

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

**Claudia Vieira Marques**

**ESTUDO DO MECANISMO DA PROSTAGLANDINA A<sub>2</sub> NA INIBIÇÃO DA  
HMG-CoA REDUTASE EM CÉLULAS RELACIONADOS AO PROCESSO  
ATEROGÊNICO**

**Porto Alegre  
2012**

**Claudia Vieira Marques**

**ESTUDO DO MECANISMO DA PROSTAGLANDINA A<sub>2</sub> NA INIBIÇÃO DA  
HMG-CoA REDUTASE EM CÉLULAS RELACIONADOS AO PROCESSO  
ATEROGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul - UFRGS, como requisito parcial para obtenção  
do grau de Mestre.

**Orientador:** Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.

**Porto Alegre  
2012**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, esta força maravilhosa que move os mundos e está sempre ao nosso lado, não nos deixando fraquejar nunca, mesmo que Dele não tenha lembrado em todos os momentos.

À minha família, minha base, meus amores. Minhas avós, tios, tias, primos, primas, meu Mano e principalmente meus pais, Cesar e Neuza, que mesmo estando longe estavam sempre juntos no pensamento. Quando foi tão difícil caminhar, vocês estiveram comigo. Acolheram minhas queixas, meus sofrimentos, meus desânimos... Juntos sorrimos, juntos choramos e vocês talvez nem calculassem o alcance das suas palavras, de suas presenças junto a mim. Por isso, especialmente com vocês, quero compartilhar minha felicidade. A vocês, o sonho, o abraço, o beijo, essa vitória!

Ao meu namorado, Rodrigo Pizzuti por todo carinho, atenção, paciência, força, compreensão, companheirismo e até por ser meu “iniciação científica” nos feriados. Tenho certeza que tudo seria muito mais difícil se você não estivesse ao meu lado, eu te amo!

Aos meus colegas de laboratório: Tatiana, Gustavo, Éder, Eber, Aline, Rossana, Thiago, Sofia, Guilherme, D. Miriam, Lino, D. Ritinha, Vinícius, Mariana, Antônio, Mirna, Maciel, Augustus, Patrícia Bock, Maycon e Bolívar. Obrigada por toda ajuda, apoio e por me acolherem neste grupo.

Aos amigos-irmãos que fiz nessa caminhada: Ana, Nelson, Paty Dias e Cinthia. Com vocês aprendi muito mais do que técnicas de laboratório, aprendi o valor de uma verdadeira amizade.

A todos os colegas da turma do mestrado, que sempre foram muito acolhedores. Em especial, aos colegas Patrícia Borba Martiny e Bruno Arbo pela ajuda nos experimentos e pelo “apoio moral”.

Aos demais amigos que mesmo de longe estavam sempre na torcida.

A todos os professores do PPG Fisiologia, em especial à professora Maria Flávia Marques Ribeiro, por gentilmente ter aberto as portas do seu laboratório e por toda a força nessa reta final.

Meu sincero agradecimento ao professor Paulo Ivo, meu orientador, por ter me recebido em seu laboratório e ter embarcado comigo nesse sonho. Obrigada pelas orientações, conselhos e puxões de orelha.

E por fim, quero agradecer imensamente ao meu “pai” da ciência, professor Volnei de Almeida Teixeira, meu orientador na graduação. Professor, obrigada por todos os ensinamentos nestes tantos anos, não só ensinamentos científicos, mas pelas lições de vida. Com toda certeza teu esforço valeu a pena e teu exemplo será sempre seguido!

*“Cada um de nós compõe a sua história,  
cada ser em si carrega o dom de ser capaz,  
e ser feliz!”*

Almir Sater

## RESUMO

A homeostase intracelular do colesterol é mantida, em células de mamíferos, por meio de uma série de mecanismos, porém pode haver uma ruptura deste balanço intracelular podendo levar ao desenvolvimento de doenças, como a lesão aterosclerótica que hoje em dia está acometendo grande parte da população mundial. A enzima HMG-CoA redutase, que possui cisteínas reativas em sua estrutura, pode ser alvo de estudos sobre o bloqueio do processo aterosclerótico, por meio de prostaglandinas da família das ciclopentenônicas (CP-PGs), particularmente a prostaglandina A<sub>2</sub> (PGA<sub>2</sub>), que desviam completamente a síntese *de novo* de colesterol no sentido da síntese de fosfolípidos em macrófagos/*foam cells* e outras preparações de macrófagos inflamatórios. Dessa forma o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da PGA<sub>2</sub> sobre a HMG-CoA redutase, em tipos celulares relacionados ao processo aterogênico, demonstrando seu mecanismo de ação por ligação covalente a cisteínas reativas desta enzima. Utilizaram-se macrófagos U937 que foram incubados ou não com LDL oxidada, tornando-se-os *foam cells*. As células foram tratadas com dose não tóxica (1 µM) de PGA<sub>2</sub> ou com mistura controle por um período de 24 h. Outros grupos de macrófagos U937 e *foam cells* foram tratados com PGA<sub>2</sub> biotinilada (com ou sem ditioneitol, DTT 10 mM) na presença ou ausência de PGA<sub>2</sub> (10 µM e 20 µM), por 2 h e 6 h. Foi feito também um estudo da atividade da HMG-CoA, através de kit específico e curvas de crescimento celular em resposta a PGA<sub>2</sub>. Nossos resultados mostraram aumento na imunodeteção de HMG-CoA redutase em macrófagos, quando tratados com LDL oxidada e tratados com PGA<sub>2</sub> biotinilada por 2 h e 6 h, sendo que o tratamento com DTT produziu uma dramática redução na incorporação da mesma à enzima. A PGA<sub>2</sub> foi capaz de reduzir a atividade da HMG-CoA em até 86,4% nas doses utilizadas. Macrófagos e *foam cells* tratados com PGA<sub>2</sub> (1 µM) tiveram um aumento na proliferação celular quando comparados com aqueles que não receberam tratamento ou que foram tratados com doses mais altas da PGA<sub>2</sub>. Nossos achados contribuem para esclarecer o mecanismo pelo qual ocorre a ação da PGA<sub>2</sub> na reversão do processo aterosclerótico via inibição da enzima HMG-CoA redutase via ligação covalente nas cisteínas reativas desta enzima.

## ABSTRACT

The intracellular cholesterol homeostasis is maintained in mammalian cells by a variety of mechanisms, although there may be intracellular breakdown of this balance that can lead to the development of diseases such as atherosclerotic lesions that are nowadays mostly affecting the population worldwide. The enzyme HMG-CoA reductase, which has critical reactive cysteines in its structure, may be target anti-atherosclerotic treatments, once cyclopentenonic prostaglandins (CP-PGs), particularly prostaglandin A<sub>2</sub> (PGA<sub>2</sub>), which completely diverts *de novo* synthesis of cholesterol toward the direction of phospholipid synthesis in macrophages/*foam cells* in macrophage/*foam cells* and other inflammatory macrophage preparations. Thus the objective of this study was to investigate the effect of PGA<sub>2</sub> on the HMG-CoA reductase in cell types related to the atherogenic process, demonstrating its mechanism of action by covalent binding to reactive cysteines of this enzyme. Macrophages U937 were used were incubated or not with LDL oxidized, making-up the *foam cells*. Cells were treated with non-toxic dose of PGA<sub>2</sub> (1 μM) or with a mixture control for a period of 24 h. Other groups and U937 macrophage *foam cells* were treated with biotinylated PGA<sub>2</sub> (with or without dithiothreitol, DTT, 10 mM) in the presence or absence of PGA<sub>2</sub> (10 mM and 20 mM) for 2 h and 6 h. Was also made a study of the activity of HMG-CoA through kit specific and cell growth curves in response to PGA<sub>2</sub>. Our results showed the increase in immunodetection of HMG-CoA reductase into macrophages, when treated with LDL oxidized and treated with biotinylated PGA<sub>2</sub> for 2 h and 6 h, and the DTT treatment produced a dramatic reduction the incorporation of the same enzyme. The PGA<sub>2</sub> was able to reduce the activity of HMG-CoA to 86.4% at the doses used. Macrophages and *foam cells* treated with PGA<sub>2</sub> (1 mM) had an increase in cell proliferation compared with those receiving no treatment or were treated with higher doses of PGA<sub>2</sub>. Our findings help to clarify the mechanism by which the action occurs in the PGA<sub>2</sub> reversal of atherosclerosis by inhibiting the enzyme HMG-CoA reductase by way of covalent bond in the reactive cysteines of this enzyme.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
SUMÁRIO .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
LISTA DE FIGURAS .....	13
INTRODUÇÃO .....	14
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1. ATEROSCLEROSE .....</b>	<b>16</b>
1.1.1. <i>INCIDÊNCIA DA DOENÇA</i> .....	16
1.1.2. <i>FATORES DE RISCO</i> .....	16
1.1.3. <i>METABOLISMO DO COLESTEROL</i> .....	17
1.1.4. <i>PATOLOGIA</i> .....	19
<b>1.2. O PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA ATEROSCLEROSE .....</b>	<b>20</b>
1.2.1. <i>DIFERENCIAÇÃO DOS MONÓCITOS</i> .....	21
1.2.2. <i>FUNÇÕES DOS MACRÓFAGOS E A FORMAÇÃO DE FOAM CELLS</i> .....	22
<b>1.3. PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENÔNICAS E ATEROSCLEROSE .....</b>	<b>23</b>
1.3.1. <i>FORMAÇÃO DAS CP-PGs</i> .....	23
1.3.2. <i>A QUÍMICA DAS CP-PGs</i> .....	24
1.3.3. <i>EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTI-COLESTEROGÊNICO DAS CP-PGs</i> .....	26
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1. GERAL .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2. ESPECÍFICOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS U937 .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS FOAM CELLS .....</b>	<b>31</b>
<b>3.5. DISPOSIÇÃO FINAL DOS RESÍDUOS .....</b>	<b>32</b>
<b>3.6. VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS .....</b>	<b>32</b>
<b>3.7. OXIDAÇÃO DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL) .....</b>	<b>32</b>
<b>3.8. REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DA PLACA DE CULTURA DE MACRÓFAGOS/FOAM CELLS E GRUPOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>34</b>



3.9. REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DA PLACA DE CULTURA DE MACRÓFAGOS/ <i>FOAM CELLS</i> E GRUPOS EXPERIMENTAIS COM $PGA_2$ BIOTINILADA .....	35
3.10. DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	38
3.11. IMUNOPRECIPITAÇÃO E ELETROFORESE SDS-PAGE PARA HMG-CoA REDUTASE DE MACRÓFAGOS .....	38
3.12. MEDIDA DA ATIVIDADE DA HMG-CoA REDUTASE .....	41
3.13. CURVA DE CRESCIMENTO DE MACRÓFAGOS U937 E <i>FOAM CELLS</i> EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM $PGA_2$ .....	41
3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
3.15. APOIO FINANCEIRO .....	42
4. RESULTADOS .....	43
4.1. IMUNODETECÇÃO DA ENZIMA HMG-CoA REDUTASE EM MACRÓFAGOS OU <i>FOAM CELLS</i> TRATADOS COM $PGA_2$ POR 24 h .....	43
4.2. IMUNOPRECIPITAÇÃO DA ENZIMA HMG-CoA REDUTASE EM MACRÓFAGOS OU <i>FOAM CELLS</i> TRATADOS COM $PGA_2$ FRIA E $PGA_2$ BIOTINILADA POR 2 h OU 6 h .....	44
4.3. MEDIDA DA ATIVIDADE DA HMG-CoA REDUTASE .....	48
4.4. CURVAS DE CRESCIMENTO DE MACRÓFAGOS E <i>FOAM CELLS</i> TRATADAS COM $PGA_2$ EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES .....	49
DISCUSSÃO .....	51
CONCLUSÃO .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

15d-PGJ <sub>2</sub> .....	15-Desóxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J <sub>2</sub>
ACAT.....	acil CoA: colesterol acil transferase
Acetil-CoA.....	acetil- coenzima A
BHT.....	hidroxibutiltolueno
BPS.....	Beraporst sódico
BSA .....	albumina sérica bovina
BSO .....	butionina-sulfoximina
CEH.....	colesteril-éster hidrolase
CETP.....	proteína de transferência de ésteres de colesterol
COX .....	ciclo-oxigenase
CP-PG .....	prostaglandina ciclopentenônica
CP-PGs .....	prostaglandinas ciclopentenônicas
DTT.....	ditiotreitól
ECL .....	do inglês, Enhanced Chemiluminescence
EDTA .....	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELAM-1.....	molécula de adesão de leucócito endotelial (do inglês, endothelial leukocyte adhesion molecule-1)
ELISA.....	do inglês, enzyme-linked immunosorbent assay
HDL.....	lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA.....	3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA
HSP.....	proteína de choque térmico
ICAM-1.....	molécula de adesão intracelular (do inglês, intracellular adhesion molecule-1)
IDL.....	lipoproteína de densidade intermediária
IGF-b1.....	do inglês, insulin-like growth factor 1
I $\kappa$ B .....	do inglês, Inhibitor of nuclear factor $\kappa$ B
IL-1 $\beta$ .....	interleucina- 1 beta
IL-1.....	interleucina- 1
IL-6.....	interleucina- 6
IL-10.....	interleucina- 10
IL-12.....	interleucina- 12

IP.....	imunoprecipitação
LCAT.....	lecitina-colesterol:aciltransferase
LDL.....	lipoproteína de baixa densidade
LDLox.....	lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLR.....	receptor de LDL
M-CSF.....	do inglês, macrophage colony stimulating factor
MSF-7.....	do inglês, Michigan Cancer Foundation - 7
NF-κB.....	fator nuclear kappa B (do inglês, nuclear factor-κB)
NO.....	óxido nítrico
PBS.....	do inglês, Phosphate-buffered saline
PDGF.....	fator de crescimento derivado de plaquetas
PGA.....	prostaglandina A
PGA <sub>1</sub> .....	prostaglandina A <sub>1</sub>
PGA <sub>2</sub> .....	prostaglandina A <sub>2</sub>
PGE.....	prostaglandina E
PGE <sub>2</sub> .....	prostaglandina E <sub>2</sub>
PGD.....	prostaglandina D
PGD <sub>2</sub> .....	prostaglandina D <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub> .....	prostaglandina F <sub>2α</sub>
PGJ <sub>2</sub> .....	prostaglandina J <sub>2</sub>
PG.....	prostaglandina
PGs.....	prostaglandinas
PKC.....	proteína quinase C
PMSF.....	fluoreto de fenil-metil-sulfonila
PPAR.....	do inglês, peroxisome proliferator-activated receptor
SDS.....	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE.....	poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SFB.....	soro fetal bovino
TBA.....	ácido tiobarbitúrico
TBARS.....	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA.....	ácido tricloroacético
TNFα.....	fator de necrose tumoral-α

VCAM-1..... molécula de adesão celular vascular (do inglês, vascular cellular adhesion molecule-1)

VLDL..... lipoproteínas de muito baixa densidade

$\Delta^{12}$ -PGJ<sub>2</sub>..... prostaglandina  $\Delta^{12}$ J<sub>2</sub>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Formação das prostaglandinas ciclopentenônicas (família das  $PGA_2$  e  $PGJ_2$ ).

**Figura 2:** Centros eletrofílicos de um anel ciclopentenônico (uma carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada e a carbonila da cetona).

**Figura 3:** Ressonância que ocorre entre os centros eletrofílicos de um anel ciclopentenônico.

**Figura 4:** Ação de nucleófilos em centros eletrofílicos de um anel ciclopentenônico.

**Figura 5:** Adição de Michael.

**Figura 6:** Representação esquemática da distribuição experimental de macrófagos U937 ou *foam cells*.

**Figura 7:** Representação esquemática da distribuição experimental de macrófagos U937 ou *foam cells*.

**Figura 8:** Imunoconteúdo da enzima HMG-CoA redutase em macrófagos U937/*foam cell* controles e tratados por 24 h com  $PGA_2$  1  $\mu M$ , e controles negativos.

**Figura 9:** Imunoprecipitação da enzima HMG-CoA redutase em macrófagos U937/*foam cell* (*ox-LDL*) e controles tratados por 2 h com  $PGA_2$  biotinilada na presença e ausência de DTT 10 mM,  $PGA_2$  biotinilada (10  $\mu M$  final) e com excesso de  $PGA_2$  a 10  $\mu M$  e 20  $\mu M$ .

**Figura 10:** Imunoprecipitação da enzima HMG-CoA redutase em macrófagos U937/*foam cell* (*ox-LDL*) e controles tratados por 2 h com  $PGA_2$  biotinilada na presença e ausência de DTT 10 mM,  $PGA_2$  biotinilada (10  $\mu M$  final) e com excesso de  $PGA_2$  a 10  $\mu M$  e 20  $\mu M$ .

**Figura 11:** Medida da atividade da HMG-CoA redutase através de kit específico (Sigma), comparando inibidor conhecido (pravastatina) com  $PGA_2$  (1  $\mu M$  e 10  $\mu M$ ).

**Figura 12:** Curvas de crescimento de macrófagos U937 (A) e *foam cells* (B), sem  $PGA_2$  e com  $PGA_2$  nas concentrações 1  $\mu M$ , 10  $\mu M$  e 20  $\mu M$ , nos tempos 0 h, 24 h e 48 h.

## INTRODUÇÃO

A homeostase intracelular do colesterol é mantida, em células de mamíferos, por meio de uma série de mecanismos que levam ao balanço entre o *input* (síntese *de novo* de lipídios a partir do acetil-CoA e captação a partir de lipoproteínas) e o *output* (efluxo) de colesterol pelas células (Goldstein & Brown, 1990). Por outro lado, pode haver uma ruptura deste balanço intracelular que levará ao acúmulo de colesterol que é uma das principais características observadas nas células que participam do desenvolvimento de algumas doenças, como a lesão aterosclerótica (Goldstein & Brown, 1977; Ross, 1995), que hoje em dia está acometendo grande parte da população mundial, o que contribui para o aumento anual de mortes por doenças cardiovasculares (Moreno & Mitjavila, 2003).

De um total de 58 milhões de mortes em 2005 decorrentes de causas diversas, as doenças crônicas foram responsáveis por 35 milhões. E, dentre elas, as doenças cardiovasculares representam a maior porcentagem. Projeta-se para os próximos anos um aumento de 17% nas mortes devido a doenças crônicas. Isto significa que, das 64 milhões de pessoas que estima-se que morrerão em 2015, 41 milhões morrerão por essa causa, a menos que medidas urgentes sejam tomadas (WHO, 2005).

Visto que desbalanços no metabolismo lipídico em geral são características marcantes do processo de aterosclerose e junto com a hiperlipidemia estão fortemente associados ao desenvolvimento dessa doença, o mecanismo pelo qual as células participantes deste tipo lesão acumulam lipídios em seu interior permanece sendo foco de pesquisas nesta área.

Participam neste processo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas que tem capacidade de estimular a formação de *foam cells* (células em espuma) (Schmitz *et al.*, 1991; Gesquière *et al.*, 1997), enquanto que outro tipo de lipoproteínas, aquelas de alta densidade (HDL) oxidadas podem impedir a saída de colesterol a partir das células (Gross & Wolin, 1995) o que compromete o transporte do colesterol ao fígado, favorecendo, assim, o acúmulo de colesterol na periferia extra-hepática (Goldstein & Brown, 1990).

Da mesma forma, uma deficiente capacidade de exportação de lipídios para o meio extracelular pelas células pode levar ao acúmulo de colesterol e

ésteres de colesterol nos tipos celulares envolvidos no processo de aterogênese. A enzima HMG-CoA, redutase que é a enzima chave na síntese de colesterol, possui cisteínas reativas em sua estrutura, podendo ser um possível local de regulação ou inibição por fatores celulares. Portanto, esta enzima pode ser alvo de estudos sobre o bloqueio do processo aterosclerótico (Gutierrez *et al.*, 2008).

Verificou-se que, *in vivo*, as prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs), particularmente da família A, desviam completamente a síntese *de novo* de colesterol no sentido da síntese de fosfolípidos em macrófagos/*foam cells* e outras preparações de macrófagos inflamatórios. Além disso, estas CP-PGs reduzem dramaticamente a importação de colesterol e ésteres de colesterol a partir dos meios de cultura enquanto que a exportação desses lípidos mostrou-se aumentada, na presença desse eicosanóide (Senna *et al.*, 1998). Os efeitos celulares, mais especificamente da  $PGA_2$  estão relacionados com importantes modificações no estado redox, no metabolismo da glutatona, no bloqueio de NF- $\kappa$ B e no aumento da expressão da proteína HSP70, mostrando ter fundamental relevância na citoproteção, como já demonstrado por estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa. Fundamentalmente, estes efeitos ocorrem somente em células oxidadas (propícias ao desenvolvimento do processo aterosclerótico), não prejudicando o metabolismo de células não submetidas à exposição com LDL oxidada.

Porém, a confirmação do mecanismo pelo qual ocorre a ação da  $PGA_2$  na reversão do processo aterosclerótico via inibição da enzima HMG-CoA redutase deve passar pelo estudo da sua capacidade de ligação covalente nas cisteínas reativas desta enzima. Faz-se necessário a confirmação de nossos resultados preliminares, para que possamos de alguma forma, dispor de uma nova classe de drogas bloqueadoras da síntese de colesterol não estatinas.

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1. ATEROSCLEROSE

#### 1.1.1. INCIDÊNCIA DA DOENÇA

As doenças cardiovasculares são a maior causa de morte no mundo. Estatísticas da Organização Mundial de Saúde indicam que morrem mais pessoas anualmente destas doenças do que de qualquer outra doença. Em 2004, cerca de 17,1 milhões de pessoas morreram devido a essa causa, o que representa quase 29% de toda a mortalidade global. Destes, 7,2 milhões foram devido à doença coronária e 5,7 milhões foram por acidente vascular cerebral. Com base nestes dados, que estão sempre em expansão, a Organização Mundial de Saúde estima que até 2030 quase 23,6 milhões de pessoas morrerão de doenças relacionadas com doenças cardiovasculares em todo o mundo (WHO, 2011).

A principal causa de doença cardíaca, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral na sociedade ocidental é a aterosclerose, uma doença crônica inflamatória caracterizada pelo acúmulo de lipídios e de colesterol dentro das paredes das artérias de grande e médio calibre (Lusis, 2000). Estes fatos apontam a aterosclerose como forte contribuinte para a principal causa de morte no planeta e a magnitude das estatísticas da Organização Mundial de Saúde enfatiza a importância da investigação científica relacionada à aterosclerose e possíveis alvos terapêuticos (McLaren *et al.*, 2011).

#### 1.1.2. FATORES DE RISCO

A aterosclerose tem uma etiologia muito complexa e tem uma abundância de fatores que podem contribuir para o aparecimento e progressão dessa doença. Estudos epidemiológicos nos últimos 50 anos revelaram inúmeros fatores de risco para aterosclerose. Estes fatores podem ser agrupados em componentes genéticos, que envolvem múltiplos genes e aqueles que são fatores ambientais (Lusis, 2000).

Tanto a predisposição genética como os fatores ambientais e a interação entre eles têm sido relacionados com o aumento do risco de um indivíduo desenvolver aterosclerose. A predisposição genética pode ser comumente



ligada à história familiar de doença cardiovascular e, normalmente, confere aos membros da família um risco elevado de desenvolver a doença. Fatores ambientais, por outro lado são geralmente relacionados ao estilo de vida do paciente. Os principais fatores que se enquadram nessa classificação envolvem uma dieta contendo elevados níveis de gordura, o tabagismo e falta de exercício físico (Lusis, 2000).

### 1.1.3. METABOLISMO DO COLESTEROL

O colesterol é fisiologicamente imprescindível ao organismo, pois a partir dele são formadas substâncias importantes para a sobrevivência dos seres, como os hormônios esteróides, a vitamina D, os ácidos biliares e as lipoproteínas (Goldstein & Brown, 1990). Além disto, o colesterol faz parte da bicamada lipídica das membranas celulares (Stryer, 1996).

É sintetizado no retículo endoplasmático a partir do acetato em uma série de reações enzimáticas (Ikonen, 2006). O passo limitante na biossíntese do colesterol é a reação catalisada pela 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-redutase (HMG-CoA redutase), que converte a HMG-CoA em mevalonato. Uma vez sintetizado, o colesterol pode ser transportado para os tecidos periféricos ou para o fígado, ou pode acumular-se em reservas intracelulares (Ikonen, 2006). Para armazenamento intracelular, o colesterol sofre conversão em éster de colesteril, através de acilação do grupo hidroxila pela enzima Acil-CoA: colesterol aciltransferase-1 (ACAT-1) (Chang *et al.*, 2001).

O colesterol é classicamente transportado na corrente sanguínea, como uma partícula lipoprotéica solúvel em água. Dois tipos de transporte de colesterol ocorrem no corpo humano: o transporte direto - em que o colesterol é transportado do fígado para os tecidos, nas VLDL, IDL e LDL (lipoproteínas de muito baixa densidade, lipoproteínas de densidade intermediária e lipoproteínas de baixa densidade, respectivamente) – e o transporte reverso – em que o colesterol é transportado dos tecidos para o fígado, nas HDL (lipoproteínas de alta densidade). As HDL captam colesterol de células da periferia extra-hepática, de quilomicrons remanescentes e de VLDL remanescentes (IDL) e o esterificam com o auxílio de uma enzima plasmática associada às partículas de LDL, a LCAT (lecitina:colesterol aciltransferase). Os ésteres de colesterol formados pela ação da LCAT sobre o colesterol livre e os

ácidos graxos provenientes de moléculas de fosfatidilcolina presentes na própria HDL são, então, transferidos para partículas de VLDL, IDL e LDL, pela ação de outra enzima plasmática, a proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP). As IDL e as LDL são catabolizadas no fígado depois da internalização via receptores de LDL. Desta maneira, as LDL nativas que circulam pelo sangue, são removidas pelos tecidos para serem utilizadas, ao passo que o colesterol proveniente de morte e renovação celular, entre outros, vindo dos tecidos, é carregado pela HDL de volta ao fígado, que é capaz de eliminar o excesso de colesterol como ácidos biliares ou colesterol biliar. Desta forma, o hepatócito é responsável por manter este balanço, alterando o fluxo de colesterol através de sua síntese endógena e da síntese, da secreção e da captação de lipoproteínas, além da conversão de colesterol em ácidos graxos e da conversão reversível do excesso de colesterol em ésteres de colesterol (Ghosh *et al.*, 1998). Claro que este equilíbrio só pode ser mantido até dado limite fisiológico; uma vez este sendo ultrapassado, tem-se o início de doença vascular.

A literatura descreve que dietas ricas em ácidos graxos podem influenciar vários aspectos do metabolismo do colesterol, incluindo a síntese hepática de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e o *clearance* da LDL a partir da circulação (Lee & Carr, 2004). Um dos determinantes da aterosclerose na população parece ser a modificação do estado de equilíbrio da concentração total de colesterol e triglicerídeos no plasma, uma vez que dietas ricas destes últimos regulam a concentração de LDL (Xie *et al.*, 2002). A quantidade de colesterol no hepatócito influencia a secreção de ésteres de colesterol como componente das lipoproteínas (Ghosh *et al.*, 1998); uma vez que há o aumento do colesterol, o fígado enviará mais colesterol via LDL para a grande circulação (transporte direto).

A expressão de receptores para LDL é regulada pelo conteúdo intracelular de colesterol. Temos dois tipos de regulação desse processo, a *up-regulation*, na qual há um aumento do número de receptores de LDL nas superfícies celulares, em resposta a um aumento da necessidade de colesterol pelos tecidos, acarretando assim, um aumentando da captação de LDL no plasma. Porém, quando os níveis de colesterol no sangue estão elevados, seja devido à dieta ou a algum tipo de doença, como diabetes ou

hipercolesterolemia familiar, as células irão diminuir o número de receptores para LDL nativa presentes nas suas superfícies, o que é conhecido como *down-regulation*, dessa maneira pode-se regular a produção interna de substâncias a partir do colesterol (Goldstein & Brown, 1990).

#### 1.1.4. PATOLOGIA

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídios e elementos fibrosos nas artérias de grande calibre (Lusis, 2000). Esse processo de aterogênese é caracterizado por uma série de desordens nas túnicas íntima e média das paredes vasculares. Dentre estas alterações podemos citar o aumento de permeabilidade do endotélio, a infiltração de monócitos, seguida de proliferação de células musculares lisas adjacentes, agregação plaquetária e acúmulo de lípidos,  $Ca^{2+}$  e ainda de componentes da matriz extracelular (Wick *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 1991).

Uma série de eventos ocorre para que a lesão aterosclerótica se estabeleça, e a sequência desses eventos ainda não está completamente entendida, no entanto, existe um consenso em torno da hipótese que se chama de "resposta a injúria", onde a aterosclerose seria decorrente de alterações provocadas nas células endoteliais por estímulos como hipercolesterolemia, ativação imunológica, hipertensão e anóxia, entre outros (Ross, 1986). Assim, em resposta à ruptura da integridade do endotélio, ocorre o recrutamento e ativação de vários tipos celulares que, em conjunto darão origem ao quadro aterogênico.

No início da lesão, devido a interações celulares com o endotélio que não está mais em sua forma íntegra, macrófagos, plaquetas, neutrófilos e linfócitos liberam alguns fatores de crescimento que são quimiotáticos, podendo atrair outros tipos celulares ao local da lesão e mitogênicos para as células da musculatura lisa vascular (Schmitz *et al.*, 1991). As células da musculatura lisa vascular, por sua vez, irão migrar da camada média para a íntima vascular aonde irão se diferenciar em células com características secretórias que se proliferam, produzem fatores de crescimento e ainda liberam componentes de matriz extracelular que induzem ativação e adesão celulares (Thyberg *et al.*, 1990). Portanto, a aterogênese é um fenômeno típico de relações intercelulares e, neste contexto, os macrófagos são as células que

ocupam uma posição central, porque estes participam de praticamente todas essas interações, agindo como célula mediadora para a instalação da aterosclerose.

Uma das respostas da parede dos vasos a estímulos nocivos/aterogênicos, como por exemplo, a hiperlipidemia e a hipertensão arterial é a produção de autacoides, que são compostos endógenos que medeiam a inflamação, derivados do endotélio, como as prostaglandinas (PGs). Neste sentido, altos níveis de estresse de cisalhamento na parede do vaso (*shear stress*), o aumento na produção de citocinas como a interleucina 1 (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) a partir de macrófagos, que desempenham papel fundamental na fase aguda da inflamação, bem como o estresse oxidativo na parede arterial (provocado, por exemplo, pela hipertensão arterial) levam à ativação do NF- $\kappa$ B, que dispara a transcrição de uma grande variedade de genes tanto nas células endoteliais quanto nas células musculares lisas, precipitando a transcrição de fatores de crescimento, outras citocinas, moléculas de adesão intercelulares e fatores de transcrição relacionados ao processo de proliferação celular (Griendling & Alexander, 1996; Collins *et al.*, 1995; Resnick & Gimbrone, 1995).

Desta ativação metabólica irão se originar transformações celulares que modificarão os fenótipos das células vasculares transformando-as em células ativadas com características sintetizantes e proliferativas, que são as principais alterações encontradas na aterosclerose e na doença vascular hipertensiva (Belló-Klein *et al.*, 2001). Assim, a ativação do NF- $\kappa$ B mediada pelo estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação de LDL e antígenos virais e bacterianos desempenha papel primordial no desenvolvimento da aterosclerose.

## **1.2. O PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA ATEROSCLEROSE**

Pode-se observar, nas camadas subendoteliais das artérias, a diferenciação dos monócitos em macrófagos, que apresentam a habilidade de acumular grandes quantidades de lípidos intracelularmente, que chamamos de *foam cells* ou células espumosas, recebendo este nome devido à morfologia característica que passam a apresentar, cheias de gordura em seu interior.

Essas *foam cells* acumulam grandes quantidades de colesterol e ésteres de colesterol que participam de um ciclo de hidrólise e reesterificação de maneira que o excesso de colesterol possa ser secretado ou utilizado para síntese de membranas celulares (Brown & Goldstein, 1983; Brown *et al.*, 1980; Rosenfeld *et al.*, 1991). Entretanto, talvez, uma das características mais importantes destes macrófagos na gênese da placa aterosclerótica, seja 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).

Quando os macrófagos aderem à matriz extracelular de células endoteliais irá ocorrer a produção de superóxido e colesterol oxidado, além de regular os mecanismos envolvidos na adesão e o próprio estado de ativação geral de macrófagos (Gudewicz & Rewin, 1991; Jang *et al.*, 1993; Gudewicz *et al.*, 1994). Além disso, macrófagos expostos a LDL oxidadas tem capacidade de produzir citocinas que irão induzir nas células endoteliais a expressão de alguns receptores (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, integrinas, caderinas) para moléculas de adesão da matriz extracelular (fibronectina, laminina, trombosposina, actina) que estão relacionadas com o recrutamento de outras células imunológicas e de plaquetas para a lesão endotelial (Frostegård *et al.*, 1993; Aznar-Salatti *et al.*, 1991).

Embora *foam cells* apresentem poucos receptores para LDL nativas, estas células possuem grande quantidade de receptores de remoção ou *scavenger*, que reconhecem e internalizam apenas LDL modificadas (Brown & Goldstein, 1983). LDL modificadas exercem uma série de efeitos sobre monócitos e outras células que participam da lesão aterosclerótica, estando diretamente implicadas na diferenciação de monócitos para o fenótipo *foam cell* (Frostegård *et al.*, 1990; Orekhov *et al.*, 1991). Além disso, LDL modificadas, apesar de eficientemente internalizadas, são pouco metabolizadas por macrófagos, levando a um dramático aumento nas concentrações intracelulares de colesterol livre (Roma *et al.*, 1992).

### 1.2.1. DIFERENCIAÇÃO DOS MONÓCITOS

Como discutido, uma vez na íntima arterial, os monócitos podem diferenciar-se em macrófagos ou células dendríticas, dependendo do sinal da

citocina recebido e o principal facilitador da sua diferenciação em macrófagos é M-CSF (Li & Glass, 2002; Bobryshev, 2006). Neste ponto, muitos marcadores de superfície importantes na aterosclerose, tais como receptores de *scavenger*, começam a ser expressos nos macrófagos. A população de macrófagos presentes nas placas ateroscleróticas também é heterogênea, semelhante às populações de monócitos.

A diferenciação de monócitos pode produzir dois tipos principais de macrófagos: os promotores de inflamação, macrófagos ativados classicamente (M1) e resolvidores de inflamação, alternativamente ativados (M2) (Shimada, 2009). Macrófagos M1 tendem a produzir sinais pró-inflamatórios pela secreção de citocinas tais como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 (Tabas, 2010; Shimada, 2009; Martinez, *et al.*, 2009). Por outro lado, os macrófagos M2 produzem sinais anti-inflamatórios pela secreção de citocinas tais como IL-10 e TGF- $\beta$ 1, que pode alternar macrófagos M1 em macrófagos M2. Ambos macrófagos M1 e M2 podem residir nas lesões ateroscleróticas e um desequilíbrio na razão de M1/M2 pode contribuir para o desenvolvimento da placa e prejudicar a resolução da inflamação (Tabas, 2010).

### 1.2.2. FUNÇÕES DOS MACRÓFAGOS E A FORMAÇÃO DE FOAM CELLS

Na aterosclerose, macrófagos têm um grande número de funções, porém seu papel principal é a formação de *foam cells*.

O acúmulo de lipídeos em macrófagos e sua transformação em *foam cells* é a principal etapa no desenvolvimento inicial da aterosclerose. O colesterol que se acumula nas *foam cells* é derivado, principalmente da LDL plasmática. A captação de LDL nativa, via receptor de LDL, é regulada pelo conteúdo intracelular de colesterol. Entretanto, um aumento na captação de LDL parece ser dependente de diferentes mecanismos, incluindo aumento da afinidade de lipoproteínas pelo receptor de LDL, e também captação de lipoproteína agregada por fagocitose, ou também aumento da captação de lipoproteínas modificadas por receptores de *scavenger*, os quais não são regulados pelo conteúdo intracelular de colesterol (Fuhrman, *et al.*, 1997).

Muitas das funções que o macrófago exerce dependem de sua composição lipídica, entre essas funções estão a percepção e transdução de

sinais, a fagocitose, a síntese de lipídios oxidados e outros mediadores inflamatórios, como os eicosanoides (Oliveros *et al.*, 2004). Uma vez que as células que compõem o sistema imune humano, como o macrófago, devem ter a capacidade de proliferação frente ao dano tecidual, eles precisam ter a capacidade de lipogênese, que passa a ser necessária e essencial para a proliferação de células, porque sabe-se que a biossíntese de lipídios precede o início da divisão celular (Homem de Bittencourt Jr. *et al.*, 1994).

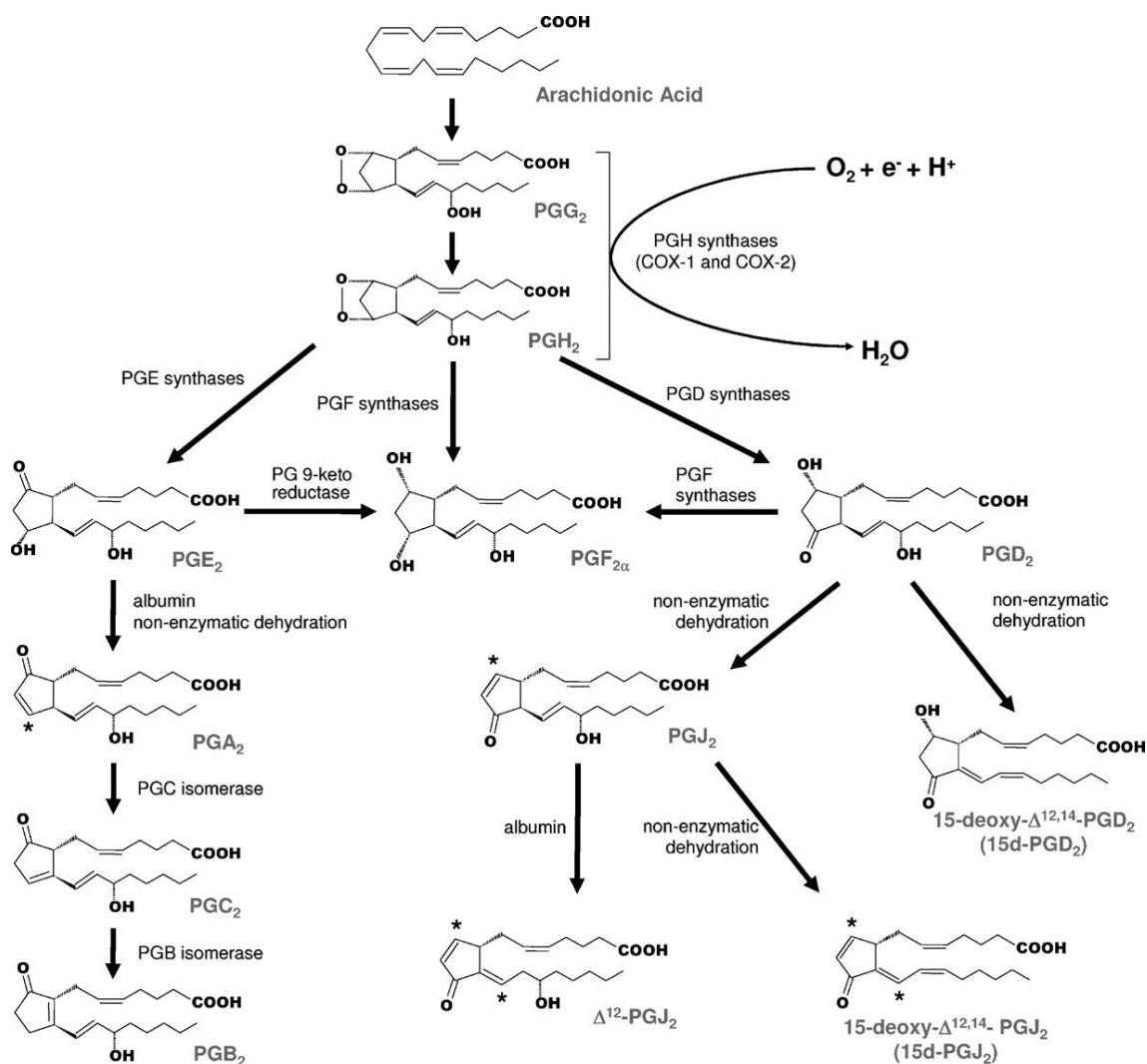
### **1.3. PROSTAGLANDINAS                    CICLOPENTENÔNICAS                    E ATEROSCLEROSE**

#### *1.3.1. FORMAÇÃO DAS CP-PGs*

Após a descoberta, em 1997, pelo grupo de Maria Gabriella Santoro na Itália, que  $PGA_1$ , uma CP-PG antiproliferativa tem capacidade de inibir a ativação do NF- $\kappa$ B, que é um fator de transcrição envolvido na resposta imunitária à inflamação (Rossi *et al.*, 1997), tornou-se claro que as CP-PGs devem ser estudadas como potenciais ferramentas farmacológicas contra a aterosclerose (Gutierrez *et al.*, 2008).

Prostaglandinas são uma família de ácidos graxos que contém 20 carbonos cíclicos em sua estrutura. Estes compostos ocorrem naturalmente no organismo e são sintetizados a partir do ácido araquidônico ou outros ácidos graxos provenientes de fosfolipídios da membrana celular pela ação de fosfolipases. O ácido araquidônico é primeiramente transformado em um endoperóxido intermediário instável pela ciclo-oxigenase (COX) e posteriormente convertido por meio da ação de muitas PG sintases em um de vários possíveis produtos, entre eles  $PGD_2$ ,  $PGE_2$  e  $PGF_{2\alpha}$  (Piva *et al.*, 2005).

$PGE_2$  e seu isômero, a  $PGD_2$ , por sua vez, podem ser transformadas facilmente no plasma *in vivo* em  $PGA_2$  e  $\Delta 12$ - $PGJ_2$  e seus J-derivados (Ohno *et al.*, 1986; Narumiya & Fukushima, 1985; Kikawa *et al.*, 1984; Fitzpatrick & Wynałda, 1983) que, juntos, são conhecidos como prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs). As etapas de formação de CP-PGs podem ser vistas na figura 1.



**Fig. 1:** Formação das prostaglandinas ciclopentenônicas (família das PGA<sub>2</sub> e PGJ<sub>2</sub>), conforme descrito por Gutierrez e colaboradores (2008).

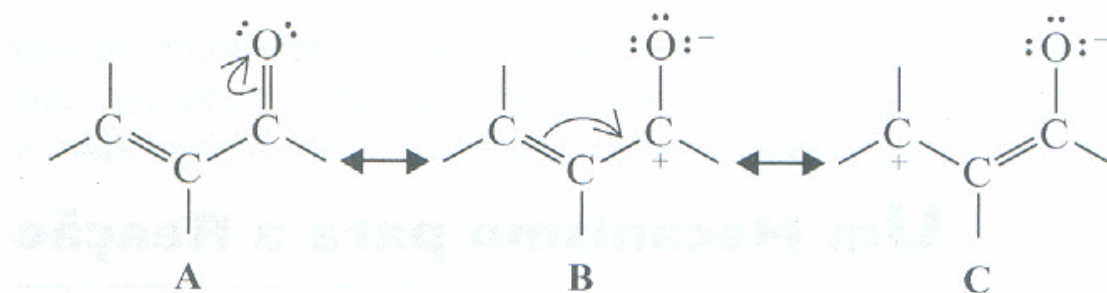
Assim, as prostaglandinas das séries A e J são originadas pela desidratação do anel ciclopentano da PGE e PGD, respectivamente, que produzem uma estrutura ciclopentenônica caracterizada pela presença de uma carbonila α,β- insaturada (Piva *et al.*, 2005).

### 1.3.2. A QUÍMICA DAS CP-PGs

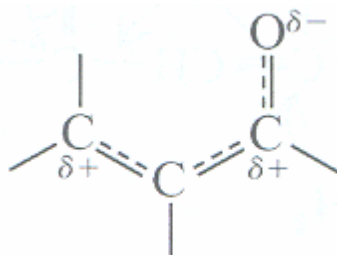
O anel ciclopentenônico das CP-PGs é caracterizado por possuir dois centros eletrofílicos e dessa forma, fica muito susceptível a reações de adição nucleofílica, na qual um eletrófilo pode se combinar com um reagente orgânico. Essa característica confere às CP-PGs alta capacidade de interação o que se torna indispensável para a ação biológica destas moléculas. Estes compostos



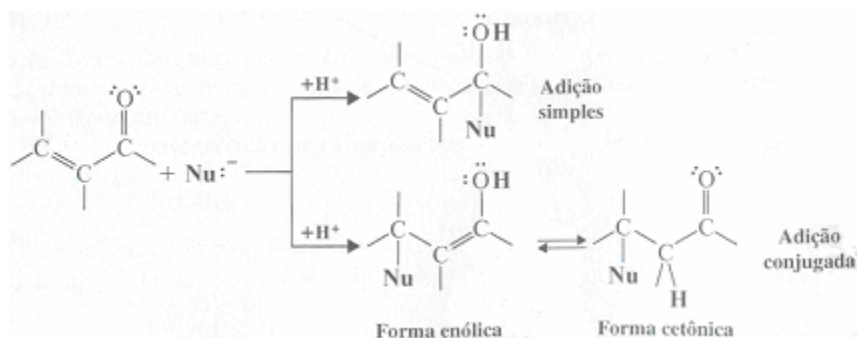
reagem rapidamente com cisteínas e grupamentos tiol pertencentes a diversas moléculas, como glutathiona e proteínas celulares, por adição de Michael (adição nucleofílica na instauração entre os carbonos  $\alpha,\beta$ , segundo Solomons, 2002), fato este descrito em muitos estudos (Atsmon *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1999; Straus & Glass, 2001; Bickley *et al.*, 2004; Musiek *et al.*, 2005). Estes centros eletrofílicos citados, a ressonância, a ação dos nucleófilos em centros eletrofílicos e a adição de Michael estão demonstrados nas Figuras 2, 3, 4 e 5, respectivamente (Solomons, 2002).



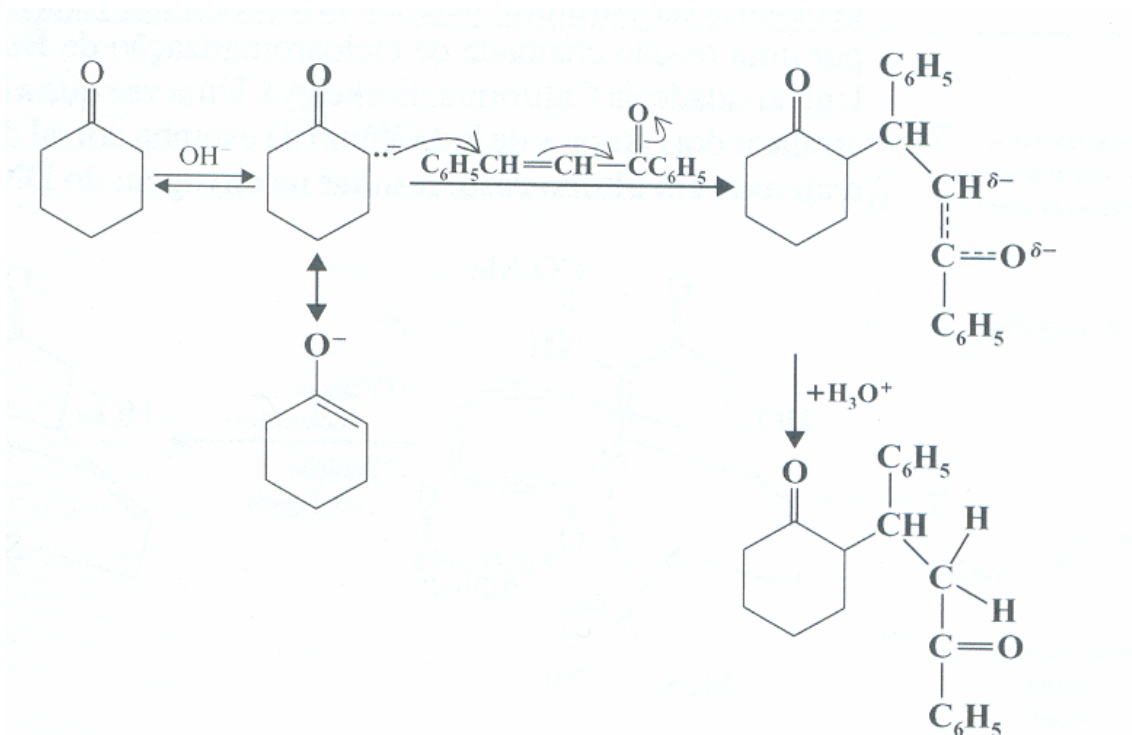
**Fig. 2:** Centros eletrofílicos de um anel ciclopentenônico (uma carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada e a carbonila da cetona), segundo Solomons (2002).



**Fig. 3:** Ressonância que ocorre entre os centros eletrofílicos de um anel ciclopentenônico, conforme Solomons (2002).



**Fig. 4:** Ação de nucleófilos em centros eletrofílicos de um anel ciclopentenônico (Solomons, 2002).



**Fig. 5:** Adição de Michael (Solomons, 2002).

### 1.3.3. EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTI-COLESTEROGÊNICO DAS CP-PGs

Sabe-se que prostaglandinas (PGs) ciclopentenônicas (CP-PGs) são ativadores universais da via das HSP (*heat shock protein*) (Amici *et al.*, 1992; Rossi & Santoro, 1995), que levam à proteção celular através da inibição dos mecanismos de ativação do NF- $\kappa$ B em série de tipos celulares já estudados, incluindo 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).

Um dos mecanismos pelos quais as CP-PGs bloqueiam a ativação do NF- $\kappa$ B é a inibição da I $\kappa$ B quinase, uma enzima que precipita a ativação deste fator nuclear (Rossi *et al.*, 2000). Assim, o NO e certas PGs ativam a via das HSP que irá inibir a ativação do NF- $\kappa$ B promovendo assim a citoproteção.

PGs do tipo E diminuem o tamanho de infartos miocárdicos experimentais em cães através do bloqueio da migração e ativação de neutrófilos (Simpson *et al.*, 1988), além de estimularem a captação de colesterol por HDL a partir de macrófagos (Bernard *et al.*, 1991), o que leva a uma diminuição dos conteúdos intracelulares de colesterol e redução do risco de acúmulo de lípidos. Por outro lado, macrófagos, que, como já discutido,

ocupam papel de destaque no início e também no desenvolvimento da lesão aterosclerótica, produzem grandes quantidades de  $\text{PGE}_2$  e seu isômero, a  $\text{PGD}_2$  (Scott *et al.*, 1982; Urade *et al.*, 1989), que como já descrito, podem ser transformadas em  $\text{PGA}_2$  e  $\Delta^{12}\text{-PGJ}_2$  e seus J-derivados (Ohno *et al.*, 1986; Narumiya & Fukushima, 1985; Kikawa *et al.*, 1984; Fitzpatrick & Wynalda, 1983).

Homem de Bittencourt e colaboradores (1993) demonstraram em seus estudos que macrófagos não só têm capacidade de produzir quanto de exportar grandes quantidades de lípidos, como colesterol, ácidos graxos, ésteres de colesterol, triacilgliceróis e fosfolípidos para o meio extracelular. Outro estudo do mesmo grupo indicou ainda que as PGs podem ser os moduladores fisiológicos do processo de produção e exportação destes lípidos em linfócitos e células tumorais (Homem de Bittencourt *et al.*, 2007).

O fator de diferenciação de adipócitos PPAR- $\gamma$  (receptor nuclear ativado por proliferadores de peroxissomas do tipo gama), do qual as CP-PGs são os ligantes fisiológicos e que leva à diferenciação de adipócitos, com uma profunda influência sobre o metabolismo lipídico destes tipos celulares (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995), também tem participação no desenvolvimento da lesão aterosclerótica e, por esse motivo passou a receber extrema atenção recentemente, principalmente porque se observou que sua expressão e ativação estão dramaticamente estimuladas em lesões ateroscleróticas humanas (Ricote *et al.*, 1998). Sabe-se, hoje, que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) quando oxidadas contêm altas concentrações de derivados lipídicos oxidados que ativam diretamente o PPAR- $\gamma$  bem como sua expressão gênica (Nagy *et al.*, 1998). A ativação deste PPAR- $\gamma$  em macrófagos leva à expressão do receptor de *scavenger* CD36/FAT, diferenciando-os em macrófagos/*foam cells* (Tontonoz *et al.*, 1998). Então, a ativação do fator de transcrição nuclear PPAR- $\gamma$  induz a um ciclo, no qual a LDL oxidada o ativa, ocasionando um aumento da expressão de receptores para a internalização de mais moléculas de LDL oxidadas.

Ao contrário das CP-PGs da família da prostaglandina  $\text{J}_2$ , que são ativadoras e ligantes fisiológicos do PPAR- $\gamma$ , as CP-PGs da família da  $\text{PGA}_2$  não levam à ativação deste fator nuclear (Forman *et al.*, 1995). Entretanto,

alguns estudos sugerem que PGs da família da  $PGA_2$  sejam citoprotetoras e redutoras das concentrações intracelulares de colesterol (Senna *et al.*, 1998). Pesquisas mostraram que a  $PGA_2$  reduz sensivelmente a lipogênese de macrófagos, sendo que este efeito foi mais exacerbado em macrófagos inflamatórios, como aqueles encontrados na lesão aterosclerótica (Tavares *et al.*, 2003).

Considerando que os efeitos das CP-PGs sobre o metabolismo lipídico de macrófagos/*foam cells* podem estar relacionados à ativação da expressão de HSP e desativação do NF- $\kappa$ B, como já discutido, estudos verificaram o efeito de CP-PGs da família da PGA sobre a síntese *de novo* de lípidos (lipogênese), captação e exportação de lípidos por macrófagos em duas situações de estresse endotelial que tendem a levar ao desenvolvimento da aterosclerose: hipertensão arterial e hipercolesterolemia. Os resultados demonstraram que *in vivo* as CP-PGs, particularmente da família A, desviam completamente a síntese *de novo* de colesterol no sentido da síntese de fosfolípidos em macrófagos/*foam cells* e outras preparações de macrófagos inflamatórios. Além disso, estas CP-PGs reduzem dramaticamente a importação de colesterol e ésteres de colesterol a partir dos meios de cultura enquanto que a exportação desses lípidos mostrou-se aumentada, na presença desse eicosanóide (Senna *et al.*, 1998).

*In vivo*, foram testadas várias preparações contendo CP-PGs. Entretanto, como as CP-PGs são citostáticas, apresentam uma série de efeitos colaterais. Por isso, foi desenvolvida uma formulação contendo CP-PGs, mas encapsuladas em lipossomos, já que as CP-PGs são ácidos graxos e, portanto, bastante lipossolúveis. O problema da especificidade foi contornado aproveitando-se que o endotélio doente expressa altíssimas quantidades de moléculas de adesão. Assim, preparou-se lipossomos contendo anticorpos monoclonais contra as moléculas de adesão vascular. O resultado obtido foi que 75% dos lipossomos injetados em camundongos LDLR-KO foram internalizados pelos vasos doentes. Desses resultados, surgiu a formulação LipoCardium, cujo pedido de patente (registro definitivo em janeiro de 2004) foi realizado pelo Laboratório de Fisiologia Celular por intermédio da UFRGS. Animais doentes tratados com LipoCardium endovenosamente de maneira

crônica apresentam reversão total da doença vascular, com melhora na qualidade de vida (Homem de Bittencourt *et al.*, 2007).

Tendo em vista, portanto, que os efeitos das CP-PGs sobre o metabolismo lipídico de macrófagos/*foam cells* podem estar relacionados à ativação da expressão de várias proteínas que participam da inflamação e que o papel de enzimas como a HMG-CoA redutase não está elucidado, a proposta deste trabalho é estudar o mecanismo dos efeitos da prostaglandina A<sub>2</sub> sobre a atividade e imunodeteção da HMG-CoA redutase. Para intensificar os estudos sobre o mecanismo de ação da PGA<sub>2</sub>, a mesma aplicada em tipos celulares relacionados ao processo aterosclerótico permite estudar a possibilidade de ligação covalente entre a PGA<sub>2</sub> e a HMG-CoA redutase. Considerando que foram estudados tipos celulares envolvidos na doença aterosclerótica, acredita-se que os resultados desta investigação poderão auxiliar no desenvolvimento de conhecimento para o tratamento/prevenção da aterosclerose.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. GERAL**

Investigar o efeito da  $\text{PGA}_2$  sobre a enzima chave da síntese endógena do colesterol, a HMG-CoA redutase, em tipos celulares relacionados ao processo aterogênico, demonstrando seu mecanismo de ação por ligação covalente a cisteínas reativas desta enzima.

### **2.2. ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito da  $\text{PGA}_2$  na atividade da HMG-CoA redutase através de Kit específico para HMG-CoA redutase;
- Avaliar imunodeteção da HMG-CoA redutase em células de leucemia humana pró-monocítica U937;
- Avaliar se os efeitos da  $\text{PGA}_2$  são decorrentes de ligação covalente com a HMG-CoA redutase, através do uso de  $\text{PGA}_2$  biotinilada e DTT.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

Neste estudo, foram cultivadas células envolvidas na gênese do processo aterosclerótico sob as seguintes condições: na presença ou ausência de LDL oxidada, sendo ou não tratadas com  $PGA_2$ . Nestas culturas celulares foi verificada a imunodeteção da enzima chave da síntese endógena do colesterol, a HMG-CoA redutase. Deste modo, foi viável inferir sobre a participação da  $PGA_2$  na inibição da HMG-CoA redutase. A verificação dos mecanismos pelos quais ocorrem estes efeitos se deu através de metodologia apropriada descrita abaixo que é capaz de descartar ou confirmar se existe a ligação covalente entre a  $PGA_2$  e a cisteína reativa da HMG-CoA.

#### **3.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO**

O presente projeto foi realizado no Laboratório de Fisiologia Celular do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Todas as etapas deste estudo foram realizadas no referido Laboratório localizado no campus central da UFRGS (Av. Sarmiento Leite n° 500, CEP 90050-170).

#### **3.3. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS U937**

Para o estudo de macrófagos humanos da linhagem U937 que foi utilizada nos estudos, estes foram retiradas de criotubos armazenados em nitrogênio líquido e tratadas em meio RPMI 1640 com antibiótico (10 ml finais) com 20% de soro fetal bovino, em garrafas específicas para cultura de células, até ficarem confluentes. As células eram provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro.

#### **3.4. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS FOAM CELLS**

Após a obtenção dos macrófagos U937, estes foram tratados com LDL oxidada por 18 horas em cultura, conforme metodologia previamente descrita (Frostegard *et al.*, 1993; Roma *et al.*, 1992) formando-se, assim, macrófagos/*foam cell* (Homem de Bittencourt Jr. *et al.*, 2007).

### 3.5. DISPOSIÇÃO FINAL DOS RESÍDUOS

Após os experimentos, meios de cultura celulares e células, tudo em garrafas de poliestireno, foram embalados em sacos apropriados, autoclavados, etiquetados como Lixo Biológico e entregues ao serviço de coleta da Aborgama. Resíduos de géis de poliacrilamida, bem como demais solventes não biodegradáveis foram tratados como Lixo Químico que foi coletado pelo serviço de coleta sediado no Instituto de Química da UFRGS.

### 3.6. VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS

*Trypan Blue* (Sigma) é um corante recomendado para o uso em procedimentos para contagem da viabilidade celular levando em consideração o número de células que morreram durante o procedimento de extração. Este método parte do princípio que células mortas absorvem este corante mudando sua coloração para o azul, enquanto que células vivas absorvem e bombeiam para fora o corante não apresentando, portanto, nenhuma coloração. Isso ocorre porque células viáveis apresentam membranas que têm capacidade de selecionar os compostos que passam através dela, e o *Trypan Blue* não é absorvido, no entanto, ele pode atravessar a membrana de uma célula morta. Assim, as células mortas são vistas com uma cor azul característica quando observadas sob um microscópio.

Para observar esta viabilidade utilizam-se, dependendo de cada amostra, determinadas quantidades de amostra, tampão de salina com PBS e *Trypan Blue*. Dessa amostra preparada, 10 µl são colocados na câmara de Neubauer para realizar a contagem de células vivas ou mortas por cada mililitro de amostra.

### 3.7. OXIDAÇÃO DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL)

A formação de macrófagos/*foam cells* foi feita a partir de incubação de U937 com LDL oxidada em meio de cultura, por 18 horas.

- *Reagentes e materiais a serem utilizados para obtenção de LDL oxidada:*

1) LDL em PBS a 1 mg/ml (solução comercial em 150 mM NaCl, pH 7,4, contendo 0,01% EDTA);



2) Tampão PBS (Phosphate-buffered saline): NaCl 136,8 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9 mM e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,4 mM em água milliQ, pH 7,4.

3) Meio de cultura RPMI 1640 com antibióticos (Ampicilina e estreptomicina 1:100);

4) Filtros (para seringa) descartáveis, estéreis Ultra-Low Binding PES;

5) Torpedo de N<sub>2</sub> gasoso;

6) BHT (hidroxibutiltolueno, 220,4 g/mol) 500x (10 mM) em etanol;

7) Reagente e padrões de BSA (albumina bovina, diluídos a partir de solução a 1 mg/ml) para dosagem de proteínas pelo método de Bradford;

8) Reagentes para TBARS: BHT (hidroxibutiltolueno 220,4 g/mol) 65 x (29,5 mM) em etanol; TCA 30% (ácido tricloroacético) em água milliQ; TBA 0,73% (ácido tiobarbitúrico) em água milliQ e Tris-HCl 10 mM pH 7,4. A reação foi feita utilizando-se 50 µl de amostra a cerca de 1 mg/ml, em tubo Eppendorf de 1,5 ml com furos na tampa, 200 µl de TCA 30%, 200 µl de Tris-HCl, foi centrifugado por 10 min a 2500 x g a 4°C e coletado 440 µl do sobrenadante. Após, adicionou-se ao sobrenadante 200 µl de TBA, 10 µl de BHT, agitou-se e levou as amostras ao banho-maria a 100°C por 1 h. Por fim, as amostras foram lidas a 535 nm diretamente contra mistura contendo 50 µl de água, 200 µl de TCA, 200 µl de Tris-HCl, 10 µl de BHT e 200 µl de TBA fervido paralelamente (segundo Buege & Aust, 1978 e Draper *et al.*, 1993).

9) Sacos de diálise (cut off 10.000 Da);

10) Lacres plásticos para sacos de diálise;

11) Solução de sulfato de cobre 100x (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 500 µM em PBS);

12) Geladeira ou câmara fria (4°C) com espaço para dialisar grandes volumes.

#### *Procedimento experimental:*

Foram dosadas as proteínas da amostra de LDL nativa a ser oxidada, pelo método de Bradford (1976). Conhecidas as quantidades de proteínas nas amostras, pegou-se do frasco-mãe 1mg de proteína e transferiu-se esta quantidade para um saco de diálise completando o volume para 1 mg/ml com PBS. A amostra foi dialisada contra 1000 volumes de PBS durante 3 horas na geladeira para remover o EDTA e outros conservantes utilizados nas preparações comerciais, por duas vezes. Após a diálise, transferiu-se a

suspensão de LDL para Eppendorfs e adicionou-se 10 µL de solução de sulfato de cobre 100x (500 µM) por ml para uma concentração final de 5 µM.

As amostras foram incubadas a 37°C em ar, para promover a oxidação, em banho-maria com agitação por 3 h. Após a oxidação, parou-se a reação com 2 µL de BHT 500x (10 mM) por ml de suspensão de LDL. Dialisou-se as amostras contra 1000 volumes de PBS durante 3 horas para retirar o sulfato de cobre. Finalmente, dosou-se TBARS em alíquotas de 50 µL (em duplicatas) tanto da LDL nativa, quanto da oxidada. Após dosagem de TBARS, dialisou-se as amostras de LDL nativa e oxidada contra 1000 volumes de meio de cultura RPMI 1640 com antibióticos e filtrou-se em filtro PES (polietersulfona) ultra low binding.

Este procedimento foi adaptado de Kohno e colaboradores (2000).

### **3.8. REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DA PLACA DE CULTURA DE MACRÓFAGOS/FOAM CELLS E GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Os reagentes utilizados para o preparo da placa de cultura de macrófagos/*foam cells* foram:

a) LDL oxidada (7,77 mg/ml) (obtida conforme preparação descrita acima); Em Eppendorf, pipetava-se 13 µl de LDL oxidada e adicionava-se 5 ml de meio RPMI 1640, para uma concentração final de 20 µg/ml.

b) Prostaglandina A<sub>2</sub> (PGA<sub>2</sub>- ICN- Biomedicals Inc. 13345-50-1) 1 µM. Em Eppendorf, pipetava-se 5 µl de PGA<sub>2</sub> e adicionava-se 295 µl de meio RPMI 1640.

d) Mistura controle: consistia de uma preparação contendo 7 µl de etanol absoluto e 203 µl de meio RPMI 1640.

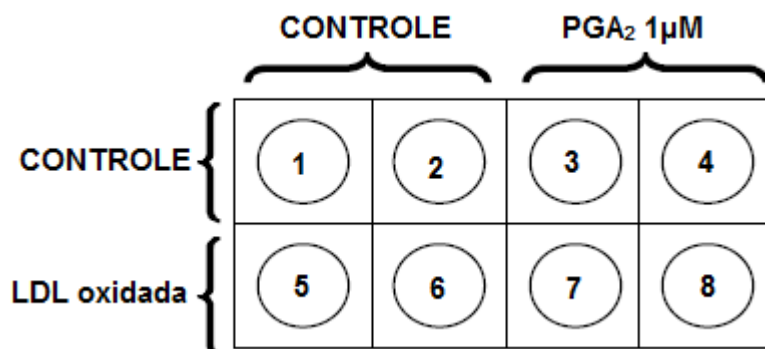
Após a obtenção dos reagentes, as placas de cultura de células eram preparadas com a pipetagem dos grupos experimentais no tempo de 24 h de ação dos reagentes sobre as células, para análise da imunodeteção da HMG-CoA redutase.

Cada well deveria conter 500 µl finais. Assim, os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira:

- Grupo controle, que consistiu de:
  - 427 µl de meio RPMI 1640;
  - 10 µl da mistura controle;

- 50  $\mu\text{l}$  de soro fetal bovino;
- 13  $\mu\text{M}$  de meio ou LDL oxidada.
- Grupo  $\text{PGA}_2$  1  $\mu\text{M}$ , que consistiu de:
  - 427  $\mu\text{l}$  de meio RPMI 1640;
  - 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{PGA}_2$  (1 $\mu\text{M}$ );
  - 50  $\mu\text{l}$  de soro fetal bovino;
  - 13  $\mu\text{l}$  de meio ou LDL oxidada.
- O procedimento experimental foi o seguinte:
  - a) Plaqueou-se as células em meio RPMI-1640 (cerca de  $2 \times 10^6$  células por well);
  - b) Pipetou-se a mistura controle ou  $\text{PGA}_2$  (1  $\mu\text{M}$ );
  - c) Aguardou-se 15 minutos;
  - d) Pipetou-se o soro fetal bovino;
  - f) Foi adicionada a LDL oxidada;
  - g) Incubou-se as células por 24 h.

A representação esquemática da distribuição experimental na placa de cultura de células era o seguinte:



**Fig. 6:** Representação esquemática da distribuição experimental de macrófagos U937 ou *foam cells*. 1 e 2 – macrófagos U937 Controle + etanol em duplicata; 3 e 4 – macrófagos U937 Controle +  $\text{PGA}_2$  em duplicata; 5 e 6 – macrófagos U937 LDL-oxidada + etanol em duplicata; 7 e 8 – macrófagos U937 LDL-oxidada +  $\text{PGA}_2$  em duplicata.

### 3.9. REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DA PLACA DE CULTURA DE MACRÓFAGOS/FOAM CELLS E GRUPOS EXPERIMENTAIS COM $\text{PGA}_2$ BIOTINILADA

Neste experimento foi utilizado um análogo biotinilado da  $PGA_2$  para analisar por SDS-PAGE com estreptavidina marcada com peroxidase, pois compostos têm capacidade de ligação a proteínas celulares. Estes compostos possuem grupo biotina ligado ao grupo carboxila do CP-PG que, em princípio, não afeta a sua reatividade e a sua interação com numerosas proteínas celulares (Parker, 1995).

Os reagentes utilizados para o preparo da placa de cultura de macrófagos/*foam cells* foram:

a) LDL oxidada (7,77 mg/ml) (obtida conforme preparação descrita acima); Em Eppendorf, pipetava-se 13  $\mu$ l de LDL oxidada e adicionava-se 5 ml de meio RPMI 1640, para uma concentração final de 20  $\mu$ g/ml.

b) Prostaglandina  $A_2$  ( $PGA_2$ - ICN- Biomedicals Inc. 13345-50-1) 20  $\mu$ M. Em Eppendorf, pipetava-se 6  $\mu$ l de  $PGA_2$  (10 mg/ml), e adicionava-se 174  $\mu$ l de meio RPMI 1640.

c) Prostaglandina  $A_2$  ( $PGA_2$ - ICN- Biomedicals Inc. 13345-50-1) 20  $\mu$ M. Em Eppendorf, pipetava-se 50  $\mu$ l de  $PGA_2$  (20  $\mu$ M) e adicionava-se 50  $\mu$ l de meio RPMI 1640.

d) Prostaglandina  $A_2$  (Prostaglandin  $A_2$ -biotin – Cayman Chemical - 10010499) 10  $\mu$ M.

e) Mistura controle: consistia de uma preparação contendo 7  $\mu$ l de etanol absoluto e 203  $\mu$ l de meio RPMI 1640.

Após a obtenção dos reagentes, as placas de cultura de células eram preparadas com a pipetagem dos grupos experimentais no tempo de 2 h e 6 h de ação dos reagentes sobre as células, para análise da imunodeteção da HMG-CoA redutase.

Cada well deveria conter 500  $\mu$ l finais. Assim, os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira:

- Grupo controle, que consistiu de:
  - 424  $\mu$ l de meio RPMI 1640;
  - 3,2  $\mu$ l de  $PGA_2$  biotinilada;
  - 10  $\mu$ l da mistura controle;
  - 50  $\mu$ l de soro fetal bovino;
  - 13  $\mu$ l de meio ou LDL oxidada.
- Grupo  $PGA_2$  10  $\mu$ M, que consistiu de:

- 424  $\mu\text{l}$  de meio RPMI 1640;
- 3,2  $\mu\text{l}$  de  $\text{PGA}_2$  biotinizada;
- 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{PGA}_2$  10 $\mu\text{M}$ ;
- 50  $\mu\text{l}$  de soro fetal bovino;
- 13  $\mu\text{l}$  de meio ou LDL oxidada
- Grupo  $\text{PGA}_2$  20  $\mu\text{M}$ , que consistiu de:

- 424  $\mu\text{l}$  de meio RPMI 1640;
- 3,2  $\mu\text{l}$  de  $\text{PGA}_2$  biotinizada;
- 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{PGA}_2$  20  $\mu\text{M}$ ;
- 50  $\mu\text{l}$  de soro fetal bovino;
- 13  $\mu\text{l}$  de meio ou LDL oxidada

• O procedimento experimental foi o seguinte:

a) Plaqueou-se as células em meio RPMI-1640 (cerca de  $2 \times 10^6$  células por well);

b) Pipetou-se 3,2  $\mu\text{l}$   $\text{PGA}_2$  biotinizada

c) Pipetou-se a mistura controle ou  $\text{PGA}_2$  (10  $\mu\text{M}$  ou 20  $\mu\text{M}$ );

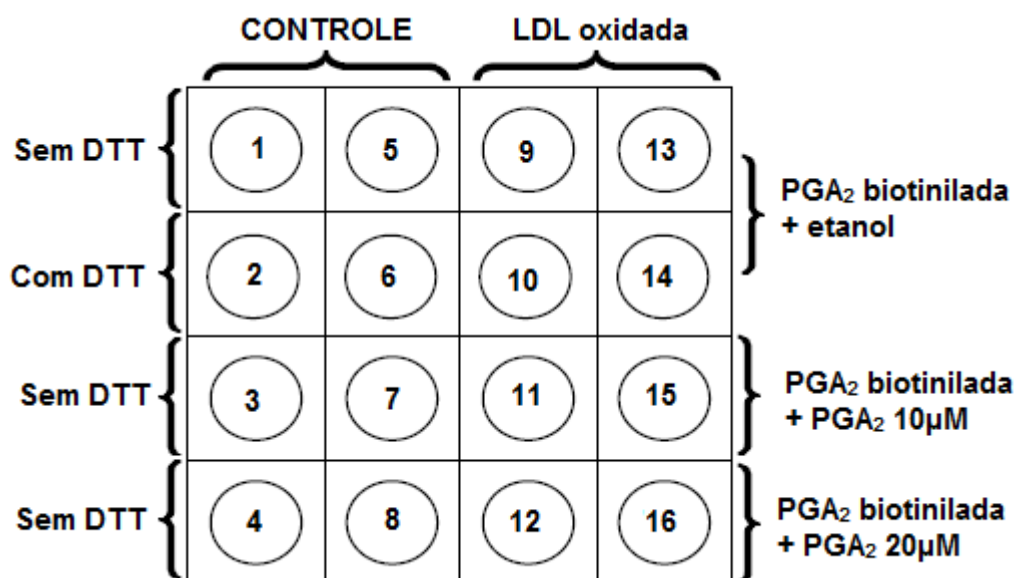
c) Aguardou-se 15 minutos;

d) Pipetou-se o soro fetal bovino;

f) Foi adicionada a LDL oxidada;

g) Incubou-se as células por 2 h ou 6 h.

A representação esquemática da distribuição experimental na placa de cultura de células era o seguinte:



**Fig. 7:** Representação esquemática da distribuição experimental de macrófagos U937 ou *foam cells*. 1 e 5 – macrófagos U937 controle + PGA<sub>2</sub> biotinilada em duplicata; 2 e 6 – macrófagos U937 Controle + PGA<sub>2</sub> biotinilada em duplicata, que foram posteriormente tratadas com DTT (10 mM); 3 e 7 – macrófagos U937 Controle+ PGA<sub>2</sub> biotinilada + PGA<sub>2</sub> 10 µM em duplicata; 3 e 7 – macrófagos U937 Controle+ PGA<sub>2</sub> biotinilada + PGA<sub>2</sub> 20 µM em duplicata; 9 e 13 – macrófagos U937 LDL-oxidada + PGA<sub>2</sub> biotinilada em duplicata; 10 e 14 – macrófagos U937 LDL-oxidada + PGA<sub>2</sub> biotinilada em duplicata, que foram posteriormente tratadas com DTT; 11 e 15 – macrófagos U937 LDL-oxidada + PGA<sub>2</sub> biotinilada + PGA<sub>2</sub> 10 µM em duplicata; 12 e 16 – macrófagos U937 LDL-oxidada+ PGA<sub>2</sub> biotinilada + PGA<sub>2</sub> 20 µM em duplicata.

### 3.10. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Refere-se à dosagem de proteínas contidas na amostra, através da comparação com uma curva padrão com diferentes concentrações proteicas conhecidas e cujas amostras são lidas em leitora de microplacas (Benchmark Biorad), baseando-se no método espectrofotométrico descrito por Bradford (1976), no qual as proteínas das amostras ligam-se ao Azul Commassie Brilhante-G-250, sendo este complexo formado, absorvido a 595 nm.

Esta etapa é fundamental em todo o processo para determinação da expressão de HMG-CoA redutase, já que quantidades iguais de proteínas deverão ser carregadas nos géis de eletroforese para apresentarem resultados fidedignos.

### 3.11. IMUNOPRECIPITAÇÃO E ELETROFORESE SDS-PAGE PARA HMG-COA REDUTASE DE MACRÓFAGOS

Proteínas celulares ou de amostras teciduais foram incubadas na presença dos anticorpos de interesse que foram precipitados com proteína A/G-agarose (que reage especificamente com as caudas Fc dos anticorpos). Depois de separados por centrifugação, os complexos proteína-anticorpo-proteína A/G-agarose foram dissolvidos em tampão de imunoprecipitação e submetidos à eletroforese. A identificação foi de uma única banda que pode ser visualizada por reação com segundo-anticorpo ligado a peroxidase. Essa

técnica permite que sejam isoladas proteínas expressas em pequenas quantidades, concentrando-as, o que é o caso da HMG-CoA redutase.

- *Os reagentes utilizados e o preparo:*

a) Anticorpo primário de interesse (anticorpo anti- *goat/ human/ mouse/ rat* HMG-CoA redutase c-18, SC 27578, Santa Cruz Biotechnology);

b) Anticorpo secundário (anticorpo anti IgG Biotinilado B7014) e reagentes para identificação por *immunoblot*;

c) Anticorpo terciário (anticorpo Streptavidina RPN 2195);

d) Peptídeo de bloqueio (SC 27578p);

e) Material para eletroforese e eletrotransferência (descritos posteriormente);

f) PBS para lavagens;

g) Inibidores de protease (leupeptina 5 mg/ml e PMSF 100 mM).

h) Tampão de imunoprecipitação (tampão IP):

- Nonidet P-40, 1% (v/v)

- Desoxicolato, 0,5% (m/v)

- NaCl 150 mM

- Tris-HCl 10 mM pH 7,4, em água destilada.

i) SDS (dodecil sulfato de sódio) em tampão de imunoprecipitação (SDS-IP) 0,1%;

j) Protein A/G Plus Agarose da Santa Cruz, sc-2003;

- *Ensaio para esta determinação:*

Os grupos experimentais propostos foram preparados em duplicata, utilizando-se duas placas de cultura de células. A placa de cultura também tem um *well* adicional para o controle negativo da imunoprecipitação. Após o período de incubação para tratamento, sugerido neste trabalho, as células foram lisadas com seringas de insulina em tubos Eppendorf em Tampão IP. Para isto, as células foram coletadas das placas de cultura em 1 ml de PBS em Eppendorf. Em seguida, foram centrifugadas por 10 segundos em microcentrífuga (velocidade máxima), descartando-se o sobrenadante. Novamente as placas de cultura foram lavadas com 1 ml de PBS e somado esse lavado ao tubo contendo as células já coletadas. Os macrófagos foram centrifugados novamente por 10 segundos e seus sobrenadantes aspirados para, então, os precipitados celulares serem quebrados. Assim, foram

adicionados às amostras leupeptina e PMSF, agitando-se a mistura em vórtex. Foi adicionado 500 µL de Tampão IP, agitando-se novamente em vórtex. Após, as células foram quebradas com seringa de insulina. As amostras foram centrifugadas por 1 segundo na microcentrífuga (velocidade máxima) apenas para baixar os núcleos e debris celulares. A HMG-CoA redutase fica no sobrenadante, assim, foi transferido 500 µL de cada sobrenadante para outros Eppendorfs, onde foi realizada a reação imunológica. Foi coletado 5 µL de cada amostra para dosagem de proteínas (cujo *blank* contém Tampão IP). Para que a reação imunológica fosse feita, para cada tubo contendo 500 µL de extrato celular em Tampão IP, foi adicionado 5 µL de anticorpo por tubo: anticorpo goat anti-human/mouse/rat HMG-CoA redutase (HMGCR da Santa Cruz Biotechnology, C-18, sc-27578). Foi reservado um tubo de lisado extra para a realização do controle negativo. Após a adição dos anticorpos, as preparações foram incubadas por 12 h a 4 °C com agitação moderada (*shaker* circular). O preparo do controle negativo deu-se com soro pré-imune, no qual foi adicionado a um tubo Eppendorf, contendo 500 µL de lisado celular, 1 µg de soro pré-imune (soro que não contém anticorpos específicos contra a HMG-CoA redutase). Essa amostra foi conduzida em paralelo. Outros dois controles negativos foram feitos, um contendo apenas albumina sérica bovina (BSA) e outro contendo peptídeo de bloqueio para o anticorpo específico. Para que fosse feita a imunoprecipitação, após a incubação de 12 horas, as amostras contendo os conjugados de proteína-anticorpo primário (em 500 µL) foram incubadas, sob agitação, por 90 min adicionais a 4°C na presença de 100 µL de proteína A/G agarose. Após a incubação com a resina, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos em microcentrífuga (velocidade máxima). Então, os sobrenadantes foram aspirados e descartados, pois eram os precipitados que contém os imunoprecipitados da HMG-CoA redutase com a proteína A/G agarose. Em seguida, os precipitados foram lavados 3 vezes com 1 ml de Tampão SDS-IP e centrifugados à velocidade máxima da microcentrífuga, aspirando e descartando os sobrenadantes. Os precipitados foram novamente lavados, agora com PBS (mesmo procedimento) e os sobrenadantes foram aspirados. Os precipitados das amostras experimentais foram dissolvidos em 55 µL de tampão de ensaio para SDS-PAGE (poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio - 10% poliacrilamida). O DTT (ditiotreitól) pode liberar CP-PGs ligadas



por adições de Michael, dessa forma algumas amostras foram ensaiada 2 vezes: uma na ausência e outra na presença de DTT. As amostras eram fervidas e congeladas (-20°C) em seguida ou submetidas à eletroforese imediatamente.

Então, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos (microcentrifuga, velocidade máxima) para precipitar a A/G agarose. Assim, foi carregado cerca de 50 µL por *well* para eletroforese dos sobrenadantes (com iguais quantidades de proteínas ou radioatividade).

Após eletroforese, foi feita a eletrotransferência e *Western Blot* utilizando-se novamente o anticorpo anti-HMG-CoA redutase (a 1:1000) (anticorpo antigoat/human/ mouse/ rat HMG-CoA redutase c-18, SC 27578, Santa Cruz Biotechnology), o segundo anticorpo e o terceiro anticorpo. As amostras foram reveladas por ECL (*Enhanced Chemiluminescence*).

O peso molecular da HMG-CoA redutase é de 43 KDa. Este protocolo de imunoprecipitação foi estabelecido a partir das técnicas originais de Amici e colaboradores (1994) e Lee e colaboradores (2000).

### **3.12. MEDIDA DA ATIVIDADE DA HMG-CoA REDUTASE**

A medida da atividade da HMG-CoA redutase se deu através de Kit de Atividade da HMG-CoA Redutase, Sigma CS1090. A principal função deste kit é determinar diferentes inibidores/ativadores da subunidade catalítica purificada da enzima. O ensaio é baseado em uma medida espectrofotométrica da diminuição da absorbância a 340 nm, o que representa a oxidação de NADPH pela subunidade catalítica da HMG-CoA redutase na presença do substrato HMG-CoA. Foi comparada a inibição da atividade através de um inibidor conhecido (pravastatina) com PGA<sub>2</sub> (1 µM e 10 µM).

### **3.13. CURVA DE CRESCIMENTO DE MACRÓFAGOS U937 E FOAM CELLS EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM PGA<sub>2</sub>**

Foram realizadas curvas de crescimentos, incubando as células na presença ou ausência de LDL oxidada e tratando-as com mistura controle (etanol) ou PGA<sub>2</sub> em diferentes concentrações (1 µM, 10 µM e 20 µM).

No tempo 0 h foram plaqueadas 10<sup>5</sup> células em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após os tempos de 24 h e 48 h

as células foram recontadas usando a técnica para verificar viabilidade celular, descrita no item 4.6 da Metodologia.

### **3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O tratamento estatístico será desenvolvido por procedimentos descritivos (medidas de tendência central e dispersão) e inferenciais (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student Newman Keuls) no programa estatístico SPSS para Windows, versão 13.0.

### **3.15. APOIO FINANCEIRO**

O Presente projeto conta com suporte financeiro do CNPq (processos n°s 551097/2007-8, 563870/2010-9 e INCT de Hormônios e Saúde da Mulher).

## 4. RESULTADOS

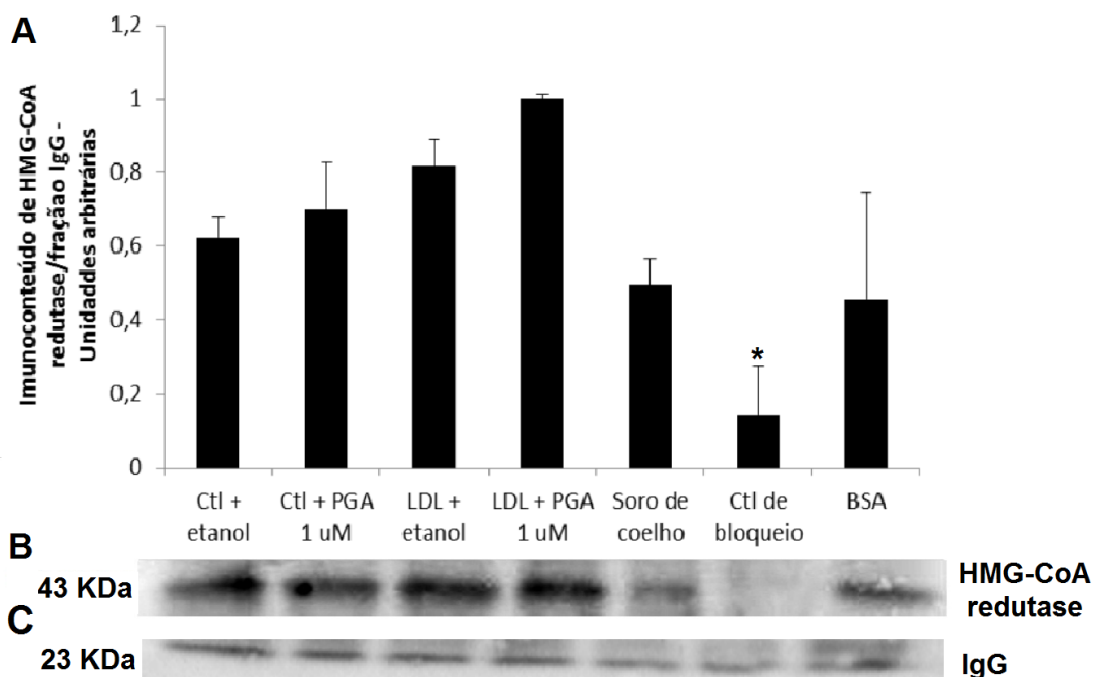
### 4.1. IMUNODETECÇÃO DA ENZIMA HMG-CoA REDUTASE EM MACRÓFAGOS OU *FOAM CELLS* TRATADOS COM $PGA_2$ POR 24 h

Como a HMG-CoA redutase é a enzima chave na síntese de colesterol e possui cisteínas reativas próximas ao sítio ativo, buscou-se estudar a possibilidade de que a  $PGA_2$  pudesse estar interferindo diretamente na atividade da enzima por meio de uma reação de adição de Michael. Para tanto, foi realizada imunodeteccção da HMG-CoA redutase através de imunoprecipitação desta enzima em macrófagos U937 ou macrófagos U937-*foam cells* tratados com  $PGA_2$  (1  $\mu$ M) por 24 h, seguida de eletroforese SDS-PAGE, conforme técnicas descritas anteriormente.

Os grupos experimentais foram demonstrados no desenho experimental no item 4.8 da Metodologia. Foram utilizadas  $2 \times 10^6$  células por *well*. Os resultados foram obtidos de 2 wells diferentes, em 3 experimentos independentes. Também foram utilizados grupos de controle negativo da imunoprecipitação (utilizando-se BSA ao invés da amostra contendo a enzima) e outro contendo peptídeo de bloqueio específico para a HMG-CoA redutase, já que as amostras foram preparadas por imunoprecipitação.

Como normalizador para a imunodeteccção de HMG-CoA redutase, usou-se a fração IgG do anticorpo usado na imunoprecipitação, visto que quantidade iguais do mesmo foram adicionadas às amostras.

Conforme os dados mostrados na Figura 8, o tratamento com LDL induziu um aumento na expressão da proteína em ambos os grupos experimentais, tratados ou não com a  $PGA_2$ . Entretanto, a  $PGA_2$  provocou uma indução semelhante tanto nas células controle quanto nas *foam cells* (tratadas previamente com LDL por 18 h antes do tratamento com a PG), porém não há diferença estatística entre os grupos.



**Fig. 8:** Imunoconteúdo da enzima HMG-CoA redutase em macrófagos U937/*foam cell* controles e tratados por 24 h com  $\text{PGA}_2$  1  $\mu\text{M}$ , e controles negativos. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. Os grupos não apresentam diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ), apenas mostrando diferença entre os diferentes grupos de tratamento em relação ao controle de bloqueio ( $p < 0,05$ ). (A) Histograma representando o imunoconteúdo de HMG-CoA normalizado pelos valores da fração IgG do anticorpo em unidades arbitrárias. (B) Imagem representativa da HMG-CoA. (C) Imagem representativa da fração IgG.

\* diferença significativa entre o grupo Controle de Bloqueio e os demais grupos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2. IMUNOPRECIPITAÇÃO DA ENZIMA HMG-CoA REDUTASE EM MACRÓFAGOS OU *FOAM CELLS* TRATADOS COM $\text{PGA}_2$ FRIA E $\text{PGA}_2$ BIOTINILADA POR 2 h OU 6 h

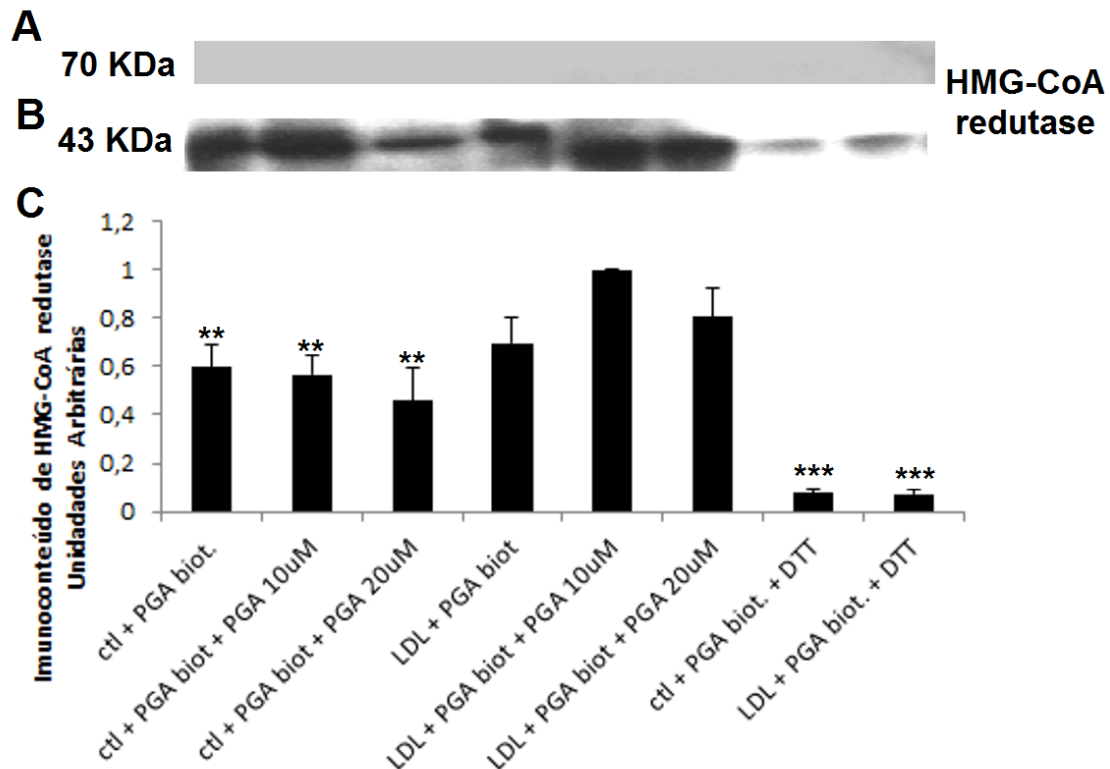
Tendo em vista que a  $\text{PGA}_2$  pode conjugar-se a cisteínas reativas próximas ao sítio ativo da enzima, realizamos um estudo onde as células foram tratadas com  $\text{PGA}_2$  fria e marcada com biotina. Em seguida, procedemos à imunoprecipitação como mostrado acima.

Macrófagos U937 e macrófagos U937 *foam cells* foram incubados na presença ou ausência de prostaglandina fria (10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M) e prostaglandina biotinilada (10  $\mu$ M) por 2 h ou 6 h, conforme descrito no item 4.9 da Metodologia. Estas células também foram submetidas à imunoprecipitação seguida de eletroforese SDS-PAGE com estreptavidina marcada com peroxidase. Neste procedimento, utilizamos uma concentração maior de  $\text{PGA}_2$  para permitir a identificação da mesma nos imunoprecipitados quando da identificação com estreptavidina.

Foram utilizadas  $2 \times 10^6$  células por well e os resultados foram obtidos de 4 experimentos independentes. Conforme mostram as Figuras 9 e 10, há diferença estatística significativa entre os grupos de macrófagos e macrófagos *foam cells* tratados apenas com  $\text{PGA}_2$  biotinilada ou com adição de  $\text{PGA}_2$  fria nas concentrações de 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M, sem DTT, quando comparados com os grupos (macrófagos e *foam cells*) tratados com DTT em ambos os tratamentos, 2 h ( $p < 0,001$ ) e 6 h ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ), porém no tratamento de 6 h houve uma diferença maior entre os grupos tratados com  $\text{PGA}_2$  fria 20  $\mu$ M em relação a estes tratados com DTT. Esse resultado demonstra que o tratamento com ditioneitol (DTT) a 10 mM provocou uma notável redução na incorporação de  $\text{PGA}_2$  à enzima imunoprecipitada.

No tratamento de 2 h, observa-se um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) quando comparados todos os grupos controles com e sem  $\text{PGA}_2$  aos grupos *foam cells*, incubados com LDL oxidada, tratados ou não com  $\text{PGA}_2$ .

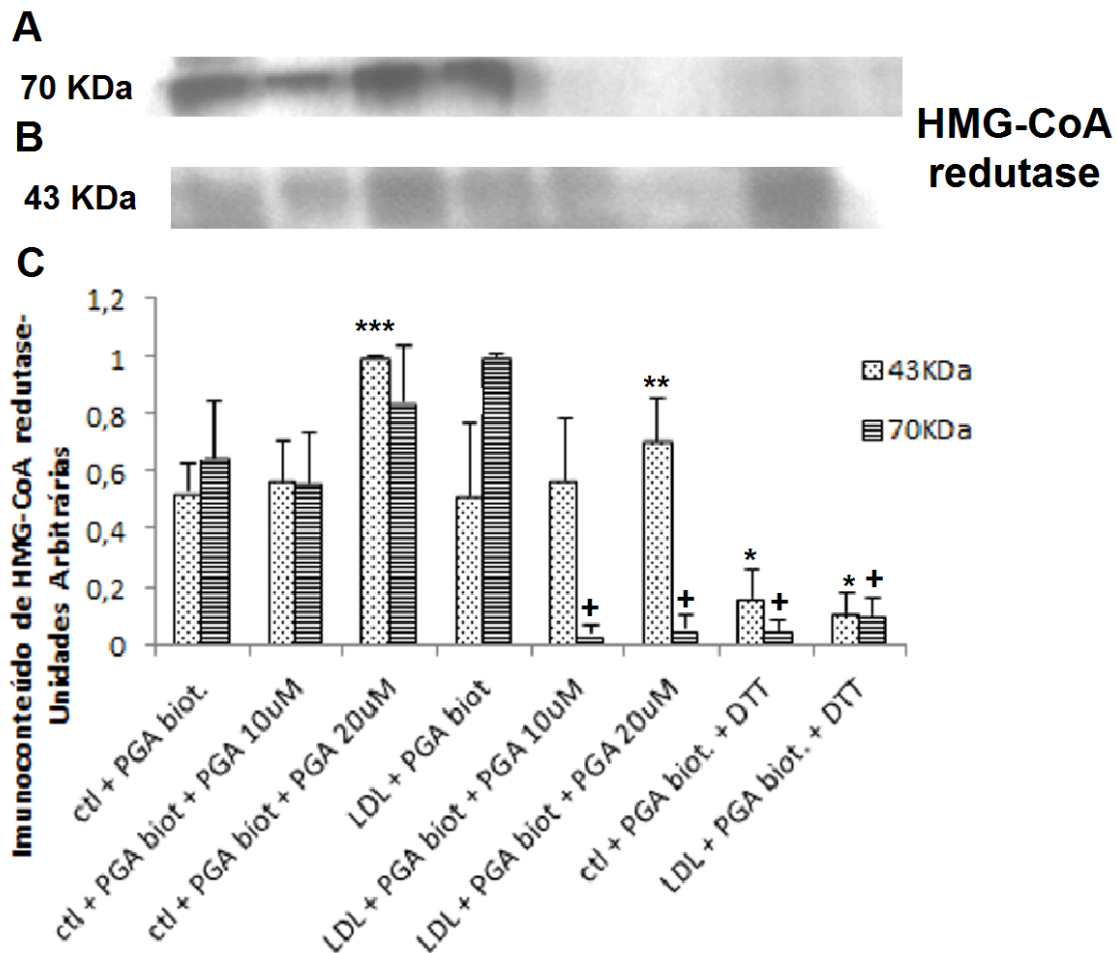
Os resultados também mostraram que, de fato, a  $\text{PGA}_2$  liga-se à enzima, tanto na subunidade C-terminal (~43 kDa) quanto na fração ligada às membranas microssomais (~80 kDa). No tratamento de 6 h, como mostrado na Figura 10, foi detectada uma banda com peso molecular de 70-80 kDa apenas nos grupos controles, tratados ou não com  $\text{PGA}_2$  e no grupo *foam cell* sem  $\text{PGA}_2$  fria. Esta detecção não foi observada no tratamento de 2 h (Figura 9).



**Fig. 9:** Imunoprecipitação da enzima HMG-CoA redutase em macrófagos U937/*foam cell* (*ox-LDL*) e controles tratados por 2 h com  $\text{PGA}_2$  biotinilada na presença e ausência de DTT 10 mM,  $\text{PGA}_2$  biotinilada (10  $\mu\text{M}$  final) e com excesso de  $\text{PGA}_2$  a 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. (A) Imagem representativa do imunoconteúdo de peso molecular de 70 kDa. (B) Imagem representativa da HMG-CoA com peso molecular de 43 kDa. (C) Histograma representando imunodeteção imunoconteúdo de HMG-CoA.

\*\* diferença significativa entre os grupos controle, tratados ou não com  $\text{PGA}_2$  e os grupos *foam cells* ( $p < 0,01$ ).

\*\*\* diferença significativa entre os grupos tratados com DTT (controle ou *foam cells*) e os demais grupos controle e *foam cells* tratados ou não com  $\text{PGA}_2$ , sem DTT ( $p < 0,001$ ).



**Fig. 10:** Imunoprecipitação da enzima HMG-CoA redutase em macrófagos U937/*foam cell* (*ox-LDL*) e controles tratados por 2 h com  $\text{PGA}_2$  biotinilada na presença e ausência de DTT 10 mM,  $\text{PGA}_2$  biotinilada (10  $\mu\text{M}$  final) e com excesso de  $\text{PGA}_2$  a 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. (A) Imagem representativa da banda de 70 kDa. (B) Imagem representativa da HMG-CoA. (C) Histograma representando o imunocconteúdo de HMG-CoA.

\* diferença significativa entre os grupos controle e *foam cells*, tratados com DTT em relação aos grupos controle e *foam cells*, na presença de  $\text{PGA}_2$  biotinilada ou em conjunto com a  $\text{PGA}_2$  fria 10  $\mu\text{M}$ , sem DTT ( $p < 0,05$ ).

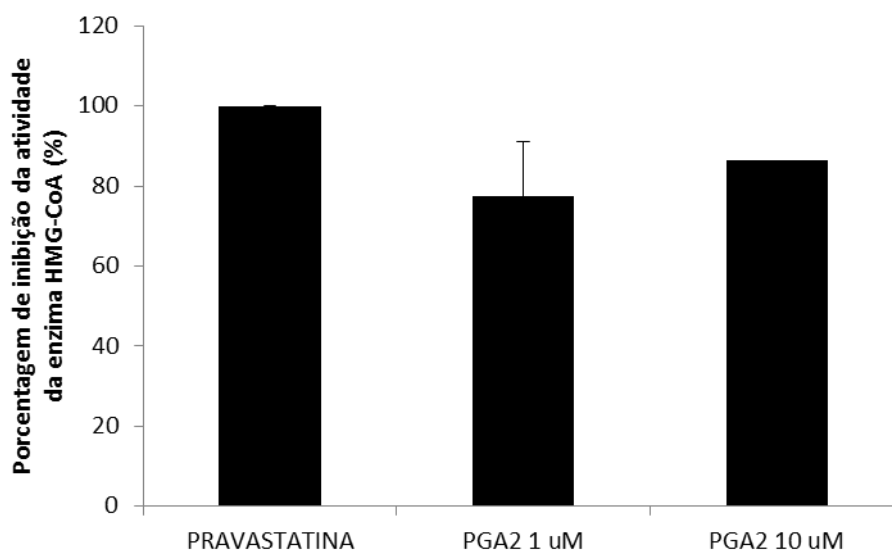
\*\* diferença significativa entre os grupos controle e *foam cells*, tratados com DTT em relação ao grupo *foam cell*, na presença de  $\text{PGA}_2$  biotinilada em conjunto com a  $\text{PGA}_2$  fria 20  $\mu\text{M}$ , sem DTT ( $p < 0,01$ ).

\*\*\* diferença significativa entre os grupos controle e *foam cells*, tratados com DTT em relação ao grupo controle, na presença de  $\text{PGA}_2$  biotinilada em conjunto com a  $\text{PGA}_2$  fria  $20 \mu\text{M}$ , sem DTT ( $p < 0,001$ ).

+ diferença significativa entre os grupos controles tratados com  $\text{PGA}_2$  fria e *foam cell* sem  $\text{PGA}_2$  fria, todos sem DTT, em relação aos grupos *foam cells*, na presença de  $\text{PGA}_2$  biotinilada em conjunto com a  $\text{PGA}_2$  fria ( $10 \mu\text{M}$  e  $20 \mu\text{M}$ ) e demais grupos tratados com DTT ( $p < 0,001$ ).

#### 4.3. MEDIDA DA ATIVIDADE DA HMG-CoA REDUTASE

No presente estudo, avaliamos a atividade da HMG-CoA redutase através de Kit de Atividade da HMG-CoA Redutase, Sigma CS1090. As atividades observadas na presença  $\text{PGA}_2$  ( $1 \mu\text{M}$  e  $10 \mu\text{M}$ ) ou em sua ausência (etanol, como veículo), foram comparadas às atividades medidas na presença de um potente inibidor da HMG-CoA (pravastatina,  $0,5 \mu\text{M}$ ) que pertence à classe das estatinas. Foram testadas diferentes concentrações de prostaglandinas. Os resultados (figura 11) mostraram que a  $\text{PGA}_2$  ( $1 \mu\text{M}$ ) promove uma redução de  $77,29 \pm 13,83\%$  e que, em concentrações maiores (e.g.  $10 \mu\text{M}$ ), a  $\text{PGA}_2$  pode inibir até  $86,4\%$  a atividade da enzima. A partir desses resultados, calculamos a dose inibitória 50% que foi estimada em cerca de  $0,13 \mu\text{M}$ . Outros experimentos, variando a proporção de DTT na preparação enzimática são necessários, no entanto, para avaliar-se a dose efetiva em condições fisiológicas.





**Fig. 11:** Medida da atividade da HMG-CoA redutase através de kit específico (Sigma), comparando inibidor conhecido (pravastatina) com  $\text{PGA}_2$  (1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ). Dados representados por média  $\pm$  desvio padrão da média.

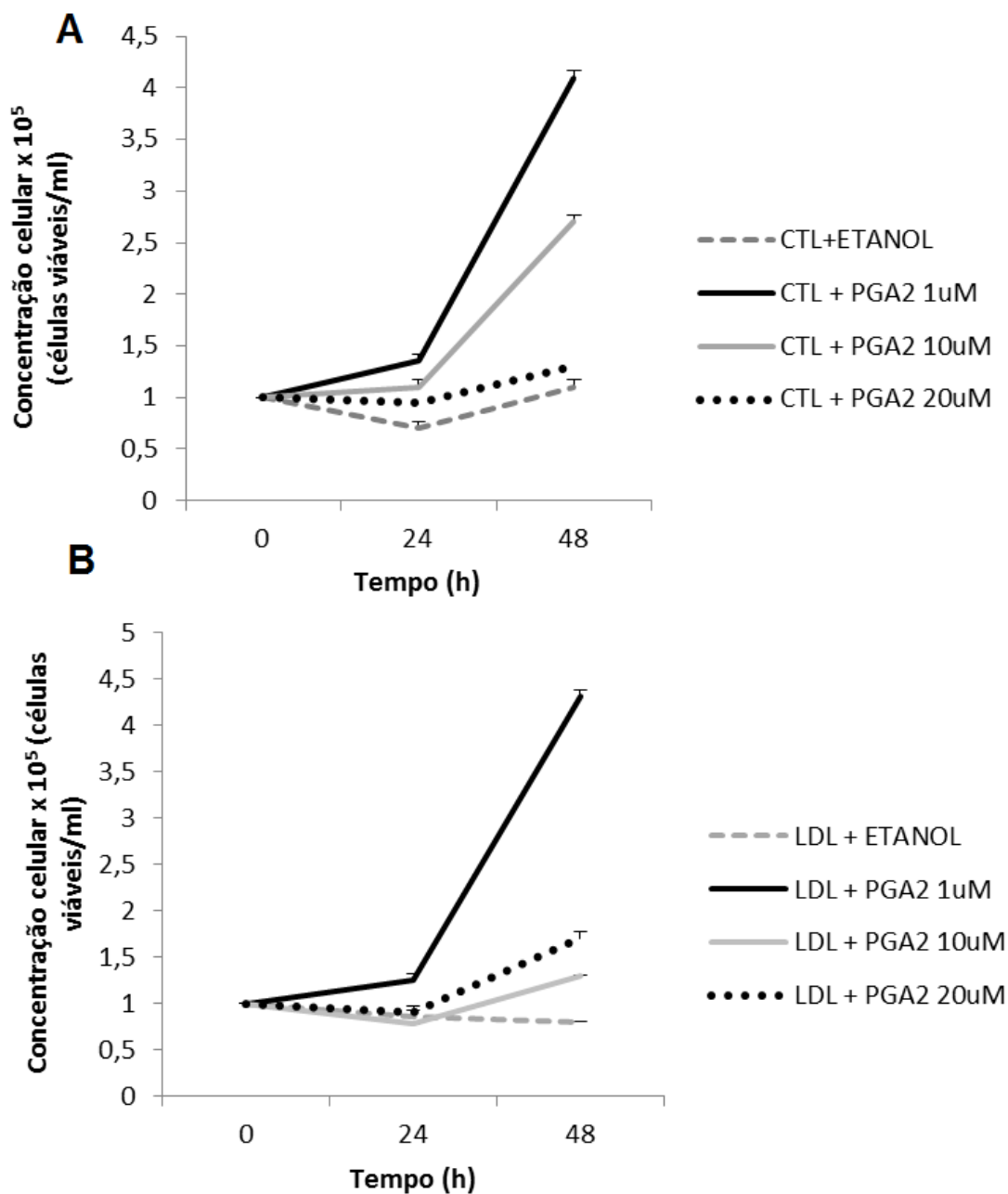
#### **4.4. CURVAS DE CRESCIMENTO DE MACRÓFAGOS E FOAM CELLS TRATADAS COM $\text{PGA}_2$ EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

Para avaliar os possíveis efeitos citotóxicos da  $\text{PGA}_2$  nas concentrações utilizadas, um estudo completo da ação da  $\text{PGA}_2$  nas diferentes doses usadas neste estudo, sobre os macrófagos U937 tratados ou não com LDL, foi feita uma curva que observa o crescimento destas células.

A Figura 12 apresenta a curva de crescimento das células U937 e *foam cells* em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, tratadas ou não com  $\text{PGA}_2$  em diferentes dosagens (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ ) nos tempos 0 h, 24 h e 48 h. Foram plaqueadas  $1,0 \times 10^5$  células por *well* em duplicata. Os resultados foram em termos do número de células  $\times 10^5/\text{ml}$ , sendo consideradas apenas as células viáveis.

No tempo 24 h, pode-se observar que houve um crescimento mais acentuado ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) das células dos grupos com LDL e sem LDL oxidada, tratadas com  $\text{PGA}_2$  na menor concentração (1  $\mu\text{M}$ ). Em doses maiores, a  $\text{PGA}_2$  passa a ser citotóxica, reduzindo a quantidade de células viáveis (até 10  $\mu\text{M}$ ) ou mesmo provocando a morte das mesmas (20  $\mu\text{M}$ ).

Quando analisadas após 48 h de tratamento, observa-se novamente maior número de células nos grupos controle e *foam cell* tratados com menor concentração de  $\text{PGA}_2$  (1  $\mu\text{M}$ ) em relação a todos os outros grupos ( $p < 0,001$ ), sendo que, contudo, os grupos tratados com maiores concentrações já apresentam retomada de crescimento. Sendo assim, na dose utilizada em que ocorre efetiva inibição da HMG-CoA redutase, observa-se que a  $\text{PGA}_2$  não apresenta efeito citotóxico para as células, apesar de bloquear a síntese de colesterol pelas mesmas.



**Fig. 12:** Curvas de crescimento de macrófagos U937 (A) e *foam cells* (B), sem PGA<sub>2</sub> e com PGA<sub>2</sub> nas concentrações 1 μM, 10 μM e 20 μM, nos tempos 0 h, 24 h e 48 h. Os resultados mostram as concentrações celulares x 10<sup>5</sup>/ml, sendo incluídas apenas células viáveis. Os dados são expressos em média ± desvio padrão da média.

## DISCUSSÃO

Sabe-se que a aterosclerose é uma das principais causas de morte no planeta e devido a este crescente índice a investigação científica nessa área, principalmente relacionada a possíveis alvos terapêuticos se faz necessária (McLaren *et al.*, 2011). Entendendo que desbalanços no metabolismo lipídico, em geral, são características importantes do processo de aterosclerose, compreender a correlação dessa patologia com as alterações lipídicas demanda uma investigação detalhada de muitos aspectos do metabolismo destes lipídeos.

Nesse sentido, a presença de cisteínas reativas em enzimas-chave desta rota metabólica pode determinar, ou não, o acúmulo de colesterol intracelular e, assim, a progressão da aterosclerose (Gutierrez *et al.*, 2007). O potente efeito inibitório das CP-PGs no processo aterogênico *in vivo* (Homem de Bittencourt Jr. *et al.*, 2007) vem a sugerir uma nova conceituação da aterosclerose e de seu tratamento. Porém são raros os estudos com estes prostanoídeos em relação ao processo aterogênico.

O presente trabalho se originou de respostas que surgiram a partir de estudos do nosso grupo de pesquisa que demonstraram que ao incubar macrófagos por 18 h com LDL oxidada, tornando-os *foam cells* e em seguida tratá-las por 24 h com  $\text{PGA}_2$  1  $\mu\text{M}$ , uma dose na qual se obtém efeito e que não é considerada tóxica para as células, houve uma diminuição na formação de colesterol endógeno, determinando assim que há modificação em rotas bioquímicas por ação desta CP-PG (Homem de Bittencourt Jr. *et al.*, 2007).

Resultados deste mesmo estudo mostraram um aumento na expressão do mRNA da enzima HMG-CoA redutase em *foam cells*, bem como uma redução nessa expressão em macrófagos controle, quando tratados com  $\text{PGA}_2$  (Homem de Bittencourt Jr. *et al.*, 2007).

Em nosso estudo, verificamos a imunodeteção da enzima HMG-CoA redutase através de imunoprecipitação e eletroforese SDS-PAGE. Não encontramos diferenças significativas entre os grupos estudados (macrófagos e macrófagos *foam cells*, tratados ou não com  $\text{PGA}_2$ ), apesar de haver um aparente aumento nos grupos tratados com LDL oxidada. Porém observamos um aumento significativo no imunoconteúdo da HMG-CoA redutase em células

tratadas com LDL oxidada apenas no experimento com  $\text{PGA}_2$  biotinilada. Esses resultados vão ao encontro com resultados prévios de nosso grupo, no qual o tratamento com LDL-oxidada e com  $\text{PGA}_2$  fria também não mostraram alterações neste parâmetro.

Não há estudos que relacionem o uso de prostaglandinas com o imunoconteúdo de HMG-CoA redutase. No entanto, trabalhos com outro tipo de prostaglandina mostraram que houve uma diminuição nos níveis de expressão de mRNA de HMG-CoA redutase em fígado de ratos OLETF, um modelo animal para diabetes tipo 2, tratados com Beraprost sódico (BPS), um análogo sintético estável da prostaglandina  $\text{I}_2$  ( $\text{PGI}_2$ ) quando comparados com ratos não tratados (Watanabe *et al.*, 2010).

Outro trabalho, no qual ratas grávidas foram tratadas com  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , mostrou que esta prostaglandina foi capaz de reduzir a expressão do gene da enzima HMG-CoA sintase (Stocco *et al.*, 2001).

Compostos análogos à  $\text{PGA}_2$ , como a  $\text{PGA}_2$  biotinilada são capazes de marcar proteínas celulares. Segundo Parker (1995) a  $\text{PGA}_2$  biotinilada é capaz de se ligar a proteínas entre 43 kDa e 56 kDa em vários tipos celulares. O DTT é um potente redutor de ligações dissulfeto e de sulfetos orgânicos mistos, enquanto que a  $\text{PGA}_2$  é um potente agente eletrofílico que pode reagir especificamente com cisteínas reativas. Dessa forma, durante o ensaio é possível que eles reajam entre si ou que o DTT desloque a  $\text{PGA}_2$  ligada covalentemente por adição de Michael em cisteínas da HMG-CoA redutase, visto que ele pode romper este tipo de ligação.

Sendo assim, incubamos macrófagos e *foam cells* com  $\text{PGA}_2$  biotinilada, e procedemos a um estudo de competição com  $\text{PGA}_2$  fria em duas concentrações (10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ ) e ainda ensaiamos algumas amostras com DTT (10 mM), durante dois tempos (2 h ou 6 h).

Os resultados mostraram que, de fato, o DTT praticamente aboliu a incorporação de  $\text{PGA}_2$  biotinilada às proteínas imunoprecipitadas com anticorpo anti-HMG-CoA redutase, sugerindo que, realmente, a  $\text{PGA}_2$  liga-se à molécula da HMG-CoA redutase através de uma reação de adição de Michael.

Também observa-se a presença de uma banda com peso molecular de ~70 kDa no tratamento de 6 h nas células controle tratadas com  $\text{PGA}_2$  biotinilada e em conjunto com  $\text{PGA}_2$  fria (10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ ) e nas *foam cells* na

ausência de  $\text{PGA}_2$  fria. Como no experimento foi feita imunoprecipitação da enzima HMG-CoA redutase, essa banda só pode ser devida à própria enzima. Esse resultado não é visto no tratamento de 2 h. O presente dado sugere que no tempo de 6 h possa haver um aumento da expressão da HMG-CoA redutase, sendo que o tempo de 2 h não foi suficiente para obter-se o mesmo efeito, porém um experimento de RT-PCR deve ser realizado para confirmar essa possível alteração na expressão do gene codificando para a enzima.

Em relação à atividade da HMG-CoA redutase, nossos estudos confirmam resultados encontrados em estudo anterior de nosso laboratório, o qual avaliou a atividade desta enzima em macrófagos/*foam cells* mediada por  $\text{PGA}_2$ . O ensaio da atividade da enzima foi feito sem DTT (ditiotreitól) e com DTT, de forma que durante o ensaio seria possível que o DTT e a  $\text{PGA}_2$  reagissem entre si ou que o DTT deslocasse a  $\text{PGA}_2$  ligada covalentemente por adição de Michael na cisteína da HMG-CoA redutase. Como essa enzima também possui resíduos de cisteína reativos localizados próximos ou no seu sítio catalítico (Capel & Hilbert, 1993); ela também poderia ser modulada pelo estado redox e/ou pela  $\text{PGA}_2$ .

Os resultados obtidos mostram que a  $\text{PGA}_2$  1  $\mu\text{M}$  adicionada a macrófagos peritoneais controle diminuiu drasticamente a atividade desta enzima comparado às células que não receberam tratamento algum, em 1 h e 24 h, quando o ensaio é realizado sem DTT. O tratamento das amostras de 24 h com ditiotreitól (DTT, 10 mM) no momento do ensaio reverteu completamente a inibição.

No presente estudo, no entanto, a própria preparação do kit traz DTT em sua formulação, de sorte que os resultados poderiam ser ainda mais exacerbados se utilizássemos uma amostra de enzima extraída das células ao invés da enzima recombinante purificada. Mesmo assim, os resultados do  $\text{IC}_{50}$  aparente calculado revelam que, nessas condições, a  $\text{PGA}_2$  apresenta uma dose inibitória 50% de cerca de 0,14  $\mu\text{M}$  o que representa bastante sensibilidade, tendo em vista que a pravastatina, uma das mais potentes estatinas disponíveis no mercado (e.g. PRAVACOL de Bristol) possui uma dose inibitória de 100% a 0,5  $\mu\text{M}$ .

Neste trabalho foi feita uma curva de crescimento de macrófagos U937 incubados ou não com LDL-oxidada e tratadas ou não com  $\text{PGA}_2$  em diferentes

concentrações (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ), nos tempos 0 h, 24 h e 48 h para avaliar-se um possível efeito citotóxico nas doses que efetivamente inibem a enzima HMG-CoA redutase. Pôde-se observar que as células tratadas com  $\text{PGA}_2$  na menor dose (1  $\mu\text{M}$ ), tiveram inclusive um aumento de proliferação quando comparadas com aquelas que não foram tratadas com este prostanóide ou que foram tratadas com concentrações mais elevadas do mesmo.

Estudos mostram que em baixas concentrações de  $\text{PGA}_2$  as células ficam ainda mais saudáveis em cultura, fato que se relaciona com o aumento na síntese de glutathiona intracelular, visto que ela é um dos principais determinantes da resistência da célula a espécies reativas de oxigênio e compostos eletrofílicos citotóxicos, gerados por processos oxidativos. Sabe-se que as CP-PGs da família A reagem com glutathiona e o comportamento celular em resposta a esses prostanóides começa com a depleção da própria glutathiona, a qual aumenta a expressão/atividade de enzimas chave do seu metabolismo, culminando com a melhoria da sua concentração intracelular. (Homem de Bittencourt *et al.*, 1998a e 1998c). Outros estudos também demonstram que células tratadas com 15d-PGJ<sub>2</sub>, outra CP-PG, tem seus níveis de glutathiona reduzida celular e a atividade da GSPx diminuídos (Kim & Surh, 2006).

As CP-PGs podem formar ligações covalentes com grupamento tiol presente na glutathiona e em algumas proteínas (Gayarre *et al.*, 2007). Muitas destas proteínas já foram identificadas e as modificações funcionais importantes que a ligação destes prostanóides promovem ao ligarem-se a grupamentos sulfidríla nas proteínas podem contribuir para seus efeitos biológicos (Gayarre *et al.*, 2005). Através de modificações covalentes, a 15d-PGJ<sub>2</sub>, outra CP-PG, por exemplo, pode oxidar resíduos críticos de fatores de transcrição sensíveis ao estado redox ou seus reguladores (Kim & Surh, 2006).

Já doses maiores, a  $\text{PGA}_2$  passa a ser citotóxica, tendo um efeito antiproliferativo, reduzindo a quantidade de células viáveis (até 10  $\mu\text{M}$ ) ou mesmo provocando a morte das mesmas (20  $\mu\text{M}$ ) (Homem de Bittencourt *et al.*, 1998a e 1998c). Outro estudo mostra uma inibição da proliferação celular em MSF-7, uma linhagem celular de câncer de mama, quando tratadas com  $\text{PGA}_2$  na dose de 36  $\mu\text{M}$  (Gorospe, *et al.*, 2006).

Um estudo mais amplo comparou quatro prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs), sendo elas PGJ<sub>2</sub>, PGA<sub>1</sub>, 16, 16-dimetil PGA<sub>1</sub> e PGA<sub>2</sub> e ainda outra prostaglandina, a PGE<sub>2</sub>, mostrando que houve uma inibição dose-dependente significativa no crescimento de células escamosas de carcinoma oral humano (SCC-15). A PGJ<sub>2</sub> mostrou maior inibição, seguida da PGA<sub>1</sub>, 16, 16-dimetil PGA<sub>1</sub> e PGA<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub> (EIAttar & Virji, 1997).

## CONCLUSÃO

Com o presente trabalho pode-se concluir que:

- 1- Não houve diferença significativa na imunodeteção de HMG-CoA redutase em macrófagos e *foam cells*, quando tratados com  $\text{PGA}_2$  por 24 h;
- 2- Houve diferença significativa na imunodeteção de HMG-CoA redutase entre macrófagos e macrófagos *foam cells*, quando tratados com  $\text{PGA}_2$  biotinilada por 2 h e 6 h, ocorrendo uma enorme redução naqueles grupos tratados com DTT, quando comparados aos grupos sem DTT;
- 3- A  $\text{PGA}_2$  foi capaz de reduzir a atividade da HMG-CoA, através de kit específico em até 86,4% (na dose de 10  $\mu\text{M}$ ) sendo que, a 1  $\mu\text{M}$  (dose não tóxica, como avaliado pelas curvas de crescimento), a inibição média da enzima foi de 77,29%;
- 4- Macrófagos U937 e U937/*foam cells* tratados com  $\text{PGA}_2$  (1  $\mu\text{M}$ ) tiveram um aumento na proliferação celular quando comparados com aqueles que não receberam tratamento ou que foram tratadas com doses mais altas da  $\text{PGA}_2$ .



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMICI, C.; SISTONEN, L.; SANTORO, M.G.; MORIMOTO, R. Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, 6227-31, 1992.

ATSMON, J.; SWEETMAN, B.J.; BAERTSCHI, S.W.; HARRIS, T.M.; ROBERTS, L.J. 2nd. Formation of thiol conjugates of 9-deoxy-delta 9,delta12(E)-prostaglandin D2 and delta 12(E)-prostaglandin D2. **Biochemistry**, v. 29(15):3760-5, 1990.

AZNAR-SALATTI, J.; BASTIDA, E.; HAAS, T. A.; ESCOLAR, G.; ORDINAS, A. Platelet adhesion to exposed endothelial cell extracellular matrix is influenced by the method of preparation. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 11:436-442, 1991.

BELLÓ-KLEIN, A.; BOCK, P.; TRAVACIO, M.; SENNA, S.M.; LLESUY, S.F.; HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I.; IRIGOYEN, M.C.C.; BELLÓ, A.A.; KUMAN, D.; SINGAL, P.K. Myocardial oxidative stress and antioxidants in hypertension as a result of nitric oxide synthase inhibition. **Cardiovascular Toxicology**, v. 1:43-50, 2001.

BERNARD, D.W., RODRIGUEZ, A., ROTHBLAT, G.H., AND GLICK, J.M. cAMP stimulates cholesteryl ester clearance to high density lipoproteins in J7774 macrophages. **J. Biol. Chem.**, v. 266 (2): 710-6, 1991.

BOBRY SHEV, Y.V. Monocyte recruitment and *foam cell* formation in atherosclerosis. **Micron.**, v. 37:208–22, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72:248-54, 1976.

BROWN, M.S.; HO, Y.K.; GOLDSTEIN, J.L. The cholesteryl ester cycle in macrophage *foam cells*. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255:9344-52, 1980.

BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. **Annual review of biochemistry**, v. 52:223-61, 1983.

BICKLEY, J.F.; CIUCCI, A.; EVANS, P.; ROBERTS, S.M.; ROSS, N.; SANTORO, M.G. Reactions of some cyclopentenones with selected cysteine derivatives and biological activities of the product thioethers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12(12):3221-7, 2004.

BUEGE, J.A. & AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52:302-310, 1978.

CAPPEL, R.E.; GILBERT, H.F. Oxidative inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and subunit cross-linking involve different dithiol/disulfide centers. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268:342-8, 1993.

COLLINS, T.; READ, M.A.; NEISH, A.S.; WHITLEY, M.Z.; THANOS, D.; MANIATIS, T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- $\kappa$ B and cytokine-inducible enhancers. **The FASEB Journal**, v. 9:899-909, 1995.

CHANG, T.Y.; CHANG, C.C.; LIN, S.; YU, C.; LI, B.L.; MIYAZAKI A. Roles of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 and -2. **Curr Opin Lipidol**, v. 12:289-96, 2001.

CHEN, Y.; MORROW, J.; ROBERTS II, L.J. Formation of Reactive Cyclopentenone Compounds in Vivo as Products of the Isoprostane Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274(16): 10863-10868, 1999.

DRAPER, H.H.; SQUIRES, E.J.; MAHMOODI, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 15:353-363, 1993.

ELATTAR, T.M.; VIRJI, A.S. Inhibition of growth in oral squamous carcinoma cells by cyclopentenone prostaglandins: comparison with chemotherapeutic agents. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 56(6):461-5, 1997.

FEINSTEIN, D.L.; GALEA, E.; AQUINO, D.A.; LI, G.C.; XU, H.; REIS, D.J. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric-oxide synthase expression by decreasing NF- $\kappa$ -B activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271 (30):17724-32, 1996.

FITZPATRICK, F.A. & WYNALDA, M.A. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D<sub>2</sub>: identification of products formed in vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258(19): 11713-8, 1983.

FORMAN, B.M.; TONTONOZ, P.; CHEN, J.; BRUN, R.P.; SPIEGELMAN, B.M.; EVANS, R.M. 15-deoxy-delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$ . **Cell**, v. 83: 803-12, 1995.

FROSTEGÅRD, J.; NILSSON, J.; HAEGERSTRAND, A.; HAMSTEN, A.; WIGZELL, H.; GIDLUND, M. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87:904-8, 1990.

FROSTEGÅRD, J.; WU, R.; HAEGERSTRAND, A.; PATARROYO, M.; HAEGERSTRAND, A.; LEFVERT, A.-K.; NILSSON, J. Mononuclear leukocytes exposed to oxidized low density lipoprotein secrete a factor that stimulates endothelial cells to express adhesion molecules. **Atherosclerosis**, v. 103:213-9, 1993.

FUHRMAN, B.; JUDITH, O.; KEIDAR, S.; BEN-YAISH, L.; KAPLAN, M.; AVIRAM, M. Increased uptake of LDL by oxidized macrophages is the result of an initial enhanced LDL receptor activity and of a further progressive oxidation of LDL. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23(1):34–46, 1997.

GAYARRE, J.; STAMATAKIS, K.; RENEDO, M.; PÉREZ-SALA, D. Differential selectivity of protein modification by the cyclopentenone prostaglandins PGA1 and 15-deoxy-12,14-PGJ2: Role of glutathione. **FEBS Letters**, v. 579(25):5803-8, 2005.

GAYARRE, J.; AVELLANO, M.I.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, F.J.; CARRASCO, M.J.; CAÑADA, F.J.; PÉREZ-SALA, D. Modification of proteins by cyclopentenone prostaglandins is differentially modulated by GSH in vitro. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1096:78-85, 2007.

GESQUIÈRE, L.; LOREAU, N.; BLACHE, D. Impaired cellular cholesterol efflux by oxysterol-enriched high density lipoproteins. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23 (4): 541-7, 1997.

GHOSH, S.; NATARAJAN, R.; PANDAK, W.M.; HYLEMON, P.B.; GROGAN, W.M. Regulation of hepatic neutral cholesteryl ester hydrolase by hormones and changes in cholesterol flux. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 274:G662-G668, 1998.

GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 46:897-930, 1977.

GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343:425-430, 1990.

GOROSPE, M.; LIU, Y.; XU, Q.; CHREST, F.J.; HOLBROOK, N.J. Inhibition of G1 Cyclin-Dependent Kinase Activity during Growth Arrest of Human Breast

Carcinoma Cells by Prostaglandin A<sub>2</sub>. **Molecular and Cellular Biology**, 762–770, 1996.

GRIENGLING, K.K. & ALEXANDER, R.W. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. **The FASEB Journal**, v. 10(2): 283-92, 1996.

GROSS, S.S. & WOLIN, M.S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annual Review of Physiology**, v. 57: 737-69, 1995.

GUDEWICZ, P.W. & FREWIN, M.B. Surface contact modulation of inflammatory macrophage antibody dependent cytotoxicity and prostanoic release. **Journal of Cellular Physiology**, v. 149:195-201, 1991.

GUDEWICZ, P.W.; FREWIN, M.B.; HEINEL, L.A.; MINNEAR, F.L. Priming of human monocyte superoxide production and arachidonic acid metabolism by adherence to collagen- and basement membrane-coated surfaces. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 55:423-9, 1994.

GUTIERREZ, L.L.; MASLINKIEWICZ, A.; CURI, R.; HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I. Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. **Biochemical Pharmacology**, v. 75(12):2245-2262, 2008.

HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I.; PERES, C.M.; YANO, M.M.; HIRATA, M.H.; CURI, R. Pyruvate is a lipid precursor for rat lymphocytes in culture: evidence for a lipid exporting capacity. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 30:631-41, 1993.

HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I.; YANO, M.M.; HIRATA, M.H.; WILLIAMS, J.F.; CURI, R. Evidence that prostaglandins modulate lipogenesis in cultured lymphocytes--a comparison with its effect on macrophages and tumour cells. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 33(3):463-75, 1994.

HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I., & CURI, R. Transfer of cholesterol from macrophages to lymphocytes in culture. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 44: 347-62, 1998a.

HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I.; SENNA, S.; VIDOR, A.; MIYASAKA, C.; CURI, R.; WILLIAMS, J. Glutathione metabolism and glutathione S-conjugate export ATPase (MRP1/GS-X pump) activity in cancer. **IUBMB Life (London)**, Canberra, v. 45: 1243-1254, 1998c.

HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I.; LAGRANHA, D.J.; MASLINKIEWICZ, A.; SENNA, S.M.; TAVARES, A.M.; BALDISSERA, L.P.; JANNER, D.R.; PERALTA, J.S.; BOCK, P.M.; GUTIERREZ, L.L.; SCOLA, G.; HECK, T.G.; KRAUSE, M.S.; CRUZ, L.A.; ABDALLA, D.S.; LAGRANHA, C.J.; LIMA, T.; CURI, R. LipoCardium: Endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. **Atherosclerosis**, v. 193: 245-258, 2007.

IKONEN, E. Mechanisms of cellular cholesterol transport: defects and human disease. **Physiol Rev**; v. 86:1237–61, 2006.

JANG, I.K.; LASSILA, R.; FUSTER, V. Atherogenesis and inflammation. **European Heart Journal**, v. 14(Supp. K):2-6, 1993.

KIKAWA, Y.; NARUMIYA, S.; FUKUSHIMA, M.; WAKATSUKA, H.; HAYAISHI, O. 9-deoxy-delta 9, delta 12-13,14-dihydroprostaglandin D2, a metabolite of prostaglandin D2 formed in human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81: 1317-21, 1984.

KIM, E.H.; SURH, Y.J. 15-Deoxy-D12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. **Biochemical Pharmacology**, v. 72:1516-1528, 2006.

KIM, Y.-M.; DE VERA, M.E.; WATKINS, S.C.; BILLIAR, T.R. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced

apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272 (2): 1402-11, 1997.

KLIEWER, S.A.; LENHARD, J.M.; WILSON, T.M.; PATEL, I.; MORRIS, D.C.; LEHMANN, J.M. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. **Cell**, v. 83: 813-19, 1995.

KOHNO, H.; SUESHIGE, N.; OGURI, K.; IZUMIDATE, H.; MASUNARI, T.; KAWAMURA, M.; ITABE, H.; TAKANO, T.; HASEGAWA, A.; NAGAI, R. Simple and practical sandwich-type enzyme immunoassay for human oxidatively modified low density lipoprotein using antioxidized phosphatidylcholine monoclonal antibody and antihuman apolipoprotein-B antibody. **Clinical Biochemistry**, v. 33:243-253, 2000.

LI, A.C.; GLASS, C.K. The macrophage *foam cell* as a target for therapeutic intervention. **Nature Medicine**, v. 8:1235–42, 2002.

LEE, J.-Y.; & CARR, T. Dietary Fatty Acids Regulate Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase and Cytosolic Cholesteryl Ester Hydrolase in Hamsters. **The Journal of Nutrition**, v. 134(12):3239-44, 2004.

LUSIS, A.J.; Atherosclerosis. **Nature**, v. 407(6801): 233–241, 2000.

MACLAREN, J.E.; Michael, D.R; Ashlin, T.G.; Ramji, D.P. Cytokines, macrophage lipid metabolism and *foam cells*: Implications for cardiovascular disease therapy. **Progress in Lipid Research**, v. 50: 331–347, 2011.

MARTINEZ, F.O., HELMING L., GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**; v. 27:451–83, 2009.

MUSIEK, E.S.; GAO, L.; MILNE, G.L.; HAN, W.; EVERHART, M.B.; WANG, D.; BACKLUND, M.G.; DUBOIS, R.N.; ZANONI, G.; VIDARI, G.; BLACKWELL,

T.S.; MORROW, J.D. Cyclopentenone isoprostanes inhibit the inflammatory response in macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280(42):35562-70, 2005.

MORENO, J.J. & MITJAVILA, M.T. The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review). **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14(4):182-95, 2003.

NAGOSHI, H.; UEHARA, Y.; KANAI, F.; MAEDA, S.; OGURA, T.; GOTO, A.; TOYO-OKA, T.; ESUMI, H.; SHIMIZU, T.; OMATA, M. Prostaglandin D2 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in rat vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 82 (2): 204-9, 1998.

NAGY, L.; TONTONOZ, P.; ALVAREZ, J.G.A.; CHEN, H.; EVANS, R. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR $\alpha$ . **Cell**, v. 93:229-240, 1998.

NARUMIYA, S. & FUKUSHIMA, M. Delta 12-prostaglandin J2, an ultimate metabolite of prostaglandin D2 exerting cell growth inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 127(3): 739-45, 1985.

OHNO, K.; FUJIWARA, M.; FUKUSHIMA, M.; NARUMIYA, S. Metabolic dehydration of prostaglandin E2 and cellular uptake of the dehydration product: correlation with prostaglandin E2-induced growth inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 139(2): 808-15, 1986.

OLIVEROS, L.B.; VIDELA, A.M.; GIMÉNEZ, M.S. Effect of dietary fat saturation on lipid metabolism, arachidonic acid turnover and peritoneal macrophage oxidative stress in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37(3) 311-320, 2004.

OREKHOV, A. N.; TERTOV, V. V.; KABAKOV, A. E. Autoantibodies against modified low density lipoprotein - Nonlipid factor of blood plasma that stimulates *foam cell* formation. **Arterioscler. Thromb**, v. 11:316-26, 1991.



PARKER, J. Prostaglandin A2 protein interactions and inhibition of cellular proliferation. **Prostaglandins**, v. 50, 359–375, 1995.

PIVA, R.; GIANFERRETTI, P.; CIUCCI, A.; TAULLI, R.; BELARDO, G.; SANTORO, M.G. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis in human malignant B cells: an effect associated with inhibition of NF-kappa B activity and down-regulation of antiapoptotic proteins. **Blood**, v. 105(4):1750-8, 2005.

RESNICK, N. & GIMBRONE JR, M.A. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. **The FASEB Journal**, v. 9 (10): 874-82, 1995.

RICOTE, M.; HUANG, J.; FAJAS, L.; LI, A.; WELCH, J.; NAJIG, J.; WITZTUM, J.; AUERX, J.; PALINSKI, W.; GLASS, C.K. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95:7614-19, 1998.

ROMA, P.; BERNINI, F.; FOGLIATTO, R.; BERTULLI, S.M.; NEGRI, S.; FUMAGALLI, R.; CATAPANO, A.L. Defective catabolism of oxidized LDL by J774 murine macrophages. **Journal of Lipid Research**, v. 33:819-29, 1992.

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. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 87:90-9, 1991.

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

ROSS, R. Cell biology of atherosclerosis. **Annual Review of Physiology**, v. 57:791-804, 1995.

ROSSI, A. & SANTORO, M.G. Induction by prostaglandin A1 of haem oxygenase in myoblastic cells: an effect independent of expression of the 70kDa heat shock protein. **The Biochemical Journal**, v. 308(pt2):455-63,1995.

ROSSI, A.; EIA, G.; SANTORO, M.G. Inhibition of nuclear factor kappa B by prostaglandin A1: na effect associated with heat shock transcription factor activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 94(2): 746-50, 1997.

ROSSI, A.; KAPAHI, P.; NATOLI, G.; TAKAHASHI, T.; CHEN, Y.; KARIM, M.; SANTORO, M.G. Antiinflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I $\kappa$ -B kinase. **Nature**, v. 403:103-108, 2000.

SCHMITZ, G.; HANKOWITZ, J.; KOVACS, E.M. Cellular processes in atherogenesis: potential targets of Ca<sup>2+</sup> channel blockers. **Atherosclerosis**, v. 88:109-132, 1991.

SCOTT, W.A.; PAWLOWSKI, N.A.; MURRAY, H.W.; ANDREACH, M.; ZRIKE, J.; COHN, Z.A. Regulation of arachidonic acid metabolism by macrophage activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 155 (4):1148-60, 1982.

SENNA, S.M.; MORAES, R.B.; BRAVO, M.F.R.; OLIVEIRA, R.R.; MIOTTO, G.C.; VIDOR, A.C.; BELLÓ-KLEIN, A.; IRIGOYEN, M.C.C.; BELLÓ, A.A.; CURI, R.; HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I. Effects of prostaglandins and nitric oxide on rat macrophage lipid metabolism in culture: implications for arterial wall-leukocyte interplay in atherosclerosis. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 46:1007-18, 1998.

SHIMADA, K. Immune system and atherosclerotic disease: heterogeneity of leukocyte subsets participating in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circ J.**; v. 73:994–1001, 2009.

SIMPSON, P.J., MICKELSON, J., FANTONE, J.C., GALLAGHER, K.P., AND LUCCHESI, B.R. Reduction of experimental canine myocardial infarct size with prostaglandin E1: inhibition of neutrophil migration and activation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 244(2): 619-24, 1988.

SOLOMONS, T.W.G. **Química Orgânica**. volume 2, 7.ed. pg 73. Rio de Janeiro:LTC, 2002.

STOCCO, C.; CALLEGARI, E.; GIBORI, G. Opposite effect of prolactin and prostaglandin F(2 alpha) on the expression of luteal genes as revealed by rat cDNA expression array. **Endocrinology**, v. 142:4158-4161, 2001.

STRAUS, D.S. & GLASS, C.K. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. **Medicinal Research Reviews**, v. (3):185-210, 2001.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996.

TABAS, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. **Nature Rev Immunol**; v. 10:36–46, 2010.

TAVARES, A.M.V.; PERALTA, J.S.; CURI, R.; HOMEM de BITTENCOURT JR, P. I. Prostaglandina A2 inibe a síntese de lípidos por macrófagos - *foam cells*: repercursão para o acúmulo vascular de gorduras na aterosclerose. In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2003, Curitiba. **XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, v. 18(116-116), 2003.

THYBERG, J.; HEDIN, U.; SJÖLUND, M.; PALMBERG, L.; BOTTGER, B. A. Regulation of differentiated properties of arterial smooth muscle cells. **Arteriosclerosis**, v. 10:966-90, 1990.

TONTONOZ, P.; NAGY, L.; ALVAREZ, J.G.A.; THOMAZY, V.A.; EVANS, R.M. PPAR $\alpha$  promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. **Cell**, v. 93:241-52, 1998.

URADE, Y.; UJIHARA, M.; HORIGUCHI, Y.; IKAI, K.; HAYAISHI, O. The major source of endogenous prostaglandin D<sub>2</sub> production is likely antigenpresenting cells: localization of glutathione requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic and Kupffer cells in various rat tissues. **Journal of Immunology**, v. 143: 2982-9, 1989.

VASSAUX, G.; GAILLARD, D.; AILHAUD, G.; NÉGREL, R. Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation. Its dual role as a cAMP- and Ca<sup>2+</sup>-elevating agent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267:11092-7, 1992a.

VASSAUX, G.; GAILLARD, D.; DARIMONT, C.; AILHAUD, G.; NÉGREL, R. Differential response of preadipocytes and adipocytes to prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub>: physiological implications. **Endocrinology**, v. 131:2393-8, 1992b.

XIE, C.; WOOLLETT, L.A.; TURLEY, S.D.; DIETSCHY, J.M. Fatty acids differentially regulate hepatic cholesteryl ester formation and incorporation into lipoproteins in the liver of the mouse. **Journal of Lipid Research**, v. 43(9):1508-19, 2002.

WATANABE, M.; NAKASHIMA, H.; ITO, K.; MIYAKE, K.; SAITO, T. Improvement of dyslipidemia in OLETF rats by the prostaglandin I<sub>2</sub> analog beraprost sodium. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**; v. 93(1-2):14-9, 2010.

WHO – World Health Organization. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>> Acesso em 02 de Março de 2012.

WHO – World Health Organization. Preventing chronic diseases: a vital investment : WHO global report. World Health Organization, 2005. Disponível em <[http://www.who.int/chp/chronic\\_disease\\_report/full\\_report.pdf](http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/full_report.pdf)> Acesso em 02 de Março de 2012.

WICK, G.; SCHETT, G.; AMBERGER, A.; KLEINDIENST, R.; XU, Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? **Immunology Today**, v. 16:27-33, 1995.

WONG, H.R.; RYAN, M.; WISPÉ, J.R. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I $\kappa$ -B degradation na NF $\kappa$ -B nuclear translocation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 231:257-63, 1997.