da LDL na concentração de 2 mg/mL foi dialisada em agitação contra uma solução de sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 2 μM em PBS pH 7,4 e mantido em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 48h (Chatterjee et al., 2004).

b) Obtenção da HoxLDL: 1 mL da LDL na concentração 1 mg/mL foi incubada com CuSO_4 20 μM , por 18 horas a 37 °C, em microtubo contendo alguns furos na tampa, para facilitar as trocas com o oxigênio atmosférico (Heinecke et al., 1984; Zaratin et al., 2002).

Após os períodos acima descritos, a oxidação da LoxLDL ou da HoxLDL foi bloqueada pela adição de EDTA 1mM.

4.2.3 Determinação de TBARS, Dienos conjugados e Hidroperóxidos lipídicos totais

O grau de oxidação da amostra foi determinado pela quantidade de maloneildialdeído (MDA) formado durante o processo de peroxidação lipídica através da dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Puhl et al., 1994), utilizando como padrão o composto 1,1,3,3 tetrametoxipropano 0,5 mM.

Resumidamente, em um microtubo foram colocados 50 μL da amostra com 200 μL do reagente de TBARS (1% de ácido tiobarbitúrico e 15% de ácido tricloroacético diluído em H_2O milli-q). Em seguida, o microtubo foi aquecido a 100

°C, por 15 minutos, para que ocorresse a reação. Após este tempo a mistura foi centrifugada e a leitura da absorbância do sobrenadante foi medida utilizando um filtro de 540 nm em um leitor de microplacas Dynatech.

A formação de dienos conjugados foi determinada pela absorbância a 234 nm (Kontush et al., 1997).

O aumento de dienos conjugados está diretamente relacionado com o acúmulo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Para calcular a concentração de hidroperóxidos lipídicos totais, utilizamos a equação $\Delta[\text{LOOH}] = 2,05 \times \Delta A_{234} / \epsilon_{cd}$, onde $\Delta[\text{LOOH}]$ é a mudança na concentração de hidroperóxidos lipídicos, A_{234} é a mudança na absorbância em 234 nm e $\epsilon_{cd} = 29.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ é um coeficiente de extinção para dienos conjugados (Spranger et al., 1998). Ao aplicarmos a equação para LoxLDL, consideramos $\Delta A_{234} = A_{234}\text{LoxLDL} - A_{234}\text{LDL}$, pois a equação é baseada na diferença da absorbância relacionada a uma amostra controle. Este mesmo critério foi utilizado para obtermos a concentração de hidroperóxidos lipídicos totais da HoxLDL.

4.2.4 Cromatografia de Troca iônica

As lipoproteínas foram analisadas por meio de cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna Resource-Q em sistema de FPLC (*fast protein liquid chromatograph*) (Amersham-Pharmacia biosciences, Suécia). Inicialmente a concentração da amostra foi ajustada para 1 mg/mL pela adição de Tris-HCl 0,01M, pH 7,4. Para a eluição das amostras foram utilizadas duas soluções: solução A, Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4 e solução B, NaCl 1,0 M. A amostra foi previamente filtrada (0,45 μm , Millipore, EUA) e posteriormente injetada na coluna. Nos primeiros 47 minutos da corrida, a eluição foi feita com um fluxo de 1 mL/minuto em um gradiente linear até 42% da solução B, seguido de um gradiente 42-100% de B, de 47 a 52 minutos. A

eluição foi constantemente monitorada na faixa de 190 – 400 nm, utilizando “Diode Array” (Shimadzu, Japão).

4.2.5 Cromatografia de Exclusão Molecular (Filtração em gel)

A cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel das lipoproteínas foi feita utilizando uma coluna Superdex 200 HR em um sistema FPLC da Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). A coluna foi previamente equilibrada com PBS 0,05 M, pH 7,0 a temperatura ambiente. Inicialmente, a concentração da amostra foi ajustada para 1 mg/mL pela adição de PBS 0,05 M pH 7,0 e filtrada em filtro com 0,45 µm de poro (Millex, Millipore®). Em seguida, foram injetados na coluna 500 µL de LDL, LoxLDL ou HoxLDL 1 mg/mL. A eluição da amostra foi feita utilizando PBS 0,05 M pH 7,0 em fluxo contínuo de 0,5 mL/min. A eluição foi constantemente monitorada na faixa de 190-600 nm, usando detector "Diode Array" (Shimadzu®, Japão).

4.2.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens das partículas de LDL, LoxLDL ou HoxLDL foram obtidas por técnica de coloração negativa. Resumidamente, 15 µL de cada lipoproteína foram espalhados em grades de 300 ou 400 malhas de parlodium-carbono revestidas com cobre. Depois de 1 a 2 minutos para permitir a adsorção à rede, o excesso da solução foi removido suavemente com papel absorvente. Em seguida foram adicionados 15 µL de ácido fosfotúngstico 2%, pH 7,2 por 5 a 10 segundos. O excesso de volume da porção superior da malha foi secado por 5 minutos. Em seguida foram feitas as aquisições das fotografias em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss) com um feixe de elétrons gerado em 80kV e ampliação de 75.000 vezes.

4.2.7 Síntese de peptídeos derivados da Apolipoproteína B-100

Foram sintetizados 302 peptídeos que correspondem a toda a sequência de aminoácidos da estrutura da ApoB-100 humana pela empresa K.J. Ross Petersen AS (Klampenborg, Denmark). Cada peptídeo foi sintetizado com um tamanho total de 20 aminoácidos, contendo 5 (cinco) aminoácidos *overlap* para o peptídeo seguinte, cobrindo a sequência total da ApoB-100. Os peptídeos foram numerados de 1 a 302, começando da porção N-terminal. A solução estoque de cada peptídeo foi feita em NaCl (9 mg/mL).

Uma fração de cada peptídeo foi modificada pelo tratamento com 0,5 mM de malondialdeído (MDA) por 3 h a 37 °C. Após a modificação, os peptídeos foram dialisados contra PBS contendo 1 mM de EDTA por 18 h a 4 °C, para a retirada do excesso de MDA não ligado ao peptídeo. Os dados a respeito da modificação dos peptídeos foram obtidos a partir do ensaio para substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico (TBARS). Não foram detectados aldeídos nas preparações dos peptídeos nativos. Para os experimentos em cultura celular, as soluções estoque de peptídeos nativos e oxidados foram diluídas em RPMI/1% de SFB.

4.2.8 Cultura das células de linhagem monocítica humana THP-1

As células de linhagem monocítica humana THP-1 foram mantidas em RPMI 1640 suplementado com 5 % de SFB, 2 mM L-glutamina, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina e mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Para os experimentos, as células foram plaqueadas na concentração 5 x 10⁵ células/mL em RPMI/1 % de SFB em um volume final de 500 µL.

Para a diferenciação em macrófagos aderentes, as células foram tratadas com 150 nM de PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) por 24 h. Em seguida as células não aderentes foram aspiradas e foi adicionado novo meio RPMI/5% SFB por 24 h.

Após este tempo o meio de cultura foi trocado para meio RPMI/1% SFB. No dia seguinte, as células foram estimuladas com os diferentes tratamentos. Os experimentos foram feitos apenas com as células aderentes.

4.2.9 Obtenção das células mononucleares e neutrófilos do sangue periférico

As células humanas foram obtidas de bolsas de sangue coletadas de doadores do Banco de Sangue do Hospital Universitário do Instituto Karolinska, Estocolmo, Suécia. As células mononucleares e neutrófilos foram separadas através de centrifugação em gradiente de densidade, utilizando os gradientes Lymphoprep e Ficoll:Hiopaque 1119 (Histopaque, SIGMA) para células mononucleares e neutrófilos, respectivamente, de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes. Em seguida, o tubo foi centrifugado a $800 \times g$ por 30 minutos, à temperatura ambiente, em centrífuga com baixa velocidade de aceleração e sem freio. As células mononucleares e os neutrófilos foram cuidadosamente separados com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram lavadas aproximadamente 4 (quatro) vezes, até que o sobrenadante adquirisse uma coloração límpida, indicando a baixa presença de plaquetas. Em seguida, as células mononucleares foram suspensas em RPMI/5% SFB, plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL em placas de 96 poços, contendo 200 μ L por poço e incubadas em estufa a 95% O_2 / 5% CO_2 , a 37 °C *over night*. Após este período, o meio foi trocado por RPMI/1% SFB, para prosseguir com os estímulos.

Quanto aos neutrófilos, estes foram cuidadosamente separados do gradiente, lavados com PBS 4 °C e centrifugados a $200 \times g$. Este procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida as células foram ressuspensas na concentração de 2×10^6 células/mL em RPMI/1% SFB e plaqueadas em placas de 96 com 200 μ L em cada poço. Em seguida, os estímulos adicionados.

4.2.10 Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6

Os camundongos isogênicos da linhagem C57Bl/6 foram adquiridos do biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Microbiologia, Tumor e Biologia Celular do Instituto Karolinska, Estocolmo, Suécia, onde os animais são mantidos em condições de temperatura e luminosidade controladas e livres de patógenos. Primeiramente, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e as células foram obtidas por lavagem da cavidade peritoneal com 5 mL de PBS a 4 °C. Os lavados foram centrifugados (200 x g por 10 minutos a 4 °C) e a concentração das células foi acertada para 2 x 10⁶ células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com HEPES 20 mM, NaHCO₃ 11 mM, SFB 5%, L-glutamina 2 mM, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. As células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços em volume final de 100 µL e incubadas em estufa a 95% O₂ / 5% CO₂, a 37 °C por 2 h para a adesão dos macrófagos. Após este tempo, as células não aderentes foram retiradas através de lavagem com PBS a 37 °C e os macrófagos foram mantidos em RPMI/ 5% SFB. Os estímulos foram adicionados no dia seguinte. Após 24 h de estímulo, o sobrenadante foi coletado para análise de citocinas.

4.2.11 Células Endoteliais de Aorta Humana (HAEC)

As células endoteliais de aorta humana (HAEC) de cultura primária foram adquiridas da Clonetics™ e mantidas em meio de cultura EGM-2 (*Endothelial Cell Medium*). Para os experimentos, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços em EGM-2, 100 µL por poço. Após as células atingirem uma camada semiconfluyente, o meio de cultura foi trocado por meio F12 contendo 1% de SFB. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado por um novo meio F12/1% SFB e os estímulos foram adicionados. Após 24 h, os sobrenadantes foram colhidos para dosagem de citocinas por ELISA.

4.2.12 Células HEK 293-hTLR4

As células HEK293 estavelmente transfectadas com o TLR4 humano e expressando apenas estes receptores, foram adquiridas da Invivogen e mantidas em DMEM/5% SFB. Para os experimentos, as células foram plaqueadas na concentração 1×10^4 /poço em 100 μ L de DMEM/5% SFB. Após as células atingirem uma camada semiconfluyente, o meio de cultura foi trocado por DMEM/1% SFB. Em seguida, as células foram tratadas com os diferentes estímulos. Após 18 h, os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagens de citocinas.

4.3 Protocolos experimentais utilizados nos experimentos com as formas oxidadas da LDL

Inicialmente, as células THP-1 não diferenciadas foram tratadas com 20 μ g/mL de LDL, LoxLDL ou HoxLDL por 24 h. Após este período, as células foram lavadas por centrifugação a 200 $\times g$ e, em seguida marcadas com os anticorpos específicos para Fc γ RII e CD36. A mudança na expressão desses receptores foi analisada por citometria de fluxo (Esquema 1).

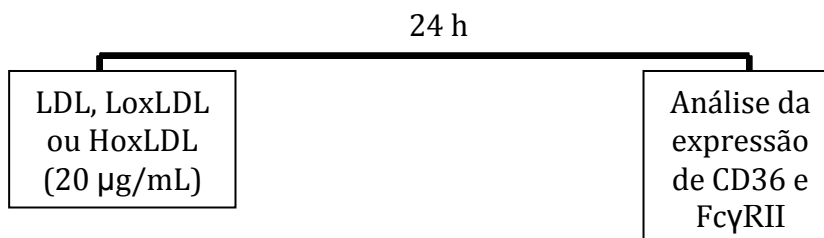
A mudança na expressão de Fc γ RII e CD36 induzida pelo tratamento com LDL, LoxLDL ou HoxLDL (20 μ g/mL) também foi analisada por citometria de fluxo em células THP-1 diferenciadas para macrófagos com PMA.

Para observar a participação de PPAR γ na expressão de CD36 ou Fc γ RII induzida LoxLDL ou HoxLDL, as células foram pré-tratadas com GW9662 (20 μ M), um antagonista de PPAR γ , 30 minutos antes do tratamento com as lipoproteínas. Como controle positivo utilizamos a Rosiglitazona (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) (Esquema 2).

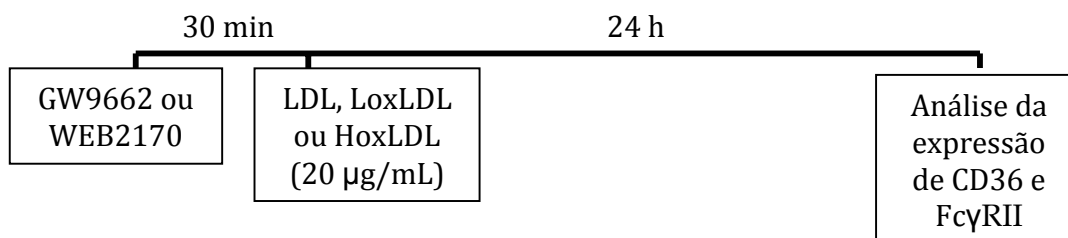
Para observar a participação do receptor de PAF na expressão de CD36, as células foram pré-tratadas com WEB2170 (10 e 50 μ M), um antagonista de PAFR, 30

minutos antes da adição de LoxLDL ou de HoxLDL. Como controle positivo utilizamos o PAF (10^{-6} , 10^{-8} e 10^{-10} M) (Esquema 2).

Esquema 1



Esquema 2



4.3.1 Citometria de Fluxo

Para a determinação da expressão de CD36, FcγRII e CD11b as células THP-1 foram tratadas com rosiglitazona, LDL, LoxLDL ou HoxLDL ($20 \mu\text{g/mL}$) por 24 h. Em outro grupo de experimentos, as células foram tratadas com GW9662, antagonista de PPAR γ , 30 min antes da adição das lipoproteínas. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a $300 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão contendo PBS/1% de SFB e incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD36, anti-CD11b/CD18 (mac-1) conjugados com ficoeritrina (PE) e anti-CD32 (FcγRII), conjugado com fluoresceína (FITC) por 30 min a 4°C no escuro. Após este tempo as células foram lavadas três vezes para retirada do excesso de anticorpos. A aquisição foi feita em citômetro de fluxo (FACS calibur – Becton) e a análise em software Summit® V3.3 (DakoCytomation).

4.3.2 Dosagem de IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10 e TGF- β em células THP-1 estimuladas com as LDL's modificadas

As células THP-1 foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 células por poço em placa de 24 poços contendo 500 μ L de RPMI/5% SFB. Em seguida foram adicionados 150 nM de PMA para induzir a diferenciação. Após 24 h, as células não aderentes foram aspiradas e o meio de cultura trocado por RPMI/5% SFB. No dia seguinte o meio de cultura foi trocado novamente por RPMI sem soro e as células foram incubadas em estufa por mais 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com 20 μ g/mL de LDL, LoxLDL ou HoxLDL. Após 24 h, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados para dosagem de IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10 e TGF- β por ELISA.

4.4 Protocolos experimentais utilizados nos experimentos com p216

Esta parte dos experimentos foi feita sob a supervisão do Dr. Zhong-qun Yan e Dr. Göran Hansson no laboratório de pesquisa cardiovascular do Instituto Karolinska, Estocolmo-Suécia.

Nesta parte utilizamos uma biblioteca contendo 302 peptídeos provenientes de toda a partícula da ApoB-100 humana, não modificados e modificados com MDA.

Inicialmente para saber da capacidade de ativação destes peptídeos em monócitos humanos, células THP-1 foram tratadas com os peptídeos e a produção de IL-8 no sobrenadante foi analisada 16 h depois por ELISA.

Após esse *screening* inicial para identificação de um peptídeo, os protocolos experimentais utilizados são descritos a seguir:

4.4.1 Verificação da presença de contaminação por LPS em p216

O LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) é um produto derivado do lisado de amebócitos do caranguejo *Limulus polyphemus*, com emprego específico na determinação de endotoxinas bacterianas derivadas de bacilos Gram-negativos pela formação de gel. A solução estoque de p216 foi analisada para observar a presença de LPS pelo teste Limulus. Para isto, utilizamos o kit PYROGENT® Single Test Gel Clot LAL Assay (Lonza, Basel, Switzerland) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a verificação da contaminação por LPS, utilizamos também células HEK293 transfectadas estavelmente com TLR4. Estas células crescem em monocamada e foram plaqueadas em placas de cultura contendo 96 poços. Assim, quando as células atingiram uma semiconfluência, o meio de cultura foi trocado para DMEM/1%. No dia seguinte, as células foram ativadas com 25 µg/mL de p216. A produção de IL-8 foi analisada no sobrenantes das culturas 16 h depois. Como controle positivo, utilizamos o LPS (100 ng/mL).

4.4.2 Tratamento de monócitos e neutrófilos humanos, células endoteliais de aorta humana e macrófagos murinos com p216

Os monócitos e neutrófilos humanos foram purificados como descrito anteriormente. Em seguida as células foram estimuladas com 25 µg/mL de p216. A produção de IL-8 foi analisada no sobrenadante das culturas dos neutrófilos após 8 h de estímulo por ELISA. A produção de IL-8 por monócitos humanos foi analisada por ELISA 16 h depois da adição do estímulo. No sobrenadante dos monócitos estimulados com p216 também foi analisada a produção de: IL-8, IL-6, MCP-1, RANTES, TNF-α, IL-10, IL-1β, IL-12p40, IFN-γ, IP-10 e MIG (CXCL9) por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (BD Biosciences, EUA).

As células endoteliais de aorta humana foram estimuladas com 25 µg/mL de p216, por 16 h e a produção de MCP-1 e IL-8 foi analisada no sobrenadante por ELISA.

Os macrófagos peritoneais murinos foram estimulados com 25 µg/mL de p216 por 16 h e a produção de IL-6 murina foi analisada no sobrenadante das culturas por ELISA.

4.4.3 Análise da expressão de mRNA para IL-8 em células mononucleares humanas

a) Purificação do RNA total

Em uma placa de 24 poços, foram plaqueadas em cada poço 1×10^6 células em 500 µL de RPMI/1% SFB. Em seguida as células foram estimuladas com p216 (25 µg/mL) por 5 h. Decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi aspirado e as células foram lisadas em tampão de lise RLT presente no Kit para purificação de RNA RNeasy (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Todo o protocolo seguinte foi feito com os tubos sempre postos em contato com gelo, para manter uma baixa temperatura. Resumidamente, aos poços contendo as células estimuladas, foram adicionados 350 µL do tampão de lise RLT e as células foram lisadas com uma ajuda de um pipeta. Em seguida, foram adicionados 350 µL de etanol 99% e as amostras foram homogeneizadas, utilizando uma seringa de 1 mL com uma agulha de 27 G por aproximadamente 5 vezes. As amostras foram adicionadas às colunas de purificação e centrifugadas a 10.000 r.p.m. por 15 segundos. O filtrado foi descartado, sobre a membrana foram adicionados 500 µL de tampão RPE e as colunas foram centrifugadas por 10.000 r.p.m. por 15 segundos. Em seguida, foram adicionados às membranas 80 µL de DNase por 10 minutos. Foram adicionados novamente 500 µL do tampão RPE e as colunas centrifugadas 10.000

r.p.m. por 15 segundos. Em seguida, as colunas foram centrifugadas por 10.000 r.p.m. por 2 minutos para a secagem da membrana. Para a eluição do RNA preso à membrana da coluna, foram adicionados 30 µL de H₂O livre de RNase e as colunas foram centrifugadas por 1 minuto a 10.000 r.p.m.

A concentração de RNA das amostras foi medida em um espectrofotômetro nanodrop com comprimento de onda 260 nm. A qualidade do RNA foi analisada em Bioanalisador, onde integridade do RNA total foi demonstrada pela presença das bandas ribossomais 18s e 28s.

b) Síntese do cDNA

A síntese de cDNA foi feita por transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Em um microtudo de 250 µL foram adicionados 200 ng de RNA total da amostra, 2 µL de pdN6 (oligonucleotídeos) e H₂O livre de RNase q.s.p. 20 µL. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 70 °C por 3 minutos e postos no gelo para que houvesse o resfriamento rápido. Em seguida, foram adicionados: 8 µL de tampão 5 x RT; 2 µL de DTT 0.1 M; 1 µL de dNTP 25 mM; 1,5 µL de RNAasin; 2 µL de Superscript IITM (RNase H- Reverse Transcriptase – Invitrogen) e 3,5 µL de H₂O livre de RNase. Em seguida, os tubos foram incubados em um aparelho termociclador programado para manter as seguintes temperaturas: 25 °C por 10 min, 42 °C por 50 min e 94 °C min. Após a síntese, o cDNA de cada amostra foi mantido à -20 °C para análise posteriores.

c) PCR quantitativo da expressão de mRNA para IL-8

Para observar a expressão de mRNA para IL-8 em PCR de tempo real, utilizamos *primers* comprados prontos para o uso da Applied Biosystems.

Em cada poço de um placa específica para PCR quantitativo foram adicionados 1,25 μ L de cada amostra de cDNA, 8,25 μ L de H₂O livre RNase mais 12,5 μ L de tampão Taq-man Máster Mix 2x concentrado. As placas foram mantidas em gelo durante todo o processo de preparação. Após este processo, as placas foram vedadas com plástico adesivo apropriado para a reação e centrifugadas a 1.000 r.p.m. por 2 minutos para evitar a formação de bolhas no fundo de cada poço. A quantificação de mRNA para IL-8 (PCR quantitativo) foi feita em um aparelho 7900 HT *fast Real-Time PCR system* (Applied Biosystems), utilizando o *software* SDS 2.3 para análise de dados.

A expressão de mRNA para IL-8 das amostras foi feita comparando os dados obtidos com uma curva padrão obtida de cDNA humano universal, cuja reação foi feita na mesma placa.

4.4.4 Análise da fosfoliração de ERK1/2, p38 MAP quinase e JNK em células THP-1

a) Preparo da amostra

Em uma placa de 24 poços foram plaqueados, em cada poço, 500 μ L da suspensão de células THP-1 na concentração de 1×10^6 células/mL, em seguida meio RPMI/1% SFB. No dia seguinte, as células foram estimuladas com 25 μ g/mL de p216 por 5, 10, 30 e 60 minutos. Decorrido o tempo de incubação, a reação foi parada pela adição de 1 mL de PBS a 4 °C. As células foram centrifugadas e lavadas com PBS a 4 °C, para retirada do estímulo. Em seguida as células foram lisadas por adição de um tampão de lise RIPA [Tris-HCl pH 8 (50 mM), NaCl (150 mM), Nonidet[®] P40 Substitute 1% , Deoxicolato de Sódio 0,5%, SDS 0,1%] contendo inibidores de protease (Complete[™], Roche) e inibidores de fosfatases [fluoreto de Sódio (10 mM) e ortovanadato de Sódio (1 mM)]. A concentração de proteína do lisados celulares foi determinada pelo kit para dosagem de proteínas Bio-Rad *protein assay*, de acordo

com as instruções do fabricante. A concentração de proteína de cada amostra aplicada no gel foi de 30 µg.

b) SDS-PAGE e Immunoblot

O lisados celulares foram homogeneizados com tampão de amostra Laemmli (Bio-Rad), contendo 5% de β-mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas em temperatura acima de 90 °C por 5 minutos, em seguida quantidades iguais das amostras (30 µg de proteínas) foram aplicadas em gel de gradiente de poliacrilamida-SDS 8-16% e submetidas à eletroforese por 1,5 h a 120 mV. As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por 60 minutos a 100 V, utilizando um aparelho de transferência Trans-blot® cell (Biorad, CA USA). Após a transferência, as membranas foram incubadas com tampão TBS-T (NaCl 150 mM, Tris 20 mM, Tween 20 0,01%, pH 7,4) contendo 5% de leite com ausência de gordura por 1 hora. Em seguida, as membranas foram tratadas com anticorpo monoclonal de coelho contra fosfo-ERK1/2, fosfo-p38 MAP quinase e fosfo-JNK, todos com diluição 1 : 1.000 em TBS-T, 5% de BSA e 0,05% de azida sódica. A incubação foi de 16 h a 4 °C com agitação em agitador vertical. Após este tempo, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T, bloqueadas novamente com leite 5% em TBS-T por 30 min à temperatura ambiente e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, diluído 1: 2.000 em leite 5% em TBS-T por 1 h a temperatura ambiente. As proteínas marcadas foram identificadas e comparadas utilizando um marcador de peso molecular de proteínas. Os imunocomplexos contendo anticorpos marcados com a peroxidase foram visualizados utilizando um kit de ECL *plus* de acordo com as instruções do fabricante. As bandas das proteínas foram visualizadas em filme fotográfico com alta sensibilidade.

As membranas foram tratadas com tampão *stripping* (NaOH 5%, SDS 0,1% em H₂O) por 5 minutos. Após este tempo as membranas foram lavadas com água corrente e, em seguida lavadas com TBS-T por 1 h. Após este tempo, as membranas foram bloqueadas com leite 5% e incubadas com os anticorpos monoclonais contra total-ERK1/2, total-p38 MAP quinase e total-JNK por 16 h a 4 °C. Os passos seguintes foram operados como descrito anteriormente.

4.4.5 Leitura do fluxo de Cálcio intracelular

As células mononucleares do sangue periférico foram plaqueadas em RPMI/5% de SFB e incubadas a 37 °C por 1 h. Após este período, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS a 37 °C. As células aderentes, em sua maioria monócitos, foram marcadas com 0,5 µM de Fluo4-AM na presença de 2,5 mM de probenecida dissolvidos em HBSS sem soro por 40 min a 37 °C. Após este período, as células foram lavadas para retirada do excesso de Fluo4-AM e ressuspenas em HBSS contendo 2,5 mM de probenecida para evitar o extravasamento de Fluo4-AM do meio intracelular. Em seguida as células foram incubadas por mais 30 min a 37 °C para estabilização. Após este período, as células foram levadas ao microscópio de fluorescência. Ao poço contendo as células, foram adicionados 25 µg/mL de p216 ou 2,5 µM de Ionóforo de Cálcio, o qual foi utilizado como controle positivo ou a solução controle. As imagens foram adquiridas no tempo 0, 5, 10 e 30 segundos após a adição do estímulo.

Para a leitura da fluorescência em leitora de microplacas. As células foram marcadas como descrito acima. Em seguida, para cada poço foi feita uma leitura inicial de 30 segundos, a fim de observar a fluorescência basal de cada poço individualmente. Em seguida foram adicionados 25 µg/mL de p216 ou de p265 ou a solução controle. A leitura foi feita a cada 3 segundos, durante um tempo total de 5

minutos. Os dados estão expressos em vezes de aumento relacionadas às leituras basais de cada amostra individualmente.

4.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* GraphPad Prism versão 5.01 para Windows.

Para a expressão dos receptores em células THP-1, os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Newman-keuls.

Os dados obtidos na dosagem de citocinas foram submetidos a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn.

Os dados obtidos com células de doadores foram submetidos a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn.

O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

CAPÍTULO 5.1 – CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS OXIDADAS DA LDL E SEU EFEITO NA EXPRESSÃO DE RECEPTORES CD36 E FcγRII EM MONÓCITOS/MACRÓFAGOS HUMANOS E ENVOLVIMENTO DE PPAR γ

5.1.1 Cromatografia de troca iônica das formas oxidadas da LDL

Neste estudo nós modificamos a LDL por dois diferentes protocolos. O mecanismo de oxidação da partícula de LDL é acompanhado pelo aumento das cargas negativas. Baseado nestas informações, utilizamos uma coluna de troca iônica (Resource Q) em sistema de FPLC para verificar o perfil de cargas negativas e obter informações a respeito do grau de oxidação da LDL modificada tanto por ferro quanto por cobre. A Figura 1 mostra os cromatogramas obtidos da LDL, LoxLDL e HoxLDL. Neles podemos observar uma diferença no perfil de cargas negativas de acordo com o tempo de retenção na corrida. Comparando os cromatogramas, podemos observar um deslocamento dos picos para direita, mostrando que há um aumento das cargas negativas em função do processo de modificação utilizado. O pico de maior concentração proteica da LDL não modificada é obtido entre 15 e 22 minutos com um pico principal eluído em 17 minutos. Já a LoxLDL mostra picos nos intervalos de tempo parecidos aos da LDL, mas contendo dois picos principais, um eluído em 17 e outro em 21 minutos. Já a HoxLDL mostra um total deslocamento da corrida, cujos picos são eluídos entre 19 e 30 minutos, com eluição dos principais picos em aproximadamente 22 minutos, mostrando um grau de oxidação mais elevado.

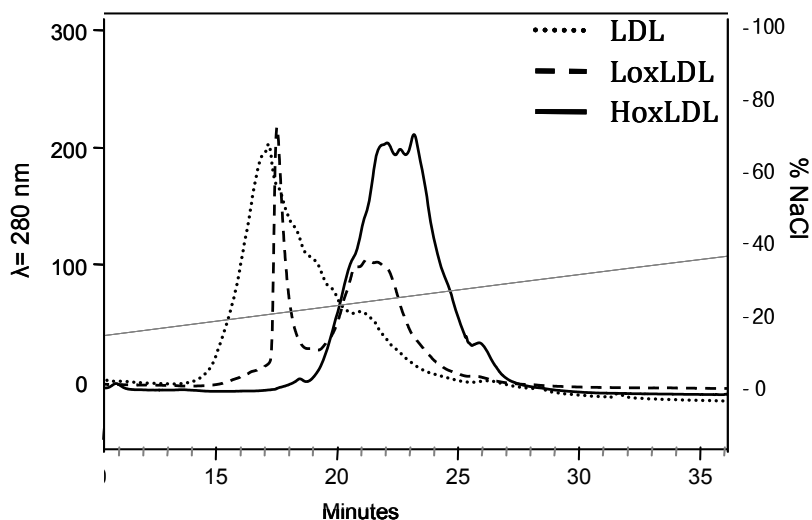


Figura 1. Cromatografia de troca iônica da LDL, LoxLDL e HoxLDL.

A LDL foi purificada por ultracentrifugação sequencial. As preparações de LDL foram obtidas como descrito em material e métodos com mais detalhes. Resumidamente, para obtenção da LoxLDL, a LDL (1 mg/mL) foi dialisada com $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 μM /mg de proteína) por 48 h a temperatura ambiente. Para HoxLDL a LDL (1 mg/mL) foi oxidada por adição de CuSO_4 (20 μM /mg de proteína) por 18 h a 37 °C. Em seguida, 500 μL de cada lipoproteína (1 mg/mL) foram injetados em uma coluna de troca iônica (Resource Q). Na figura estão representados os perfis

5.1.2 Eletroforese em gel de agarose das formas oxidadas da LDL

Com o aumento das cargas negativas durante o processo oxidativo, também ocorre um aumento na mobilidade eletroforética das partículas. Dessa forma, as LDLs obtidas pelos diferentes protocolos de oxidação foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1%. Os resultados obtidos (Figura 2), confirmam a oxidação máxima da HoxLDL, uma vez que esta mostrou um aumento na mobilidade eletroforética, comparada com LDL e LoxLDL. Não foram observadas diferenças na corrida eletroforética entre LDL e LoxLDL, confirmando o baixo grau de oxidação.

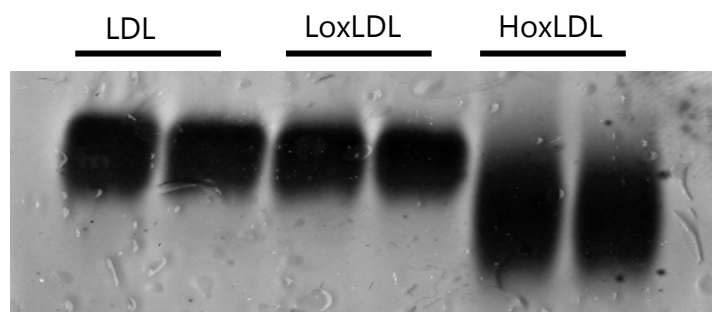


Figura 2. Eletroforese em Gel de agarose da LDL, LoxLDL e HoxLDL.

As preparações de LDL foram obtidas como descrito em material e métodos. Em seguida, 30 μg de cada lipoproteína foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 0,5% em tampão barbital. A figura mostra um experimento representativo. As amostras estão identificadas com suas respectivas *lanes*.

5.1.3 Cromatografia de Exclusão Molecular das formas oxidadas da LDL

De uma maneira geral, no início do processo oxidativo da partícula de LDL ocorre uma diminuição da concentração de antioxidantes, seguido da oxidação da porção lipídica, acompanhado da modificação e hidrólise da ApoB-100 gerando diversos compostos proteicos de baixo peso molecular. Baseados nestas informações, com a finalidade de obter dados a respeito da oxidação da LDL, injetamos 500 μL de LDL (2 mg/mL) em uma coluna de cromatografia de exclusão molecular (Superdex 200R) acoplada a um sistema de FPLC. A Figura 3A mostra os cromatogramas obtidos por exclusão molecular da LDL, LoxLDL e HoxLDL. Os dados obtidos mostram que as diferentes preparações de LDL possuem perfis cromatográficos únicos de acordo com o tempo de retenção. Nossos resultados mostram que a oxidação leva a formação de novos produtos de característica proteica, já que o comprimento de onda foi estabelecido em 280 nm. Estes novos produtos podem ser observados nos cromatogramas da LoxLDL e HoxLDL quando comparados a LDL não modificada. A LoxLDL mostra um novo pico de baixa concentração protéica em 25 minutos, enquanto que a HoxLDL mostra picos contendo baixo peso molecular eluídos em 38 e 41 minutos.

Com estes resultados mostramos que os diferentes protocolos de modificação da LDL geram diferentes produtos, justificando assim um estudo comparado entre essas partículas.

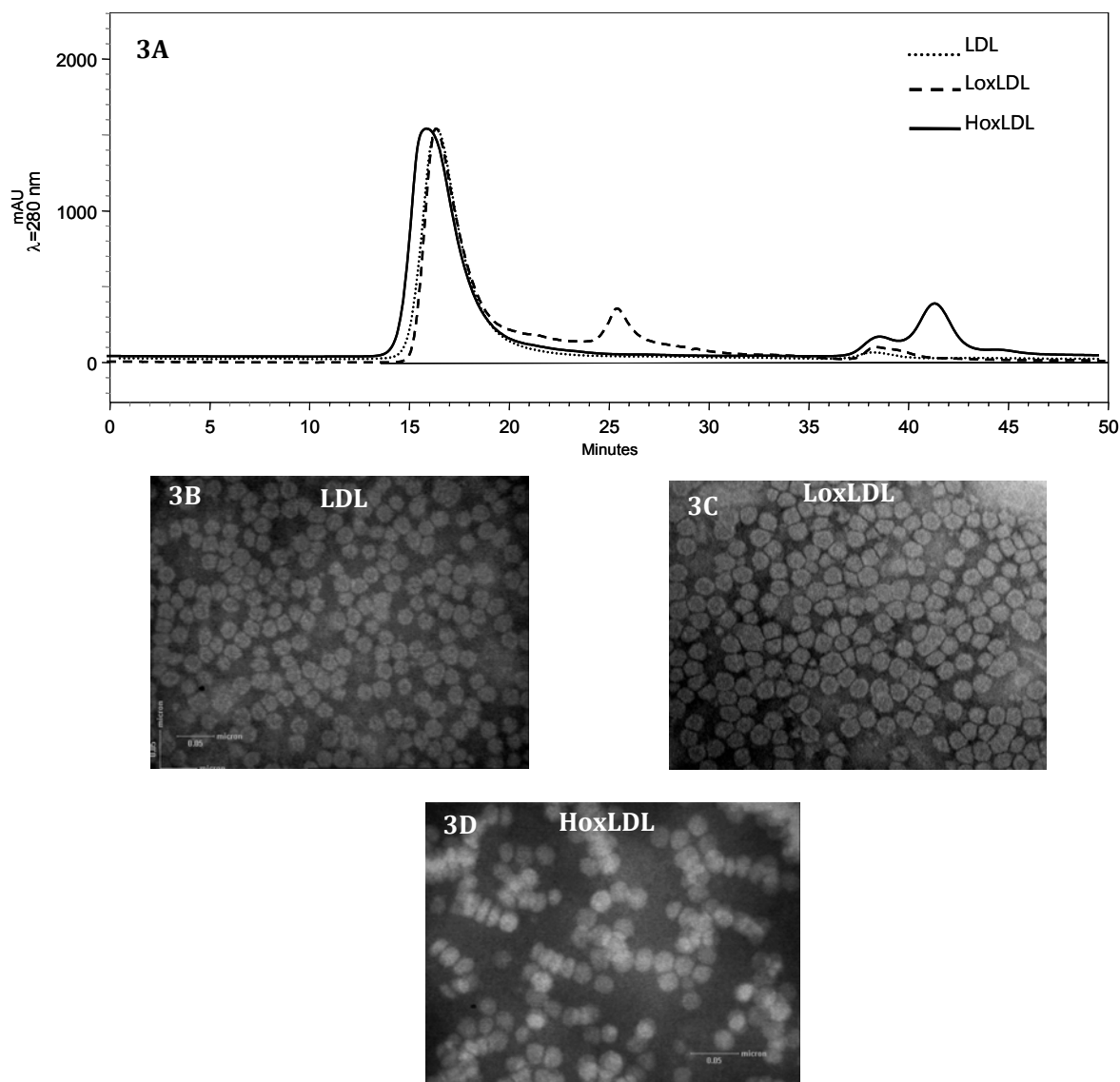


Figura 3. Cromatografia de exclusão molecular e microscopia eletrônica de transmissão da LDL, LoxLDL e HoxLDL.

As preparações de LDL foram obtidas como descrito em material e métodos. Em uma coluna de exclusão molecular (Superdex-200R) foram injetados 500 μ L das lipoproteínas com concentração de 1 mg/mL. Na figura 3A estão representados os perfis cromatográficos obtidos da LDL (.....), LoxLDL (----) e HoxLDL (—). As figuras 3B, 3C e 3D mostram as fotografias de LDL, LoxLDL e HoxLDL, respectivamente, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão em técnica de coloração negativa.

5.1.4 Microscopia eletrônica das diferentes formas oxidadas da LDL

As Figuras 3B, 3C e 3D mostram as figuras obtidas por microscopia eletrônica para LDL, LoxLDL e HoxLDL respectivamente. Os dados obtidos por microscopia mostram que, comparada a LDL, a LoxLDL não apresenta uma mudança drástica na disposição das partículas, mas apenas a formação de pequenos agregados. Já a HoxLDL apresenta uma perda na integridade da partícula, presença de grandes agregados e, em alguns campos podem ser visualizadas fusões entre as partículas de LDL.

5.1.5 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos totais das LDL's com diferentes graus de oxidação

Com a oxidação da LDL ocorre um aumento da concentração de MDA, dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos totais. Na Tabela 1 pode-se observar a quantidade de MDA formado com o processo oxidativo. A LoxLDL mostrou um pequeno aumento na concentração de MDA (7,5 nmol/mg de proteína) e dienos conjugados (D. O. 3,02), quando comparamos com a LDL (D. O. 2,84 e MDA de 0,2 mmol/mg de proteína). A HoxLDL possui uma grande quantidade de MDA (53,1 nmol/mg de proteína) e de dienos conjugados (D. O. 4,00).

O aumento na absorbância a 234 nm é atribuído a um aumento na quantidade de dienos conjugados nas amostras. Por sua vez, o aumento de dienos conjugados está relacionado com o acúmulo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), cuja concentração pode ser obtida através da equação $\Delta[\text{LOOH}] = 2,05 \times \Delta A_{234}/\epsilon_{cd}$, onde $\Delta[\text{LOOH}]$ é a mudança na concentração de hidroperóxidos lipídicos; A_{234} é a mudança na absorbância em 234 nm relacionada a LDL não modificada e $\epsilon_{cd} = 29.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ é um coeficiente de extinção para dienos conjugados (Spranger et al., 1998). Ao aplicarmos a equação para LoxLDL, consideramos $\Delta A_{234} = A_{234\text{LoxLDL}} - A_{234\text{LDL}}$,

pois a equação é baseada na diferença da absorbância relacionada a uma amostra controle. Este mesmo critério foi utilizado para HoxLDL. Sendo assim, ao aplicarmos essa equação aos nossos resultados, obtivemos os valores de $\Delta[\text{LOOH}]$ para LoxLDL de 12,5 μM e para HoxLDL de 80,6 μM . Estes dados mostram o grau de oxidação mínimo da LoxLDL e a extensiva oxidação da HoxLDL.

Tabela 1 – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), Dienos conjugados e Hidroperóxidos lipídicos das lipoproteínas modificadas

	¹ TBARS	² Dienos	³ Hidroperóxidos Lipídicos totais
LDL	0.2	2.84	-
LoxLDL	7.5 ^{***}	3.02	12,5
HoxLDL	53.1 ^{***}	4.00 ^{***}	80,6

¹ TBARS estão expressos em nmol of malondialdeído /mg proteína.

² Dienos conjugados expressos em Densidade Optica de uma solução 1 mg/mL.

³ Concentração de hidroperóxidos lipídicos em μM . Obtida através da equação $\Delta[\text{LOOH}] = 2,05 \times \Delta A_{234} / \epsilon_{cd}$, onde $\Delta[\text{LOOH}]$ é a mudança na concentração de hidroperóxidos lipídicos, A_{234} é a mudança na absorbância em 234 nm relacionada a LDL não modificada e $\epsilon_{cd} = 29.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ é um coeficiente de extinção para dienos conjugados.

Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três diferentes experimentos.

*** $p < 0.001$ vs LDL.

5.1.6 Expressão de CD36, Fc γ RII e CD11b/CD18 (mac-1) em células THP-1

As células THP-1 possuem um formato arredondado e são mantidas em suspensão no meio de cultura. Após o tratamento com 150 nM de PMA por 24 h, estas células se tornam aderentes, aumentando a expressão de algumas moléculas de membrana, adquirindo o fenótipo semelhante aos macrófagos (Figura 4). Neste estudo, utilizamos apenas as células aderentes como controle de diferenciação

celular. O estágio de diferenciação das células THP-1 foi confirmado pelo aumento da expressão de CD11b/CD18 (mac-1). Como mostrado na Tabela 2, as células THP-1 diferenciadas com PMA apresentaram um aumento de aproximadamente 5 (cinco) vezes na expressão de CD11b/CD18 (mac-1). O tratamento com PMA induziu um aumento significativo na expressão de CD36 ($86,6 \pm 0,9$). Aproximadamente 8 (oito) vezes de aumento comparado às células THP-1 não diferenciadas, as quais foram utilizadas como controle ($10,3 \pm 1,2$). Quanto a expressão de Fc γ RII, foi detectado um pequeno aumento na expressão deste receptor após a diferenciação com PMA comparado com as células não diferenciadas ($82 \pm 0,67$ vs $73,6 \pm 0,8$ respectivamente). O aumento na expressão de CD36 e de CD11b/CD18 (mac-1) após a diferenciação foi encontrado tanto na porcentagem de células positivas, quanto na média da intensidade da fluorescência (MFI).

Células THP-1 não diferenciadas



Células THP-1 diferenciadas com PMA



Figura 4. Células THP-1 não diferenciada e diferenciadas para macrófagos com PMA

As células THP-1 foram plaqueadas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço em RPMI/10% SFB e tratadas com 150 nM de PMA. Após 24 h as células não aderentes foram removidas e foi adicionado novo meio RPMI/10% SFB. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado por RPMI/1% SFB e os experimentos foram realizados 24 h depois. As imagens mostram uma figura representativa dos experimentos.

Tabela 2 – Expressão de CD11b/CD18 (mac-1), CD36 e FcγRII em células THP-1 não diferenciadas e diferenciadas com PMA.

	Não-diferenciadas	diferenciadas
CD11b/CD18 (mac-1)	13 ± 1.15	58.3 ± 7.4 ^{***}
CD36	10.3 ± 1.2	86.6 ± 0.9 ^{***}
FcγRII	73.6 ± 0.8	82 ± 0.6

As células THP-1 não diferenciadas e diferenciadas com PMA foram marcadas com anticorpos específicos e a expressão de CD11b/CD18 (mac-1), CD36 e FcγRII foi analisada por citometria de fluxo. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão de no mínimo três diferentes experimentos. ^{***}p<0.001 vs células THP-1 não diferenciadas.

5.1.7 Efeitos de formas oxidadas da LDL na expressão de CD36 e FcγRII em células THP-1

a) em células THP-1 não diferenciadas

As células THP-1 foram tratadas com LDL, LoxLDL ou HoxLDL (20 µg/mL) e a expressão de CD36 ou FcγRII foi determinada por citometria de fluxo. O tratamento das células THP-1 não diferenciadas com LoxLDL ou HoxLDL aumentou a expressão de CD36 comparado ao grupo controle não tratado (Figuras 5A, 5C e 5D). O tratamento com LoxLDL induziu um aumento na expressão de CD36, demonstrado pela média da intensidade da fluorescência (MFI: 27,3 ± 1,9) (Figura 5A) e pela porcentagem de eventos positivos (39.9% p < 0.001) (Figura 5C). O aumento da expressão de CD36 também foi observado após o tratamento com HoxLDL, apresentando MFI de 24,9 ± 1,6 com um aumento de 39% (p < 0.001) (Figuras 5A e 5D) comparado ao grupo controle não tratado (MFI 10,3 ± 1,2). Não foi observado aumento na expressão de CD36 ou FcγRII após o tratamento com a LDL não modificada (Figuras 5A, 5B e 5E). Estes resultados mostram claramente que o tratamento de células THP-1 não diferenciadas com oxLDL, com baixo e alto grau de

oxidação, induzem a expressão do receptor CD36, mostrando que este efeito é independente do grau de oxidação da partícula de LDL. Entretanto, estes tratamentos não afetam a expressão de FcγRII.

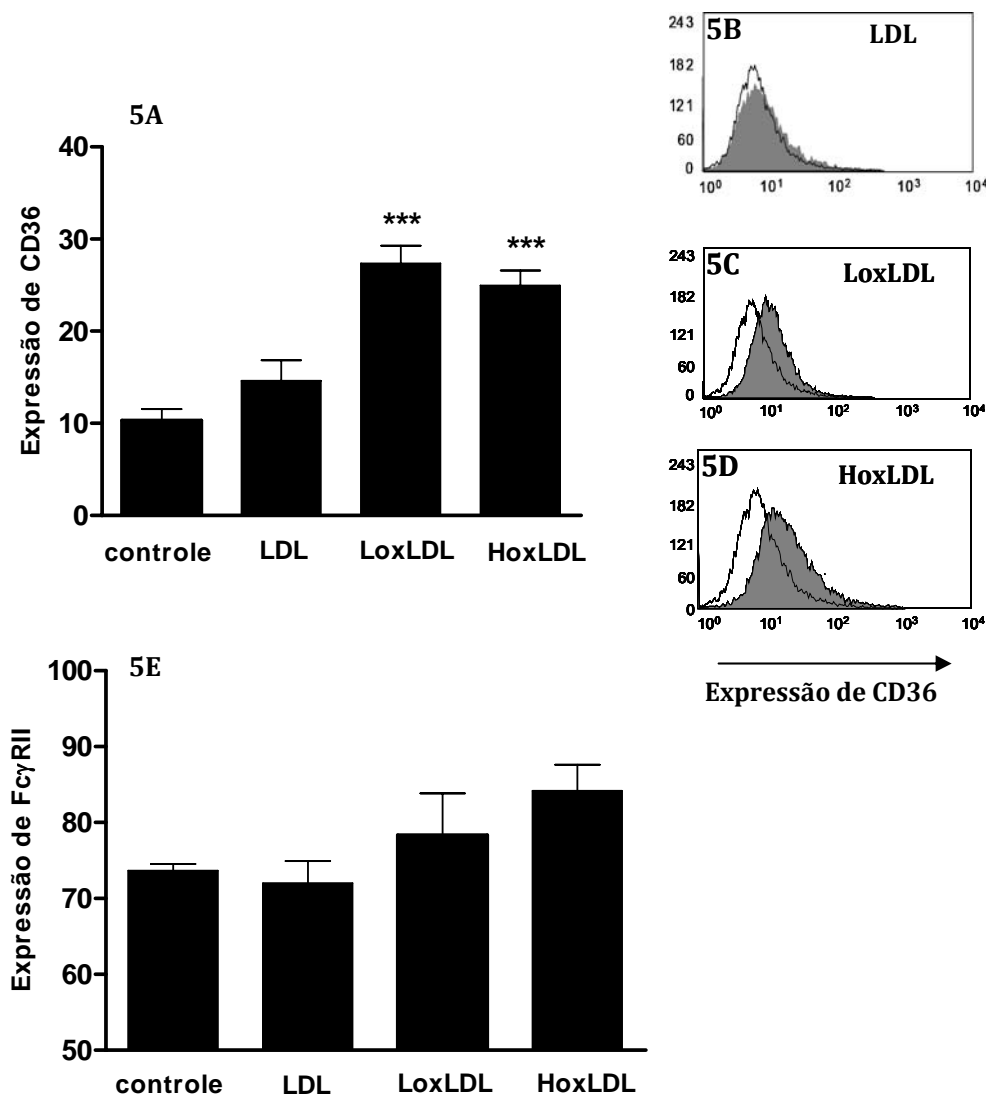


Figura 5. Efeitos das LDL's modificadas na expressão de CD36 e FcγRII em células THP-1 não diferenciadas.

As células THP-1 não diferenciadas foram tratadas com LDL, LoxLDL ou HoxLDL (20 µg/mL) por 24 h. A expressão de CD36 e FcγRII foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico 5A e os histogramas 5B, 5C e 5D mostram expressão de CD36 após os tratamentos as lipoproteínas. O gráfico 5E mostra a expressão de FcγRII após os tratamentos com as lipoproteínas modificadas. Os gráficos estão expressos em média ± erro padrão da média de intensidade da fluorescência (MFI) de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os histogramas mostram um experimento representativo de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ vs controle não tratado.

b) em células THP-1 diferenciadas

Esta parte dos experimentos foi feita utilizando células THP-1 diferenciadas com PMA (THP-1 PMA). Após o tratamento para diferenciação, as células THP-1 foram tratadas com LDL, LoxLDL ou HoxLDL como descrito acima. As Figuras 6A, 6C e 6D mostram que tanto a LoxLDL quanto a HoxLDL induzem a expressão de CD36, comparados ao grupo controle não tratado. A LoxLDL induziu um aumento na porcentagem de eventos positivos em 26,6% (Figura 6C) apresentando uma MFI de 259 ± 71 (Figura 6A) comparados ao grupo controle $86 \pm 2,9$. Resultados similares foram obtidos após o tratamento com HoxLDL, o qual induziu um aumento de 34,7% dos eventos positivos, apresentando MFI de $227 \pm 26,3$ (Figuras 6D e 6A, respectivamente). Diferente dos resultados obtidos com células não diferenciadas, as células THP-1 diferenciadas com PMA mostraram um aumento na expressão de FcγRII após o tratamento com HoxLDL, apresentando um aumento de 74% e MFI de $135 \pm 2,08$ (Figuras 6E e 6F) comparado com o grupo controle (46% eventos positivos; MFI $82 \pm 0,5$). O tratamento com LDL não induziu aumento na expressão de CD36 (Figuras 6A e 6B) ou de FcγRII (Figura 6E).

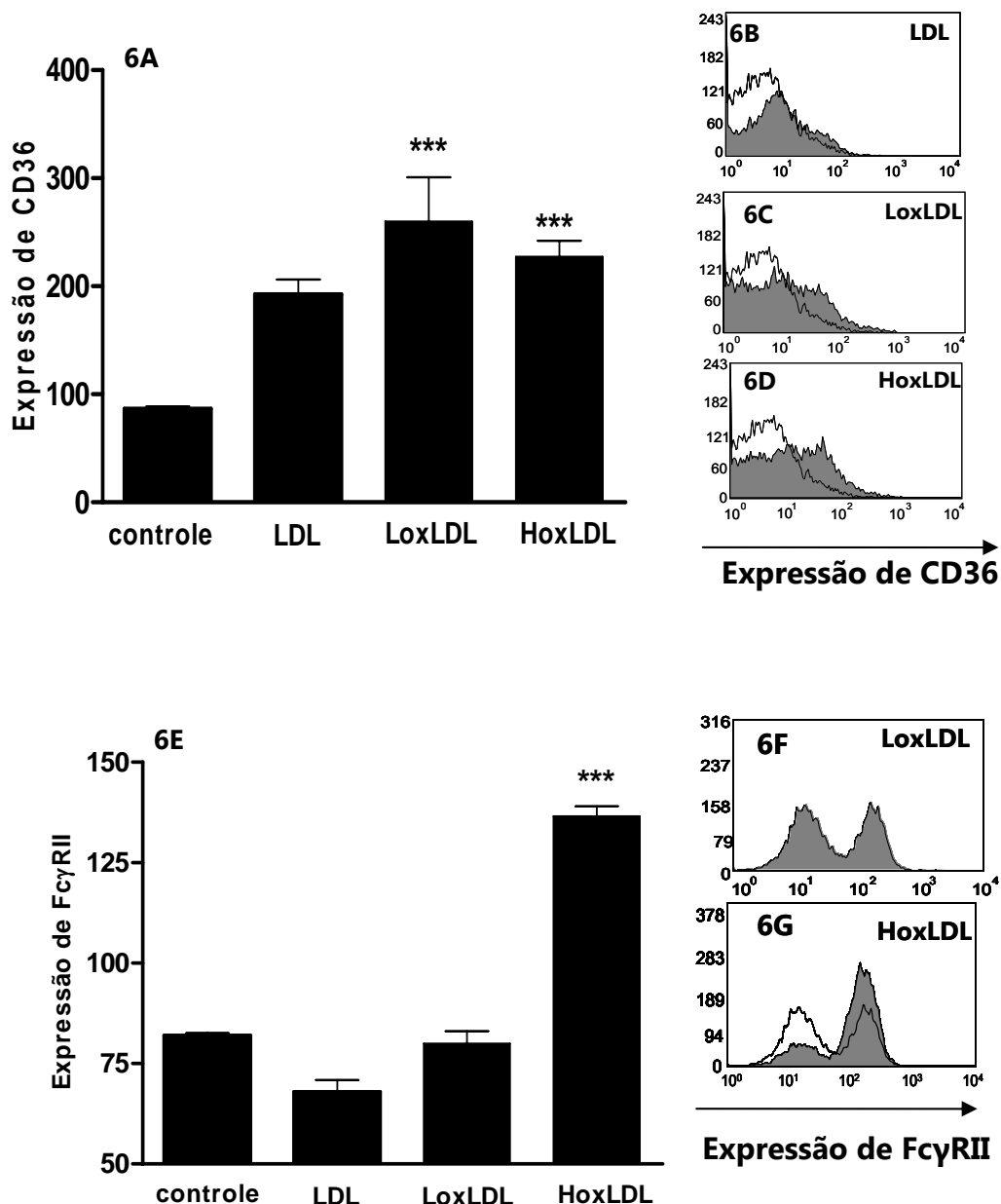


Figura 6. Efeitos das LDLs modificadas na expressão de CD36 e FcγRII em células THP-1 diferenciadas com PMA.

As células THP-1 foram diferenciadas para macrófagos pelo tratamento com PMA, como descrito em material e métodos. Em seguida, as células foram tratadas com LDL, LoxLDL ou HoxLDL (20 µg/mL) por 24 h. A expressão de CD36 e FcγRII foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico 6A e os histogramas 6B, 6C e 6D mostram expressão de CD36 após os tratamentos com as diferentes lipoproteínas. O gráfico 6E e os histogramas 6F e 6G mostram a expressão de FcγRII após os tratamentos com as lipoproteínas modificadas. Os gráficos estão expressos em média ± erro padrão da média de intensidade da fluorescência (MFI) de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os histogramas mostram um experimento representativo de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ vs controle não tratado.

5.1.8 Envolvimento de PPAR γ na expressão de CD36 e Fc γ RII induzida por formas oxidadas de LDL

Para investigar o envolvimento de PPAR γ na expressão de CD36 induzida pelas LDLs modificadas, as células THP-1 foram pré-tratadas com um antagonista de PPAR γ , GW9662 (20 μ M) 30 min antes da adição de LoxLDL ou HoxLDL. Os resultados obtidos mostram que a expressão de CD36 induzida por LoxLDL (MFI: 112,6 \pm 19,4) ou por HoxLDL (MFI: 100,6 \pm 17,8) não foi afetada pelo pré-tratamento com GW9662. Resultados similares foram obtidos quando utilizamos as células THP-1 PMA (Figura 7A). Entretanto, o pré-tratamento das células THP-1 PMA com GW9662 foi capaz de inibir o aumento na expressão de Fc γ RII induzida por HoxLDL (Figura 7B). Esta inibição equivale a aproximadamente 71% comparado com o grupo controle não tratado com GW9662 (MFI: 97 \pm 10 vs controle 135 \pm 2; meio de cultura 82 \pm 0,6). O pré-tratamento com GW9662 também inibiu a expressão de eventos positivos (60 \pm 3,0 vs 75 \pm 0,9; meio de cultura 45,0 \pm 5,0). Juntos, estes dados demonstram que a expressão de CD36 pode ser modulada pelo tratamento com LDLs modificadas, independente do grau de oxidação, mas que este efeito é independente de PPAR γ . Entretanto, o aumento na expressão de Fc γ RII induzido por LDL com alto grau de oxidação é dependente da ativação de PPAR γ . O tratamento com um agonista de PPAR γ , a rosiglitazona (10⁻⁵ M) induziu um aumento significativo na expressão de CD36 (MFI: 138; 63,1% de eventos positivos) (Figuras 8A e 8B; Tabela 3). Estes efeitos foram inibidos pelo tratamento com GW9662, apresentando 63,7% de inibição, confirmando que a dose do antagonista utilizado em nossos experimentos foi efetiva. Em baixas concentrações, a rosiglitazona não apresentou efeitos na expressão de CD36.

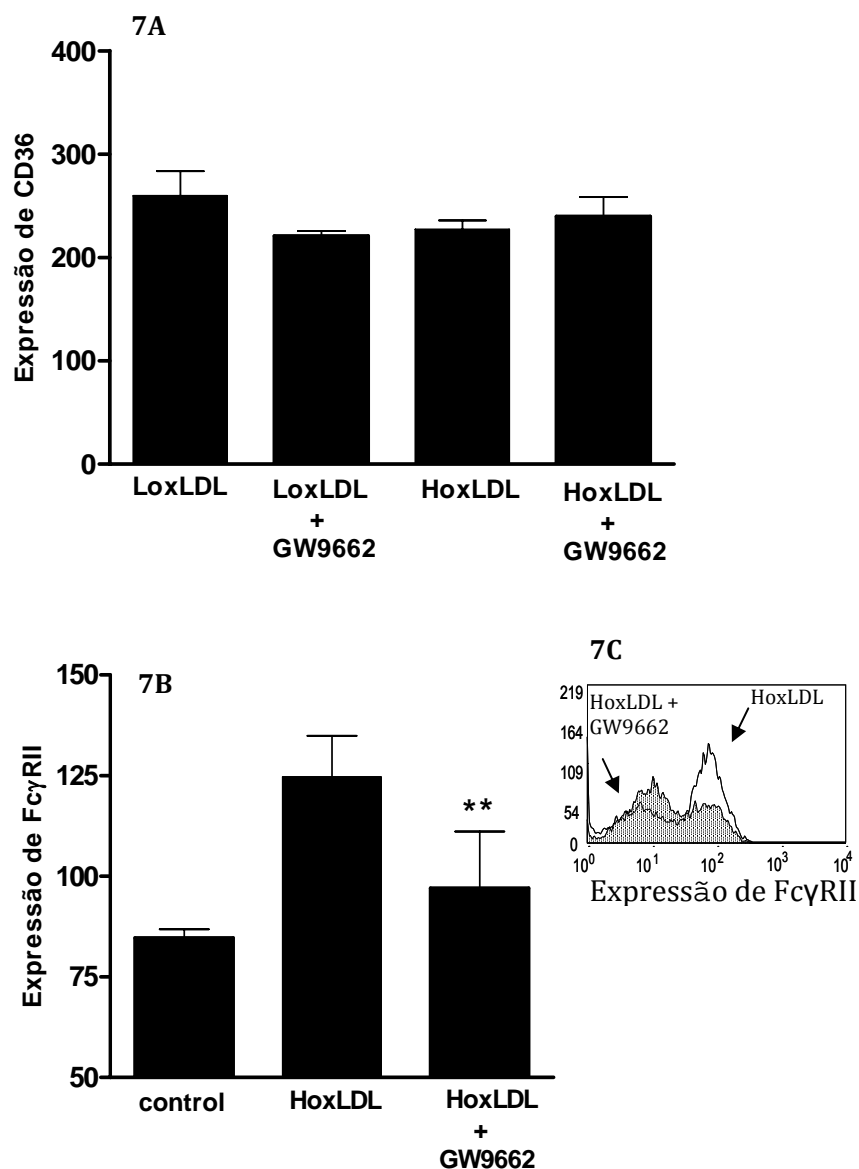


Figura 7. Efeitos do antagonista de PPAR γ (GW9662) na expressão de CD36 e Fc γ RII.

As células THP-1 foram diferenciadas para macrófagos pelo tratamento com PMA, como descrito em material e métodos. Em seguida, as células foram pré tratadas com GW9662 (20 μ M) por 30 min e, em seguida estimuladas com HoxLDL (20 μ g/mL). A expressão de CD36 e Fc γ RII foi avaliada após 24 h por citometria de fluxo. O gráfico 7A e 7B mostram os efeitos de GW9662 na expressão de CD36 e Fc γ RII induzida por HoxLDL, respectivamente. O histograma 7C mostra o efeito inibitório de GW9662 na expressão de Fc γ RII induzida por HoxLDL. Os gráficos estão expressos em média \pm erro padrão da média de intensidade da fluorescência (MFI) de três experimentos independentes realizados em triplicata. O histograma mostra um experimento representativo de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$ GW9662 + HoxLDL vs HoxLDL.

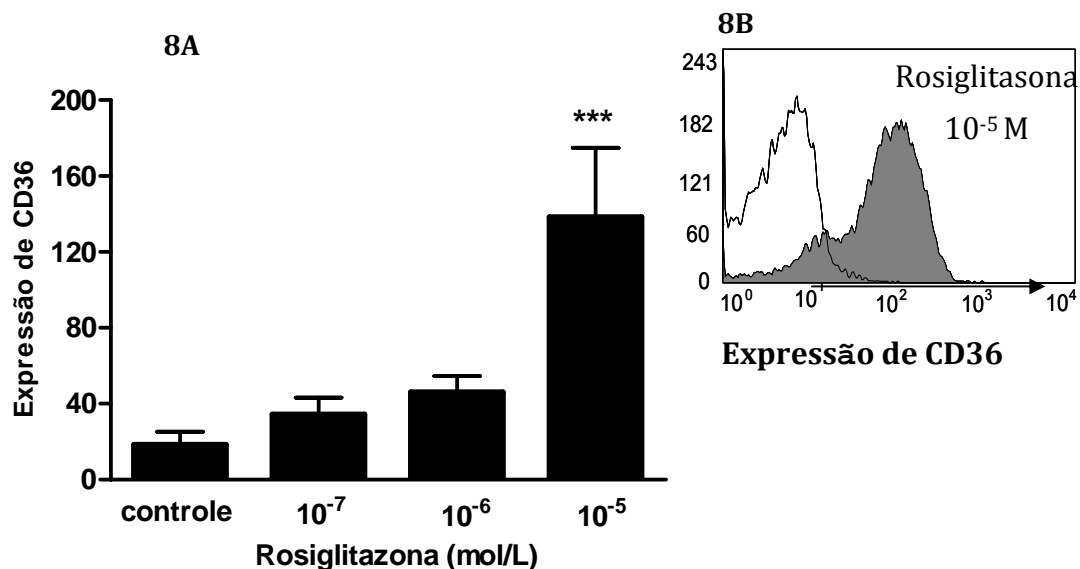


Figura 8. Efeitos da Rosiglitazona na expressão de CD36 em células THP-1 não diferenciadas.

As células THP-1 não diferenciadas foram tratadas com Rosiglitazona (10^{-7} ; 10^{-6} e 10^{-5} mol/L) por 24 h. A expressão de CD36 foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico 8A e o histograma 8B mostram expressão de CD36 após os tratamentos as lipoproteínas. O gráfico está expresso em média \pm erro padrão da média de intensidade da fluorescência (MFI) de três experimentos independentes realizados em triplicata. O histograma mostra um experimento representativo de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ vs controle não tratado.

Tabela 3 – Expressão de CD36 induzida por Rosiglitazona em células THP-1

	MFI	% de inibição	% eventos positivos
Controle	10.3 \pm 1.2	-	-
Rosiglitazona 10^{-5} M	138 \pm 36.6 ***	-	63.1 \pm 10.5 **
Rosigl. + GW9662(20 μM)	50.1 \pm 15 &	63.7	20.9 \pm 8.8 &

As células THP-1 não diferenciadas foram tratadas com Rosiglitazona. A expressão de CD36 foi analisada por citometria 24 h depois. A adição de GW9662 foi feita 30 min antes do tratamento com Rosiglitazona. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da amostra de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs controle. & $p < 0,05$ vs Rosiglitazona 10^{-5} M.

CAPÍTULO 5.2-

A EXPRESSÃO DE CD36 INDUZIDA POR LoxLDL e HoxLDL EM MONÓCITOS/ MACRÓFAGOS HUMANOS É PARCIALMENTE DEPENDENTE DE PAF-R

5.2.1 Ativação do PAF-R induz a expressão de CD36 em células THP-1

Produtos resultantes do processo oxidativo das lipoproteínas são capazes de interagir com o PAF-R. Para verificar se a ativação destes receptores aumenta a expressão de CD36, as células THP-1 foram estimuladas com diferentes concentrações de PAF (10^{-10} ; 10^{-8} e 10^{-6} M) e a expressão de CD36 foi avaliada após 24 h por citometria de fluxo. Os resultados obtidos mostram que o estímulo induzido por PAF foi capaz de induzir a expressão de CD36 em células THP-1 quando comparadas ao controle não tratado (Figuras 9A e 9B). Este aumento foi significativo na dose de 10^{-6} M de PAF ($48,6 \pm 5,6$ de intensidade de fluorescência, 40,2 % de eventos positivos). Este efeito foi significativamente inibido pelo pré-tratamento com um antagonista de PAF-R, o WEB2170, na dose de 50 μ M, induzindo 54,5 % de inibição (Figura 9C).

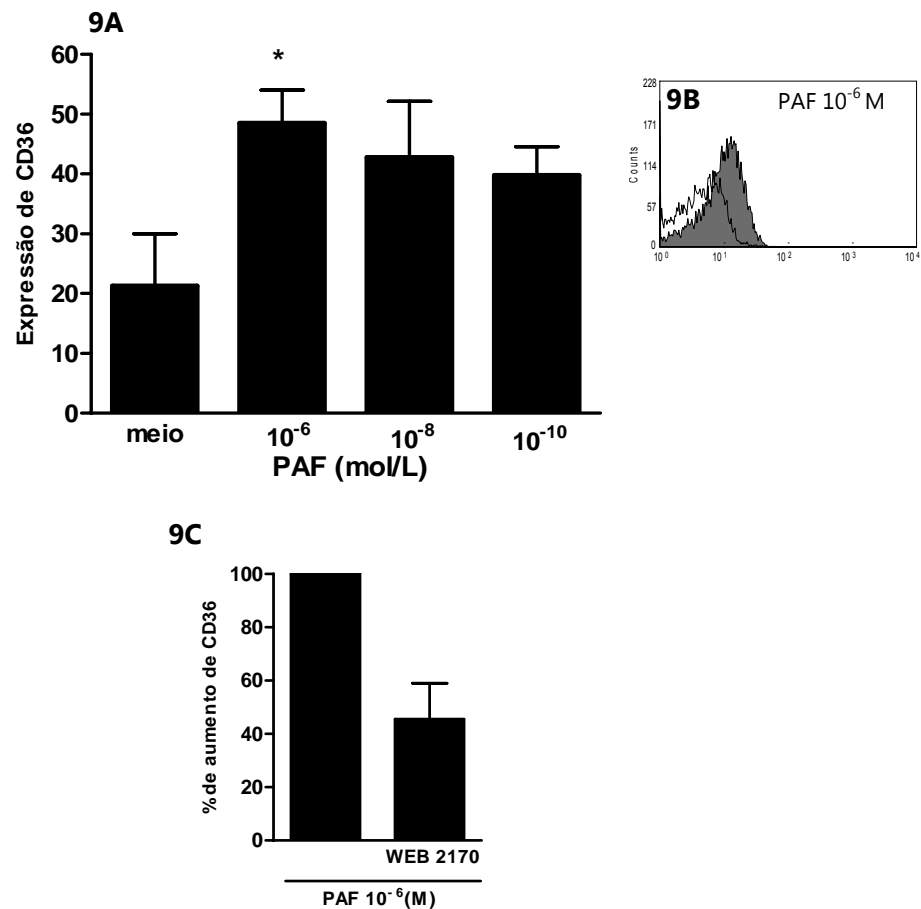


Figura 9. Efeitos do tratamento das células THP-1 com PAF na expressão de CD36.

As células THP-1 foram tratadas com diferentes concentrações de PAF (10^{-6} ; 10^{-8} e 10^{-10}). A expressão de CD36 foi avaliada por citometria após 24 h. O gráfico 9A mostra a expressão de CD36 em células THP-1 após o tratamento com PAF. O histograma 9B mostra um experimento representativo da expressão de CD36 induzida por PAF na concentração 10^{-6} M. O gráfico 9C mostra o efeito de WE2170 (50 μ M) na expressão de CD36 induzida por PAF (10^{-6} M). O gráfico expressa a média \pm erro padrão da média de intensidade da fluorescência (MFI) de três experimentos independentes realizados em triplicata. O histograma mostra um experimento representativo de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs controle não tratado.

5.2.2 A expressão de CD36 por formas oxidadas da LDL em células THP-1 é dependente de PAF-R

a) em células THP-1 não diferenciadas

A participação de PAF-R na expressão de CD36 e FcγRII induzida por LoxLDL ou HoxLDL em células THP-1 não diferenciadas foi investigada utilizando o antagonista WEB2170. Este foi adicionado às células THP-1 não diferenciadas, 30 minutos antes da adição das lipoproteínas oxidadas. As Figuras 10A e 10B mostram que tratamento prévio com o antagonista não interferiu na expressão de CD36 induzida pela LoxLDL ou HoxLDL, respectivamente, em células THP-1 não diferenciadas, indicando que a expressão de CD36 induzida por LoxLDL ou HoxLDL em células THP-1 não diferenciadas não é dependente de PAF-R.

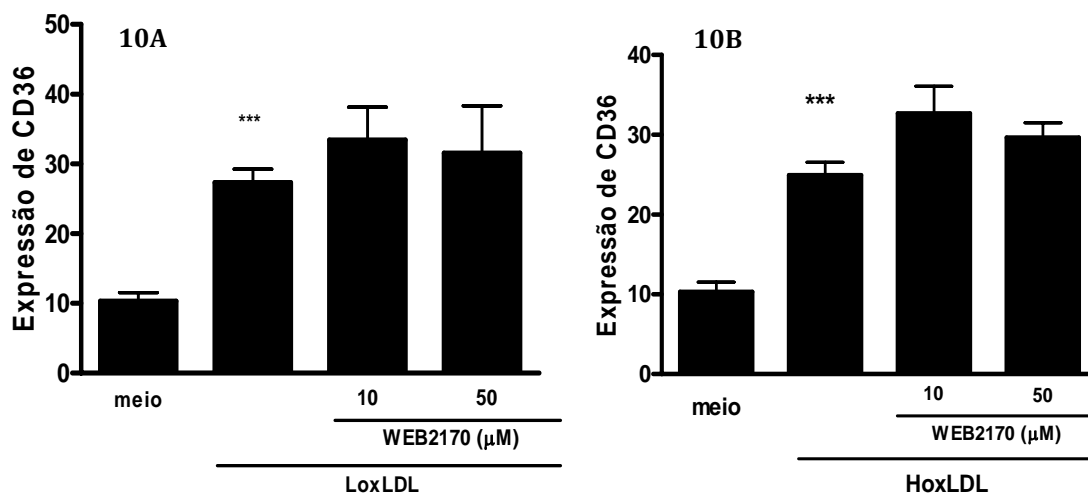


Figura 10. Efeitos do antagonista do PAF-R (WEB2170) na expressão de CD36 em células THP-1 não diferenciadas.

As células THP-1 não diferenciadas foram pré tratadas com WEB2170 (10 e 50 μM) por 30 min e, em seguida estimuladas com LoxLDL ou HoxLDL (20 μg/mL). Os gráficos 10A e 10B mostram a expressão de CD36 após o estímulo de 24 h com LoxLDL e HoxLDL em células THP-1 previamente tratadas com WEB2170. Os gráficos estão expressos em média ± erro padrão da média de intensidade da fluorescência (MFI) de três experimentos independentes realizados em triplicata. *** p < 0,001 vs controle não tratado.

a) em células THP-1 não diferenciadas

O processo de diferenciação das células THP-1 pelo tratamento com PMA por si só já induz um aumento na expressão de CD36 comparada com células THP-1 não diferenciadas, como mostramos em resultados anteriores (Tabela 2). Ao estimularmos as células THP-1 PMA com as lipoproteínas oxidadas, observamos um aumento na expressão de CD36, como mostrado em resultados anteriores deste mesmo estudo.

Em seguida, analisamos a participação de PAF-R na expressão de CD36 em células THP-1 PMA. O WEB2170 foi adicionado às células THP-1 PMA 30 minutos antes da adição das lipoproteínas oxidadas. Nossos resultados mostram que o tratamento prévio das células com WEB2170 inibe o aumento da expressão de CD36 induzido tanto por LoxLDL quanto por HoxLDL quando comparadas ao grupo controle não tratado (Figuras 11A e 11B, respectivamente). O efeito de WEB2170 foi mais efetivo na concentração de 50 μ M, entretanto para a HoxLDL o efeito já foi significativo na concentração de 10 μ M. As inibições foram de aproximadamente 45% e 73% na intensidade de fluorescência para LoxLDL e HoxLDL respectivamente. Mostrando que parte do aumento da expressão de CD36 induzido pela LDL oxidada é dependente de PAF-R.

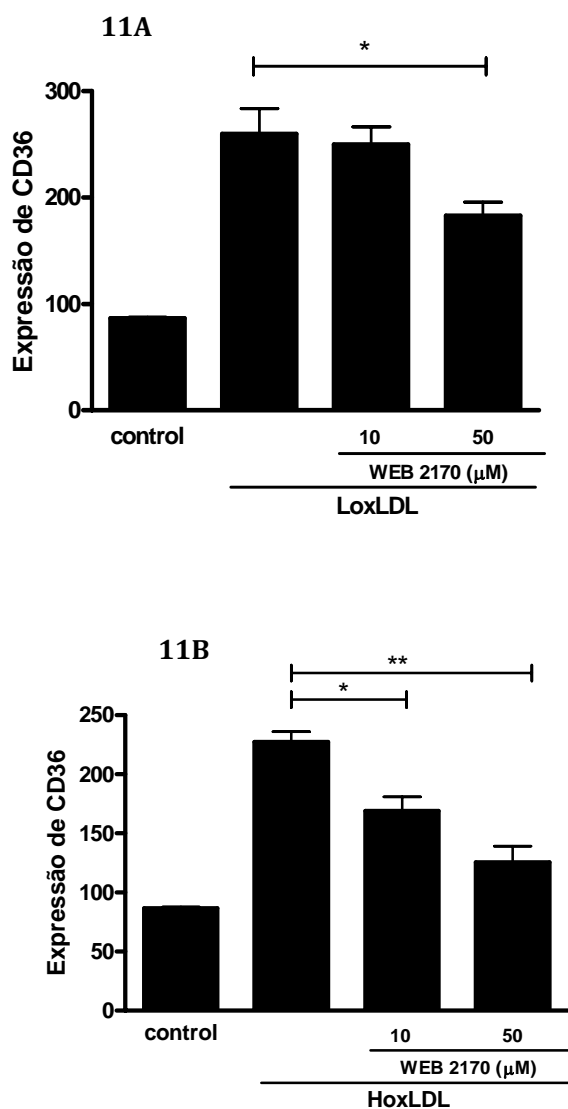


Figura 11. Efeitos do antagonista de PAF-R (WEB2170) na expressão de CD36 em células THP-1 diferenciadas com PMA.

As células THP-1 foram diferenciadas para macrófagos pelo tratamento com PMA, como descrito em material e métodos. Em seguida, as células foram pré tratadas com WEB2170 (10 e 50 μ M) por 30 min e, em seguida estimuladas com LoxLDL ou HoxLDL (20 μ g/mL). A expressão de CD36 foi avaliada após 24 h por citometria de fluxo. Os gráficos 11A e 11B mostram os efeitos de WEB2170 na expressão de CD36 induzida por LoxLDL e HoxLDL, respectivamente. Os gráficos estão expressos em média \pm desvio padrão da média de intensidade da fluorescência (MFI) de três experimentos independentes realizados em triplicata.

CAPÍTULO 5.3

EFEITOS DE FORMAS MODIFICADAS DA LDL NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS THP-1

5.3.1 Produção de IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10 e TGF- β induzidas por formas modificadas da LDL em macrófagos

Existem evidências na literatura que, dependendo do grau de oxidação, a LDL pode induzir ou inibir a ativação de macrófagos. No Capítulo I mostramos que, diferente das células não diferenciadas, as células THP-1 diferenciadas com PMA são mais sensíveis a ativação induzida tanto por LoxLDL, quanto por HoxLDL. Desta forma, nossa próxima etapa foi investigar a produção de IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10 e TGF- β por células THP-1 diferenciadas com PMA e estimuladas pelas lipoproteínas com diferentes graus de oxidação.

Em nossos experimentos, avaliamos a produção de duas citocinas pro-inflamatórias (IL-6 e TNF α), uma quimiocina (IL-8) e duas citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β). De uma maneira geral, os resultados obtidos mostram que a LoxLDL e HoxLDL induzem um perfil diferente de produção de citocinas em células THP-1 PMA. O tratamento das células THP-1 PMA com LoxLDL induziu uma maior produção de IL-8 (3.974 ± 198 pg/mL; $p < 0,001$) (Figura 12A) e IL-6 (503 ± 115 pg/mL; $p < 0,001$) (Figura 12B) comparado ao grupo controle não tratado (342 ± 49 pg/mL e $24,6 \pm 16$ pg/mL para IL-8 e IL-6 respectivamente). A produção de IL-8 e IL-6 induzida por LoxLDL também foi significativa ($p < 0,05$) comparado com a LDL (2.604 ± 192 pg/mL e 261 ± 109 pg/mL para IL-8 e IL-6 respectivamente) e a HoxLDL (2.773 ± 191 pg/mL e 279 ± 77 pg/mL para IL-8 e IL-6 respectivamente). O tratamento das células com LDL ou HoxLDL induziu um aumento significativo comparados ao grupo controle ($p < 0,001$), entretanto não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre si.

Ao analisarmos a produção de TNF- α , observamos que o tratamento das células com HoxLDL induziu uma produção significativa desta citocina (153 ± 45 pg/mL; $p < 0,01$), comparado com o grupo controle não tratado ($12 \pm 9,7$ pg/mL) (Figura 12C). O tratamento das células com LoxLDL (66 ± 17 pg/mL) ou LDL (83 ± 50 pg/mL) não induziu uma produção significativa de TNF- α comparado ao grupo controle não tratado.

Em seguida, analisamos a produção de IL-10 e TGF- β no sobrenadante das culturas (Figuras 13A e 13B). Os resultados obtidos mostram que a LDL extensivamente oxidada (HoxLDL) induziu um aumento significativo na produção dessas citocinas ($131,4 \pm 37$ para IL-10 e 1.770 ± 733 para TGF- β ; $p < 0,05$) comparado ao grupo controle não tratado ($15,4 \pm 4$ e 408 ± 312 para IL-10 e TGF- β respectivamente). A HoxLDL também induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) comparada com a LDL e com a LoxLDL. Não foram observadas diferenças significativas na produção de IL-10 e TGF- β induzidas por LoxLDL ou LDL comparadas ao controle não tratado.

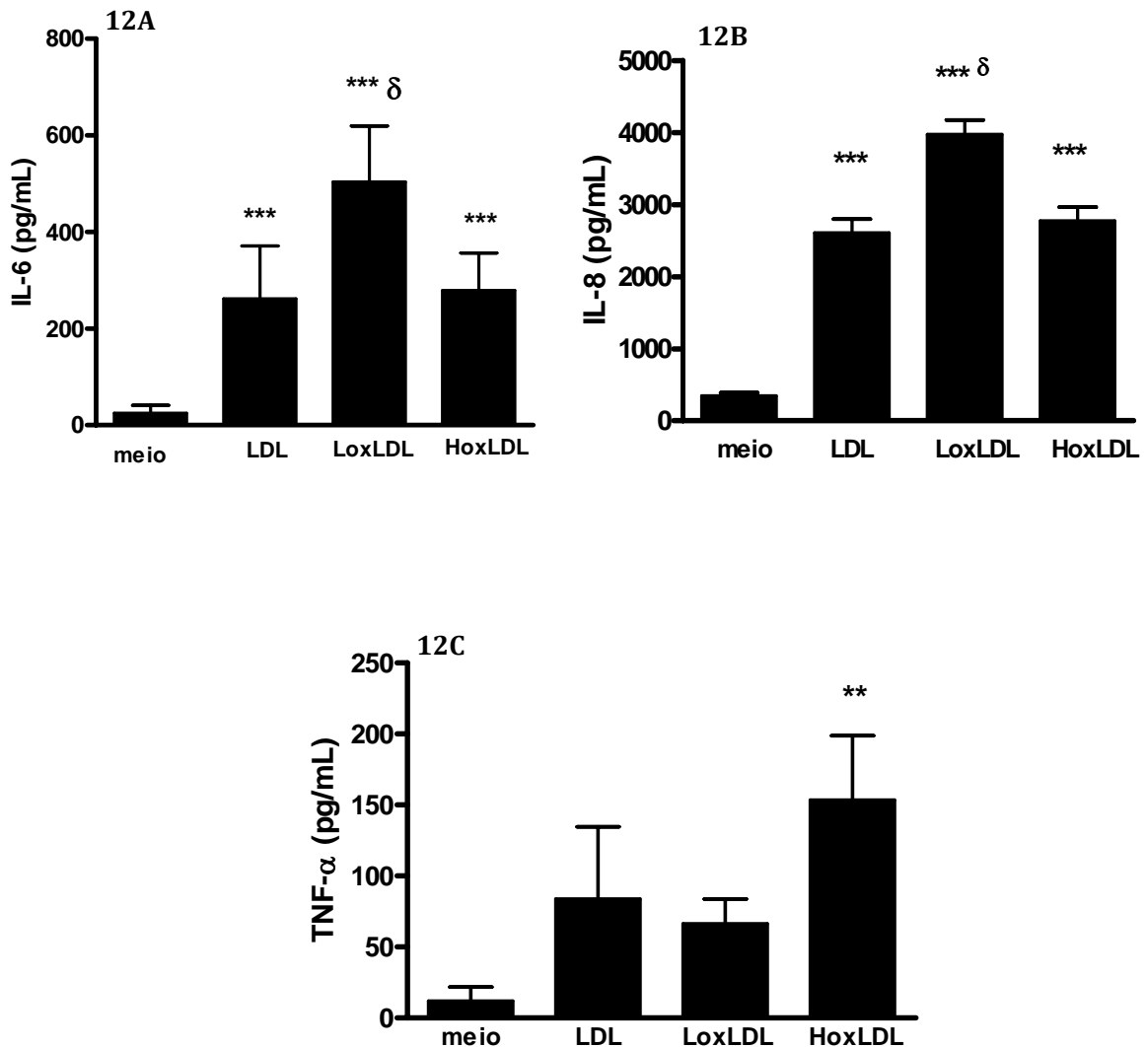


Figura 12. Efeitos das LDL's modificadas na produção de IL-6, IL-8 e TNF-α em células THP-1 diferenciadas com PMA.

As células THP-1 foram diferenciadas para macrófagos pelo tratamento com PMA, como descrito em material e métodos. Em seguida, as células foram tratadas com LDL, LoxLDL ou HoxLDL (20 µg/mL) por 24 h. A produção de IL-6, IL-8 e TNF-α foi analisada no sobrenadante por ELISA. Os gráficos 12A, 12B e 12C mostram a produção de IL-6, IL-8 e TNF-α, respectivamente. Os gráficos estão expressos em média ± desvio padrão de seis experimentos independentes. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs controle; δ $p < 0,05$ vs LDL e LoxLDL

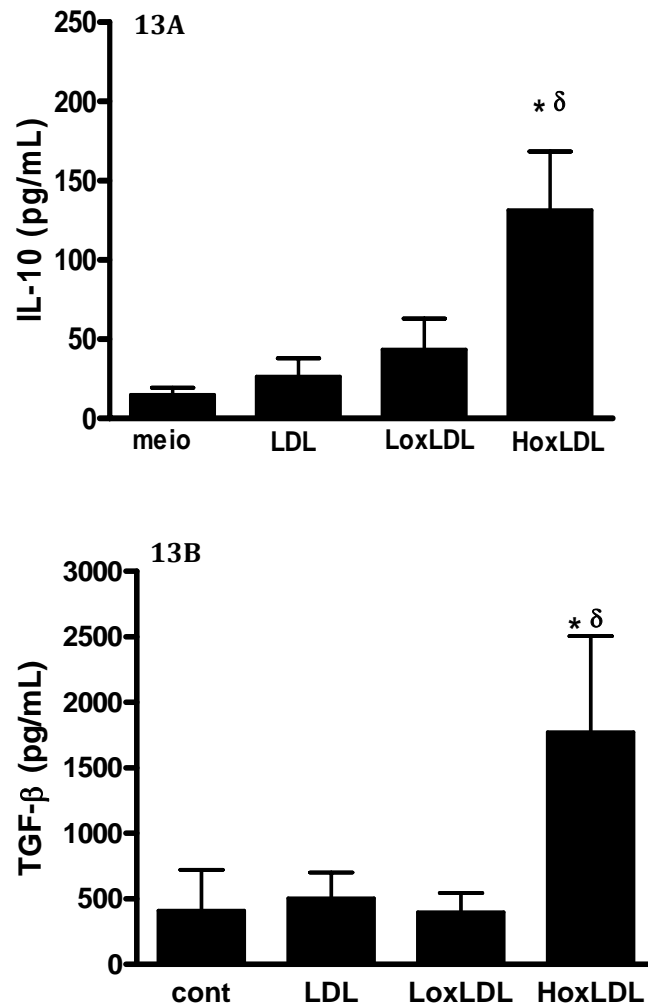


Figura 13. Efeitos das LDL's modificadas na produção de IL-10 e TGF-β em células THP-1 diferenciadas com PMA.

As células THP-1 foram diferenciadas para macrófagos pelo tratamento com PMA, como descrito em material e métodos. Em seguida, as células foram tratadas com LDL, LoxLDL ou HoxLDL (20 µg/mL) por 24 h. A produção de IL-10 e TGF-β foi analisada no sobrenadante por ELISA. Os gráficos 13A e 13B mostram a produção de IL-10 e TGF-β, respectivamente. Os gráficos estão expressos em média ± desvio padrão de seis experimentos independentes. *p < 0,05 vs controle; δ p<0,05 vs LDL e LoxLDL

6 DISCUSSÃO

Ao migrarem para íntima arterial, os monócitos diferenciam-se em macrófagos e são ativados por diferentes formas de LDL modificada. Nos dois primeiros capítulos deste estudo nós utilizamos duas formas de LDL modificada: a) LoxLDL, obtida pela incubação com ferro, e b) HoxLDL, a qual foi obtida pela incubação com cobre. O processo de modificação oxidativa da LDL é acompanhado pela formação de dienos que alteram as cargas positivas dos resíduos de lisina presentes na apoB-100, resultando em acréscimo das cargas negativas (Steinbrecher et al., 1987). Os componentes presentes na oxLDL podem induzir diversos efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo*, tais como adesão e diferenciação de monócitos, ativação de células endoteliais, efeitos vasculares e ativação do sistema imunológico (Frostedgard et al., 1991; Ronchini et al., 2004). Desta forma o processo oxidativo parece estar diretamente envolvido no aparecimento destas substâncias. Os resultados obtidos por TBARS, dienos conjugados e cromatografia de troca iônica mostraram claramente a diferença no grau de oxidação da partícula de LDL acompanhado por um aumento das cargas negativas em HoxLDL quando comparada a LoxLDL e LDL. Embora os protocolos de oxidação padronizados neste estudo não possam ser comparados quanto ao potencial oxidativo, pois utilizamos diferentes concentrações de ferro ou cobre para obtenção de LoxLDL e HoxLDL, respectivamente, resultados presentes na literatura apresentam evidências de que, mesmo em concentrações similares, esses metais possuem diferenças em seu potencial oxidante, onde o ferro é menos potente que o cobre em induzir a oxidação da LDL (Lynch e Frei, 1995). Essas evidências, associadas aos nossos resultados das LDL's com diferentes graus de oxidação nos deram segurança de que estávamos trabalhando com duas formas oxidadas de LDL diferentes. A LDL com baixo grau de oxidação é caracterizada pela depleção de antioxidantes, oxidação dos fosfolídeos contendo ácido araquidônico, baixa oxidação de ácidos linoléicos e insignificante modificação da proteína (Chatterjee et al., 2004). Por sua vez, durante a formação da LDL com alto grau de oxidação, os grupos

fosfolipídicos, triacilglicerol e os ésteres de colesterol são transformados em hidroperóxidos que reagem com a ApoB-100, resultando na modificação e fragmentação das cadeias de aminoácidos (Itabe, 1998; Gaut e Heinecke, 2001). Ainda não está claro qual o principal mecanismo responsável pelo início do processo oxidativo *in vivo*, entretanto, diversos agentes causadores desse processo têm sido descritos na literatura, tais como ação de enzimas que promovam oxidação ou até mesmo uma clivagem direta da partícula de LDL (Piha et al., 1995), assim como substâncias produzidas por células endoteliais ou macrófagos expostos a condições pró-inflamatórias (Dugas et al., 1998; Fernvik et al., 2004). Em nosso trabalho optamos por utilizar o cobre e ferro, por serem metais de fácil manipulação, permitindo um certo controle na concentração necessária para que a reação ocorra. Mas também, por existir evidências mostrando que esses metais de transição estão presentes em sistemas biológicos em concentrações suficientes para promover a oxidação da LDL (Smith et al., 1992; Lamb et al., 1995; Swain e Gutteridge, 1995).

Diversos trabalhos presentes na literatura mostram que a maioria dos efeitos biológicos é dependente de produtos resultantes da extensa modificação da LDL, entretanto há poucos resultados que mostram efeitos biológicos de uma LDL com um baixo grau de oxidação (LoxLDL), podendo desempenhar efeitos similares ou diferentes da HoxLDL, uma vez que possui diferentes produtos oxidados (Thorne et al., 1996; Kavanagh et al., 2003; Bae et al., 2009).

A oxidação da LDL é um processo que se inicia na porção lipídica, e esta modificação pode causar uma modificação da partícula de ApoB-100 (Hevonoja et al., 2000). Nos resultados obtidos com a cromatografia de exclusão molecular, mostramos que a LoxLDL apresenta pequenos sinais de modificação da ApoB-100, enquanto que a HoxLDL já mostra o aparecimento de produtos de baixo peso molecular. Além disto, as fotos obtidas por microscopia eletrônica mostram que é necessário um estágio de oxidação mais avançado para quebrar a integridade da partícula, gerando a formação de agregados e fusão de partículas de LDL. Levando essas informações em consideração, podemos assumir que a LoxLDL é um estágio

inicial no processo de oxidação, que pode evoluir para uma HoxLDL, com um elevado grau de oxidação. Aparentemente, estas características bioquímicas podem levar a diferentes efeitos biológicos, além disso, algumas formas de LDL modificada têm se mostrado mais pro-aterogênicas que outras (Han e Pak, 1999; Hevonoja et al., 2000).

Diversas propriedades biológicas tem sido descritas para a oxLDL. Embora a modificação oxidativa da partícula de LDL tenha sido associada a efeitos pró-inflamatórios, há evidências de que a oxLDL é capaz de inibir a expressão gênica e proteínas inflamatórias induzidas por LPS em macrófagos (Mikita et al., 2001; Rios, 2004). Além disso, compostos presentes na oxLDL, tais como *sphingosine 1-phosphate* (S1P) e *oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine* (oxPAPC) foram capazes de inibir a ativação de TLR2 e TLR4 respectivamente (Walton et al., 2003; Duenas et al., 2008). A complexidades das ações induzidas pela oxLDL pode ser explicada pela sua capacidade de interação com diferentes receptores presentes em macrófagos, células endoteliais e células de músculo liso, os quais podem ser receptores *scavenger A*, CD36 (Yan e Hansson, 2007), *Platelet activating Factor receptor* (PAF) (Frostegard et al., 1997; Svensjo et al., 2003) e TLR4 (Miller et al., 2005; Bae et al., 2009).

Neste trabalho mostramos que a LoxLDL e HoxLDL também atuam na expressão de FcγRII. Estes receptores estão envolvidos no *clearance* de complexos imunes, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, produção de anion superóxido e secreção de varias moléculas biologicamente ativas (Jancar e Sanchez Crespo, 2005). Poucos são os dados na literatura a respeito da participação de receptores Fcγ na aterosclerose, e até o momento não sabemos se sua participação é benéfica ou deletéria. Seria de se esperar que a captação de imunocomplexos de anticorpos ligados a oxLDL por monócitos/macrófagos reduziria a oxLDL circulante, contribuindo para prevenção da lesão aterosclerótica, como tem sido sugerido através de estudos em animais imunizados com oxLDL (Pfeiffer et al., 2001; Hansson e Nilsson, 2009). Por outro lado, o *engagement* do FcγR em fagócitos infiltrados na

placa aterosclerótica poderia ativar estas células a produzirem citocinas e mediadores lipídicos que aumentariam o processo inflamatório vascular.

Com a diferenciação de células THP-1 para macrófagos, encontramos que ocorre um aumento na expressão de FcγRII, estes resultados estão de acordo com dados encontrados na literatura, mostrando que macrófagos expressam uma maior quantidade destes receptores que monócitos (Blom et al., 2003), evidenciando a eficiência do protocolo utilizado para a diferenciação celular. Nossos resultados mostram que HoxLDL, mas não LoxLDL, é capaz de induzir um aumento na expressão de FcγRII em células THP-1 diferenciadas.

Sabe-se que a diferenciação de células THP-1 para macrófagos induz um aumento da expressão de PPARγ (Marx et al., 1998). Este aumento também tem sido mostrado em células tratadas com oxLDL (Kavanagh et al., 2003). Baseados nestas informações, nós decidimos estudar a influência de PPARγ no aumento da expressão de FcγRII induzido por HoxLDL em células THP-1 diferenciadas. Nossos resultados mostram que o pré-tratamento das células com GW9662, um antagonista de PPARγ, reduziu a expressão de FcγRII, sugerindo que monócitos e macrófagos podem expressar diferentes receptores para oxLDL e que a captação e ativação dependente de receptores FcγII com consequente transformação em células espumosas pode ocorrer em uma fase tardia de formação da placa, possivelmente em um estágio onde estão presentes os macrófagos e a LDL com alto grau de oxidação. Resultados encontrados por um outro grupo de pesquisadores mostraram que agonistas de PPARγ aumentam a fagocitose mediada por receptores Fcγ em macrófagos alveolares (Aronoff et al., 2007). Neste estudo mostramos pela primeira vez que a oxLDL pode ativar PPARγ e aumentar a expressão de FcγRII em macrófagos. A expressão protéica e o polimorfismo genético de FcγRII têm sido associados a doenças autoimunes, tais como artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico (van Sorge et al., 2003). Em nossos resultados não observamos se a HoxLDL aumenta a expressão dos receptores FcγIIA ou FcγIIB, os quais são ativadores e inibidores do processo inflamatório, respectivamente (Nimmerjahn e Ravetch, 2008). Apesar desses receptores possuírem

funções biológicas opostas ao se ligarem a complexos imunes, foi demonstrado que o receptor $Fc\gamma IIB$ também é capaz de desenvolver funções associadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares quando se ligam a complexos formados de proteína C-reativa ligada à oxLDL (Mineo et al., 2005). Entretanto, até o momento pouco se sabe da participação deste receptor no contexto da doença aterosclerótica, a qual possui várias características de uma doença inflamatória e autoimune (Nilsson e Hansson, 2008).

A captação de oxLDL por macrófagos é mediada por diferentes receptores, os quais incluem o receptor *scavenger* da classe A, CD36 e CD68 (Glass e Witztum, 2001). A expressão de CD36 por monócitos/macrófagos está diretamente relacionada ao aumento da captação das partículas de oxLDL (Nozaki et al., 1995; Tontonoz et al., 1998). Neste presente estudo, nós mostramos que tanto oxLDL quanto HoxLDL são capazes de aumentar a expressão de CD36, de maneira independente do grau de oxidação. Nossos resultados confirmam dados encontrados por outros grupos de pesquisa (Kavanagh et al., 2003), mas além disso, mostramos que este aumento ocorre de maneira independente do estágio de diferenciação celular, uma vez que em nossos experimentos utilizamos THP não diferenciadas e diferenciadas para macrófagos. Estes resultados sugerem que a captação de oxLDL dependente de CD36, com consequente formação de células espumosas, pode começar nos estágios iniciais do processo aterosclerótico, antes da diferenciação de monócitos em macrófagos e da formação das estrias gordurosas e que a LDL com baixo grau de oxidação podem ser responsáveis por iniciar o processo.

Vários estímulos, assim com sinalizações intracelulares têm sido descritos como responsáveis pelo aumento da expressão de CD36 em monócitos/macrófagos, inclusive a ativação de $PPAR\gamma$ (Collot-Teixeira et al., 2007). Nagy e colaboradores (1998), utilizando agonistas, mostraram que a expressão de CD36 em macrófagos pode ser mediada $PPAR\gamma$ (Nagy et al., 1998; Tontonoz et al., 1998). De fato, há evidências sugerindo que parte do efeito da oxLDL pode ser mediado pela ativação de $PPAR\gamma$, uma vez que a oxidação da LDL pode levar a formação de 9- e 13-HODE

(do inglês *hydroxy octadecadienoic acids*), os quais são descritos como potentes ativadores de PPAR γ (Takano e Komuro, 2009). Entretanto, nossos resultados mostram que o aumento da expressão de CD36 induzido por LoxLDL ou HoxLDL em células THP-1, não diferenciadas ou diferenciadas para macrófagos, não foi influenciado pelo pré-tratamento com GW9662, um antagonista de PPAR γ . Este efeito, porém, não foi observado após o tratamento com rosiglitazona, um agonista de PPAR γ , o qual foi capaz de induzir um aumento da expressão de CD36 e este efeito foi inibido por GW9662. Juntos, estes resultados encontrados claramente sugerem o aumento da expressão de CD36 induzido por oxLDL pode envolver mecanismos diferentes independentes da ativação de PPAR γ .

Novas funções associadas ao CD36 têm sido descritas e aquele conceito de que se tratava apenas um receptor *scavenger* capaz de interagir com cargas negativas tem sofrido mudanças consideráveis. Resultados recentes associam este receptor à resistência a infecções por bactérias e fungos, considerando-o um receptor reconhecedor de padrões (Hoebe et al., 2005; Stuart et al., 2005; Silverstein e Febbraio, 2009). Curiosamente, seu envolvimento também foi demonstrado em células sensoriais responsáveis pela sinalização induzida por feromônios em insetos (Benton et al., 2007) e pela preferência a alimentos com alto teor de gorduras por roedores (Gaillard et al., 2008a; Gaillard et al., 2008b). O receptor CD36 também é importante para a fagocitose de células apoptóticas devido a sua interação com os fosfolípídeos oxidados presentes na membrana destas células (Febbraio e Silverstein, 2007). Dados obtidos anteriormente mostram que a fagocitose de células apoptóticas diminui na presença de PAF ou de oxLDL, mostrando assim a dessensibilização de um mesmo receptor. Esses resultados apontaram para a importância do receptor para PAF nestes mecanismos (de Oliveira et al., 2006). Ao lado destes dados, alguns grupos de pesquisa mostram que lipídeos oxidados presente na partícula da LDL modificada, são capazes de aumentar a expressão de CD36, entretanto até o momento não há dados a respeito dos receptores envolvidos nesta ativação (Nagy et al., 1998). Neste estudo mostramos que em células THP-1 diferenciadas com PMA e

tratadas com LoxLDL ou HoxLDL houve um aumento significativo na expressão de CD36 e, pela primeira vez, mostramos que este efeito é dependente de PAF-R.

O PAF é reconhecido por um único receptor com sete domínios transmembrânicos acoplado a proteína G, o qual pode reagir com análogos produzidos durante o processo oxidativo da LDL ou grupamentos presentes em membranas celulares, tais como fosfatidilcolina ou fosfolipídeos (Marathe et al., 1999). Foi demonstrado que análogos do PAF são gerados por oxidação em condições de stress oxidativo ou tabagismo são capazes de ativar leucócitos e plaquetas (Marathe et al., 2001). Além disso, resultados encontrados por nosso grupo de pesquisa e por outros laboratórios demonstraram que produtos PAF-like formados durante o processo oxidativo e presentes na oxLDL possuem ação no endotélio vascular e em macrófagos (Svensjo et al., 2003; Jurado, 2006; Vasques et al., 2006).

Diversos grupos de pesquisa têm demonstrado vários efeitos biológicos dependentes de fosfolipídeos oxidados presentes na oxLDL. Neste conjunto de compostos, pode-se citar espécies oxidadas de fosfatidilcolina (PC) com fosfolipídios contendo um grupamento acil na posição *sn*-2 (Podrez et al., 2002a; Podrez et al., 2002b), como o 1-palmitoil-2-araquidonoil-PC (oxPAPC), 1-palmitoil-2-linoleoil-PC (oxPLPC), 1-palmitoil-2-oxovaleroil-*sn*-glicero-3-PC (POVPC) os quais possuem tanto afinidade por CD36 (Nicholson e Hajjar, 2004) quanto pelo receptor de PAF (Travers et al., 1998; Subbanagounder et al., 1999). Nossos resultados utilizando LoxLDL e HoxLDL mostram que os produtos PAF-like são formados logo no início do processo oxidativo da LDL e estão presentes até mesmo em partículas altamente oxidadas.

Os resultados apresentados no presente estudo não são os primeiros a levantarem uma dúvida a respeito do aumento da expressão de CD36 mediado pela ativação de PPAR γ . Resultados mostrados por outro grupo de pesquisa demonstram que a ativação de células deficientes de PPAR γ , também aumenta a expressão de CD36 (Castrillo et al., 2001; Westendorf et al., 2005). Dessa forma, outro fator de transcrição, chamado Nrf2 [do inglês *nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related factor*

2], tem sido descrito como responsável pela expressão de CD36 mediada pela oxLDL (Ishii et al., 2004) e, até mesmo por compostos descritos como agonistas de PPAR γ , como a 15dPGJ2 (Gong et al., 2002; Zhang et al., 2004). Suspeita-se que a principal via de sinalização responsável pela a ativação de Nrf2 é a MAPK, PKC e PI3K (Zipper e Mulcahy, 2000; Huang et al., 2002; Nakaso et al., 2003) as quais podem ser ativadas através do receptor de PAF (Chen et al., 2005). Embora o estudo de Nrf2 não tenha sido um objetivo em nosso estudo, essa via de sinalização mostra um grande caminho a ser discutido em experimentos futuros que visem uma explicação para os resultados agora encontrados.

Nos resultados encontrados na primeira e segunda parte deste estudo, mostramos que células THP-1 diferenciadas para macrófagos apresentam uma maior sensibilidade a ativação induzida tanto por LoxLDL quanto por HoxLDL, provavelmente pela diferença na expressão de receptores e no potencial inflamatório que pode ser atingido por estas células. Sendo assim, o nosso próximo passo neste estudo foi obter um perfil na produção de citocinas induzidas por LoxLDL ou por HoxLDL em células THP-1 diferenciadas. Os resultados obtidos mostram que a LoxLDL induz uma maior produção de IL-6 e IL-8, enquanto que a HoxLDL, de TNF- α , IL-10 e TGF- β . Esses resultados realmente nos deixaram surpresos, entretanto, eles provam a nossa idéia inicial de que diversos compostos são formados durante o processo oxidativo e, mais ainda, que estes novos compostos possuem efeitos biológicos diferentes. Nossos resultados mostram que a LoxLDL possui um potencial inflamatório maior que a HoxLDL, pois, apesar desta última induzir também um aumento na produção de TNF- α , induz altas concentrações de IL-10 e TGF- β , diferente da LoxLDL.

O estudo das capacidades inflamatórias dos macrófagos tem hoje se direcionado para uma discussão referente às subpopulações de macrófagos, definidas de acordo com suas características: M1, com características pró-inflamatórias e M2 com características anti-inflamatórias e funções associadas a fusão celular, fibrose e cicatrização (Mosser e Edwards, 2008). Apesar da aterosclerose ser

considerada uma doença inflamatória, as duas populações de macrófagos têm sido observadas na placa aterosclerótica avançada (Bouhlef et al., 2007). Entretanto, não se sabe a respeito dessas sub-populações no estágio inicial da lesão. Em nossos resultados, mostramos que a HoxLDL induz uma maior produção de IL-10, TGF- β , além de induzir uma maior expressão de CD36, o qual também é outro marcador associado ao subpopulação M2 (Gordon, 2003). Dados publicados por Fadok et al (1998) mostraram que macrófagos que fagocitaram células apoptóticas estavam polarizados para perfil M2, já que apresentaram baixa produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-8) e alta produção de TGF- β e também de prostaglandina E₂ (PGE₂) e fator ativador de plaquetas (PAF) (Fadok et al., 1998). Resultados publicados anteriormente pelo grupo da Profa Sonia Jancar mostraram que a fagocitose de células apoptóticas pode ser mediada por PAF-R (de Oliveira et al., 2006). Além disso, mostramos anteriormente que a LDL altamente oxidada é capaz de inibir a expressão de COX-2 e iNOS induzidas por LPS em macrófagos (Rios, 2004). Associando estas evidências aos resultados encontrados neste estudo podemos levantar uma hipótese de que a HoxLDL pode interagir com o receptor de PAF gerando um potencial anti-inflamatório no macrófago. Outro mecanismo que pode está envolvido seria a ativação de PPAR γ , cuja expressão tem sido observada em placas ateroscleróticas humanas (Ricote et al., 1998). De fato, diversas evidências atribuem a ativação de PPAR γ à mecanismos anti-inflamatórios e, em nossos resultados mostramos que a HoxLDL é capaz de ativar esse receptor. Além disso, resultados de análise de expressão gênica, obtidos de *microarray* em macrófagos tratados com LDL com diferentes graus de oxidação mostraram que, ao contrário da LoxLDL, a HoxLDL aumenta a expressão de genes relacionados ao PPAR γ , além de diversos outros genes que apresentaram diferenças entres essas duas formas de LDL (Cho et al., 2007). Já a LoxLDL pode interagir com outros receptores, tais como TLR4 sendo mais pró-inflamatória (Miller et al., 2003; Miller et al., 2005). Se considerarmos esta hipótese para a lesão aterosclerótica, podemos sugerir que a LoxLDL inicia o processo inflamatório característico da lesão aterosclerótica, com migração de células

para o espaço subendotelial. Essas células captam tanto LoxLDL quanto HoxLDL, transformando-se em células espumosas, as quais expressam uma maior quantidade de PPAR γ (Ricote et al., 1998). Estas células espumosas são importantes para a manutenção da placa, mas também podem produzir TGF- β , o qual contribui para o aumento da capa fibrosa (Ishisaki e Matsuno, 2006). Esta idéia não responde como estas células produzem metaloproteinases e outras substâncias inflamatórias características da lesão. Entretanto, abre um precedente a ser pesquisado no futuro. Provavelmente, a melhor maneira de pesquisá-la seria uma caracterização de todos os produtos formados durante o processo oxidativo e presentes na LoxLDL e HoxLDL. O que talvez não seja viável, uma vez que a LDL é uma partícula tão heterogênea, com alto peso molecular e que, ao ser modificada pode gerar uma infinidade de produtos que necessitaria de um grande aparato bioquímico e biológico para responder para desenvolver um projeto de tamanha grandeza.

Na intenção de responder uma parte da pergunta e seguindo a linha de raciocínio da ideia acima, delimitamos a próxima etapa deste trabalho em estudar fragmentos peptídicos da sequência de aminoácidos da ApoB-100, os quais podem ter alguma importância na ativação celular e no processo inflamatório característico na lesão aterosclerótica. Dessa forma, no quarto capítulo deste estudo, estudamos a ativação de monócitos por peptídeos derivados ApoB-100. Esta parte do estudo foi baseada em evidências sugerindo que não apenas a parte lipídica, mas também a porção protéica da LDL modificada pode induzir uma ativação celular (Svensjo et al., 2003). Nesta parte do estudo, identificamos um peptídeo na estrutura da ApoB-100 chamado de p216, capaz de [1] induzir a resposta inflamatória em monócitos humanos, induzindo a produção de IL-8, MCP-1, RANTES e IL-6; [2] a ativação por esse peptídeo é específica para fagócitos humanos, tais como neutrófilos e monócitos; [3] p216 induz a mobilização de cálcio intracelular e ativa ERK1/2, JNK e p38 quinase; [4] a produção de IL-8 ocorre devido a ativação de p38 MAP quinase. A modificação da LDL ocorre inicialmente na porção lipídica, aumentando a concentração de aldeídos que podem se ligar à lisina na estrutura da ApoB-100

(Hevonoja et al., 2000). Entretanto, quando os peptídeos foram modificados com MDA, não detectamos a produção de IL-8 observada para o mesmo peptídeo não modificado.

Os macrófagos podem contribuir para aterogênese principalmente após a sua interação com oxLDL na intima arterial, produzindo citocinas e mediadores inflamatórios (Wang et al., 1996; Yan e Hansson, 2007). A ativação dos macrófagos durante o processo aterosclerótico causa um aumento na expressão de CD36, captação de oxLDL, transformando-se em células espumosas (Endemann et al., 1993; Collot-Teixeira et al., 2007). Nos resultados mostrados neste trabalho, nós demonstramos que um peptídeo não modificado derivado da estrutura química da ApoB-100 pode ativar macrófagos e neutrófilos humanos, induzindo a produção de citocinas.

Em seguida, nós estudamos a via de sinalização responsável pela produção de IL-8 dependente da ativação por p216. Os resultados mostram que a ativação de PBMCs com p216 induz um aumento fluxo de cálcio intracelular e que a secreção de IL-8 é dependente principalmente da ativação de p38, apesar de ocorrer também a fosforilação de ERK1/2 e JNK. A ativação de fagócitos induzindo a produção de quimiocinas no processo aterosclerótico tem sido demonstrada (Hansson et al., 2006), entretanto até o momento este fenômeno tem sido atribuído apenas à ativação de células pela LDL minimamente modificada ou por fosfolípidios oxidados provenientes da oxidação da partícula de LDL, os quais há evidências de que sua ação é decorrente da ativação de TLR4 (Honda et al., 1999; Chatterjee et al., 2004; Miller et al., 2005). Em nosso estudo mostramos que peptídeos não modificados da ApoB-100 também são capazes de ativar vias pró-inflamatórias. Mostramos ainda que há uma certa especificidade na ativação induzida por p216, pois este fenômeno foi observado apenas em fagócitos humanos, tais como monócitos e neutrófilos. O tratamento de células endoteliais com p216 não mostrou efeito. Até o momento não se conhece um homólogo para IL-8 em camundongos, entretanto, nestes animais a regulação da produção de IL-6 é similar à produção da IL-8 humana (Vanden Berghe et al., 1999;

Hoffmann et al., 2002), porém a ativação de macrófagos murinos não mostrou efeito na produção de IL-6.

Apesar da ativação de p216 também induzir a produção de IL-6, MCP-1, RANTES em PBMCs, a IL-8 é encontrada em concentrações mais elevadas. Ainda não sabemos os mecanismos específicos que envolvem a produção de concentrações elevadas de IL-8, assim como não sabemos o porquê deste peptídeo não induz a secreção de grande parte das citocinas inflamatórias. Uma possibilidade seria a especificidade de p216 ativar preferencialmente os fatores de transcrição para a síntese de IL-8 em monócitos e neutrófilos. O gene para IL-8 contém elementos regulatórios para NF- κ B, AP-1 e NF-IL-6 (Mukaida et al., 1994). Estes fatores de transcrição podem ser ativados através de quinases de proteínas específicas. Nossos resultados mostram que a fosforilação de p38 se faz necessária para a produção de IL-8 induzida por p216, apesar de ocorrer também a fosforilação de ERK1/2 e de JNK. Estes resultados podem ser explicados pela regulação específica na expressão gênica de IL-8 pela p38 quinase (Hoffmann et al., 2002). Além disso, foi demonstrado por outro grupo de pesquisa que a ativação de p38 estabiliza o mRNA para IL-8, contribuindo para expressão gênica de IL-8 e que a inibição de p38 quinase diminui a adesão de monócitos a células endoteliais induzida por IL-8 (Holtmann et al., 1999). No presente trabalho, os resultados obtidos por *western blot* mostraram que ERK1/2 e JNK MAP quinases também são ativadas. Embora o uso de inibidores de ERK1/2 e JNK não interfira com a produção de IL-8 de maneira significativa, a ativação destas quinases pode ser necessária para a sua produção, uma vez que a ativação de ERK1/2, JNK e NF- κ B podem induzir a transcrição de mRNA o qual pode ser rapidamente estabilizado pela via da p38 quinase (Winzen et al., 1999).

A resposta imunológica gerada contra peptídeos, nativos ou modificados, derivados da sequência da ApoB-100 já vem sendo estudada (Fredrikson et al., 2003a; Fredrikson et al., 2005). Foi demonstrada a presença de anticorpos contra estes peptídeos em seres humanos e animais de experimentação, resultando em uma resposta imune protetora contra o processo aterosclerótico em camundongos

knockout de ApoE (Fredrikson et al., 2003b). A ativação de células participantes do processo aterogênico por peptídeos endógenos foi demonstrada por Edfeldt e colaboradores (Edfeldt et al., 2006), o qual demonstrou que LL-37, um peptídeo endógeno antimicrobiano produzido em infecções, foi encontrado em placas ateroscleróticas, podendo ativar células endoteliais e macrófagos contribuindo para a inflamação na lesão. Nossos resultados mostram que um peptídeo derivado da ApoB-100 pode iniciar um processo inflamatório em um local livre de infecções, contribuindo assim para a aterogênese.

Com os resultados apresentados neste trabalho, não podemos afirmar em que situação este peptídeo será exposto, sendo capaz de iniciar o processo inflamatório, recrutando células para a íntima arterial. O peptídeo p216 encontra-se em uma região rica em prolina chamada prd2 (Segrest et al., 2001). Esta região possui uma ponte dissulfeto entre os aminoácidos 3.167 e 3.297 formando o único *loop* presente em toda a sequência da ApoB-100, que segundo revisado por Segrest et al (2001), trata-se de uma região exposta na superfície da partícula e que não possui interação com lipídeo. Esta ponte dissulfeto não está presente em todas as espécies. Além disso, uma pesquisa na base de dados BLAST mostrou que homólogos de p216 são encontrados principalmente em primatas. Já em camundongos não foi encontrado um peptídeo com boa homologia ao p216. Estes dados estão de acordo com os resultados experimentais encontrados, onde não observamos ativação de macrófagos de camundongos por p216.

A fragmentação da ApoB-100 é um fenômeno presente na lesão aterosclerótica. Há evidências na literatura que mostram que a LDL obtida da íntima arterial de placas ateroscleróticas apresenta diferentes graus de fragmentação (Torzewski et al., 1998). Alguns fenômenos podem estar envolvidos nesse processo: o primeiro seria a oxidação (Steinberg, 1997; Oorni et al., 2000; Ketelhuth et al., 2008). Em nossos resultados, mostramos por microscopia que a extensiva oxidação leva a perda da integridade estrutural, resultando em agregação e possível fusão da partícula, levando também a quebra da ApoB-100 resultando no aparecimento de

produtos de baixo peso molecular; Um outro possível mecanismo responsável pela liberação de fragmentos proteicos seria por proteólise. Após a ação de enzimas proteolíticas sobre a LDL, ocorre não só a fusão de partículas, mas também foi demonstrado que há algumas perdas de fragmentos proteicos (Piha et al., 1995; Hevonoja et al., 2000). O p216 está presente na subunidade beta da ApoB-100, localizado na superfície da partícula de LDL, o qual facilmente poderia ser exposto ou até mesmo liberado após a ação de enzimas ou um processo de oxidação da LDL (Hevonoja et al., 2000; Segrest et al., 2001). Ao analisarmos a sequência do p216 no programa CLC *main workbench*, o qual pode identificar locais de clivagens enzimáticas na estrutura de proteínas, observamos que a tripsina pode gerar um fragmento que contém a sequência completa do p216. Mostrando assim, uma situação em que p216 possa ser exposto na placa aterosclerótica.

De uma maneira geral, os resultados obtidos neste estudo evidenciam a complexidade dos efeitos causados por diferentes formas de LDL oxidada em monócitos/macrófagos e levanta a discussão da dificuldade em encontrar estratégias eficazes para o tratamento da aterosclerose. O aumento da expressão de FcγRII induzido por HoxLDL era de se esperar que tivesse um efeito benéfico na doença aterosclerótica, uma vez que este receptor poderia participar da remoção de complexos imunes formados por anticorpos e oxLDL. Entretanto, a expressão destes receptores está associada a doenças inflamatórias e até mesmo a aterosclerose, sugerindo a necessidade de mais estudos que comprovem sua relevância (Konishi et al., 2002; Hernandez-Vargas et al., 2006). Neste caso, o tratamento com antagonistas de PPARγ poderiam impedir os efeitos da HoxLDL. Já o tratamento com agonistas de PPARγ, tais como rosiglitazona, também não seria uma boa escolha, uma vez que estas drogas aumentam a expressão de CD36, promovendo a formação de células espumosas (Nagy et al., 1998; Tontonoz et al., 1998). Por outro lado, nossos resultados associados a dados presentes na literatura mostram uma função importante desempenhada pelo PAF-R ativado pela oxLDL no processo de formação da placa aterosclerótica. Os compostos PAF-like contribuem para a migração de

monócitos para o espaço subendotelial (Lehr et al., 1993; Leitinger et al., 1997). Neste espaço a oxLDL pode interagir com PAF-R induzindo um aumento da expressão de CD36 em monócitos. Estas células captam oxLDL através de CD36, diferenciam-se em macrófagos e transformam-se em células espumosas, contribuindo para a progressão da lesão (Collot-Teixeira et al., 2007). Desta forma o uso de antagonistas do receptor de PAF pode ser um tratamento a ser considerado para estabilizar a progressão da aterosclerose, uma vez que impediria a migração de monócitos e o aumento de CD36, impedindo assim o aparecimento da célula espumosa.

Além disso, os resultados apresentados neste trabalho mostram pela primeira vez a presença de um peptídeo na sequência da ApoB-100 capaz de induzir a fosforilação da via das MAP quinases, levando à produção de quimiocinas em fagócitos humanos. É digno de nota que a ativação celular, a qual está presente em todas as fases do processo aterogênico, pode ser induzida, não apenas por fosfolípidios oxidados, mas também por peptídeos derivados da ApoB-100. Neste sentido, a identificação de um único peptídeo responsável pela ativação de monócitos, o p216, torna-se relevante. Assim, a busca de fármacos que impeçam a interação e/ou efeito deste peptídeo em macrófagos poderia significar uma alternativa para o tratamento da aterosclerose.

De uma forma geral, nosso trabalho contribui para o avanço no conhecimento dos mecanismos inflamatórios envolvidos no processo aterosclerótico, nos permitindo propor a hipótese esquematizada na figura 1. Além disso, abre novos caminhos para estudos posteriores com vistas ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a aterosclerose.

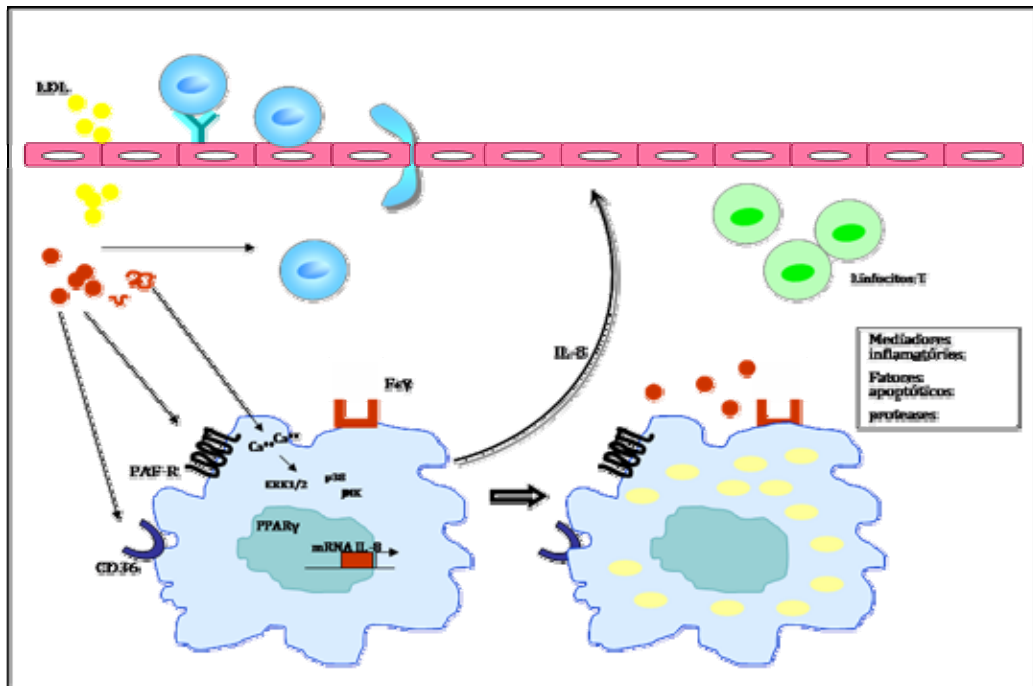


Figura 1. A LDL circulante entra no espaço subendotelial, iniciando o processo de oxidação, transformando-se em oxLDL. A oxLDL interage com PPAR γ e com receptores para o PAF, aumentando a expressão de receptores Fc γ e de CD36. O aumento na expressão de CD36 contribuirá para uma maior captação de oxLDL pelos macrófagos, contribuindo para a formação da célula espumosa. Os fragmentos protéicos da oxLDL também podem ativar os macrófagos, induzindo um aumento no fluxo de cálcio, fosforilação da via das MAP quinases e secreção de IL-8, a qual contribuirá para um aumento na migração de células inflamatórias para o local da lesão. Esta migração celular contribuirá para um aumento no número de células espumosas, as quais podem secretar mediadores inflamatórios e proteases. Estas células contribuirão para o ambiente inflamatório, participando de todo o processo de desenvolvimento e estabelecimento da lesão aterosclerótica.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, estudamos os efeitos de duas formas oxidadas da LDL, uma com baixo grau de oxidação (LoxLDL) e uma com alto grau de oxidação (HoxLDL) em monócitos e macrófagos humanos. Além disso, estudamos a ativação de monócitos humanos por peptídeos derivados da apolipoproteína B-100.

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- 1) Dependendo do grau de oxidação, a oxLDL exerce efeitos diferentes em monócitos e macrófagos. Em monócitos, tanto LoxLDL quanto HoxLDL podem induzir a expressão de CD36. Entretanto, apenas em macrófagos a HoxLDL pode ativar PPAR γ aumentando a expressão de Fc γ RII;
- 2) Parte da expressão do receptor CD36 induzida por LoxLDL ou HoxLDL em macrófagos é dependente do receptor de PAF;
- 3) A ativação de macrófagos com LoxLDL e HoxLDL induz um perfil diferente na produção de citocinas. LoxLDL estimula macrófagos a produzirem altas concentrações de IL-6 e IL-8, enquanto que a HoxLDL induz a produção de TNF- α , IL-10 e TGF- β ;
- 4) A ativação de monócitos humanos pode ser induzida por um peptídeo derivado da apolipoproteína B-100. Identificamos um peptídeo capaz de induzir esta ativação, o p216, o qual induz um aumento do fluxo intracelular de cálcio. Estimula monócitos a produzirem IL-8, IL-6, MCP-1 e RANTES. A produção de IL-8 é dependente de p38 quinase, apesar de p216 também ativar ERK1/2 e JNK.

REFERÊNCIAS

Ministério da Saude, Secretaria de Vigilância em Saúde. Saúde Brasil 2007. Uma Análise da Situação de Saúde. Perfil de Mortalidade do Brasileiro. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletiva_saude_061008.pdf. [2009 jul 11].

World Health Organization. Cardiovascular diseases. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>. [2009 julh 11].

Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med*. 2006;12(2):178-80.

Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1998;188(7):1359-68.

Aronoff DM, Serezani CH, Carstens JK, Marshall T, Gangireddy SR, Peters-Golden M, et al. Stimulatory Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma on Fcgamma Receptor-Mediated Phagocytosis by Alveolar Macrophages. *PPAR research*. 2007;2007:525-46.

Bachem MG, Wendelin D, Schneiderhan W, Haug C, Zorn U, Gross HJ, et al. Depending on their concentration oxidized low density lipoproteins stimulate extracellular matrix synthesis or induce apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells. *Clin Chem Lab Med*. 1999;37(3):319-26.

Bae YS, Lee JH, Choi SH, Kim S, Almazan F, Witztum JL, et al. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ Res*. 2009;104(2):210-8, 21p following 8.

Beaudeux JL, Said T, Ninio E, Ganne F, Soria J, Delattre J, et al. Activation of PAF receptor by oxidised LDL in human monocytes stimulates chemokine releases but not urokinase-type plasminogen activator expression. *Clin Chim Acta*. 2004;344(1-2):163-71.

Benitez S, Sanchez-Quesada JL, Ribas V, Jorba O, Blanco-Vaca F, Gonzalez-Sastre F, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation*. 2003;108(1):92-6.

Benton R, Vannice KS, Vosshall LB. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature*. 2007;450(7167):289-93.

Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(5):707-27.

Bishop-Bailey D, Wray J. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2003;71(1-2):1-22.

Blom AB, Radstake TR, Holthuysen AE, Sloetjes AW, Pesman GJ, Sweep FG, et al. Increased expression of Fcgamma receptors II and III on macrophages of rheumatoid arthritis patients results in higher

production of tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(4):1002-14.

Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*. 2007;6(2):137-43.

Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:223-61.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986;232(4746):34-47.

Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*. 1981;212(4495):628-35.

Brown SL, Jala VR, Raghuwanshi SK, Nasser MW, Haribabu B, Richardson RM. Activation and regulation of platelet-activating factor receptor: role of G(i) and G(q) in receptor-mediated chemotactic, cytotoxic, and cross-regulatory signals. *J Immunol*. 2006;177(5):3242-9.

Castrillo A, Mojena M, Hortelano S, Bosca L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent inhibition of macrophage activation by the non-thiazolidinedione agonist L-796,449. Comparison with the effects of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2). *J Biol Chem*. 2001;276(36):34082-8.

Chatterjee S, Berliner JA, Subbanagounder GG, Bhunia AK, Koh S. Identification of a biologically active component in minimally oxidized low density lipoprotein (MM-LDL) responsible for aortic smooth muscle cell proliferation. *Glycoconjugate journal*. 2004;20(5):331-8.

Chen LW, Lin MW, Hsu CM. Different pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neutrophils. *J Biomed Sci*. 2005;12(2):311-9.

Cho HJ, Shashkin P, Gleissner CA, Dunson D, Jain N, Lee JK, et al. Induction of dendritic cell-like phenotype in macrophages during foam cell formation. *Physiol Genomics*. 2007;29(2):149-60.

Choi SH, Harkewicz R, Lee JH, Boullier A, Almazan F, Li AC, et al. Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake. *Circ Res*. 2009;104(12):1355-63.

Chyu KY, Zhao X, Reyes OS, Babbidge SM, Dimayuga PC, Yano J, et al. Immunization using an Apo B-100 related epitope reduces atherosclerosis and plaque inflammation in hypercholesterolemic apo E (-/-) mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(4):1982-9.

Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovascular research*. 2007;75(3):468-77.

D'Archivio M, Scazzocchio B, Filesi C, Vari R, Maggiorella MT, Sernicola L, et al. Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Lett.* 2008;582(15):2291-8.

Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1994;94(1):437-44.

Day C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med.* 1999;16(3):179-92.

de Oliveira SI, Fernandes PD, Amarante Mendes JG, Jancar S. Phagocytosis of apoptotic and necrotic thymocytes is inhibited by PAF-receptor antagonists and affects LPS-induced COX-2 expression in murine macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006;80(1-2):62-73.

Devaraj S, Yun JM, Duncan-Staley C, Jialal I. C-reactive protein induces M-CSF release and macrophage proliferation. *J Leukoc Biol.* 2009;85(2):262-7.

Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2005;366(9493):1279-89.

Duenas AI, Aceves M, Fernandez-Pisonero I, Gomez C, Orduna A, Crespo MS, et al. Selective attenuation of Toll-like receptor 2 signalling may explain the atheroprotective effect of sphingosine 1-phosphate. *Cardiovascular research.* 2008;79(3):537-44.

Dugas TR, Morel DW, Harrison EH. Impact of LDL carotenoid and alpha-tocopherol content on LDL oxidation by endothelial cells in culture. *J Lipid Res.* 1998;39(5):999-1007.

Dupre DJ, Chen Z, Le Gouill C, Theriault C, Parent JL, Rola-Pleszczynski M, et al. Trafficking, ubiquitination, and down-regulation of the human platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem.* 2003;278(48):48228-35.

Edfeldt K, Agerberth B, Rottenberg ME, Gudmundsson GH, Wang XB, Mandal K, et al. Involvement of the antimicrobial peptide LL-37 in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(7):1551-7.

Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1993;268(16):11811-6.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998;101(4):890-8.

Febbraio M, Silverstein RL. CD36: implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(11):2012-30.

Fernvik EC, Ketelhuth DF, Russo M, Gidlund M. The autoantibody repertoire against copper- or macrophage-modified LDL differs in normolipidemics and hypercholesterolemic patients. *J Clin Immunol*. 2004;24(2):170-6.

Fragopoulou E, Iatrou C, Antonopoulou S, Ruan XZ, Fernando RL, Powis SH, et al. Platelet-activating factor (PAF) increase intracellular lipid accumulation by increasing both LDL and scavenger receptors in human mesangial cells. *J Lab Clin Med*. 2006;147(6):281-9.

Fraleigh AE, Schwartz GG, Olsson AG, Kinlay S, Szarek M, Rifai N, et al. Relationship of oxidized phospholipids and biomarkers of oxidized low-density lipoprotein with cardiovascular risk factors, inflammatory biomarkers, and effect of statin therapy in patients with acute coronary syndromes: Results from the MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction With Aggressive Cholesterol Lowering) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(23):2186-96.

Fredrikson GN, Andersson L, Soderberg I, Dimayuga P, Chyu KY, Shah PK, et al. Atheroprotective immunization with MDA-modified apo B-100 peptide sequences is associated with activation of Th2 specific antibody expression. *Autoimmunity*. 2005;38(2):171-9.

Fredrikson GN, Hedblad B, Berglund G, Alm R, Ares M, Cercek B, et al. Identification of immune responses against aldehyde-modified peptide sequences in apoB associated with cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003a;23(5):872-8.

Fredrikson GN, Soderberg I, Lindholm M, Dimayuga P, Chyu KY, Shah PK, et al. Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003b;23(5):879-84.

Frostegard J, Haegerstrand A, Gidlund M, Nilsson J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *Atherosclerosis*. 1991;90(2-3):119-26.

Frostegard J, Huang YH, Ronnelid J, Schafer-Elinder L. Platelet-activating factor and oxidized LDL induce immune activation by a common mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(5):963-8.

Gaillard D, Laugerette F, Darcel N, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A, et al. The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB J*. 2008a;22(5):1458-68.

Gaillard D, Passilly-Degrace P, Besnard P. Molecular mechanisms of fat preference and overeating. *Ann N Y Acad Sci*. 2008b;1141:163-75.

Gaut JP, Heinecke JW. Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein. Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2001;11(3-4):103-12.

George J, Harats D, Gilburd B, Levy Y, Langevitz P, Shoenfeld Y. Atherosclerosis-related markers in systemic lupus erythematosus patients: the role of humoral immunity in enhanced atherogenesis. *Lupus*. 1999;8(3):220-6.

Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104(4):503-16.

Gong P, Stewart D, Hu B, Li N, Cook J, Nel A, et al. Activation of the mouse heme oxygenase-1 gene by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) is mediated by the stress response elements and transcription factor Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2002;4(2):249-57.

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

Greenberg ME, Sun M, Zhang R, Febbraio M, Silverstein R, Hazen SL. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med*. 2006;203(12):2613-25.

Gustin C, Delaive E, Dieu M, Calay D, Raes M. Upregulation of pentraxin-3 in human endothelial cells after lysophosphatidic acid exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):491-7.

Hammad SM, Taha TA, Nareika A, Johnson KR, Lopes-Virella MF, Obeid LM. Oxidized LDL immune complexes induce release of sphingosine kinase in human U937 monocytic cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2006;79(1-2):126-40.

Han CY, Pak YK. Oxidation-dependent effects of oxidized LDL: proliferation or cell death. *Exp Mol Med*. 1999;31(4):165-73.

Han KH, Chang MK, Boullier A, Green SR, Li A, Glass CK, et al. Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest*. 2000;106(6):793-802.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-95.

Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(7):508-19.

Hansson GK, Nilsson J. Vaccination against atherosclerosis? Induction of atheroprotective immunity. *Semin Immunopathol*. 2009;31(1):95-101.

Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and Atherosclerosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2006;1:297-329.

Havel RJ, Eeder HA, Gragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 1955;34:345-53.

Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest*. 1984;74(5):1890-4.

Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(10):6499-503.

Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*. 1983;3(2):149-59.

Hernandez-Vargas P, Ortiz-Munoz G, Lopez-Franco O, Suzuki Y, Gallego-Delgado J, Sanjuan G, et al. Fcγ receptor deficiency confers protection against atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Circ Res*. 2006;99(11):1188-96.

Hertzel AV, Bernlohr DA. Regulation of adipocyte gene expression by polyunsaturated fatty acids. *Mol Cell Biochem*. 1998;188(1-2):33-9.

Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis*. 1983;3(3):215-22.

Hessler JR, Robertson AL, Jr., Chisolm GM, 3rd. LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis*. 1979;32(3):213-29.

Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1488(3):189-210.

Hoebel K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*. 2005;433(7025):523-7.

Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol*. 2002;72(5):847-55.

Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, Wallach D, et al. Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol*. 1999;19(10):6742-53.

Honda HM, Leitinger N, Frankel M, Goldhaber JI, Natarajan R, Nadler JL, et al. Induction of monocyte binding to endothelial cells by MM-LDL: role of lipoxygenase metabolites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(3):680-6.

Honda Z, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *J Biochem*. 2002;131(6):773-9.

Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem*. 2002;277(45):42769-74.

Huang YH, Schafer-Elinder L, Wu R, Claesson HE, Frostegard J. Lysophosphatidylcholine (LPC) induces proinflammatory cytokines by a platelet-activating factor (PAF) receptor-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol*. 1999;116(2):326-31.

Ibrahimi A, Sfeir Z, Magharaie H, Amri EZ, Grimaldi P, Abumrad NA. Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(7):2646-51.

-
- Ishii T, Itoh K, Ruiz E, Leake DS, Unoki H, Yamamoto M, et al. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circ Res*. 2004;94(5):609-16.
- Ishisaki A, Matsuno H. Novel ideas of gene therapy for atherosclerosis: modulation of cellular signal transduction of TGF-beta family. *Curr Pharm Des*. 2006;12(7):877-86.
- Itabe H. Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Progress in lipid research*. 1998;37(2-3):181-207.
- Jain MK, Ridker PM. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(12):977-87.
- Jancar S, Sanchez Crespo M. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. *Trends Immunol*. 2005;26(1):48-55.
- Jessup W, Wilson P, Gaus K, Kritharides L. Oxidized lipoproteins and macrophages. *Vascul Pharmacol*. 2002;38(4):239-48.
- Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998;391(6662):82-6.
- Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986;6(2):131-8.
- Joseph SB, Tontonoz P. LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3(2):192-7.
- Jurado MC. Análise, caracterização bioquímica e biológica de componentes orgânicos de lipoproteína de baixa densidade oxidada em leucócitos humanos. [tese de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.
- Karasawa K. Clinical aspects of plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761(11):1359-72.
- Kavanagh IC, Symes CE, Renaudin P, Nova E, Mesa MD, Boukouvalas G, et al. Degree of oxidation of low density lipoprotein affects expression of CD36 and PPARgamma, but not cytokine production, by human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis*. 2003;168(2):271-82.
- Kesaniemi YA, Witztum JL, Steinbrecher UP. Receptor-mediated catabolism of low density lipoprotein in man. Quantitation using glucosylated low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1983;71(4):950-9.
- Ketelhuth DF, Tonini GC, Carvalho MD, Ramos RF, Boschcov P, Gidlund M. Autoantibody response to chromatographic fractions from oxidized LDL in unstable angina patients and healthy controls. *Scand J Immunol*. 2008;68(4):456-62.

Klouche M, Peri G, Knabbe C, Eckstein HH, Schmid FX, Schmitz G, et al. Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2004;175(2):221-8.

Konishi H, Katoh Y, Takaya N, Kashiwakura Y, Itoh S, Ra C, et al. Platelets activated by collagen through immunoreceptor tyrosine-based activation motif play pivotal role in initiation and generation of neointimal hyperplasia after vascular injury. *Circulation*. 2002;105(8):912-6.

Kontush A, Spranger T, Reich A, Djahansouzi S, Karten B, Braesen JH, et al. Whole plasma oxidation assay as a measure of lipoprotein oxidizability. *Biofactors*. 1997;6(2):99-109.

Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz DC, Collins JL, et al. Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol Cell Biol*. 2001;21(22):7558-68.

Lamb DJ, Mitchinson MJ, Leake DS. Transition metal ions within human atherosclerotic lesions can catalyse the oxidation of low density lipoprotein by macrophages. *FEBS Lett*. 1995;374(1):12-6.

Lee KJ, Ha ES, Kim MK, Lee SH, Suh JS, Park KH, et al. CD36 signaling inhibits the translation of heat shock protein 70 induced by oxidized low density lipoprotein through activation of peroxisome proliferators-activated receptor gamma. *Exp Mol Med*. 2008;40(6):658-68.

Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(10):1859-67.

Lehr HA, Seemuller J, Hubner C, Menger MD, Messmer K. Oxidized LDL-induced leukocyte/endothelium interaction in vivo involves the receptor for platelet-activating factor. *Arterioscler Thromb*. 1993;13(7):1013-8.

Leitinger N, Watson AD, Faull KF, Fogelman AM, Berliner JA. Monocyte binding to endothelial cells induced by oxidized phospholipids present in minimally oxidized low density lipoprotein is inhibited by a platelet activating factor receptor antagonist. *Adv Exp Med Biol*. 1997;433:379-82.

Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000;106(4):523-31.

Lipton BA, Parthasarathy S, Ord VA, Clinton SK, Libby P, Rosenfeld ME. Components of the protein fraction of oxidized low density lipoprotein stimulate interleukin-1 alpha production by rabbit arterial macrophage-derived foam cells. *J Lipid Res*. 1995;36(10):2232-42.

Lynch SM, Frei B. Reduction of copper, but not iron, by human low density lipoprotein (LDL). Implications for metal ion-dependent oxidative modification of LDL. *J Biol Chem*. 1995;270(10):5158-63.

Marathe GK, Davies SS, Harrison KA, Silva AR, Murphy RC, Castro-Faria-Neto H, et al. Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J Biol Chem*. 1999;274(40):28395-404.

Marathe GK, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Oxidized LDL contains inflammatory PAF-like phospholipids. *Trends Cardiovasc Med*. 2001;11(3-4):139-42.

Marnell L, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol.* 2005;117(2):104-11.

Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J. Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol.* 1998;153(1):17-23.

Mehta JL, Li DY. Identification and autoregulation of receptor for OX-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;248(3):511-4.

Meier CA, Chicheportiche R, Juge-Aubry CE, Dreyer MG, Dayer JM. Regulation of the interleukin-1 receptor antagonist in THP-1 cells by ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cytokine.* 2002;18(6):320-8.

Mikita T, Porter G, Lawn RM, Shiffman D. Oxidized low density lipoprotein exposure alters the transcriptional response of macrophages to inflammatory stimulus. *J Biol Chem.* 2001;276(49):45729-39.

Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 2003;278(3):1561-8.

Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, Witztum JL. Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(6):1213-9.

Mineo C, Gormley AK, Yuhanna IS, Osborne-Lawrence S, Gibson LL, Hahner L, et al. FcgammaRIIB mediates C-reactive protein inhibition of endothelial NO synthase. *Circ Res.* 2005;97(11):1124-31.

Moghadasian MH, McManus BM, Nguyen LB, Shefer S, Nadji M, Godin DV, et al. Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. *Faseb J.* 2001;15(14):2623-30.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69.

Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 1994;56(5):554-8.

Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest.* 1988;58(3):249-61.

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell.* 1998;93(2):229-40.

Nakaso K, Yano H, Fukuhara Y, Takeshima T, Wada-Isoe K, Nakashima K. PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 2003;546(2-3):181-4.

Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(12):2108-14.

Nicholson AC, Hajjar DP. CD36, oxidized LDL and PPAR gamma: pathological interactions in macrophages and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2004;41(4-5):139-46.

Nicholson AC, Han J, Febbraio M, Silverstein RL, Hajjar DP. Role of CD36, the macrophage class B scavenger receptor, in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;947:224-8.

Nicoletti A, Caligiuri G, Tornberg I, Kodama T, Stemme S, Hansson GK. The macrophage scavenger receptor type A directs modified proteins to antigen presentation. *Eur J Immunol.* 1999;29(2):512-21.

Nilsson J, Hansson GK. Autoimmunity in atherosclerosis: a protective response losing control? *Journal of internal medicine.* 2008;263(5):464-78.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(1):34-47.

Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med.* 2007;356(24):2457-71.

Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S, Nakagawa T, Kostner B, Tomiyama Y, et al. Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest.* 1995;96(4):1859-65.

Oksjoki R, Kovanen PT, Lindstedt KA, Jansson B, Pentikainen MO. OxLDL-IgG immune complexes induce survival of human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(3):576-83.

Oorni K, Pentikainen MO, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J Lipid Res.* 2000;41(11):1703-14.

Paoletti R, Gotto AM, Jr., Hajjar DP. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):III20-6.

Pasini AF, Anselmi M, Garbin U, Franchi E, Stranieri C, Nava MC, et al. Enhanced levels of oxidized low-density lipoprotein prime monocytes to cytokine overproduction via upregulation of CD14 and toll-like receptor 4 in unstable angina. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(9):1991-7.

Pentikainen MO, Lehtonen EM, Oorni K, Lusa S, Somerharju P, Jauhiainen M, et al. Human arterial proteoglycans increase the rate of proteolytic fusion of low density lipoprotein particles. *J Biol Chem.* 1997;272(40):25283-8.

Pfeiffer JR, Howes PS, Waters MA, Hynes ML, Schnurr PP, Demidenko E, et al. Levels of expression of Fcγ receptor IIA (CD32) are decreased on peripheral blood monocytes in patients with severe atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2001;155(1):211-8.

Piha M, Lindstedt L, Kovanen PT. Fusion of proteolyzed low-density lipoprotein in the fluid phase: a novel mechanism generating atherogenic lipoprotein particles. *Biochemistry*. 1995;34(32):10120-9.

Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, et al. A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J Biol Chem*. 2002a;277(41):38517-23.

Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, et al. Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem*. 2002b;277(41):38503-16.

Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods in enzymology*. 1994;233:425-41.

Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:275-90.

Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, et al. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. *Biochem J*. 1997;322 (Pt 1):317-25.

Rhinehart-Jones T, Greenwalt DE. A detergent-sensitive 113-kDa conformer/complex of CD36 exists on the platelet surface. *Arch Biochem Biophys*. 1996;326(1):115-8.

Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998a;95(13):7614-9.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998b;391(6662):79-82.

Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008;359(21):2195-207.

Rios FJ. LDL modificada inibe a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão das enzimas NO sintase (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) induzidas em macrófagos. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.

Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hansson GK. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(5):e10-4.

Ronchini KR, Duarte AJ, Casseb JS, Gidlund M. Cardiovascular complications and increased levels of circulating modified low density lipoprotein in HIV patients and patients with lipodystrophy. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(1):119-22.

Ross R. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplant Proc.* 1993;25(2):2041-3.

Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973;180(93):1332-9.

Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N England J Med.* 1976;295:369-77.

Sakai M, Kobori S, Miyazaki A, Horiuchi S. Macrophage proliferation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11(5):503-9.

Schini-Kerth VB, Bassus S, Fisslthaler B, Kirchmaier CM, Busse R. Aggregating human platelets stimulate the expression of thrombin receptors in cultured vascular smooth muscle cells via the release of transforming growth factor-beta1 and platelet-derived growth factorAB. *Circulation.* 1997;96(11):3888-96.

Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res.* 2001;42(9):1346-67.

Segrest JP, Jones MK, Mishra VK, Anantharamaiah GM, Garber DW. apoB-100 has a pentapartite structure composed of three amphipathic alpha-helical domains alternating with two amphipathic beta-strand domains. Detection by the computer program LOCATE. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(10):1674-85.

Segrest JP, Jones MK, Mishra VK, Pierotti V, Young SH, Boren J, et al. Apolipoprotein B-100: conservation of lipid-associating amphipathic secondary structural motifs in nine species of vertebrates. *J Lipid Res.* 1998;39(1):85-102.

Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal.* 2009;2(72):re3.

Singh S, Loke YK, Furberg CD. Long-term risk of cardiovascular events with rosiglitazone: a meta-analysis. *JAMA.* 2007;298(10):1189-95.

Singh U, Dasu MR, Yancey PG, Afify A, Devaraj S, Jialal I. Human C-reactive protein promotes oxidized low density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in Wistar rats. *J Lipid Res.* 2008;49(5):1015-23.

Smith C, Mitchinson MJ, Aruoma OI, Halliwell B. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem J.* 1992;286 (Pt 3):901-5.

Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1989;264(5):2599-604.

Spranger T, Finckh B, Fingerhut R, Kohlschutter A, Beisiegel U, Kontush A. How different constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper. *Chem Phys Lipids*. 1998;91(1):39-52.

Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*. 1997;272(34):20963-6.

Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis*. 1987;7(2):135-43.

Stocker R. Lipoprotein oxidation: mechanistic aspects, methodological approaches and clinical relevance. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5(6):422-33.

Stuart LM, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, et al. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol*. 2005;170(3):477-85.

Subbanagounder G, Leitinger N, Shih PT, Faull KF, Berliner JA. Evidence that phospholipid oxidation products and/or platelet-activating factor play an important role in early atherogenesis : in vitro and In vivo inhibition by WEB 2086. *Circ Res*. 1999;85(4):311-8.

Svensjo E, Boschcov P, Ketelhuth DF, Jancar S, Gidlund M. Increased microvascular permeability in the hamster cheek pouch induced by oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and some fragmented apolipoprotein B proteins. *Inflamm Res*. 2003;52(5):215-20.

Swain J, Gutteridge JM. Prooxidant iron and copper, with ferroxidase and xanthine oxidase activities in human atherosclerotic material. *FEBS Lett*. 1995;368(3):513-5.

Takano H, Komuro I. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009;73(2):214-20.

Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006;86(2):515-81.

Thorne SA, Abbot SE, Winyard PG, Blake DR, Mills PG. Extent of oxidative modification of low density lipoprotein determines the degree of cytotoxicity to human coronary artery cells. *Heart*. 1996;75(1):11-6.

Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998;93(2):241-52.

Torzewski M, Klouche M, Hock J, Messner M, Dorweiler B, Torzewski J, et al. Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(3):369-78.

Travers JB, Murphy RC, Johnson CA, Pei Y, Morin SM, Clay KL, et al. Identification and pharmacological characterization of platelet-activating factor and related 1-palmitoyl species in human inflammatory blistering diseases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 1998;56(5-6):305-24.

Triantafilou M, Gamper FG, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, et al. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem.* 2006;281(41):31002-11.

van der Wal AC, Becker AE, Das PK. Medial thinning and atherosclerosis--evidence for involvement of a local inflammatory effect. *Atherosclerosis.* 1993;103(1):55-64.

van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG. FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens.* 2003;61(3):189-202.

van Tits L, de Graaf J, Toenhake H, van Heerde W, Stalenhoef A. C-reactive protein and annexin A5 bind to distinct sites of negatively charged phospholipids present in oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(4):717-22.

Vanden Berghe W, De Bosscher K, Boone E, Plaisance S, Haegeman G. The nuclear factor-κB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. *J Biol Chem.* 1999;274(45):32091-8.

VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(1):12-22.

Vasques E, Almeida AL, Noya V, D'Alegria B, Marathe G, McIntyre TM, et al. Impairment of endothelium-dependent aorta relaxation by phospholipid components of oxidized low-density lipoprotein. *Endothelium.* 2006;13(1):1-8.

Wallberg-Jonsson S, Cvetkovic JT, Sundqvist KG, Lefvert AK, Rantapaa-Dahlqvist S. Activation of the immune system and inflammatory activity in relation to markers of atherothrombotic disease and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002;29(5):875-82.

Walton KA, Cole AL, Yeh M, Subbanagounder G, Krutzik SR, Modlin RL, et al. Specific phospholipid oxidation products inhibit ligand activation of toll-like receptors 4 and 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1197-203.

Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC, Chau LY. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1998;152(3):711-20.

Wang N, Tabas I, Winchester R, Ravalli S, Rabbani LE, Tall A. Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma. *J Biol Chem.* 1996;271(15):8837-42.

Westendorf T, Graessler J, Kopprasch S. Hypochlorite-oxidized low-density lipoprotein upregulates CD36 and PPARγ mRNA expression and modulates SR-BI gene expression in murine macrophages. *Mol Cell Biochem.* 2005;277(1-2):143-52.

-
- Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol.* 2001;22(12):665-9.
- Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(5):551-61.
- Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, et al. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.* 1999;18(18):4969-80.
- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991;88(6):1785-92.
- Yan ZQ, Hansson GK. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunological reviews.* 2007;219:187-203.
- Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest.* 1989;84(4):1086-95.
- Yla-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Glass CK, Sigal E, Witztum JL, et al. Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(18):6959-63.
- Yun MR, Im DS, Lee SJ, Park HM, Bae SS, Lee WS, et al. 4-Hydroxynonenal enhances CD36 expression on murine macrophages via p38 MAPK-mediated activation of 5-lipoxygenase. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(5):692-8.
- Zaguri R, Verbovetski I, Atallah M, Trahtemberg U, Krispin A, Nahari E, et al. 'Danger' effect of low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL on human immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(3):543-52.
- Zaratin A, Gidlund M, Boschcov P, Castilho L, de Faria EC. Antibodies against oxidized low-density lipoprotein in normolipidemic smokers. *Am J Cardiol.* 2002;90(6):651-3.
- Zarev S, Bonnefont-Rousselot D, Jedidi I, Cosson C, Couturier M, Legrand A, et al. Extent of copper LDL oxidation depends on oxidation time and copper/LDL ratio: chemical characterization. *Arch Biochem Biophys.* 2003;420(1):68-78.
- Zhang X, Lu L, Dixon C, Wilmer W, Song H, Chen X, et al. Stress protein activation by the cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in human mesangial cells. *Kidney Int.* 2004;65(3):798-810.
- Zipper LM, Mulcahy RT. Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;278(2):484-92.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)