

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA**

LAVÍNIA ALMEIDA CRUZ

**EFEITO DAS PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENÔNICAS SOBRE A
EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR NUCLEAR PPAR- γ , DO RECEPTOR DE
SCAVENGER CD36 E PROTEÍNAS DE APOPTOSE EM MACRÓFAGOS:
IMPLICAÇÕES PARA A FISIOPATOLOGIA DA ATEROSCLEROSE**

Porto Alegre

2004

LAVÍNIA ALMEIDA CRUZ

EFEITO DAS PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENÔNICAS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR NUCLEAR PPAR- γ , DO RECEPTOR DE SCAVENGER CD36 E PROTEÍNAS DE APOPTOSE EM MACRÓFAGOS: IMPLICAÇÕES PARA A FISIOPATOLOGIA DA ATEROSCLEROSE

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior

Porto Alegre, dezembro 2004

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a sua realização.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, do Departamento de Bioquímica Clínica da Universidade de São Paulo, pela acolhida e pela orientação, indispensáveis para a elaboração dos experimentos constantes neste trabalho;

Ao professor Dr. Rui Curi, do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de São Paulo, por disponibilizar o laboratório e recursos diversos para a realização dos experimentos de cultura de células e expressão gênica;

Ao Dr. Humberto Matos, pelo apoio e inestimável orientação para desvendar os mistérios do HPLC;

Ao professor Dr. Éder Quintão e a Lilla, do Laboratório de Lípidos da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na separação de LDL;

À professora Dra. Regina Guaragna, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo apoio, amizade e orientação em todos os momentos, desde 1998;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Celular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Lino, Elza, Dai, Júlia, Baby, Dedé, Ângela B1, Ângela B2 e Tati, pela amizade, companheirismo e torcida calorosa;

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade de São Paulo, Joelma, Elaine, Simone, Nágila, Kátia, Emerson, Edimar e Isabela, além do meu “aluninho” Fabrício, pela amizade apoio e paciência, mesmo nos períodos mais difíceis;

Aos colegas do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de São Paulo, Rô, Thaís e Manuela, pela grande ajuda nos experimentos de expressão gênica;

Ao pessoal da “Cicerolândia”, pelo convívio alegre e descontraído, na saúde e na doença;

Aos amigos Geane, Cris, Ricki, Sara, Rose, Douglas e Laerte, do Departamento de Engenharia Química da Universidade de São Paulo, pelo apoio, amizade e pelas aulas de modelagem molecular, que mostraram perspectivas sempre maiores para o trabalho realizado no laboratório;

Aos familiares, pai, Inês, Pri, Lú, Sú, tia Vera, tio Wilson e Thaís, pelo incentivo indispensável, em todos os momentos, mesmo à distância;

Ao Robertinho, pelo carinho, paciência e compreensão ímpares, que me impediram de desistir de tudo;

Aos amigos Thaís, Charles, Anelise, Fábio, Alessandra, Berg, bem como ao tio Bruno, pessoas cujo incentivo foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Considerando que as doenças cardiovasculares representam a maior causa de mortalidade e morbidade em países ocidentais, a aterosclerose se destaca pelo fato de predispor os pacientes ao infarto do miocárdio, a acidentes vasculares cerebrais e a doenças vasculares periféricas. Neste contexto, a oxidação de lipoproteínas do plasma, particularmente LDL, é um dos fatores de risco para eventos cardiovasculares, pois é reconhecida e internalizada por macrófagos, ocasionando a sua diferenciação em *foam cells*. Diversos fatores participam deste processo de diferenciação, como a expressão de receptores de *scavenger* CD 36, proporcionando aumento na captação de LDL oxidada, aumento na síntese endógena de colesterol e ativação de fatores nucleares que iniciam a transcrição de proteínas específicas e fatores de crescimento que disparam a aterogênese. Os fenômenos celulares relacionados à apoptose também são de especial importância, tanto no desenvolvimento da lesão aterosclerótica como na estabilidade da placa e formação de trombos. As prostaglandinas (PGs) ciclopentenônicas (CP-PGs), em particular a PGA_2 e a 15-desóxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ são uma classe especial de PGs que, em diminutas concentrações, disparam a expressão das proteínas de choque térmico (hsp), que são citoprotetoras. Além disso, CP-PGs bloqueiam a ativação do fator nuclear pró-inflamatório NF- κ B tornando-as potentes agentes antiinflamatórios. Embora as PGs das famílias A e J guardem uma série de características em comum, a 15-desóxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ é o ligante fisiológico do fator nuclear pró-aterogênico PPAR- γ , enquanto as PGs da família A ativam apenas a via citoprotetora das hsp. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos das CP-PGs sobre a expressão gênica de fatores relacionados à diferenciação de macrófagos em *foam cells*, bem como proteínas reguladoras do processo de apoptose, em células da linhagem pró-monocítica humana U937. Para tal, as células foram tratadas com CP-PGs em presença e/ou ausência de LDL nat e LDL ox, o RNA foi extraído para a realização de RT-PCR para PPAR- γ , CD 36, HMG-CoA redutase e proteínas de apoptose Caspase 3, p53 e Bcl-xL. O tratamento estatístico utilizado foi análise de variância (ANOVA one-way) e teste “t” de *student*, com resultados expressos como médias \pm desvios-padrão da média, com $P < 0,05$. Os resultados obtidos demonstraram que as CP-PGs PGA_2 (20 μ M-24h) e PGJ₂ (1,5 μ M-24h) inibiram a expressão gênica do fator nuclear PPAR- γ (64 % (PGA_2), 88 % (15-d-PGJ₂)) nas células U937, em presença de LDL oxidada, quando comparado ao controle. PGA_2 inibiu a expressão de HMG-CoA redutase (33 %), enzima chave da síntese de colesterol intracelular, e o tratamento com as CP-PGs também inibiu a apoptose nas células tratadas em presença de LDL oxidada. Os dados sugerem que as CP-PGs apresentam grande potencial para o tratamento da aterosclerose, já que, além de apresentarem efeito antiinflamatório, inibem a expressão do fator nuclear pró-aterogênico PPAR- γ , do receptor de scavenger CD36 (apenas a 15-desóxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂) e da enzima HMG-CoA redutase. O bloqueio da apoptose nas células estudadas pode estar relacionado à citoproteção oferecida por estas PGs. Embora investigações *in vivo* deste laboratório tenham mostrado a eficácia do tratamento com CP-PGs em camundongos portadores de aterosclerose, estudos adicionais são necessários para esclarecer-se o efeito antiaterogênico das mesmas.

Palavras chave: **prostaglandinas ciclopentenônicas, aterosclerose, LDL, apoptose, macrófagos *foam cells***

ABSTRACT

Inasmuch as cardiovascular diseases are a major cause of mortality and morbidity in western countries, atherosclerosis is highlighted for being a main cause of brain strokes and peripheral vascular diseases. Low density lipoprotein (LDL) particles are the major carriers of cholesterol towards extrahepatic tissues in the blood. The oxidation hypothesis of atherogenesis proposes that LDL must be oxidatively modified to trigger the pathological events of atherosclerosis. Apoptosis is another important factor to both development of atherosclerosis lesions and cloth formation. Cyclopentenone prostaglandins (CP-PGs), particularly PGA_2 and 15-desóxi- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 are a special class of prostaglandins (PGs) wich, in minute amounts, trigger the expression of heat shock proteins (hsp) that are, in turn, cytoprotectors. Moreover, CP-PGs impair the activation of the pro-inflammatory nuclear factor NF-kappa B, which makes CP-PGs potent anti-inflammatory agents. Although type A and J PGs present many commom different features between one another, 15-desóxi- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 is the physiological ligand of the pro-atherogenic nuclear factor PPAR- γ , whereas PGs of A-family activate only the cytoprotector hsp pathway. Since CP-PGs are anti-inflammatory and atherosclerosis is a typically inflammatory disease of vascular wall, this work aimed to investigate CP-PG effects on the expression of some factors related to macrophage-foam cell differentiation as well as apoptosis regulatory proteins in human pro-monocytic leukemia line U937 cells. Cells were treated with CP-PGs in the presence or absence of LDL (native or oxidized) and total RNA was extrated to be probed to PPAR- γ , CD36, HMG-CoA reductase as well as apoptosis pathway proteins caspase 3, p53 and Bcl-xL by RT-PCR. Statistical analysis were performed by one-way ANOVA and Student "t" test by using the means \pm S.E.M. and $p < 0,05$. Data showed that treatment whith PGA_2 (20 μM) and 15-desóxi- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 (15-d PGJ_2 , 1.5 μM) during 24 h inhibited PPAR- γ (by 64 % (PGA_2), 88 % (15-d- PGJ_2)), in U937 cells in presence of oxidized LDL (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as compared to controls. PGA_2 also inhibited of HMG-CoA reductase gene expression (by 33 %). Treatment with CP-PGs also inhibits apoptosis in U937 cells in presence of oxidized LDL (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as compared to controls. Taken together, the results suggest that CP-PGs show a high therapeutical potential for the treatment of atherosclerosis since, besides being anti-inflammatory, they inhibited the expression of the pro-atherogenic factor PPAR- γ , the scavenger receptor CD36 (only 15-d PGJ_2) and the key-enzyme of the cholesterologenesis HMG-CoA reductase. Impairment of apoptosis in the cells studied may be related to the cytoprotection offered by such PGs. Although in vivo studies from this laboratory have demonstrated the efficacy of CP-PG treatment in atherosclerosis-bearing mice, additional studies are necessary to clarify anti-atherogenic effects of them.

Key-words: **cyclopentenonic prostaglandins, atherosclerosis, LDL, apoptosis, macrophage-foam cells**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. ATEROSCLEROSE.....	13
1.1.1. ATEROSCLEROSE E LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	19
1.1.2. Aterosclerose e apoptose	26
1.2 Prostaglandinas ciclopentenônicas.....	30
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Separação das lipoproteínas do plasma	37
3.1.1. Purificação da LDL por HPLC	39
3.1.2. Curva de xidação da LDL.....	43
3.1.4 Integridade das lipoproteínas oxidadas.....	47
3.2. Cultura de células.....	54
3.2.1. Grupos experimentais	54
3.2.2. Extração de RNA total e RT-PCR.....	56
3.2.3. Síntese de cDNA - reação de RT (<i>Reverse Transcriptase</i>)	57
3.2.4. Amplificação do DNA alvo – reação de PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>).....	57
3.3. Tratamento estatístico.....	61
4. RESULTADOS	62
4.1. Genes envolvidos na diferenciação de macrófagos em <i>foam cells</i>	63
4.1.1. PPAR- γ	63
4.1.2. CD36.....	65
4.1.3. HMG-CoA redutase.....	67
4.2. Proteínas reguladoras de apoptose.....	70
4.2.1. Caspase 3.....	71
4.2.2. p53.....	72
4.2.3. Bcl-xL.....	73
5. DISCUSSÃO	77
5.1. Proteínas relacionadas à diferenciação de macrófagos em <i>foam cells</i>	77
5.1.1. PPAR- γ	77

5.1.2. CD36.....	79
5.1.3. HMG-CoA redutase.....	82
5.2. Proteínas relacionadas à apoptose.....	84
5.2.1. Caspase 3.....	86
5.2.2. p53.....	87
5.2.3. Bcl-xL.....	88
6. CONCLUSÕES.....	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografia de artéria coronariana com placa ateromatosa e formação de trombo oclusivo (<i>Scientific American Brasil, 2004</i>)... ..	17
Figura 2 – Modelo molecular esquemático de uma partícula de LDL em condições fisiológicas. (Hevonoja <i>et al.</i> , 2000).....	20
Figura 3 – Representação esquemática da reação de lipoperoxidação (LIMA, E. S. & ABDALLA, D. S. P., 2001).	25
Figura 4 – Purificação de lipoproteínas de baixa densidade por HPLC.....	41
Figura 5 – Dot blot LDL, HDL e Lp(a).....	43
Figura 6 – Curva de oxidação da LDL.	47
Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page), LDL nativa e oxidada	52
Figura 8 – <i>Western blot</i> das bandas de LDL nativa e LDLoxidada.....	53
Figura 9 – Expressão do gene do fator PPAR- γ em células U937, nos diferentes tratamentos.	64
Figura 10 – Expressão do gene do receptor de <i>scavenger</i> CD36/FAT em células da linhagem U937, nos diferentes tratamentos.....	66
Figura 11 – Expressão do gene que codifica a enzima HMG-CoA redutase em células da linhagem U937, nos diferentes tratamentos.....	68
Figura 12 – Expressão do gene que codifica a proteína pró-apoptótica Caspase 3 em células da linhagem U937, nos diferentes tratamentos.....	71
Figura 13 – Expressão do gene que codifica a proteína pró-apoptótica p53 em células da linhagem U937, nos diferentes tratamentos.....	73
Figura 14 – Expressão do gene que codifica a proteína anti-apoptótica Bcl-x _L em células da linhagem U937, nos diferentes tratamentos.....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Solução de Diálise para LDL (10 x concentrada).....	38
Quadro 2 – Solução A (TRIS 20 mM)	40
Quadro 3– Solução B (TRIS 20 mM – NaCl 1 M).....	40
Quadro 4 – Solução de Bloqueio (BLOTTO)	42
Quadro 5 – Substrato para Peroxidase.....	42
Quadro 6 – PBS	42
Quadro 7 – TRIS-HCl (pH = 7,4).....	45
Quadro 8 – Solução Acrilamida/Bis-Acrilamida	48
Quadro 9 – Tris (Separação).....	48
Quadro 10 – Tris (empilhamento)	49
Quadro 11 – Gel de Entrada (Empilhamento – 5 %).....	49
Quadro 12 – Géis de Separação.....	49
Quadro 13 – Tampão de Amostra	49
Quadro 14 – Tampão de Eletroforese (10 x concentrado).....	50
Quadro 15 – Corante	50
Quadro 16 – Descorante Forte.....	50
Quadro 17 – Descorante Fraco	50
Quadro 18 – Tampão de Transferência	53

ABREVIATURAS

AGPI: Ácidos graxos poliinsaturados

CP-PGs: Prostaglandinas ciclopentenônicas

DNA: Ácido desoxirribonucléico

HDL: *High-density lipoprotein*

HPLC: *High-performance liquid chromatography*

HSP: *Heat shock protein*

LDL: *Low-density lipoprotein*

LDLnat: LDL nativa

LDLox: LDL oxidada

Lp(a): Lipoproteína (a)

LPO: Lipoperoxidação

MDA: Malondialdeído

MPO: Mieloperoxidase

mRNA: RNA mensageiro

NO: Óxido nítrico

PGA₂: Prostaglandina A₂

PGJ₂: Prostaglandina J₂

RNA: Ácido ribonucléico

TBA: *Thiobarbituric acid*

TBARS: *Thiobarbituric acids reactive substances*

TCA: *Trichloroacetic acid*

VLDL: *Very low-density lipoproteins*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aterosclerose

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de mortalidade e morbidade em países ocidentais (*American Heart Association*, 2000). No ano de 1997, atingiram cerca de 1/6 da população norte-americana com idade média de 65 anos (Keaney *et al.*, 2000), correspondendo, em termos percentuais, a 30% para homens e 24% para mulheres (*American Heart Association*, 2000). Dentre estas doenças, a aterosclerose se destaca pelo fato de predispor os pacientes ao infarto do miocárdio, a acidentes vasculares cerebrais e doenças vasculares periféricas.

A aterogênese caracteriza-se por uma sucessão de desordens nas túnica íntima e média das paredes vasculares. Tais desordens incluem aumento de permeabilidade do endotélio, infiltração de monócitos, proliferação de células musculares lisas adjacentes, agregação plaquetária e acúmulo de lípidos, Ca^{2+} e de componentes de matriz extracelular (Schmitz *et al.*, 1991).

Estudos epidemiológicos têm identificado vários fatores de risco para a aterosclerose, incluindo as hiperlipidemias adquiridas ou familiares (Castelli, 1992), o diabetes mellitus (Fuller *et al.*, 1980), a hipertensão (Kannel, 1975), o tabagismo (McGill, 1988), a obesidade (Hubbert *et al.*, 1983) e os baixos níveis de HDL (*Conference of consense of NIH*, 1994). A oxidabilidade das lipoproteínas, particularmente da LDL, assim como a funcionalidade do

endotélio, também vêm sendo considerados essenciais para a iniciação e a progressão da aterosclerose (Böger *et al.*, 1997; Flavahan, 1992).

Apesar da magnitude deste problema de saúde pública, pouco se sabe a respeito das causas da aterosclerose, e diversas hipóteses visam explicar seu desenvolvimento. A clássica teoria da infiltração lipídica propõe que as dislipidemias, sobretudo as hipercolesterolemias, sejam um fator decisivo para o desenvolvimento da aterosclerose (Aherns *et al.*, 1957; Hegsted *et al.*, 1965; Grundy *et al.*, 1988). A hipótese da resposta à injúria, proposta por Ross & Glomset (1983) e por Ross (1986), sugere que lesões teciduais, causadas por estímulos mecânicos, substâncias químicas, toxinas, infecções virais ou até mecanismos imunológicos, provocariam modificações primárias no endotélio. Tais alterações promoveriam o recrutamento e ativação de vários tipos celulares específicos que, juntos, desfecham o quadro aterogênico.

Devido a interações celulares com o endotélio já não íntegro, macrófagos, plaquetas, neutrófilos e linfócitos liberam fatores de crescimento que são quimiotáticos e mitogênicos para as células da musculatura lisa vascular (Schimitz *et al.*, 1991). Estas, por sua vez, migram da média para a íntima vascular, onde perdem o fenótipo contrátil, diferenciando-se em células com características secretórias que se proliferam, produzem fatores de crescimento e liberam componentes de matriz extracelular que induzem ativação e lesão celulares (Thyberg *et al.*, 1990). Fatores celulares como PAF e PDGF, produzidos por macrófagos da lesão tecidual, induzem as células endoteliais a produzirem o fator de von Willebrand (Hashemi *et al.*, 1993), recrutam e ativam plaquetas que, por sua vez, produzem grandes quantidades do eicosanóide altamente vasoconstritor tromboxana A₂ (Buzzard *et al.*, 1993).

Devido à injúria ao endotélio nos estágios iniciais da aterogênese, as células endoteliais passam a apresentar maior reciclagem metabólica, levando à replicação celular, aumento de permeabilidade para elementos do plasma e ativação de proteínas do sistema complemento, o que favorece a infiltração de monócitos (Schimitz *et al.*, 1991). Nas camadas subendoteliais, ocorre diferenciação destes monócitos em macrófagos com habilidade de acumular grandes quantidades de lípidos: as *foam cells* ou células espumosas, que recebem este nome devido à morfologia característica que passam a apresentar. Estas células acumulam grandes quantidades de colesterol e ésteres de colesterol, que ficam constantemente sendo submetidos a um ciclo de hidrólise e reesterificação, até que o excesso de colesterol possa ser secretado ou utilizado para a síntese de membranas (Brown & Goldstein, 1983; Brown *et al.*, 1980; Rosenfeld *et al.*, 1991). Entretanto, uma das características mais importantes destes macrófagos, pelas implicações na gênese da placa ateromatosa, é a capacidade das *foam cells* de captar e degradar lipoproteínas de baixa densidade (LDL) modificadas, promovendo sua oxidação e gerando produtos com alta capacidade oxidativa e de lesão tecidual (Rosenfeld *et al.*, 1991).

A aterogênese é, portanto, um fenômeno de relações intercelulares e, neste contexto, os macrófagos ocupam uma posição central, pois participam de praticamente todas estas alterações, agindo como célula mediadora para a instalação da aterosclerose.

Sabe-se que monócitos/macrófagos, em presença de lipoproteínas modificadas oxidativamente, aumentam a expressão de receptores de *scavenger* (Brown *et al.*, 1980) e/ou receptores para a fração Fc das imunoglobulinas (Stanton *et al.*, 1992). Este evento permite a captação de partículas ricas em ésteres de colesterol, através de um processo não controlado por *feed-back* negativo, dando origem as *foam cells*. Células da musculatura lisa vascular

apresentam os mesmos receptores de remoção encontrados em macrófagos, e células endoteliais são igualmente capazes de internalizar LDL, mas por receptores de *scavenger* diferentes daqueles encontrados em macrófagos *foam cells* (Bickel & Freeman, 1992).

A progressão das lesões ateroscleróticas compreende três estágios: lesões iniciais, lesões em desenvolvimento e lesões maduras.

As lesões iniciais são caracterizadas por deposição lipídica, conhecida como estrias gordurosas (*fatty streaks*). Apresentam macrófagos *foam cells*, células musculares lisas, linfócitos T, lipídeos extracelulares, proteoglicanos, colágenos e fibras elásticas em menores quantidades que na placa fibrosa. As estrias gordurosas não se projetam em direção à luz do vaso, não comprometendo, portanto, o fluxo sanguíneo. Estas lesões surgem em crianças com menos de um ano de vida e estão presentes em todas as crianças com dez anos de idade (Frederick *et al*, 1996), podendo ocupar cerca de 1/3 da artéria por volta dos trinta anos.

As lesões em desenvolvimento são algumas vezes denominadas placas fibro-gordurosas, e representam um estágio avançado das estrias gordurosas. Elas são inicialmente encontradas em diversas regiões das artérias coronarianas, na aorta abdominal e nas artérias carótidas (em torno dos trinta a quarenta anos de idade). Estas placas fibrosas são rígidas e recobertas por uma capa fibromuscular.

Finalmente, as lesões progridem para um estágio mais complicado e avançado, caracterizado por áreas fibrosas calcificadas com ulceração visível, sendo consideradas lesões maduras. Estas calcificações contribuem para a perda da complacência do vaso e favorecem a ruptura da lesão, com conseqüente liberação de trombos na circulação sistêmica. Assim, este

tipo de lesão predispõe à trombose e calcificação, levando ao enfraquecimento da musculatura lisa do vaso e a sua dilatação (aneurisma).

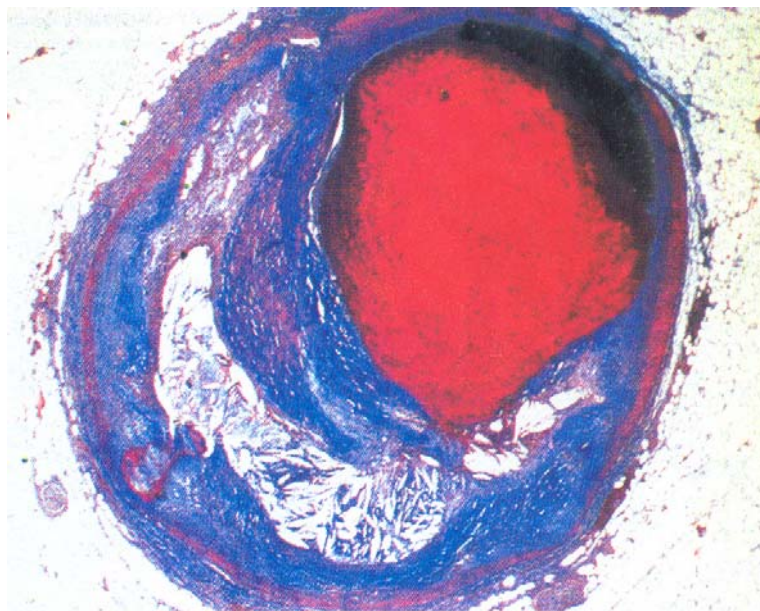


Figura 1 – Fotomicrografia de artéria coronariana com placa aterosclerótica e formação de trombo oclusivo (em vermelho) (*Scientific American Brasil*, 2004).

De acordo com a *American Heart Association* (Stary *et al.*, 1995), as lesões ateroscleróticas podem ainda ser classificadas quanto à sua organização histológica, da seguinte forma:

- **Lesões do Tipo I:** presença de macrófagos e de *foam cells* isolados. Aparecem na primeira década de vida;
- **Lesões do Tipo II:** são as chamadas estrias gordurosas. Apresentam-se como lesões principalmente intracelulares, caracterizadas por acúmulo lipídico. Também se iniciam na primeira década de vida;

- **Lesões do Tipo III:** são as chamadas intermediárias, pois são semelhantes às lesões do Tipo II, mas apresentam acúmulo de lipídeos extracelulares. Começam a se formar a partir da terceira década de vida;
- **Lesões do Tipo IV:** são os ateromas. Também se assemelham às lesões Tipo II, mas agora há a presença de um núcleo lipídico extracelular. Também aparecem a partir da terceira década de vida;
- **Lesões do Tipo V:** são denominadas fibroateromas. Estas lesões são caracterizadas pelo núcleo lipídico e por uma camada fibrosa de tecido conjuntivo, ou por vários núcleos e várias camadas fibrosas. Já há calcificação da lesão. Esta deposição de material fibroso favorece a precipitação de cálcio com colesterol e outros lipídeos na placa, resultando em rigidez da parede vascular e perda de distensibilidade, que podem evoluir para a ruptura do vaso (GANONG, 1997). Sua formação ocorre a partir da quarta década de vida;
- **Lesões do Tipo VI:** são as lesões mais graves que podem ocorrer. Apresentam a superfície do ateroma defeituosa, com hematomas, hemorragias e coágulos. Também aparecem a partir da quarta década de vida.

Normalmente, as lesões ateroscleróticas estão localizadas nas bifurcações de artérias de tamanho médio, tais como as de coronárias, carótidas, artérias vertebrais, bem como na aorta e em artérias que suprem as extremidades baixas, como artérias ilíacas e femorais (Munro *et al.*, 1988; Stary *et al.*, 1995). As lesões ateroscleróticas que se localizam nas artérias coronarianas ou nas bifurcações carotídeas podem liberar trombos que são direcionados ao

cérebro, provocando sintomas cerebrais transitórios. Entretanto, a oclusão da artéria carótida interna proximal ou das ramificações cerebrais pode levar à obstrução, isquemia e necrose de uma porção de tecido cerebral (Stary *et al.*, 1995).

1.1.1. Aterosclerose e lipoproteínas plasmáticas

As lipoproteínas do plasma são agregados hidrossolúveis de lipídeos com proteínas especializadas (apolipoproteínas), cuja função é transportar lipídeos, como triglicérides e ésteres de colesterol, do fígado e intestino para outros tecidos do corpo, para estoque ou utilização como fonte de energia. As apolipoproteínas solubilizam e estabilizam os lipídeos insolúveis das partículas de lipoproteínas, possibilitando este transporte.

A LDL humana é uma partícula esférica com limites de densidade entre 1.019 e 1.063 g/mL, diâmetro variável de 19 a 25 nm e peso molecular de 2,5 milhões de daltons (Steinová *et al.*, 2001). O núcleo da partícula contém, aproximadamente, 1600 moléculas de ésteres de colesterol (CE) e 170 moléculas de triglicérides (TG) (Esterbauer *et al.*, 1990). A superfície da lipoproteína é constituída de uma monocamada que compreende cerca de 700 moléculas de fosfolipídios e uma única molécula de apolipoproteína B-100 (apo B). Esta apolipoproteína é glicosilada e contém aproximadamente 4536 aminoácidos, correspondendo a um peso molecular de 550.000 KDa. Das cerca de 3000 moléculas de ácidos graxos presentes na partícula de LDL, a metade é composta por ácidos graxos poliinsaturados, sendo predominantes os ácidos linoléico (18:2) e araquidônico (20:4), com uma quantidade relativamente pequena de ácido docosahexaenóico (22:6) (Esterbauer *et al.*, 1987). Os antioxidantes associados à lipoproteína são de natureza lipossolúvel e o mais abundante é o α -tocoferol, com aproximadamente 6 a 8

moléculas por partícula de LDL. Outros antioxidantes presentes na LDL incluem o γ -tocoferol, ubiquinol-10, β -caroteno, licopeno, criptoxantina e α -caroteno. No entanto, estes antioxidantes ocorrem em baixas concentrações nas partículas de LDL.

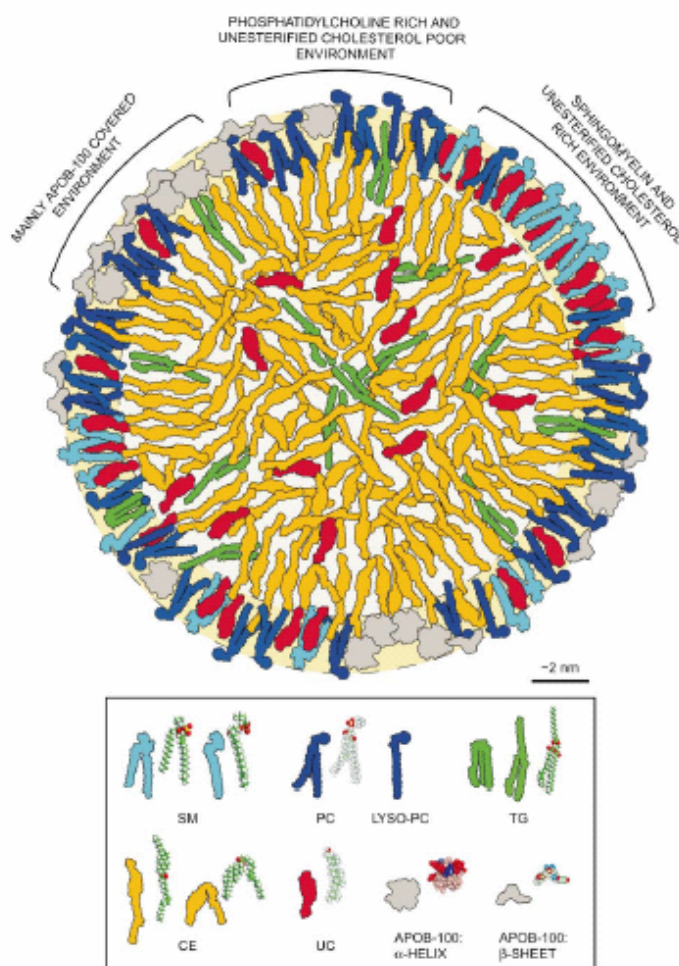


Figura 2 – Modelo molecular esquemático de uma partícula de LDL em condições fisiológicas. A partícula representada tem um diâmetro de 2 nm (fundo amarelado), e composição média de 20 % proteína, 20 % fosfolípidos, 40 % ésteres de colesterol, 10 % colesterol não-esterificado e 5 % triglicérides. As moléculas individuais foram desenhadas usando o *software* Cerius² (MSI *Molecular Simulations Inc.*). A composição das cadeias ilustradas acima é: esfingomielina (SM) (16:0); fosfatidilcolina (PC) (16:0/18:2^{Δ9,12}); triglicérides (TG) (16:0/18:2^{Δ9,12}/14:0); ésteres de colesterol (CE) (18:2^{Δ9,12}) (Hevonoja *et al.*, 2000).

As descobertas da modificação *in vivo* de LDL e do envolvimento das LDL modificadas com a aterosclerose vieram da detecção de autoanticorpos contra LDL oxidadas

no plasma de humanos com aterosclerose (Palinsky *et al.*, 1989). Já foram encontradas várias alterações nas LDL plasmáticas e que ocorrem *in vivo*. Contudo, a mais significativa destas alterações é a peroxidação da fração lipídica destas lipoproteínas e oxidação de resíduos lisina das apoproteínas (parte protéica) (Brown & Goldstein, 1983). Outra alteração verificada e associada à aterogênese foi a redução de até 75 % no conteúdo de ácido siálico em LDL provenientes de pacientes com doença coronariana oclusiva (Orekhov *et al.*, 1992). A glicosilação de LDL, que ocorre em presença de altas concentrações de glicose circulantes no diabetes, induz a adesão de monócitos a células endoteliais, após internalização mediada por receptores (Kim *et al.*, 1994; Picard *et al.*, 1992).

O motivo pelo qual as LDL nativas são modificadas ainda não está esclarecido, embora se suspeite que altas concentrações de colesterol plasmático levem a uma circulação de LDL contendo colesterol por tempo maior, até que a lipoproteína seja retirada do plasma, o que aumenta a probabilidade de que as LDL e seus conteúdos lipídicos venham a ser oxidados (Brown & Goldstein, 1990). O aumento da meia-vida das LDL no plasma deve-se à “saturação” do sistema de remoção destas partículas, que é inibido pelo colesterol intracelular, cujas concentrações, por sua vez, estão elevadas quando o indivíduo apresenta hipercolesterolemia. É possível, também, que a modificação das LDL ocorra no local da lesão aterosclerótica (Steinberg *et al.*, 1989).

A LDL pode ser modificada oxidativamente por células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos, plaquetas e outros tipos celulares (Malle & Sattler, 1994). As partículas de LDL podem se ligar a proteoglicanos, o que facilita a sua oxidação por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas pelas células da parede vascular. Estas células poderiam participar da oxidação de lipoproteínas por diversos mecanismos, como: a) geração

de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, b) fornecimento de substratos que geram oxidantes extracelulares, c) propagação da peroxidação lipídica no meio e d) depleção de antioxidantes da lipoproteína.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada em neutrófilos e monócitos, que tem sido detectada nas lesões ateroscleróticas. Esta enzima amplifica o potencial oxidante do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), utilizando-o como co-substrato para gerar compostos oxidantes difusíveis, que podem oxidar, nitrar e clorar lipídeos e proteínas da LDL (Podrez *et al*, 2000). Monócitos-macrófagos das lesões ateroscleróticas também expressam a 15-lipoxigenase, enzima capaz de catalisar a formação de peróxidos lipídicos nas partículas de LDL, contribuindo para a formação da LDL oxidada (Cathart & Folcik, 2000).

Os neutrófilos e as células endoteliais constituem uma fonte potencial para a produção do ânion radical superóxido (O_2^-) *in vivo*. Os leucócitos e as células endoteliais contêm os complexos enzimáticos da NAD(P)H-oxidase que, embora apresentem características distintas entre si, geram grandes quantidades de radicais superóxido (Jesaitis *et al*, 1991; Souza *et al*, 2001). A angiotensina II, através do receptor AT-1, promove hiperregulação de várias subunidades da NAD(P)H-oxidase das células endoteliais, aumentando a produção de radicais superóxido (Wolf, 2000). A oxidação das lipoproteínas plasmáticas em indivíduos hiperlipidêmicos poderia também ser facilitada pela maior produção de espécies reativas de oxigênio por leucócitos estimulados (Ludwig *et al*, 1982; Prónai *et al*, 1991; Lavy *et al*, 1991; Krause *et al*, 1993), uma vez que leucócitos mononucleares de pacientes com hiperlipidemia combinada ou hipertrigliceridemia liberam maiores quantidades de espécies reativas de oxigênio, quando comparados aos indivíduos normolipidêmicos (Hiramatsu & Arimori, 1988).

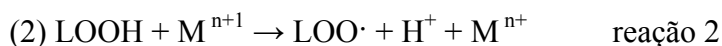
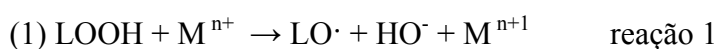
A oxidação mediada pelo ânion radical superóxido depende da presença de metais de transição, como cobre e ferro (Heinecke *et al.*, 1984). A concentração destes metais na forma livre é extremamente baixa no plasma, pelo fato de estarem complexados às suas proteínas transportadoras, que os impedem de participar de ciclos redox, em condições fisiológicas (Halliwell & Gutteridge, 1985). Entretanto, o ânion radical superóxido pode liberar tanto o ferro da ferritina em pH fisiológico (Biemond *et al.*, 1986; Bolann & Ulvik, 1987), como o cobre da superfície da ceruloplasmina, que é a principal transportadora deste metal na circulação, gerando espécies que induzem a peroxidação lipídica e a oxidação de lipoproteínas (Fox *et al.*, 2000).

A peroxidação lipídica, ou lipoperoxidação (LPO) consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado (AGPI) para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial. Nos sistemas biológicos a LPO pode ocorrer por duas vias principais: (i) uma via enzimática, envolvendo as ciclooxygenases e lipooxygenases na oxigenação dos AGPI e (ii) a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de espécies ativas de oxigênio e nitrogênio, metais de transição e outros radicais livres (Al Mehdi *et al.*, 1993; Porter *et al.*, 1995).

O processo da LPO pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que os AGPI sofrem o ataque de uma espécie, suficientemente reativa, capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂-), formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Em meio aeróbio, o radical alquila inicialmente formado se combina com o oxigênio, formando o radical peroxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e promovendo a etapa da propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico (LOOH). Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode propagar a LPO (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Íons de metais de transição, como Fe^{n+} e Cu^{n+} , podem participar do processo catalisando a formação de radicais lipídicos alcóxila, peroxila e hidroxila a partir dos hidroperóxidos, conforme demonstrado nas reações (1) e (2):



A terceira e última etapa da reação, a fase de terminação, dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares (Gardner, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1999). Os radicais peroxila e alcóxila também podem: sofrer dismutação ou clivagem formando aldeídos; formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos ou sofrer um rearranjo, formando produtos secundários da LPO (derivados hidroxi-, ceto-, ceto-hidroxi- e epoxi-hidroxi-ácido graxo) (Lima, E. S. & Abdalla, D. S. P., 2001), conforme figura 3.

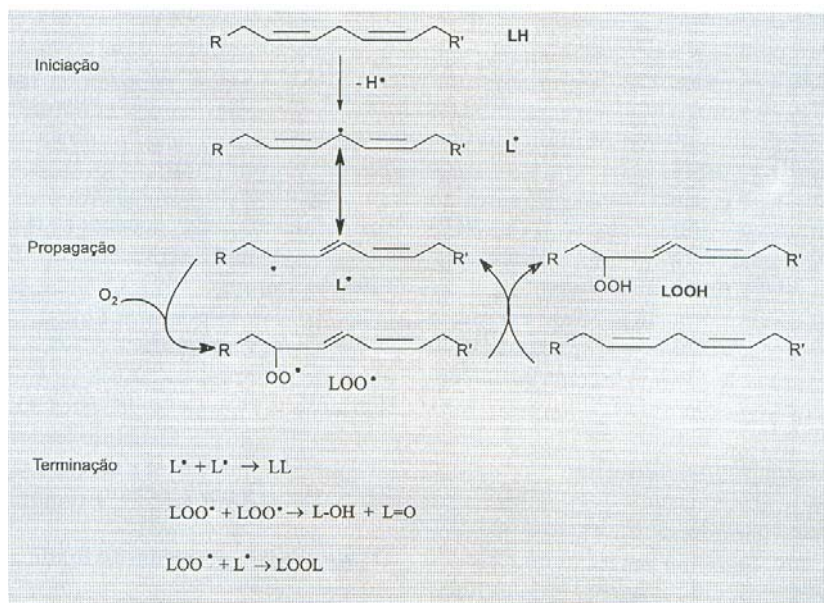


Figura 3 – Representação esquemática da reação de lipoperoxidação (Lima, E. S. & Abdalla, D. S. P., 2001).

Os efeitos da lipoperoxidação podem ser observados tanto pela mudança no ambiente lipídico das membranas biológicas (modificações na fluidez e na seletividade), como também pelas alterações de suas proteínas (receptores e canais iônicos) (YU, 1994).

As proteínas também sofrem reações oxidativas iniciadas pelas espécies ativas de oxigênio, que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais. Processos como fragmentação e agregação, além da maior susceptibilidade a proteases, ilustram algumas das ações das espécies ativas de oxigênio sobre as proteínas (YU, 1994).

1.1.2. Aterosclerose e apoptose

Diversos grupos de pesquisa têm demonstrado a ocorrência de morte celular por apoptose em lesões ateroscleróticas humanas, bem como a presença de fatores apoptóticos nos locais afetados (Hayakawa *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 1997; Isner *et al.*, 1995; Han *et al.*, 1995; Kockx *et al.*, 1998).

Placas prestes ao rompimento apresentam uma delgada capa fibrosa, com algumas células musculares lisas vasculares, e densa infiltração de macrófagos (Davis *et al.*, 1996; Libby *et al.*, 1996; Libby *et al.*, 1995). As células musculares lisas vasculares são importantes na manutenção da resistência tênsil da capa fibrosa, pois estas células sintetizam fibras colágenas dos tipos I e III (Kockx & Herman, 1998). Embora se tenha verificado a ocorrência de apoptose em placas ateroscleróticas humanas, os mecanismos que desencadeiam os processos apoptóticos, bem como sua contribuição para a baixa densidade de células musculares lisas vasculares na região da placa, permanecem desconhecidos.

Sabe-se que modificações oxidativas da LDL estão envolvidas na aterogênese, e a internalização de LDL oxidada (LDLox) por macrófagos e células de músculo liso vascular leva à formação de *foam cells*. Também se tem demonstrado que LDLox apresenta-se citotóxica, e capaz de promover apoptose em cultura de células de músculo liso vascular (Morel *et al.*, 1983; Jovinge *et al.*, 1997; Bjokerud & Bjokerud, 1996).

As LDL oxidadas são citotóxicas para uma grande variedade de células, e induzem apoptose não apenas em células musculares lisas, mas também em fibroblastos, células

endoteliais e macrófagos, *in vitro*. As proteínas pró-apoptóticas Fas, Bax e Caspase 3 são geralmente encontradas no endotélio e células musculares lisas próximas ao lúmen do vaso, enquanto Bcl-2 co-localiza-se com macrófagos e células musculares lisas de lesões ateroscleróticas (Norata *et al*, 2002).

Diversos trabalhos relatam a presença de macrófagos mortos em lesões ateroscleróticas humanas, o que influencia a progressão da lesão. Moléculas aterogênicas e trombogênicas, bem como enzimas degradativas liberadas de macrófagos em processo de morte, particularmente morte por apoptose, podem contribuir para a aterogênese, ruptura da placa e trombose aguda (Yao & Tabas, 2000). Deste modo, tanto a ruptura da placa como trombose aguda estão intimamente associadas com a presença de cores lipídicos nas lesões, os quais contêm *debris* de macrófagos mortos (Ball *et al*, 1995; Berberian *et al*, 1990).

As possíveis causas para a morte de macrófagos em lesões ateroscleróticas incluem a citotoxicidade induzida pelo colesterol (Warner *et al*, 1995; Tabas *et al*, 1996), a privação de fatores de crescimento (Chin *et al*, 1999) e a exposição a lipoproteínas oxidadas e outros fatores, como citocinas inflamatórias e óxido nítrico (Mitchinson *et al*, 1996; Lopez-Collazo *et al*, 1998).

O processo apoptótico caracteriza-se morfológicamente por redução no tamanho das células, condensação do núcleo e aparecimento de corpos nucleares, devido à fragmentação do DNA. Ocorre também o surgimento de vesículas que são rapidamente fagocitadas por macrófagos ou por outras células adjacentes, sem desencadear-se uma resposta inflamatória (Martim, 1993).

A regulação dos mecanismos de apoptose é bastante complexa, envolvendo fatores como receptores e enzimas celulares. Dentre estas, destacam-se as caspases, CD95 (APO-1/FAS), citocromo c, CD36, *inhibitors of apoptosis proteins* (IAP), p53 e família Bcl₂. Esta última possui três subfamílias:

1. Bcl₂, composta pelos fatores anti-apoptóticos bcl₂, bcl_{xL} e bcl_w;
2. Bax, da qual fazem parte os fatores pró-apoptóticos bax, bak e bok;
3. BH3, constitui-se dos fatores pró-apoptóticos bik, blk e bid (Adams & Cory, 1998).

Estresse celular, como o causado por danos ao DNA, hipoxia ou lipoproteínas oxidadas ativam a proteína supressora de tumor p53, primeiramente através da inibição da sua rota bioquímica de degradação (Lohrum *et al*, 2000). Elevados níveis de p53 levam a respostas antiproliferativas e pró-apoptóticas, tanto pela ativação da expressão de determinados genes (p21^{WAF1} e Bax), pela inibição da expressão de outros genes (IGF-II e Bcl-2), como também pela interação direta proteína-proteína, como ocorre entre helicases e caspases (Gottlieb & Oren, 1998; Sheikh & Fornace, 2000).

O papel do p53 na proliferação de células musculares lisas em lesões ateroscleróticas humanas tem sido um tópico particularmente popular na literatura (Tabas *et al*, 2001). Por outro lado, a deficiência de p53 está associada com o aumento no tamanho da lesão aterosclerótica (Tabas *et al*, 2001). Desta forma, pesquisas que busquem desvendar as possíveis propriedades pró-aterogênicas de células deficientes em p53, especialmente

macrófagos, associadas à investigação do papel do p53 na captação e metabolismo de lipoproteínas aterogênicas, ou mesmo seu envolvimento na produção e secreção de outras moléculas pró-aterogênicas pelas células do espaço arterial são de especial interesse (Tabas, 2001).

1.2. Prostaglandinas ciclopentenônicas

Prostaglandinas formam um ramo de uma família maior de compostos endógenos conhecida como eicosanóides, à qual também pertencem os tromboxanos e leucotrienos. Estes compostos constituem um grupo variado de ácidos graxos de 20 carbonos insaturados e oxigenados, derivados do ácido araquidônico e outros ácidos graxos poliinsaturados e de estrutura similar (ácido di-homo-linolênico, ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico e ácido adrênico, entre outros). Os eicosanóides exercem efeitos profundos sobre praticamente todas as células e tecidos, sendo alvos potenciais nos tratamentos de vários estados patológicos.

Prostaglandinas como PGA_2 , PGJ_2 e 12 - PGJ_2 , coletivamente chamadas de PGs ciclopentenônicas (CP-PGs), são produzidas *in vivo* por desidratação de PGE_2 (PGA_2) e PGD_2 (PGJ_2 e 12 - PGJ_2), catalisada por albumina plasmática. Estas prostaglandinas apresentam mecanismos de ação diferente do de outros eicosanóides. Sua produção está relacionada com a resposta celular ao estresse (atividade citoprotetora). As prostaglandinas ciclopentenônicas apresentam atividade antiproliferativa em função do grupo cetona, insaturado.

As CP-PGs são ativamente transportadas ao interior das células através de carreador específico, que reconhece o grupamento ciclopentenônico, insaturado, e localizam-se no núcleo celular. Estas PGs impedem a progressão de células além da fase G_1 do ciclo celular, inibindo a síntese *de novo* de moléculas de DNA polimerases, embora sem interferir na atividade destas enzimas, o que resulta na inibição da síntese de DNA pela célula. As CP-PGs também promovem desorganização de filamentos de actina do citoesqueleto e inibem a reciclagem de fosfoinosítídeos de membrana. Deste modo, as CP-PGs podem ser mediadores

fisiológicos de mecanismo geral de defesa celular contra agentes estressantes ou de autocontrole da atividade proliferativa (Choi *et al.*, 1992; Thompson, 1995).

Com respeito à aterosclerose, uma das primeiras respostas da parede arterial a estímulos nocivos/aterogênicos (como hiperlipidemia e hipertensão arterial) é a produção de autacóides derivados do endotélio, como prostaglandinas (PGs), especialmente a prostaciclina (PGI₂) e o óxido nítrico (NO) (Schmitz *et al.*, 1991). Se, por um lado estes compostos estão implicados na defesa e manutenção da quiescência da parede vascular, evidências sugerem que deficiências na produção de PGs e NO estejam envolvidas no estabelecimento da aterosclerose (Gross & Wolin, 1995; Harrison, 1997; Michel & Feron, 1997).

Sabe-se que as PGs do tipo E diminuem o tamanho de enfartos miocárdicos experimentais em cães, através do bloqueio da migração e ativação de neutrófilos (Simpson *et al.*, 1998), além de estimularem a captação de colesterol por HDL, a partir de macrófagos (Bernard *et al.*, 1991). Isso leva a uma diminuição dos conteúdos intracelulares de colesterol e redução do risco de acúmulo de lípidos. Por outro lado, macrófagos, que ocupam papel de destaque na iniciação e no desenvolvimento da lesão aterosclerótica, são produtores de grandes quantidades de PGE₂ e seu isômero, a PGD₂ (Scott., 1982; Urade *et al.*, 1989) que, por sua vez, podem ser transformadas facilmente, no plasma *in vivo*, em PGA₂ e Δ^{12} -PGJ₂ e seus derivados (Ohno *et al.*, 1986; Narumiya & Fukushima, 1985; Kikawa *et al.*, 1984; Fitzpatrick & Wynalda, 1983).

Altos níveis de estresse de cisalhamento, interleucina 1 (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) derivados de macrófagos, ativadores da proteína quinase C (PKC), bem como o estresse oxidativo da parede arterial, levam à ativação do fator transcripcional NF- κ B,

que dispara a transcrição de uma grande variedade de genes, tanto nas células endoteliais quanto nas células musculares lisas. Por sua vez, o NF- κ B ativado precipita, nestas células, a transcrição de fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão intercelulares e fatores de transcrição, relacionados ao processo de proliferação celular (Griendling & Alexander, 1996; Colins *et al.*, 1995; Resnik e Gimbrone, 1995).

Sabe-se que as CP-PGs são ativadoras da via das HSP (*heat shock protein*) (Amici *et al.*, 1992; Rossi e Santoro, 1995), e que estas levam à citoproteção através da inibição dos mecanismos de ativação do NF- κ B em diversos tipos celulares já estudados, incluindo as células musculares lisas dos vasos (Rossi *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Nagoshi *et al.*, 1998; Feinstein *et al.*, 1996). Na verdade, as CP-PGs bloqueiam a ativação do NF- κ B através da inibição da I- κ B quinase, enzima que precipita a ativação deste fator nuclear (Rossi *et al.*, 2000).

Tanto a expressão como a ativação do fator de diferenciação de adipócitos PPAR- γ (receptor nuclear ativado por proliferadores de peroxissomas) estão dramaticamente estimuladas em lesões ateroscleróticas humanas (Ricote *et al.*, 1998). A ativação do PPAR- γ em macrófagos leva à expressão do receptor de scavenger CD36/FAT, característica de macrófagos *foam cells* (Tontonoz *et al.*, 1998).

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas contêm altas concentrações de derivados lipídicos oxidados, como o 9- e 13-HODE (ácido hidróxi-ocatadecadienóico), que são ativadores diretos do PPAR- γ (Nagy *et al.*, 1998). Assim, a ativação do PPAR- γ induz a um ciclo que perpetua a lesão aterosclerótica, já que componentes das LDL oxidadas ativam

este fator, que desencadeia a expressão de receptores de *scavenger* para a internalização de cada vez mais moléculas de LDL oxidadas, contendo mais ativadores do PPAR- γ .

As CP-PGs da família da prostaglandina J₂ são ativadoras e ligantes fisiológicos do PPAR- γ , podendo participar do desenvolvimento da aterosclerose. Já as CP-PGs da família da PGA₂ não levam à ativação deste fator nuclear (Forman *et al.*, 1995). Ao contrário, estudos sugerem que PGs da família da PGA₂ sejam citoprotetoras e redutoras das concentrações intracelulares de colesterol (Senna *et al.*, 1998). CP-PGs desviam o metabolismo lipídico de macrófagos inflamatórios no sentido da produção de fosfolípidos, o que resulta numa grande diminuição no acúmulo de colesterol, ésteres de colesterol e ácidos graxos por estas células. Assim, as CP-PGs e o NO compartilham a propriedade de induzir citoproteção através da ativação da via metabólica das HSP, pela inibição do NF- κ B, inibindo os efeitos citotóxicos decorrentes da ativação deste fator transcricional.

Outro efeito positivo das CP-PGs na aterosclerose diz respeito à síntese de colesterol. A homeostase intracelular de colesterol é sustentada, em células de mamíferos, por uma intrincada série de mecanismos que levam ao preciso balanço entre o *input* (síntese de novo de lípidos a partir do acetil-CoA, via HMG-CoA redutase, e captação via lipoproteínas) e o *output* (efluxo) de colesterol pelas células (Goldstein & Brown, 1990). Apesar de desbalanços no metabolismo lipídico em geral serem características marcantes do processo de aterosclerose, e a hiperlipidemia estar fortemente associada ao desenvolvimento da doença, o mecanismo pelo qual as células participantes da lesão acumulam lipídios permanece por ser estudado.

A lipogênese, em macrófagos, é um fenômeno essencial para a sua funcionalidade, uma vez que estas células apresentam uma altíssima taxa de renovação de membranas ($t^{1/2} \sim 30$ min) e intensa produção e secreção de mediadores lipídicos (Steiman *et al.*, 1983). Entretanto, o efeito de autacóides derivados de células endoteliais sobre a lipogênese e exportação de lipídios em macrófagos permanece por ser investigada, e seu estudo poderá esclarecer aspectos críticos do funcionamento de macrófagos na aterosclerose. Sabe-se que a PGA_2 desvia o metabolismo lipídico de macrófagos, reduzindo a síntese *de novo* de colesterol, triglicérides e ácidos graxos livres (Senna *et al.*, 1998).

Uma vez que o acúmulo de lipídios por macrófagos pode estar relacionado com disfunções na capacidade de regulação da síntese e exportação destes lipídios, a investigação do mecanismo de ação das CP-PGs sobre tal síntese, através da medida da expressão gênica de enzimas reguladoras do metabolismo lipídico, como a HMG-CoA redutase, é de grande importância para esclarecer o papel das CP-PGs no processo de resposta à injúria. Deste modo, os mecanismos pelos quais as prostaglandinas ciclopentenônicas podem interferir na regulação da ativação de fatores nucleares como PPAR- γ , bem como o modo como estes compostos podem influenciar no comportamento de macrófagos e sua diferenciação em macrófagos *foam cells* permanecem obscuros.

Conforme já discutido, em seções anteriores neste trabalho, a modificação oxidativa das lipoproteínas de baixa densidade no plasma, *in vivo*, é um evento crítico na patogenia da aterosclerose. Durante o desenvolvimento da lesão vascular, diversas populações celulares sofrem alterações fisiológicas que culminam com a formação da placa de ateroma, entre elas, células de músculo liso vascular, células endoteliais e, principalmente, macrófagos.

O papel central dos macrófagos no desenvolvimento da placa ateromatosa está relacionado à sua diferenciação em *foam cells*, características deste estado patológico. Os macrófagos são capazes de internalizar lipoproteínas de baixa densidade oxidadas, via receptores específicos, como os receptores de *scavenger* CD36. Estas células também tem a capacidade de acumular ésteres de colesterol em gotículas citoplasmáticas.

A captação de LDL oxidadas e/ou síntese endógena de colesterol pelos macrófagos, deficiências no mecanismo de exportação de lípidos e a ativação de fatores nucleares reguladores da transcrição de genes específicos, interferem nas alterações fenotípicas sofridas durante o processo de diferenciação em *foam cells*.

Neste contexto, proteínas envolvidas no processo de diferenciação de macrófagos em *foam cells*, como CD36 (receptor de LDLox), HMG-CoA redutase (enzima reguladora da síntese endógena de colesterol), e fatores nucleares, como NF- κ B e PPAR- γ são de especial interesse para o esclarecimento do processo aterogênico.

Da mesma forma, a compreensão dos processos que regulam a maquinaria intracelular de apoptose pode trazer grandes progressos na busca de terapias eficazes para o combate desta doença. Destacam-se o fator supressor de tumor p53, o PPAR- γ , proteínas da família das caspases e proteínas da família Bcl.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem o objetivo de verificar os possíveis efeitos das prostaglandinas ciclopentenônicas PGA_2 e 15-d-PGJ_2 sobre a expressão gênica do fator nuclear $\text{PPAR-}\gamma$, do receptor de *scavenger* CD36, das proteínas de apoptose p53, caspase 3 e Bcl-_{XL} e da enzima chave da síntese endógena de colesterol, HMG-CoA redutase, em macrófagos e macrófagos *foam cells*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Separação das lipoproteínas do plasma

Para a indução da diferenciação de células pré-monocíticas humanas (linhagem U937) em macrófagos *foam cells*, mediada por LDL oxidada, fez-se necessário isolar partículas destas lipoproteínas nativas do plasma humano e oxidá-las no laboratório. Deste modo, foram realizados os procedimentos experimentais subsequentemente descritos.

As lipoproteínas foram separadas do plasma segundo Havel *et al* (1955), com algumas modificações.

Foram coletadas bolsas de sangue de indivíduos saudáveis, normolipidêmicos, do sexo masculino, com idade entre 25 e 35 anos. Após a coleta, hematócrito e plasma foram separados por centrifugação, a 2500 rpm (10 min, 4°C). Ao plasma, foram adicionados os inibidores de protease Aprotinina (2ug/mL), PMSF (1mM) e Benzamidina (2 mM), e o antioxidante BHT (20mM), a fim de inibir a atividade de proteases presentes na amostra e evitar a oxidação prévia das lipoproteínas durante o procedimento de separação.

Na primeira etapa de separação, foi feita ultracentrifugação seqüencial das lipoproteínas, ajustando-se a densidade do plasma para $d=1.019$ g/mL com sal de KBr. Após 12 horas de centrifugação em rotor 50 Ti (Beckmann), 4°C, 40000 rpm, obteve-se uma fração de plasma livre de quilomícrons e VLDL, eliminando-se o sobrenadante, que continha essas

lipoproteínas. A este plasma, adicionou-se sal de KBr para novo ajuste de densidade, desta vez para $d=1.055 \text{ g/mL}$ (para a obtenção de uma fração livre de Lp(a), segundo Havel *et al*, 1955). O plasma, então livre de quilomícrons e VLDL, passou por uma nova etapa de centrifugação, desta vez durante 20 horas, a 40000 rpm, 4°C, rotor 50 Ti (Beckmann), para a separação da fração contendo LDL.

As lipoproteínas assim obtidas foram, então, dialisadas contra PBS contendo o antioxidante EDTA 0.01% (100 vezes o volume), em dialisador giratório, durante 12 h, em geladeira e ao abrigo da luz, para a remoção do sal de KBr anteriormente adicionado. As concentrações de colesterol (Kit Biosystem®, cat. n° 11505) e triglicerídeos (Kit Biosystem®, cat. n° 11528) totais presentes na fração lipoprotéica de LDL foram determinadas através de métodos enzimáticos, utilizando-se reagentes comerciais (Biosystem®, Barcelona, Espanha).

Os valores obtidos foram ajustados para um índice de recuperação de 100%, visando contornar as perdas ocorridas durante o processo de ultracentrifugação.

Quadro 1 – Solução de Diálise para LDL (10 x concentrada)

NaCl.....	87,88 g
EDTA N ₂	3,72 g
NaN ₃ (tritriplex).....	1,95 g
Trizma.....	12,11 g
H ₂ O milli-Q q.s.p.....	1000 mL

O pH da solução foi ajustado em 7,4 e esta foi guardada em geladeira até o momento da sua utilização, quando foi diluída (1:10 em H₂O milli-Q).

3.1.1 Purificação da LDL por HPLC

As amostras de LDL separadas por ultracentrifugação foram purificadas por HPLC, utilizando-se a técnica descrita por Hodis *et al* (1994), com algumas modificações. Este procedimento teve como objetivo eliminar eventuais partículas de HDL ou outras lipoproteínas que não LDL, que possam estar presentes na fração lipoprotéica obtida apenas por centrifugação, visto que a natureza heterogênea destas partículas, com respeito à sua densidade, já foi bem descrita na literatura.

Como primeiro passo para a purificação das lipoproteínas por HPLC, as amostras foram purificadas em colunas de cromatografia por afinidade com a proteína A, para remover possíveis contaminações com albumina e imunoglobulinas (Hi TrapTM Blue, Amersham Pharmacia Biotech) e, depois, concentradas em concentrador Molecular/Por[®] (Spectrum[®], Califórnia, EUA), com membrana Molecular/Por[®] Type C (CE) MWCO 50.000, até a concentração protéica de 1mg/mL (Lowry, 1950). Com este procedimento, partículas menores que 50.000 KDa passam pelo filtro e são eliminadas, enquanto partículas de tamanho superior a 50.000 KDa, como a LDL, com 55.000 KDa, permanecem retidas no filtro. Para evitar a prévia oxidação das lipoproteínas pela exposição ao ar, luz ou calor, o concentrador utilizado era preenchido com atmosfera de N₂, sua superfície transparente era envolvida, externamente, em papel alumínio e o concentrador permanecia em gelo durante o tempo necessário ao procedimento.

Após, a LDL foi filtrada em filtro Nalgene[®] de 0,22 µm, para eliminação de partículas de poeira, bactérias ou outras capazes de danificar a coluna ou as amostras, e

purificada por cromatografia líquida de alta performance, com o auxílio de uma coluna de troca iônica (PRP-X500 Hamilton). O sistema de tampões utilizado para a separação por gradiente foi composto pelas seguintes fases móveis: solução A, constituída de Tris (20 mM), pH 7,8; e solução B, Tris (20mM) – NaCl (1M), pH 7,4.

Quadro 2 – Solução A (TRIS 20 mM)

Tris (grau HPLC).....	2,422 g
H ₂ O milli-Q q.s.p.....	1000 mL
Ajustar pH em 7,8 e filtrar em filtro 0,22 µm (Millipore®).	

Quadro 3– Solução B (TRIS 20 mM – NaCl 1 M)

Tris (grau HPLC).....	2,422 g
NaCl.....	58,440 g
H ₂ O milli-Q q.s.p.....	1000 mL
Ajustar pH em 7,4 e filtrar em filtro 0,22 µm (Millipore®).	

Foram reconhecidos três picos no cromatograma: LDL nativa, LDL-1 e LDL-2, conforme apresentado na figura 1. Como LDL nativa, entendam-se as partículas de LDL que permaneceram íntegras. LDL-1 corresponde a LDL eletronegativa, forma fisiologicamente modificada de LDL, cuja partícula apresenta um aumento na sua carga negativa. Quanto ao pico aqui denominado LDL-2, este compreende partículas de LDL oxidadas durante o processo de purificação, que apresentam aumento ainda mais acentuado em sua carga negativa.

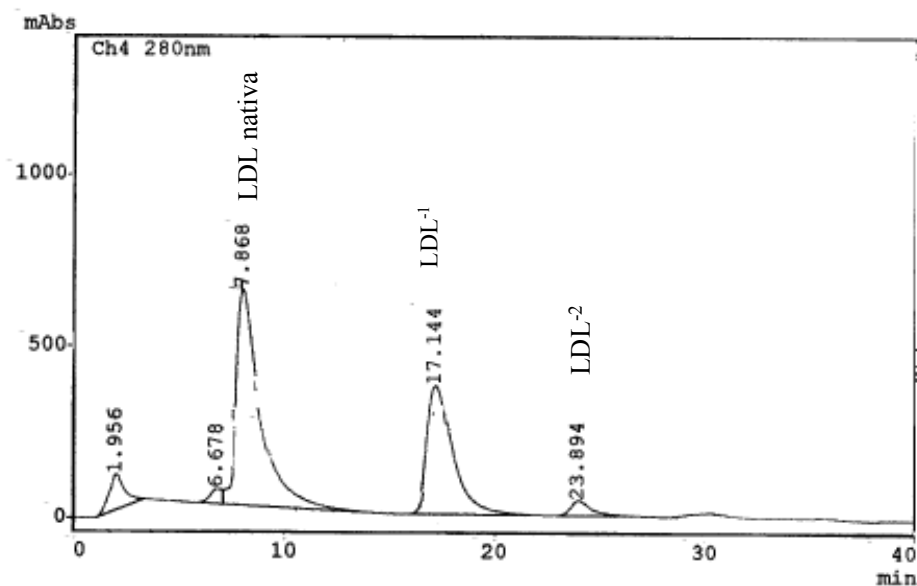


Figura 4 – Purificação de lipoproteínas de baixa densidade por HPLC. As lipoproteínas de baixa densidade, obtidas por ultracentrifugação seqüencial de plasma humano, foram dialisadas contra PBS e purificadas por uma coluna de cromatografia por afinidade com a proteína A, para remover possíveis contaminações com albumina e imunoglobulinas. Depois, as amostras foram concentradas em concentrador Molecular, conforme descrito em materiais e métodos. As lipoproteínas foram então purificadas por HPLC, passando por uma coluna de troca iônica (PRP-X500 Hamilton). A separação por gradiente utilizou as seguintes fases móveis: solução A, Tris (20 mM), pH 7,8; e solução B, Tris (20 mM) – NaCl (1 M), pH 7,4. A fração de lipoproteínas injetada em cada corrida apresentava três picos: LDL nativa, que era coletada após 6 minutos de corrida; LDL-1, minimamente oxidada, detectada após 17 minutos de corrida; e LDL-2, fortemente eletronegativa, detectada após 23 minutos de corrida.

As amostras referentes ao pico da LDL nativa foram coletadas e novamente dialisadas contra PBS com EDTA 0,01%, para a remoção dos sais contidos na fase móvel do HPLC, e concentradas em atmosfera de N₂, no gelo e ao abrigo da luz, conforme anteriormente descrito. A concentração de proteína na LDL purificada e concentrada foi determinada pelo método de Lowry (1950). As lipoproteínas purificadas foram filtradas em filtro Nalgene® de 0,22 µm em condições estéreis, aliqüotadas e acondicionadas em frascos estéreis em atmosfera de N₂ e permaneceram em geladeira, a 4°C e ao abrigo da luz, até o momento de sua utilização.

Para assegurar a ausência de HDL e Lp(a) na fração purificada, foi realizado *dot blot* na amostra. Neste procedimento, gotas de amostra foram adicionadas a pedaços de membrana

de nitrocelulose, até sua total absorção (30 a 60 minutos, em temperatura ambiente). Após, as membranas foram lavadas em PBS e mergulhadas em solução de bloqueio (blotto), rica em proteína, no caso, albumina, durante 60 minutos.

Passado este período, as membranas foram novamente incubadas em solução de bloqueio contendo anticorpos específicos diluídos (*Goat anti-human- α -lipoprotein* (HDL), *Mouse anti-human Lp(a)* e *Goat anti-human- β -lipoprotein* (LDL)), durante 60 minutos, lavadas em PBS (3x de 10 minutos cada, em agitação) e incubadas com os anticorpos conjugados à enzima peroxidase, reativos a imunoglobulina G do animal produtor dos anticorpos específicos, por mais 60 minutos, sob agitação, em temperatura ambiente. As membranas foram, então, lavadas em PBS (3x de 10 minutos cada, em agitação), para a remoção dos conjugados livres, e reveladas por reação com peróxido de hidrogênio. As soluções foram preparadas conforme segue.

Quadro 4 – Solução de Bloqueio (BLOTTO)

BSA.....	1 g
NaN ₃	20 mg
Tween 20.....	50 μ L
PBS q.s.p.....	100 mL

Quadro 5 – Substrato para Peroxidase

3,3'-diaminobenzidina (DAB-4HCl).....	6,01 mg
H ₂ O ₂ 30 %.....	10 μ L
Tris (pH = 7,6) q.s.p.....	10 mL

Quadro 6 – PBS

NaCl 136,8 mM.....	8 g
--------------------	-----

KCl 2,7 mM.....	0,20 g
KH ₂ PO ₄ 0,9 mM.....	0,12 g
Na ₂ HPO ₄ 6,4 mM.....	0,91 g
H ₂ O milli-Q q.s.p.....	1000 mL

Os resultados do *dot blot* para HDL (*Goat anti-human- α -lipoprotein*), LDL (*Goat anti-human- β -lipoprotein*) e Lp(a) (*Mouse anti-human Lp(a)*) são apresentados na figura 5.



Figura 5 – Dot blot LDL, HDL e Lp(a). Foram aplicadas gotas de amostras purificadas em membrana de nitrocelulose que, posteriormente, foi incubada com anticorpos específicos (*Goat anti-human- α -lipoprotein*, *Goat anti-human- β -lipoprotein* e *Mouse anti-human Lp(a)*). Num segundo momento, as mesmas membranas foram lavadas em PBS e incubadas com os anticorpos anti IGg dos animais que forneceram o primeiro anticorpo, conjugados à enzima peroxidase. A reação da peroxidase com o substrato pode ser visualizada na membrana. O sinal (+) corresponde à região de aplicação da amostra purificada, e o sinal (-) corresponde a aplicação de albumina sérica bovina (BSA), utilizada como controle negativo.

3.1.2 Curva de xidação da LDL

Para a obtenção de LDL oxidada, as amostras de LDL nativa purificada (1 mg/mL de proteína) foram novamente dialisadas contra PBS durante 12 h, conforme anteriormente descrito, para a remoção do antioxidante EDTA 0.01%, e incubadas a 37°C, sob agitação

constante, com CuSO_4 em PBS, nas concentrações de 5 μM e 50,0 μM durante 1, 2 e 3 horas, para o estabelecimento da metodologia mais adequada para a oxidação das lipoproteínas. Esta curva de oxidação foi elaborada em virtude da grande variação nos protocolos para a oxidação de lipoproteínas disponíveis na literatura, principalmente no tocante a concentração de CuSO_4 e tempo de incubação (Hiroaki *et al.*, 2000; Valkonen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). Deste modo, buscou-se verificar que tipo de oxidação seria mais conveniente para o experimento, capaz de realizar a lipoperoxidação na partícula de LDL, com geração de produtos derivados do processo, para sua mensuração, porém sem prejudicar a integridade estrutural da apolipoproteína da partícula de LDL.

Ao final dos tempos de incubação, a reação de oxidação com CuSO_4 foi bloqueada com EDTA 1mM em PBS (20 μL de EDTA para cada 1mL de reação). As amostras de LDL foram, então, novamente dialisadas contra PBS com EDTA 0.01% (24h em geladeira), para a remoção total do CuSO_4 , e filtradas em filtro Nalgene® de 0,22 μm em condições estéreis. Todas as amostras foram mantidas em geladeira e ao abrigo da luz, até a execução dos experimentos.

Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar o grau de oxidação de lipídeos é o teste do malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de AGPI, por cisão *beta* dos AGPI peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. É volátil, possui baixo peso molecular ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$, P.M. = 72,07), tem uma cadeia curta 1,3-dicarbonil e é um ácido moderadamente fraco ($\text{pK}_a = 4,46$). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (Janero, 1990; Benzie, 1996).

A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos que podem ser determinados por absorção no visível (532 nm) ou por fluorescência ($\lambda_{exc} = 515$ nm e $\lambda_{em} = 553$ nm). O teste padrão consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, em meio ácido e sob alta temperatura, sendo conhecido como “teste das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)”. Este método é de fácil aplicação, e fornece informações sobre a extensão da LPO em sistemas simples, *in vitro* (Esterbauer *et al.*, 1984).

Para a aplicação do teste de TBARS, as amostras de LDL, oxidadas conforme anteriormente descrito, foram separadas em alíquotas de 50 μ l. Adicionou-se, a cada alíquota, 200 μ l de ácido tricloroacético (TCA) a 30 %. As amostras foram agitadas em vortex por 1 minuto e, em seguida, acrescidas de 200 μ l de tampão Tris-HCl, pH 7,4. Após a adição do tampão, as amostras foram agitadas por mais um minuto. Feito isso, adicionou-se 200 μ l de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,73 %. Finalmente, as amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho fervente por uma hora. Passado este período, procedeu-se a centrifugação das amostras durante 5 minutos, a 2500 rpm, 4°C. O sobrenadante foi coletado, sendo a absorbância monitorada em 535 nm, em espectrofotômetro (Beckman Model DU[@]640 - EUA). Os valores foram expressos em nmol de equivalentes de TBARS/mg de proteína. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Quadro 7 – TRIS-HCl (pH = 7,4)

Solução (A) (Tris 0,2 M)

Tris.....	2,424 g
H ₂ O milli-Q q.s.p.....	100 mL

Solução (B) (HCl 0,1 N)

HCl.....	0,8309 mL
H ₂ O milli-Q q.s.p.....	100 mL

25 mL de solução (A) + 42,43 mL de solução (B) e H₂O milli-Q q.s.p. 500 mL.

Ajustar pH em 7,4.

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o MDA, que foram produzidas em cada ponto da curva de oxidação, foram quantificadas e utilizadas como indicador da eficiência da reação de lipoperoxidação da LDL nativa, purificada no laboratório. Deste modo, os diferentes tempos de incubação e diferentes concentrações de CuSO₄ utilizadas na montagem do protocolo de oxidação de lipoproteínas, foram testados quanto à sua eficiência em produzir TBARS. Os resultados obtidos podem ser visualizados na figura que segue.

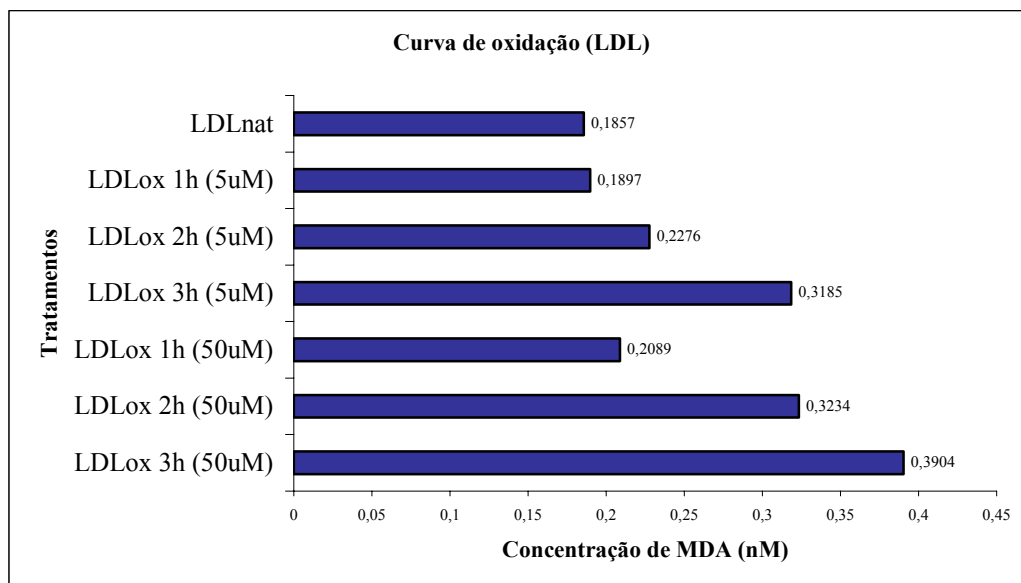


Figura 6 – Curva de oxidação da LDL. As lipoproteínas de baixa densidade, obtidas após purificação por HPLC, foram dialisadas contra PBS, para a remoção do antioxidante EDTA, e oxidadas por incubação a temperatura de 37 °C, sob agitação, com CuSO₄ em PBS, nas concentrações de 5,0 μM e 50,0 μM, durante 1, 2 e 3 horas. Ao término de cada tempo de incubação, a reação de oxidação com CuSO₄ foi bloqueada com EDTA 1mM em PBS (20 μL de EDTA para cada 1 mL de reação). Os resultados obtidos são expressos em nM de MDA/mg de proteína, e mostram uma maior produção de MDA nas partículas de LDL oxidadas com CuSO₄ 5 μM (2 e 3 horas de incubação) e CuSO₄ 50 μM (2 e 3 horas de incubação), indicando a eficiência destes protocolos na oxidação das partículas de LDL.

3.1.4. Integridade das lipoproteínas oxidadas

Após o processo de oxidação experimental das LDL previamente purificadas, fez-se necessário avaliar a integridade estrutural das partículas, uma vez que estas devem ter suas características de reatividade biológica preservadas.

Particularidades como tamanho das partículas, peso molecular e mobilidade eletroforética, bem como reconhecimento por anticorpos específicos, como na técnica de *immunoblotting*, são úteis na avaliação da situação estrutural das lipoproteínas. Neste sentido,

a técnica de eletroforese em gradiente vincula a migração de partículas carregadas através da matriz, com o concomitante aumento na concentração do gel de poliacrilamida. O tamanho do poro da matriz é progressivamente reduzido, conforme as concentrações do gel aumentam. Isto resulta em um diferencial de retardo na migração de partículas carregadas, sendo útil na descrição de subpopulações de HDL e LDL (Krauss & Burke, 1982).

Assim, as lipoproteínas experimentalmente oxidadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) em gradiente, com concentrações de 5 % a 15 %, com a finalidade de verificar a integridade das apolipoproteínas, após o processo de oxidação, em cada tratamento.

Para o procedimento, foram preparados, simultaneamente, dois géis de poliacrilamida de diferentes concentrações, 5 % e 15 %. Uma vez preparados, os géis foram distribuídos em bomba de gradiente e aplicados a cuba. Passadas cerca de 12h, período referente à polimerização, o gel de entrada foi carregado com as amostras de LDL – *25 µL de amostra (1 mg/mL) + 6 µL de tampão de amostra + 9 µL de água milli-Q*. As primeiras 2 horas de corrida ocorreram com amperagem variável e voltagem constante em 50 V. Nas 4 horas seguintes, a voltagem utilizada foi de 150 V. As soluções utilizadas foram preparadas conforme segue.

Quadro 8 – Solução Acrilamida/Bis-Acrilamida

Acrilamida.....	30,00g
Bis-acrilamida.....	0,80g
H ₂ O milli-Q qsp.....	100,00mL

Quadro 9 – Tris (Separação)

Tris base 1,5 M.....	18,17 g
----------------------	---------

SDS 20 %.....	2,00 mL
H ₂ O milli-Q qsp.....	100,00 mL
O pH foi ajustado em 8,8	

Quadro 10 – Tris (empilhamento)

Tris base 0,5 M.....	6,06 g
SDS 20 %.....	2,00 mL
H ₂ O milli-Q qsp.....	100,00 mL
O pH foi ajustado em 6,8	

Quadro 11 – Gel de Entrada (Empilhamento – 5 %)

Acrilamida/bis.....	0,67 mL
Tris (empilhamento).....	1,00 mL
H ₂ O milli-Q.....	2,30 mL
TEMED.....	10,00 µL
APS (10 %).....	30,00 µL

Quadro 12 – Géis de Separação

GEL	5 %	15 %
Acrilamida/bis.....	1,7 mL.....	5,0 mL
Tris (separação).....	2,5 mL.....	2,5 mL
H ₂ O milli-Q.....	5,8 mL.....	2,5 mL
TEMED.....	10,0 µL.....	5,0 µL
APS (10 %).....	50,0 µL.....	50,0 µL

Quadro 13 – Tampão de Amostra

Tris 0,0625 M
Glicerol (v/v) 10 %
SDS 3 %
2-mercaptoetanol 5 %
Azul de bromofenol 0,001 %
HCl, para o ajuste de pH em 6,8

Quadro 14 – Tampão de Eletroforese (10 x concentrado)

Tris 0,25 M
Glicina 1,92 M
SDS 1 %
H ₂ O q.s.p.

Quadro 15 – Corante

Metanol 50 %
Ácido acético 10 %
Comassie blue 0,1 %
H ₂ O q.s.p

Quadro 16 – Descorante Forte

Metanol 50 %
Ácido acético 7 %
H ₂ O q.s.p

Quadro 17 – Descorante Fraco

Metanol 35 %
Ácido acético 7 %
H ₂ O q.s.p

Analisando-se a figura 6, como os pontos CuSO₄ 5 µM (2 e 3 horas de incubação) e CuSO₄ 50 µM (2 e 3 horas de incubação) apresentaram maiores valores de TBARS, realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) em gradiente, com concentrações de 5 % a

15 %, com a finalidade de verificar a integridade das apolipoproteínas B-100 das partículas de LDL, após o processo de oxidação, nestes pontos da curva.

A visualização do gel indica uma maior integridade da apolipoproteína B-100 das partículas de LDL oxidadas, utilizando-se CuSO_4 na concentração de 5 μM , com tempo de incubação de 3h, em relação aos demais pontos da curva, que apresentaram maior TBARS. Bandas com rastro e sem delimitação indicam fragmentação das lipoproteínas.

O gel fotografado foi carregado com LDL nativa, LDLox (CuSO_4 5 μM , 3h), LDLox (CuSO_4 5 μM , 2h), LDLox (CuSO_4 50 μM , 3h), LDLox (CuSO_4 50 μM , 2h) e padrão de alto peso molecular para eletroforese (High Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis – Pharmacia Biotech).

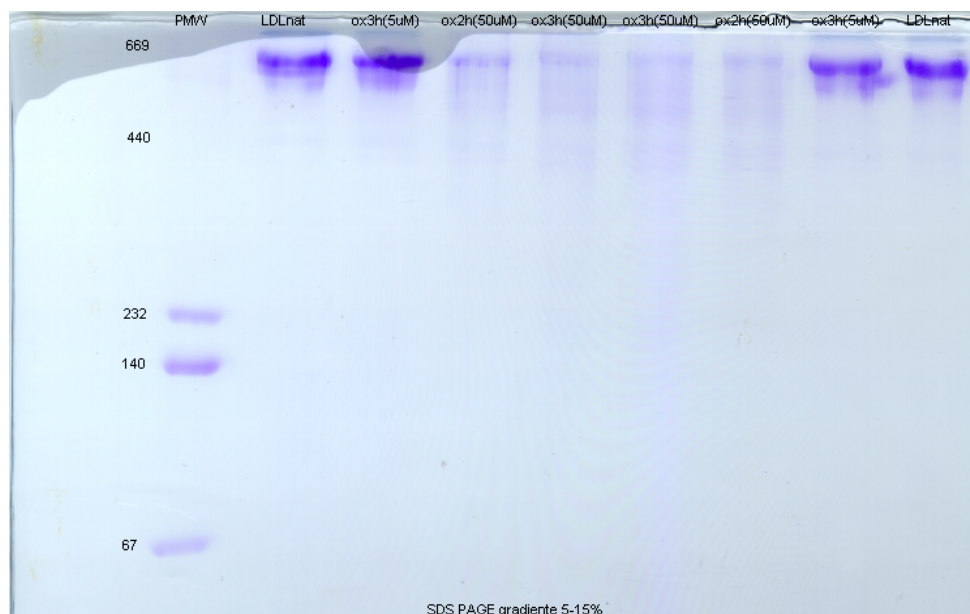


Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das LDL purificadas e oxidadas (SDS-Page). Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) em gradiente, com concentrações de 5 % a 15 %. As amostras de LDL, oxidadas com CuSO_4 nas concentrações de $5 \mu\text{M}$ e $50 \mu\text{M}$, com tempos de incubação de 2h e 3h, foram submetidas a eletroforese, para a verificação da integridade das apolipoproteínas B-100 das partículas de LDL, após o processo de oxidação, nestes pontos da curva. Todos os poços foram carregados com $5 \mu\text{g}$ de proteína, sendo que bandas com rastro e sem delimitação indicam fragmentação das lipoproteínas.

Após a verificação das bandas no gel, as quais foram coradas com *comassie blue*, colocadas sobre uma placa de vidro e escaneadas, o procedimento de eletroforese das amostras de LDL nativa e oxidada foi repetido, para a eletrotransferência das apolipoproteínas presentes no gel para uma membrana de nitrocelulose, técnica conhecida por *western blot*.

Este procedimento teve por objetivo a confirmação da integridade das apolipoproteínas oxidadas experimentalmente em comparação com a apolipoproteína B-100 da LDL nativa. Deste modo, o ponto selecionado na curva de oxidação de LDL com maior TBARs e menor degradação (conforme visualização do gel, na seção resultados) foi submetido à técnica de *western blot*, juntamente com a amostra de LDL nativa. Para a eletrotransferência, foi utilizada cuba de transferência *semi-dried*, e a solução de transferência é especificada

abaixo. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi tratada de forma idêntica à descrita na técnica de *dot blot*, por incubação com tampão contendo anticorpo específico anti-apolipoproteína B-100 (*Goat anti-human- β -lipoprotein*, Sigma L8016), na concentração de 1:1000.

Quadro 18 – Tampão de Transferência

Tris.....	6 g
Glicina.....	28,8 g
Metanol.....	400 mL
H ₂ O milli-Q qsp.....	1000 mL

As bandas, na figura 8, indicam a ligação do anticorpo específico às apolipoproteínas B-100 das partículas de LDL nativa e oxidada (CuSO₄ 5 μ M, 3h).

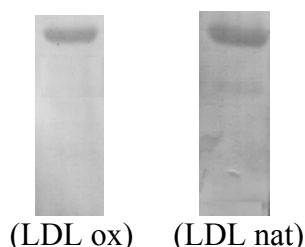


Figura 8 – *Western blot* das bandas de LDL nativa e LDL oxidada. As amostras de LDL nativa e LDL oxidada (CuSO₄ 5 μ M, 3h) foram submetidas à eletroforese e *Western blot*, para a verificação da presença da apolipoproteína B-100, bem como da integridade do sítio de ligação ao anticorpo. Procedimento descrito em materiais e métodos.

Uma vez estabelecido o protocolo de oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, estas foram aliquotadas nas formas nativa e oxidada, filtradas em filtro Nalgene® de 0,22 μ m em condições estéreis, e mantidas em geladeira e ao abrigo da luz, até a execução dos experimentos com cultura de células.

3.2. Cultura de Células

Células da linhagem pré-monocítica humana U937 foram obtidas junto ao Banco de células do Rio de Janeiro (Bio-Rio), e cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos penicilina (10 U/mL) e estreptomicina (10 µg/mL) (Gibco BRL – Life Technologies. New York, USA). As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo, Japão), sob atmosfera de 5 % CO₂ a 37 °C, com densidade máxima de 1,0 x 10⁶ células/mL, em garrafas T 25.

3.2.1 Grupos Experimentais

As células, cultivadas conforme descrito no item anterior, receberam os seguintes tratamentos:

- a) Controle (CT), apenas com meio de cultura;
- b) LDL nativa (20 µM);
- c) LDL oxidada (20 µM);
- d) PGA₂ (20 µM);

- e) PGJ₂ (1,5 μM);

- f) LDL nativa (20 μM) + PGA₂ (20 μM);

- g) LDL nativa (20 μM) + PGJ₂ (1,5 μM);

- h) LDL oxidada (20 μM) + PGA₂ (20 μM);

- i) LDL oxidada (20 μM) + PGJ₂ (1,5 μM).

As células (exceto os grupos (a), (d) e (e)) foram primeiramente incubadas em presença de LDL nat ou LDL ox no meio de cultura, nas concentrações indicadas acima, durante 18 horas, para o início da sua diferenciação em *foam cells*. Após este período, as culturas foram lavadas com PBS, para a remoção da LDL oxidada, e novamente incubadas, conforme cada tratamento citado acima, já com as prostaglandinas em seus grupos experimentais correspondentes, por mais 24 horas. Com este procedimento, as alterações metabólicas promovidas pela exposição das células à LDL nativa e LDL oxidada têm início antes de as células serem expostas às prostaglandinas. Ao término da incubação, as células foram lavadas em PBS estéril, pH 7,4, e submetidas à extração de RNA total.

3.2.2 Extração de RNA total e RT-PCR

O RNA total foi extraído de 1×10^7 células utilizando TRIZOL seguindo o protocolo do fabricante. O procedimento para extração utiliza isotiocianato de guanidina e fenol-clorofórmio, conforme descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). Resumidamente, as células coletadas por centrifugação foram homogeneizadas com 1 mL do reagente de extração, e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. O RNA total foi isolado das proteínas e restos celulares, acrescentando-se 0,2 mL de clorofórmio, seguido por agitação durante 15 segundos e incubação a temperatura ambiente, por 3 minutos. O material foi, então, centrifugado por $12.000 \times g$, durante 15 minutos, à temperatura de 4°C . O RNA presente na fase aquosa (superior) foi precipitado com 0,5 mL de isopropanol por 10 minutos à temperatura ambiente, e sedimentado por centrifugação ($12.000 \times g$ por 10 minutos à 4°C). O “pellet” foi lavado com etanol a 75 %, centrifugado por $7000 \times g$, por 5 minutos, seco a temperatura ambiente e ressuspensão em água DEPC (dietilpirocarbonato).

A concentração de RNA foi estimada por espectrofotometria à 260 nm, segundo a fórmula: $(\text{RNA } \mu\text{g/mL}) = \text{Abs} \times 44,19 \times \text{diluição}$, onde 44,19 é o coeficiente de extinção molar para RNA. A pureza do RNA foi determinada pela razão 260/280 nm, onde a relação igual ou maior que 1,8 indica alto grau de pureza (Sambrook *et al*, 1989). A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo formaldeído, MOPS e $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de brometo de etídio, onde verificou-se a presença de bandas nítidas do RNA ribossômico 18S e 28S, e ausência de material degradado.

3.2.3 Síntese de cDNA - reação de RT (*Reverse Transcriptase*)

As amostras de 2 µg de RNA tratadas com DNase (5U/mg) foram transcritas para cDNA em um termociclador (modelo Techne Genius – Unicidade do Brasil, SP) à temperatura de 42 °C, durante 50 minutos, utilizando 146 ng de “*primers*” randômicos, 500 µM de trifosfato de desoxinucleotídeos (dNTP), 5 mM de DTT e 200 U de transcriptase reversa (SuperScript™ II, Rnase HRT, Life Technologies), seguindo todas as etapas de síntese conforme protocolo do fornecedor. O cDNA obtido foi armazenado a –20°C até a realização da PCR.

3.2.4 Amplificação do DNA alvo – reação de PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Para a amplificação do cDNA, alguns parâmetros da PCR, tais como temperatura de anelamento dos “*primers*”, concentração de MgCl₂ e número de ciclos, foram padronizados. Para uma análise semi-quantitativa, a β-actina foi utilizada como controle, pois este “*housekeeping*” não se alterou em nenhum tratamento.

O sistema de reação da PCR para cada gene sondado continha 200 pmol de cada “*primer*”, 10 µM dNTP e 2 U de Taq DNA polimerase. Esta mistura foi acrescentada à 2 µL de cDNA. A amplificação foi processada em um termociclador.

Os produtos de PCR (10 μ L) foram acrescidos de tampão de amostra para DNA (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol-FF 0,25% e glicerol 30%), e avaliados por meio de separação eletroforética em gel de agarose, a 1,5% em TBE, corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL). A visualização foi realizada por exposição do gel à luz ultravioleta, no transiluminador (modelo Macrovue da Pharmacia LKB – Pharmacia Biotech. Inc, Uppsala, Suécia).

O material amplificado foi fotografado, utilizando o sistema de câmera digital da KODAK (*DC 120 Zoom digital camera system, Life Technologies*), analisado e quantificado utilizando o programa *Kodak Digital Science 1D Image Analysis (Life Technologies)*. A análise da expressão dos genes investigados é expressa em valores relativos, entre a intensidade da banda do gene de interesse e a intensidade da banda do gene controle (gene de interesse/gene β -actina). Os dados serão apresentados em relação aos respectivos controles, os quais receberão um valor arbitrário de 1 em cada experimento.

O ensaio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizado para a detecção de mRNA para a enzima HMG-CoA redutase, o fator nuclear PPAR- γ e as proteínas CD36, Bcl- x_L , p53 e caspase 3, usando-se sempre o gene da proteína β -actina como controle. Aos tubos de reação, adicionou-se 2 μ g de cDNA sintetizado na reação de RT, juntamente com os demais reagentes (tampão PCR 10x, *primer sense* e *primer anti-sense*, Taq DNA polimerase (5U/ μ L)). As reações foram realizadas nas seguintes condições:

- CD36, (389 pb) e β -actina, (550 pb) humano – 33 ciclos:
 - 94 °C por 1 minuto (desnaturação);
 - 55 °C por 1 minuto (anelamento);

72 °C por 1 minuto (extensão).

- p53 (494 pb) humano – 30 ciclos:
94 °C por 1 minuto (desnaturação);
60 °C por 1 minuto (anelamento);
72 °C por 1 minuto (extensão).
- Caspase 3 (256 pb) – 35 ciclos:
94 °C por 1 minuto (desnaturação);
58 °C por 1 minuto (anelamento);
72 °C por 1 minuto (extensão).
- Bcl-xL (496 pb) – 35 ciclos:
94 °C por 1 minuto (desnaturação);
59 °C por 1 minuto (anelamento);
72 °C por 1 minuto (extensão).
- HMG-CoA redutase (298 pb) – 35 ciclos:
94 °C por 1 minuto (desnaturação);
56 °C por 1 minuto (anelamento);
72 °C por 1 minuto (extensão).
- PPAR- γ (476 pb) – 35 ciclos:
94 °C por 1 minuto (desnaturação);

59 °C por 1 minuto (anelamento);

72 °C por 1 minuto (extensão).

As seqüências de primers utilizadas nos experimentos, para cada gene estudado, foram as seguintes:

- CD36

ANTI – TTTCAACTGGAGAGGCAAAGGC

SENSE – GAGAACTGTTATGGGGCTAT

- p53

ANTI – CTTGCATTCTGGGACAGCCAAG

SENSE – GCACAAACACGCACCTCAAAGC

- Caspase 3

ANTI – GTCGATGCAGCAAACCTCAGGG

SENSE – TGTTTCAGCATGGCACAAAGCG

- Bcl-xL

ANTI – CATGGCAGCAGTAAAGCAAGC

SENSE – GGTCAGTGTCTGGTCATTTCCG

- HMG-CoA redutase

ANTI - TACCATGTCAGGGGTACGTC

SENSE – CAAGCCTAGAGACATAATCATC

- PPAR- γ

ANTI – TCTCTCCGTAATGGAAGACCA

SENSE – GCATTATGAGACATCCCCAC

3.3 Tratamento Estatístico

A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA one-way). A comparação entre os grupos foi feita pelo teste T de *student*, considerando variâncias equivalentes. O nível de significância considerado foi $P < 0,05$. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4. RESULTADOS

O papel citoprotetor das prostaglandinas ciclopentenônicas, particularmente prostaglandina A₂ e prostaglandina J₂, em diversas populações de células envolvidas na progressão da aterosclerose tem sido bastante discutido (ver introdução), embora os exatos mecanismos de ação destas moléculas permaneçam desconhecidos. Também se sabe que as CP-PGs da família da prostaglandina J₂ são ativadoras e ligantes fisiológicos do PPAR- γ , podendo participar do desenvolvimento da aterosclerose, enquanto as CP-PGs da família da PGA₂ mostram-se citoprotetoras e redutoras das concentrações intracelulares de colesterol em macrófagos (Senna *et al.*, 1998).

Por outro lado, em lesões ateroscleróticas já estabelecidas, um grande número de debris celulares, resultantes da liberação de corpos apoptóticos por macrófagos *foam cells*, são encontrados na região do core lipídico da placa. O processo apoptótico, neste caso, tem sido relacionado à pouca celularidade das placas ateromatosas, que resulta na sua instabilidade e possível rompimento.

Considerando os fatores acima relacionados, foram verificados os efeitos dos tratamentos descritos em materiais e métodos (CP-PGs) sobre a expressão dos genes para PPAR- γ , CD36 e HMG-CoA redutase, envolvidos no processo de diferenciação de macrófagos em *foam cells*, bem como genes que codificam os fatores pró-apoptóticos p53 e caspase 3, e o gene que codifica o fator anti-apoptótico Bcl-x_L, nas células da linhagem pré-monocítica humana U937.

4.1. Genes envolvidos na diferenciação de macrófagos em foam cells

4.1.1. PPAR- γ

O PPAR- γ , ou *peroxisome proliferator activated receptor- γ* , pertence a uma superfamília de receptores esteróides nucleares (PPARs). Estes receptores têm sido identificados como controladores críticos da atividade de enzimas-chave, que catalisam a oxidação de ácidos graxos (Zhang & Young, 2002). Existem três membros conhecidos na superfamília de PPARs: PPAR- α , PPAR- β/δ , e PPAR- γ . O PPAR controla a lipogênese e termogênese celulares, pela regulação da expressão de uma série de genes envolvidos no metabolismo lipídico e da glicose, e diferenciação de adipócitos. Trabalhos recentes sugerem que PPARs, particularmente o PPAR- γ e seus ligantes fisiológicos, exercem um papel central no desenvolvimento de respostas imunes e inflamatórias (Zhang & Young, 2002).

Deste modo, as células U937, cultivadas e tratadas segundo materiais e métodos, responderam aos diferentes tratamentos conforme mostrado na figura 9, no tocante à expressão gênica do fator nuclear PPAR- γ .

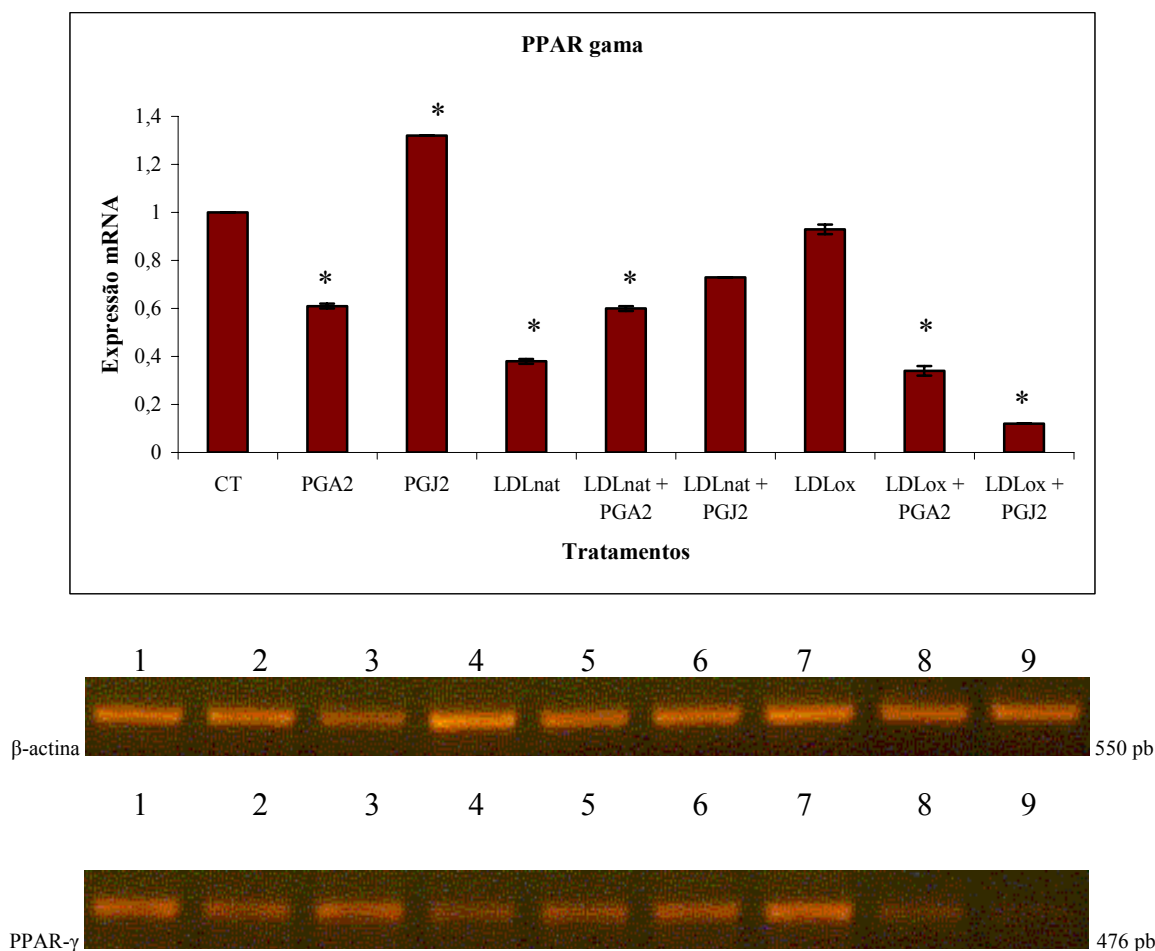


Figura 9 – Expressão do gene do fator PPAR- γ em células U937, nos diferentes tratamentos. Células da linhagem pró-monocítica humana U937 foram cultivadas segundo materiais e métodos, com meio de cultura RPMI 1640 (grupo 1, controle) em presença PGA_2 (20 μM) (grupo 2); Δ^{12} -PGJ₂ (1.5 μM) (grupo 3); LDL nativa (20 μM) (grupo 4); LDL oxidada (20 μM) (grupo 5); LDLnat + PGA_2 (20 μM) (grupo 6); LDLnat + Δ^{12} -PGJ₂ (1.5 μM) (grupo 7); LDL ox + PGA_2 (20 μM) (grupo 8); LDL ox + Δ^{12} -PGJ₂ (1.5 μM) (grupo 9), durante 18h (LDL nat e LDLox, pré-incubação) e CP-PGs durante 24h (incubação). Resultados quantitativos em referentes à densidade ótica (unidades arbitrárias) do mRNA para PPAR- γ estão representados no gráfico, relacionados à expressão do gene da β -actina. Abaixo do gráfico, os fragmentos de 560 pb e 476 pb correspondem, respectivamente, aos produtos de RT-PCR para β -actina e PPAR- γ . Resultados expressos como média \pm DP, com nível de significância * $P < 0,05$ (teste “t” de *student*). Todos os grupos experimentais são comparados ao grupo controle.

A figura 9 mostra uma inibição significativa na expressão do gene que codifica o fator nuclear PPAR- γ nas células U937 tratadas com PGA_2 (20 μM), da ordem de 33 %. A CP-PG 15-d-PGJ₂ (1.5 μM), por sua vez, intensificou significativamente a expressão gênica deste fator nuclear, na proporção de 35 %, quando comparado ao grupo controle.

As células U937 tratadas com LDL nativa tiveram a transcrição de mRNA para PPAR- γ significativamente inibida em 65 %, em comparação ao grupo controle. LDL nativa combinada com PGA₂ (20 μ M) mostra inibição na expressão gênica para PPAR- γ similar ao observado no tratamento com apenas PGA₂ (35 % em relação ao controle).

Células tratadas com LDL nativa combinada com 15-d-PGJ₂ (1.5 μ M) não mostraram alteração na expressão gênica de PPAR- γ em comparação ao controle, tratado apenas com meio de cultura, o que também se verifica no tratamento das células com LDL oxidada.

As CP-PGs PGA₂ (20 μ M) e 15-d-PGJ₂ (1.5 μ M) mostraram-se inibidoras da síntese de mRNA para PPAR- γ , mesmo em presença de LDL oxidada. O tratamento com LDLox + PGA₂ (20 μ M) inibiu a expressão deste fator nuclear em 64 %, enquanto esta inibição foi da ordem de 88 % para o tratamento das células com LDLox +15-d-PGJ₂ (1.5 μ M).

4.1.2. CD36

O receptor de *Scavenger* CD36/FAT reconhece e internaliza LDL modificada, contribuindo para a ativação de macrófagos e formação de *foam cells*. Esta proteína de membrana também está envolvida na fagocitose de corpos apoptóticos por macrófagos. Os tratamentos experimentais realizados no laboratório, visando verificar o efeito das CP-PGs sobre a expressão gênica do receptor de *scavenger* CD 36, promoveram os resultados apresentados abaixo (figura 10).

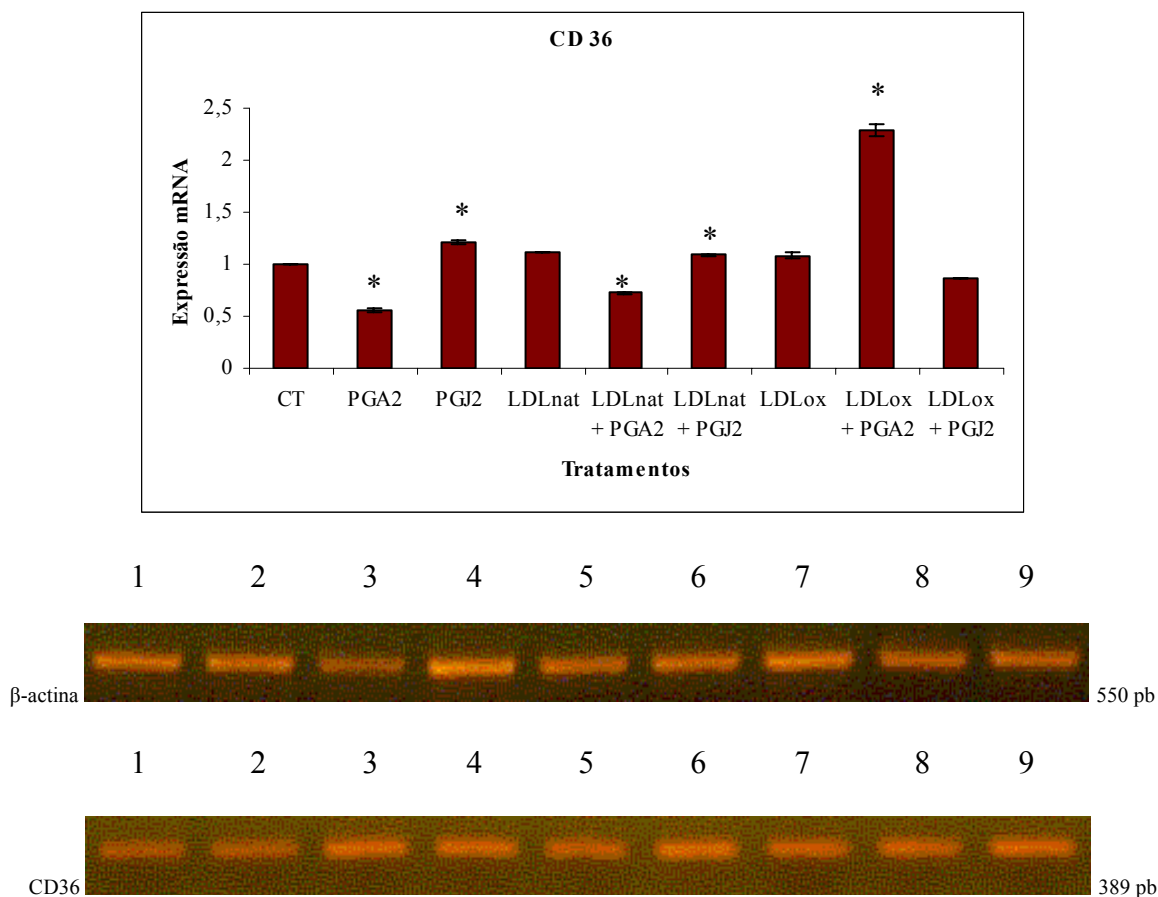


Figura 10 – Expressão do gene do receptor de *scavenger* CD36/FAT em células da linhagem U937, nos diferentes tratamentos. Células da linhagem pró-monocítica humana U937 foram cultivadas segundo materiais e métodos, com meio de cultura RPMI 1640 (grupo 1, controle) em presença PGA₂ (20μM) (grupo 2); Δ¹²-PGJ₂ (1.5μM) (grupo 3); LDL nativa (20μM) (grupo 4); LDL oxidada (20μM) (grupo 5); LDLnat + PGA₂ (20μM) (grupo 6); LDLnat + Δ¹²-PGJ₂ (1.5μM) (grupo 7); LDL ox + PGA₂ (20μM) (grupo 8); LDL ox + Δ¹²-PGJ₂ (1.5μM) (grupo 9), durante 18h (LDL nat e LDLox, pré-incubação) e CP-PGs durante 24h (incubação). Resultados quantitativos em referentes à densidade ótica (unidades arbitrárias) do mRNA para CD36/FAT estão representados no gráfico, relacionados à expressão do gene da β-actina. Abaixo do gráfico, os fragmentos de 560 pb e 476 pb correspondem, respectivamente, aos produtos de RT-PCR para β-actina e CD36/FAT. Resultados expressos como média ± DP, com nível de significância *P<0,05 (teste “t” de *student*). Todos os grupos experimentais são comparados ao grupo controle.

A figura 10 mostra que, enquanto a CP-PG PGA₂ (20μM) inibiu a expressão gênica do receptor de *scavenger* CD36/FAT em 42 %, a CP-PG 15-d-PGJ₂ (1.5μM) aumentou a expressão gênica desta proteína em 23 %, quando comparado ao grupo controle.

Os tratamentos das células U937 com LDL nativa ou LDL oxidada não interferiram na expressão de mRNA para CD 36, a qual permaneceu nos níveis observados no grupo controle.

Células U937 tratadas com PGA_2 ($20\mu\text{M}$) + LDL nativa sofreram significativa redução na expressão gênica de CD36 (26 %, comparado ao grupo controle). Quando as células foram tratadas com 15-d-PGJ₂ ($1.5\mu\text{M}$) + LDL nativa, a sua resposta fisiológica foi de ativação da expressão de mRNA para CD36, da ordem de 10 %.

Embora as células tratadas com LDL oxidada + 15-d-PGJ₂ ($1.5\mu\text{M}$) não tenham sofrido alterações na expressão gênica de CD36, o tratamento com LDL oxidada + PGA_2 ($20\mu\text{M}$) intensificou a expressão deste gene em 124 %, comparando-se ao controle.

4.1.3. HMG-CoA redutase

O processo de diferenciação de macrófagos em *foam cells* é caracterizado tanto pelo aumento da captação de partículas modificadas de LDL contendo colesterol, como por alterações nos processos de síntese e esterificação de colesterol pelas células, além da redução na capacidade de exportação de lípidos por macrófagos inflamatórios. Como o acúmulo de lípidos por macrófagos pode estar relacionado com disfunções na sua capacidade de regulação da síntese e exportação destas moléculas, a medida da expressão gênica de mRNA para HMG-CoA redutase, enzima reguladora da síntese intracelular de colesterol, foi efetuada em diferentes condições experimentais.

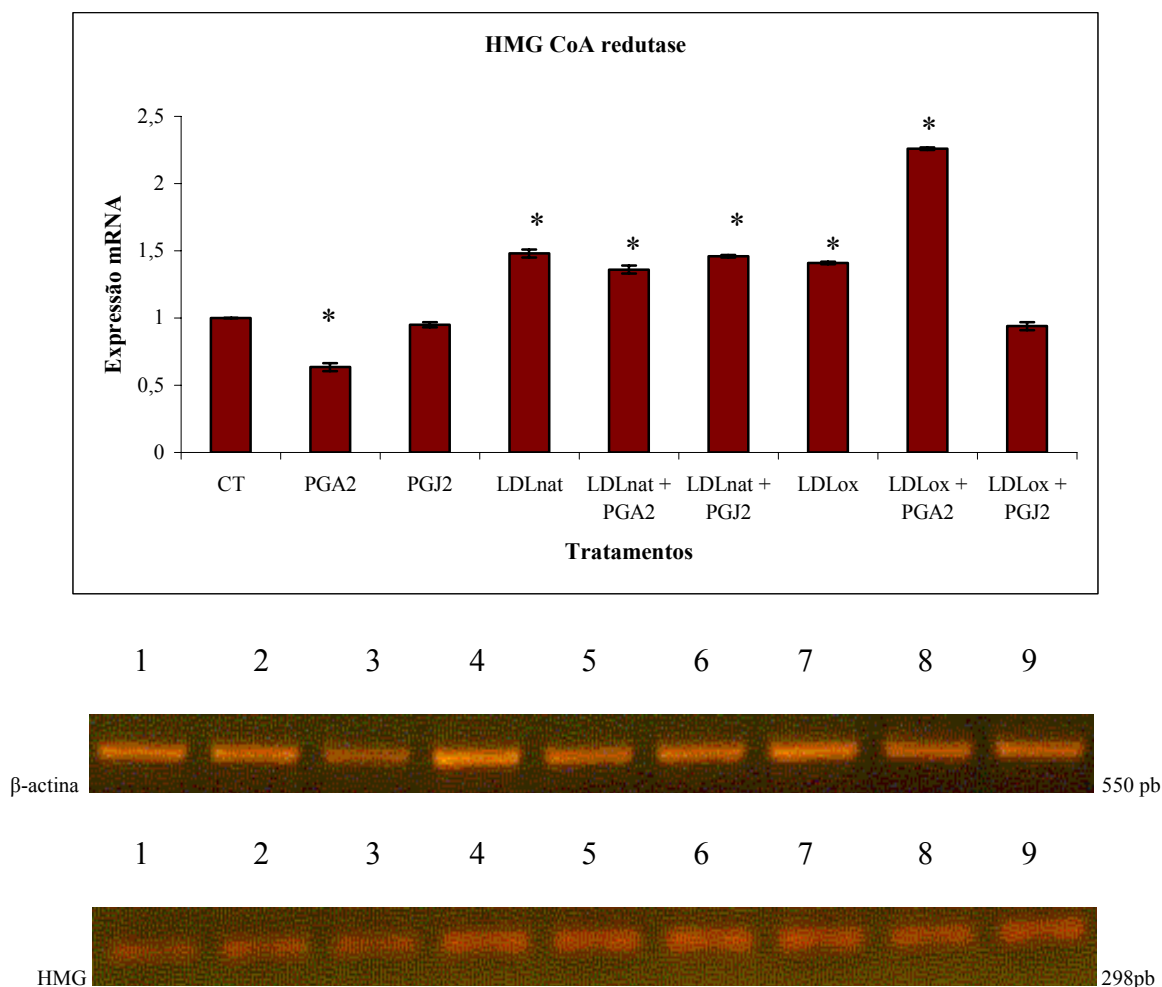


Figura 11 – Expressão do gene que codifica a enzima HMG-CoA reductase em células da linhagem U937, nos diferentes tratamentos. Células da linhagem pró-monocítica humana U937 foram cultivadas segundo materiais e métodos, com meio de cultura RPMI 1640 (grupo 1, controle) em presença PGA_2 ($20\mu\text{M}$) (grupo 2); Δ^{12} - PGJ_2 ($1.5\mu\text{M}$) (grupo 3); LDL nativa ($20\mu\text{M}$) (grupo 4); LDL oxidada ($20\mu\text{M}$) (grupo 5); LDLnat + PGA_2 ($20\mu\text{M}$) (grupo 6); LDLnat + Δ^{12} - PGJ_2 ($1.5\mu\text{M}$) (grupo 7); LDL ox + PGA_2 ($20\mu\text{M}$) (grupo 8); LDL ox + Δ^{12} - PGJ_2 ($1.5\mu\text{M}$) (grupo 9), durante 18h (LDL nat e LDLox, pré-incubação) e CP-PGs durante 24h (incubação). Resultados quantitativos em referentes à densidade ótica (unidades arbitrárias) do mRNA para HMG-CoA reductase estão representados no gráfico, relacionados à expressão do gene da β -actina. Abaixo do gráfico, os fragmentos de 560 pb e 476 pb correspondem, respectivamente, aos produtos de RT-PCR para β -actina e HMG-CoA reductase. Resultados expressos como média \pm DP, com nível de significância $*P < 0,05$ (teste “t” de *student*). Todos os grupos experimentais são comparados ao grupo controle.

A PGA_2 ($20\mu\text{M}$) inibiu significativamente a expressão de mRNA para a enzima HMG-CoA redutase, nas células U937. Este efeito não se verifica com respeito a CP-PG 15-d-PGJ₂ ($1.5\mu\text{M}$), uma vez que o tratamento com este autacóide não alterou a expressão gênica para HMG-CoA redutase nas condições experimentais utilizadas neste trabalho.

Os tratamentos com LDL, tanto nativa como oxidada, aumentaram a expressão gênica para HMG-CoA redutase de modo estatisticamente significativo, sendo este aumento de 52 % para o tratamento com LDLnat e 40 % para o tratamento com LDLox, em relação ao grupo controle.

Do mesmo modo, os tratamentos com PGA_2 ($20\mu\text{M}$) + LDL nativa e 15-d-PGJ₂ ($1.5\mu\text{M}$) + LDL nativa aumentaram significativamente a expressão gênica para HMG-CoA redutase, em 39 % para o primeiro tratamento (PGA_2 + LDLnat) e 47 % para o segundo tratamento (15-d-PGJ₂ + LDLnat).

O grupo experimental tratado com PGA_2 + LDLox exibiu aumento na expressão gênica de HMG-CoA redutase (127 %), enquanto o tratamento com 15-d-PGJ₂ + LDLox não produziu alteração significativa na expressão gênica desta enzima, pois os valores permaneceram semelhantes aos observados no grupo controle.

4.2 Proteínas reguladoras de apoptose

Moléculas aterogênicas e trombogênicas, bem como enzimas degradativas liberadas de macrófagos em processo de morte por apoptose, contribuem de forma definitiva para a aterogênese, ruptura da placa e trombose aguda. Do mesmo modo, ruptura da placa e trombose aguda, estão fortemente associadas com a presença de cores lipídicos nas lesões, regiões caracterizadas por conter debris e corpos apoptóticos de macrófagos mortos (Ball *et al*, 1995; Barberian *et al*, 1990).

Assim, quanto aos genes envolvidos com rotas de morte celular por apoptose, tanto os genes que codificam as proteínas intracelulares pró-apoptóticas p53 e caspase 3, quanto o gene que codifica a proteína intracelular anti-apoptótica Bcl-x_L, tiveram sua expressão quantificada, para avaliar a resposta celular aos tratamentos experimentais anteriormente descritos.

4.2.1. Caspase 3

Os resultados da expressão gênica da proteína pró-apoptótica caspase 3, perante os diferentes tratamentos aos quais as células U937 foram submetidas, podem ser observados na figura 12.

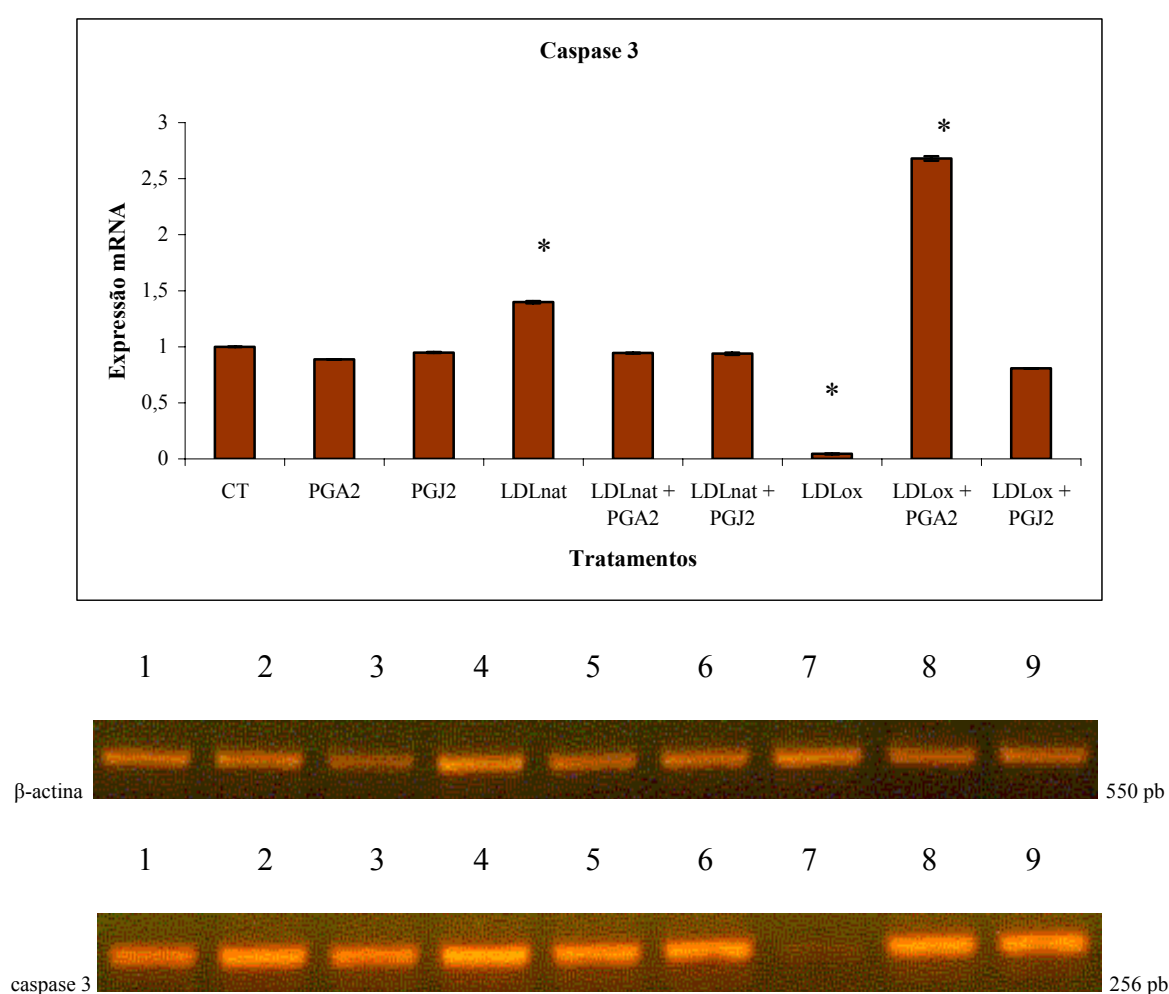


Figura 12 – Expressão do gene que codifica a proteína pró-apoptótica Caspase 3 em células da linhagem U937, nos diferentes tratamentos. Células da linhagem pró-monocítica humana U937 foram cultivadas segundo materiais e métodos, com meio de cultura RPMI 1640 (grupo 1, controle) em presença PGA_2 (20 μM) (grupo 2); Δ^{12} -PGJ₂ (1.5 μM) (grupo 3); LDL nativa (20 μM) (grupo 4); LDL oxidada (20 μM) (grupo 5); LDLnat + PGA_2 (20 μM) (grupo 6); LDLnat + Δ^{12} -PGJ₂ (1.5 μM) (grupo 7); LDL ox + PGA_2 (20 μM) (grupo 8); LDL ox + Δ^{12} -PGJ₂ (1.5 μM) (grupo 9), durante 18h (LDL nat e LDLox, pré-incubação) e CP-PGs durante 24h (incubação). Resultados quantitativos em referentes à densidade óptica (unidades arbitrárias) do mRNA para caspase 3 estão representados no gráfico, relacionados à expressão do

gene da β -actina. Abaixo do gráfico, os fragmentos de 560 pb e 476 pb correspondem, respectivamente, aos produtos de RT-PCR para β -actina e caspase 3. Resultados expressos como média \pm DP, com nível de significância $*P < 0,05$ (teste “t” de *student*). Todos os grupos experimentais são comparados ao grupo controle.

O tratamento das células U937 com as CP-PGs PGA_2 e 15-d-PGJ₂ não alterou a expressão gênica da proteína pró-apoptótica caspase 3, em comparação ao grupo controle.

Células U937 tratadas com LDL nativa mostraram aumento significativo na expressão gênica de caspase 3 (39 %), mas os tratamentos com PGA_2 + LDLnat e 15-d-PGJ₂ + LDLnat mantiveram a expressão gênica desta proteína em valores semelhantes aos do grupo controle.

O tratamento das células U937 com LDL oxidada inibiu drasticamente a expressão gênica da caspase 3 (95 %), embora curiosamente o tratamento com PGA_2 + LDLox aumente a expressão de mRNA para esta proteína, também de forma muito acentuada (166 %). Quando as células foram submetidas a tratamento com 15-d-PGJ₂ + LDLox, os níveis de expressão gênica da caspase 3 permaneceram semelhantes aos observados no grupo controle.

4.2.2. p53

A proteína supressora de tumor p53 exerce efeitos tanto antiproliferativos como pró-apoptóticos, em diversas células (Lohrum *et al*, 2000; Gottlieb & Oren, 1998; Sheikh & Fornace, 2000). Sabe-se que lipoproteínas oxidadas ativam p53, através da inibição da sua rota

bioquímica de degradação (Lohrum *et al*, 2000), e sabe-se que, nas lesões ateroscleróticas, p53 co-localiza-se com macrófagos não-proliferativos ou apoptóticos.

Desta forma, os resultados obtidos com os diferentes tratamentos impostos às células U937 se refletiram na modulação da expressão gênica da proteína supressora de tumor p53, conforme ilustrado na figura 13.

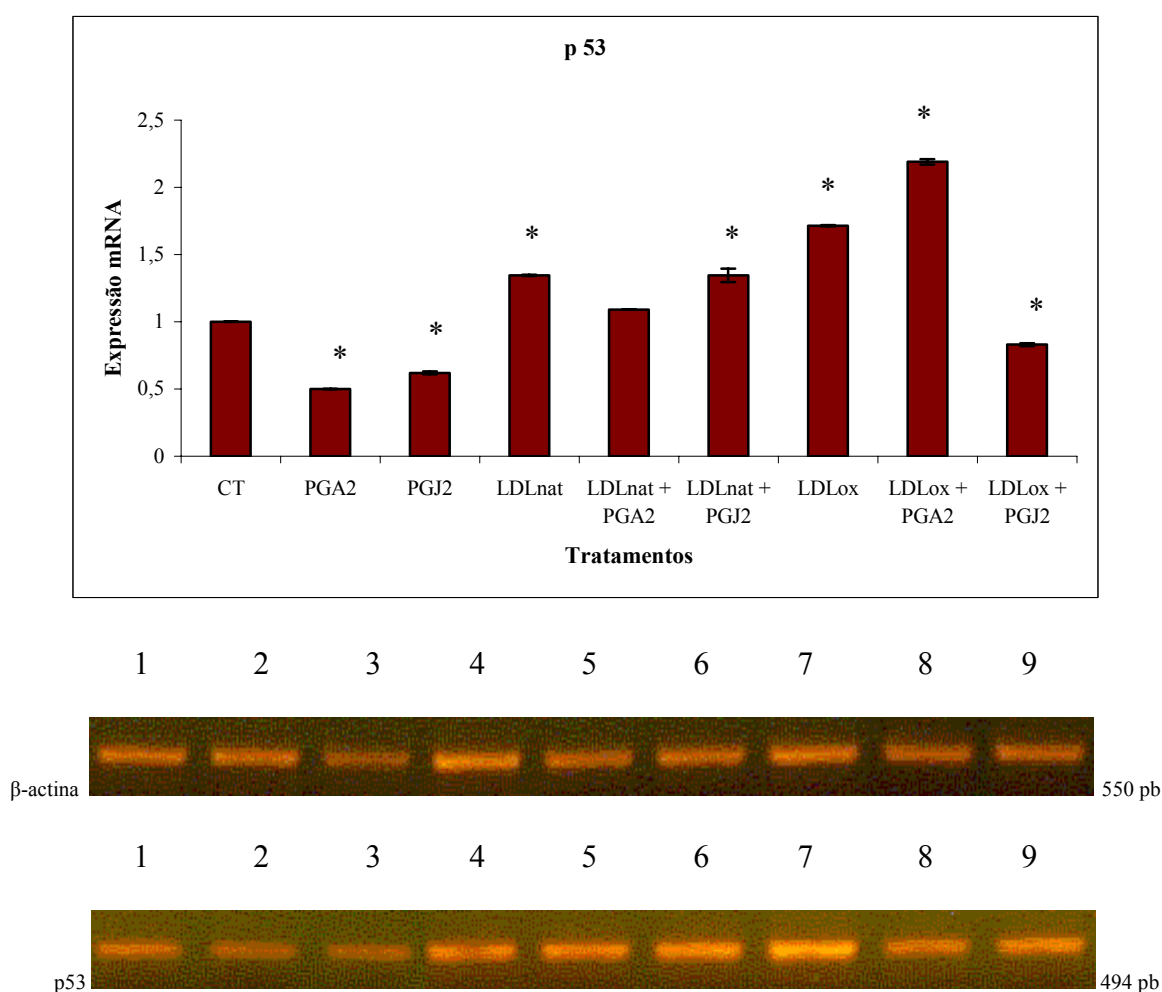


Figura 13 – Expressão do gene que codifica a proteína pró-apoptótica p53 em células da linhagem U937, nos diferentes tratamentos. Células da linhagem pró-monocítica humana U937 foram cultivadas segundo materiais e métodos, com meio de cultura RPMI 1640 (grupo 1, controle) em presença PGA₂ (20μM) (grupo 2); Δ¹²-PGJ₂ (1.5μM) (grupo 3); LDL nativa (20μM) (grupo 4); LDL oxidada (20μM) (grupo 5); LDLnat + PGA₂ (20μM) (grupo 6); LDLnat + Δ¹²-PGJ₂ (1.5μM) (grupo 7); LDL ox + PGA₂ (20μM) (grupo 8); LDL ox + Δ¹²-PGJ₂ (1.5μM) (grupo 9), durante 18h (LDL nat e LDLox, pré-incubação) e CP-PGs durante 24h (incubação). Resultados quantitativos em referentes à densidade óptica (unidades arbitrárias) do mRNA para p53 estão representados no gráfico, relacionados à expressão do gene da β-actina.

Abaixo do gráfico, os fragmentos de 560 pb e 476 pb correspondem, respectivamente, aos produtos de RT-PCR para β -actina e p53. Resultados expressos como média \pm DP, com nível de significância $*P < 0,05$ (teste “t” de *student*). Todos os grupos experimentais são comparados ao grupo controle.

O tratamento das células U937 com as CP-PGs PGA_2 e 15-d-PGJ₂ promoveu inibição da expressão gênica da proteína supressora de tumor p53, em comparação ao grupo controle. Esta inibição foi da ordem de 49 % para o tratamento com PGA_2 e 36 % para o tratamento das células com 15-d-PGJ₂.

Os grupos experimentais tratados com LDL nativa e LDL oxidada mostraram aumento na expressão gênica de p53, estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. Este aumento foi de 34 % para o tratamento com LDL nativa e 71 % para o tratamento com LDL oxidada.

As células que foram incubadas com PGA_2 + LDLnat não sofreram alterações na expressão de mRNA para p53, enquanto aquelas tratadas com 15-d-PGJ₂ + LDLnat aumentaram a expressão gênica desta proteína em 34 %, em relação ao grupo controle.

O grupo experimental incubado com PGA_2 + LDLox aumentou a sua expressão gênica de p53 significativamente (117 %), em comparação ao grupo controle. No caso do tratamento das células com 15-d-PGJ₂ + LDLox, houve um efeito inibitório estatisticamente significativo, sobre a expressão de p53, aumento este da ordem de 16 % em relação ao grupo controle.

4.2.3. Bcl_{xL}

O efeito dos tratamentos experimentais sobre a expressão do gene que codifica o fator anti-apoptótico Bcl_{xL}, pertencente à uma subfamília da família Bcl₂, pode ser verificado na figura 14.

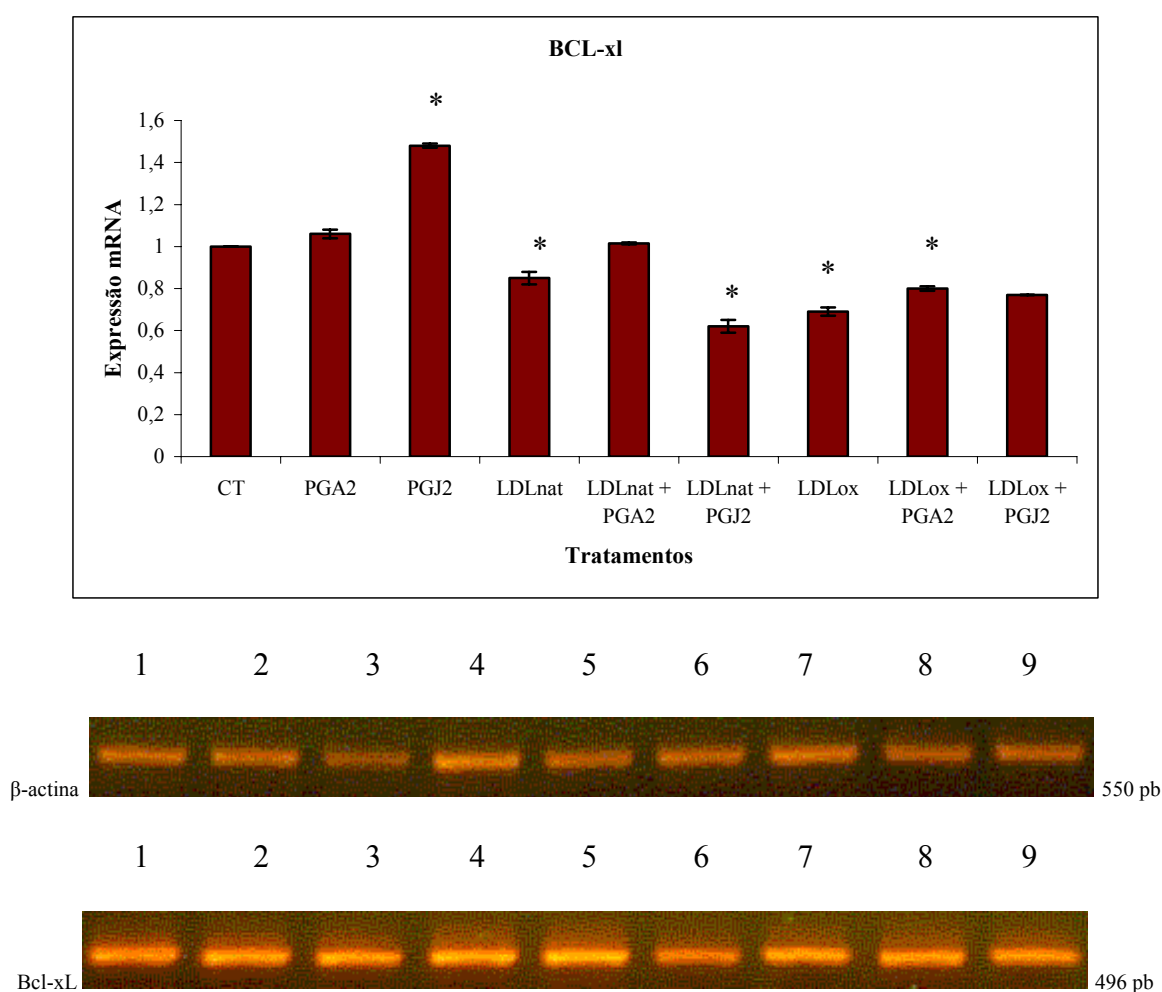


Figura 14 – Expressão do gene que codifica a proteína anti-apoptótica Bcl-x_L em células da linhagem U937, nos diferentes tratamentos. Células da linhagem pró-monocítica humana U937 foram cultivadas segundo materiais e métodos, com meio de cultura RPMI 1640 (grupo 1, controle) em presença PGA₂ (20μM) (grupo 2); Δ¹²-PGJ₂ (1.5μM) (grupo 3); LDL nativa (20μM) (grupo 4); LDL oxidada (20μM) (grupo 5); LDLnat + PGA₂ (20μM) (grupo 6); LDLnat + Δ¹²-PGJ₂ (1.5μM) (grupo 7); LDL ox + PGA₂ (20μM) (grupo 8); LDL ox + Δ¹²-PGJ₂ (1.5μM) (grupo 9), durante 18h (LDL nat e LDLox, pré-incubação) e CP-PGs durante 24h (incubação). Resultados quantitativos em referentes à densidade ótica (unidades arbitrárias) do mRNA para Bcl-xL estão representados no gráfico, relacionados à expressão do gene da β-actina. Abaixo do gráfico, os fragmentos de 560 pb e 476 pb correspondem, respectivamente, aos produtos de RT-PCR para β-actina e Bcl-xL.

Resultados expressos como média \pm DP, com nível de significância $*P < 0,05$ (teste “t” de *student*). Todos os grupos experimentais são comparados ao grupo controle.

As células da linhagem pró-monocítica humana U937 tratadas com PGA_2 não tiveram a expressão gênica da proteína anti-apoptótica Bcl-xL alterada, porém, o tratamento com a CP-PG 15-d-PGJ₂ intensificou a expressão deste gene significativamente, em relação ao grupo controle (49 %).

O tratamento das células com LDL nativa e também com LDL oxidada inibiu a expressão de mRNA para Bcl-xL em 18 % e 29 %, para cada tratamento, respectivamente.

As células U937 tratadas com PGA_2 + LDLnat não sofreram alteração na expressão gênica de Bcl-xL, em comparação ao grupo controle. Este efeito não se verifica no grupo tratado com 15-d-PGJ₂ + LDLnat, visto que este tratamento inibiu a expressão gênica de Bcl-xL de modo significativo em relação ao grupo controle, em 34 %.

Células tratadas com PGA_2 + LDLox tiveram a síntese de mRNA para Bcl-xL inibida em 19 %, em relação ao grupo controle. Já o tratamento com 15-d-PGJ₂ + LDLox não alterou a expressão gênica desta proteína.

5. DISCUSSÃO

5.1. Proteínas relacionadas à diferenciação macrófagos/foam cells

5.1.1. PPAR- γ

Diversas pesquisas demonstram a expressão de PPAR- γ em monócitos e macrófagos (Greene *et al*, 1995; Jiang *et al*, 1998; Ricote *et al*, 1998), e Tontonoz *et al* (1998) e Ricote *et al* (1998) demonstraram que o PPAR- γ atua na formação de foam cells. O PPAR- γ pode ser ativado por LDL oxidada (Ricote *et al*, 1998), de modo que a expressão de PPAR- γ em macrófagos fagocíticos é de grande importância no contexto da lesão ateromatosa vascular (Pelton *et al*, 1999).

A ativação do PPAR- γ em macrófagos leva à expressão do receptor de scavenger CD36/FAT, característica de macrófagos *foam cells* (Tontonoz *et al.*, 1998). O aumento no número de receptores CD36/FAT resulta em aumento no *input* de LDL oxidada nos macrófagos, que iniciam sua diferenciação em *foam cells*.

As células U937 tratadas com PGA₂ tiveram a expressão gênica de PPAR- γ inibida em relação ao grupo controle. Este efeito se manteve, mesmo em presença de LDL nativa e LDL oxidada. Observa-se ainda que o tratamento das células U937 com LDL nativa também exerce efeito inibitório sobre a expressão deste fator nuclear. Já o tratamento com LDL oxidada aumentou significativamente a expressão de PPAR- γ , quando comparado ao grupo controle. Este efeito, mediado por LDL oxidada, já era esperado, pois sabe-se que esta LDL tem altas concentrações de derivados lipídicos oxidados, como o 9- e o 13-HODE (ácido hidróxi-

octadecadienóico), que são ativadores diretos do PPAR- γ (Nargy *et al.*, 1998).

A ativação do PPAR- γ , mediada por LDL oxidada, desencadeia a expressão de receptores de *scavenger* para a internalização de cada vez mais LDL oxidadas, contendo mais ativadores do PPAR- γ , o que contribui para a diferenciação de macrófagos em *foam cells*. Neste contexto, tanto a PGA₂ como a 15-d-PGJ₂ inibiram a expressão do PPAR- γ , quando em presença de LDL oxidada, que é potencialmente aterogênica.

É importante salientar que as CP-PGs da família da 15-d-PGJ₂ são ativadoras e ligantes fisiológicos do fator nuclear PPAR- γ (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995), conforme se confirma pelos resultados obtidos com a incubação das células em presença desta CP-PG. Em presença de LDL nativa, a expressão gênica de PPAR- γ permaneceu nos níveis observados no grupo controle e, além disso, a 15-d-PGJ₂ também foi capaz de inibir a expressão de PPAR- γ nas células tratadas com LDL oxidada. Sabe-se que o tratamento de macrófagos peritoniais com 15-d-PGJ₂ inibe a transcrição gênica do receptor de scavenger A, em resposta a estimulação com PMA (Ricote *et al.*, 1998).

A ativação do PPAR- γ por ligantes pode resultar na indução de apoptose em macrófagos diferenciados. Este processo é acompanhado pelo surgimento de subunidades proteolíticas ativas da protease sinalizadora de morte celular caspase 3 (Chinetti *et al.*, 1998). Também têm sido demonstrado que o NF- κ B protege macrófagos da morte celular induzida por TNF- α , e o PPAR- γ interfere com esta sinalização. A ativação do PPAR- γ induzindo apoptose também têm sido constatada em células cancerígenas gástricas (Takahashi *et al.*, 1999). Os ligantes fisiológicos do PPAR- γ , ciglitizona e PG 15-dJ₂, também induzem apoptose em células endoteliais (Bishop-Bailey *et al.*, 1999).

5.1.2. CD36

Sabe-se que a oxidação de lipoproteínas do plasma, particularmente LDL, tem demonstrado diversas propriedades pró-aterogênicas. Talvez a mais notável contribuição da LDL oxidada para o desenvolvimento da aterosclerose seja a sua captação por macrófagos no espaço vascular. Diversos trabalhos descrevem o papel da rápida e desregulada captação de LDL oxidada na transformação de monócitos/macrófagos em *foam cells*, nas lesões ateroscleróticas.

Um grande número de proteínas presentes na membrana celular capazes de se ligar com grande afinidade à LDL oxidada têm sido identificado na superfície de macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas. Uma característica comum destes receptores de *scavenger* é a sua habilidade em se ligar com grande afinidade a diversos ligantes estruturalmente diferentes (Dhaliwal & Steinbrecher, 1999). Dentre os receptores de scavenger que sabidamente interagem com LDL oxidada, têm-se SR-AI/II, CD36, SR-BI, CD68, LOX-1 e SREC (Baljinder & Steinbrecher, 1999).

O CD36, um receptor de *scavenger* classe B, é uma glicoproteína presente na membrana plasmática de monócitos, plaquetas, células endoteliais, epitélio da glândula mamária e adipócitos de murinos que, dependendo do tipo de célula em que é encontrado, pode ter diferentes pesos moleculares (78, 88 ou 94 kDa), correspondendo à diferentes glicofomas (Greenwalt *et al*, 1992; Alessio *et al*, 1991). Esta proteína foi primeiramente identificada como receptor para LDL oxidada, mas o CD36 tem afinidade por diversos

ligantes diferentes, incluindo lipoproteínas nativas (além de oxidadas), ácidos graxos, fosfolípidios aniônicos, colágenos tipo I e tipo IV, bem como eritrócitos parasitados com *Plasmodium falciparum*.

O CD36 liga-se à lisina de proteínas modificadas, como LDL acetilada ou oxidada, e também está envolvido na fagocitose de células apoptóticas ou de fragmentos celulares. Entretanto, a sua importância quantitativa na captação de LDL oxidada por macrófagos permanece desconhecida. O CD36 também é reportado como envolvido na fagocitose de neutrófilos e linfócitos T apoptóticos por macrófagos (Alessio *et al*, 1995).

Sabe-se que a expressão gênica de CD36 em macrófagos é estimulada por interleucina 4 (IL-4), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), LDL modificada, conteúdo intracelular de colesterol e PPAR- γ , e é inibida, ou *down* regulada, por interferon- γ , *transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1) e TGF- β 2 (Yesner *et al*, 1996; Han *et al*, 1997; Han *et al*, 1999; Tontonoz *et al*, 1998; Nakagawa *et al*, 1998; Han *et al*, 2000). Sabe-se também que partículas de LDL nativa, acetilada e oxidada estimulam a captação de emulsão rica em triglicerídeos por macrófagos, através de diversos mecanismos, dos quais se destacam os mediados por receptores de scavenger (Quintão *et al.*, 2002).

Os experimentos apresentados neste trabalho (figura 10) demonstraram que o tratamento das células da linhagem pró-monocítica humana U937 com LDL nativa e LDL oxidada não interferiu na expressão gênica de CD36, embora inúmeros autores já tenham descrito aumento na expressão de CD36, em diversos modelos experimentais, em resposta à presença de LDL oxidada. Assim, é possível que um aumento no tempo de tratamento das culturas com LDL oxidada altere este perfil.

A exposição das culturas de células a CP-PGs alterou significativamente a expressão gênica de CD36, porém, de modo antagônico, pois enquanto a PGA_2 inibiu, a 15-d-PGJ₂ intensificou a expressão gênica deste receptor de *scavenger*, quando comparado ao controle.

Em presença de LDL nativa, a PGA_2 continuou exercendo efeitos inibitórios sobre a expressão gênica de CD36, mas, curiosamente, resultados inesperados foram observados no tratamento das células com PGA_2 em presença de LDL oxidada. Este tratamento intensificou a expressão de CD36, provavelmente por uma via independente de PPAR- γ , uma vez que a PGA_2 reduziu a expressão deste fator nuclear de modo significativo, em todos os tratamentos (ver figura 9).

Por outro lado, verificou-se aumento significativo na expressão gênica de CD36, após tratamento com 15-d-PGJ₂, em presença ou ausência de LDL nativa, o que se deve, provavelmente, ao efeito da 15-d-PGJ₂ em si, sem a interferência da LDL nativa acrescida ao meio de cultura. Este efeito pode estar relacionado com o aumento concomitante na expressão do fator nuclear PPAR- γ (figura 9), uma vez que a 15-d-PGJ₂ é um conhecido ligante fisiológico do PPAR- γ , conforme anteriormente descrito.

É interessante mencionar que, embora a 15-d-PGJ₂ aumente a expressão de PPAR- γ , bem como a sua ativação, já descrita na literatura, que pode levar ao concomitante aumento na expressão de CD36, esta CP-PG também se mostrou eficiente em reduzir, dramaticamente, a expressão de PPAR- γ , quando em presença de LDL oxidada. Tal efeito inibitório pode ter contribuído para a manutenção da expressão de CD36 em níveis semelhantes aos observados no grupo controle.

5.1.3. HMG-CoA redutase

No caso da enzima HMG-CoA redutase, responsável pelo controle da síntese intracelular de colesterol, o tratamento com PGA_2 inibiu significativamente sua expressão gênica, enquanto o tratamento com 15-d-PGJ_2 parece não interferir na expressão desta enzima. É importante mencionar que inibidores da HMG-CoA redutase também são capazes de reduzir a adesão de monócitos humanos a células endoteliais (Thiery *et al*, 2001).

Tanto o tratamento das células U937 com LDL nativa, como o tratamento com LDL oxidada, aumentaram significativamente a expressão gênica da HMG-CoA redutase, quando comparado ao grupo controle. Assim, a internalização de LDL (contendo colesterol) pelas células, na sua forma nativa ou oxidada, é capaz de promover ativação da expressão gênica de HMG-CoA redutase. Este resultado é inesperado, uma vez que está bem estabelecido que a atividade desta enzima é inibida por altos níveis intracelulares de colesterol, num processo de *feedback* negativo. Este aumento na expressão da HMG-CoA redutase em presença de LDL, pode promover uma ativação na maquinaria celular de síntese de colesterol, que, associado ao aumento na expressão de CD 36, com maior *imput* de LDL modificada contendo colesterol, contribui para o aumento de colesterol intracelular. Além disso, Curi e Bittencourt (1997) demonstraram que macrófagos *foam cells* tem sua capacidade de transferir colesterol a linfócitos em co-cultura bastante reduzida, o que resulta em acúmulo ainda maior de colesterol intracelular.

O tratamento das culturas de células com as CP-PGs PGA_2 e 15-d-PGJ_2 parece não interferir no aumento da expressão gênica para HMG-CoA redutase, induzido pela LDL nativa. Curiosamente, quando as células são tratadas com LDL oxidada e PGA_2 , a expressão gênica desta enzima aumenta consideravelmente.

Sabe-se que a PGA_2 intensifica a síntese de fosfolípidos, enquanto reduz, concomitantemente, as concentrações intracelulares de colesterol, ácidos graxos livres, triglicerídeos e ésteres de colesterol, em macrófagos de rato, possivelmente via regulação da expressão gênica ou da atividade da HMG-CoA redutase (Bittencourt *et al*, 1998). Assim, este dado vem ao encontro do efeito observado no tratamento das células com PGA_2 em ausência de LDL, pois esta CP-PG ocasionou redução na expressão de mRNA para a enzima HMG-CoA redutase. Curiosamente, o tratamento com PGA_2 e LDL oxidada aumentou a expressão de mRNA para esta enzima.

Já com relação a 15-d-PGJ_2 , embora esta CP-PG não tenha alterado a expressão gênica da HMG-CoA redutase, os resultados obtidos no tratamento combinando 15-d-PGJ_2 e LDL oxidada demonstram uma clara capacidade desta CP-PG em trazer os níveis de expressão gênica da HMG-CoA redutase a valores similares aos observados no grupo controle. Este efeito parece se contrapor à estimulação da expressão gênica da enzima, que se verifica no tratamento com LDL oxidada e nativa, em ausência de 15-d-PGJ_2 .

5.2. Proteínas relacionadas a apoptose

O processo de apoptose ou morte celular programada caracteriza-se por mudanças estruturais, tais como alterações em membranas plasmáticas, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e diminuição celular. A aterosclerose é um processo complexo em que a significância da apoptose depende de numerosos fatores que estão relacionados à placa aterosclerótica, tais como seu estágio de desenvolvimento, localização e os tipos celulares relacionados.

A significância do processo de apoptose em macrófagos e em células musculares lisas pode ser completamente diferente. A apoptose em macrófagos pode ser benéfica para a estabilidade da placa, se os corpos apoptóticos forem removidos. Por outro lado, células apoptóticas não removidas podem ativar a trombina e induzir trombose. Sabe-se também que lesões consistindo somente de células musculares lisas apresentam-se com muito pouca apoptose, o que enfraquece a cápsula fibrosa pela diminuição da síntese de fibras colágenas, contribuindo, assim, para a instabilidade da placa (Drager *et al*, 2002).

Estes fenômenos têm sido cada vez mais estudados em modelos animais e humanos, sendo proposto que a associação de apoptose com a ativação de um complexo sistema envolvendo inúmeros mediadores inflamatórios contribui tanto para o remodelamento vascular como para a instabilidade da placa, a sua ruptura e a formação de trombos. A caracterização do papel da apoptose e sua interação com processos inflamatórios criam perspectivas de novos rumos terapêuticos para a estabilização da placa, que poderiam levar a eventos coronários.

Sabe-se que os macrófagos têm a capacidade de direcionar a morte celular no remodelamento de diversos tecidos. Assim, macrófagos recrutados do sangue podem direcionar a apoptose em células endoteliais, e podem também deletar células residentes durante o remodelamento das regiões inflamadas, induzindo apoptose em células próximas por mecanismos que incluem a liberação de óxido nítrico (Duffield *et al*, 2000).

A capacidade dos macrófagos em direcionar a morte celular é regulada pela captação de células apoptóticas. Por exemplo, a citólise de células tumorais por macrófagos ativados é inibida pela ingestão de células apoptóticas. Em algumas circunstâncias, a captação de células apoptóticas pode engatilhar a liberação da citocina indutora de morte CD95 por macrófagos, resultando na apoptose das células adjacentes (Savill & Fadok, 2000).

É fato conhecido que o estresse celular, como o causado por danos ao DNA, hipoxia ou lipoproteínas oxidadas, ativam a proteína supressora de tumor p53, e elevados níveis de p53 levam a respostas antiproliferativas e pró-apoptóticas. Por outro lado, a deficiência de p53 está associada com o aumento no tamanho da lesão aterosclerótica.

Sabe-se também que as caspases, cisteíno-proteases que clivam proteínas nas proximidades de resíduos de ácido aspártico específicos, são efetoras do processo de morte celular por apoptose. Estas proteases podem ter seus efeitos pró-apoptóticos inibidos pelas proteínas da família Bcl-2, presentes nas membranas mitocondriais. Em mitocôndrias isoladas, Bcl-2 ou Bcl-x intensificam a extrusão de prótons da mitocôndria e aumentam a capacidade de tamponamento do cálcio mitocondrial (Nguyen *et al*, 1994, Mazel *et al*, 1996), de modo que estas proteínas talvez se comuniquem funcionalmente ou fisiologicamente com proteínas da membrana mitocondrial interna que controlam o transporte de íons.

5.2.1. Caspase 3

As CP-PGs PGA_2 e 15-d-PGJ_2 não interferiram na expressão gênica da proteína pró-apoptótica caspase 3, nas condições experimentais aqui apresentadas, em comparação ao grupo controle. Porém, quando estas CP-PGs foram combinadas com LDL nativa, a expressão gênica da caspase 3 manteve-se nos níveis observados no grupo controle. Como o tratamento com LDL nativa aumentou significativamente a expressão gênica da caspase 3, podemos supor que este efeito tenha sido anulado pela adição das CP-PGs ao meio de cultura contendo LDL nativa (figura 12).

O tratamento das células U937 com LDL oxidada inibiu drasticamente a expressão gênica da caspase 3, quando comparado ao grupo controle. Este efeito anti-apoptótico induzido pela LDL oxidada foi anulado pela adição de CP-PGs ao meio de cultura. Observe-se que PGA_2 e LDL oxidada, quando combinadas, aumentaram a expressão gênica de caspase 3, o que pode levar a um efeito pró-apoptótico. No caso do tratamento das células com a combinação de 15-d-PGJ_2 e LDL oxidada, a expressão gênica da caspase 3 retorna aos valores do grupo controle, o que se contrapõe à redução observada no tratamento com LDL oxidada.

5.2.2. p53

O tratamento das células U937 com as CP-PGs PGA_2 e 15-d-PGJ_2 inibiu significativamente a expressão do gene que codifica a proteína pró-apoptótica p 53, quando comparado ao grupo controle (figura 13). Ao contrário, os tratamentos com LDL nativa e LDL oxidada aumentaram a expressão gênica desta proteína.

Embora a LDL nativa promova um aumento na expressão gênica de p53, quando as células são tratadas com LDL nativa e PGA_2 combinadas, a expressão gênica retorna aos valores observados no grupo controle. Este efeito não se observa no tratamento que combina 15-d-PGJ_2 e LDL nativa, cujos resultados permanecem semelhantes aos observados em presença apenas de LDL nativa.

No caso do tratamento com LDL oxidada, observou-se um aumento significativo na expressão gênica de p53, em relação ao grupo controle. Tal aumento se intensifica ao se adicionar a CP-PG PGA_2 ao meio de cultura. Ao contrário, o tratamento combinando a CP-PG 15-d-PGJ_2 com LDL oxidada inibiu a expressão gênica da proteína pró-apoptótica p53, em comparação ao grupo controle.

5.2.3. Bcl-xL

As células U937 tratadas com PGA_2 não sofreram qualquer alteração na expressão gênica da proteína anti-apoptótica Bcl-xL. Já a 15-d-PGJ₂ aumentou a expressão de mRNA para esta proteína, em comparação ao grupo controle.

Tanto LDL nativa como LDL oxidada inibiram a expressão gênica de Bcl-xL, em comparação ao grupo controle. Ao se adicionar PGA_2 às culturas contendo LDL nativa, verifica-se um retorno dos níveis de expressão gênica de Bcl-xL aos valores observados no grupo controle. Este efeito não é visível no tratamento das células com LDL oxidada e PGA_2 , pois este grupo experimental mostra resultado semelhante ao do grupo tratado somente com LDL oxidada. Já no tratamento com 15-d-PGJ₂ e LDL oxidada combinadas, a expressão gênica para Bcl-xL é similar à observada no grupo controle, embora a LDL oxidada tenha efeito inibitório sobre a expressão desta proteína, quando comparado ao grupo controle.

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, tanto PGA_2 como 15-d-PGJ₂ parecem exercer efeitos de inibição do processo apoptótico nas células U937, por um lado inibindo a expressão gênica de p53 e por outro lado estimulando a expressão de Bcl-xL (15-d-PGJ₂). Os tratamentos com LDL nativa favorecem a apoptose das células, aumentando a expressão de p53 e caspase, além de inibir Bcl-xL. Já a LDL oxidada parece estimular a apoptose aumentando p53 e inibindo a expressão de Bcl-xL, mas inibe a expressão de caspase 3, o que sugere rotas específicas para a sua atividade pró-apoptótica. Estes achados vêm de encontro aos de Yoshifumi *et al* (2000) e Yao & Tabas (2000), que atribuem a indução de apoptose em macrófagos e células musculares lisas à presença de LDL oxidada e colesterol livre nos meios de cultura.

Células U937 tratadas com de LDL oxidada mostram uma forte tendência à apoptose, apesar do efeito inibitório das CP-PGs PGA_2 e 15-d-PGJ_2 sozinhas sobre a expressão de p53. Já a 15-d-PGJ_2 parece não interferir na expressão gênica da caspase 3, embora demonstre anular o efeito inibitório da LDL oxidada sobre a expressão desta proteína. No caso da expressão de p53, esta CP-PG por si só promove redução na expressão gênica, efeito este que se mantém em presença de LDL oxidada. Esta tendência anti-apoptótica da 15-d-PGJ_2 se confirma também pelo aumento na expressão gênica de Bcl-xL promovido pelo autacóide, quando administrado sozinho no meio de cultura.

Estes resultados indicam um possível papel anti-apoptótico das CP-PGs, que se contrapõe aos efeitos pró-apoptóticos já bem descritos, exercidos pela exposição das células à LDL oxidada, como verificado por Curi *et al* (2004), que relatam efeitos da 15-d-PGJ_2 no sentido de indução de apoptose, em células Jurkat e Raji.

Para maiores esclarecimentos a respeito dos mecanismos de ação das CP-PGs sobre as rotas moduladoras dos processos de morte celular por apoptose em macrófagos/*foam cells*, são necessários estudos mais aprofundados de expressão gênica neste e em outros modelos experimentais, verificando-se vias específicas de ação destes autacóides.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos experimentalmente e ora apresentados neste trabalho, a CP-PG 15-d-PGJ₂ mostra-se citoprotetora para as células da linhagem pró-monocítica humana U937, reduzindo a expressão gênica de PPAR- γ e mantendo a expressão de CD36 em níveis semelhantes aos do no grupo controle, mesmo em presença de LDL oxidada.

A PGA₂ exerce efeito semelhante, suprimindo a expressão gênica, tanto do fator nuclear PPAR- γ como também de CD36. Esta resposta fisiológica pode ser de grande utilidade na terapêutica da aterosclerose, uma vez que o receptor de *scavenger* CD36 é capaz de reconhecer e internalizar partículas de LDL oxidada, participando da diferenciação de macrófagos em *foam cells*.

PGA₂ inibe a expressão gênica da enzima HMG-CoA redutase, reguladora da síntese intracelular de colesterol. Esta constatação, associada a futuras pesquisas no sentido de se avaliar também a atividade da enzima HMG-CoA redutase, frente ao tratamento com CP-PGs e LDL nativa e oxidada, pode auxiliar efetivamente no desenvolvimento de terapias eficazes no combate à aterosclerose.

A 15-d-PGJ₂ parece manter a expressão da HMG-CoA redutase aos níveis observados no grupo controle, mesmo em presença de LDL oxidada. Por outro lado, esta CP-PGP sozinha não altera a expressão gênica da enzima, pelo menos nas condições em que foram realizados os experimentos. Assim, seria interessante verificar o efeito deste eicosanóide sobre a

expressão dos genes estudados em períodos mais prolongados de tratamento, tanto para PGA_2 como para 15-d-PGJ₂.

Com relação aos genes relacionados aos processos de apoptose, tanto pró-apoptóticos, como p53 e caspase 3, como anti-apoptótico, como no caso da Bcl-xl, as CP-PGs parecem exercer efeitos anti-apoptóticos nas células estudadas. Estes efeitos se contrapõem ao papel pró-apoptótico, já bem descrito, da LDL oxidada, sobre macrófagos e células musculares lisas vasculares.

Embora as CP-PGs 15-d-PGJ₂ e PGA_2 mostrem-se, por um lado, inibidoras da diferenciação de macrófagos em *foam cells*, pela inibição da expressão de genes relacionados a este processo e, por outro lado, também interferem positivamente na regulação do processo de apoptose, muitos pontos permanecem por ser esclarecidos.

Assim, novas pesquisas acerca dos mecanismos de ação das CP-PGs sobre a diferenciação de macrófagos em *foam cells*, bem como seus efeitos sobre os processos que modulam os processos de sobrevivência e morte destas células, são de especial importância para uma possível terapêutica no tratamento da aterosclerose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHERNS, E. H., HIRSCH, J., INSULL, W. J., TSALTAS, T. T., PETERSON, M. L. The influence of dietary fats on serum-lipid levels in mam. *Lancet*, 32: 943-953, 1957.
- AL MEHIDI, A. B., DODIA, C., JAIN, M. K., FISHER, A. B. A phospholipase A₂ inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substances during lung ischemia-reperfusion. *Biophys. Biochim. Acta*, v. 1166, p. 56-62, 1993.
- BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nut.*, v. 47, p. 233-261, 1996.
- BICKEL, P. E. & FREEMAN, M. W. Rabbit aortic smooth muscle cells express inducible macrophage scavenger receptor messenger RNA that is absent from endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 90: 1450-1457, 1992.
- BITTENCOURT Jr, P.I., CURI, R., BELLÓ, A.A., IRIGOYEN, M.C.C., BELLÓ-KLEIN, A., VIDOR, A.C., MIOTTO, C.G., OLIVEIRA, R.R., BRAVO, M.F.R., MORAES, R.B., SENNA, S.M. Effects of prostaglandins and nitric oxide on rat macrophage lipid metabolism in culture: implications for arterial wall-leucocyte interplay in atherosclerosis. *Biochemistry and Molecular Biology International*. V 46, (5): 1007-1018, 1998.
- BJOKERUD, B., BJOKERUD, S. Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 16: 416-424, 1996.
- BÖGER, R. H., BÖGER-BODE, S. M., BRANDES, R. P., PHIVTHONG-NGAM, L., BÖHME, M., FRÖLICH, J. C. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Circulation*, 96: 1282-1290, 1997.
- BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. Drugs used in the treatment of hyperlipoproteinemias. In GOODMAN GILMAN, A., RALL, T. W., NIES, A. S., TAYLOR, P. (eds). Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 8.ed, New York, *Pergamon Press*. P. 874-896, 1990.
- BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 52: 223-261, 1983.
- BROWN, M. S., HO, Y. K., GOLDSTEIN, J. L. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and reesterification of cytoplasmatic cholesteryl esters. *J. Biol. Chem.*, 255: 9344-9352, 1980.
- BUZZARD, C. J., PFISTER, S. L., CAMPBELL, W. B. Endothelium-dependent contractions in rabbit pulmonary artery are mediated by thromboxane A₂. *Circul. Res.*, 72: 1023-1034, 1993.

CASTELLI, W. P. Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham. *Am. J. Cardiol.*, v.70, p.3H-9H, 1992.

CHOI, A. M., FARGNOLI, J., CARLSON, S. G., HOLBROOK, N. J. Cell growth inhibition by prostaglandin A2 results in elevated expression of gadd 153 mRNA. *Exp. Cell. Res.*, 199: 85-89, 1992.

CURI, r., Bittencourt, P.i. Transfer of cholesterol from macrophages to lymphocytes in culture. *Biochemistry and Molecular Biology International*. V 44, (2): 347-362, 1997.

DAVIES, M. J. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis: the Paul Dudley White Lecture. *Circulation*. 94: 2013-2020, 1995.

DRAGER, L.F., BUCCHERI, V., SERRANO, C.V. Inflammation and apoptosis: effect on vascular remodeling in coronary atherosclerosis. *Rev Soc Cardiol*. 4: 569-576, 2002;

DUFFIELD, J.A. et al. Activated macrophage direct apoptosis and suppress mitosis of mesangial cells. *J. Immunol*. 164, 2110-2119, 2000;

ESTERBAUER, H., DIEBER-ROTHENEDER, M., WAEG, G., STIEGL, G., JURGENS, G. Biochemical, structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol*. 3(2): 77-92, 1990.

ESTERBAUER, H., GEBICKI, J., PUHL, H., JÜRGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biol. Med.*, v. 13, p. 341-390, 1992.

ESTERBAUER, H., LANG, J., ZADRAVEC, S., SLATER, T. F. Detection of malonaldehyde high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.*, v. 105, p. 319-328, 1984.

FLAVAHAN, N. A. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction – Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/Nitric Oxide activity. *Circulation*, 85: 1927-1938, 1992.

FREDERICK, J., SCHOEN, M. D. Vasos Sangüíneos. In: Robbins: Bases Patológicas das Doenças, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 415-450, 1996.

FULLER, J. N., SHIPLER, M. J., ROSE, G., JARRET, R. J., KEEN, N. Coronary heart disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitcomb Study. *Lancet*, v.1, p.1373-1379, 1980.

GANONG, W. F. Energy balance, metabolism and nutrition. In: *Review of Medical Physiology*. Connecticut: Appleton and Lange, p. 251-295, 1997.

GARDNER, H. W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biol. Med.*, v. 7, p. 65-86, 1989.

GLOCKZIN, S., von KNETHEN, A., SCHEFFNER, M., BRUNE, B. Activation of the cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome. *J Biol Chem*. 274: 19581-19586, 1999.

- GOTTLIEB, T. M., OREN, M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 8: 359-368, 1998.
- GRUNDY, S. M., VEGA, G. L. Plasma cholesterol responsiveness to saturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.*, 47(5): 822-824, 1988.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. C. M. Free Radicals in Biology and Medicine. 3th ed. *Oxford University Press*, 1999.
- HAN, D. K., HAUDENSCHILD, C. C., HONG, M. K. et al. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol.* 147: 267-277, 1995.
- HARADA, K., CHEN, Z., ISHIBASHI, S. et al. Apoptotic cell death in atherosclerotic plaques of hiperlipidemic knockout mice. *Atherosclerosis.* 135: 235-239, 1997.
- HASHEMI, S., PALMER, D. S., AYE, M. T., GANZ, P. R. Platelet-activating factor secreted by DDAVP-treated monocytes mediates von Willebrand factor release from endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, 154: 496-505, 1993.
- HEGSTED, D. M., MCGANDY, R. B., MYERS, M. L., STARE, F. J. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, 17: 281-295, 1965.
- HEVONOJA, T., PENTIKÄINEN, M. O., HYVÖNEN, M. T., KOVANEN, P. T. ALA-KORPELA, M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochimica et biophysica Acta.* 1488: 189-210, 2000.
- HIROAKI KOHNO. *Clinical Biochemistry.* Vol. 33. 4:243-253, 2000.
- HSIEH, R. J., KINSELLA, J. E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products and inhibition with emphasis on fish. *Adv. Food Nutr. Res.*, v. 33, p. 233-341, 1989.
- HUBERT, H. B., FEINLEIB, M., MCNAMARA, P. M., CASTELLI, W. P. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham heart study. *Circulation*, 67(5): 968-977, 1983.
- IHLING, C., HAENDELER, J., MENZEL, G., HESS, R. D., FRAEDRICH, G., SCHAEFER, H. E., ZEIHNER, A. M. Co-expression of p53 and MDM2 in human atherosclerosis: implications for the regulation of cellularity of atherosclerotic lesions. *J Pathol.* 185: 303-312, 1998.
- IHLING, C., MENZEL, G., WELLENS, E., MONTING, J. S., SCHAEFER, H. E., ZEIHNER, A. M. Topographical association between the cyclin-dependent kinases inhibitor p21, p53 accumulation, and cellular proliferation in human atherosclerotic tissue. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 17: 2218-2224, 1997.
- ISNER, J. M., KEARNEY, M., BORTMAN, S., et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 91: 2703-2711, 1995.
- JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biol. Med.*, v. 9, p. 515-540, 1990.

JOVIGE, S., CRISBY, M., THYBERG, J. et al. DNA fragmentation and ultra-structural changes of degenerating cells in atherosclerotic lesions and smooth muscle cells exposed to oxidized LDL in vitro. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 17: 2225-2231, 1997.

KANNEL, W. B. Role of blood pressure in cardiovascular disease. The Framingham Study. *Angiology*, v.26, p.1-14, 1975.

KEANEY, J. F. Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque oxidation and endothelial dysfunction. *Mol. Aspects Med.* 21(4-5): 99-166, 2000.

KIKUCHI, J., FURUKAWA, Y., KUBO, N., TOKURA, A., HAYASHI, N., NAKAMURA, M., MATSUDA, M., SAKURABAYASHI, I. Induction of ubiquitin-conjugating enzyme by aggregated low density lipoprotein in human macrophages and its implications for atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 20: 128-134, 2000.

KIM, J. A., BERLINER, J. A., NATARAJAN, R. D., NADLER, J. L. Evidence that glucose increases monocyte binding to human aortic endothelial cells. *Diabetes.* 43: 1103-1107, 1994.

KOCKX, M. M. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Atheroscler Tromb Vasc Biol.* 18: 1519-1522, 1998.

KUBO, N., KIKUCHI, J., FURUKAWA, Y., et al. Regulatory effects of aggregated LDL on apoptosis during foam cell formation of human peripheral blood monocytes. *FEBS Lett.* 409:177-182, 1997;

LIBBY, P. Molecular basis of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 91: 2844-2850, 1995.

LIBBY, P., GENG, Y. J., AIKAWA, M. et al. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol.* 7: 330-335, 1996.

LIMA, E. S., ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* Vol. 37. n. 3: 293-303, 2001.

LIU, MING-LIN. A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *American Physiological Society.* 0193: 1083-1091, 1999.

LOHRUM, M. A., VOUSDEN, K. H. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol.* 10: 197-202, 2000.

MALLE, E. & SATTLER, W. Platelets and the lipoproteins: native, modified and platelet modified lipoproteins. *Platelets* 5: 70-83, 1994.

MARTINET, W. KOCKX, M.M. Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. *Curr Opin Lipidol.* 12 (5):535-541, 2001;

MAZEL, D., PETRIE, H.T. Apoptosis in macrophages: implications in pathophysiology of atherosclerosis. *J. Exp. Méd.* 183, 1996;

McGILL, H. C. The cardiovascular pathology of smoking. *Am. Heart J.*, v.115, p.250-257, 1988.

MENEGHINI, R. A toxidade do oxigênio. *Ciência Hoje*. Vol. 5 número 28, 1987.

MOREL, D. W., HESSLER, J. R., CHISOLM, G. M. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res.* 24:1070-1076.

MUNRO, J. M., COTRAN, R. S. Biology of disease – The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Laboratory Investigation.* 58: 249-260, 1988.

NGUYEN, M. et al. Review of apoptosis. *J Biol Chem.* 269, 1994.

OKURA, Y., BRINK, M., ITABE, H. et al. Oxidized low-density lipoprotein particles is associated with apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 102:2680-2686, 2000;

OKURA, Y., BRINK, M., ITABE, H., SCHEIDEGGER, K.J., KALANGOS, A., DELAFONTAINE, P. Oxidized low-density lipoprotein is associated with apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *American Heart Association.* 102:2680-2686, 2000;

OORNI, K., PENTIKAINEN, M.O., ALA-KORPELA, M., KOVANEN, P.T. Aggregation, fusion and vesicle formation of low-density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J Lipid Res.* 41:1703-1714, 2000;

OREKHOV, A. N., TERTOV, V. V., SOBENIN, I. A., SMIRNOV, V. N., VIA, D. P., GUEVARA, J., GOTTO, A. M., MORRISET, J. D. Sialic acid content of human low density lipoproteins affect their interaction with cell receptors and intracellular lipid accumulation. *J. Lipid Res.* 33: 805-817, 1992.

PALINSKY, W., ROSENFELD, M. E., YLÄ-HERTTUALA, S., GURTNER, G. C., SOCHER, S. S., BUTLER, S. W., PARTHASARATHY, S., CAREW, T. E., STEINBERG, D., WITZUM, J. L. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 1372-1376, 1989.

PICARD, S., PARTHASARATHY, S., FRUEBIS, J., WITZTUM, J. L. Aminoguanidine inhibits oxidative modification of low density lipoprotein protein and the subsequent increase in uptake by macrophage scavenger receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 6876-6880, 1992.

PORTER, N. A., CALDWELL, S. E., MILLS, K. A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids.* V. 30, n. 4, p. 277-290, 1995.

QUINTAO, E.C., BOSCHCOV, P., KETELHUTH, D.F., GIDLUND, M., HARADA, L.M., CARVALHO, M.D. Macrophages take up triacylglycerol-rich emulsions at a faster rate upon co-incubation with native and modified LDL: An investigation on the role of natural chylomicrons in atherosclerosis. *J Cell Biochem.* 84(2):309-23, 2002.

RICOTE, M., HUANG, J., FAJAS, A., LI, A., WELCH, J., NAJIB, J., WIZTUM, J. L., AUWERX, J., PALINSKI, W., GLASS, C. K. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR- γ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *The National Academy Sciences*. 95: 7614-7619, 1998.

ROSENFELD, M. E., KHOO, J. C., MILLER, E., PARTHASARATHY, S. PALINSKI, W., WITZTUM, J. L. Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesion degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low-density lipoproteins, and contain oxidation-specific lipid protein adducts. *J. Clin. Invest.*, 87: 90-99, 1991.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *N. Engl. J. Med.*, 314: 488-500, 1986.

ROSS, R., GLONSET, J. A. The pathogenesis of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 295: 369-377, 1983.

RUSSEL, G. A. Deuterium – isotopo Effects in the Autoxidation of Aralkyl Hydrocarbons Mechanism of the Interaction of Peroxy Radicals, in: *J. Am. Chem. Soc.* 79: 3871 – 3880, 1957.

SAVILL, J., FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*: vol 407, 2000;

SCHIMITZ, G., HANKOWITZ, J., KOVACZ, E. M. Cellular processes in atherogenesis: potential targets of Ca^{2+} channel blockers. *Atherosclerosis*, 88: 109-132, 1991.

SCHMITZ, G., Hankowitz, J., Kovacs, E. M. Cellular processes in atherogenesis: potential targets of Ca^{2+} channel blockers. *Atherosclerosis*. 88: 32-109, 1991.

SHEIKH, M. S., FORNACE A. J. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol*. 182: 171-181, 2000.

SOUTHORN, P. & POWIS, G. Free radicals in medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reaction. *Clin. Proc*, (63): 381-389, 1988.

SPITELLER, P., SPITELLER, G. Strong dependence of lipid peroxidation product spectrum whether Fe^{2+}/O_2 or Fe^{3+}/O_2 is used as oxidant. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 1392, p. 23-40, 1998.

STANTON, L. W., WHITE, R. T., BRYANT, C. M., PROTTER, A. A., ENDERMAN, G. A macrophage Fc receptor for IgG is also a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, 267(31): 22446-22451, 1992.

STARY, H. C., CHANDLER, A. B., DINSMORE, R. E., FUSTER, V., GLAGOV, S., INSULL, W., ROSENFELD, M. E., SCHUARTZ, C. J., WAGNER, W. D., WISSLER, R. W. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis – a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92: 1355-1374, 1995).

STEINBERG, D., PARTHASARATHY, S., CAREW, T. E., KHOO, J. C., WITZTUM, J. L. The role of post-secretory structural modification of low density lipoproteins in atherogenesis. *N. Engl. J. Med.* 320: 915-924, 1989.

STEINEROVA, A., RACEK, J., STOZICKY, F., ZIMA, T., FIALOVA, L., LAPIN, A. Antibodies against oxidized LDL – theory and clinical use. *Physiol. Res.* 50(2): 131-141, 2001.

THIERY, J., STEIN, Y., STEIN, O., BRUEGEL, M., TEUPSER, D. HMG-CoA reductase inhibitors reduce adhesion of human monocytes to endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 289: 838-844, 2001.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1.456-62, 1995.

THYBERG, J., HEDIN, U. SJÖLUND, M., PALMBERG, L., BOTTGER, B. A. Regulation of differentiated properties of arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 10: 966-990, 1990.

VALKONEN, M. and KUUSI, T. Passive smoking induces atherogenic changes in low-density lipoprotein. *Circulation.* 97: 2012-2016, 1998.

VERLENGIA, R., HIRATA, R., HIRATA, M. Prevenção e controle da contaminação nas reações de amplificação de ácidos nucléicos. Newslab, edição 43, 2000;

YAO, P.M., TABAS, I. Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the fas pathway. *Journal of Biological Chemistry.* Vol. 275, 31:23807-23813, 2000;

YU, L. W., LATRIANO, L., DUNCAN, S., HARTWICK, R., WITY, G. High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and *trans-trans*-muconaldehyde. *Anal. Biochem.*, v. 156, p. 326-333, 1986.

YU, P. B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews.* 74(1): 139-162, 1994.