

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Tese de Doutorado

**"PAPEL DA PROSTAGLANDINA A₂ E DO ESTADO REDOX COMO
MODULADORES DO METABOLISMO DO COLESTEROL EM DIFERENTES
TIPOS DE MACRÓFAGOS "**

Lucila Ludmila Paula Gutierrez

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

**Porto Alegre
2007**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**"PAPEL DA PROSTAGLANDINA A₂ E DO ESTADO REDOX COMO
MODULADORES DO METABOLISMO DO COLESTEROL EM DIFERENTES
TIPOS DE MACRÓFAGOS "**

Lucila Ludmila Paula Gutierrez

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

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutor.**

**Porto Alegre
2007**

**“Se o trabalhador trabalha com alegria,
o trabalho vira a alegria do trabalhador”**

Emmanuel

**Dedico este trabalho
a todos os seres que visam
melhorar a vida neste planeta.**

AGRADECIMENTOS

A esta força maravilhosa que move os mundos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr., por me guiar no caminho do conhecimento científico, pela confiança que depôs no meu trabalho e por todo o carinho, desvelo e ensinamentos durante todos estes anos.

Ao meu marido, amigo e companheiro de todas as horas, Fabiano, que sempre esteve ao meu lado, até como meu “bolsista de iniciação científica”, fazendo experimento junto comigo nas madrugadas, me ajudando a organizar a tese e, acima de tudo, me apoiando em tudo, demonstrando paciência inesgotável ao longo destes tantos anos.

Às minhas incentivadoras de sempre e amigas de todas as horas: Maris e Jaque.

Aos meus amigos de todos os momentos, que muito me ajudaram me dando colo ou me fazendo rir...

Aos meus familiares pela compreensão dos momentos de ausência...

A todos do laboratório (os que ainda estão e aos que não mais), Joelso, Patrícia, Daiane, Maurício, Ângela, Lino, João, Júlia, Damiana, Gustavo, Lisiane, Mariana, Bibiana, Elza, Alexandre (desculpem se esqueci alguém) pelo aprendizado, pelo apoio, pelas conversas, risadas, besteiras e pelo ambiente amistoso.

Aos Professores Maria Flávia Marques Ribeiro e Luiz Carlos Kucharski pelo empréstimo de material.

Em particular meus agradecimentos a três pessoas especiais no laboratório: os alunos de iniciação científica Augustus Joli Fernandes e João Roberto Fernandes e a mestranda Juliane Rossato, que compartilharam minhas angústias e fizeram meus dias e noites no laboratório mais felizes e cheios de esperança. A vocês agradeço o maior de todos os presentes: a amizade!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, IX

LISTA DE FIGURAS, XIII

RESUMO, XVIII

1. INTRODUÇÃO, 1

2. REFERENCIAL TEÓRICO, 2

2.1- Da homeostase do colesterol à aterosclerose, 2

2.2- Metabolismo lipídico do macrófago e seu papel central na aterogênese, 5

2.3- Exportação de lipídios, sinalizações intracelulares e ativação metabólica por prostaglandinas ciclopentenônicas, 17

2.4- Estado redox celular e sua importância na aterosclerose, 31

2.5- Vistas ao desenvolvimento de uma terapia vascular à base de CP-PGs, 37

3. OBJETIVOS, 39

4. METODOLOGIA, 41

4.1 - Animais, 41

4.2 - Obtenção de macrófagos peritoneais, 41

4.3- Obtenção de macrófagos/foam cell, 41

4.4- Obtenção de macrófagos U937, 41

4.5- Hemólise de eritrócitos contaminantes, 42

4.6- Viabilidade de macrófagos, 42

4.7- Reagentes utilizados no preparo da placa de cultura de macrófagos peritoneais ou U937 e grupos experimentais, 42

4.8- Oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) , 46

4.9- Reagentes utilizados no preparo da placa de cultura de macrófagos/foam cells e grupos experimentais, 47

4.10- Determinação do conteúdo intracelular de GSH e GSSG e relação [GSSG/GSH], 50

- 4.11- Quantificação de proteína, 52**
- 4.12- Medida da Atividade da Acil-CoA: Colesterol O-Aciltransferase (ACAT) em macrófagos peritoneais e macrófagos/foam cells, 52**
- 4.13- Medida da Atividade da HMG-CoA redutase pelo método espectrofotométrico, em macrófagos peritoneais, 56**
- 4.14- Imunoprecipitação e eletroforese SDS-PAGE para HMG-CoA redutase de macrófagos peritoneais, 58**
- 4.15- Expressão de proteínas de choque térmico (HSP) em macrófagos/foam cells e peritoneais, 61**
- 4.16- Expressão de proteínas da NO sintase induzível (iNOS, ou NOS-2), 64**
- 4.17- Expressão de proteínas do receptor scavenger CD36, 64**
- 4.18- Expressão de proteínas da bomba MRP1, 64**
- 4.19- Expressão da proteína β -Actina, 65**
- 4.20- Análise estatística, 65**
- 5. RESULTADOS, 66**
- 5.1- Atividade da Acil-CoA: Colesterol O-Aciltransferase (ACAT) em macrófagos/foam cells, 66**
- 5.2- Atividade da Acil-CoA: Colesterol O-Aciltransferase (ACAT) em macrófagos peritoneais, 67**
- 5.3- Estado redox celular em macrófagos peritoneais, 71**
- 5.4- Estado redox celular em macrófagos U937, 78**
- 5.5- Expressão da proteína MRP1 em macrófagos peritoneais, 85**
- 5.6- Expressão da proteína HSP70 em macrófagos peritoneais, 88**
- 5.7- Expressão da proteína HSP70 em macrófagos/foam cells, 94**
- 5.8- Expressão da proteína iNOS em macrófagos peritoneais, 96**
- 5.9- Atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) em macrófagos peritoneais, 99**

5.10- Expressão da proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) em macrófagos peritoneais, 103

5.11- Expressão da proteína CD36 em macrófagos peritoneais, 105

6. DISCUSSÃO, 108

7. CONCLUSÃO, 131

8. REFERÊNCIAS, 133

APÊNDICE FINAL, XX

ABSTRACT, XXI

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1.....	do inglês, <i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ACAT.....	acil CoA: colesterol acil transferase
ACEH.....	colesteril éster hidrolase ácida
AMP.....	monofosfato de adenosina
AMPK.....	5'- proteína quinase dependente de monofosfato de adenosina
AMPKK.....	quinase da 5'- proteína quinase dependente de monofosfato de adenosina
AP-1.....	ativador da proteína-1
apoA-1.....	apolipoproteína A-1
apoB-100.....	apolipoproteína B-100
ARE/ EpRE.....	elemento responsivo a antioxidantes/ eletrófilos (do inglês <i>antioxidant/ electrophile response element</i>)
ATP.....	trifosfato de adenosina
ATPase.....	adenosina trifosfatase
Acetil-CoA.....	acetil- coenzima A
BHT.....	hidroxibutiltolueno
BSA.....	albumina sérica bovina
BSO.....	butionina-sulfoximina
CAT.....	catalase
CEH.....	colesteril-éster hidrolase
CETP.....	proteína de transferência de ésteres de colesterol
COX.....	ciclooxigenase
COX-2.....	ciclooxigenase-2
CP-PG.....	prostaglandina ciclopentenônica
CP-PGs.....	prostaglandinas ciclopentenônicas
DEM.....	maleato de dietila
DMSO.....	sulfóxido de dimetila
DNP-SG.....	(2,4-dinitrofenil)-S-glutationa
DTNB.....	ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DTT.....	ditiotreitol
EAO.....	espécies ativas de oxigênio
ECL.....	do inglês, <i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA.....	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELAM-1.....	molécula de adesão de leucócito endotelial (do inglês, <i>endothelial leukocyte adhesion molecule-1</i>)
ELISA.....	do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assays</i>
eNOS.....	óxido nítrico sintase endotelial
G6PDH.....	glicose-6-fosfato desidrogenase

GS-conjugado.....	S-conjugados de glutatona
GSH.....	glutatona (forma reduzida)
GSRd	glutatona redutase
GPx.....	glutatona peroxidase
GSSG.....	dissulfeto de glutatona
GST.....	glutatona S-transferase
GS-X.....	bomba de glutatona
γ -GCS.....	γ -glutamincisteína sintetase
HDL.....	lipoproteína de alta densidade
HETE.....	ácido hidróxi-eicosatetraenóico
HMG-CoA.....	3-hidroxi-3metilglutaril-CoA
HODE.....	ácido hidróxi-ocatadecadienóico
HPETE.....	ácido hidroperóxi-eicosatetraenóico
HSC.....	proteína de choque térmico constitutiva
HSE.....	elemento de ligação dos HSF ao DNA
HSF.....	fator de transcrição para HSP
HSG.....	genes de choque térmico (do inglês, <i>Heat Shock Genes</i>)
HSP.....	proteína de choque térmico
ICAM-1.....	molécula de adesão intracelular (do inglês, <i>intracellular adhesion molecule-1</i>)
IDL.....	lipoproteína de densidade intermediária
IFN- λ	Interferon gamma
I κ B	do inglês, <i>Inhibitor kappa B</i>
IKK.....	do inglês, <i>Inhibitor kappa B</i> quinase
IL-1 β	interleucina- 1 beta
IL-1.....	interleucina- 1
IL-6.....	interleucina- 6
iNOS.....	óxido nítrico sintase induzível
Insig-1.....	do inglês, <i>insulin-induced genes-1</i>
IP.....	imunoprecipitação
JNK	c-Jun quinase
Keap1.....	do inglês, <i>Kelch-like ECH-associated protein-1</i>
LCAT.....	lecitina-colesterol aciltransferase
LDL.....	lipoproteína de baixa densidade
LDLox.....	lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLR.....	receptor de LDL
LDS.....	Soro deficiente em lipoproteínas
LOX1.....	do inglês, <i>lecitin-like oxidized LDL receptor</i>
LPS.....	lipolissacarídeo
MDA.....	malondialdeído
MDR.....	resistência múltipla a drogas
MPA.....	ácido metafosfórico

MRP	proteínas de multi-resistência a drogas (do inglês, <i>Multidrug Resistance-Associated Protein</i>)
NAC.....	N-acetil-cisteína
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NCEH	colesteril éster hidrolase neutra
NEM.....	N-etilmaleimida
NF-κB.....	fator nuclear kappa B (do inglês, <i>nuclear factor- κB</i>)
NF-Y.....	fator nuclear-Y
nNOS.....	óxido nítrico sintase neuronal
NO.....	óxido nítrico
NOS.....	óxido nítrico sintase
Nrf2	do inglês, <i>nuclear factor erythroid</i>
PBS.....	do inglês, <i>Phosphate-buffered saline</i>
PDGF.....	fator de crescimento derivado de plaquetas
PÉS.....	polietersulfona
PGA.....	prostaglandina A
PGA ₂	prostaglandina A ₂
PGE.....	prostaglandina E
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGD.....	prostaglandina D
PGD ₂	prostaglandina D ₂
PGF _{2α}	prostaglandina F _{2α}
PGI ₂	prostaciclina
PGJ ₂	prostaglandina J ₂
PG.....	prostaglandina
PGs.....	prostaglandinas
PIPES.....	ácido piperazina N-N'-bis-(etanossulfônico)
PKC.....	proteína quinase C
PMSF	fluoreto de fenil-metil-sulfonila
PPAR	do inglês, <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PUFA.....	ácidos graxos polinsaturados
Scap.....	do inglês, <i>SREBP-cleavage activating protein</i>
SDS.....	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE.....	poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SFB.....	soro fetal bovino
SNAP.....	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SOD.....	superóxido dismutase
SR-A	Receptor <i>scavenger</i> - A (do inglês, <i>scavenger receptor – A</i>)
SR-BI.....	Receptor <i>scavenger</i> - BI (do inglês, <i>scavenger receptor – BI</i>)

SRE.....	elementos regulatórios para esteróis
SREBP.....	elemento de resposta a esterol
SREC.....	(do inglês, <i>scavenger receptor expressed by endothelial cells</i>)
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS.....	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TGF β -1.....	fator de crescimento transformante beta-1(do inglês, <i>transforming growth factor beta-1</i>)
TLC.....	Cromatografia de camada delgada (do inglês, <i>Thin Layer Chromatography</i>)
TNF α	fator de necrose tumoral
TX.....	tromboxano
U.....	unidades de atividade enzimática
UI.....	unidades internacionais
VCAM-1.....	molécula de adesão celular vascular (do inglês, <i>vascular cellular adhesion molecule-1</i>)
VLDL.....	lipoproteínas de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Rotas metabólicas envolvidas no balanço intracelular do colesterol, 11
- Figura 2: Metabolismo do ácido aracdônico e formação das prostaglandinas ciclopentenônicas (família das PGA_2 e PGJ_2), 23
- Figura 3: Centros eletrofilicos de um anel ciclopentenônico, 24
- Figura 4: Ressonância que ocorre entre os centros eletrofilicos de um anel ciclopentenônico, 24
- Figura 5: Ação de nucleófilos em centros eletrofilicos de um anel ciclopentenônico, 24
- Figura 6: Adição de Michael, 25
- Figura 7: Expressão do receptor *scavenger* CD36/FAT em macrófagos por ativação do PPAR- γ , 28
- Figura 8: Ativação do fator nuclear PPAR- γ e ciclo que perpetua a lesão aterosclerótica, 29
- Figura 9: Efeitos das CP-PGs no metabolismo do colesterol, 30
- Figura 10: Possíveis reações de Adição de Michael entre CP-PGs e grupamento tiol da glutathiona, 34
- Figura 11: Possível reação de Adição de Michael entre CP-PGs e cisteínas reativas de proteínas, 35
- Figura 12: Representação esquemática da distribuição experimental de macrófagos peritoneais ou U937, 45
- Figura 13: Representação esquemática da distribuição experimental de macrófagos peritoneais ou *foam cells*, 49
- Figura 14: Ação enzimática da ACAT sobre o colesterol e o oleato marcado, 53
- Figura 15: Ação enzimática da HMG-CoA redutase, 56
- Figura 16: Atividade enzimática da acil CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), em macrófagos/ *foam cells* nos diferentes grupos experimentais, 67

Figura 17: Atividade enzimática da acil CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), em 1h de tratamento com PGA_2 $1\mu\text{M}$, em macrófagos peritoneais nos diferentes grupos experimentais, 69

Figura 18: Atividade enzimática da acil CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), em 24h de tratamento com PGA_2 $1\mu\text{M}$, em macrófagos peritoneais nos diferentes grupos experimentais, 70

Figura 19: Concentração de glutathiona reduzida (GSH) intracelular de macrófagos peritoneais em 1h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais, 72

Figura 20: Concentração de glutathiona oxidada (GSSG) intracelular de macrófagos peritoneais em 1h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais, 73

Figura 21: Relação da concentração de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) [GSSG/GSH] intracelular de macrófagos peritoneais em 1h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais, 74

Figura 22: Concentração de glutathiona reduzida (GSH) intracelular de macrófagos peritoneais em 24h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais, 75

Figura 23: Concentração de glutathiona oxidada (GSSG) intracelular de macrófagos peritoneais em 24h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais, 76

Figura 24: Relação da concentração de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) [GSSG/GSH] intracelular de macrófagos peritoneais em 24h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais, 77

Figura 25: Concentração de glutathiona reduzida (GSH) intracelular de células U937 em 1h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais, 79

Figura 26: Concentração de glutathiona oxidada (GSSG) intracelular de células U937 em 1h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais, 80

Figura 27: Relação da concentração de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) [GSSG/GSH] intracelular de células U937 em 1h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais, 81

Figura 28: Concentração de glutathiona reduzida (GSH) intracelular de células U937 em 24h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes, 82

Figura 29: Concentração de glutathiona oxidada (GSSG) intracelular de células U937 em 24h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais, 83

Figura 30: Relação da concentração de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) [GSSG/GSH] intracelular de células U937 em 24h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais, 31

Figura 31: Expressão da proteína MRP1. A expressão relativa da MRP1 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da MRP1 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 6h com PGA₂ 1mM, 86

Figura 32: Expressão da proteína MRP1 em macrófagos. A expressão relativa da MRP1 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da MRP1 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 24h com PGA₂ 1μM, 87

Figura 33: Expressão da proteína HSC73. A expressão relativa da HSC73 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da HSC73 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 6h com PGA₂ 1μM, 89

Figura 34: Expressão da proteína HSC73. A expressão relativa da HSC73 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da HSC73 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de

cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 24h com PGA_2 $1\mu\text{M}$, 91

Figura 35: Expressão da proteína HSP72. A expressão relativa da HSP72 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da HSP72 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 24h com PGA_2 $1\mu\text{M}$, 93

Figura 36: Expressão da proteína HSP70. A expressão relativa da HSP70 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da HSP70 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos/ *foam cells* controle e tratados com PGA_2 $1\mu\text{M}$ e $20\mu\text{M}$, 95

Figura 37: Expressão da proteína iNOS. A expressão relativa da iNOS em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da iNOS pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 6h com PGA_2 $1\mu\text{M}$, 97

Figura 38: Expressão da proteína iNOS. A expressão relativa da iNOS em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da iNOS pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 24h com PGA_2 $1\mu\text{M}$, 98

Figura 39: Atividade enzimática da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), em 1h de tratamento com PGA_2 $1\mu\text{M}$, em macrófagos peritoneais nos diferentes grupos experimentais, 100

Figura 40: Atividade enzimática da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), em 24h de tratamento com PGA_2 $1\mu\text{M}$, em macrófagos peritoneais nos diferentes grupos experimentais, 102

Figura 41: Expressão da proteína HMG-CoA redutase em macrófagos peritoneais controle e tratados por 24h com PGA_2 $1\mu\text{M}$, 104

Figura 42: Expressão da proteína CD36. A expressão relativa da CD36 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da CD36 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 6h com PGA_2 $1\mu\text{M}$, 106

Figura 43: Expressão da proteína CD36. A expressão relativa da CD36 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da CD36 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 24h com PGA_2 $1\mu\text{M}$, 107

Figura 44A: Efeitos da PGA_2 no metabolismo do colesterol em células oxidadas, 131

Figura 44B: Efeitos da PGA_2 no metabolismo do colesterol em células em equilíbrio redox, 131

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

"PAPEL DA PROSTAGLANDINA A₂ E DO ESTADO REDOX COMO MODULADORES DO METABOLISMO DO COLESTEROL EM DIFERENTES TIPOS DE MACRÓFAGOS "

Autora: Lucila Ludmila Paula Gutierrez

Orientador: Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.

A aterosclerose é uma doença extremamente grave que leva à morte milhares de pessoas em todo o mundo. A ruptura do balanço intracelular que leva ao acúmulo de colesterol é uma das principais características observadas nas células que participam do desenvolvimento da lesão aterosclerótica. Estudos de nosso grupo mostraram que as prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs), em particular a PGA₂, desviam o metabolismo lipídico de macrófagos e macrófagos-*foam cells* reduzindo a síntese *de novo* de colesterol e ésteres de colesterol e induzindo a síntese de fosfolípidos, no lugar dos derivados do colesterol. Além disso, as CP-PGs são potentes agentes antiinflamatórios por promoverem diretamente a inibição da ativação do fator nuclear NF-κB e, indiretamente, pela ativação das proteínas de choque térmico (HSP), o que também leva à citoproteção. O resultado combinado dessas alterações é que a PGA₂ induz uma potente redução na quantidade de colesterol total em macrófagos-*foam cells* revertendo seu fenótipo ao de uma célula normal. Assim, e tendo em vista que a aterogênese e o acúmulo de lipídios por macrófagos está relacionado a disfunções na capacidade de regulação de síntese e

exportação de lipídios, o objetivo deste estudo foi investigar o mecanismo de ação da PGA_2 sobre a atividade e expressão de enzimas que participam do metabolismo do colesterol, a saber, acil-coenzima A: colesterol acil-transferase (ACAT) e 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase). Foi estudada, também, a possibilidade de que o efeito desta prostaglandina pudesse dar-se pela indução de alterações no estado redox celular e expressão de proteínas relacionadas à iniciação e desenvolvimento da lesão ateromatosa em macrófagos. Verificamos que, apesar de a PGA_2 inibir a atividade da ACAT em macrófagos/*foam cells*, o mesmo não ocorre com macrófagos normais. Contudo, a PGA_2 apresenta um potente efeito inibitório sobre a atividade da HMG-CoA redutase, mas não sobre a expressão da proteína ou de seu mRNA. Os dados obtidos com a PGA_2 , que é um agente eletrofílico, são mimetizados e potencializados por manobras que alteram as concentrações intracelulares de glutathione (GSH) e dissulfeto de glutathione (GSSG) e confirmados pela expressão de proteínas cujos fatores de transcrição específicos são sensíveis ao estado redox, como a HSP70 (via HSF), MRP1 (via Nrf2/Keap1) e iNOS (via NF- κ B). Os resultados implicam as CP-PGs como uma nova classe de agentes hipocolesterolemiantes através da modulação do estado redox celular.

APÊNDICE FINAL

Artigo submetido à revista científica *Atherosclerosis*.

Título: *Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins.*

Autores: Lucila Ludmila Paula Gutierrez¹, Alexandre Maslinkiewicz, Rui Curi, e Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a leading cause of death in the world. Disruption of the intracellular lipid balance, which leads to cholesterol accumulation is one of the features of cells that participate of the development of atherosclerotic lesions. Evidence form our laboratory indicates that cyclopentenone prostaglandins (CP-PGs), particularly PGA_2 , deviate lipid metabolism from the synthesis of cholesterol and cholesteryl esters to the synthesis of phospholipids in foam cell macrophages. Moreover, CP-PGs are powerful anti-inflammatory agents by directly inhibiting nuclear factor $\text{NF-}\kappa\text{B}$, and indirectly through the activation of heat shock protein (HSP) pathway, which, in turn, confers cytoprotection. The combined effect of such alterations is that PGA_2 dramatically reduces cholesterol contents in foam cell macrophages, thus reversing its phenotype to that of a normal cell. Hence, and since atherogenesis and lipid accumulation by macrophages are related with dysfunctions in the ability of regulating lipid synthesis and export, the aim of this study was to investigate the mechanism of action of PGA_2 on the activity and expression of enzymes related to cholesterol metabolism, namely, acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) and 3-hidroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase). The possibility that the effects of this CP-PG were modulated by alterations in the intracellular redox status and expression of proteins related to the initiation and development of atheromatous lesions in macrophages was also investigated. We found that, although PGA_2 did inhibit ACAT activity in foam cell macrophages, the same was not true for normal macrophages. However, PGA_2 showed a powerful inhibitory effect of HMG-CoA reductase activity but not in the expression of both protein or mRNA. The data obtained with PGA_2 , which is an electrophilic agent, were mimicked and potentialized by certain maneuvers that alter intracellular glutathione (GSH) and glutathione disulphide (GSSG) contents and were confirmed by the expression of proteins whose specific transcription factors are

redox-sensitive, such as HSP70 (via HSFs), MRP1 (via Nrf2/Keap1) and iNOS (via NF- κ B). The results indicate CP-PGs as a new class of hypocholesterolemic drugs by virtue of their capacity to modulate intracellular redox status.

1. INTRODUÇÃO

A homeostase intracelular do colesterol é sustentada, em células de mamíferos, através de uma intrincada série de mecanismos que levam ao preciso 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, a ruptura deste balanço intracelular levando ao acúmulo de colesterol é uma das principais características observadas nas células que participam do desenvolvimento de doenças, como a lesão aterosclerótica (Goldstein & Brown, 1977; Ross, 1995). A aterosclerose é o principal contribuinte de patologias como infarto cerebral e miocárdico, gangrena e perda de funções das extremidades; por este motivo, é uma doença mundialmente estudada (Moreno & Mitjavila, 2003).

Apesar de desbalanços no metabolismo lipídico em geral serem características marcantes do processo de aterosclerose e de que a hiperlipidemia esteja fortemente associada ao desenvolvimento da doença, o mecanismo pelo qual as células participantes da lesão acumulam lipídios permanece por ser esclarecido. Uma notável exceção é constituída pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas que sabidamente estimulam a formação de *foam cells* (Schmitz et al, 1991; Gesquière et al, 1997), enquanto que lipoproteínas de alta densidade (HDL) oxidadas impedem o efluxo de colesterol a partir das células (Gross & Wolin, 1995) comprometendo o transporte reverso do colesterol ao fígado, favorecendo, portanto, o acúmulo de colesterol na periferia extra-hepática (Goldstein & Brown, 1990). Entretanto, pouco se sabe sobre o papel da lipogênese e sua regulação para o estabelecimento da aterosclerose. Da mesma forma, uma deficiente capacidade de exportação de lipídios para o meio extracelular pode levar ao acúmulo de colesterol e ésteres de colesterol em células envolvidas na aterogênese. Contudo, a participação do processo de extrusão de lipídios para a homeostase do colesterol não é sabida. A presença de cisteínas reativas em fatores de transcrição gênica e enzimas-chave do metabolismo lipídico podem favorecer, ou não, o acúmulo de colesterol intracelular logo, é possível que o estado redox celular influencie no metabolismo do colesterol e, assim, auxiliem na progressão da doença vascular (Gutierrez et al, 2007).

Assim, a proposta deste trabalho baseia-se no estudo dos efeitos de prostaglandinas ciclopentenônicas, que são eletrofílicas e se ligam a cisteínas reativas, e no estado redox celular sobre outros processos envolvidos no acúmulo de lipídios por macrófagos peritoneais, que não a excessiva captação por receptores de *scavenger*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1- Da homeostase do colesterol até a aterosclerose

O colesterol é fisiologicamente imprescindível ao organismo, uma vez que 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). Entretanto, a hipercolesterolemia é um dos principais fatores que podem levar à aterosclerose.

Existem dois tipos de transporte de colesterol que 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. Por sua vez, as HDL recebem apoE de VLDL, IDL e LDL e passam a poder interagir com os receptores hepáticos para LDL e lipoproteínas remanescentes (Yamashita et al, 2000). 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 triacilglicerol 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 envia mais colesterol por LDL para a grande circulação (transporte direto).

A expressão de receptores para LDL é regulada pelo conteúdo intracelular de colesterol. Quando os tecidos necessitam de maiores quantidades de colesterol, o número de receptores de LDL aumenta nas superfícies celulares (*up-regulation*), aumentando a captação de LDL no plasma. Ao contrário, quando se tem um aumento de colesterol no sangue, seja devido à dieta ou a algum tipo de doença, como diabete ou hipercolesterolemia familiar, as células diminuem o número de receptores na suas superfícies (*down-regulation*) para LDL nativas, regulando a produção interna de substâncias a partir do colesterol (Goldstein & Brown, 1990). O motivo pelo qual as LDL nativas são modificadas ainda não está esclarecido. Acredita-se que há uma diminuição do *clearance* das LDL que, não sendo utilizadas, envelhecem e se oxidam, provavelmente por espécies ativas de

oxigênio formadas a partir do O₂ circulante, além de células endoteliais que também podem oxidar estas partículas (Goldstein & Brown, 1990; Da Luz, 1996). A peroxidação dos fosfolipídios e da fração protéica destas lipoproteínas (Steinbrecher et al, 1984) também contribuem para o agravamento do processo ateromatoso, uma vez que LDL oxidadas são citotóxicas às células endoteliais (Lyons et al, 1994). Estudos apontam que as células endoteliais são responsáveis pelo aumento de produção de ânion superóxido em plasma hipercolesterolêmico e a formação deste radical livre parece estar aumentada na aterosclerose (Shihabi et al, 2002). Temos, então, um quadro de estresse oxidativo. O aumento de meia-vida das LDL no plasma deve-se à “saturação” do sistema de remoção destas partículas que é inibido pelo colesterol intracelular, cujas concentrações, por sua vez, estão elevadas quando o indivíduo apresenta hipercolesterolemia, conforme descrito.

Os locais preferenciais para formação de lesões por estresse são as bifurcações arteriais, que têm o fluxo sanguíneo mais turbulento e que por este motivo aumentam o estresse do vaso, quando em condições anormais. Temos como exemplo a aorta, as coronárias, as artérias carótidas, a bifurcação renal e as artérias cerebrais. Qualquer destas situações leva a um estresse oxidativo das células endoteliais, ocasionando uma cascata de respostas do organismo, como forma de manter a homeostase. É interessante lembrar que o estresse de cisalhamento e a hipercolesterolemia promovem formação de radicais livres, que podem reagir com a LDL, oxidando-a (Berliner, 2002). Além disso, o processo de oxidação parece conferir atividade fosfolipase à própria LDL oxidada (Schmitz et al, 1991) o que explica a geração de lisofosfolipídios (aumento na hidrólise de fosfolipídios) observado nessas lipoproteínas (Sparrow et al, 1988). Isso tem uma implicação importante na aterogênese porque a geração de LDL oxidadas com atividade fosfolipase pelo endotélio pode ser responsável pelo recrutamento de monócitos à lesão, uma vez que os lisofosfolipídios produzidos são quimiotáticos para macrófagos (Schmitz et al, 1991). A reação entre o ânion superóxido e o óxido nítrico diminui o relaxamento dependente do endotélio, processo que também influencia na formação de aterosclerose (Shihabi et al, 2002).

Devido à injúria ao endotélio nos estágios iniciais da aterogênese, as células endoteliais passam a apresentar maior reciclagem metabólica, levando

à replicação celular, aumento de permeabilidade para elementos do plasma e ativação de proteínas do sistema complemento, o que favorece a infiltração de monócitos (Schmitz et al, 1991). Nas camadas subendoteliais, ocorre a diferenciação destes monócitos em macrófagos com habilidade de acumular grandes quantidades de lipídios: as *foam cells* ou células espumosas, que recebem este nome devido à morfologia característica que passam a apresentar. Estas partículas de LDL e as LDL oxidadas são fagocitadas pelos macrófagos, originando as estrias gordurosas e dando início à placa de ateroma (Da Luz et al, 1996). *Foam cells* acumulam grandes quantidades de colesterol e ésteres de colesterol que ficam constantemente sendo submetidos a um ciclo de hidrólise e reesterificação até que o excesso de colesterol possa ser secretado ou utilizado para síntese de membranas (Brown & Goldstein, 1983; Brown et al, 1980; Rosenfeld et al, 1991). Uma das características destes macrófagos é a capacidade das *foam cells* de captar e degradar lipoproteínas de baixa densidade (LDL) modificadas, promovendo sua oxidação e gerando produtos com alta capacidade oxidativa (oxiesteróis) (Rosenfeld et al, 1991; Bansal et al, 2001). Ainda, a formação de macrófagos/*foam cells* pode afetar a estabilidade da placa de ateroma, podendo levar a ruptura do vaso ou a trombose coronariana (Escary et al, 1998).

Desta forma, quando estas circunstâncias se instalam cronicamente, o organismo responde ao dano de forma continuada, levando a uma resposta imune sustentada e à formação da placa de ateroma. Assim sendo, a aterosclerose é tida, atualmente, como uma doença inflamatória da parede vascular (Alexander, 1995; Wick et al, 1995), com resolução disfuncional (Lawrence & Gilroy, 2007).

2.2- Metabolismo lipídico do macrófago e seu papel central na aterogênese

Macrófagos são espécies celulares que produzem e exportam grandes quantidades de lipídios, como colesterol, ácidos graxos, ésteres de colesterol, triacilgliceróis e fosfolipídios para o meio extracelular (Homem de Bittencourt Jr. et al, 1993). Também transferem ácidos graxos para outras células, como linfócitos (Garcia Jr. et al, 2001) e estão implicados como mediadores da proliferação destes últimos (Nishiyama-Naruke & Curi, 2000). Assim,

macrófagos são células imunoinflamatórias caracterizadas por metabolismo energético, oxidativo e lipídico extremamente ativos. Muitas funções do macrófago dependem de sua composição lipídica, como a percepção e transdução de sinais, a fagocitose, a síntese de lipídios oxidados e outros mediadores inflamatórios, como os eicosanóides (Oliveros et al, 2004). Ainda, a lipogênese é necessária para a rápida proliferação de células e está estabelecido que a biossíntese de lipídios precede o início da divisão celular (Homem de Bittencourt Jr. et al, 1994). Uma vez que as células que compõem o sistema imune humano, como o macrófago, devem ter a capacidade de proliferação frente ao dano tecidual, a capacidade de lipogênese passa a ser essencial.

Entretanto, esta capacidade de produção e exportação de colesterol do macrófago vem sendo muito estudada, porque um desbalanço na produção e exportação deste lipídio pode levar a aterosclerose (Kisilevsky & Pang Tam, 2003). Um dos maiores marcadores de aterosclerose é justamente o acúmulo de colesterol intra e extracelular (Wang et al, 2005). Embora seja possível que a gênese do processo aterosclerótico dê-se pela ativação imunológica de monócitos, sabe-se que estes são recrutados pela lesão inicial já existente e lá passam a exercer efeitos sobre as demais populações celulares envolvidas. Estas células aparecem em um estágio precoce do desenvolvimento da lesão aterosclerótica e persistem durante toda a sua evolução, indicando que são células-chave neste processo patológico (Jessup et al, 2002). Além de sua ação citotóxica no sítio aterogênico, macrófagos promovem recrutamento e ativação de outros tipos celulares, sendo responsáveis diretos pela indução de proliferação das células circunjacentes (Sunderkötter et al, 1994; Garcia et al, 2001), acumulam colesterol, são mediadores da resposta imune e fonte de secreção de enzimas e fatores de crescimento (Jessup et al, 2002). Muitos desses efeitos são mediados por moléculas de adesão da matriz extracelular que mantêm a integridade estrutural e funcionalidade do endotélio. Além do suporte mecânico, fazem ligação entre elementos fibrosos extracelulares e estruturas intracelulares, contribuindo para as propriedades viscoelásticas, regulando a permeabilidade e a retenção dos componentes do plasma. O rompimento desta integridade está implicado na gênese inicial da aterosclerose (Srinivasan et al, 1991).

A aderência de macrófagos à matriz extracelular de células endoteliais modula a adesão, a produção de superóxidos, o colesterol oxidado e o estado de ativação geral de macrófagos (Gudewicz & Frewin, 1991; Jang et al, 1993; Gudewicz et al, 1994).

Macrófagos expostos a LDL oxidadas produzem citocinas que induzem nas células endoteliais a expressão de receptores (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, integrinas, caderinas) para moléculas de adesão da matriz extracelular (fibronectina, laminina, trombosposina, α -actina) envolvidas com o endereçamento de outras células imunológicas e de plaquetas para a lesão endotelial (Frostegård et al, 1993; Aznar-Salatti et al, 1991). O estresse oxidativo e a formação de radicais livres também estão implicados na expressão de moléculas de adesão, como por exemplo o VCAM-1, que é expresso quando o estado redox das células endoteliais é modificado (Marui et al, 1993; Alexander, 1995). Macrófagos ainda interferem no metabolismo lipídico de células endoteliais e secretam fatores como oncostatina M, as interleucinas IL-1 e IL-6 e TGF β -1 que são capazes de aumentar a expressão de receptores de LDL nas células-alvo (Grove et al, 1991). Ainda, a captação e metabolização de LDL por células endoteliais, que leva a um aumento de colesterol intracelular, tem sido apontada como fator de diminuição de fluidez nas membranas destas células, além de facilitar a adesão de macrófagos à superfície do endotélio (Pritchard & Schwarz, 1991).

Assim, as lesões ateroscleróticas começam como estrias gordurosas resultantes do recrutamento de monócitos circulantes do sangue para a parede arterial, que se diferenciam em macrófagos e começam a acumular colesterol proveniente de lipoproteínas ricas em éster de colesterol modificados. São nestas células que, nos estágios iniciais da doença, o colesterol em excesso é depositado como éster de colesterol. Sabe-se que o colesterol das lesões ateroscleróticas é predominantemente derivado de lipoproteínas séricas, como a LDL. Esta última consiste de um centro hidrofóbico que contém éster de colesterol e triglicerídios e apolipoproteína B-100 (apoB-100) (Wang et al, 2005).

As lipoproteínas são internalizadas por macrófagos, via endocitose mediada por receptor ou fagocitose (Skoczynska, 2005). O componente apoB-100 da LDL é reconhecido por receptores de fenda revestida por clatrina

(Brown & Goldstein, 1985). Embora os mecanismos pelas quais a LDL constitua-se em uma partícula pró-aterogênica não estejam totalmente elucidados, há evidências de que a modificação oxidativa da mesma, dentro ou fora das artérias, é uma etapa importante, senão obrigatória, na aterogênese. De acordo com a literatura, macrófagos internalizam LDL oxidadas através de sua ligação com muitos tipos de receptores, entre eles os receptores *scavengers*. Um destes é o receptor CD36, uma glicoproteína de membrana expressa por células endoteliais, adipócitos, células da musculatura lisa e esquelética, cardiomiócitos, plaquetas, monócitos e macrófagos. O CD36, que é um receptor *scavenger* de classe B (assim como o SR-BI, segundo Dhaliwal & Steinbrecher, 1999) reconhece e liga-se a vários ligantes, como a LDL oxidada, ácidos graxos de cadeia longa, colágeno, células apoptóticas, fosfolipídios aniônicos, entre outros. Este receptor *scavenger* está envolvido em vários processos, como na resposta imune, remoção de células apoptóticas e no transporte de ácidos graxos de cadeia longa, além da aterosclerose (Kuliczowska-Plaksej et al, 2006). É a captação desregulada das formas modificadas de LDL via receptores *scavenger*, como receptores *scavenger* da classe A (SR-A) tipo I (SR-AI) e II (SR-AII), que leva ao desenvolvimento de macrófagos/*foam cells*. Este tipo celular contém massivas quantidades de inclusões de ésteres de colesterol citoplasmáticas (Ghosh et al, 2003; Linton & Fazio, 2003). Além dos receptores citados, outras proteínas, como CD68/macrosialina, LOX-1 (do inglês, *lecitin-like oxidized LDL receptor*) e SREC (do inglês, *scavenger receptor expressed by endothelial cells*) também são consideradas *scavenger*, sendo característica de todos estes receptores possuírem afinidade a vários ligantes (Dhaliwal & Steinbrecher, 1999). Células da musculatura lisa vascular apresentam os mesmos receptores de remoção encontrados em macrófagos, e células endoteliais são igualmente capazes de internalizar LDL (Raines & Ross, 1993), mas por receptores *scavenger* diferentes daqueles encontrados em macrófagos/*foam cells* (Bickel & Freeman, 1992). LDL modificadas, apesar de eficientemente internalizadas, são pouco metabolizadas por macrófagos, levando a um aumento nas concentrações intracelulares de colesterol livre (Roma et al., 1992). Além disso, as LDL oxidadas representam a maior fonte de colesterol para macrófagos de lesões ateromatosas (Steinberg et al., 1989; Skoczynska, 2005). Uma vez formadas

pela endocitose mediada por receptores, as vesículas com LDL se fundem com endossomos cujo pH interno é de aproximadamente 5. Sob estas condições, a LDL dissocia-se de seus receptores, que voltam à superfície celular. Então, o endossomo contendo LDL se funde com um lisossomo, local em que a apoB-100 é degradada em aminoácidos e os ésteres de colesterol são hidrolisados, gerando colesterol e ácidos graxos (Voet et al, 2002). Os triacilgliceróis e ésteres de colesterol associados à lipoproteína são hidrolisados por colesteril-éster hidrolases ácidas (nos lisossomos), formando ácidos graxos e colesterol livre; este último é transferido para o citosol (Belkner et al, 2000; Wang et al, 2005; Skoczynska, 2005). No citosol, a acil CoA: colesterol acil transferase (ACAT) reesterifica o colesterol livre e ácidos graxos de cadeia longa (Pramfalk, C. et al, 2005) e o resultado é que este colesterol pode ser estocado como gotas lipídicas citosólicas (Belkner et al, 2000). O colesterol livre também pode ser estocado na membrana celular (Ru Su et al, 2005), sendo constituinte desta última (Natarajan et al, 1999).

Se, por um lado, o excesso de colesterol deve ser evitado, por outro, a quantidade de colesterol deve ser suficiente para que todas as ações fisiológicas dependentes deste último sejam executadas (como exemplo a formação de hormônios esteróides e a bile). Logo, a colesterogênese é essencial para a sobrevivência celular, não só pela produção de esteróis, entre outros, mas também devido à produção de intermediários isoprenóides não-esteróis, como pirofosfato de farnesil e de geranilgeranil, que são necessários na sinalização intracelular que medeia a proliferação e diferenciação das células (Basso et al, 2006). Assim sendo, outra enzima que passa a ter um papel ativo na regulação da concentração de colesterol intracelular é a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), enzima microssomal chave da síntese de colesterol e isoprenóides. A HMG-CoA redutase também é regulada pela disponibilidade de colesterol proveniente do LDL e por produtos finais de esteróis e não-esteróis, como pirofosfato de farnesil (Correl & Edwards, 1994), podendo ser ativada ou inativada, e até mesmo degradada, a partir dos níveis de colesterol intracelular (Brown & Glodstein, 1999), conforme demonstrado na Figura 1 (Gutierrez et al, 2007). Está provado que a inibição desta enzima é efetiva em diminuir os níveis de colesterol total do plasma, da LDL e de triglicerídeos em humanos, de modo que as estatinas, classe

farmacológica de inibidores da HMG-CoA redutase, são utilizados no tratamento da aterosclerose (Argmann et al, 2005).

Portanto, três processos passam a estar envolvidos na manutenção do balanço homeostático entre o colesterol livre (forma que pode ser exportada da célula) e os ésteres de colesterol (forma de armazenamento intracelular): a esterificação do excesso de colesterol livre pela acil CoA: colesterol acil transferase (ACAT) (citosólica), a hidrólise de ésteres de colesterol pelas colesteril-éster hidrolases (CEH) ácidas (lipossomal) e neutras (citosólicas) e a síntese endógena do colesterol pela HMG-CoA redutase, (Belkner et al, 2000; Correl & Edwards, 1994). Estas rotas metabólicas envolvidas no balanço intracelular do colesterol podem ser visualizadas na Figura 1, conforme descrito por Gutierrez e colaboradores (2007).

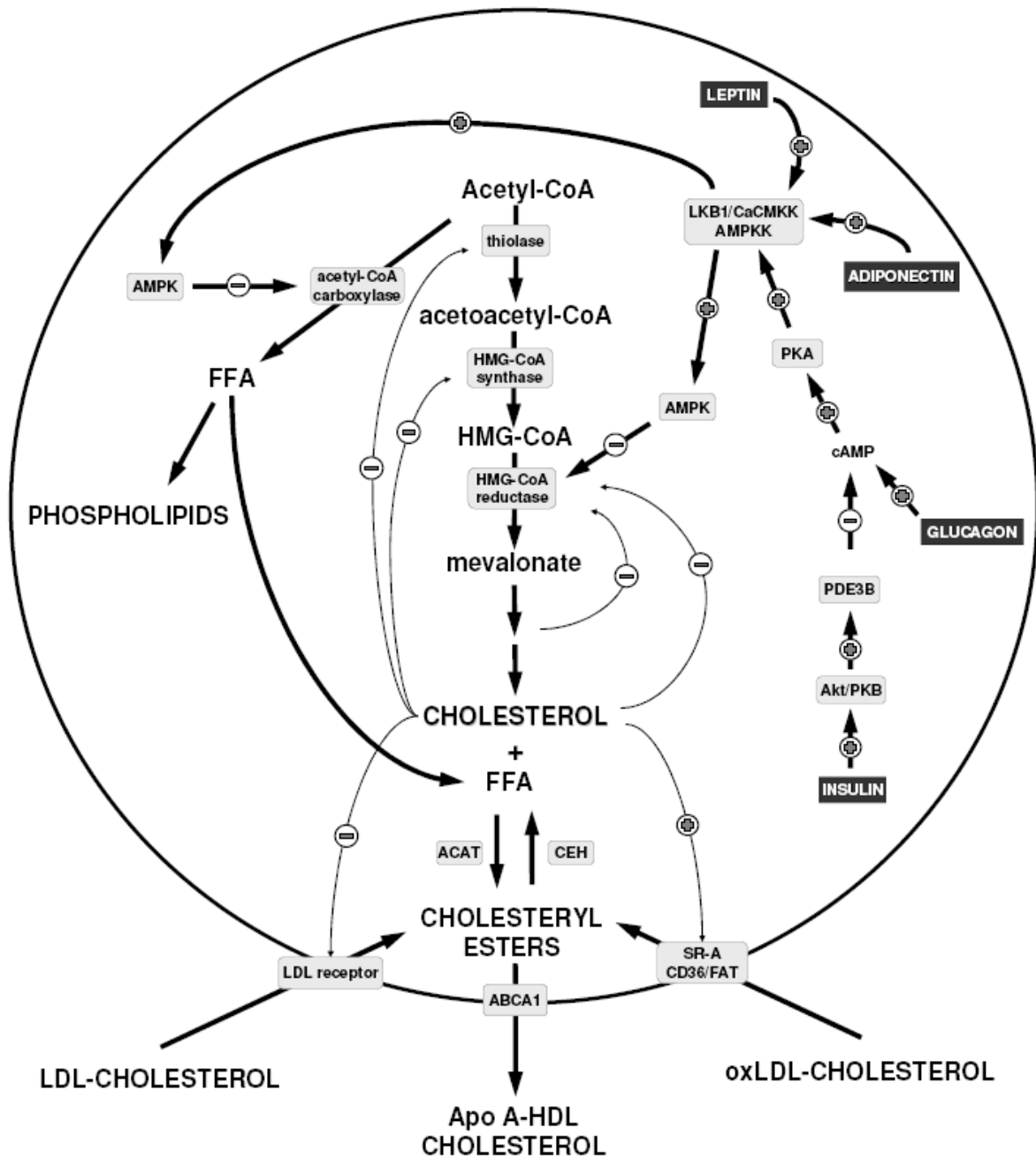


Figura 1: Rotas metabólicas envolvidas no balanço intracelular do colesterol. Sinais de menos e mais nas flechas mais finas indicam inibição e estimulação de expressão gênica, respectivamente. Sinais nas flechas mais grossas representam a influência direta na atividade das enzimas ou nos fatores de transcrição, segundo Gutierrez e colaboradores, 2007.

A ACAT é uma enzima integral presente no retículo endoplasmático rugoso (Lee & Carr, 2004), mais especificamente na membrana desta organela (Guo et al, 2005). Existem dois genes que regulam a expressão de duas

diferentes isoformas da ACAT (ACAT1 e ACAT2), que foram clonadas em mamíferos. Em humanos, a ACAT1 é expressa na maioria dos tecidos, incluindo hepatócitos, células da pele, células de Kupffer, enterócitos e macrófagos (Pramfalk et al, 2005; Ru Su et al, 2005), além de estar presente em células produtoras de hormônios esteróides, neurônios, túbulos renais, pituitária, glândula prostática e outros (Sakashita et al, 2000). A ACAT2 é expressa em células da mucosa intestinal (intestino delgado) e hepatócitos (Pramfalk et al, 2005; Ru Su et al, 2005). A ACAT1 tem seu sítio ativo orientado para o citosol e sua função é evitar que excesso de colesterol seja adicionado à membrana celular. Em contraste, a ACAT2 tem seu sítio ativo voltado para o lúmen do retículo endoplasmático, sugerindo que esta enzima está envolvida na síntese e secreção de lipoproteínas hepáticas e na absorção de colesterol no intestino delgado (Lee & Carr, 2004). A ACAT1 é uma proteína de membrana integral com múltiplos domínios transmembrana e com quatro subunidades idênticas (Lu et al, 2002). Recentes pesquisas indicaram que a ACAT1 possui dois distintos sítios de ligação de esteróis: um sítio de ligação de substrato e um sítio ativado alostericamente (Liu et al, 2005), sendo que a ACAT pode ser ativada alostericamente pelo colesterol (Wang et al, 2005). Entretanto, as bases moleculares do alosterismo da ACAT são desconhecidas (Lu et al, 2002). Liu e colaboradores (2005) demonstraram que, na ACAT1, a estereoquímica do grupo 3-OH no anel esteróide A é a estrutura crítica para um esterol servir como substrato, mas menos crítico para a ativação da enzima. Estes autores referem que o colesterol enantiomérico, que possui as mesmas propriedades biofísicas como colesterol nas membranas, falha em ativar a ACAT1. Assim, a ativação da ACAT1 pelo colesterol é o resultado de interações estereo-específicas entre o colesterol e a ACAT1, e não está relacionada com as propriedades biofísicas dos fosfolipídios de membrana. Além disso, o referido grupo de pesquisa demonstrou que a ativação da ACAT se dá não pelo aumento da quantidade de enzima, mas em parte devido ao aumento da quantidade de colesterol no retículo endoplasmático onde a ACAT1 está (Liu et al, 2005). Guo e colaboradores (2005) descreveram que a ACAT1 humana contém nove resíduos de cisteínas, sendo que a cisteína 92 está localizada para o lado citoplasmático da membrana do retículo endoplasmático e seu dissulfeto está localizado no lúmen desta organela,

enquanto todas as outras cisteínas livres estão voltadas para as regiões hidrofóbicas desta enzima. Assim, estes pesquisadores propuseram que vários resíduos de cisteína devem constituir parte da região de ligação de substrato da ACAT.

A CEH, por sua vez, como descrito anteriormente, é uma enzima que converte os ésteres de colesterol em colesterol livre quando os níveis destes últimos estão baixos. Entre as várias CEH presentes nas células, a CEH neutra (citossólica) é a enzima chave necessária para a manutenção da quantidade adequada de colesterol livre a partir de ésteres de colesterol estocados intracelularmente. Assim, esta enzima está envolvida na regulação dos níveis de colesterol livre celular (Grogan et al, 1991). Respondendo à quantidade de colesterol livre intracelular, a CEH neutra é regulada de modo semelhante a HMG-CoA redutase e de modo oposto à ACAT (Grogan et al, 1991; Natarajan, et al, 1999). A regulação da a CEH neutra no fígado ocorre principalmente por transcrição e por hormônios (Ghosh et al, 1998). A síntese aumentada de ácidos biliares aumenta a atividade e o RNAm da CEH hepática (Natarajan et al, 1999). Desta forma, o aumento da expressão de CEH em hepatócitos humanos resulta em aumento significativo da síntese de ácidos biliares, demonstrando que esta enzima pode regular a síntese de ácidos biliares e assim remover o colesterol da circulação (Zhao et al, 2005). É sabido que a expressão do gene da CEH neutra de hepatócitos de ratos é regulada por glicocorticóides, tiroxina e agentes que possam perturbar o metabolismo do colesterol. Foram identificados elementos responsivos para esteróis (SRE -92 e SRE -160) e um possível sítio de ligação ao fator nuclear-Y (NF-Y) no promotor da CEH. Resultados indicam que o gene da CEH possui duas unidades responsivas a glicocorticóides em porções distais do promotor, assim como possíveis elementos de resposta a hormônios da tireóide (Natarajan et al, 1999). Os hormônios da tireóide diminuem os níveis séricos de colesterol e esta diminuição está correlacionada com o aumento de secreção biliar de colesterol (Ghosh et al, 1998). Os elementos responsivos aos esteróis estão localizados muito próximos a outros ligantes de fatores de transcrição, o que aparentemente é essencial para a regulação ótima destes genes sensíveis aos esteróis. Por exemplo, promotores dos SREs de LDLR, acetil-CoA carboxilase e da enzima ácido graxo sintase requerem seqüências de Sp1 para que ocorra

a resposta aos esteróis (Natarajan et al, 1999). A atividade da CEH tem mostrado sensibilidade a estímulo hormonal de testículos, corpo lúteo, aorta e do córtex da adrenal (Ghosh et al, 1998). Gandarias e colaboradores (1984) demonstraram o aumento de colesterol hepático em resposta a uma única injeção de estradiol, resultando em diminuição da CEH neutra. Este mesmo grupo de pesquisa, em 1986, demonstrou uma diminuição da CEH neutra pela progesterona. Além disto, também está descrito que a prostaciclina (PGI_2) estimula a atividade da colesterol éster hidrolase ácida e neutra (Morishita et al, 1990). A lipase ácida lisossomal/ CEH ácida é essencial para a degradação intracelular de ésteres de colesterol e triacilgliceróis que são endereçados aos lisossomos pela endocitose de LDL mediada por receptores (Groener et al, 2000). Esta enzima é sintetizada por todas as células, exceto por eritrócitos, e hidrolisa ésteres de colesterol e triglicerídios contidos em partículas de LDL endocitadas em colesterol, di e monoglicerídios e ácidos graxos livres (Lohse et al, 1997). Um grupo de cisteínas é encontrado nas posições 227, 236 e 244, de forma conservada na família de genes de lipases ácidas de mamíferos, onde a lipase ácida lisossomal/ CEH ácida está incluída (Pagani et al, 1997). A lipase ácida lisossomal/ CEH ácida contém seis resíduos de cisteínas na proteína madura (Lohse et al, 1997), nas posições 41, 188, 227, 236, 240 e 244 e uma cisteína adicional no aminoácido 27 no N-terminal (Pagani et al, 1997).

Finalmente, a HMG-CoA redutase, em sua rota bioquímica, produz numerosas moléculas sinalizadoras bioativas, incluindo oxisteróis, entre outros, que geram eventos transcricionais e pós-transcricionais, afetando vários processos biológicos (Argmann et al, 2005). Esta enzima é regulada em múltiplos níveis, incluindo a transcrição gênica (Engelking et al, 2005), degradação protéica (Brown & Goldstein, 1999), fosforilação protéica (Omkumar, 1984) e estado redox (Roitelman & Shechter, 1989), o que faz a HMG-CoA redutase ser considerada uma das enzimas mais precisamente e intrincadamente regulada (Gutierrez et al, 2007). Esta enzima contém múltiplos domínios transmembrana, que a ancoram na membrana do retículo endoplasmático (Correl & Edwards, 1994), estando presente no retículo endoplasmático e ocorrendo tanto na forma fosforilada inativa, quanto na não-fosforilada (ativa) (Brown & Goldstein, 1976).

Os níveis de colesterol regulam sua própria biossíntese, conforme descrito anteriormente, apesar dos mecanismos envolvidos ainda serem apenas parcialmente compreendidos. Um dos principais fatores que influenciam no conteúdo total de colesterol e ésteres de colesterol nas células e também em hepatócitos é a dieta, que é capaz de alterar a composição lipídica das células e aumentar a disponibilidade de LDL (Oliveros et al, 2004). De um modo geral, uma alta ingestão de colesterol da dieta leva a uma redução global na produção endógena, enquanto que uma ingestão reduzida leva ao efeito oposto. Um aumento de colesterol intracelular pode reprimir a expressão de enzimas da sua síntese endógena, assim como de receptores de LDL (Brown & Goldstein, 1990), até dado limite fisiológico. Estas rotas metabólicas podem ser visualizadas na Figura 1.

Um dos principais mecanismos regulatórios da síntese do colesterol ocorre pela proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol (SREBP), presente no retículo endoplasmático. Na presença do colesterol, a SREBP se liga a outras duas proteínas: Scap (do inglês, *SREBP-cleavage activating protein*) e Insig-1 (do inglês, *insulin-induced genes-1*). Quando os níveis de colesterol caem, a Insig-1 se dissocia do complexo SREBP-Scap, permitindo que o complexo migre para o aparelho de Golgi, onde a SREBP é clivada pela Sp1 e Sp2 (site 1/2 protease), duas enzimas que são ativadas pela Scap quando os níveis de colesterol estão baixos. Então, a SREBP clivada migra para o núcleo e age como um fator de transcrição para se ligar ao elemento regulatório de esterol (SRE) de diversos genes para estimular sua transcrição. Entre os genes transcritos estão o receptor LDL e o HMG-CoA redutase. O primeiro procura por LDL circulante na corrente sanguínea, ao passo que o HMG-CoA redutase leva a uma produção endógena aumentada de colesterol (Smith et al, 2005; Engelking et al, 2005).

Não surpreendentemente, a HMG-CoA redutase é negativamente regulada por fosforilação via 5'- proteína quinase dependente de monofosfato de adenosina (AMPK), que é considerada a quinase "sensível à energia" celular (Kanellis et al, 2006). A AMPK responde a modificações na relação AMP/ATP durante a privação metabólica, situações de hipoxia e a baixa relação de insulina/glucagon, que sinaliza situações fisiológicas de déficit de energia (jejum) (conforme Figura 1) (Kim & Novak, 2007). A HMG-CoA

redutase é fosforilada e inativada pela AMPK (Clarke & Hardie, 1990), que fica ativa quando os níveis de ATP são depletados, diminuindo a síntese de colesterol e preservando o estoque energético da célula (Sato et al, 1993). Ainda, a fosforilação por AMPK ou o tratamento de macrófagos da linhagem U937 com inibidores da HMG-CoA redutase (como as estatinas), prejudica a quimiotaxia e a migração destas células (Kanellis et al, 2006), o que reforça a importância do envolvimento da rota bioquímica do mevalonato para a função celular na aterosclerose (Gutierrez et al, 2007).

Em estágios avançados da aterosclerose, os lisossomos se tornam o maior sítio de acúmulo lipídico. Isto ocorre porque a hidrólise do colesterol ocorre conjuntamente com sua transferência para a membrana. Quando os níveis de colesterol na membrana plasmática ficam baixos, ocorre a hidrólise dos ésteres de colesterol. Quando os níveis de aceptores de colesterol na membrana aproximam-se da saturação ou quando a exportação de colesterol é bloqueada, o colesterol é reesterificado em endossomos (Wang et al, 2005).

A apoptose de macrófagos ocorre em todos os estágios da aterosclerose. Em lesões iniciais, onde o *clearance* fagocítico de células mortas parece ser eficiente, a apoptose de macrófagos parece estar associada com a diminuição da celularidade e diminuição da progressão da lesão. Em lesões avançadas, no entanto, grande número de fatores contribuem para um *clearance* fagocítico defeituoso em macrófagos apoptóticos, levando a uma necrose secundária e a uma resposta pró-inflamatória. O efeito cumulativo desta lesão tardia é a formação de centro necrótico que, em acordo com os efeitos pró-aterogênicos gerados pelos macrófagos residuais sobreviventes, promovem mais inflamação, instabilidade plaquetária e trombose (Tabas, 2005). Os ésteres de colesterol e colesterol, provenientes da apoptose de macrófagos, ficam libertos na lesão, representando o centro lipídico ou necrótico que ocorre em lesões em aterosclerose avançadas (Skoczynska, 2005). Então, em resumo, as lesões ateroscleróticas se dividem em três estágios: a disfunção do endotélio vascular, a formação de estrias gordurosas e a formação de cápsula fibrosa (Moreno & Mitjavila, 2003).

A partir do exposto, duas principais alternativas são relatadas, na literatura, para a prevenção desta doença. A primeira é o mecanismo pelo qual o colesterol é sintetizado, distribuído e levado por macrófagos e a segunda é o

processo pelo qual estas células exportam o colesterol. O maior objetivo do tratamento da prevenção da aterosclerose é regular o balanço entre a síntese/captação de colesterol pelos macrófagos e sua exportação, de modo a limitar a quantidade de colesterol intracelular.

Desta maneira, o atual foco do meio científico está nas atividades das enzimas e receptores envolvidos neste processo, como a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima envolvida na síntese de colesterol; a LDL e os receptores *scavenger*, envolvidos no influxo de colesterol nas células; a ACAT, que esterifica o colesterol, fazendo com que este fique estocado na célula e a CEH, que forma colesterol livre, que pode ser exportado (Kisilevsky & Pang Tam, 2003). A saída de colesterol da célula é controlada pela mobilização de éster de colesterol estocado através da desesterificação (pela ação de colesterol éster hidrolases ácidas e neutras, lisossomais e citoplasmáticas, respectivamente), pelo transporte do colesterol livre formado através da membrana celular (por transportadores como ABCA1 ou pela difusão não-específica do efluxo do colesterol, segundo Yokoyama, 2006) e pela presença de quantidade adequada de aceptores extracelulares plasmáticos de colesterol, como a apolipoproteína A-I (apoA-I), HDL e albumina (Belkner et al, 2000; Leventhal et al, 2001; Kisilevsky & Pang Tam, 2003).

Com base nas evidências apresentadas, a migração de monócitos e sua diferenciação em *foam cells* constituem-se eventos críticos na formação da lesão aterosclerótica. Entretanto, o mecanismo que leva à diferenciação de monócitos em *foam cells* da lesão ateromatosa e a possibilidade de que desbalanços na captação, na estocagem, na síntese *de novo* e no efluxo do colesterol possam contribuir para esta diferenciação e, portanto, para o desenvolvimento da aterosclerose, são aspectos ainda não bem esclarecidos, embora a literatura já descreva que alterações, mesmo discretas, neste delicado balanço bioquímico, geram acúmulo de colesterol e aterogênese.

2.3- Exportação de lipídios, sinalizações intracelulares e ativação metabólica por prostaglandinas ciclopentenônicas

Uma das primeiras respostas da parede arterial a estímulos nocivos/aterogênicos (como hiperlipidemia e hipertensão arterial) é a produção de autacóides derivados do endotélio, como prostaglandinas (PGs),

especialmente a prostaciclina (PGI_2) e o óxido nítrico (NO) (Schmitz et al., 1991). Prostaglandinas são uma família de ácidos graxos com 20 carbonos cíclicos que ocorrem naturalmente no organismo e que são sintetizados a partir do ácido araquidônico ou outros ácidos graxos provenientes de fosfolipídios da membrana celular pela ação de fosfolipases. O aracdonato é primeiramente transformado em um endoperóxido intermediário instável pela cicloxigenase (COX) e subseqüentemente convertido em um de vários produtos, incluindo PGD_2 , PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, através da ação de muitas PG sintases (Piva et al, 2005). Se, por um lado estes compostos estão implicados na defesa e manutenção da quiescência da parede vascular, evidências sugerem que deficiências na produção de PGs e NO possam estar envolvidas no estabelecimento da aterosclerose (Gross & Wolin, 1995; Harrison, 1997; Michel & Feron, 1997).

O NO é um mediador de diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo a inflamação, sendo produzido pela óxido nítrico sintase (NOS), que catalisa a conversão de L- arginina para NO e L-citrulina. A enzima NOS existe em três isoformas: neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS). Em muitos tecidos ocorre a expressão de uma ou mais dessas isoformas. A nNOS e a eNOS são expressas constitutivamente e sua atividade é regulada pela concentração intracelular de cálcio (Dröge, 2002). A iNOS é estimulada pela combinação de $IFN-\lambda$, $TNF-\alpha$, $IL-\beta$ (Niess, 2000), isto é, quando ocorre inflamação. A isoforma iNOS tem sua expressão induzida nos macrófagos após a estimulação por citocinas, lipopolissacarídeos (LPS), e outros agentes imunológicos relevantes.

A inibição local do NO pode acelerar a formação da placa de ateroma, modulando o recrutamento de monócitos. A redução do relaxamento arterial é conseqüência da inibição do NO e não devido à ação da PGI_2 , um fator vasodilatador dependente do endotélio. Ainda, o NO reduz a ativação de células endoteliais e inibe a adesão de macrófagos por reprimir a expressão do gene da VCAM-1 e a ação pró-inflamatória das citocinas. Estes achados sugerem que o NO apresenta propriedades antiaterogênicas e antiinflamatórias (Da Luz et al, 1996).

Outro fator envolvido na redução do relaxamento arterial pode ser dependente da produção aumentada de radicais livres nos vasos acometidos.

Sabe-se que o ânion superóxido pode ser responsável pela inativação do NO (Da Luz et al, 1996). O superóxido pode reagir diretamente com o NO, inativando-o e formando nitratos com atividade biológica reduzida, ou ainda, formando o radical peroxinitrito que é um subproduto tóxico fortemente oxidante, além de inativar diretamente a guanililciclase no endotélio (Laurindo & Da Luz, 1995).

Altos níveis de estresse de cisalhamento (*shear stress*), aumento na produção de interleucina 1 (IL-1 β) e fator de necrose tumoral (TNF α) derivados de macrófagos, ativadores da proteína quinase C (PKC), bem como o estresse oxidativo na parede arterial (provocado pela hipertensão arterial ou pela hipercolesterolemia) levam à ativação do fator transcricional NF- κ B que dispara a transcrição de uma grande variedade de genes tanto nas células endoteliais quanto nas células musculares lisas. O NF- κ B pertence à família Rel e é peça integrante do controle da inflamação e da resposta imune inata (Piva et al, 2006). Este fator de transcrição normalmente existe como um complexo inativo citoplasmático, cuja forma predominante é um heterodímero composto pelas subunidades p50 e p65 (RelA) ligadas a uma proteína inibitória da família das I κ Bs. A indução do NF- κ B requer a ativação do complexo I κ B, contendo duas subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) e a subunidade regulatória IKK γ , que fosforila a I κ B, fazendo com que o NF- κ B fique livre para atravessar a membrana nuclear. Esta translocação do NF- κ B permite que ele se ligue ao DNA em sítios específicos e induza a transcrição de uma variedade de genes (Piva et al, 2005).

Quando o NF- κ B é ativado, ele precipita, nos macrófagos, a transcrição de fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão intercelulares e fatores de transcrição relacionados ao processo de proliferação celular (Griendling & Alexander, 1996; Colins et al., 1995; Resnik & Gimbrone, 1995), estando inclusive, mais recentemente, implicado em muitos aspectos da oncogênese, migração, progressão do ciclo celular e apoptose (Piva et al, 2006). Assim sendo, moléculas de adesão, como VCAM-1, podem ser expressas recrutando macrófagos. Estes formarão as *foam cells* que, juntamente com outros acontecimentos celulares, vão gerar um quadro inflamatório e, desta forma, mais macrófagos serão recrutados, mais moléculas

de adesão serão expressas e a lesão inicial vai aumentando, devido à exacerbação da resposta imune por dano continuado, conforme descrito anteriormente. Decorre desta ativação toda uma transformação celular que modifica os fenótipos quiescentes das células vasculares transformando-as em células ativadas com características sintetizantes e proliferativas, alterações tipicamente encontradas na aterosclerose e doença vascular hipertensiva (Belló-Klein et al, 2001). Assim, a ativação do NF- κ B mediada pelo estresse celular desempenha papel primordial no desenvolvimento da aterosclerose iniciada, quer por dislipidemias, quer por outros processos agressivos ao endotélio, como hipertensão arterial.

O NO, além de seus efeitos hemodinâmicos já bem estabelecidos (Griendling & Alexander, 1996), induz citoproteção vascular através do bloqueio exercido sobre as vias de ativação do NF- κ B (Xu et al., 1997). Foi observado que esta citoproteção dá-se através da ativação da via metabólica das proteínas de choque térmico (HSP). As HSP funcionam como chaperonas e são chamadas de proteínas de choque térmico (do inglês, *heat shock proteins*) por serem sintetizadas em grandes quantidades quando as células são expostas a temperaturas elevadas (42°C). Chaperonas moleculares são proteínas que ajudam na formação correta das proteínas, sendo responsáveis pela síntese, dobramento e degradação protéica (Pockley, 2001).

Várias proteínas de choque térmico funcionam como chaperonas moleculares, isto é, proteínas que “acompanham” outras proteínas de um compartimento celular a outro ou até que cheguem a seus destinos fisiológicos (núcleo, membranas, mitocôndrias, etc). A função chaperona das HSP está relacionada a sua propriedade de impedir dobramentos indesejáveis e a desnaturação das proteínas celulares, motivo pelo qual, estas HSP apresentam efeito citoprotetor (Fehrenbach, 2000) .

Nas células eucarióticas, tanto a família HSP60 quanto a HSP70 possuem afinidade pelas regiões hidrofóbicas expostas por proteínas com um dobramento incorreto, de forma que estas proteínas de choque térmico se ligam às proteínas não nativas e através da hidrólise de ATP, modificam a estrutura protéica, dando a oportunidade de um novo dobramento (Roberts et al, 1994). Por ter essa função na estabilização protéica, as HSP participam de uma variedade de processos fisiológicos celulares como controle do ciclo

celular, regulação do estado redox celular e apresentação de antígenos (Füst et al, 2005).

As HSP pertencem a uma classe de proteínas altamente conservadas filogeneticamente (Watson, 2003), podendo ser agrupadas em famílias de acordo com suas seqüências de aminoácidos e com seus pesos moleculares, em kDa (Meyer & Silva, 1999).

Nas células, a família das HSP70 apresentam-se em duas formas: HSC70 (do inglês, *Heat Shock Cognates*) e HSP70 induzível. A HSC (73 kDa) é expressa constitutivamente, ou seja, independe das condições de estresse, portanto, também ocorre nas células em repouso (Meyer & Silva, 1999). Já a HSP70 (72 kDa) é induzida por diversos agentes como aumento de temperatura, estresse oxidativo, depleção de energia celular, concentrações iônicas extremas, gases e várias substâncias tóxicas (Feder & Hofmann, 1999).

As situações estressantes causam dobramento incorreto ou agregação protéica, fazendo com que ocorra uma resposta de indução de um fator de transcrição para proteínas de choque térmico, HSF (do inglês, *Heat Shock Factor*), para restabelecer o balanço entre síntese, arranjo e desagregação protéica. Quatro HSFs foram identificados em vertebrados, sendo o HSF1 o principal HSF envolvido na resposta fisiológica e ambiental ao estresse (Todryk et al., 2003). Em estado de repouso, esse fator de transcrição está presente no citoplasma na forma latente de molécula monomérica que não se liga ao DNA. Em condições de estresse, HSF é fosforilada tornando-se ativa, ou seja, capaz de se ligar ao DNA. A regulação da transcrição do gene da HSP é mediada pela interação do HSF com HSE (do inglês, *Heat Shock Element*) nas regiões promotoras do gene de proteínas de choque térmico (Pockley, 2001).

A resposta da HSP ao estresse é somente transiente, pois o prolongamento e inapropriada presença de moléculas protéicas ligantes poderiam influenciar adversamente na homeostase protéica e numa variedade de funções intracelulares. Um mecanismo pelo qual a atividade da HSF1 é regulada negativamente, ocorre pela ligação da HSP70 ao domínio de transativação deste fator, o que resulta na repressão do gene de transcrição das proteínas de choque térmico, pois com o aumento da síntese de HSP, estas se deslocam para o núcleo, ligando-se ao domínio ativador de transcrição

dos HSF1 e reprimindo o processo de transcrição de genes HSP (Santoro et al, 2000).

Macrófagos, que, como discutido acima, ocupam papel de destaque na iniciação e no desenvolvimento da lesão aterosclerótica, são produtores de grandes quantidades de PGE₂ e seu isômero, a PGD₂ (Scott et al, 1982; Urade et al, 1989). Estas prostaglandinas, por sua vez, podem ser transformadas facilmente no plasma *in vivo* em PGA₂ e Δ^{12} -PGJ₂ e seus J-derivados (Ohno et al, 1986; Narumiya & Fukushima, 1985; Kikawa et al, 1984; Fitzpatrick & Wynalda, 1983) que, juntos, são conhecidos como prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs). 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). A Figura 2 mostra estas estruturas, conforme descrito por Gutierrez e colaboradores (2007).

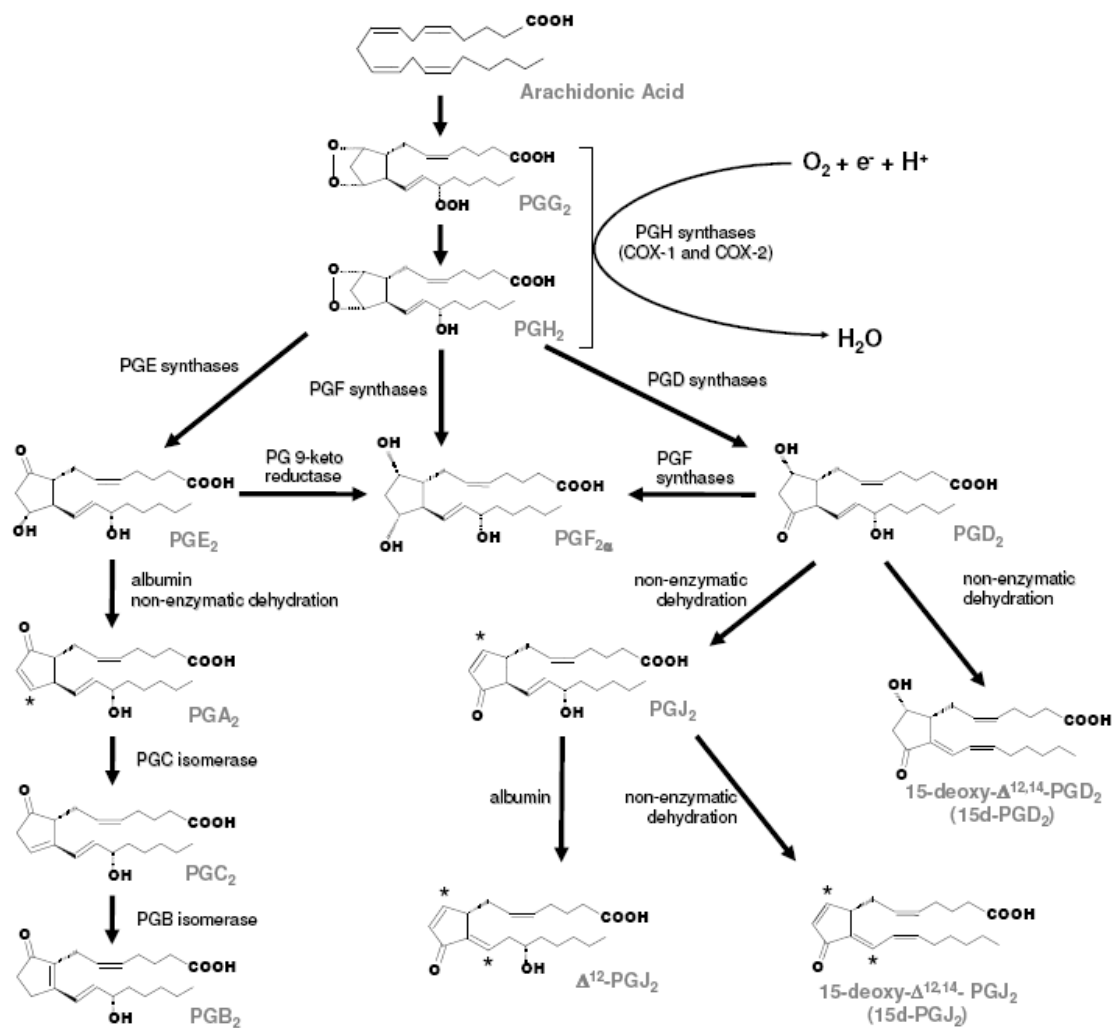


Figura 2: Metabolismo do ácido araquidônico e formação das prostaglandinas ciclopentenônicas (família das PGA₂ e PGJ₂), conforme descrito por Gutierrez e colaboradores (2007).

O anel ciclopentenônico possui dois centros eletrofílicos e por este motivo, fica muito susceptível a reações de adição nucleofílica, conferindo às CP-PGs alta capacidade de interação e sendo indispensável para a ação biológica destas moléculas. São estes centros o grupo carbonil α,β - insaturado e o carbono da cetona presente no anel, estruturas estas que se encontram em ressonância (Atsmon et al, 1990; Chen et al, 1999, Straus & Glass, 2001; Solomons, 2002). Estes compostos reagem rapidamente com cisteínas e grupamentos tiol pertencentes a diversas moléculas, como glutatona e proteínas celulares, por adição de Michael (adição nucleofílica na insaturação

entre os carbonos α,β , 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). Os centros eletrofílicos, a ressonância, os ataques nucleofílicos e a adição de Michael estão demonstrados nas Figuras 3, 4, 5 e 6, respectivamente (Solomons, 2002).

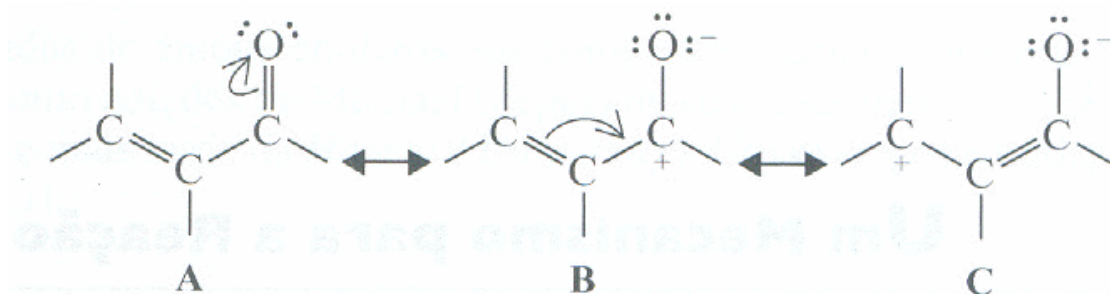


Figura 3: Centros eletrofílicos de um anel ciclopentenônico (uma carbonila α,β -insaturada e a carbonila da cetona), segundo Solomons (2002).

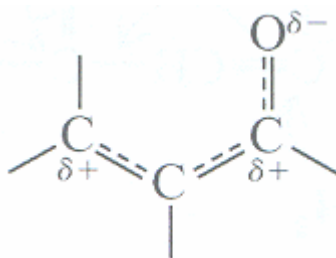


Figura 4: Ressonância que ocorre entre os centros eletrofílicos de um anel ciclopentenônico, conforme Solomons (2002).

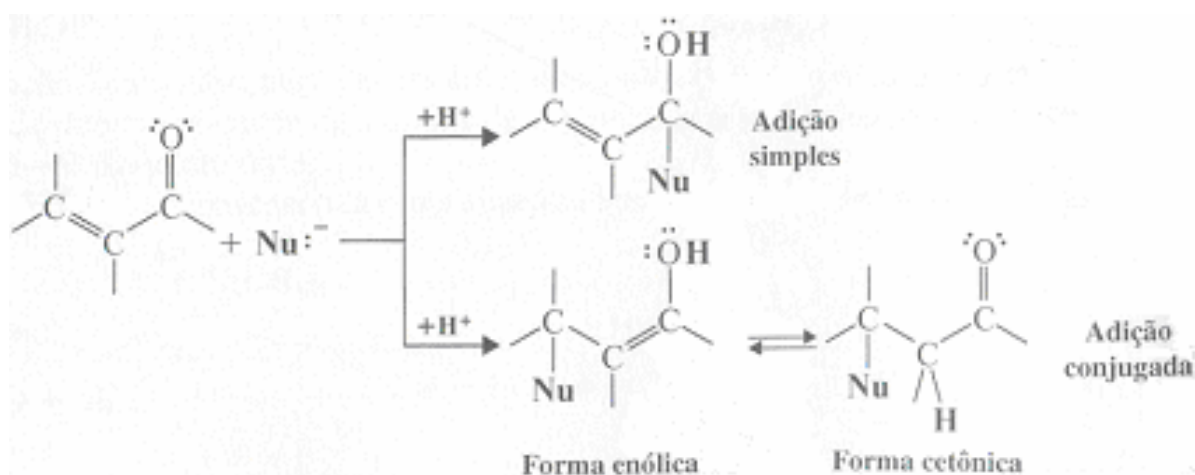


Figura 5: Ação de nucleófilos em centros eletrofílicos de um anel ciclopentenônico (Solomons, 2002).

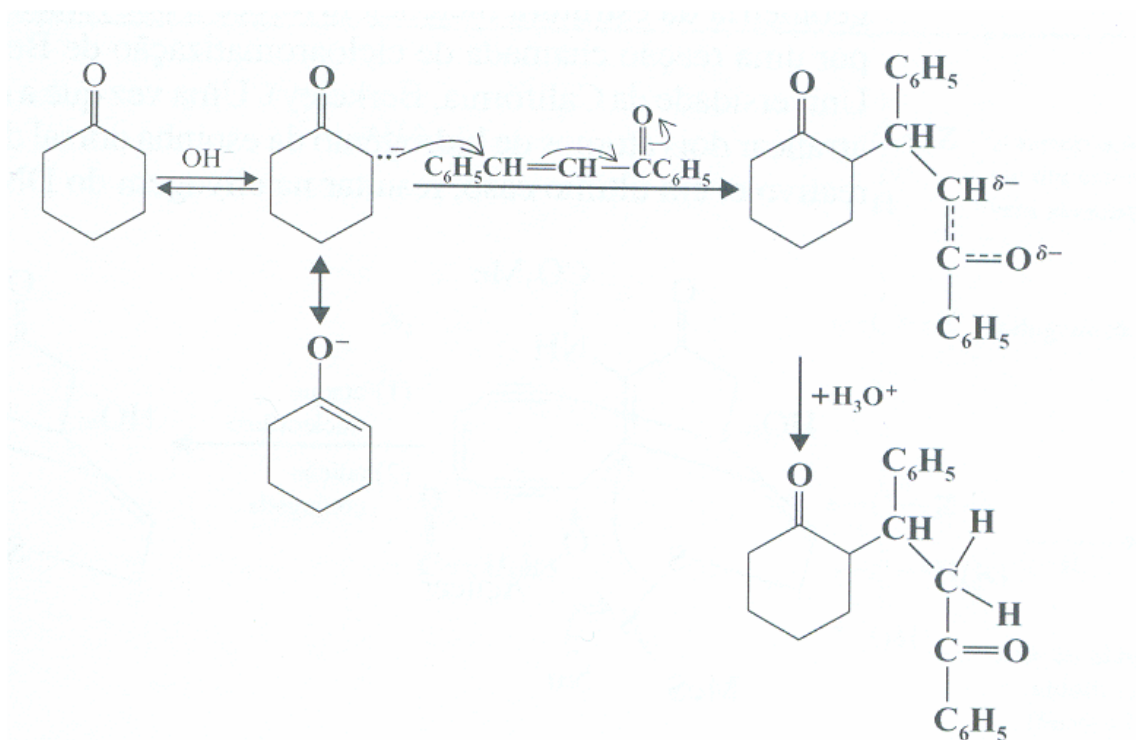


Figura 6: Adição de Michael (Solomons, 2002).

As prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) são ativadores universais da via das HSP (Amici et al, 1992; Rossi & Santoro, 1995) e levam a citoproteção através da inibição dos mecanismos de ativação do NF- κ B numa 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). Essas prostaglandinas (PGs) têm sua produção relacionada com a resistência celular ao estresse (atividade citoprotetora) e têm efeito antiproliferativo contra replicação viral e vários tipos de câncer (Homem de Bittencourt Jr. et al, 1998c; Homem de Bittencourt Jr. & Curi, 2001).

Na verdade, as CP-PGs bloqueiam a ativação do NF- κ B através de, pelo menos um mecanismo conhecido: a inibição da I- κ B quinase, enzima que precipita a ativação deste fator nuclear (Rossi et al, 2000). Assim, o NO e certas prostaglandinas ativam a via das HSP que desliga a ativação do NF- κ B promovendo citoproteção.

Desta forma, é possível que as PGs e o NO compartilhem outros mecanismos intracelulares comuns durante o dano celular, ao lado do já bem estabelecido sinergismo observado durante a inflamação, onde o NO produzido

pela NO sintase induzível (iNOS) aumenta a atividade da cicloxigenase-2 (COX-2) que produz PGs no sítio inflamatório (Isakson et al, 1995).

Outro fator que parece estar envolvido no desenvolvimento da aterosclerose é o PPAR (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor*), que são receptores nucleares que regulam a expressão de genes controlando o metabolismo lipídico e da glicose. Apesar de três isoformas do PPAR já terem sido descritas (α , β e δ), a identificação de seus ligantes naturais permanece controvertida (Bell-Parikh et al, 2003). PPAR- α são ativados por derivados de ácidos graxos e eicosanóides, sendo expressos em fígado, coração, músculo e rim, além de estar presente na parede vascular (células da musculatura lisa e endotélio) e em células como monócitos, macrófagos e macrófagos/ *foam cells*. Nestes últimos, o PPAR- α diminui a esterificação do colesterol por inibir a ACAT, induz a expressão do gene do ABCA1 e promove o efluxo do colesterol mediado por apoAI (Chinetti et al, 2003). O PPAR- γ , por sua vez, é um fator de transcrição que regula o metabolismo lipídico e lipoprotéico, a homeostase da glicose e a inflamação (Duval et al, 2002), também estando implicado na obesidade, diabetes, resposta imune, envelhecimento e aterosclerose (Na & Surh, 2003) e sendo expresso predominantemente em tecido adiposo, cólon e macrófagos e em menor extensão, em células musculares lisas da vasculatura (Bell-Parikh et al, 2003). Além disto, três elementos responsivos a PPAR foram identificados no gene da CEH em macrófagos humanos, nas posições -176, -179 e -1316. Uma diminuição da atividade do promotor do gene da CEH foi observada na presença de ligantes específicos de PPAR- α e de PPAR- γ e a introdução de uma mutação no PPAR a -176 aboliu completamente o efeito de ligantes do PPAR na atividade do promotor. Assim, viu-se que a CEH humana também é regulada por PPAR (Ghosh & Natarajan, 2001). Ainda, o PPAR- γ aumenta a expressão de dois genes envolvidos na síntese de colesterol, da HMG-CoA sintase e da HMG-CoA reductase em macrófagos, além de aumentar a atividade desta última enzima, aumentando a quantidade de colesterol intracelular (Iida et al, 2002).

Foi demonstrado que LDL oxidadas induzem a expressão (Ricote et al, 1998) e ativação (Tontonoz et al, 1998; Nagy et al, 1998) do fator nuclear

PPAR- γ , tendo a camada íntima das células musculares lisas, maiores níveis presentes que a camada média (Bishop-Bailey et al, 2002). O PPAR- γ pode ser ativado por um grande número de ligantes, como eicosanóides e produtos da cicloxigenase, como PGI₂, PGD₂, 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ e LDL oxidada. Ainda, o PPAR- γ é expresso pela vasculatura, monócitos, macrófagos e linfócitos T auxiliares, estando comprovadamente presente em lesões ateroscleróticas (Bishop-Bailey et al, 2002). O PPAR- γ ativa a transcrição do gene do receptor *scavenger* CD36 (Iida et al, 2002), que estimula a captação de mais LDL oxidadas por macrófagos (Boullier et al, 2002), fazendo com que estas células se diferenciem em *foam cells* e exacerbando o processo aterosclerótico. Estudos demonstram que o estresse oxidativo aumenta a expressão do receptor CD36 (Fuhrman et al, 2002) e que sua expressão está aumentada na placa aterosclerótica e no tecido vascular lesado (Kuliczowska- Plaksej et al, 2006).

As prostaglandinas podem ser os moduladores fisiológicos do processo de produção e exportação de lipídios em linfócitos e células tumorais (Homem de Bittencourt Jr. et al, 1994). Além disso, a prostaciclina (PGI₂), interfere no metabolismo lipídico de pré-adipócitos elevando a expressão de glicerol-3-fosfato desidrogenase e conseqüente acúmulo de triacilgliceróis nestas células (Vassaux et al, 1992a, 1992b), enquanto que CP-PGs são os ligantes fisiológicos do fator de transcrição nuclear PPAR- γ que leva à diferenciação de adipócitos, com profunda influência sobre o metabolismo lipídico destas células (Forman et al, 1995; Kliewer et al, 1995). Somente a PGJ ativa o PPAR- γ e isto tem profunda importância farmacológica. As prostaglandinas J, especialmente a 15-desóxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂, causam anti-proliferação, apoptose, diferenciação e tem ação anti-inflamatória em certos tipos de células cancerígenas. Seus efeitos anti-inflamatórios estão relacionados com a supressão da expressão de genes que levam a produção da inflamação, via inativação do fator transcripcional NF- κ B. Além disto, a 15-desóxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ induziu a expressão de enzimas responsivas ao estresse, o que pode conferir resistência celular ou adaptação ao estresse oxidativo (Na & Surh, 2003). A participação do fator de diferenciação de adipócitos PPAR- γ (receptor nuclear ativado por proliferadores de peroxissomas) no

desenvolvimento da lesão aterosclerótica passou a receber extrema atenção depois que foi observado que sua expressão e ativação estão estimuladas em lesões ateroscleróticas humanas (Ricote et al, 1998a).

Sabe-se que as LDL oxidadas contêm altas concentrações de derivados lipídicos oxidados, como o 9- e 13-HODE (ácido hidróxi-ocatadecadienóico), que são metabólitos do ácido linoléico e são ativadores diretos do PPAR- γ e de sua expressão gênica (Nagy et al, 1998). Por sua vez, a ativação do PPAR- γ em macrófagos leva à expressão do receptor de *scavenger* CD36 em macrófagos (Figura 7), diferenciando-os em macrófagos/ *foam cells* (Tontonoz et al, 1998). Assim, a ativação do fator de transcrição nuclear PPAR- γ induz a um ciclo que perpetua a lesão aterosclerótica (Figura 8, segundo Tontonoz e colaboradores, 1998), já que componentes das LDL oxidadas ativam este fator que desencadeia a expressão de receptores de *scavenger* para a internalização de mais e mais moléculas de LDL oxidadas contendo mais ativadores do PPAR- γ .

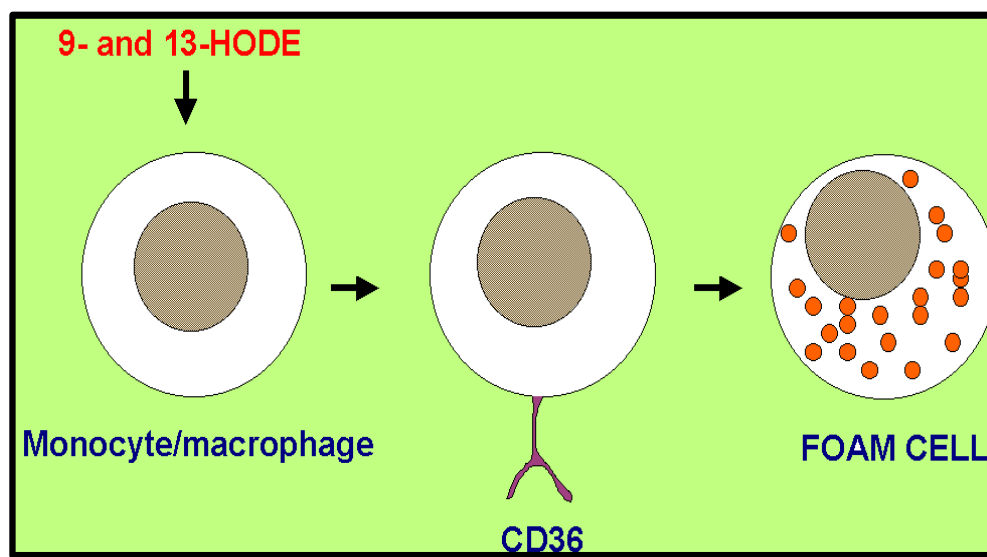


Figura 7: Expressão do receptor *scavenger* CD36/FAT em macrófagos por ativação do PPAR- γ , segundo Tontonoz e colaboradores (1998).

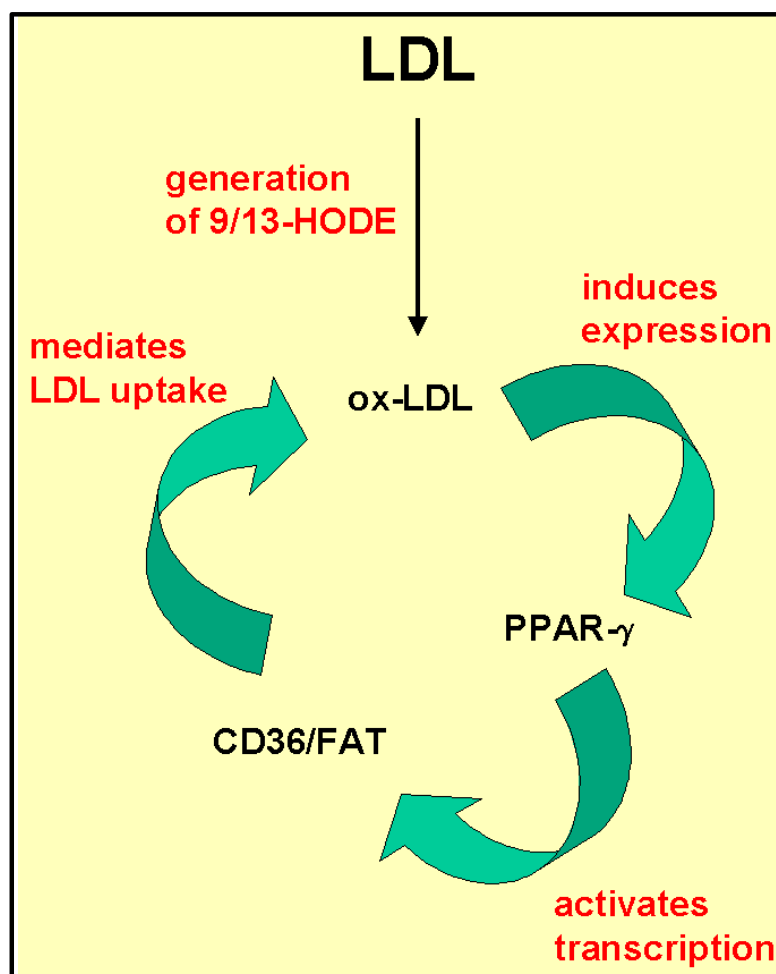


Figura 8: Ativação do fator nuclear PPAR- γ e ciclo que perpetua a lesão aterosclerótica, segundo Tontonoz e colaboradores (1998).

Embora as CP-PGs da família da prostaglandina J_2 sejam ativadoras e ligantes fisiológicos do PPAR- γ podendo ter algum papel no desenvolvimento da aterosclerose, CP-PGs da família da PGA_2 não levam à ativação deste fator nuclear (Forman et al, 1995). Ao contrário, resultados sugerem que as prostaglandinas da família da PGA_2 sejam citoprotetoras e redutoras das concentrações intracelulares de colesterol (Senna et al, 1998; Homem de Bittencourt Jr. et al, 2007). As CP-PGs e o NO compartilham a propriedade de induzir citoproteção através da ativação da via metabólica das HSP, que induz inibição do NF- κ B, o que inibe os efeitos citotóxicos decorrentes da ativação deste fator transcripcional. Foi observado que a PGA_2 e o doador de óxido

nítrico SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) reduzem sensivelmente a lipogênese de macrófagos. É interessante, ainda, que este efeito seja mais exacerbado em macrófagos inflamatórios, como aqueles encontrados na lesão ateromatosa.

As CP-PGs provocam um desvio no metabolismo lipídico de macrófagos inflamatórios no sentido da produção de fosfolípidios. Isto acarreta uma grande diminuição no acúmulo de colesterol, ésteres de colesterol e ácidos graxos por estas células. Homem de Bittencourt Jr. e colaboradores (2007) mostraram que o tratamento de *foam cells in vitro* com PGA_2 fez com que estas células voltassem a ser como macrófagos não inflamatórios (Figura 9). Neste estudo, observou-se que quando macrófagos/ *foam cells* se encontravam em meio com colesterol e éster de colesterol radioativos e PGA_2 , havia uma inibição da incorporação de colesterol e éster de colesterol exógeno, assim como da via de biotransformação intracelular destes dois lipídios. Ainda, todo o acetil-CoA presente nos macrófagos inflamatórios, em presença de PGA_2 (segundo Homem de Bittencourt Jr. et al, 2007), utilizam estes substrato para produção de fosfolípidios e não para formação intracelular de colesterol, conforme mostra a Figura 9 (Gutierrez et al, 2007). É interessante lembrar que é a partir de fosfolípidios que as prostaglandinas são formadas. Apesar dos resultados obtidos mostrarem a influência da PGA_2 em macrófagos/ *foam cells*, o mecanismo pelo qual seu metabolismo está alterado não é conhecido assim como também não é conhecido em macrófagos residentes.

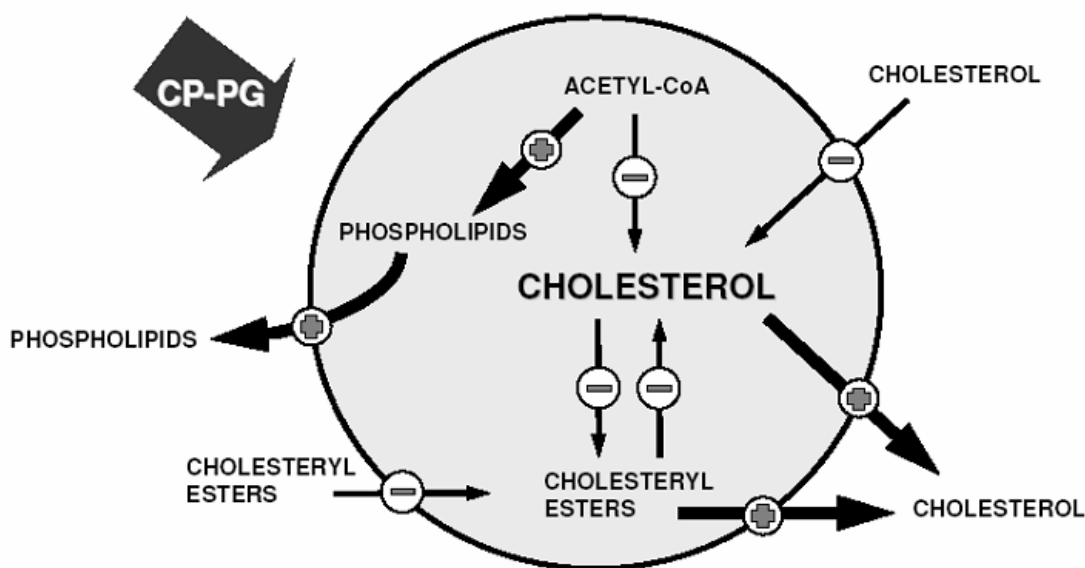


Figura 9: Efeitos das CP-PGs no metabolismo do colesterol (Gutierrez et al, 2007).

Homem de Bittencourt Jr. e colaboradores (2007) verificaram que a via que esterifica o colesterol e que transforma os ésteres de colesterol em colesterol novamente está diminuída em macrófagos inflamatórios, o que sugere uma diminuição da atividade ou expressão da ACAT e da ACEH/NCEH. Ainda, a síntese endógena do colesterol pelos macrófagos/*foam cells* está diminuída, sugerindo que também aja uma diminuição da atividade ou expressão da HMG-CoA redutase, enzima chave na formação desta substância (Figura 9). Entretanto, nenhum destes efeitos foi estudado em macrófagos peritoneais e macrófagos/*foam cells*. Finalmente, as CP-PGs sempre apresentam efeitos biológicos dependentes da expressão de HSP. Sendo assim, não se pode descartar a possibilidade de que a indução de HSP possa influenciar nas alterações observadas.

2.4- Estado redox celular e sua importância na aterosclerose

O dano infligido por radicais livres em alvos celulares e extracelulares, como as membranas lipídicas, proteínas e DNA claramente contribuem para a disfunção dos órgãos e tecidos em muitas patologias (Shihabi et al, 2002).

É sabido que o balanço entre oxidantes e antioxidantes é crítico para função das células, pois isto mantém a integridade e a funcionalidade da membrana celular, das proteínas celulares e dos ácidos nucleicos, além de ser essencial no controle da transdução de sinal e expressão gênica. As células imunológicas são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo devido à grande porcentagem de ácidos graxos polinsaturados existentes em suas membranas plasmáticas e à grande produção de espécies ativas de oxigênio, que fazem parte de suas funções normais. Assim sendo, a concentração de glutathione (GSH) intracelular é essencial para impedir a ação de radicais livres e regular o metabolismo lipídico do macrófago (Oliveros et al, 2004).

Outro passo essencial para a lipogênese das células envolvidas na aterosclerose é a geração de NADPH para a síntese de lipídios. A NADPH oxidase é a maior fonte de formação de espécies ativas de oxigênio de células vasculares em cultura, embora a xantina oxidase, a óxido nítrico sintase, a citocromo P450 e a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial também

sejam importantes fontes de espécies ativas de oxigênio em dadas circunstâncias. As enzimas geradoras de NADPH para a lipogênese em macrófagos/ *foam cells* são a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e enzima málica (malato desidrogenase dependente de NADP⁺). A geração de força redutora para a lipogênese (NADPH) é fundamental para a fisiologia de macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas vasculares, e a razão NADPH/ NADP⁺ (força redutora para a lipogênese) depende do balanço redox intracelular (Shihabi et al, 2002).

As espécies reativas de oxigênio, formadas, na maioria dos casos, por agentes genotóxicos exógenos (irradiação, citocinas inflamatórias e carcinógenos), são elementos desencadeadores das alterações do potencial redox. As EAO e o potencial redox alterado podem ser considerados como as mudanças intracelulares primárias que regulam proteínas quinase, servindo, deste modo, como importantes componentes celulares de ligação entre o estímulo externo e o sinal de transdução na resposta ao estresse (Adler et al, 1999). Em contraste à noção convencional de que as EAO sejam primordialmente um gatilho para o dano oxidativo das estruturas biológicas, está o fato de que, em baixas concentrações (fisiológicas), estas possam regular uma série de mecanismos moleculares que podem estar ligados a importantes funções celulares (Sen, 2000).

Assim, o potencial redox, sustentado pela relação entre a glutathiona (GSH) e o dissulfeto de glutathiona (GSSG), tem a função de regular a expressão de genes detoxificantes, sendo finamente regulado nas células sob condições normais. Nestas condições, a extrusão de GSH e de conjugados de GSH (GS-conjugados), para fora das células compõe parte do sistema GSH de defesa celular contra EAO. A redução de hidroperóxidos pela enzima glutathiona peroxidase (GPx) produz GSSG, o qual é transportado através da membrana celular por intermédio de uma ATPase específica para GS-conjugados (Akerboom & Sies, 1994). A magnitude da resposta a estímulos fisiológicos, suficientemente intensos para disparar a sinalização redox sob condições não tóxicas, no entanto, ainda não é conhecida.

Pesquisas indicam que prostaglandinas podem modular o estado redox celular através do metabolismo da GSH, afetando a lipogênese de macrófagos (Homem de Bittencourt Jr. & Curi, 1998; Homem de Bittencourt Jr. et al, 1998a;

1998b; 1998c; Senna et al, 1998; Homem de Bittencourt Jr. & Curi, 2001, Gutierrez et al, 2007). A natureza reativa das CP-PGs conferida pela presença do grupamento carbonila α,β - insaturado e pela presença da cetona no anel, que caracterizam estas moléculas, dão sustento à hipótese de sua participação no estado redox celular e na patogênese de injúrias oxidativas. Como mencionado anteriormente, as CP-PGs inibem a proliferação celular por sua habilidade de modular uma variedade grande de genes relacionados com o crescimento celular e genes induzidos por estresse, induzir apoptose em altas concentrações e ativar o PPAR- γ (Ricote et al, 1998b). O grupamento carbonila α,β - insaturado parece ser essencial para muitas destas ações biológicas. Desde 1968, segundo Boyland & Chasseaud, está descrito que a glutathione é capaz de reagir com compostos α,β - insaturados, reação esta que pode ser catalisada por vários tipos de enzimas. A PGA_2 é rapidamente conjugada com a glutathione pela ação da glutathione-S-transferase, produzindo um GS-conjugado, diferente da $12-PGJ_2$, que não requer esta catálise para ligar-se rapidamente à glutathione (Chen et al, 1999). Estes autores demonstraram que a conjugação das CP-PGs com a glutathione impediu que ocorresse inibição da proliferação celular e a indução de apoptose por parte das CP-PGs (estas ações podem ser visualizadas na Figura 10, conforme proposto por Gutierrez, et al, 2007).

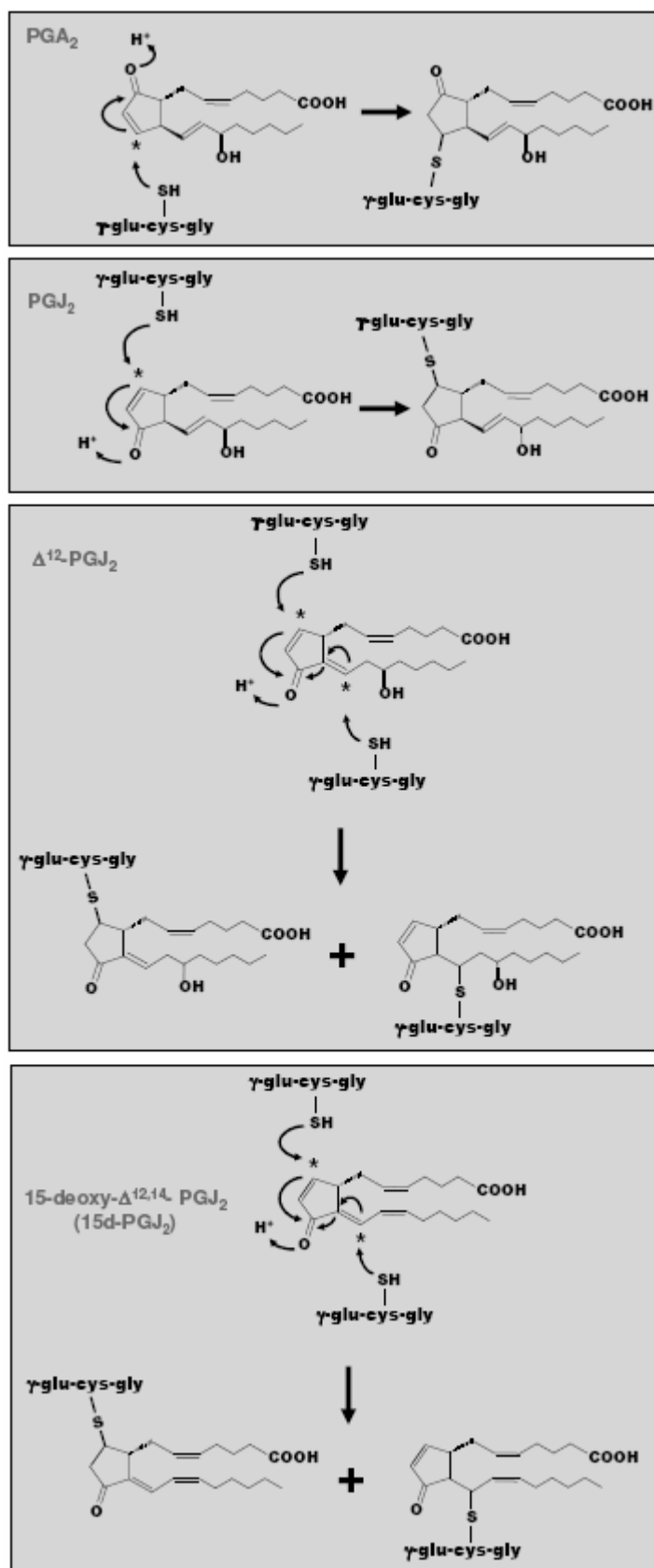


Figura 10: Possíveis reações de Adição de Michael entre CP-PGs e grupamento tiol da glutatona, segundo Gutierrez e colaboradores, 2007.

Desta forma, acredita-se que, além das CP-PGs poderem interferir no estado redox das células, também possam interferir na atividade das enzimas ACAT, CEH e HMG-CoA redutase, por estas possuírem grupamentos contendo cisteínas (Figura 11, segundo Gutierrez et al, 2007). Porém, a consequência disto ainda não é conhecida em toda sua extensão.

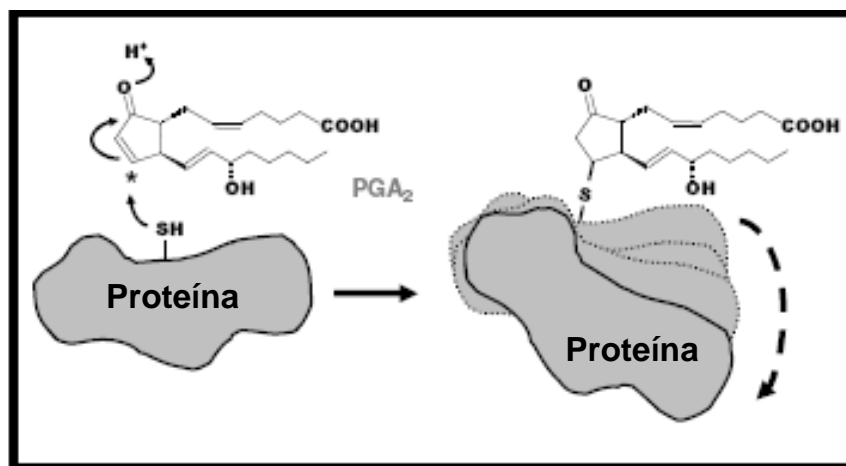


Figura 11: Possível reação de Adição de Michael entre CP-PGs e cisteínas reativas de proteínas, segundo Gutierrez e colaboradores, 2007.

Ainda, a presença da ATPase de membrana MRP1/bomba GS-X (MRP, do inglês, *Multidrug Resistance-Associated Protein*), que exporta GS-conjugados para o espaço extracelular, pode estar modificada pela presença de prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs). Em condições normais, a reação da GST encontra-se próxima do equilíbrio químico sob as condições fisiológicas do meio intracelular. Porém, em presença de CP-PGs a MRP1/bomba GS-X desloca o equilíbrio para a direita, no sentido da formação de mais GS-conjugados, o que impede o acúmulo de eletrófilos, como as CP-PGs. Logo, a ausência, ou baixa atividade da MRP1/bomba GSX favorece o acúmulo destas CP-PGs (Homem de Bittencourt Jr. & Curi, 2001), o que provavelmente modifica o estado redox celular. A baixa expressão de MRP (um transportador de membrana, tais como as proteínas de multi-resistência a drogas - MRP, do inglês *multidrug resistance-associated protein*) está associada à baixa expressão da γ -GCS (γ - glutamil cisteína sintetase), enzima-chave de regulação da síntese de GSH, o que poderia sugerir participação da MRP na regulação da GSH. Porém apesar de o mRNA da γ -GCS apresentar co-expressão com as MRP-1 e MRP-2, a expressão dos dois genes parece ser

controlada independentemente (Kuo et al, 1998). Pouco se sabe sobre a sinalização envolvida na regulação da MRP, no entanto, alguns fatores ambientais já foram identificados como reguladores do gene de MRP (Oosthuizen et al, 2000). Homem de Bittencourt Jr. & Curi, em 2001, sugeriram que a MRP1, mais do que qualquer outra proteína, é mediadora do transporte ATP-dependente de S-conjugados de GSH. Uma oxidação aumentada de GSH, catalisada pela GPx leva à formação aumentada de GSSG, que é um GS-conjugado e, portanto, substrato para a ATP-dependente MRP/bomba GS-X, podendo ser exportado pela mesma. Estes resultados sugerem que a MRP/bomba GS-X possa atuar como moduladora do potencial redox celular ao exportar os GS-conjugados e regular o balanço entre GSSG e GSH.

A aterosclerose é uma situação de estresse que leva a um desbalanço redox intracelular, pois macrófagos são capazes de captar LDL oxidadas, o que leva ao acúmulo de oxisteróis (colesterol oxidado), podendo modificar o estado redox celular (Bansal et al, 2001). A presença destes oxisteróis prejudica a exportação de colesterol pelo macrófago, sugerindo a ação de oxisteróis na manutenção do fenótipo *foam cell* (Van Reyk & Jessup, 1999). Os efeitos pró-aterogênicos de LDL oxidadas são atribuídos aos oxisteróis, particularmente ao 7 β -hidroxicolesterol. Bansal e colaboradores, em 2001, sugeriram que o 7 β -hidroxicolesterol gera estresse oxidativo em macrófagos e os torna mais suscetíveis aos efeitos pró-aterogênicos por prejudicar o sistema celular de defesa, que consiste de antioxidantes e de proteínas que respondem ao estresse, como a HSP 70 (Aviram et al, 2000). Segundo a literatura, o desequilíbrio redox dá-se tanto pelo aumento de espécies oxidantes, com conseqüente aumento das concentrações intracelulares de GSSG, quanto pela depleção não-oxidativa da GSH, através da formação de GS-conjugados. Nestas situações verifica-se a expressão de HSP, associadas ao estado redox alterado (Homem de Bittencourt Jr et al, 1998a, b, c). A homeostase do estado redox intracelular de GSH é finamente regulada para comandar o metabolismo celular e proteger as células contra o estresse oxidativo.

Além disso, o NF- κ B é um fator de transcrição sensível ao estado redox. Estudos identificaram que uma certa quantidade de GSSG é necessária para a indução da ativação do NF- κ B e da translocação nuclear, enquanto o excesso

de GSSG inibe a função do NF- κ B em nível da ligação ao DNA (Galter et al, 1994). As etapas sensíveis ao estado redox são comumente dependentes da natureza do ativador do NF- κ B (Janssen-Heininger et al, 2000). Hiperóxia ou elevações das EAO causam a ubiquinação e destruição das proteínas inibitórias (I- κ B), liberando o NF- κ B e permitindo que se ligue aos promotores dos genes-alvo. Por outro lado, a atividade do NF- κ B como ligante do DNA e fator de transcrição, é inibida por agentes oxidantes e potenciada por tióis (Mihm et al, 1995). Assim, percebe-se nitidamente que existe um estado redox "ótimo" abaixo do qual, a ativação do NF- κ B diminui e acima do mesmo, a ativação aumenta, mas sua capacidade de ligação ao DNA diminui (Galter et al, 1994).

Conforme visto, as interações de lipídios modificados, macrófagos e macrófagos/ *foam cells* tem sido muito estudadas; entretanto pouca atenção tem sido dada ao potencial redox intracelular do macrófago como um modulador da sua síntese e metabolismo de lipídios e poucos estudos têm esta abordagem.

2.5- Vistas ao desenvolvimento de uma terapia vascular à base de CP-PGs

Viu-se que CP-PGs da série J são os ativadores fisiológicos do fator de transcrição nuclear PPAR- γ que leva à diferenciação de adipócitos e macrófagos, com profunda influência sobre o metabolismo lipídico destas células (Forman et al, 1995; Kliewer et al, 1995; Ricote et al, 1998b; Tontonoz et al, 1998; Nagy et al, 1998). Além disto, a 15-deoxi-delta (12,14)-prostaglandina J₂ induz a expressão de enzimas responsivas ao estresse, o que pode conferir resistência celular ou adaptação ao estresse oxidativo (Na & Surh, 2003), conforme descrito anteriormente, mas não é conhecido o efeito da PGA₂ sobre o estado redox de macrófagos. Entretanto, é possível que exista uma ligação entre a modulação do metabolismo lipídico por CP-PGs e o estado redox celular através da supressão das vias efetoras dependentes do NF- κ B.

Resultados obtidos com CP-PGs, segundo Homem de Bittencourt Jr. e colaboradores (2007), podem representar um grande avanço científico, já que os fármacos e procedimentos utilizados atualmente garantem apenas a estabilização da placa de ateroma. O efeito das CP-PGs desviando o

metabolismo lipídico de macrófagos inflamatórios no sentido da síntese de fosfolipídios poderá ser explorado clinicamente visando à redução da lipogênese, em particular, da colesterogênese e produção de ésteres de colesterol. Por isso, o tratamento com estas substâncias é promissor no sentido de que se poderá explorar clinicamente o acúmulo de lipídios nos vasos através de um ponto de vista absolutamente inovador.

A lipogênese em macrófagos é um fenômeno essencial para sua funcionalidade, já que estas células apresentam uma altíssima taxa de renovação de membranas ($t_{1/2} \approx 30$ min) e intensa produção e secreção de mediadores lipídicos (Steinman et al, 1983). Entretanto, o efeito de autacóides, como a CP-PGs, sobre a lipogênese e estado redox de macrófagos nunca foi investigado e seu estudo poderá esclarecer aspectos críticos do funcionamento de macrófagos na aterosclerose.

A importância deste estudo justifica-se pelo fato de que a maioria dos trabalhos referente a interações intercelulares no processo aterogênico leva em conta apenas os fenômenos ocasionados pela produção de fatores de crescimento, linfocinas, produtos da matriz extracelular e interações com LDL modificadas. Apesar de a aterosclerose ser uma síndrome essencialmente de desbalanço lipídico, pesquisas sobre a participação de lipídios neste processo normalmente estão relacionadas apenas com evidências epidemiológicas ou com o metabolismo de lipoproteínas. Portanto, tornou-se mister a investigação sobre o metabolismo do colesterol para o desenvolvimento da aterosclerose.

Tendo em vista, portanto, que os efeitos das CP-PGs sobre o metabolismo lipídico de macrófagos podem estar relacionados à ativação da expressão de HSP e desativação do NF- κ B, assim como da expressão de CD36, iNOS e MRP1, e que o papel das enzimas ACAT (acil CoA:colesterol aciltransferase) e HMG-CoA redutase não está elucidado, assim como a ação das CP-PGs sobre o estado redox celular, foi proposto o estudo do efeito de CP-PGs da família da prostaglandina A sobre o estado redox e a síntese *de novo* de lipídios (lipogênese) em diferentes tipos de macrófagos. Considerando que os macrófagos são o principal tipo celular desencadeador da aterosclerose, acreditamos que os resultados desta investigação poderão auxiliar na compreensão do desenvolvimento desta doença.

3. OBJETIVOS

Os resultados de estudos anteriores (Homem de Bittencourt Jr. et al, 2007) mostraram que a PGA_2 tem um efeito benéfico contra o desenvolvimento da aterosclerose por reduzir dramaticamente a quantidade de colesterol e ésteres de colesterol em macrófagos/ *foam cells*. Uma vez que os estudos com traçadores radioquímicos indicaram que a PGA_2 bloqueia o fluxo de acetil-CoA para a síntese de colesterol e ésteres de colesterol, resolveu-se pesquisar se a PGA_2 possui um efeito inibitório direto sobre a atividade da HMG-CoA redutase e ACAT em macrófagos peritoneais. Um possível efeito inibitório sobre a expressão da HMG-CoA redutase, em macrófagos/ *foam cells*, foi descartado porque estudos prévios indicaram que a expressão do RNAm codificado para esta enzima encontra-se inclusive aumentada. Tendo em vista que a PGA_2 bloqueia a AMPKK, responsável pela ativação da AMPK que, em última instância, bloqueia a atividade da redutase por fosforilação da enzima, restou a possibilidade de que a PGA_2 pudesse inibir a atividade HMG-CoA redutase pela formação de adutos de Michael com as cisteínas reativas Cys 266 (sítio ativo) e Cys 323 (alostérico). Por isso, objetivamos investigar os efeitos da PGA_2 sobre a atividade da redutase em macrófagos peritoneais comparando-os com outras alterações no estado redox celular que pudessem mimetizar seus efeitos. Além disso, como a ACAT também possui uma cisteína reativa (Cys467) tivemos como objetivo, também, o estudo do efeito da PGA_2 sobre a atividade da mesma também em comparação com várias manobras de interferência no potencial de redução das células (macrófagos peritoneais e *foam cells*, neste caso).

Como objetivos específicos visou-se a estudar:

- A atividade da ACAT, enzima envolvida na síntese de ésteres de colesterol, em macrófagos/ *foam cells* em 24h de tratamento com PGA_2 ;
- A atividade da ACAT em macrófagos peritoneais em dois tempos distintos (1h e 24h) de tratamento com PGA_2 , oxidantes (BSO/DEM) e antioxidantes (NAC);
- O estado redox celular frente a PGA_2 , oxidantes (BSO/DEM) e antioxidante (NAC) em dois tempos distintos e em duas linhagens celulares diferentes (macrófagos peritoneais e U937), uma vez que o potencial redox

pode ativar cascatas de sinalização e desencadear a ativação de fatores de transcrição celular;

- A expressão da proteína MRP1, em macrófagos peritoneais em dois tempos distintos (6h e 24h) de tratamento com PGA_2 , oxidantes (BSO/DEM) e antioxidantes (NAC), visto que a MRP1 está envolvida no controle redox intracelular, exportando conjugados eletrofílicos com a glutathiona para o meio extracelular;

- A expressão das proteínas da família HSP70, em macrófagos peritoneais em dois tempos distintos (6h e 24h) de tratamento com PGA_2 , oxidantes (BSO/DEM) e antioxidantes (NAC), já que estas proteínas também são sensíveis a modificações no estado redox celular;

- A expressão das proteínas da família HSP70, em macrófagos/ *foam cells* em 24h de tratamento com PGA_2 , pelo mesmo motivo acima exposto;

- A expressão da proteína iNOS, em macrófagos peritoneais em dois tempos distintos (6h e 24h) de tratamento com PGA_2 , oxidantes (BSO/DEM) e antioxidantes (NAC), uma vez que modificações no estado redox podem imitar as condições existentes em células inflamatórias;

- A atividade e a expressão da enzima-chave da síntese de colesterol, a HMG-CoA redutase, em macrófagos peritoneais, em dois tempos distintos (1h e 2h para a atividade e 6h e 24h para a expressão da enzima) de tratamento com PGA_2 , a oxidantes (BSO/DEM) e antioxidantes (NAC). Resultados anteriores sugerem que a PGA_2 inibe a atividade da HMG-CoA redutase em macrófagos/ *foam cells*, mesmo havendo aumento de RNAm desta enzima neste tipo celular; no entanto, não era conhecido o que ocorria em macrófagos residentes;

- A expressão da proteína CD36, um receptor *scavenger*, em macrófagos peritoneais em dois tempos distintos (6h e 24h) de tratamento com PGA_2 , oxidantes (BSO/DEM) e antioxidantes (NAC), sabendo-se que dados anteriores demonstravam inibição de incorporação de colesterol em macrófagos/ *foam cells*.

4. METODOLOGIA

4.1 - Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso médio de 250g. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, sendo mantidos em caixas plásticas de 270 x 260 x 310mm, com cinco ratos em cada uma, tendo o assoalho recoberto por serragem. Receberam alimentação comercial padrão para ratos de laboratório e água *ad libitum* e foram mantidos sob períodos de 12 horas luz/ 12 horas escuro (começando o ciclo às 7h da manhã), a uma temperatura de 22°C.

Para os experimentos, os animais foram mortos por decapitação, pois este método produz mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. Os animais sempre eram decapitados no período da manhã, para que fosse evitada a ação do cortisol sobre as células imunológicas estudadas.

4.2- Obtenção de macrófagos peritoneais

Após a decapitação, a obtenção de macrófagos peritoneais ocorreu a partir de lavado peritoneal, por injeção i.p. de PBS (ver adiante a preparação). Massageou-se a região do peritônio por 30 segundos e as células residentes foram retiradas com pipeta através de corte abdominal, conforme descrito em Homem de Bittencourt Jr. et al. (1993) e Homem de Bittencourt Jr. & Curi (1998). Doze ratos eram decapitados por vez e os macrófagos obtidos destes animais eram agrupados.

4.3- Obtenção de macrófagos/foam cell

O procedimento experimental era o mesmo ocorrido no item anterior. Após a obtenção do *pool* de macrófagos peritoneais de ratos, estes eram tratados com LDL oxidada por 18 horas em cultura, conforme metodologia consagrada (Frostegard et al, 1993; Roma et al, 1992) formando-se, assim, macrófagos/ *foam cell* (Homem de Bittencourt Jr. et al, 2007).

4.4- Obtenção de macrófagos U937

Para o estudo de macrófagos humanos da linhagem U937, estes foram retirados de criotubos armazenados em nitrogênio líquido e tratados em meio

RPMI 1640 com antibiótico (10mL 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 (*Cell Bank*).

4.5- Hemólise de eritrócitos contaminantes

Para a remoção de eritrócitos contaminantes de preparações de macrófagos obtidos a partir de peritônio de ratos, as suspensões celulares brutas foram centrifugadas (2500x *g* por 10 min) com solução de hemólise (Tris 0,017M e NH₄Cl 0,144M) e os precipitados celulares ressuspensos em tampão PBS, pH 7,4. Este procedimento era repetido até que o precipitado não mais apresentasse eritrócitos. Assim, o protocolo garante preparações celulares virtualmente isentas de eritrócitos, prestando-se, portanto, ao estudo acurado do metabolismo da glutatona, quando hemácias contaminantes representariam fonte considerável de erro.

4.6- Viabilidade de macrófagos

Após o procedimento inicial descrito acima, em capela de fluxo laminar, o precipitado contendo macrófagos peritoneais ou U937 era semeado em meio RPMI 1640 com antibiótico em microplacas de poliestireno (Corning) com 24 micropoços (*wells*), ficando em estufa de CO₂ a 37°C por uma hora, que é o suficiente para as células aderirem à superfície das placas. No entanto, a exemplo do que acontece *in vivo*, o processo adesivo leva a profundas alterações nas características dos macrófagos, o que rapidamente diferencia-os em células mais ativadas, semelhantes aos macrófagos teciduais encontrados *in vivo* (Homem de Bittencourt Jr. et al., 1993; 1994).

Uma amostra desta preparação era utilizada para contagem em câmara de Neubauer e para determinação da viabilidade celular, que foi feita pelo método da exclusão do azul Trypan. Este teste indicou sempre uma proporção maior que 98% de células viáveis. Após 1h e 24h de cultivo nestas condições, 98% dos macrófagos permaneciam viáveis. Era necessário que cada *well* contivesse 2x 10⁶ células para os experimentos, o que sempre foi obtido.

4.7- Reagentes utilizados no preparo da placa de cultura de macrófagos peritoneais ou U937 e grupos experimentais

Os reagentes utilizados para o preparo da placa de cultura de macrófagos peritoneais e U937 foram:

- a) N- acetil- cisteína (NAC- Sigma A8199) 20mM. Em Eppendorf, pesava-se 16,3mg de NAC e adicionava-se 1mL de meio RPMI 1640, para uso imediato;
- b) Dietilmaleato (DEM- ICN Biomedicals Inc 141-05-9) 5mM. Em Eppendorf, misturava-se 4 μ L de DEM em 10 μ L de etanol absoluto.
- c) Butionina – [S, R] – sulfoxamina (BSO- Sigma B2515) 2,5 μ M. Em falcon de 15mL, pesava-se 2,8mg de BSO e adicionava-se com 5mL de meio RPMI 1640; após preparava-se uma solução com a mistura dos 4 μ L de DEM em 10 μ L de etanol absoluto com os 5mL de BSO, obtendo-se a solução BSO/DEM, podendo ser armazenada.
- d) Prostaglandina A₂ (PGA₂- ICN Biomedicals Inc 13345-50-1) 1 μ M. Em Eppendorf, pipetava-se 2 μ L de PGA₂, secava-se em corrente de nitrogênio e adicionava-se 20 μ L de etanol absoluto e 1152 μ L de meio RPMI 1640.
- e) Mistura controle: consistia de uma preparação contendo 20 μ L de etanol absoluto e 154 μ L de meio RPMI 1640.

Os reagentes NAC e BSO/DEM eram filtrados por filtro estéril 0,22 μ m, com o auxílio de seringa também estéril.

Após a obtenção dos reagentes, para as análises enzimáticas e do estado redox, as placas de cultura de células eram preparadas com a pipetagem dos grupos experimentais nos tempos 1h e 24h de ação dos reagentes sobre as células. Para avaliação da expressão de proteínas, as placas de cultura de células eram preparadas com a pipetagem dos grupos experimentais nos tempos 6h e 24h.

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

- *Grupo controle*, que consistiu de:
 - 340 μ L da preparação contendo macrófagos peritoneais ou U937;
 - 110 μ L de meio RPMI 1640;
 - 10 μ L da mistura controle ou PGA₂ (1 μ M);
 - 50 μ L de soro fetal bovino.
- *Grupo NAC*, que consistiu de:
 - 340 μ L da preparação contendo macrófagos peritoneais ou U937;

- 100 μ L de meio RPMI 1640;
- 10 μ L da mistura controle ou PGA₂ (1 μ M);
- 50 μ L de soro fetal bovino.
 - *Grupo BSO/DEM*, que consistiu de:
 - 340 μ L da preparação contendo macrófagos peritoneais ou U937;
 - 80 μ L de meio RPMI 1640;
 - 10 μ L da mistura controle ou PGA₂ (1 μ M);
 - 50 μ L de soro fetal bovino.

O procedimento experimental foi o seguinte:

- a) Plaquear as células (cerca de 2×10^6 células em 340 μ L);
- b) Pipetar o NAC ou o BSO/DEM;
- c) Aguardar 15 minutos;
- d) Pipetar a PGA₂ 1 μ M;
- e) Aguardar 15 minutos;
- f) Adicionar o soro fetal bovino.

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

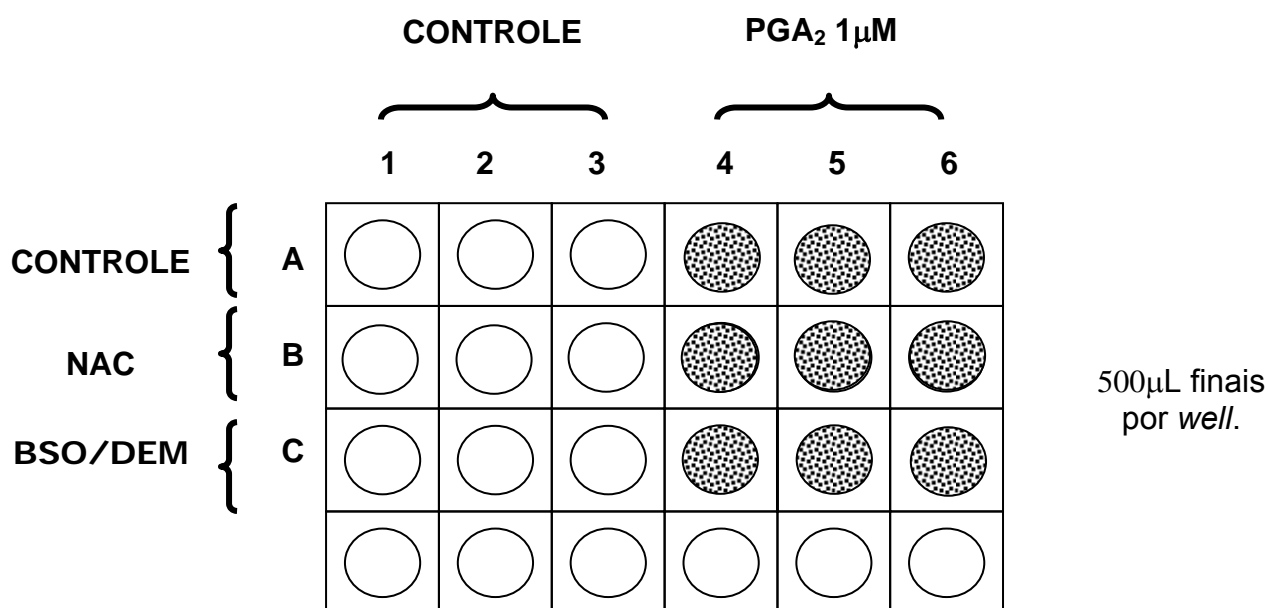


Figura 12: Representação esquemática da distribuição experimental de macrófagos peritoneais ou U937. 1, 2 e 3 A – macrófagos peritoneais ou U937. Controle em triplicata; 1, 2 e 3 B – macrófagos peritoneais ou U937 Controle+ NAC em triplicata; 1, 2 e 3 C – macrófagos peritoneais ou U937 Controle+ BSO/DEM em triplicata; 4, 5 e 6 A- macrófagos peritoneais ou U937 Controle+ PGA₂ em triplicata; 4, 5 e 6 B- macrófagos peritoneais ou U937 NAC+ PGA₂ em triplicata; 4, 5 e 6 B- macrófagos peritoneais ou U937 BSO+ DEM/PGA₂ em triplicata. A última linha da placa de cultura não foi utilizada.

Na representação esquemática da distribuição experimental não foi utilizada a última linha da placa de cultura de células. Todos os grupos experimentais foram feitos em triplicata. O número de células obtidas por *well* era de aproximadamente 2×10^6 . A placa pronta, então era colocada em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, para incubação de 1h, 6h ou 24h conforme protocolo experimental.

Após o período de incubação, as células eram retiradas da placa de cultura e transferidas para Eppendorfs, centrifugadas e os sobrenadantes eram aspirados com auxílio de bomba de vácuo, para obtenção de um precipitado de células. A partir deste momento, era dada a continuidade do experimento de acordo com o que fosse ser analisado.

4.8- Oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL)

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

Para obtenção de LDL oxidada, os reagentes e materiais utilizados para esta determinação foram, a saber:

- a) LDL em PBS a 1 mg/mL (solução comercial em 150 mM NaCl, pH 7,4, contendo 0,01% EDTA);
- b) Tampão PBS (*Phosphate-buffered saline*): NaCl 136,8 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 0,9 mM e Na_2HPO_4 6,4 mM em água milliQ, pH 7,4.
- c) Meio de cultura RPMI 1640 com antibióticos (Ampicilina e estreptomicina 1:100);
- d) Filtros (para seringa) descartáveis, estéreis Ultra-Low Binding PES;
- e) Torpedo de N_2 gasoso;
- f) BHT (hidroxibutiltolueno, 220,4 g/mol) 500x (10 mM) em etanol;
- g) Reagente e padrões de BSA (albumina bovina, diluídos a partir de solução a 1mg/mL) para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (ver mais adiante, no item 4.12 da metodologia);
- h) 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 era feita utilizando-se 50 μl de amostra a cerca de 1 mg/ml, em tubo Eppendorf de 1,5ml com furos na tampa, 200 μl de TCA 30%, 200 μl de Tris-HCl, centrifugando-se 10min a 2500 x g a 4°C e coletando-se 440 μl do sobrenadante. Após, adicionava-se ao sobrenadante 200 μl de TBA, 10 μl de BHT, agitavam-se e levavam-se as amostras ao banho-maria a 100°C por 1h. Por fim, as amostras eram lidas a 535nm 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).
- i) Sacos de diálise (*cut off* 100.000 Da), cujas instruções de uso vinham nos pacotes de fábrica;
- j) Lacs plásticos para sacos de diálise;
- l) Solução de sulfato de cobre 100x ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 500 μM em PBS);

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

O procedimento experimental era o seguinte:

Dosavam-se proteínas da amostra de LDL nativa a ser oxidada, pelo método de Bradford. Conhecidas as quantidades de proteínas nas amostras, tomava-se do frasco-mãe 1mg de proteína e transferia-se esta quantidade para um saco de diálise completando o volume para 1mg/mL com PBS. Então, dialisava-se a amostra 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, transferia-se a suspensão de LDL para Eppendorfs e adicionava-se 10 µL de solução de sulfato de cobre 100x (500 µM) por mL para uma concentração final de 5 µM. Incubavam-se as amostras a 37°C em ar, para promover a oxidação, em banho-maria com agitação por 3 h. Após a oxidação, parava-se a reação com 2 µL de BHT 500x (10 mM) por mL de suspensão de LDL. Dialisavam-se as amostras contra 1000 volumes de PBS durante 3 horas para retirar o sulfato de cobre. Finalmente, dosava-se TBARS em alíquotas de 50 µL (em duplicatas) tanto da LDL nativa, quanto da oxidada. Após dosagem de TBARS, dialisavam-se as amostras de LDL nativa e oxidada contra 1000 volumes de meio de cultura RPMI 1640 com antibióticos e filtrava-se em filtro PES (polietersulfona) *ultra low binding*.

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

4.9- 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 (obtida conforme preparação do item anterior);
- b) Prostaglandina A₂ (PGA₂- ICN- Biomedicals Inc. 13345-50-1) 1µM. Em Eppendorf, pipetava-se 2µL de PGA₂, secava-se em corrente de nitrogênio e adicionava-se 20µL de etanol absoluto e 1152µL de meio RPMI 1640.
- c) Prostaglandina A₂ (PGA₂- ICN- Biomedicals Inc. 13345-50-1) 20µM. Em Eppendorf, pipetava-se 6µL de PGA₂, secava-se em corrente de nitrogênio e adicionava-se 20µL de etanol absoluto e 154µL de meio RPMI 1640.

d) Mistura controle: consistia de uma preparação contendo 20 μ L de etanol absoluto e 154 μ 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 24h de ação dos reagentes sobre as células, para análise enzimática e para análise da expressão de proteínas.

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

- *Grupo controle*, que consistiu de:
 - 435 μ L de meio RPMI 1640;
 - 10 μ L da mistura controle ou PGA₂ (1 μ M ou 20 μ M);
 - 50 μ L de soro fetal bovino;
 - 5 μ M de meio ou LDL oxidada.
- *Grupo PGA₂ 1 μ M*, que consistiu de:
 - 435 μ L de meio RPMI 1640;
 - 10 μ L da mistura controle ou PGA₂ (1 μ M);
 - 50 μ L de soro fetal bovino;
 - 5 μ M de meio ou LDL oxidada.
- *Grupo PGA₂ 20 μ M*, que consistiu de:
 - 435 μ L de meio RPMI 1640;
 - 10 μ L da mistura controle ou PGA₂ (20 μ M);
 - 50 μ L de soro fetal bovino;
 - 5 μ M de meio ou LDL oxidada.

O procedimento experimental foi o seguinte:

- a) Plaquear as células em meio RPMI-1640 (cerca de 2x10⁶ células por *well*);
- b) Pipetar mistura controle ou PGA₂ (1 μ M ou 20 μ M);
- c) Aguardar 15 minutos;
- d) Pipetar o soro fetal bovino;
- e) Aguardar 15 minutos;
- f) Adicionar a LDL oxidada.

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

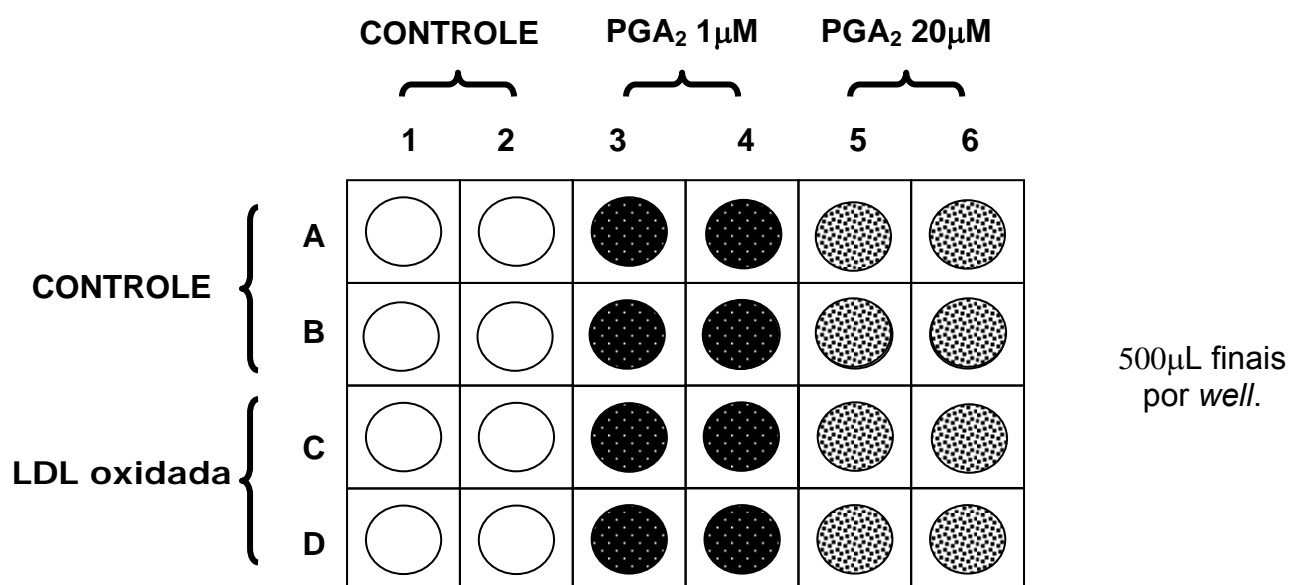


Figura 13: Representação esquemática da distribuição experimental de macrófagos peritoneais ou *foam cells*. 1 e 2 A e 1 e 2 B – macrófagos peritoneais Controle em quadriplicata; 3 e 4 A e 3 e 4 B – macrófagos peritoneais Controle+ PGA₂ 1 μ M em quadriplicata; 5 e 6 A e 5 e 6 B – macrófagos peritoneais Controle+ PGA₂ 20 μ M em quadriplicata; 1 e 2 C e 1 e 2 D – macrófagos/*foam cells* Controle+ LDL oxidada em quadriplicata; 3 e 4 C e 3 e 4 D - macrófagos/*foam cells* PGA₂ 1 μ M+ LDL oxidada em quadriplicata; 5 e 6 C e 5 e 6 D – macrófagos/*foam cells* PGA₂ 20 μ M+ LDL oxidada em quadriplicata.

Na representação esquemática da distribuição experimental todas as linhas da placa de cultura de células foram utilizadas. Todos os grupos experimentais foram feitos em quadriplicata. O número de células obtidas por well era de aproximadamente 2×10^6 . A placa pronta, então era colocada em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, para incubação de 24h, conforme protocolo experimental.

Após o período de incubação, as células eram retiradas da placa de cultura e transferidas para Eppendorfs numerados, centrifugadas e os sobrenadantes eram aspirados com auxílio de bomba de vácuo, para obtenção

de um precipitado de células. A partir deste momento, era dada a continuidade do experimento de acordo com o que fosse ser analisado.

4.10- Determinação do conteúdo intracelular de GSH e GSSG e relação [GSSG/GSH]

A partir da obtenção do precipitado de macrófagos peritoneais ou U937, após o tratamento proposto, a determinação dos conteúdos intracelulares de glutathiona (GSH) e dissulfeto de glutathiona (glutathiona "oxidada", GSSG), assim como sua relação [GSH/GSSG] foi obtida. Para isto, as células (cerca 2×10^6) foram lavadas com 500 μ L de tampão PBS (4°C) e imediatamente rompidas em 100 μ l de ácido metafosfórico 5% (m/v) com homogeneização por micropipeta para análise cinético-espectrofotométrica pelo método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (=DTNB) e GSSG redutase (GSRd) de Anderson (1985). A rápida homogeneização das células em meio ácido é um passo de extrema importância para a inativação das tiol-transferases e γ -glutamiltanspeptidases responsáveis pela transformação da GSH em outros derivados peptídicos, levando a subestimativas das concentrações reais do tripeptídeo. Além disso, a acidificação previne a auto-oxidação da GSH que ocorre rapidamente em pH superior a 7,0 (Anderson, 1985; Akerboom & Sies, 1981, Carlberg & Mannervik, 1985).

Por outro lado, apesar de a auto-oxidação da GSH em GSSG em meio ácido ocorrer numa taxa mínima (0,1 a 0,2% por hora), pelo fato de as concentrações intracelulares de GSSG serem naturalmente muito baixas (menos de 1% da concentração de GSH), o processamento das amostras para dosagem de GSSG deve ser efetuado o mais rapidamente possível, a fim de evitar-se resultados falsamente superiores aos valores reais (Akerboom & Sies, 1981).

Os reagentes utilizados para estas determinações foram, a saber:

- a) Tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 0,2M, pH 7,4;
- b) Tampão de ensaio: mistura de EDTA dissódico 6,3mM em 100mL de tampão fosfato;
- c) NEM (N-etilmaleimida): 0,2M em etanol absoluto;
- d) KOH (hidróxido de potássio) 2M: 11, 22g em 100mL de água destilada;

- e) PIPES (ácido piperazina-N,N'-bis-[etanossulfônico]) 0,3M, adicionado em KOH 2M;
- f) MPA (ácido metafosfórico) 5% em água destilada;
- g) Tampão PBS (*Phosphate-buffered saline*): NaCl 136,8 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 0,9 mM e Na₂HPO₄ 6,4 mM em água destilada, pH 7,4.

A primeira parte do ensaio consistiu na determinação do conteúdo de glutationa "total" (GSH+ GSSG) medido em equivalentes de GSH pelo método da reciclagem com DTNB que leva à oxidação estequiométrica da GSH em GSSG com formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e posterior restituição da GSH pela redução altamente específica com GSSG redutase (GSRd) na presença de NADPH. A taxa de formação de TNB, proporcional à soma inicial de GSH e GSSG, foi, então, monitorada a 412 nm ($\epsilon_{\text{TNB}} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Como a velocidade da reação depende não somente da concentração inicial de GSH+GSSG, mas, também, da atividade da GSRd, fatores que interfiram na atividade enzimática, levarão invariavelmente a falsos resultados. Por isso, além de ter sido utilizada uma curva de calibração (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 nmol) com padrão de GSH preparado a cada ensaio, foram efetuadas leituras de amostras com adição de padrão, sendo os resultados obtidos idênticos aos observados para as amostras separadamente. A incubação foi iniciada pela adição de 10 μl de NADPH (concentração final 0,17 mM) e 75 μl de DTNB (final 1,26 mM), ambos em tampão fosfato de sódio 143 mM (pH 7,5), a cerca de 10 μl de amostra (em MPA 5%) num volume final 105 μl em cada *well*, em placa de ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assays*), com 1 cm de caminho óptico a 37°C, tendo sido registrada a absorbância a 412 nm em jaqueta termostaticada com aquisição direta e processamento cinético automático (em espectrofotômetro ligado ao programa Microtemplate Protocol). Em seguida, foram adicionados 10 μl de GSRd (atividade final na cubeta de 0,5 U/ml) sob agitação e as amostras foram analisadas espectrofotometricamente a 412 nm por cerca de 10 min adicionais.

Antes da determinação do conteúdo de GSSG, alíquotas de 50 μl das mesmas amostras ensaiadas para GSH "total" foram retiradas para conjugação da GSH presente com N-etil-maleimida (NEM, Fluka) segundo metodologia descrita em Akerboom & Sies (1981). Foram adicionados, então, 17 μl de NEM

0,2M diretamente às amostras dissolvidas em MPA 5%. Depois, a mistura foi neutralizada, cuidadosamente sob agitação, até pH 5,5 pela adição de 20 μ l de KOH 2M em tampão de ácido piperazina-N,N'-bis-(etanossulfônico) (=PIPES, Boehringer) 0,3 M. Foi efetuada a extração do excesso de NEM com acetato de etila, tendo o excesso de solvente sido evaporado em concentrador SpeedVac. Posteriormente, as amostras foram ensaiadas pelo método da reciclagem, como descrito para a GSH. As amostras foram inicialmente incubadas com a GSRd por 5 min a 37°C, tendo sido monitorada a absorbância a 340 nm (consumo de NADPH) até a estabilização. Depois, foi adicionado o DTNB e as leituras a 412 nm (produção de TNB) foram acompanhadas espectrofotometricamente conforme descrito acima. A diferença entre os valores obtidos para glutationa "total" e GSSG forneceu os valores dos conteúdos de GSH procurados.

4.11- Quantificação de proteína

Na determinação das concentrações de proteínas nas amostras foi utilizado o método de Bradford (1976). Como padrão de referência, utilizaram-se soluções de albumina sérica bovina (BSA) fração V (Sigma). O método de Bradford, baseado na ligação do Azul Comassie Brilhante G-250 0,01% (m/v) em meio de ácido fosfórico 8,5% (m/v)-etanol 4,7% (m/v) a proteínas das amostras, com formação de complexo que absorve intensamente a 595 nm (BIO-RAD Protein Assay kit, Bio-Rad Laboratories, GmbH, DR), apresenta, na faixa de algumas dezenas de microgramas de proteína ensaiada, sensibilidade bastante adequada para os fins experimentais determinados.

4.12- Medida da Atividade da Acil-CoA: Colesterol O-Aciltransferase (ACAT) em macrófagos peritoneais e macrófagos/foam cells

A conversão intracelular de colesterol e ácidos graxos em ésteres de colesterol dá-se por ação da ACAT, enzima que é ativada pela presença de colesterol exógeno proveniente das LDL internalizadas por receptores de LDL nativa. Assim, quando macrófagos são pré-incubados com soro deficiente em lipoproteínas e são cultivados na presença de [14 C ou 3 H]oleato, observa-se um expressivo aumento na síntese de [14 C ou 3 H]oleato de colesterol, que é proporcional à atividade da ACAT intracelular, segundo Figura 14.

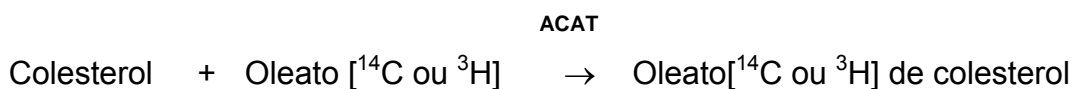


Figura 14: Ação enzimática da ACAT sobre o colesterol e o oleato marcado.

Este protocolo trata da medida indireta da ACAT através da incubação de células pré-cultivadas em meio deficiente em lipoproteínas (5%) com [^{14}C ou ^3H]oleato após a adição de colesterol contido nas LDL do SFB normal. Para isso, as células foram tratadas pelos períodos de tempo desejados (1h e 24h para macrófagos peritoneais e 24h para macrófagos/ *foam cells*), conforme protocolo experimental. Depois, as células foram lavadas e tratadas com meio deficiente em lipoproteínas por 5h. Ao final deste período, as células foram incubadas com [^{14}C ou ^3H]oleato na presença de colesterol/LDL (meio normal).

Os reagentes utilizados para esta determinação foram, a saber:

- a) NaCl 150 mM em água destilada;
- b) Solução A: Tris-HCl 50 mM em NaCl 150 mM, pH 7,4;
- c) Solução B: BSA 2 mg/mL de solução A;
- d) NaOH 5N em água destilada;
- e) Soro fetal bovino (SFB);
- f) Soro deficiente em lipoproteínas (LDS, dialisado estéril, Sigma);
- g) Albumina deslipidada dialisada estéril (BSA, concentração final de 27,3 mg/mL em PBS, pH 7,4);
- h) [^{14}C]oleato;
- i) Ácido oléico FRIO a 100 mg/ml em clorofórmio/metanol (2:1);
- j) Mistura hexano/isopropanol (3:2, v/v);
- k) Solventes para TLC – *Thin Layer Chromatography* (hexano, éter etílico, ácido acético glacial);
- l) Etanol PA;
- m) Placas de TLC.

A preparação dos reagentes se deu da seguinte maneira:

- *BSA deslipidada e dialisada*, segundo a técnica do carvão ativado de Chen (1967) seguida de diálise contra PBS pH 7,4 e esterilização em filtro de nitrocelulose (poro <0,22 μm).

- *Complexo albumina-oleato de sódio 12,7 mM*, técnica original descrita por Goldstein et al. (1983), modificada a saber:

Pipetou-se 318,6 μmol de ácido oléico (solução a 100 mg/mL em clorofórmio/metanol, 2:1) em um tubo de ensaio e secou-se o solvente em corrente de nitrogênio. A seguir, adicionou-se 2 mL de etanol e agitou-se este preparado, que teve adicionado, logo após, 100 μL de NaOH 5N. Agitou-se o conteúdo novamente, sendo o excesso de etanol removido por evaporação em corrente de nitrogênio. A esta mistura foi adicionado 10 mL de solução de NaCl 150 mM. Agitou-se em vórtex e aqueceu-se a mistura em banho-maria a 60°C, com agitação vigorosa por 5 minutos. Então, pipetou-se 12,5 mL de BSA deslipidado (concentração final de 27,3 mg/mL), transferindo-se a preparação para um béquer e agitando-se a solução por 10 minutos. O volume final foi ajustado para 25 mL com NaCl 150 mM (concentração final de oleato de sódio: 318,6 $\mu\text{mol}/25\text{ mL} = 12,7\text{ mM}$) e o pH averiguado. Se fosse necessário, acertar-se-ia o pH para 7,4.

- *Complexo de [1-¹⁴C] oleato de sódio 12,7 mM em albumina deslipidada*: Visou-se preparar uma mistura de oleato frio+quente contendo cerca de 43 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. Para tal, pipetou-se 10 μL de ácido oléico[1-¹⁴C] 50 μCi em Eppendorf e este foi seco em corrente de nitrogênio. Em seguida, o radioativo foi ressuspenso em 500 μL da solução contendo 12,7 mM de oleato de sódio em BSA deslipidado contendo NaCl 150 mM, pH 7,4. Agitou-se a solução em banho com agitação por 4 – 6 h à temperatura ambiente.

- *Complexo de COLESTEROL FRIO 20 mM com SFB*: De uma solução 100 mg/mL de colesterol em clorofórmio/metanol, 2:1 (v/v), alíquotou-se 77,5 μL em Eppendorf e secou-se este volume em corrente de nitrogênio. Adicionou-se 1 mL de solução de SFB normal estéril e incubou-se de 4 – 6 h a 37°C em banho-maria com agitação.

O ensaio, propriamente dito, ocorreu da seguinte forma:

Após o período de cultura de interesse, as células foram transferidas da placa de cultura para Eppendorfs, foram lavadas e incubadas por 5h, a 37°C em estufa de CO₂ 5%, na presença de meio contendo soro deficiente em lipoproteínas a 5% (v/v), novamente em placa de cultura.

Ao término das 5h de incubação, as células foram outra vez transferidas para Eppendorfs; estes foram centrifugados e tiveram os sobrenadantes aspirados. Assim, as células foram plaqueadas (em placas de cultura de 24 *wells* - 500 μL finais) com 430 μL de meio RPMI 1640, 50 μL de SFB, 10 μL de oleato de sódio (frio e quente, isto é, colesterol normal e colesterol marcado) em BSA e 10 μL de colesterol em SFB. Coletou-se uma amostra (5 μL) de cada *well* para a determinação da radioatividade específica. Finalizado este procedimento, as células foram incubadas por 2h, a 37°C em estufa de CO₂ 5%.

Após período de incubação, as células foram transferidas para Eppendorfs, que sofreram centrifugação e tiveram seus sobrenadantes aspirados. As células, então, foram lavadas duas vezes com volumes de 2 mL cada de Solução B e uma vez com um volume de 2 mL de Solução A, foram centrifugadas e tiveram seus sobrenadantes aspirados. Adicionou-se 1 mL da mistura hexano/isopropanol (3:2, v/v) em cada amostra para a extração dos ésteres de colesterol do intracelular. As células, então, ficaram incubando com os solventes por 30min à temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi aspirado e transferido para outro tubo Eppendorf. Procedeu-se novamente a lavagem das células com 1mL da mistura hexano/isopropanol (3:2, v/v), coletou-se o solvente de cada Eppendorf e somaram-se os extratos nos novos Eppendorfs para secagem em concentrador (SpeedVac).

Após secagem completa das amostras, estas foram dissolvidas em 50 μL de padrões internos de colesterol e ésteres de colesterol em clorofórmio/metanol (2:1, v/v). Depois de agitar-se a mistura nos tubos contendo as amostras, estas foram secas novamente em SpeedVac e lavadas com 60 μL de hexano.

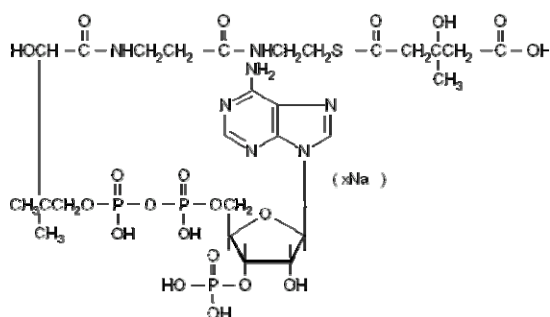
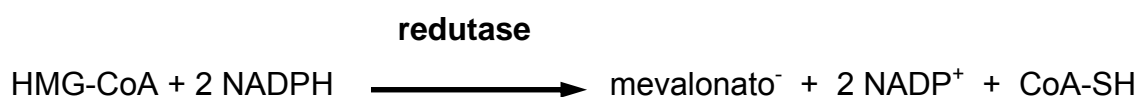
A partir de então, a técnica de TLC pôde ser empregada. A fase móvel consistiu de hexano/éter dietílico/ácido acético (80:20:1 em volume). Recortaram-se as bandas dos ácidos graxos e dos ésteres de colesterol. Os resultados obtidos para o ácido oléico restante, quando somados aos observados na fração dos ésteres de colesterol são úteis para o cálculo aproximado da radioatividade total que entrou na célula durante o experimento.

Uma unidade da atividade da ACAT corresponde a 1pmol por minuto a 37°C. Assim, os resultados da atividade da ACAT foram expressos em mU/10⁶ células (segundo Liu et al, 2005). Este protocolo de medida de atividade da ACAT foi estabelecido a partir das técnicas originais de Goldstein e colaboradores (1983), Maor e colaboradores (1991), Calder e colaboradores (1990) e Chen (1967).

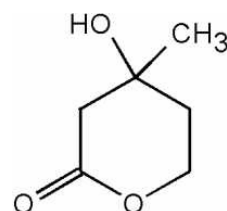
4.13- Medida da Atividade da HMG-CoA redutase pelo método espectrofotométrico, em macrófagos peritoneais

Trata-se da medida da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) em células cultivadas.

A HMG-CoA redutase é a enzima-chave da síntese de colesterol, cuja reação pode ser vista na Figura 15:



RS-HMG-CoA



RS-mevalonolactona

Figura 15: Ação enzimática da HMG-CoA redutase.

A técnica consiste no monitoramento da oxidação do NADPH na presença de HMG-CoA. Uma unidade da enzima é definida como a quantidade necessária para oxidar 2 nmols de NADPH (ou 1 nmol de HMG-CoA) por minuto a 37°C (Edwards et al., 1979).

Em leucócitos a atividade desta enzima é baixa (cerca de 0,5-1 pmol/min/mg proteína microsomal) (Young & Rodwell, 1977). Esses dados devem ser levados em conta no momento de se coletar a quantidade adequada de células.

Os reagentes utilizados e a preparação destes se deu da seguinte maneira para esta determinação, a saber:

- a) Tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4/ KH_2PO_4) 40 mM pH 7,2;
- b) Tampão de extração: sacarose 100 mM, KCl 50 mM, EDTA 30 mM em tampão fosfato de potássio 40 mM pH 7,2;
- c) Tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4/ KH_2PO_4) 160 mM pH 6,8;
- d) Tampão de Ensaio: KCl 200 mM, EDTA 4 mM e DTT (ditiotreitól) 10 mM em tampão fosfato 160 mM pH 6,8;

No caso de tecidos ou células tratadas com CP-PGs, como a PGA_2 , o DTT deve ser omitido do tampão de ensaio. Para testar o efeito do DTT (que pode liberar CP-PGs ligadas por adições de Michael), cada amostra foi ensaiada 2 vezes: uma na ausência e outra na presença de DTT. O DTT sempre aumenta a atividade da redutase.

- e) β -NADPH 200 μ M em $NaHCO_3$ 0,5%;
- f) RS-HMG-CoA 2 mM, pH 6,0.

A extração e o preparo das amostras se deu da seguinte maneira:

Usou-se PMSF e leupeptina como inibidores de protease na extração. Para tal, no momento da homogeneização, adicionou-se:

- a) PMSF 100 mM em isopropanol;
- b) Leupeptina 2 mg/mL.

Depois dos períodos de cultura, removeram-se os sobrenadantes celulares por aspiração, as células foram lavadas com PBS e raspadas dos *wells* com policial de borracha (*cell scraper*). Repetiu-se este procedimento para remoção das células restantes. Assim, procedeu-se a centrifugação da suspensão resultante a 15000 x g por 10 segundos e descartou-se o sobrenadante por aspiração. Os precipitados celulares, em seguida, foram ressuspensos em volumes menores de Tampão Tris-NaCl para serem transferidos para tubos de homogeneização. As células foram novamente centrifugadas e os precipitados celulares ressuspensos em 120 μ L de Tampão de Extração. A homogeneização das células e o preparo de suspensão de microsomos sem a utilização de detergentes ocorreu pela técnica do *freezing-thawing*, que consiste em congelar as células em nitrogênio líquido e descongelar as células rapidamente em banho-maria a 37°C. Repetiu-se este processo de descongelamento/congelamento 3 vezes. As células foram

homogeneizadas, ainda nos Eppendorfs, em vórtex e centrifugadas por 20 minutos a 15.000 x g a 4°C, para a eliminação das mitocôndrias, núcleos e debris celulares. Por fim, os sobrenadantes foram coletados em Eppendorfs para dosagem de proteínas e determinação da atividade da redutase no sobrenadante. Após o preparo das amostras, dosaram-se as proteínas pelo método de Bradford (1976).

O ensaio, propriamente, se deu da seguinte forma:

A atividade da HMG-CoA redutase foi analisada espectrofotometricamente a 340 nm. Em uma microplaca de ELISA, pipetaram-se os blanks da placa (100 µL). No leitor de ELISA, ligou-se o aquecimento a 37°C e regulou-se o comprimento de onda para 340 nm. A seguir, todos os reagentes e amostras foram retirados do gelo, deixando apenas o Tampão de Ensaio a 37°C e pipetou-se 130 µL de tampão de ensaio (sem DTT). Após, pipetou-se 10 µL da solução de NADPH (em todos os *wells*), 10 µL da solução de HMG-CoA (apenas nos *test-wells*), 50 µL de amostra (em todos os *wells*), agitou-se a microplaca por 5 segundos e monitorou-se, a 340 nm, por 2 a 4 minutos, a inclinação referente à atividade da HMG-CoA redutase na ausência de DTT. Em amostras separadas, pipetou-se 10 µL de DTT para determinação da atividade máxima. A inclinação da linha de base (apenas NADPH e amostra) foi descontada da inclinação na presença de HMG-CoA. As atividades máximas são obtidas na presença de DTT, mas as atividades obtidas sem DTT devem ser comparadas entre os grupos controles e os tratados com CP-PGs.

Uma unidade da atividade da HMG-CoA redutase corresponde a 1nmol de mevalonato formado por minuto a 37°C e a 2 nmols de NADPH consumidos por minuto, a esta temperatura. Assim, os resultados da atividade da HMG-CoA redutase foram expressos em U/mg de proteína (segundo Edwards, 1979). Este protocolo de medida de atividade da HMG-CoA redutase foi estabelecido a partir das técnicas originais de Edwards e colaboradores (1979), Young & Rodwell (1977) e Williamson & Rodwell (1981).

4.14- Imunoprecipitação e eletroforese SDS-PAGE para HMG-CoA redutase de macrófagos peritoneais

Proteínas celulares ou de amostras teciduais são incubadas na presença

dos anticorpos de interesse que são precipitados com proteína A-sepharose (que reage especificamente com as caudas Fc dos anticorpos). Depois de separados por centrifugação, os complexos proteína-anticorpo-proteína A-sepharose são dissolvidos em tampão de imunoprecipitação e submetidos a eletroforese. A identificação deve ser de uma única banda que pode ser visualizada por reação com segundo-anticorpo ligado a peroxidase. A técnica permite que sejam isoladas proteínas expressas em pequenas quantidades, concentrando-as, o que é o caso da HMG-CoA redutase, presente em muito baixa quantidade em leucócitos.

Os reagentes utilizados e o preparo destes para esta determinação foram, a saber:

- 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- *mouse* IgG A9044, Sigma) e reagentes para identificação por *immunoblot*;
- c) Material para eletroforese e eletrotransferência (descritos posteriormente);
- d) PBS para lavagens;
- e) Inibidores de protease (leupeptina 5mg/mL e PMSF 100mM).
- f) 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.
- g) Tampão de bloqueio da proteína a-sepharose: BSA a 1 mg/mL em Tampão IP;
- h) SDS (dodecil sulfato de sódio) em tampão de imunoprecipitação (SDS-IP) 0,1%;
- i) Proteína A-Sepharose CL4B (GE HealthCare).

O preparo da resina foi feito lavando-se o material com PBS. Então, a resina foi centrifugada por 30 segundos em microcentrífuga, teve seu sobrenadante aspirado e o volume inicial foi completado com PBS. A mistura foi agitada no vórtex e sofreu nova centrifugação, por 30 segundos. Este processo foi repetido por duas vezes (total = 3 lavagens). Após, a resina foi ressuspensa em Tampão de Bloqueio da Proteína A-Sepharose, usado para completar para o volume inicial. Incubou-se a resina no Tampão de Bloqueio por 24 h a 4°C. Após o bloqueio, a resina foi lavada uma vez com PBS. Uma

nova centrifugação foi realizada e a resina foi ressuspensa em Tampão IP, ficando pronta para ser utilizada.

O ensaio para esta determinação se deu, a saber:

Os grupos experimentais propostos foram preparados em duplicata, utilizando-se duas placas de cultura de células. A placa de cultura também possuía 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 1mL de PBS em Eppendorf. Em seguida, foram centrifugadas por 10 segundos em microcentrifuga (velocidade máxima), descartando-se o sobrenadante. Novamente as placas de cultura foram lavadas com 1mL 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, adicionou-se às amostras leupeptina e PMSF, agitando-se a mistura em vórtex. Adicionou-se 500 μ L de Tampão IP, agitando-se novamente em vórtex. Após, as células foram quebradas com seringa de insulina. Centrifugaram-se as amostras por 1 segundo na microcentrifuga (velocidade máxima) apenas para baixar os núcleos e debris celulares. A HMG-CoA redutase fica no sobrenadante, assim, transferiu-se 500 μ L de cada sobrenadante para outros Eppendorfs, onde foi realizada a reação imunológica. Coletou-se 5 μ L de cada amostra para dosagem de proteínas (cujo *blank* continha Tampão IP).

Para que a reação imunológica fosse feita, para cada tubo contendo 500 μ L de extrato celular em Tampão IP, adicionou-se 5 μ L de anticorpo por tubo: anticorpo goat anti-human/mouse/rat HMG-CoA redutase (HMGCR da Santa Cruz Biotechnology, C-18, sc-27578). Reservou-se 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 se deu com soro pré-imune, em que foi adicionado a um tubo Eppendorf, contendo 500 μ L de lisado celular, 1 μ g de soro pré-imune (soro que não contém anticorpos específicos contra a HMG-CoA redutase). Essa amostra foi conduzida em paralelo e, quando todas as

amostras foram precipitadas com Proteína A-Sepharose, o controle negativo, depois de feita a eletroforese, não apresentou nenhuma banda relativa à HMG-CoA redutase (43 kDa).

Para a que fosse feita a imunoprecipitação, após a incubação de 12 horas, as amostras contendo os conjugados de proteína-anticorpo primário (em 500 μ L) foram incubadas, sob agitação, por 90 min adicionais a 4°C na presença de 100 μ L de proteína A-Sepharose. Após a incubação com a resina, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos em microcentrífuga (velocidade máxima). Então, aspiraram-se e descartaram-se os sobrenadantes, pois são os precipitados que contém os imunoprecipitados da HMG-CoA redutase com a proteína A-Sepharose. 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 μ L de tampão de ensaio para SDS-PAGE (poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio - 10% poliacrilamida), agitados e fervidos. Então, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos (microcentrífuga, velocidade máxima) para precipitar a A-Sepharose. Assim, carregou-se cerca de 50 μ L por *well* para eletroforese dos sobrenadantes (com iguais quantidades de proteínas). Após eletroforese, foi feita a eletrotransferência e *Western Blot* (técnicas descritas mais adiante) utilizando-se novamente o anticorpo anti-HMG-CoA redutase (a 1:1000) (anticorpo anti-*goat/ human/ mouse/ rat* HMG-CoA redutase c-18, SC 27578, Santa Cruz Biotechnology) e segundo anticorpo (anticorpo anti-*mouse* IgG A9044, Sigma) marcado com peroxidase. As amostras foram reveladas por ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) (técnica também descrita mais adiante). O peso molecular da HMG-CoA redutase é de 43KDa. Este protocolo de imunoprecipitação foi estabelecido a partir das técnicas originais de Amici e colaboradores (1994) e Lee e colaboradores (2000).

4.15- Expressão de proteínas de choque térmico (HSP) em macrófagos/foam cells e peritoneais

Para análise da expressão de HSP70, macrófagos peritoneais foram tratados, segundo protocolo estabelecido neste trabalho, por 6 horas e 24 horas (6h é o período de expressão gênica máxima da HSP70) e macrófagos/*foam cells* foram tratados por 24h. No intuito de avaliarmos a correlação entre o acúmulo de CP-PGs em macrófagos e a expressão de HSP70, as células foram, inicialmente, precipitadas em tubos para microcentrifuga (Eppendorf), agitadas (vórtex), lisadas em solução de SDS a 0,1% e passadas em seringa de insulina (1ml) para serem homogeneizadas e para que a quantidade total de proteína pudesse ser medida (Bradford, 1976). A seguir, as preparações foram diluídas em tampão de amostra, quantidades iguais de proteína foram carregadas e estas foram separadas (por corrida eletroforética) durante 2 horas (a 100 mA/ gel) à temperatura ambiente (25°C) por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foi utilizado sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) e tampão de corrida constituído de Tris a 25 mM, glicina a 192 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3 usando-se 1cm de gel de empilhamento (entrada) a 4% (m/v) e gel de separação a 10% (m/v) em termos de monômero de acrilamida, para corridas em géis de 10 cm em tampão de amostra redutor constituído de Tris-HCL 62,5 mM pH 6,8, glicerol a 10% (v/v), SDS a 2% (v/v) e β -mercaptoetanol a 5%, conforme descrito em Santoro et al. (1989). Como marcador de peso molecular foi utilizada a mistura de padrões de pesos moleculares previamente coloridos (Invitrogen) com as seguintes proteínas: miosina (200 kDa), fosforilase b (92,5 kDa), BSA (69kDa), ovalbumina (46kDa), anidrase carbônica (30kDa) e lisozima (14kDa).

Após as corridas, os géis foram destacados das placas de suporte, tendo sido removidos os géis de separação. As amostras contidas no gel foram destinadas ao processamento por *Western blot*, como descrito em Elia & Santoro (1994), sendo transferidas diretamente para membrana de nitrocelulose (Millipore) em sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100 V por 90 minutos, por eletrotransferência. Após a transferência, as bandas, contendo proteínas foram evidenciadas pela coloração com vermelho Ponceau, sal de sódio (Sigma) a 0,3% (m/v) em solução TCA a 3%. Então, as membranas foram descoradas em tampão TEN-Tween (Tris 50 mM pH 7,4 EDTA 5 mM, NaCl 150 mM). Antes do *immunoblot*, os filtros de nitrocelulose foram imersos

em tampão de bloqueio a fim de recobrirem-se as porções da membrana onde não houve transferência de proteínas, promovendo-se, então, bloqueio de ligação inespecífica de anticorpos ao filtro. Assim, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 horas sob agitação enérgica em tampão de bloqueio – bloto (leite em pó a 5%) (Kolberg et al, 2005); após este procedimento a membrana foi lavada por 3 vezes com 10 ml de TEN-Tween sob agitação. Para o *Western blot* das HSP70, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 horas sob agitação enérgica em tampão de bloqueio a 0,05% (v/v) na presença de anticorpo monoclonal BRM-22 de ascite de camundongo (hibridoma BRM-22) contra HSP70 humana (Amersham), que reage especificamente com o polipeptídeo de 72 kDa (HSP70, ou HSP induzível) e com o de 73 kDa (HSP73, também chamado de HSC70 ou HSP70 constitutiva), diluído a 1:1000 em solução de bloqueio. Depois disso, as membranas foram lavadas três vezes sob agitação por 10 minutos com 5 ml de TEN-Tween e incubada por 2 horas com 5 ml de tampão de bloqueio contendo o segundo anticorpo de coelho (diluído também 1:1000) contra IgG de camundongo conjugado a peroxidase de rabanete (Sigma A 9044) sob agitação. Após nova lavagem, as membranas foram submetidas à técnica de ECL (Enhanced Chemiluminescence). A técnica de ECL é feita na câmara escura, pois o cassete de exposição e o filme de raios X (Hyperfilm, Amersham) são fotossensíveis. Foram utilizados Luminol (3-aminophthalhydrazide = 3-aminoftalidrazida) grau QL (Fluka, cód. 09153) e ácido p-coumárico (Fluka, cód 28200), que foram misturados em 5 mL de tampão Tris HCl 1,5 M pH 8,8. Esta mistura reage com peróxido de hidrogênio 30% (Fluka), também diluído em Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, que marcaram as bandas das amostras. A revelação por ECL é um processo que consiste em mergulhar a membrana de nitrocelulose nas soluções citadas acima, sob agitação por 3 minutos, a fim de visualizar o aparecimento das bandas. Em seguida, esta membrana é retirada das soluções e envolvida por um papel filme de PVC. A membrana é, então, colocada sobre o cassete de exposição juntamente com o filme de raio X, que vai por cima dela. Após a exposição e revelação (conforme instruções do fabricante, Amersham), as bandas foram registradas digitalmente (Vídeo Documentation System de aquisição digital e processamento de imagens - VDS, Amersham Pharmacia Biotech) e as

imagens analisadas para os cálculos posteriores. Os resultados foram expressos por unidades arbitrárias.

Em muitos experimentos, a reutilização das membranas de nitrocelulose para ressonagem com outro anticorpo é importante para efeito de controle. A completa remoção do primeiro e do segundo anticorpos após a detecção pode ser realizada pela técnica de *stripping* e ressonagem de membranas. Nestes casos, as membranas podem ser sondadas e ressonadas várias vezes, desde que as mesmas sejam mantidas em refrigerador e úmidas (TEN-Tween). Para tal, a membrana de nitrocelulose foi mergulhada na solução de *strip* (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,7, SDS 2% e β -mercaptoetanol 100 mM) e incubada por 30 min a 50°C. Lavou-se a membrana com TEN-Tween por duas vezes, por 10 min cada e esta foi incubada em tampão de bloqueio. A partir de então, o procedimento de *immunoblot* foi repetido (Diaz et al, 1996a, b).

4.16- Expressão de proteínas da NO sintase induzível (iNOS, ou NOS-2)

Para verificar a expressão das NO sintase induzível (iNOS, ou NOS-2), foi utilizada a mesma técnica acima, porém foram adicionados anticorpos (primeiro anticorpo anti- Nitric Oxide Synthase indutible –iNOS- N 7782, Sigma; segundo anticorpo anti-*mouse* IgG A 9044, Sigma) específicos para pesquisa dessa proteína nos diferentes grupos experimentais, em macrófagos residentes. A revelação foi realizada pela técnica de ECL. O peso molecular desta proteína é de 130KDa.

4.17- Expressão de proteínas do receptor scavenger CD36

Para verificar a expressão do receptor *scavenger* CD36, foi utilizada a mesma técnica do item 4.15 da Metodologia, porém foram adicionados anticorpos (primeiro anticorpo anti- *rabbit* IgG anti- CD36, H300 – sc9154, Santa Cruz Biotechnology; segundo anticorpo anti- *mouse* IgG A 9044, Sigma) específicos para pesquisa dessa proteína nos diferentes grupos experimentais, em macrófagos residentes. A revelação foi realizada pela técnica de ECL. O peso molecular desta proteína está entre 88-90KDa.

4.18- Expressão de proteínas da bomba MRP1

Para verificar a expressão da bomba MRP1, foi utilizada a mesma técnica do item 4.15 da Metodologia, porém foram adicionados anticorpos específicos para pesquisa dessa proteína nos diferentes grupos experimentais, em macrófagos residentes (anticorpo primário anti- *goat* anti- MRP1 clone QCRL-4, M9192, Sigma; anticorpo secundário, anti- *mouse* IgG, A9044, Sigma). A revelação foi realizada pela técnica de ECL. O peso molecular desta proteína é de 190KDa.

4.19- Expressão da proteína β -Actina

Para fins de controle, verificou-se a expressão da proteína β -Actina, presente no citoesqueleto celular. Assim, todas as proteínas pesquisadas foram expressas a partir do resultado obtido da divisão da quantidade de pixel das bandas das proteínas estudadas pela quantidade de pixel das bandas de actina de cada amostra. Para tal, foi utilizada a mesma técnica do item 4.15 da Metodologia, porém foram adicionados anticorpos específicos para pesquisa dessa proteína nos diferentes grupos experimentais, em macrófagos residentes (primeiro anticorpo anti- Actin I-19, sc- 1616, Santa Cruz Biotechnology; segundo anticorpo anti- *mouse* IgG A9044, Sigma). A revelação foi realizada pela técnica de ECL. O peso molecular desta proteína é de 44KDa.

4.20- Análise estatística

Conforme necessário em cada experimento, as diferenças entre os grupos controle e os tratados foram comparadas com o teste ANOVA, tendo sido considerado para nível de significância mínimo um risco α com $p < 0,05$ para erros do tipo I, com uso de testes complementares como Tukey-Kramer ou Bonferroni para análise de variância. A análise estatística foi efetuada com o auxílio do programa computacional GraphPad InStat 3.0, versão para Windows.

5. RESULTADOS

Os dados aqui descritos são relativos aos resultados encontrados em cada desenho experimental, nos diferentes tempos de estudo.

As atividades de diferentes enzimas que participam do metabolismo do colesterol, assim como a expressão de importantes marcadores destas rotas foi avaliada e comparada entre os grupos.

Para cada análise, há uma Figura e/ou uma tabela, para que se obtenha uma melhor visualização destes dados.

5.1- Atividade da Acil-CoA: Colesterol O-Aciltransferase (ACAT) em macrófagos/ foam cells

A atividade ACAT foi determinada por técnica radioquímica através da adição de [¹⁴C]-oleato e análise (TLC) dos ésteres de colesterol formados, em macrófagos/ *foam cells* tratados com PGA₂ (1μM e 20μM) por 24h, conforme técnica descrita anteriormente. As diferentes concentrações foram testadas para que se pudesse escolher a mais efetiva.

Os grupos experimentais foram demonstrados no desenho experimental no item 4.9 da Metodologia. Foram utilizadas 2 x 10⁶ células por *well*. Os resultados foram obtidos de 4 *wells* diferentes, em três experimentos independentes.

Estes dados podem ser visualizados na Figura 16. A transformação dos macrófagos peritoneais em *foam cells*, após 18h de incubação com LDL oxidada aumentou a atividade da ACAT em 2,5 vezes quando se compara o grupo Controle com o grupo Controle+ LDLox (p<0,05). O tratamento das *foam cells* com PGA₂, na concentração de 1μM, reduziu significativamente em 33% a atividade desta enzima (p<0,05), comparado ao grupo Controle+ LDLox. Na concentração de 20μM, o poder inibitório da PGA₂ não foi observado. Interessante notar que nos macrófagos Controle, comparados aos macrófagos Controle que receberam PGA₂ 1μM, observa-se o aumento significativo da atividade ACAT (280% de aumento, p<0,001).

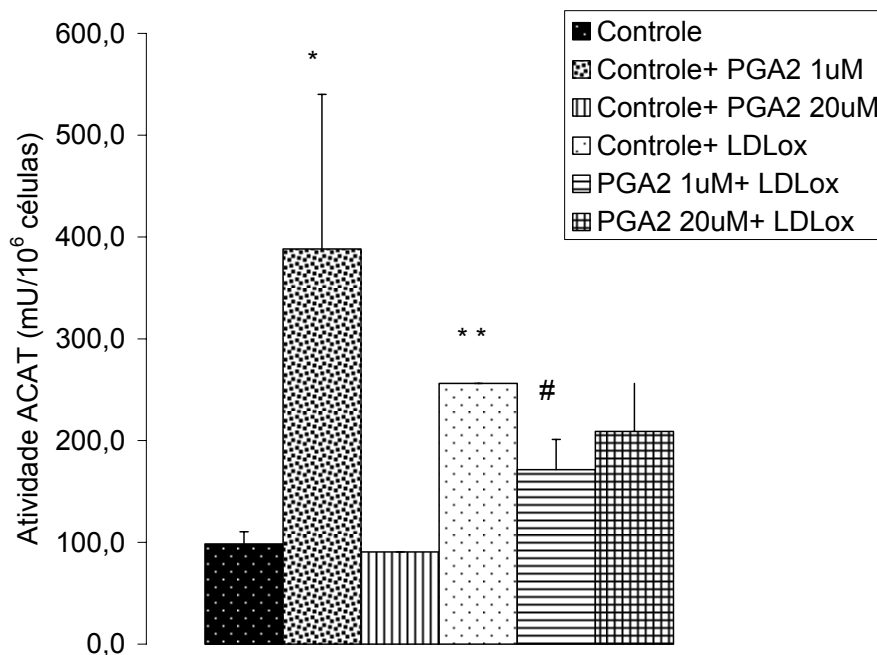


Figura 16: Atividade enzimática da acil CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), em macrófagos/ *foam cells* nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 4 *wells* diferentes, em três experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle e Controle + PGA₂ 1 μ M ($p < 0,001$).

** diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle LDLox ($p < 0,05$).

diferença significativa entre o grupo Controle LDLox e o grupo PGA₂ 1 μ M+ LDLox ($p < 0,05$).

5.2- Atividade da Acil-CoA: Colesterol O-Aciltransferase (ACAT) em macrófagos peritoneais

Uma vez que a PGA₂ diminui a atividade da ACAT em 33% em macrófagos/ *foam cells*, visou-se determinar qual a resposta celular em macrófagos não estimulados, em situações de estresse ou de proteção ao estresse celular. Como na concentração de 1 μ M se obteve a melhor resposta, esta passou a ser a concentração de escolha.

Assim, a atividade ACAT foi determinada por técnica radioquímica através da adição de [¹⁴C]-oleato e análise (TLC) dos ésteres de colesterol

formados, em macrófagos peritoneais tratados com PGA_2 $1\mu\text{M}$, na presença ou ausência de butionina sulfoxamina e dietilmaleato (BSO/DEM, $2,5\mu\text{M}/5\text{mM}$, para depleção da glutathiona [GSH] intracelular) ou N-acetilcisteína (NAC, 20mM , que eleva os níveis de GSH) por 1h e por 24h, conforme técnica descrita anteriormente.

Os grupos experimentais foram demonstrados no desenho experimental no item 4.7 da Metodologia, para ambos os tempos de tratamento. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média, valores obtidos de três preparações experimentais em triplicatas (2×10^6 células por *well*).

Os resultados a seguir descritos são relativos à atividade da ACAT, inferida pela formação de ésteres de colesterol em 1h de tratamento. Todos os dados podem ser observados na Figura 17.

Ao contrário do que se verificou com relação à atividade ACAT em macrófagos/ *foam cells*, os dados mostraram que a PGA_2 ($1\mu\text{M}$) aumenta significativamente ($p < 0,05$) a atividade da ACAT (55% de aumento), quando as células controle são tratadas por 1h com esta prostaglandina ciclopentenônica, comparado com o grupo controle, uma vez que a concentração de ésteres de colesterol formado aumentou. No entanto, os perfis encontrados para o grupo controle e grupo PGA_2 em presença de BSO/DEM no sistema de incubação e grupo controle e PGA_2 em presença de NAC, não variaram significativamente, apesar de o tratamento com BSO/DEM apresentar uma tendência de aumento ainda maior na atividade enzimática.

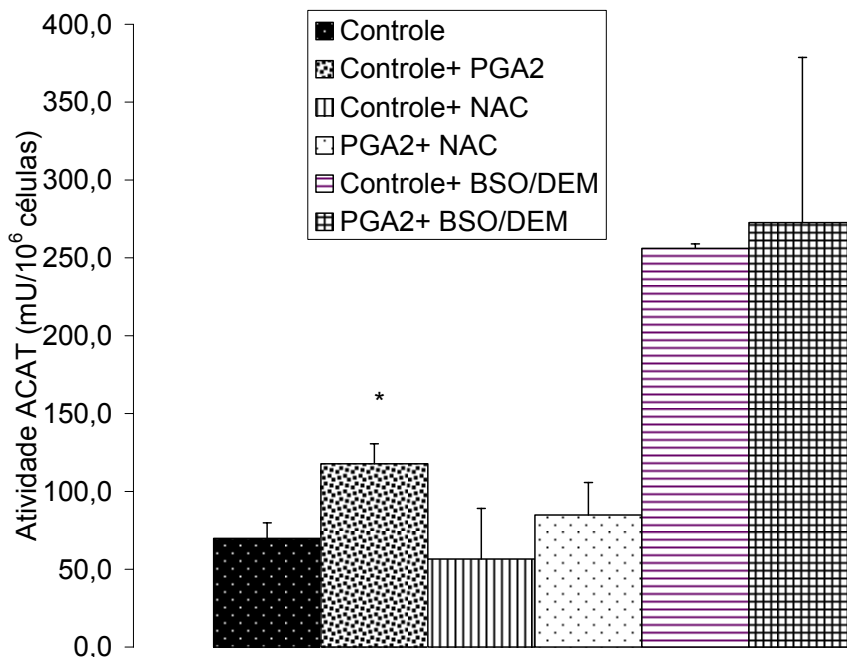


Figura 17: Atividade enzimática da acil CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), em 1h de tratamento com PGA_2 $1\mu\text{M}$, em macrófagos peritoneais nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *well*s diferentes, em três experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle + PGA_2 $1\mu\text{M}$ ($p < 0,05$).

Os valores encontrados, relativos à atividade da ACAT em macrófagos peritoneais em 24h de tratamento, estão demonstrados na Figura 18. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média, valores obtidos de três preparações experimentais em triplicatas (2×10^6 células por *well*).

Em relação à atividade da ACAT, a PGA_2 aumentou em 35% ($p < 0,05$), quando o grupo Controle e Controle+ PGA_2 $1\mu\text{M}$ são comparados em 24h, uma vez que houve aumento de ésteres de colesterol formado. Neste período de tratamento, em macrófagos peritoneais, a depleção de GSH pela presença de BSO/DEM no meio, juntamente com a PGA_2 , promoveu redução significativa da atividade da ACAT ($p < 0,05$), comparando-se os grupos Controle+BSO/DEM e

PGA₂+ BSO/DEM, enquanto que o tratamento com NAC potencializou-a de modo significativo, se se comparar Controle+ NAC e PGA₂+ NAC ($p < 0,05$).

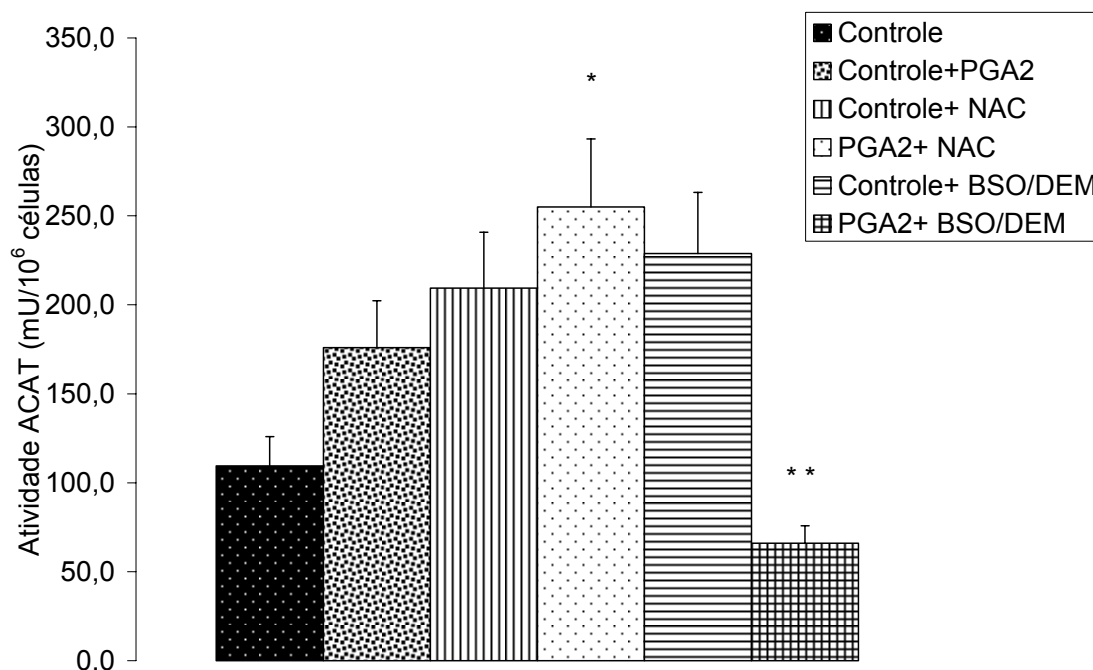


Figura 18: Atividade enzimática da acil CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), em 24h de tratamento com PGA₂ 1 μ M, em macrófagos peritoneais nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em três experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle+ NAC e o grupo PGA₂ 1 μ M+ NAC ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o grupo Controle+ BSO/DEM e o grupo PGA₂ 1 μ M+ BSO/DEM ($p < 0,05$).

Quando se comparam os grupos entre si no período de 1h e 24h de tratamento, vê-se que o grupo Controle aumenta a atividade da ACAT em 24h, comparado com 1h, de modo significativo, assim como o fazem os grupos Controle+ PGA₂, Controle+ NAC e PGA₂+ NAC ($p < 0,05$ para todos). No entanto, o grupo PGA₂+ BSO/DEM diminui significativamente ($p < 0,01$), a atividade da enzima, enquanto o grupo Controle+ BSO/DEM não se altera.

5.3- Estado redox celular em macrófagos peritoneais

Verificando-se que a atividade da ACAT se modificava com o estado redox e que a resposta obtida em macrófagos peritoneais era muito diversa da observada em *foam cells* (a adição de PGA_2 aumentava a atividade da ACAT na primeira e a mesma adição diminuía a atividade da enzima na segunda) se tornou essencial a determinação do estado redox celular.

Então, com a finalidade de se avaliar a resposta celular ao estresse oxidativo produzido pelo tratamento de macrófagos peritoneais com a PGA_2 ($1\mu\text{M}$), BSO/DEM e NAC, foram determinadas as concentrações da glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e a relação entre elas [GSSG/GSH], pois sua relação demonstra o estado redox da célula, vez que o potencial redox das células depende do $\ln ([\text{GSSG}]/[\text{GSH}])$.

As células foram tratadas conforme desenho experimental descrito no item 4.7 da Metodologia, e as medidas das concentrações de GSH, GSSG e a relação [GSSG/GSH] foram obtidas, segundo o protocolo descrito anteriormente. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média, valores obtidos de duas preparações experimentais em triplicatas (2×10^6 células por *well*).

Após o tratamento, observou-se que a PGA_2 reduziu significativamente a concentração de GSH intracelular 1h (30% menor), conforme mostra a Figura 19. Ainda, em 1h de tratamento, observa-se que as concentrações intracelulares de GSH diminuem 35% comparando-se os grupos Controle+NAC e PGA_2 + NAC, de modo significativo ($p < 0,05$), enquanto que o tratamento do grupo BSO/DEM com PGA_2 , comparado ao seu Controle, aumentou em mais de 10 vezes suas concentrações ($p < 0,05$).

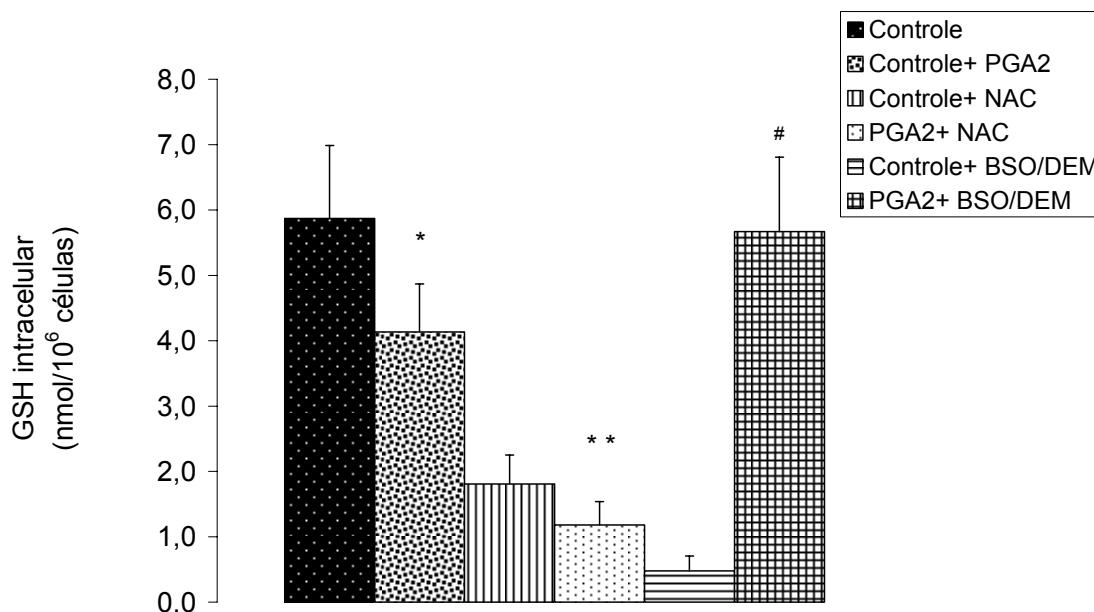


Figura 19: Concentração de glutathiona reduzida (GSH) intracelular de macrófagos peritoneais em 1h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle + PGA₂ 1 μ M (p< 0,05).

** diferença significativa entre o grupo Controle+ NAC e o grupo PGA₂ 1 μ M+ NAC (p< 0,05).

diferença significativa entre o grupo Controle+ BSO/DEM e o grupo PGA₂ 1 μ M+ BSO/DEM (p< 0,05).

Na Figura 20 visualiza-se o que ocorre com a concentração de GSSG em 1h de tratamento. Em relação à formação de GSSG, neste período de tratamento, não há alterações de concentração entre os grupos, exceto entre os grupos Controle+ BSO/DEM e PGA₂+ BSO/DEM. Observa-se que o grupo Controle+ BSO/DEM aumenta a quantidade de GSSG, uma vez que BSO/DEM age como um pró-oxidante realmente, depletando em 45% (p<0,05) a quantidade de glutathiona em 1 hora.

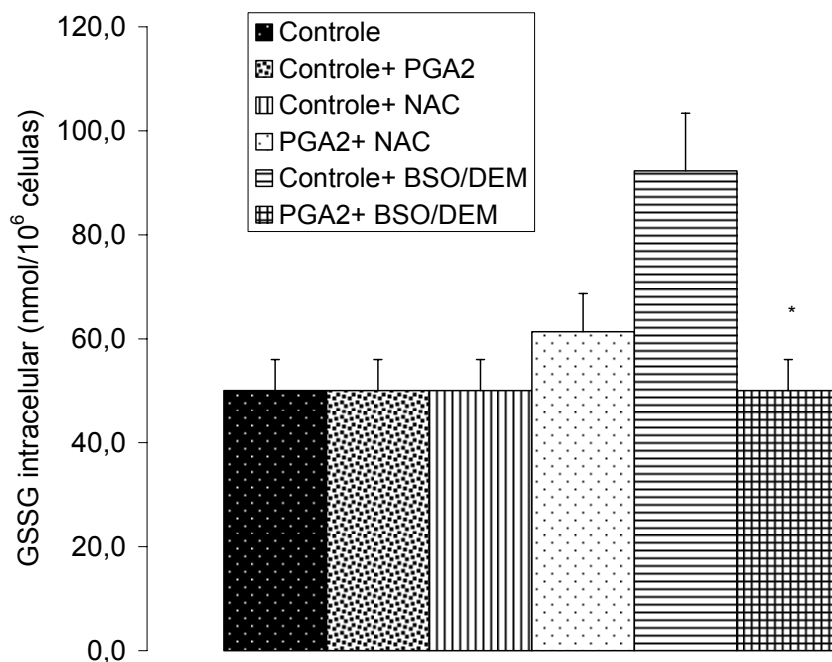


Figura 20: Concentração de glutathiona oxidada (GSSG) intracelular de macrófagos peritoneais em 1h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle+ BSO/DEM e o grupo PGA₂ 1 μ M+ BSO/DEM ($p < 0,05$).

Para que possa ser avaliado o estado redox intracelular, faz-se mister avaliar o balanço entre a GSH e a GSSG, dados demonstrados na Figura 21. Assim, verificou-se que em 1h de tratamento, a relação [GSSG]/[GSH] apresentou-se modificada significativamente ($p < 0,05$) entre os grupos Controle+ PGA₂ e PGA₂+ BSO/DEM, ambos diminuídos em relação aos seus controles, sendo que entre os grupos BSO/DEM esta redução chegou a 95%.

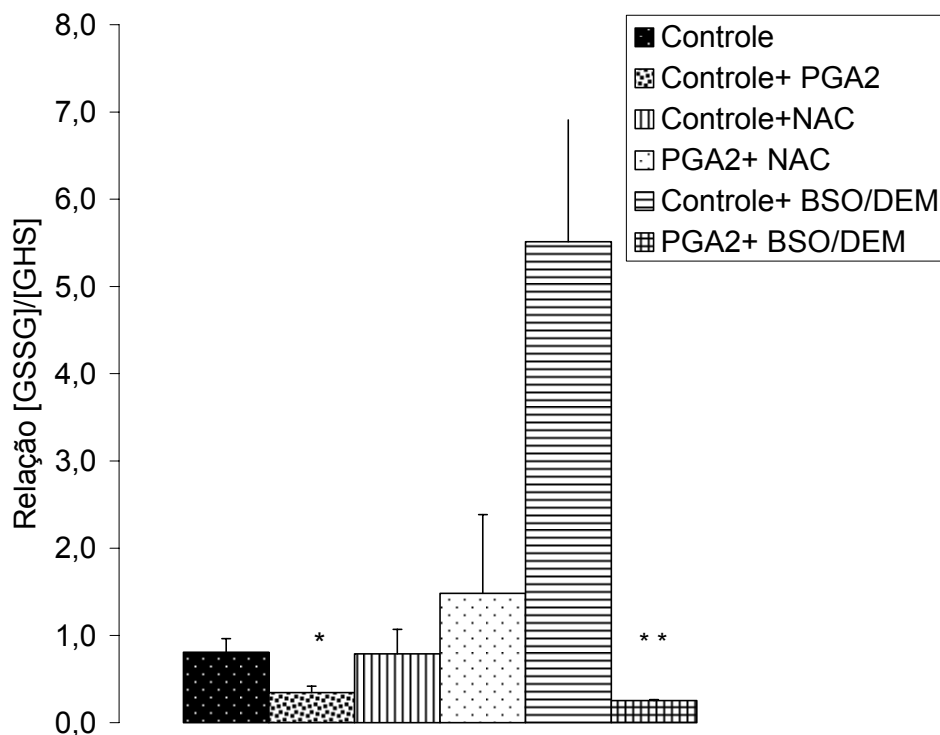


Figura 21: Relação da concentração de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) [GSSG/GSH] intracelular de macrófagos peritoneais em 1h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle + PGA₂ 1 μ M (p < 0,05).

** diferença significativa entre o grupo Controle+ BSO/DEM e o grupo PGA₂ 1 μ M+ BSO/DEM (p < 0,05).

Os resultados obtidos em 24h de tratamento estão descritos na Figura 22. Após o tratamento das células, observou-se que as células sem tratamento (controle) mantiveram suas concentrações de glutathiona reduzida em 1h, como visto, e também em 24h, no entanto, o tratamento com PGA₂ fez com que estas concentrações aumentassem no grupo Controle+ PGA₂ de modo significativo, nos dois tempos de tratamento (Figuras 19 e 22, respectivamente). Em 24 horas de tratamento, é possível também observar uma diminuição grande da quantidade de glutathiona intracelular no grupo NAC+ PGA₂, comparado ao seu controle.

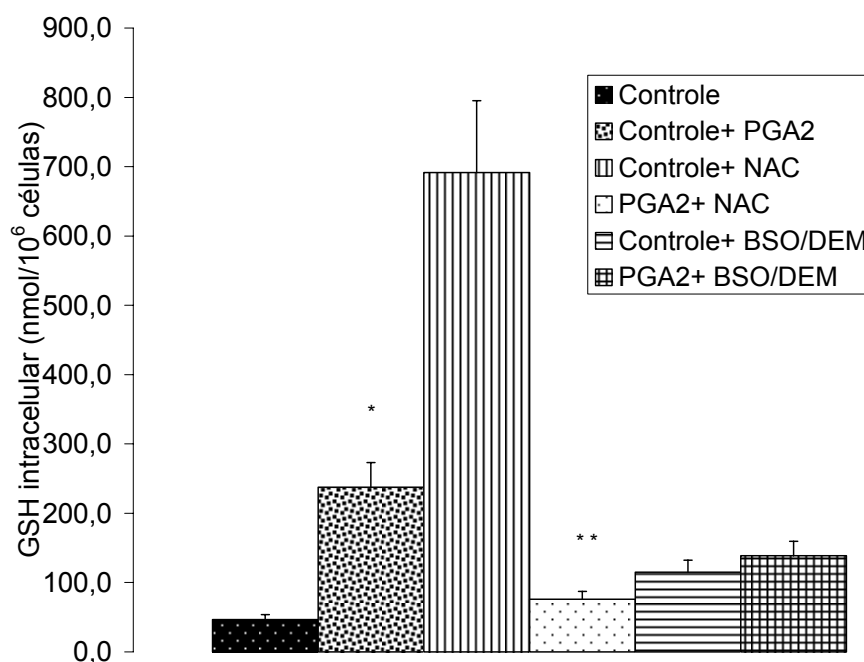


Figura 22: Concentração de glutathiona reduzida (GSH) intracelular de macrófagos peritoneais em 24h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle + PGA₂ 1 μ M ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o grupo Controle+ NAC e o grupo PGA₂ 1 μ M+ NAC ($p < 0,05$).

Na Figura 23, pode-se observar que a concentração de glutathiona oxidada (GSSG) intracelular de macrófagos peritoneais em 24h de tratamento, modificou-se apenas entre os grupos Controle e o Grupo Controle + PGA₂ (este último apresentou aumento significativo em sua concentração).

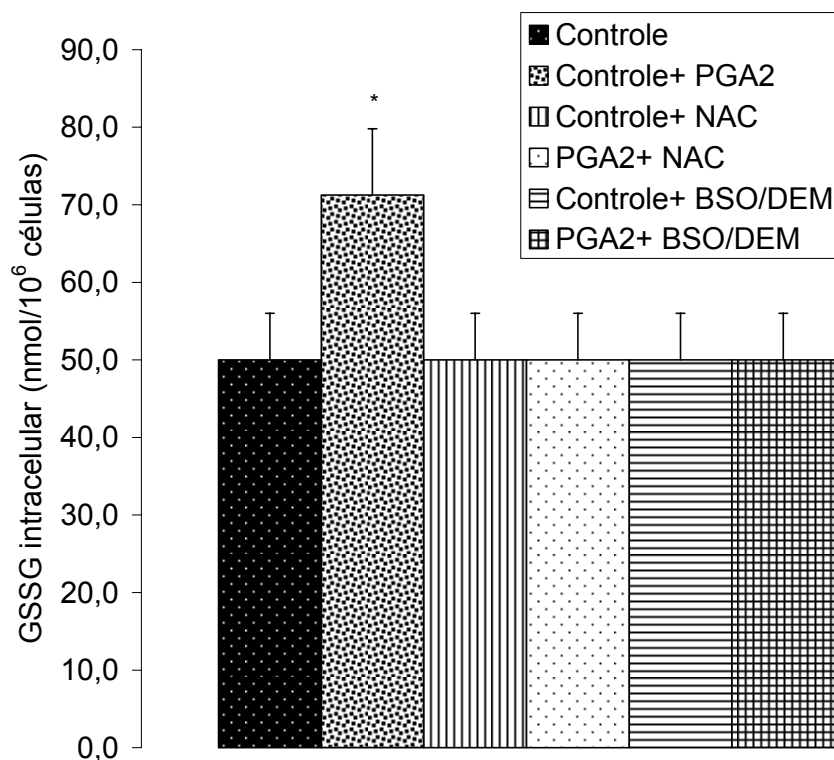


Figura 23: Concentração de glutatona oxidada (GSSG) intracelular de macrófagos peritoneais em 24h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle + PGA₂ 1 μ M ($p < 0,05$).

Os valores encontrados na relação da concentração entre glutatona oxidada (GSSG) e glutatona reduzida (GSH) estão demonstrados na Figura 24. Quando a relação da concentração de glutatona oxidada (GSSG) e glutatona reduzida (GSH) [GSSG/GSH] intracelular de macrófagos peritoneais, em 24h de tratamento, foi analisada, verificou-se que houve diminuição significativa ($p < 0,05$) do estado redox no grupo Controle + PGA₂, comparado ao seu controle e aumento do mesmo ($p < 0,05$) no grupo NAC+ PGA₂. Os grupos tratados com BSO/DEM e BSO/DEM+ PGA₂ não se modificaram significativamente.

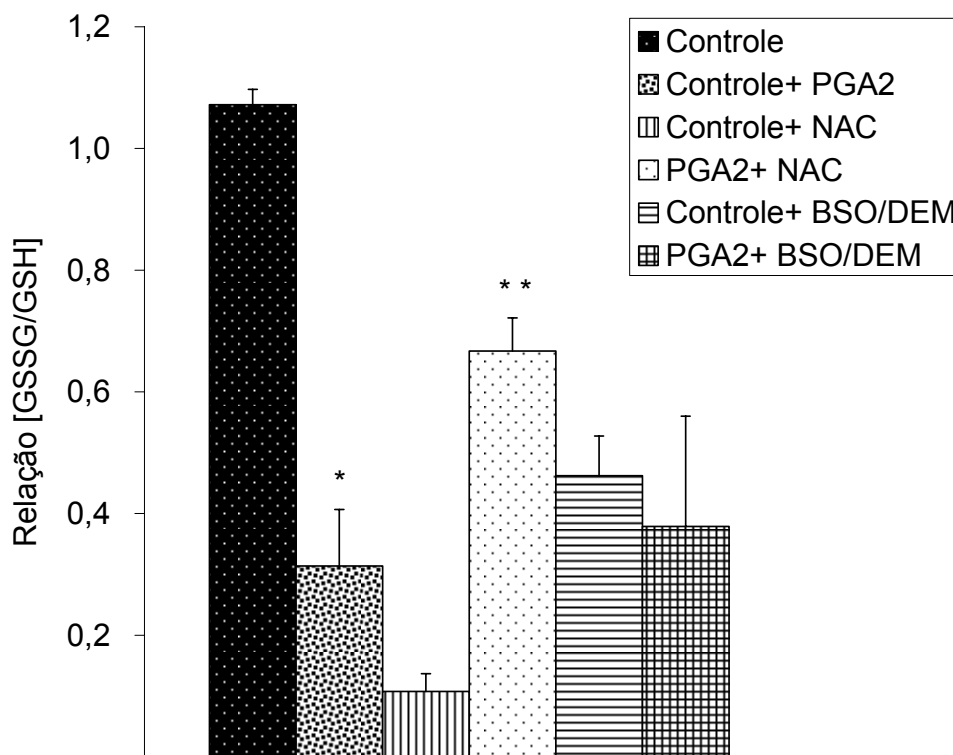


Figura 24: Relação da concentração de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) [GSSG/GSH] intracelular de macrófagos peritoneais em 24h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle + PGA₂ 1 μ M (p< 0,05).

** diferença significativa entre o grupo Controle+ NAC e o grupo PGA₂ 1 μ M+ NAC (p< 0,05).

Comparando-se os grupos experimentais entre eles mesmos em 1h e 24h, nota-se que as concentrações de GSH e GSSG intracelulares aumentaram no período de 24h de tratamento, em relação ao de 1h, em todos os grupos estudados significativamente (p<0,01). No entanto, quando se comparam as relações da concentração de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) [GSSG/GSH] intracelular de macrófagos peritoneais entre si no período de 1h e 24h de tratamento, vê-se que o grupo Controle se oxida em 24h, comparado com 1h, de modo significativo, assim como o fazem

os grupos Controle+ NAC, PGA₂+ NAC e Controle+ BSO/DEM ($p < 0,05$ para todos). Os outros grupos não apresentam variações significantes.

5.4- Estado redox celular em macrófagos U937

Uma vez obtido o estado redox em macrófagos peritoneais, viu-se da importância de testar-se outros tipos celulares frente ao mesmo tipo de estresse. Como macrófagos humanos da linhagem U937 são fáceis de se trabalhar em cultura e são tidos como excelentes modelos de macrófagos precursores de *foam cells* da aterosclerose, estas células foram a escolha, visando-se comparação.

Com a finalidade de se determinar a resposta celular ao estresse oxidativo produzido pelo tratamento das células U937 com a PGA₂, BSO/DEM e NAC, foram determinadas as concentrações da glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e a relação entre elas [GSSG/GSH].

Os resultados descritos foram obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes (2×10^6 células U937 por *well*), pelas medidas das concentrações de GSH, GSSG e cálculo da relação [GSSG/GSH], segundo o protocolo descrito anteriormente. O desenho experimental utilizado está descrito no item 4.7 da Metodologia. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

Consideradas as diferenças nos valores absolutos (que nas U937 são muito maiores), os resultados são bastante semelhantes aos obtidos para macrófagos peritoneais de rato, validando, portanto, os protocolos utilizados aqui. Após o tratamento, observou-se que as células U937 controle continham menos glutathiona reduzida em 1h comparado ao grupo Controle+ PGA₂. Ainda o grupo PGA₂+ BSO/DEM apresentou-se com um aumento de GSH, comparado ao seu controle (sem PGA₂). O grupo Controle+ NAC e PGA₂+ NAC não mostrou diferença nas concentrações de GSH (Figura 25).

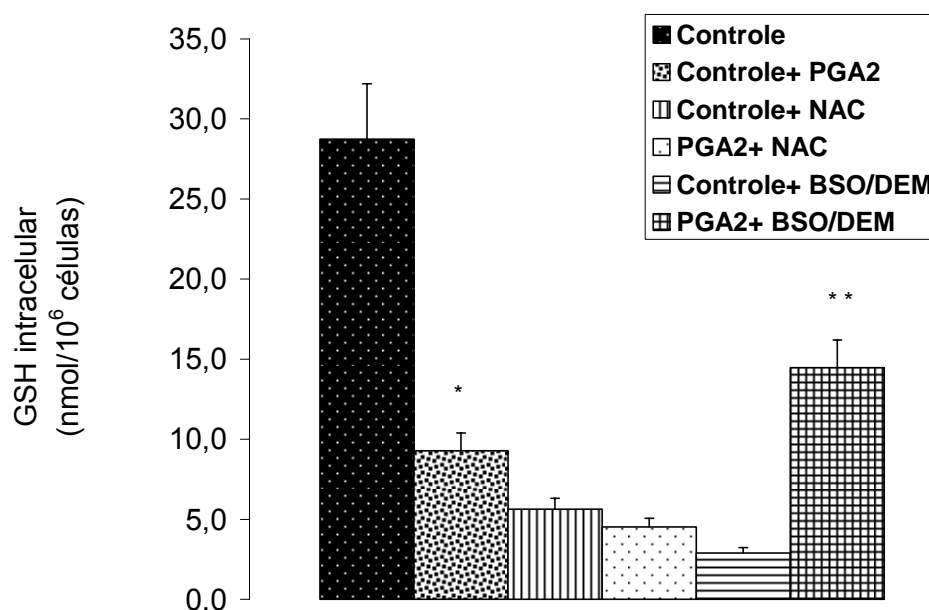


Figura 25: Concentração de glutatona reduzida (GSH) intracelular de células U937 em 1h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle + PGA₂ 1 μ M ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o grupo Controle+ BSO/DEM e o grupo PGA₂ 1 μ M+ BSO/DEM ($p < 0,05$).

Em relação às concentrações intracelulares de glutatona oxidada (GSSG), em 1h de tratamento verificou-se que sua quantidade diminui nos grupos que foram tratados com PGA₂ (Controle+ PGA₂ e PGA₂+ BSO/DEM), comparados aos seus respectivos controles; porém, o tratamento de células com PGA₂+ NAC aumentou significativamente as quantidades de GSSG intracelular neste grupo (Figura 26).

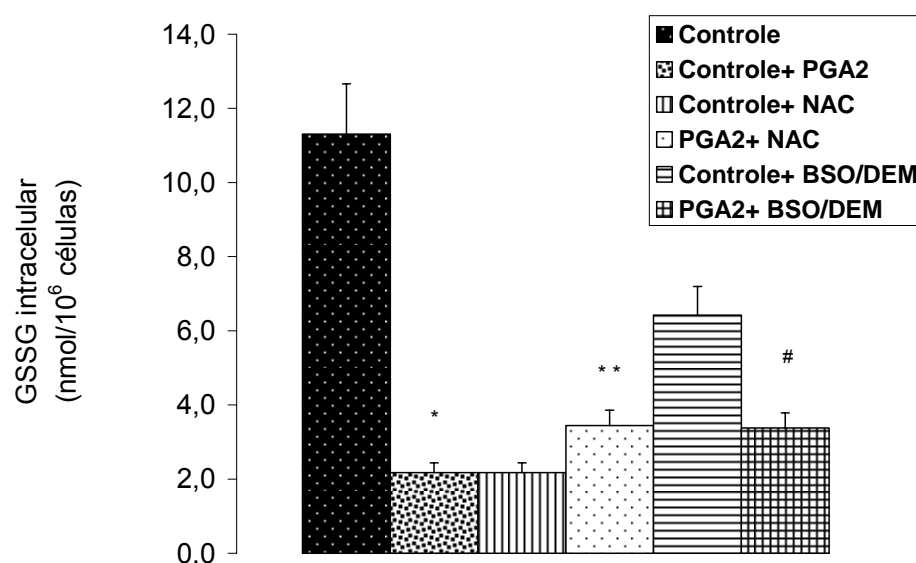


Figura 26: Concentração de glutathiona oxidada (GSSG) intracelular de células U937 em 1h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle + PGA₂ 1 μ M ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o grupo Controle+ NAC e o grupo PGA₂ 1 μ M+ NAC ($p < 0,05$).

diferença significativa entre o grupo Controle+ BSO/DEM e o grupo PGA₂ 1 μ M+ BSO/DEM ($p < 0,05$).

A relação [GSSG/GSH] é um importante indicador da resposta celular ao estresse, pois o balanço redox celular depende em grande parte da manutenção do metabolismo da glutathiona, em especial de sua forma reduzida.

Assim, quando se analisa esta relação em 1 hora de tratamento das células U937, nota-se que os grupos Controle+ PGA₂ e PGA₂+ NAC apresentam estresse oxidativo maior que os seus respectivos controles; entretanto, os dados obtidos no grupo Controle+ BSO/DEM sugerem um intenso estresse oxidativo celular. Os valores obtidos estão demonstrados na Figura 27.

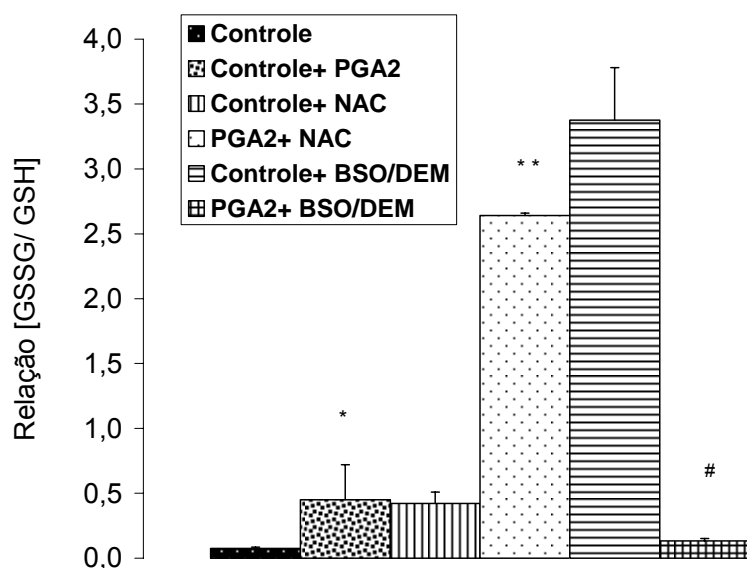


Figura 27: Relação da concentração de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) [GSSG/GSH] intracelular de células U937 em 1h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle + PGA₂ 1 μ M (p < 0,05).

** diferença significativa entre o grupo Controle+ NAC e o grupo PGA₂ 1 μ M+ NAC (p < 0,05).

diferença significativa entre o grupo Controle+ BSO/DEM e o grupo PGA₂ 1 μ M+ BSO/DEM (p < 0,05).

Quando se analisam os dados obtidos em 24h de tratamento, observa-se que houve aumento significativo de GSH intracelular no grupo Controle+ PGA₂. No entanto, quando as células são tratadas apenas com NAC, observa-se que a GSH aumenta em resposta ao mesmo, conforme esperado, uma vez que o NAC é um antioxidante, sendo seu papel mais efetivo após 24 horas, chegando mesmo a aumentar a quantidade de glutathiona reduzida neste grupo, quando comparado ao grupo Controle. Após 24 horas de tratamento, também se observa uma diminuição grande da quantidade de glutathiona intracelular no

grupo PGA_2 + NAC, comparado ao grupo Controle+ NAC, o que demonstra a ação da PGA_2 como pró-oxidante, segundo verifica-se na Figura 28.

Quando se compara a ação do grupo BSO/DEM com o grupo PGA_2 + BSO/DEM, verifica-se que houve depleção na concentração de GSH quando o BSO/DEM+ PGA_2 foram adicionados ao meio, valores demonstrados na Figura 28.

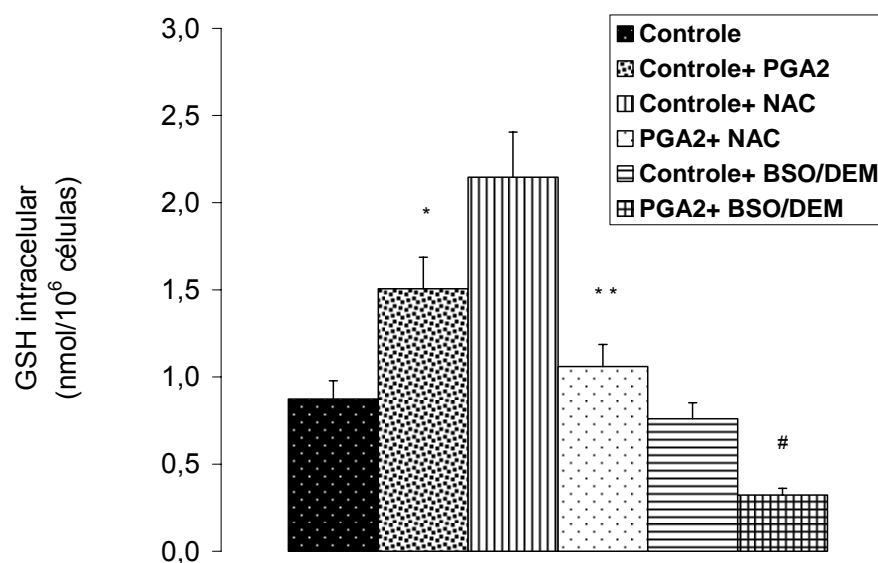


Figura 28: Concentração de glutatona reduzida (GSH) intracelular de células U937 em 24h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle + PGA_2 1 μM ($p < 0,05$).

* * diferença significativa entre o grupo Controle+ NAC e o grupo PGA_2 1 μM + NAC ($p < 0,05$).

diferença significativa entre o grupo Controle+ BSO/DEM e o grupo PGA_2 1 μM + BSO/DEM ($p < 0,05$).

Em 24h, também se verificou que o grupo Controle e Controle+ PGA_2 não apresentou diferenças significativas em concentração de GSSG. No entanto, o grupo NAC+ PGA_2 teve esta concentração reduzida e o grupo

PGA₂+ BSO/DEM aumentada, quando comparados aos seus controles, respectivamente, conforme demonstrado na Figura 29.

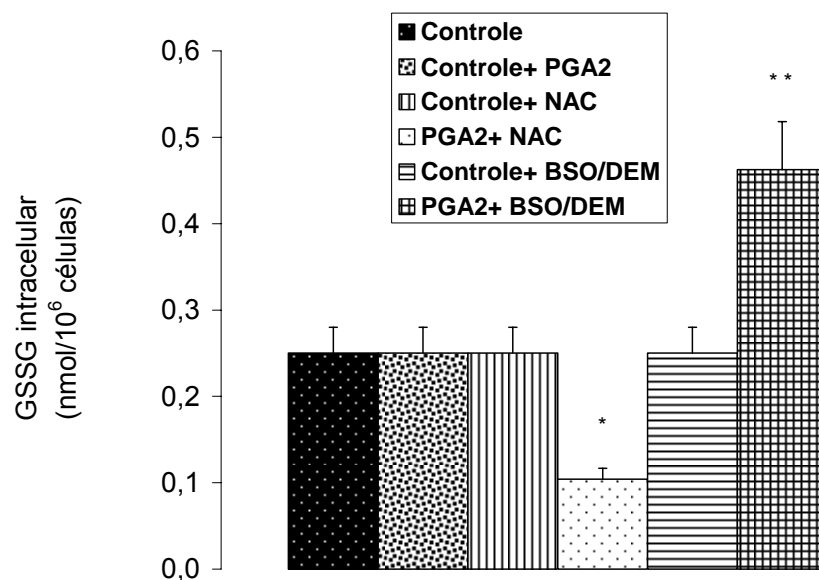


Figura 29: Concentração de glutathiona oxidada (GSSG) intracelular de células U937 em 24h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle+ NAC e o grupo PGA₂ 1 μ M+ NAC ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o grupo Controle+ BSO/DEM e o grupo PGA₂ 1 μ M+ BSO/DEM ($p < 0,05$).

Segundo demonstra a Figura 30, em 24 horas, a relação [GSSG/GSH] não diferiu significativamente entre os grupos Controle+ NAC e PGA₂+ NAC; entretanto, o grupo BSO/DEM+ PGA₂ demonstrou ter sofrido intenso estresse oxidativo com o passar do tempo, ao passo que o grupo Controle+ PGA₂ teve seu estado redox diminuído (Figura 30).

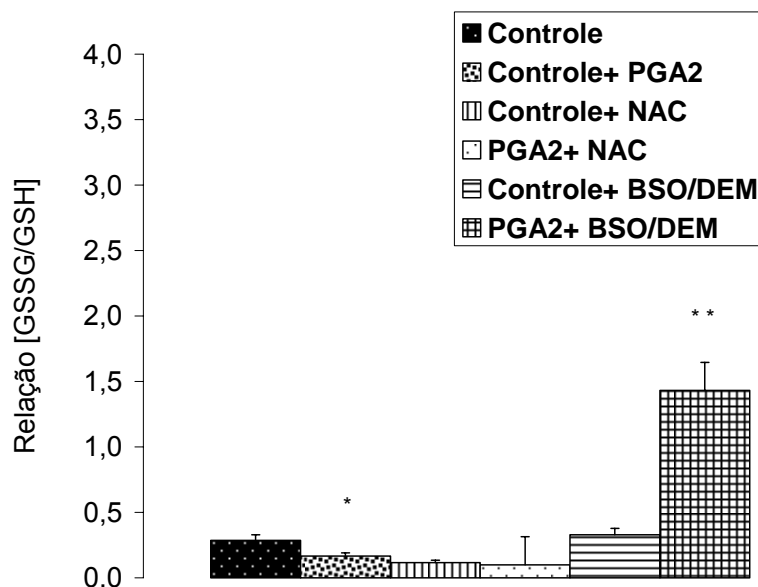


Figura 30: Relação da concentração de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) [GSSG/GSH] intracelular de células U937 em 24h de tratamento, nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle + PGA₂ 1 μ M ($p < 0,05$).

* * diferença significativa entre o grupo Controle+ BSO/DEM e o grupo PGA₂ 1 μ M+ BSO/DEM ($p < 0,05$).

Comparando-se os grupos experimentais entre eles mesmos em 1h e 24h, nota-se que as concentrações de GSH e GSSG intracelulares se encontravam diminuídas significativamente no período de 24h de tratamento, em relação ao de 1h, em todos os grupos estudados ($p < 0,05$). No entanto, quando se comparam as relações da concentração de glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona reduzida (GSH) [GSSG/GSH] intracelular de macrófagos U937 entre si no período de 1h e 24h de tratamento, vê-se que o grupo Controle se oxida em 24h, comparado com 1h, de modo significativo, assim como o faz o grupo Controle+ BSO/DEM ($p < 0,05$). Todos os outros grupos se

reduzem em 24h, comparados com eles mesmos em 1h ($p < 0,05$ para todos), com exceção do grupo Controle+ PGA_2 , que não se altera.

5.5- Expressão da proteína MRP1 em macrófagos peritoneais

Conforme visto, o perfil de resposta dos macrófagos peritoneais e os macrófagos U937 foi bastante semelhante, embora os níveis basais destas células sejam diferentes. Porém, é difícil inferir exatamente o que ocorre nas células se os parâmetros que medem o potencial redox destas são muitos. Assim, de modo a visualizar-se de forma mais ampla esta resposta celular ao estresse oxidativo gerado pelo tratamento dos macrófagos peritoneais com oxidantes, antioxidantes e PGA_2 , fez-se mister avaliar-se a expressão da MRP1, cuja expressão é regulada pelo complexo Nrf2/Keap1, sendo que a proteína inibitória Keap1 é sensível ao estado redox. Em outras palavras, situações de estresse oxidativo, ou tratamento com eletrófilos (como a PGA_2) devem incrementar a expressão da mesma pela liberação do Nrf2 que migra para o núcleo em resposta à alteração redox na proteína inibitória Keap1.

Então, a expressão da proteína MRP1 em macrófagos peritoneais foi medida em 6h e 24h de tratamento, uma vez que a ação genômica de muitas drogas e hormônios só começa a ocorrer após, pelo menos, 90 minutos. Os grupos experimentais foram demonstrados no desenho experimental no item 4.7 da Metodologia, para ambos os tempos de tratamento. Foram utilizadas 2×10^6 células por *well*. Os resultados foram obtidos de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

As amostras foram submetidas a *Western Blot*, utilizando-se anti-MRP1 (primeiro anticorpo) e segundo anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase. As bandas foram quantificadas por digitalização de imagem. Para determinação da β -actina, foi utilizado anti-actina (primeiro anticorpo) e segundo anticorpo anti-camundongo marcado com peroxidase.

Os dados relativos à expressão da proteína estão representados na Figura 31. Observou-se que a resposta celular à expressão de MRP1 em 6h de tratamento não se alterou significativamente entre os grupos.

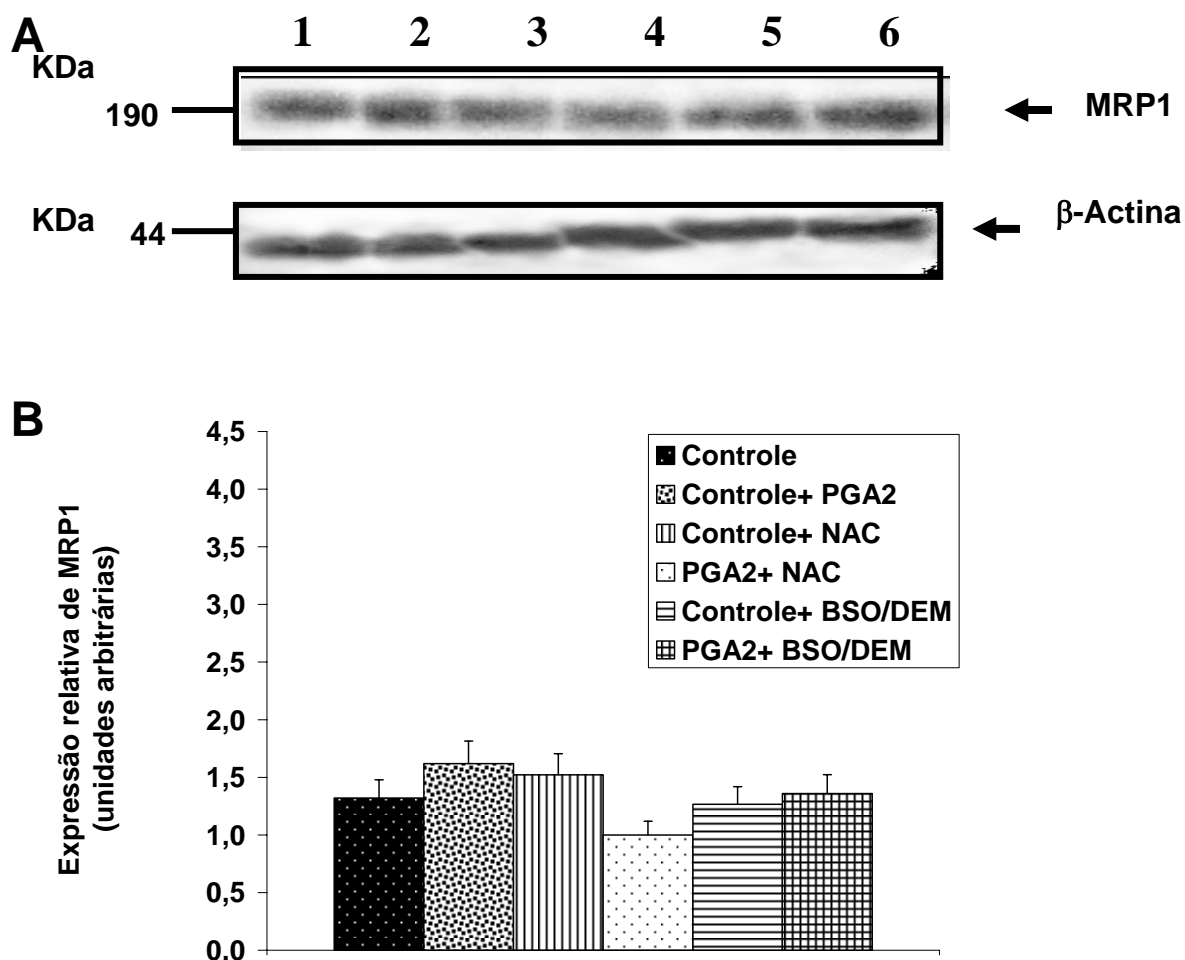


Figura 31: Expressão da proteína MRP1. A expressão relativa da MRP1 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da MRP1 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 6h com PGA2 1mM. **A**- análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot*; 1- Controle; 2- Controle+ NAC; 3- Controle+ BSO/DEM; 4- Controle+ PGA₂; 5- NAC+ PGA₂; 6- BSO+ DEM/PGA₂; **B** - valores arbitrários da expressão de MRP1. *Western blot* representativo de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo 20µg/mL de proteína por *well*.

Os resultados descritos na Figura 32 representam os dados obtidos em 24h de tratamento. Neste período, observa-se um aumento significativo na expressão desta bomba de extrusão de glutathiona conjugada nos grupos Controle+ PGA₂ e PGA₂ + NAC, comparados aos seus controles.

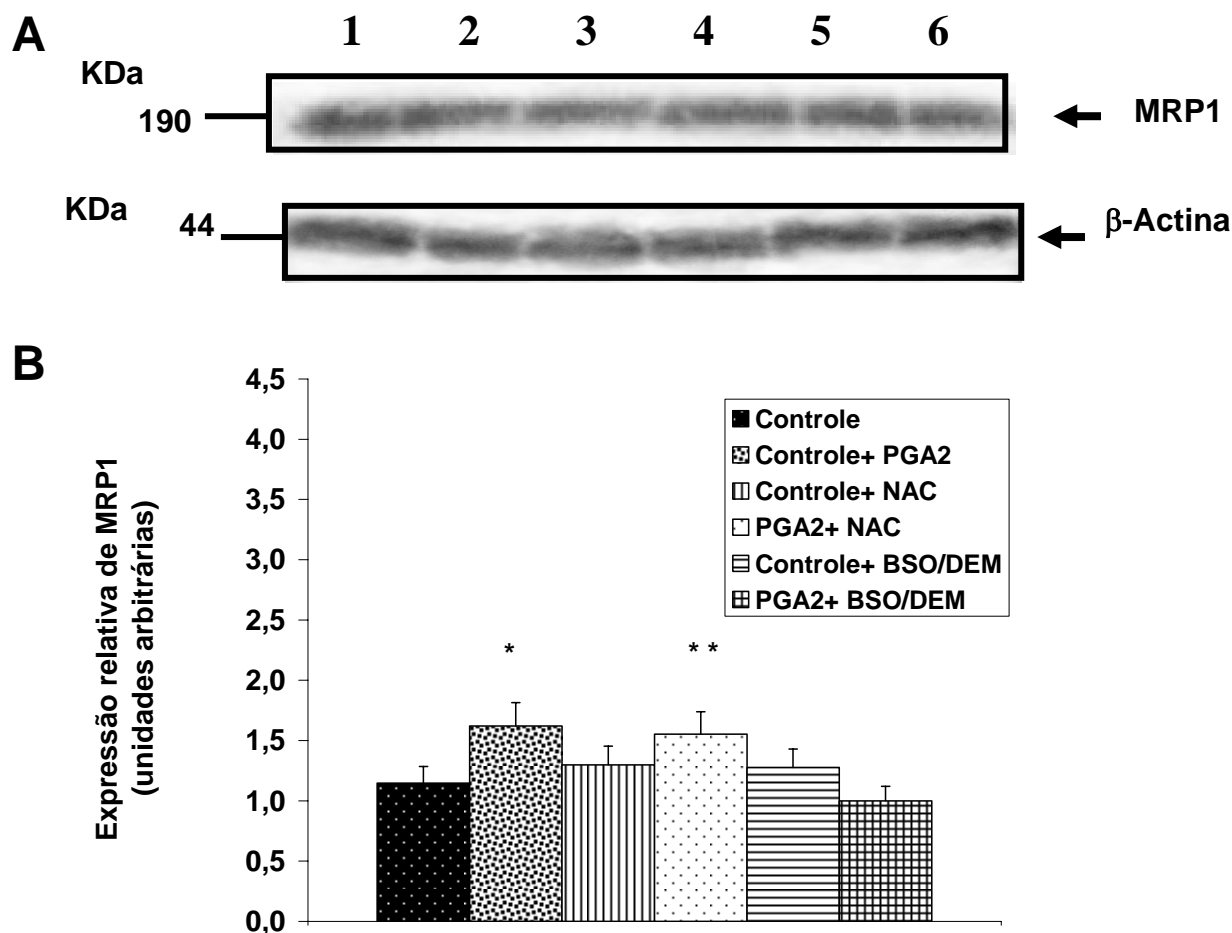


Figura 32: Expressão da proteína MRP1 em macrófagos. A expressão relativa da MRP1 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da MRP1 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 24h com PGA_2 $1\mu\text{M}$. **A**- análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot*; 1- Controle; 2- Controle+ NAC; 3- Controle+ BSO/DEM; 4- Controle+ PGA_2 ; 5- NAC+ PGA_2 ; 6- BSO+ DEM/ PGA_2 ; **B** - valores arbitrários da expressão de MRP1. *Western blot* representativo de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

* diferença significativa entre o Grupo Controle e o Grupo Controle+ PGA_2 ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o Grupo Controle+ NAC e o Grupo PGA_2 + NAC ($p < 0,05$).

5.6- Expressão da proteína HSP70 em macrófagos peritoneais

Discutiu-se que muitos parâmetros inferem desequilíbrio redox; assim, como medida ainda essencial para uma melhor visualização da resposta celular frente ao tratamento proposto, visou-se a determinar a expressão da família das HSP70. A ativação dos *heat shock factors* (HSF) é sensível ao estado redox pela presença de cisteínas reativas nas cadeias das mesmas. Por isso, uma das primeiras respostas celulares ao tratamento com PGA_2 é sempre a indução de HSP70, o que atesta a eficiência do tratamento com a prostaglandina.

A expressão das isoformas HSC73 (do inglês *Heat Shock Cognates* – isoforma constitutiva, de 73KDa) e HSP72 (induzível) em macrófagos peritoneais foi medida em 6h e 24h de tratamento, uma vez que a ação genômica de muitas drogas e hormônios só começa a ocorrer após, pelo menos, 90 minutos. É sabido que 6h é o período de expressão gênica máxima da família das HSP70.

Os grupos experimentais foram demonstrados no desenho experimental no item 4.7 da Metodologia, para ambos os tempos de tratamento. Foram utilizadas 2×10^6 células por *well*. Os resultados foram obtidos de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

As amostras foram submetidas a *Western Blot*, utilizando-se anti-HSP70 (primeiro anticorpo) e segundo anticorpo anti-camundongo marcado com peroxidase. As bandas foram quantificadas por digitalização de imagem. Para determinação da β -actina, foi utilizado o anti-actina (primeiro anticorpo) e segundo anticorpo anti-camundongo marcado com peroxidase.

Os dados podem ser visualizados na Figura 33. Analisando-se os resultados após 6h de tratamento dos macrófagos peritoneais, notou-se que o grupo Controle+ PGA_2 apresentou indução significativa de produção de HSP72, comparado com o grupo Controle ($p < 0,05$). O grupo Controle+ NAC também apresentou aumento de expressão da HSP72 neste período ($p < 0,05$). Nos grupos tratados com BSO/DEM não apresentaram alteração. É importante notar que em 6h de tratamento, só ocorreu expressão da HSP72, que é a forma induzível.

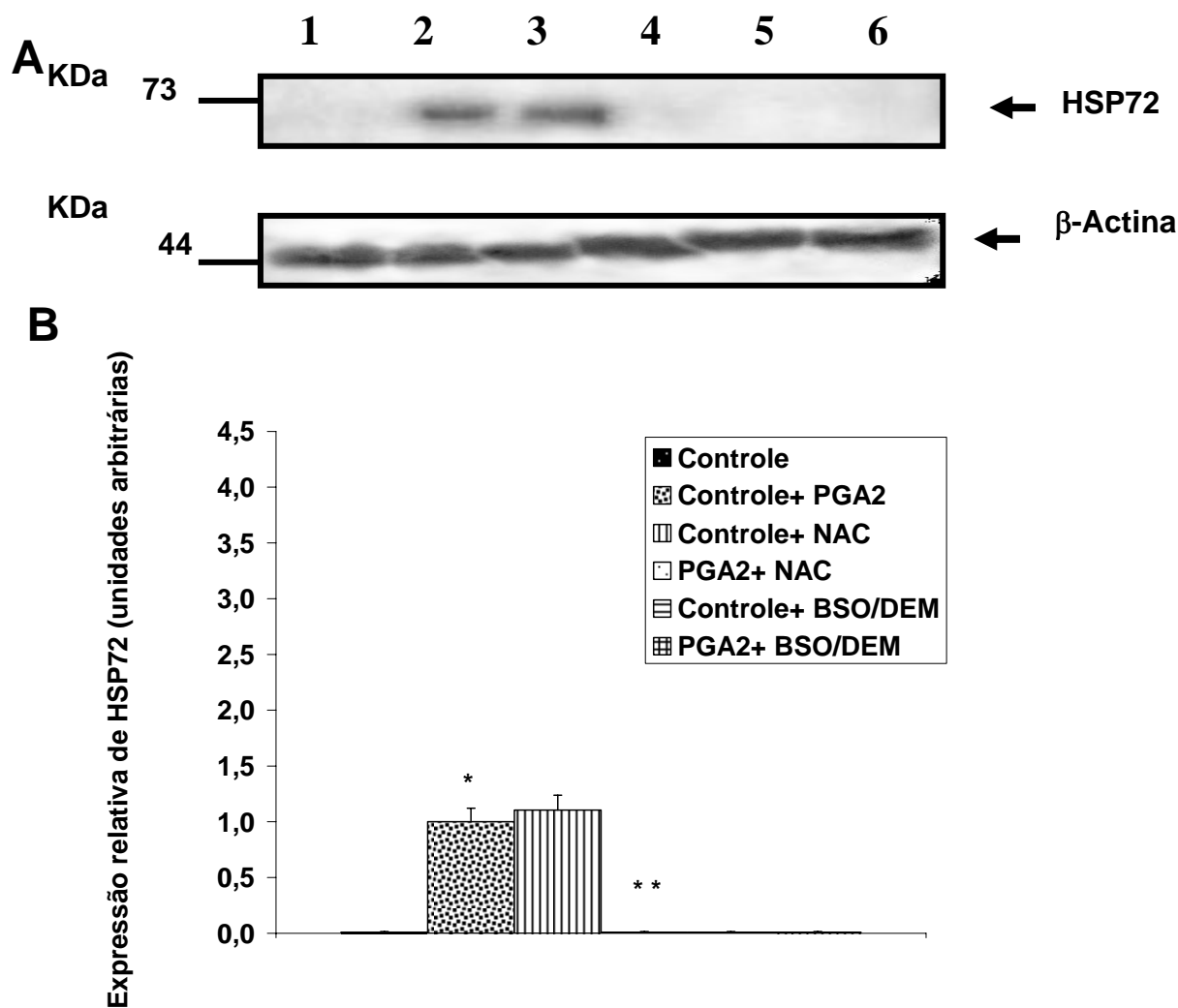


Figura 33: Expressão da proteína HSP72. A expressão relativa da HSP72 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da HSP72 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 6h com PGA_2 $1\mu\text{M}$. **A**- análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot*; 1- Controle; 2- Controle+ NAC; 3- Controle+ BSO/DEM; 4- Controle+ PGA_2 ; 5- NAC+ PGA_2 ; 6- BSO+ DEM/ PGA_2 ; **B** - valores arbitrários da expressão de HSP72. *Western blot* representativo de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

* diferença significativa entre o Grupo Controle e o Grupo Controle+ PGA_2 $1\mu\text{M}$ ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o Grupo Controle+ NAC e o Grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + NAC ($p < 0,05$).

Segundo a Figura 34, após 24h de tratamento, ocorreu a expressão das duas isoformas da família da HSP70: a HSC73 (constitutiva) e HSP72 (induzível). Houve um aumento significativo na expressão da HSC73, que é a proteína constitutiva, no grupo Controle+ PGA_2 , comparado com o grupo Controle ($p < 0,05$). Os grupos PGA_2 + NAC e PGA_2 + BSO/DEM mostraram-se com expressões diminuídas da HSC74 ($p < 0,05$), comparados ao grupo Controle+ PGA_2 , e sem alterações significativas comparados aos seus controles, neste período.

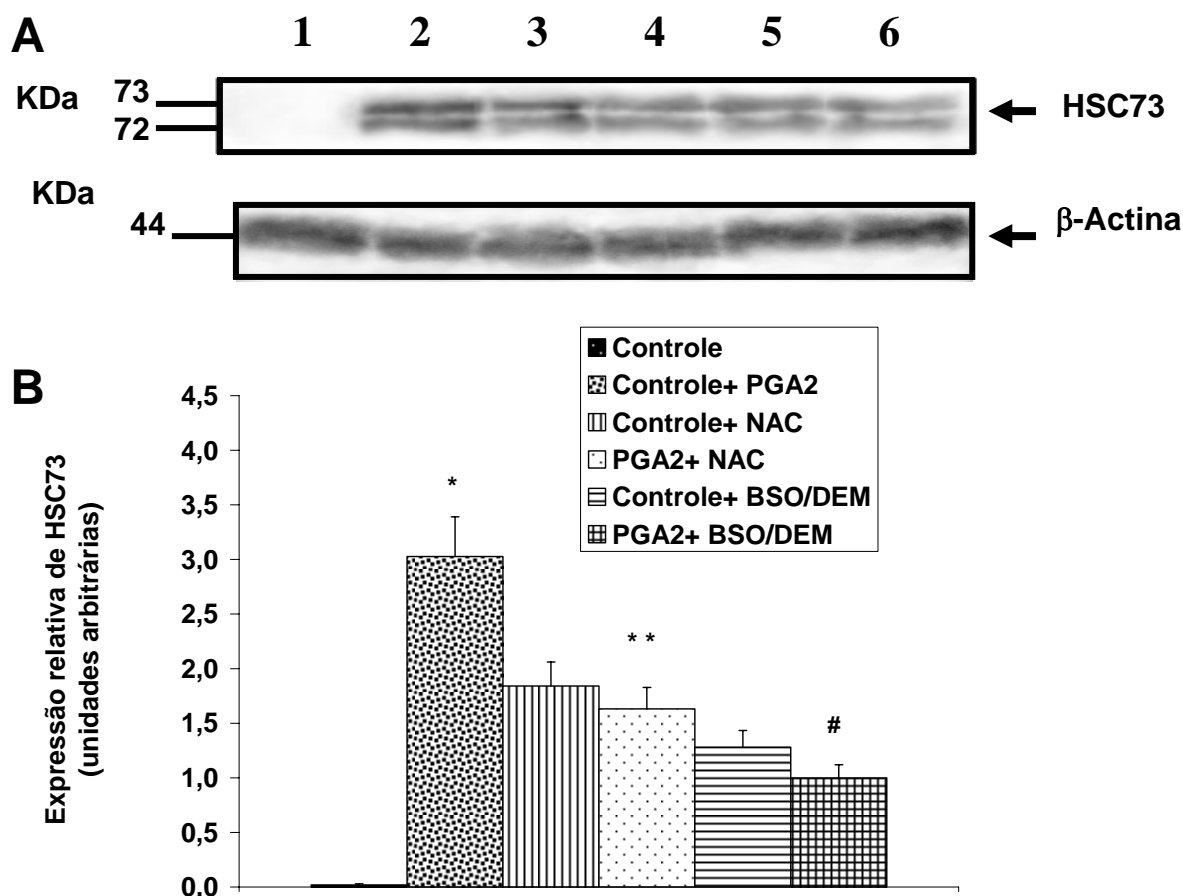


Figura 34: Expressão da proteína HSC73. A expressão relativa da HSC73 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da HSC73 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 24h com PGA_2 $1\mu\text{M}$. **A**- análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot*; 1- Controle; 2- Controle+ NAC; 3- Controle+ BSO/DEM; 4- Controle+ PGA_2 ; 5- NAC+ PGA_2 ; 6- BSO+ DEM/ PGA_2 ; **B** - valores arbitrários da expressão de HSC73. *Western blot* representativo de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

* diferença significativa entre o Grupo Controle e o Grupo Controle+ PGA_2 $1\mu\text{M}$ ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o Grupo Controle+ NAC e o Grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + NAC ($p < 0,05$).

diferença significativa entre o Grupo Controle+ BSO/DEM e o Grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + BSO/DEM ($p < 0,05$).

Os resultados são apresentados na Figura 35. Em 24h de tratamento, observou-se que ocorreu um aumento significativo na expressão da HSP72, que é a proteína induzível, no grupo Controle+ PGA_2 , comparado com o grupo Controle ($p < 0,05$). Os grupos PGA_2 + NAC e PGA_2 + BSO/DEM mostraram o mesmo perfil verificado na expressão da isoforma constitutiva, diferindo significativamente de seus controles.

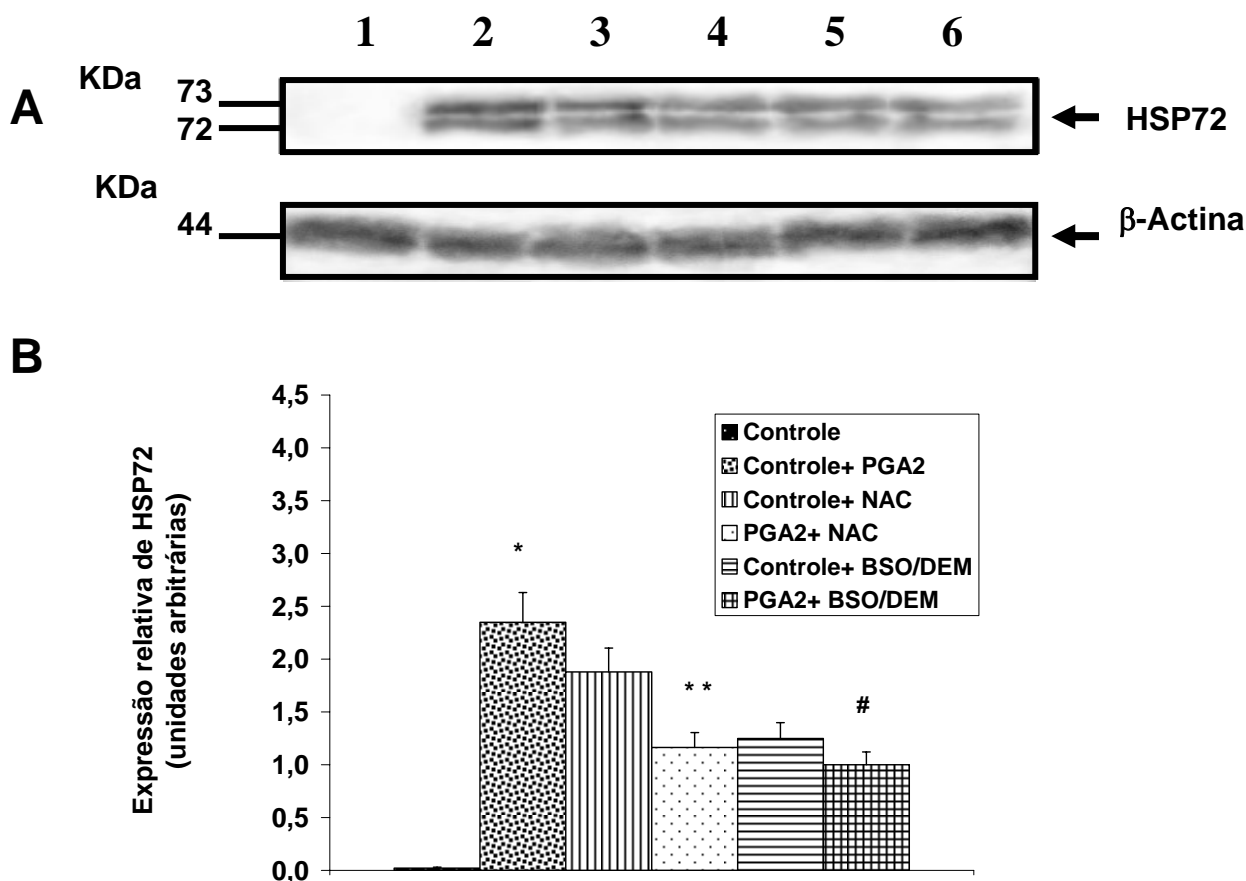


Figura 35: Expressão da proteína HSP72. A expressão relativa da HSP72 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da HSP72 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 24h com PGA_2 $1\mu\text{M}$. **A**- análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot*; 1- Controle; 2- Controle+ NAC; 3- Controle+ BSO/DEM; 4- Controle+ PGA_2 ; 5- NAC+ PGA_2 ; 6- BSO+ DEM/ PGA_2 ; **B** - valores arbitrários da expressão de HSP72. *Western blot* representativo de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

* diferença significativa entre o Grupo Controle e o Grupo Controle+ PGA_2 $1\mu\text{M}$ ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o Grupo Controle+ NAC e o Grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + NAC ($p < 0,05$).

diferença significativa entre o Grupo Controle+ BSO/DEM e o Grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + BSO/DEM ($p < 0,05$).

5.7- Expressão da proteína HSP70 em macrófagos/ foam cells

Após a obtenção dos resultados de expressão da família das HSP70 em macrófagos peritoneais, visou-se determinar o que ocorreria com as *foam cells*, oxidadas frente a ação da LDL oxidada.

Assim, a expressão de HSP70 (proteína de choque térmico de 70 kDa) foi analisada em macrófagos/ *foam cells* controle e tratados com PGA_2 nas concentrações de $1\mu\text{M}$ e $20\mu\text{M}$, vinte e quatro horas após a incubação. Foram utilizadas 2×10^6 células por *well*.

Os grupos experimentais foram demonstrados no desenho experimental no item 4.9 da Metodologia, para ambos os tempos de tratamento. Foram utilizadas 2×10^6 células por *well*. Os resultados foram obtidos de 1 experimento independente, em triplicata. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

As amostras foram submetidas a *Western Blot*, utilizando-se anti-HSP70 (primeiro anticorpo) e segundo anticorpo anti-camundongo marcado com peroxidase. As bandas foram quantificadas por digitalização de imagem. Para determinação da β - actina, foi utilizado o anti-actina (primeiro anticorpo) e segundo anticorpo anti-camundongo marcado com peroxidase.

Os dados foram apresentados na Figura 36. Os resultados obtidos demonstram um aumento de 73% na expressão da HSP70 nos macrófagos/ *foam cells* tratados com PGA_2 $1\mu\text{M}$ ($p < 0,05$), quando comparado com o controle tratado com PGA_2 $1\mu\text{M}$, e uma diminuição de 67% de sua expressão em macrófagos/ *foam cells* tratados com PGA_2 $20\mu\text{M}$, quando comparado com o controle tratado com PGA_2 $20\mu\text{M}$.

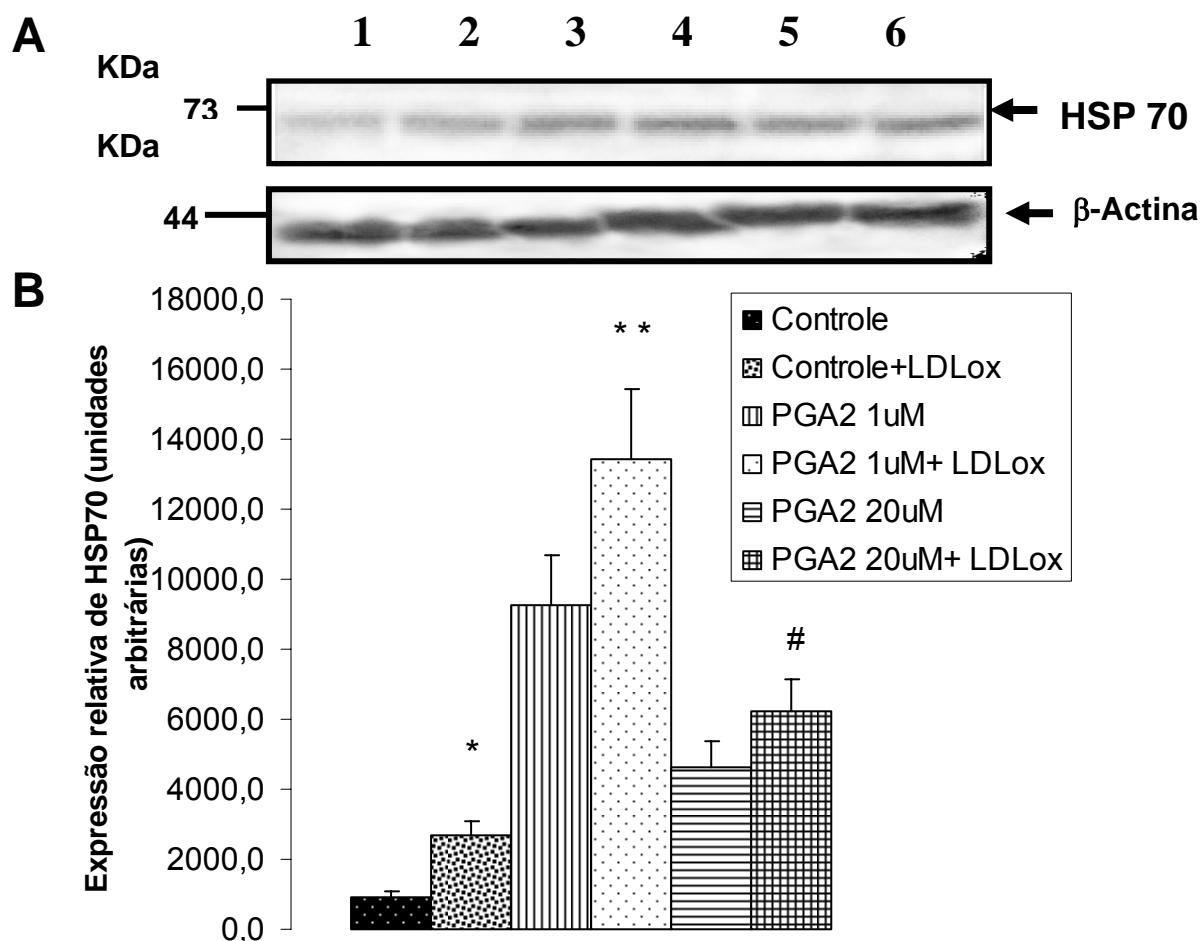


Figura 36: Expressão da proteína HSP70. A expressão relativa da HSP70 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da HSP70 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos/ *foam cells* controle e tratados com PGA_2 $1\mu\text{M}$ e $20\mu\text{M}$. **A**- análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot*; 1- Controle; 2- Controle+ LDLox; 3- Controle+ PGA_2 $1\mu\text{M}$; 4- LDLox+ PGA_2 $1\mu\text{M}$; 5- Controle+ PGA_2 $20\mu\text{M}$; 6- LDLox+ PGA_2 $20\mu\text{M}$; **B** - valores arbitrários da expressão da HSP70. *Western blot* representativo de 1 experimento independente, com três *well*. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

* diferença significativa entre o grupo Controle e Controle+ PGA_2 $1\mu\text{M}$ ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo Controle LDLox ($p < 0,05$).

diferença significativa entre o grupo Controle LDLox e o grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + LDLox ($p < 0,05$).

5.8- Expressão da proteína iNOS em macrófagos peritoneais

Teoricamente, a oxidação gerada intracelularmente pelo tratamento dos macrófagos peritoneais imita o que ocorre em *foam cells* e também em células inflamatórias. Sabe-se que a inflamação gera estresse oxidativo e que isto é essencial para que ocorra transcrição gênica de diversas moléculas pró-inflamatórias: uma delas é a iNOS que, inclusive, pode se modificar drasticamente no processo da aterosclerose. Na verdade, a forma induzida da NO sintase é expressa somente em resposta à ativação do NF- κ B nos macrófagos e constitui-se, por isso, um importante marcador dos mecanismos de expressão envolvidos nos tratamentos aplicados.

Desta forma, a expressão da iNOS em macrófagos peritoneais foi medida em 6h e 24h de tratamento, uma vez que a ação genômica de muitas drogas e hormônios só começa a ocorrer após, pelo menos, 90 minutos.

Os grupos experimentais foram demonstrados no desenho experimental no item 4.7 da Metodologia, para ambos os tempos de tratamento. Foram utilizadas 2×10^6 células por *well*. Os resultados foram obtidos de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo 20 μ g/mL de proteína por *well*.

As amostras foram submetidas a *Western Blot*, utilizando-se anti-iNOS (primeiro anticorpo) e segundo anticorpo anti-camundongo marcado com peroxidase. As bandas foram quantificadas por digitalização de imagem. Para determinação da β -actina, foi utilizado o anti-actina (primeiro anticorpo) e segundo anticorpo anti-camundongo marcado com peroxidase.

Os resultados podem ser visualizados na Figura 37. Em 6h de tratamento, somente o grupo Controle+ NAC apresentou aumento significativo na expressão da iNOS ($p < 0,05$). Os outros grupos não mostraram alterações em seus níveis de expressão.

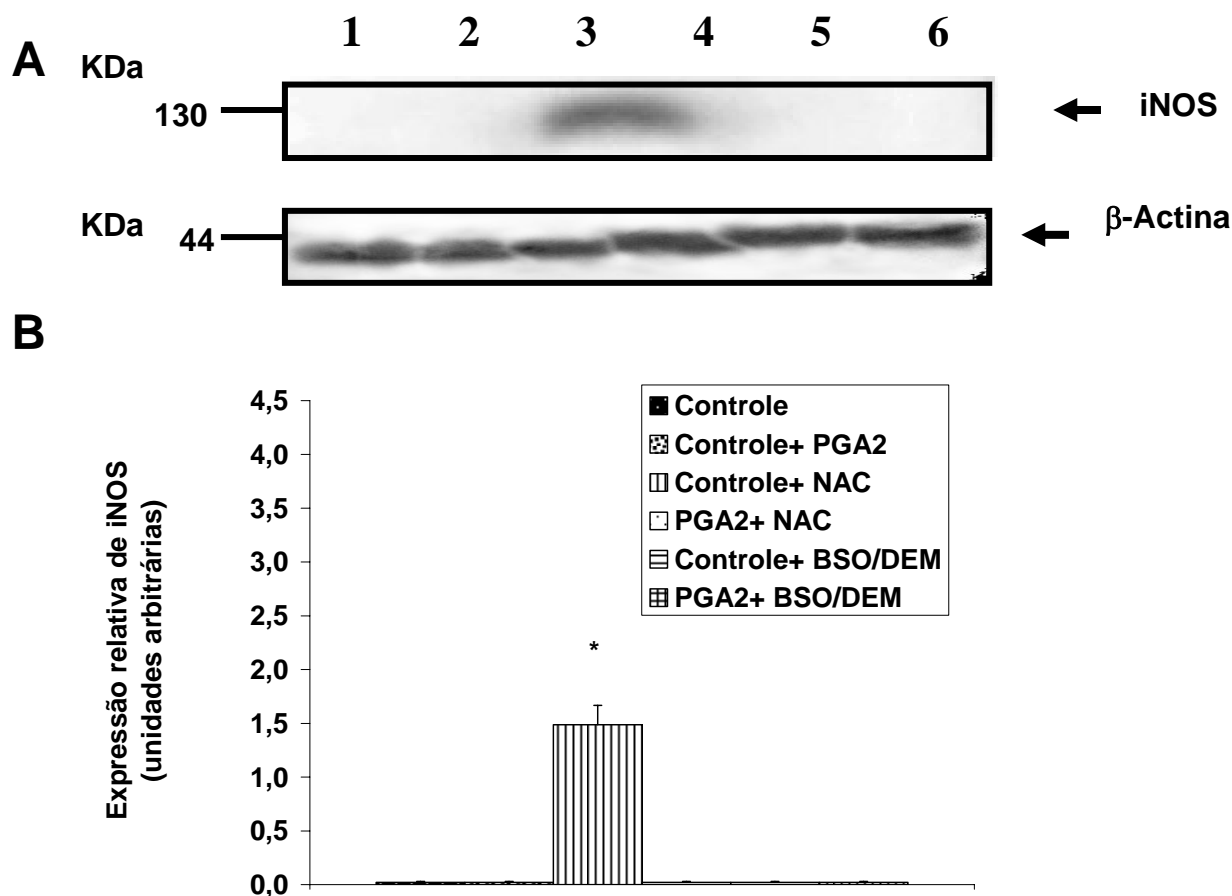


Figura 37: Expressão da proteína iNOS. A expressão relativa da iNOS em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da iNOS pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 6h com PGA_2 $1\mu\text{M}$. **A**- análise por immunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot*; 1- Controle; 2- Controle+ NAC; 3- Controle+ BSO/DEM; 4- Controle+ PGA_2 ; 5- NAC+ PGA_2 ; 6- BSO+ DEM/ PGA_2 ; **B** - valores arbitrários da expressão da iNOS. *Western blot* representativo de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

* diferença significativa entre o Grupo Controle+ NAC e o Grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + NAC ($p < 0,05$).

Os resultados estão expressos na Figura 38. Após 24h de tratamento, o grupo Controle+ NAC continuava com expressão aumentada em relação ao seu controle e aos outros grupos ($p < 0,05$). O grupo Controle+ BSO/DEM

também se apresentou aumentado significativamente ($p < 0,05$), comparado ao seu controle, no mesmo período de tratamento.

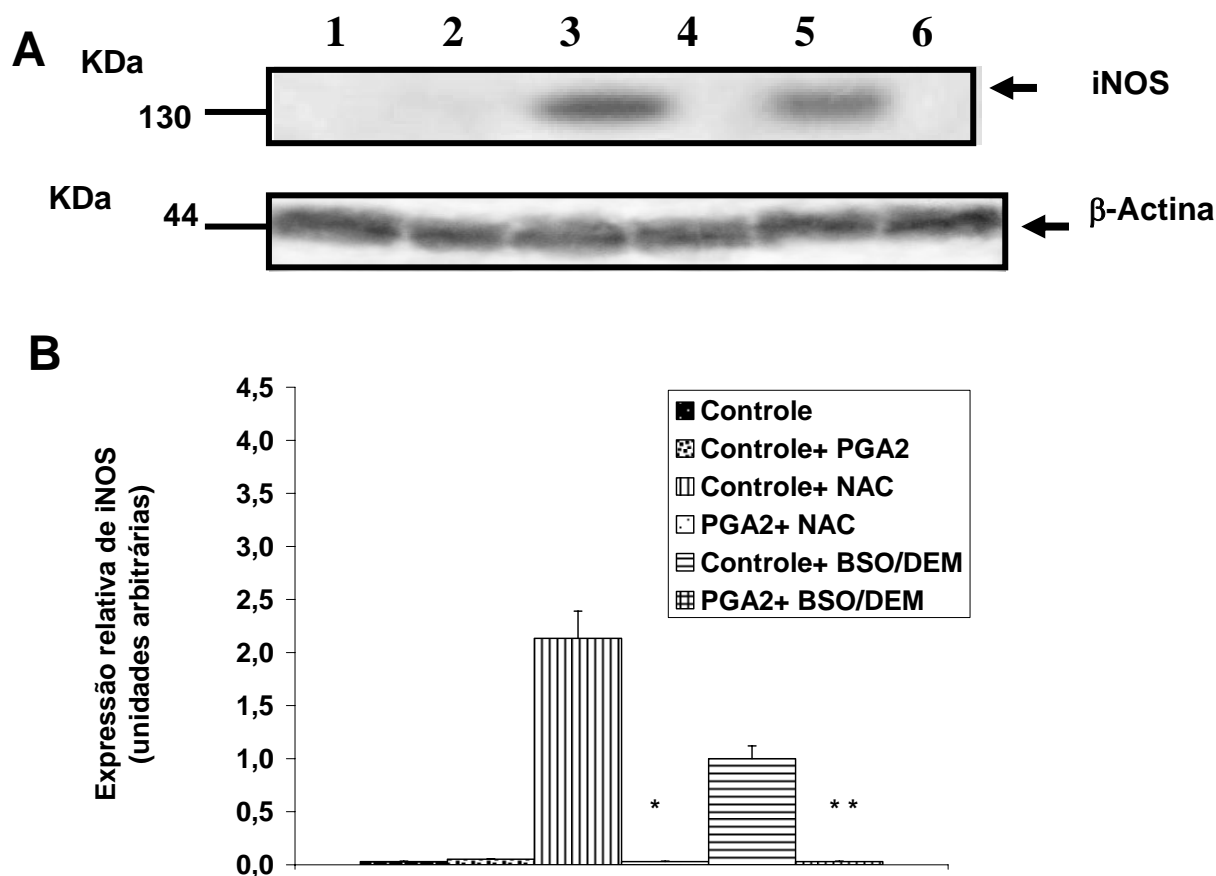


Figura 38: Expressão da proteína iNOS. A expressão relativa da iNOS em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da iNOS pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 24h com PGA_2 $1\mu\text{M}$. **A**- análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot*; 1- Controle; 2- Controle+ NAC; 3- Controle+ BSO/DEM; 4- Controle+ PGA_2 ; 5- NAC+ PGA_2 ; 6- BSO+ DEM/ PGA_2 ; **B** - valores arbitrários da expressão de iNOS. *Western blot* representativo de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

* diferença significativa entre o Grupo Controle+ NAC e o Grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + NAC ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o Grupo Controle+ BSO/DEM e o Grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + BSO/DEM ($p < 0,05$).

5.9- Atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) em macrófagos peritoneais

Foi demonstrado que a PGA_2 $1\mu\text{M}$, em macrófagos/ *foam cells* diminui a formação de colesterol endógeno, a partir do acetil-CoA (Homem de Bittencourt Jr. et al, 2007), isto é, ocorre modificação destas rotas bioquímicas por ação deste prostanóide. Isso pode sugerir inibição da atividade ou diminuição da expressão de HMG-CoA redutase, enzima-chave da síntese de colesterol. Assim, viu-se da importância de determinar a atividade da HMG-CoA redutase.

Então, a atividade HMG-CoA redutase foi medida por técnica de monitoramento da oxidação do NADPH na presença de HMG-CoA. Uma unidade da enzima é definida como a quantidade necessária para oxidar 2 nmols de NADPH (ou 1 nmol de HMG-CoA) por minuto a 37°C (Edwards et al., 1979).

No caso de células tratadas com CP-PGs, como a PGA_2 , o DTT (ditiotreitól) deve ser omitido do tampão de ensaio, conforme descrito anteriormente. Assim, para testar o efeito do DTT (que pode liberar CP-PGs ligadas por adições de Michael), cada amostra foi ensaiada 2 vezes: uma na ausência e outra na presença de DTT. O DTT sempre aumenta a atividade da HMG-CoA redutase, porque ela é uma enzima que apresenta várias cisteínas reativas que permanecem oxidadas dentro das células e nas preparações, dependendo do potencial redox empregado (ou intracelular).

Macrófagos peritoneais foram tratados com PGA_2 $1\mu\text{M}$, na presença ou ausência de butionina sulfoxamina e dietilmaleato (BSO/DEM, $2,5\mu\text{M}/5\text{mM}$, para depleção da glutatona [GSH] intracelular) ou N-acetilcisteína (NAC, 20mM , que eleva os níveis de GSH) por 1h e por 24h. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média, valores obtidos de três preparações experimentais em triplicatas (2×10^6 células por *well*).

Os grupos experimentais estão demonstrados no desenho experimental no item 4.7 da Metodologia, para ambos os tempos de tratamento.

Os resultados a seguir descritos são relativos à atividade da HMG-CoA redutase em macrófagos peritoneais, inferida pelo consumo de NADPH^+ em presença da enzima, em 1h de tratamento. Segundo consta na Figura 39, os dados sugerem que a PGA_2 ($1\mu\text{M}$) diminui a atividade desta enzima em 64%,

na ausência de DTT, comparando-se o grupo Controle com o grupo Controle+PGA₂ ($p < 0,05$) em 1h. Na presença de DTT, observa-se que a inibição persistiu, mas que havia uma atividade latente muito maior que a ensaiada na ausência do redutor. Neste mesmo período de tratamento, a depleção de GSH pela presença de BSO/DEM no meio, juntamente com a PGA₂, promoveu redução da atividade da HMG-CoA redutase ainda maior, comparando-se com o grupo Controle+ BSO/DEM ($p < 0,05$), enquanto que o tratamento com NAC não apresentou diferença significativa.

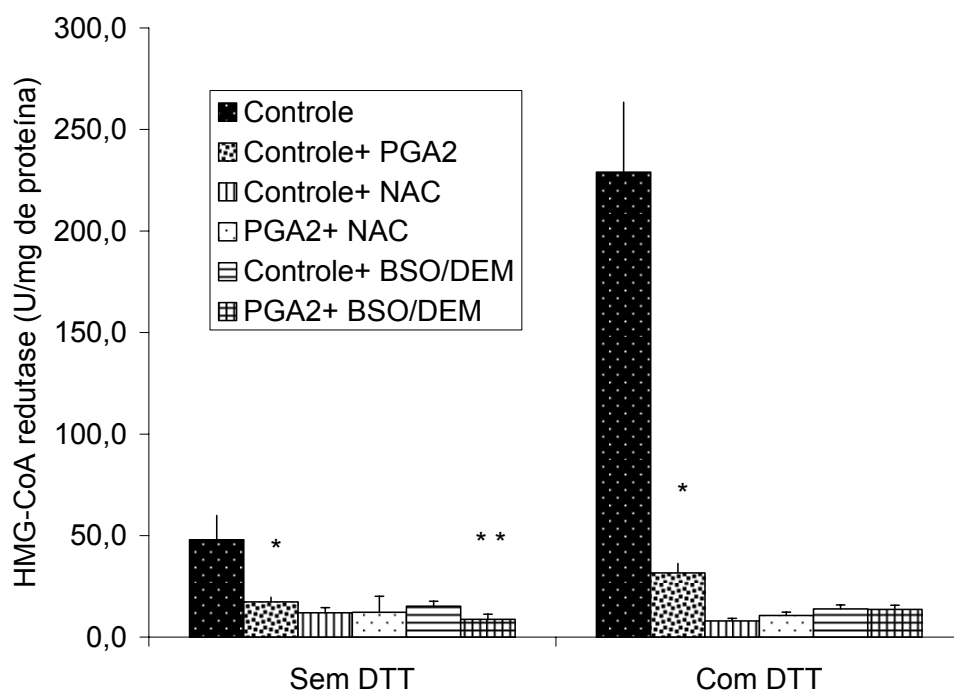


Figura 39: Atividade enzimática da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), em 1h de tratamento com PGA₂ 1 μ M, em macrófagos peritoneais nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o Grupo Controle e o Grupo Controle + PGA₂ 1 μ M ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o Grupo Controle+ BSO/DEM e o Grupo PGA₂ 1 μ M+ BSO/DEM ($p < 0,05$).

Os resultados referentes a 24h de tratamento podem ser visualizados nas Figuras 40 e 41, respectivamente. Em 24h de tratamento, a

atividade da HMG-CoA redutase foi reduzida em 56% no grupo Controle+PGA₂ com relação ao Controle, em macrófagos residentes do grupo ensaiado sem DTT. O tratamento das amostras de 24h com ditioneitol (DTT, 10 mM) no momento do ensaio reverteu completamente a inibição. Por outro lado, o tratamento conjunto com BSO/DEM e PGA₂ (que reduzem a GSH significativamente, $p < 0,05$), bloqueia a atividade da enzima na forma ativa, mas leva a um aumento de 2,6 vezes ($p < 0,01$) na quantidade total da redutase, sugerindo aumento na expressão da enzima, corroborando estudos anteriores deste laboratório.

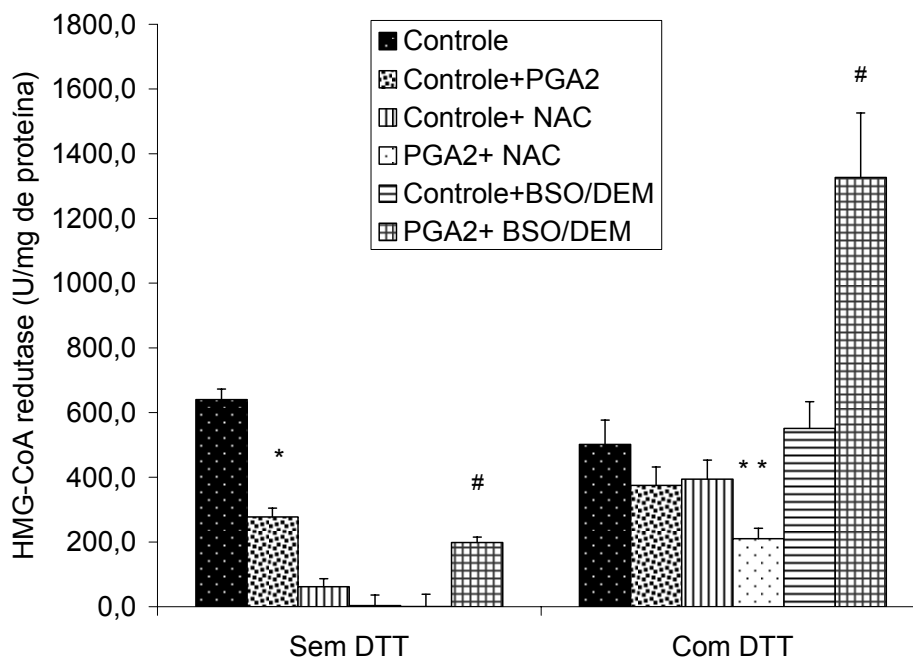


Figura 40: Atividade enzimática da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), em 24h de tratamento com PGA_2 $1\mu\text{M}$, em macrófagos peritoneais nos diferentes grupos experimentais. Resultados obtidos de 3 *wells* diferentes, em dois experimentos independentes. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa entre o Grupo Controle e o Grupo Controle + PGA_2 $1\mu\text{M}$ ou entre o grupo Controle+ NAC e PGA_2 $1\mu\text{M}$ + NAC ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre o Grupo Controle+ NAC e o Grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + NAC ($p < 0,05$).

diferença significativa entre o Grupo Controle+ BSO/DEM e o Grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + BSO/DEM ($p < 0,05$).

Comparando-se os grupos experimentais entre eles mesmos em 1h e 24h, nota-se que no ensaio sem DTT, a atividade da HMG-CoA redutase aumentou significativamente no período de 24h de tratamento, em relação ao de 1h, nos grupos Controle, Controle+ PGA_2 e PGA_2 + BSO/DEM ($p < 0,01$), enquanto os outros grupos não apresentaram variação. No entanto, quando se adiciona DTT ao ensaio, a atividade da HMG-CoA redutase de macrófagos peritoneais comparados entre si no período de 1h e 24h de tratamento, apresenta-se inalterada no grupo Controle e aumentada em todas os outros

grupos em 24h, comparados com 1h, de modo significativo ($p < 0,05$ para todos).

5.10- Expressão da proteína 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) em macrófagos peritoneais

Uma vez que a atividade da HMG-CoA redutase se mostrou drasticamente inibida pela presença de PGA_2 no meio, fez-se mister a investigação da expressão da enzima, para que se pudesse inferir se a diminuição da atividade pela prostaglandina era dada por ação de inibição da enzima, por ligação da PGA_2 nas cisteínas reativas desta, da expressão ou de ambas.

A expressão da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) em macrófagos peritoneais foi medida somente em 24h de tratamento, uma vez que se sabe que a expressão da enzima pode sofrer alterações que só se verificam nesse período de tempo. Sendo a expressão desta proteína microssomal bastante baixa, resolvemos optar pela imunoprecipitação seguida de SDS-PAGE, ao invés do *Western blot* convencional diretamente dos extratos celulares.

Os grupos experimentais foram demonstrados no desenho experimental no item 4.7 da Metodologia, para ambos os tempos de tratamento. Foram utilizadas 2×10^6 células por *well*. Os resultados foram obtidos de 2 experimentos independentes. As amostras foram carregadas com quantidade de proteína de $20\mu\text{g/mL}$. Também foi utilizado um grupo Controle Negativo da imunoprecipitação, já que as amostras foram preparadas por imunoprecipitação.

Após a imunoprecipitação, as amostras foram submetidas a *Western Blot*, utilizando-se anti-HMG-Coa redutase (primeiro anticorpo) e segundo anticorpo anti-camundongo marcado com peroxidase. As bandas foram quantificadas por digitalização de imagem. Para determinação da β -actina, foi utilizado o anti-actina (primeiro anticorpo) e segundo anticorpo anti-camundongo marcado com peroxidase.

Conforme mostra a Figura 41, todos os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa na expressão desta enzima, com exceção do grupo $\text{PGA}_2 + \text{BSO/DEM}$, que comparado com seu controle e com os outros

grupos, aumentou 2,6 vezes ($p < 0,01$) a expressão da HMG-CoA redutase, em 24h, o que é compatível com o aumento de atividade observado para o mesmo grupo.

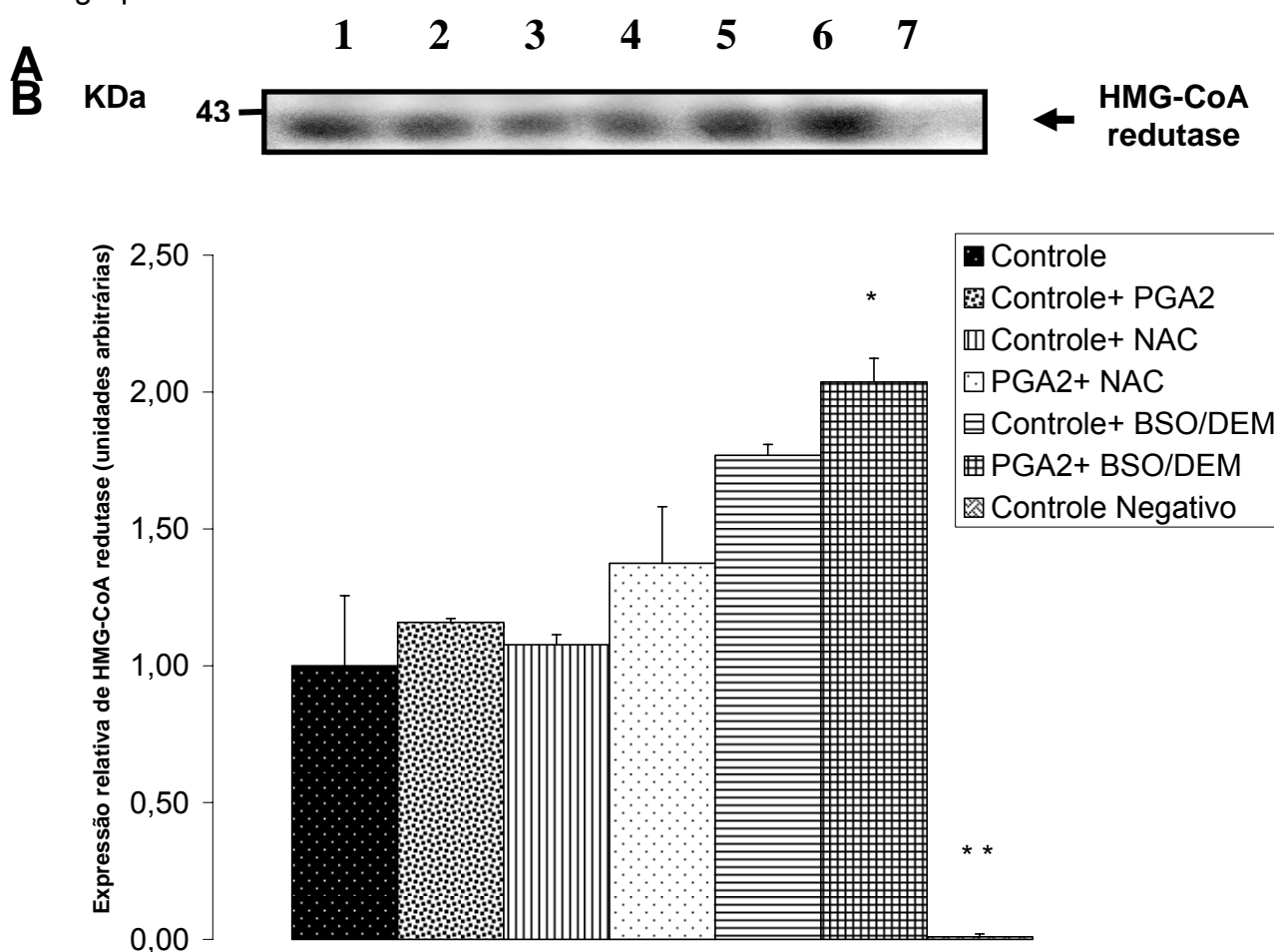


Figura 41: Expressão da proteína HMG-CoA redutase em macrófagos peritoneais controle e tratados por 24h com PGA_2 $1\mu\text{M}$. **A**- análise por immunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot*; 1- Controle; 2- Controle+ NAC; 3- Controle+ BSO/DEM; 4- Controle+ PGA_2 ; 5- NAC+ PGA_2 ; 6- BSO+ DEM/ PGA_2 ; **B** - valores arbitrários da expressão da HMG-CoA redutase. *Western blot* representativo de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

* diferença significativa entre o Grupo Controle+ BSO/DEM e o Grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + BSO/DEM ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre os grupos experimentais e o grupo Controle Negativo ($p < 0,05$).

5.11- Expressão da proteína CD36 em macrófagos peritoneais

Já está demonstrado que ocorre a inibição da incorporação de colesterol exógeno em macrófagos/ *foam cells* tratados com PGA_2 $1\mu\text{M}$ (Homem de Bittencourt Jr. et al, 2007). Assim, era importante determinar se ocorria *down-regulation* de receptores *scavenger* na membrana dos macrófagos peritoneais. Dentre os muitos receptores *scavenger* que fazem captação de colesterol do meio extracelular, um dos mais importantes e sabidamente envolvidos com o acúmulo de colesterol em macrófagos e, portanto, com a aterosclerose, é o receptor CD36.

A expressão do receptor *scavenger* CD36 em macrófagos peritoneais foi medida em 6h e 24h de tratamento, uma vez que a ação genômica de muitas drogas e hormônios só começa a ocorrer após, pelo menos, 90 minutos.

Os grupos experimentais foram demonstrados no desenho experimental no item 4.7 da Metodologia, para ambos os tempos de tratamento. Foram utilizadas 2×10^6 células por *well*. Os resultados foram obtidos de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

As amostras foram submetidas a *Western Blot*, utilizando-se anti-CD36 (primeiro anticorpo) e segundo anticorpo anti-camundongo marcado com peroxidase. As bandas foram quantificadas por digitalização de imagem. Para determinação da β - actina, foi utilizado o anti-actina (primeiro anticorpo) e segundo anticorpo anti-camundongo marcado com peroxidase.

Os resultados estão demonstrados na Figura 42. Os dados obtidos do tratamento dos grupos experimentais em 6h, mostraram que a expressão do receptor *scavenger* CD36 está diminuída no grupo PGA_2 + NAC, comparado ao seu controle ($p<0,05$). Os grupos Controle+ BSO/DEM e PGA_2 + BSO/DEM apresentaram expressões diminuídas deste receptor comparadas com todos os outros grupos ($p<0,05$).

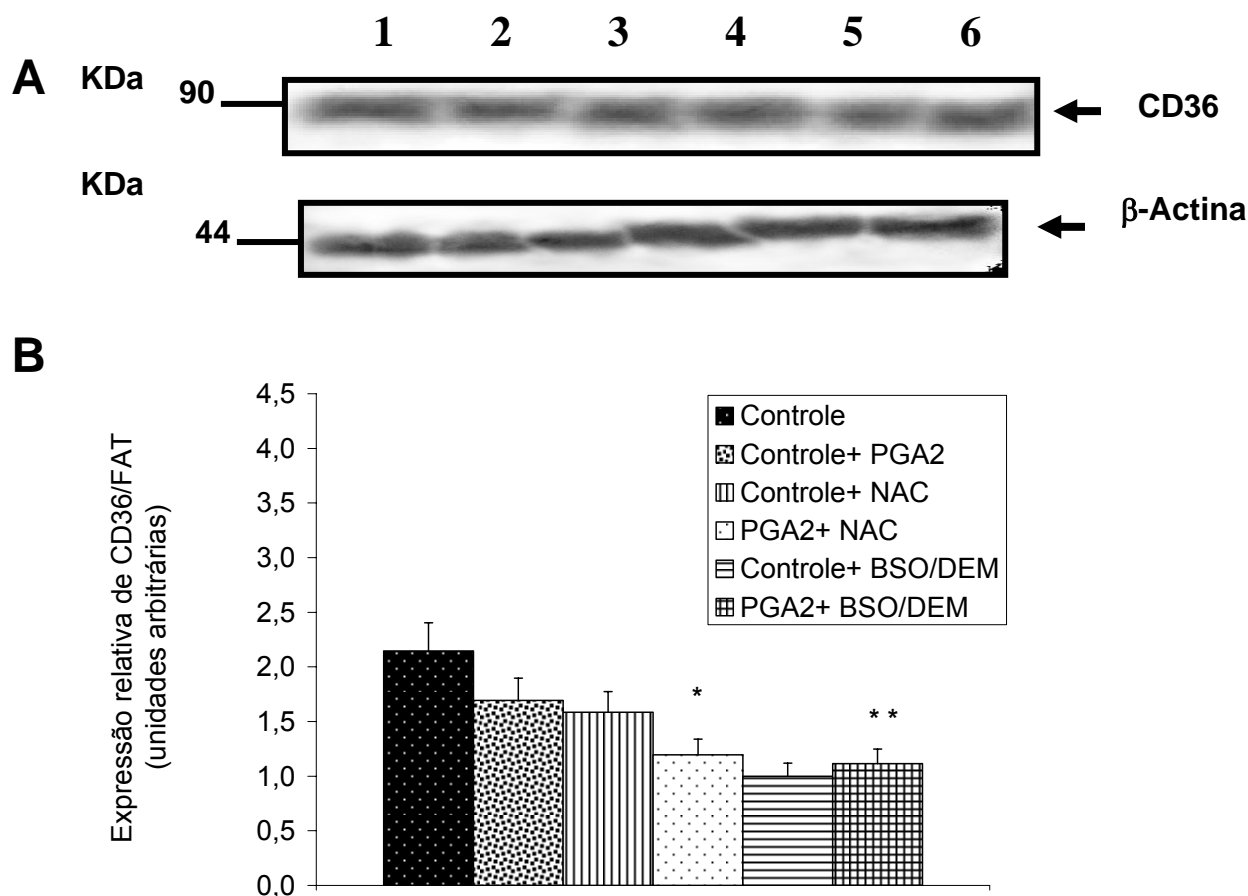


Figura 42: Expressão da proteína CD36. A expressão relativa da CD36 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da CD36 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 6h com PGA_2 $1\mu\text{M}$. **A**- análise por immunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot*; 1- Controle; 2- Controle+ NAC; 3- Controle+ BSO/DEM; 4- Controle+ PGA_2 ; 5- NAC+ PGA_2 ; 6- BSO+ DEM/ PGA_2 ; **B** - valores arbitrários da expressão de CD36. *Western blot* representativo de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

* diferença significativa entre o Grupo Controle+ NAC e o Grupo PGA_2 $1\mu\text{M}$ + NAC ($p < 0,05$).

** diferença significativa entre os Grupos Controle+ BSO/DEM e PGA_2 $1\mu\text{M}$ + BSO/DEM, comparados a todos os outros grupos ($p < 0,05$).

Quando se analisa a resposta celular em 24h de tratamento, nota-se que não há diferença significativa entre os grupos. Estes dados estão representados na Figura 43.

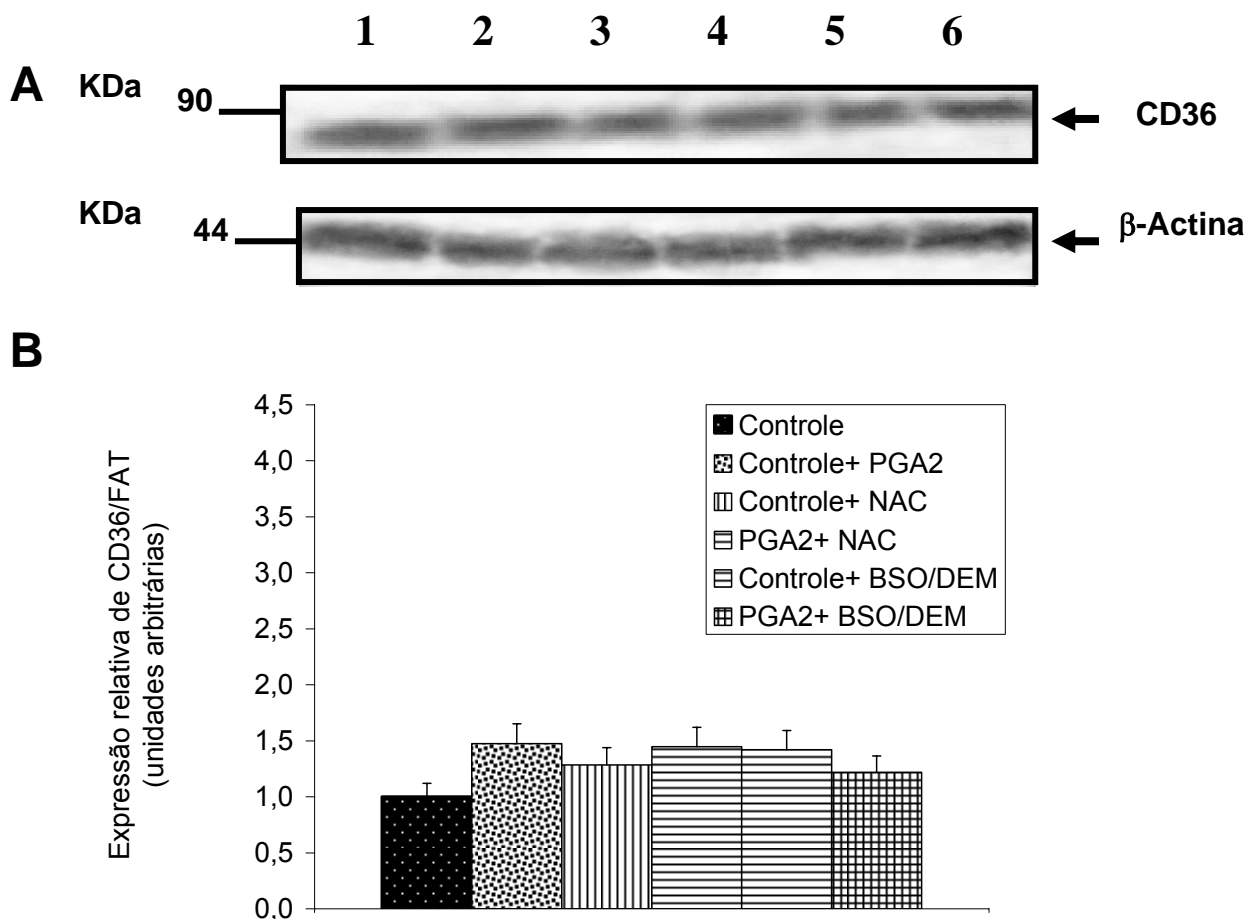


Figura 43: Expressão da proteína CD36. A expressão relativa da CD36 em termos da beta-actina foi obtida pela divisão da quantidade de pixels das bandas da CD36 pela quantidade de pixels das bandas de beta-actina de cada amostra em macrófagos peritoneais controle e tratados por 24h com PGA_2 $1\mu\text{M}$. **A**- análise por immunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot*; 1- Controle; 2- Controle+ NAC; 3- Controle+ BSO/DEM; 4- Controle+ PGA_2 ; 5- NAC+ PGA_2 ; 6- BSO+ DEM/ PGA_2 ; **B** - valores arbitrários da expressão de CD36. *Western blot* representativo de 2 experimentos independentes. Foram aplicadas amostras contendo $20\mu\text{g/mL}$ de proteína por *well*.

6. DISCUSSÃO

A aterosclerose relacionada a doenças cardiovasculares responde a, pelo menos, uma morte a cada três em países industrializados; nos Estados Unidos da América, estas mortes podem chegar a 40% de todas as mortes considerando-se todas as faixas etárias de todos os grupos (Mackay & Mensah, 2004). Entretanto, apesar de desordens no plasma e no metabolismo intracelular lipídico possivelmente serem características da aterosclerose, muitos aspectos do desequilíbrio lipídico que acompanham esta doença continuam sem respostas. Assim, compreender a correlação da aterosclerose com as alterações lipídicas requer investigação meticulosa de muitos aspectos do metabolismo destes lipídeos. Particularmente a este respeito, a presença de cisteínas reativas em fatores de transcrição e enzimas-chave deste metabolismo pode ditar, ou não, o acúmulo de colesterol intracelular e, assim, a progressão da aterosclerose (Gutierrez et al, 2007). Contudo, poucos estudos visaram aplicabilidade nestes achados. O grande efeito inibitório das CP-PGs na progressão da aterosclerose *in vivo* (Homem de Bittencourt Jr. et al, 2007) sugere uma nova conceituação da aterosclerose e de seu tratamento.

Foi demonstrado que o tratamento de macrófagos/ *foam cells*, *in vitro*, com PGA_2 em 24h provoca uma inibição da incorporação de colesterol e éster de colesterol exógeno, assim como diminuição da formação de colesterol endógeno, a partir da acetil- CoA (sugerindo inibição da atividade ou diminuição da expressão de HMG-CoA redutase, enzima chave da síntese de colesterol), diminuição da formação de ésteres de colesterol (sugerindo diminuição da atividade ou da expressão da ACAT) e uma diminuição de formação de colesterol livre (sugerindo diminuição da atividade ou da expressão da CEH). Ainda, em presença de PGA_2 o processo de exportação de colesterol a partir do meio intracelular está aumentado (Homem de Bittencourt Jr. et al, 2007). As enzimas envolvidas no metabolismo do colesterol, no entanto, além dos processos de regulação metabólica classicamente descritos, podem ser também reguladas pelo estado redox, já que apresentam cisteínas reativas, como dito anteriormente. Portanto, fez-se mister o estudo destas rotas metabólicas, tratando-as com PGA_2 e comparando os resultados obtidos com modificações do potencial redox intracelular destas.

Conforme visto, os macrófagos/ *foam cells* e os macrófagos peritoneais eram obtidos de ratos Wistar. Então, além de pesquisarmos o comportamento destas células entre elas, também comparamos os resultados obtidos em macrófagos de ratos com macrófagos humanos da linhagem U937, uma vez que vários trabalhos científicos que estudam diversas doenças, incluindo a aterosclerose, utilizam-se deste último tipo, pela facilidade de obtenção, cultura e tratamento destas células, além de elas responderem como ocorre *in vivo* na aterosclerose (Erdogan et al, 2006; Hammad et al, 2006; Vogel et al, 2005).

O primeiro experimento feito foi a medida da atividade da Acil-CoA: Colesterol O-Aciltransferase (ACAT) em macrófagos/ *foam cells*, para que se pudesse avaliar o que ocorria nesta rota bioquímica quando estas células eram tratadas com PGA_2 . Esta é a enzima que primeiramente será discutida.

A transformação dos macrófagos peritoneais em *foam cells*, pelo tratamento com LDL oxidada, elevou em 280% a atividade ACAT em relação aos controles, conforme visto em nosso trabalho. Sabe-se que a LDL oxidada representa um fator adicional capaz, por si só, de introduzir perturbação na via de síntese de lipídios, que não é influenciada pelo estado redox do macrófago (Bravo et al, 2001). Também é sabido que o desenvolvimento de *foam cells* poderia ativar o processo de formação de vesículas com ACAT1 pelo retículo endoplasmático (Sakashita et al, 2000). Entretanto, o tratamento destas células com PGA_2 , por 24h, na concentração de $1\mu\text{M}$, reduziu em 33% a atividade desta enzima. Na concentração de $20\mu\text{M}$, a PGA_2 parece ser menos efetiva (inibição estatisticamente não significativa) em macrófagos/ *foam cells*.

A regulação das enzimas envolvidas no metabolismo intracelular do colesterol em macrófagos é essencial para manutenção do equilíbrio lipídico do macrófago: a HMG-CoA redutase fazendo a síntese endógena do colesterol; a CEH formando colesterol livre (para que este possa ser exportado da célula) e a ACAT gerando ésteres de colesterol (que é a forma de armazenamento intracelular). Então, as drásticas alterações na atividade da ACAT em macrófagos/ *foam cells* tratados com PGA_2 por 24h, tornou necessário a análise da atividade da mesma sob o efeito dos agentes oxidantes e antioxidantes em macrófagos peritoneais, em diferentes tempos (1h ou 24h), uma vez que modificações intracelulares na atividade ou expressão destas enzimas podem promover o acúmulo de ésteres de colesterol em macrófagos

vasculares, sendo este o motivo da corrida científica em busca de drogas que atuem eficazmente sobre elas (Ru Su et al, 2005). Diversos estudos demonstram a perturbação que oxidantes ou antioxidantes podem gerar no metabolismo lipídico. Curiosamente, parece que a natureza possui uma maneira singular de regular o metabolismo lipídico, que consiste na presença de resíduos de cisteína reativas nas enzimas-chave desta rota e nos fatores de transcrição, que prontamente respondem a alterações do equilíbrio redox, e era justamente nisto que a hipótese deste trabalho estava baseada (Gutierrez et al, 2007).

A atividade da ACAT1, presente em macrófagos é severamente inibida por vários reagentes modificadores de tióis, incluindo o ácido sulfônico p-cloromercúriobenzeno, sugerindo que algum resíduo de cisteína (ou vários) devem estar perto ou no sitio ativo da enzima. A cisteína 467 é o maior alvo do o ácido sulfônico p-cloromercúriobenzeno e sua ligação com esta substância leva a inativação da ACAT1 humana (Lu et al, 2002). Interessantemente, ACAT1 de macrófagos contém nove resíduos críticos de cisteínas, que sugerem a grande sensibilidade desta enzima a modificações de estado redox (Schissel et al, 1995; Guo et al, 2005), enquanto alterações na cisteína 467 levam à completa inativação da ACAT (Lu et al, 2002). Embora a estrutura e a função da ACAT estejam bem definidas, os fatores que a regulam ainda não estão claros. A disponibilidade de colesterol livre e de ácidos graxos, citocinas e homônios, a concentração de HDL plasmática, a regulação alostérica e a regulação pós-transcricional são sugeridas na regulação da ACAT (Li & Pownall, 2000; Panousis & Zuckerman, 2000; Xie et al, 2002; Lee & Carr, 2004). Como a PGA_2 possui um centro eletrofilico e a ACAT possui cisteínas, foi testada a hipótese de que o estado redox regularia sua atividade, assim como a PGA_2 . Observou-se que em macrófagos peritoneais, tratados com oxidantes e antioxidantes, o tratamento com a PGA_2 ($1\mu M$) provocou um aumento significativo na atividade da ACAT em 1h, quando as células controle são comparadas com o grupo controle+ PGA_2 , e uma tendência ao aumento em 24h (não significativo). No entanto, os perfis encontrados para o grupo controle e grupo PGA_2 em presença de BSO/DEM no meio e grupo controle e em presença de NAC no meio, em 1h de tratamento, não variaram significativamente. Já em 24h de tratamento, a depleção de GSH pela

presença de BSO/DEM no meio, juntamente com a PGA_2 , promoveu redução significativa da atividade da ACAT, comparando-se os grupos Controle+BSO/DEM e PGA_2 + BSO/DEM, enquanto que o tratamento com NAC potencializou-a, se se comparar Controle+ NAC e PGA_2 + NAC.

Comparando-se os tipos celulares estudados, é importante ressaltar que o aumento da atividade da ACAT em macrófagos peritoneais é um dado completamente inesperado, já que a PGA_2 é eletrofílica e inibe dramaticamente a atividade da ACAT em *foam cells*, conforme discutido. Em uma primeira análise, estes dados parecem sugerir que a PGA_2 agiria acumulando ésteres de colesterol em macrófagos peritoneais, levando à aterosclerose e não diminuindo o acúmulo, conforme demonstrado por Homem de Bittencourt Jr. e colaboradores (2007). Porém, estudando-se os resultados com mais cautela, nota-se que, em realidade, o perfil encontrado na atividade da ACAT em macrófagos/ *foam cells* foi semelhante ao observado em macrófagos peritoneais, em meio pró-oxidante, pois, ao que parece, a oxidação do meio intracelular gera um microambiente que é semelhante àquele obtido pela LDL oxidada. Assim, em ambos os tipos celulares, quando se adiciona a PGA_2 na concentração de $1\mu M$, ocorre inibição da atividade da ACAT. Curiosamente, estes dados vêm de encontro com as observações da literatura, que demonstram que a depleção de GSH (meio oxidado) leva à inibição da formação de ésteres de colesterol em células cancerígenas humanas (Madhesh et al, 1998) e em macrófagos (Bravo et al, 2001). Para corroborar com os resultados obtidos, notou-se que a proteção gerada pela adição de um antioxidante como o NAC, faz com que a atividade da ACAT aumente, frente à ação da PGA_2 . Isto sugere que a PGA_2 só inibe a atividade da ACAT em meio oxidado realmente. Possivelmente isto ocorre porque o aumento de pró-oxidantes na célula leva à depleção de GSH, sobrando, desta forma, menos glutathiona para reagir com a PGA_2 . Assim, esta fica livre e em maior quantidade, quando comparada com os outros grupos experimentais, para reagir com a cisteína reativa da ACAT, por adição nucleofílica, gerando uma ligação covalente com a enzima e inibindo sua atividade. Em situação contrária, quando se tem aumento de antioxidantes, sobra mais GSH livre e NAC para reagir com a CP-PG, anulando o efeito biológico desta sobre a atividade da enzima. Gesquiere e colaboradores, em 1999, demonstraram, *in*

vitro, que o estresse oxidativo, induzido por azobis- amidinopropano em células da musculatura lisa, fez com que estas células apresentassem acúmulo de colesterol, aparentemente resultado de um aumento da biossíntese de colesterol e sua esterificação, uma diminuição da colesteril-éster hidrolase intracelular e uma redução da exportação de colesterol. Todos estes parâmetros se apresentaram apostos quando foram usados antioxidantes. Existe, ainda, outra possibilidade: como a medida da atividade da ACAT nas células foi indireta, e não nos microssomos (isto é, as células foram tratadas com oleato de colesterol marcado e a incorporação do ^{14}C nos ésteres de colesterol foi avaliada), é sempre possível que os efeitos contraditórios possam ser devidos a uma enorme redução na hidrólise de ésteres de colesterol nestas células, o que já foi demonstrado (Homem de Bittencourt Jr. et al, 2007). Portanto, não se pode descartar a possibilidade de que o acúmulo de ésteres de colesterol, neste caso, possa ser devido a uma redução na hidrólise mediada pelas colesteril-éster hidrolases.

Ainda mais curiosos ficam estes resultados quando comparamos o que ocorre com os grupos experimentais de macrófagos peritoneais, em relação a eles mesmos em 1h e 24h. Viu-se que em 24h a atividade da ACAT aumenta significativamente em todos os grupos, comparado ao que se tinha em 1h, com exceção dos grupos que foram tratados com BSO/DEM. Sabe-se que as células tentam se adaptar frente a substâncias oxidantes e antioxidantes, que geram modificações de seu potencial redox. Realmente, este quadro fica claro em 24h, mais do que numa situação aguda (1h), já que há aumento da atividade da ACAT, inclusive no controle não tratado, demonstrando que o próprio estresse pela cultura celular a que os macrófagos foram submetidos, mesmo tentando-se manter uma situação semelhante à fisiológica, gera modificações no estado redox destas células. Estes dados vêm de encontro com o que se verifica quando se analisam os resultados de glutathione oxidada e estado redox (que aumentam quando se comparam os mesmos grupos entre si em 1h e 24h em quase todos os grupos).

Como os resultados iniciais obtidos foram muito interessantes e com comportamentos completamente inesperados nos dois tipos celulares, viu-se que, para que se tivesse certeza do controle redox da enzima, fazia-se mister o estudo do estado redox das células.

A homeostase do estado redox intracelular é regulada por moléculas contendo grupos tiol (como a glutatona e tiorredoxina) e a manutenção desta homeostasia (isto é, o balanço apropriado entre oxidantes e antioxidantes) é essencial para a sustentação das propriedades funcionais celulares. No entanto, este balanço é perpetuamente ameaçado por fatores externos, como o aumento de espécies ativas de oxigênio durante a inflamação ou pela exposição destas células a xenobióticos, que são metabolizados depletando os antioxidantes intracelulares (Kim & Surh, 2006). Ao longo da evolução, os seres vivos tiveram que desenvolver um mecanismo capaz de enfrentar as situações de estresse oxidativo, criando um sistema de defesa que permitisse recuperar o balanço redução/ oxidação, ou balanço redox celular (Monks et al, 1990). Várias são as substâncias que participam ativamente deste sistema de defesa, por exemplo: a enzima superóxido dismutase (SOD) - responsável pela destruição do radical superóxido, formando peróxido de hidrogênio; a catalase (CAT) - enzima responsável pela redução do peróxido de hidrogênio à água; a glutatona peroxidase (GPx) – enzima responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio à água e hidroperóxidos orgânicos em álcool; vitaminas (E e C), que são *scavenger* de radicais livres, e outros. Dentre as defesas contra o estresse oxidativo, uma das mais importantes é a glutatona (GSH), que é um tripeptídeo composto por um glutamato, uma glicina e uma cisteína, estando presente em todas as células dos mamíferos. A glutatona é um potente detoxificante, que permite ao organismo livrar-se de radicais livres, toxinas e poluentes, formando compostos solúveis (através da ligação com o grupo sulfidríla existente na cisteína) que podem ser excretados (Jaeschke, 1990).

Diversas funções celulares são influenciadas pelo potencial redox intracelular, como cascatas de sinalização ativadas por estresse oxidativo, apoptose, indução de permeabilidade mitocondrial, liberação de fatores de amplificação da morte mitocondrial, ativação das caspases intracelulares, dano ao DNA e transcrição de genes (Le Bras et al, 2005; Gayarre et al, 2005; Kim & Surh, 2006). O mecanismo pelo qual a transcrição de genes específicos é regulado pelo estado redox em células eucarióticas é bastante complexo, porém, pesquisas das últimas décadas sugerem que fatores de transcrição sensíveis ao estado redox têm papel importante neste processo (Arrigo, 1999).

As prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) das séries A e J têm como característica principal a presença de uma carbonila α,β -insaturada (Gutierrez et al, 2007), conforme descrito anteriormente. Isto faz com que estas moléculas sejam extremamente reativas, tornando-as capazes de modular as funções celulares por múltiplos mecanismos, incluindo a modificação covalente de resíduos de cisteína pela adição de Michael (Gayarre et al, 2007). Além disto, as CP-PGs podem formar ligações covalentes com grupamento tiol, presente na glutathione e em proteínas. Muitas destas proteínas já foram identificadas e as modificações funcionais importantes que a ligação destes prostanóides geram, quando se ligam a grupamentos sulfidrilas nas proteínas, contribuem para seus efeitos biológicos (Gayarre et al, 2005). Alguns fatores de transcrição e moléculas sinalizadoras relacionadas possuem resíduos de cisteína que servem como sensores redox e a oxidação destas cisteínas podem modular suas funções fisiológicas. Através de modificações covalentes, a 15d-PGJ₂, outra CP-PG, por exemplo, pode oxidar resíduos críticos de fatores de transcrição sensíveis ao estado redox ou seus reguladores (Kim & Surh, 2006).

Embora concentrações fisiológicas das CP-PGs não sejam estressantes para as células, dependendo da dose empregada e do ambiente intracelular, estes prostanóides podem bloquear a síntese de proteínas, causar dano no citoesqueleto e ser extremamente tóxicos para a célula (Kim & Surh, 2006; Gutierrez et al, 2007)

Desta forma, várias linhagens celulares diferentes foram utilizadas com vistas de comparação entre as respostas destas frente a agentes redutores e oxidantes e à PGA₂, em relação ao estado redox e ao metabolismo lipídico. Assim, começou-se testando macrófagos/ *foam cells* e em seguida macrófagos peritoneais e da linhagem U937. Os estudos destes tipos celulares, no entanto, devem ter prosseguimento.

É importante ressaltar que os efeitos das CP-PGs dependem de sua captação pelas células e este fenômeno pode ser tão efetivo que se torna difícil detectar estas substâncias *in vivo* ou em cultura de células (Gutierrez et al, 2007). Passaremos a discutir, então, o potencial redox intracelular.

O estado redox celular dos vários grupos experimentais foi testado com agentes oxidantes (BSO/DEM e a própria PGA₂, já que esta CP-PG gasta a

GSH intracelular, induzindo estado de estresse oxidativo) e com antioxidantes (NAC), em diferentes tempos (1h ou 24h para medidas de estado redox celular e 6h e 24h para medida de expressão de proteínas envolvidas com o controle do estado redox), e a resposta celular frente a estes agentes perturbadores foi analisada.

Sabe-se que a PGA_2 é eletrofílica e, portanto, pode ser considerada um agente oxidante, nos termos acima descritos. Como tal, pode reagir com a glutathiona (GSH), diminuindo seus níveis livres intracelularmente. Estudos demonstram que células tratadas com 15d-PGJ₂, outra CP-PG, tem seus níveis de glutathiona reduzida celular e a atividade da GSPx diminuídos (Kim & Surh, 2006). Realmente, CP-PGs são rapidamente conjugadas com GSH pela glutathiona-S- transferase (GST), formando conjugados de GSH- CP-PGs (Homem de Bittencourt Jr. et al, 1998a; b). Após serem adicionadas à cultura de células, concentrações não-tóxicas de CP-PGs diminuem os níveis de GSH intracelular, levando as células a uma desbalanço redox (Kondo et al, 2001), o que, por si só, é um importante sinal regulatório que leva a ativação de fatores de transcrição sensíveis ao potencial redox (Dröge, 2002). Genes que fazem a detoxificação celular ou enzimas antioxidantes são sabidamente ativados por eletrófilos e espécies ativas de oxigênio, como parte da resposta adaptativa da sobrevivência celular. Esta resposta coordenada é regulada através do elemento responsivo a antioxidantes/ eletrófilos (ARE/ EpRE – do inglês *antioxidant/ electrophile response element*), localizado no promotor de genes que geram antioxidantes. O Nrf2 (do inglês, *nuclear factor erythroid*) é um dos principais fatores de transcrição ligantes do ARE/ EpRE. Assim, sempre que a célula é exposta a estresse oxidativo ou eletrófilos, o Nrf2 é translocado para o núcleo, induzindo a expressão de proteínas antioxidantes como a glutathiona-S-transferase (GST) e a HSP70, entre outras. A 15d- PGJ₂, por exemplo, ativa o Nrf2 por se ligar covalentemente ao Keap1 (do inglês, *Kelch-like ECH-associated protein-1*), que é a proteína repressora do Nrf2, permitindo que este último faça a transcrição de antioxidantes (Kim & Surh, 2006). Adicionalmente, a depleção da glutathiona mediada por CP-PGs provoca um aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como a γ - glutamilcisteína sintetase (γ -GCS, enzima-chave de regulação da síntese GSH), GST (que protege a célula por conjugar a glutathiona às CP-PGs), e MRP1 (bomba de glutathiona -

bomba GS-X, que gera a extrusão de eletrófilos conjugados com a glutationa, do meio intracelular) (Gutierrez et al, 2007). A conjugação intracelular de CP-PGs com moléculas de GSH e sua exportação pela bomba GS-X na forma de GS-conjugados pode ser uma estratégia celular importante na manutenção da homeostase. O primeiro passo na inativação de muitas substâncias endógenas e exógenas dá-se pela conjugação com moléculas de GSH (Honn & Marnett, 1985; Gouin et al, 1986) e o papel desse processo pode ser inferido pela importância das GST na detoxificação contra substâncias eletrofílicas (Hales & Huang, 1994; Zhang & Das, 1994). No caso da PGA_2 , a conjugação com moléculas de GSH abole todo seu caráter eletrofílico e, portanto, seus efeitos biológicos sobre as células. O segundo passo no processo de eliminação de substâncias, como as CP-PGs, seria, então, a exportação destas na forma de GS-conjugados, como sugerido anteriormente (Ishikawa, 1992). Esta etapa é capital no processo de defesa celular contra eletrófilos porque desloca o equilíbrio da reação catalisada pelas GST para a direita, no sentido da eliminação de mais moléculas do eletrófilo. A expressão da MRP/ bomba GS-X pode ser um importante agente de modulação da atividade biológica das CP-PGs, através da exportação das mesmas para o espaço extracelular. O papel fisiológico destas proteínas pode variar de uma função protetora contra a toxicidade química e estresse oxidativo (Cole & Deeley, 1998) à regulação do estado redox e de ativação celular (Homem de Bittencourt Jr. et al, 1998a; b). Fica claro que a lipogênese e o estado redox são os dois lados de uma mesma moeda, uma vez que são controlados pelas vias do Keap1/ Nrf2/ ARE, como discutido. Devido a isto, a ativação das rotas bioquímicas da lipogênese ou a mudança do potencial redox, no metabolismo da GSH, em sua síntese (γ -GCS), sua regeneração (por ação da Glutathione Redutase) e sua extrusão (GST e MRP1), agindo como um todo, protegem o meio intracelular do acúmulo de eletrófilos, espécies ativas de oxigênio e de GSSG. Juntas, estas estratégias sustentam o poder redutor necessário para a execução da biossíntese lipídica (Gutierrez et al, 2007). Assim sendo, para uma análise mais detalhada, deve-se levar em consideração, não só o potencial redox celular, mas também a capacidade da célula de exportar conjugados de glutathione, via MRP1. Conforme discutido anteriormente, as análises enzimáticas e o estado redox foram avaliados em 1h e 24h, enquanto as expressões das proteínas

foram observadas às 6h e 24h. Em 6h se tem o máximo de expressão protéica para a maioria ds proteínas estudadas, por isto, este período foi o escolhido.

Neste trabalho observou-se que a resposta dos macrófagos peritoneais frente à PGA_2 fez com que o potencial redox diminuísse, isto é, aumentasse a concentração de GSH em 1h (provavelmente aumentando só a atividade de enzimas antioxidantes), uma vez que os resultados obtidos demonstram que não houve modificação de expressão da bomba de glutathiona (MRP1) em até 6h após o tratamento das células. Em 24h, este perfil encontrado foi mantido, isto é, a concentração de GSH também se apresentou aumentada, possivelmente por aumento da atividade de enzimas antioxidantes e também da expressão de enzimas antioxidantes, tanto em macrófagos peritoneais quanto da linhagem U937. Sabe-se que MRP1 é freqüentemente co-induzida com a γ -GCS em situações de estresse oxidativo (Kuo et al, 1998), como neste caso. Realmente, neste período de tratamento, a expressão da MRP1 encontrou-se aumentada no grupo tratado com PGA_2 , o que demonstra a adaptação celular frente ao estresse oxidativo. Similarmente como ocorre com a γ -GCS e com a GST, a expressão de MRP1 requer a ativação da rota Nrf2/ARE, que é promovida pela depleção de GSH dependente de CP-PGs (Kim & Surh, 2006). Estas alterações levam tempo para ocorrer (24h) e explicam porque ocorre um aumento na concentração de GSH, restabelecendo o equilíbrio redox intracelular, após a ação das CP-PGs (Homem de Bittencourt Jr et al, 1998c). Os resultados encontrados vêm ao encontro de achados da literatura que, conforme visto, inferem aumento de atividade e/ou de expressão de antioxidantes e formação de GS-CP-PGs que podem ser exportados pelas células, em situações de estresse e explicam por que a GSH aumenta em células tratadas com CP-PGs, embora estas sejam eletrofílicas.

O NAC, como previsto, uma vez que é um antioxidante, em 1h ou 24h de tratamento em ambos os tipos celulares, manteve a relação $[GSSG]/[GSH]$ ou a diminui, isto é, diminui o estresse oxidativo em relação ao controle; em até 6h ou 24h após o tratamento, não havia modificação da expressão da MRP1, porém em 24h o aumento de GSH já era visto. A combinação de NAC com PGA_2 , entretanto, ou não é diferente do Controle+ NAC, além de não haver alteração na expressão da MRP1, ou a oxidação intracelular é maior, em 1h ou 24h para ambos os tipos celulares observados, mesmo estando a expressão

desta bomba aumentada em macrófagos peritoneais, em 24h, possivelmente porque o NAC não consegue neutralizar o efeito oxidante da PGA_2 . Essa possibilidade encontra-se em estudo atualmente no Laboratório de Fisiologia Celular, no Departamento de Fisiologia da UFRGS .

Os grupos celulares tratados com oxidantes, o BSO e o DEM, apresentaram intensa oxidação em macrófagos peritoneais e U937, principalmente em 1h; esta combinação, no entanto, não apresentou o efeito supressor esperado em 24h, provavelmente por adaptação celular ao estresse oxidativo. Destaca-se o fato de que estes grupos experimentais testados não apresentaram modificação na expressão da bomba de glutathione em até 6h e em 24h, efeito este que se esperaria aumentado, principalmente nos grupos tratados com BSO e DEM, que são potentes oxidantes. Provavelmente por falta desta indução, dentre outros fatores, é que ocorre intensa oxidação dentro da célula. A combinação de PGA_2 com BSO/DEM fez com que ocorresse uma grande redução do potencial redox, possivelmente por efeito de ativação de enzimas antioxidantes intracelulares, uma vez que a bomba de glutathione também não aumentou sua expressão nos grupos em 6h e 24h. Em realidade, no que diz respeito ao estado redox, notou-se que o perfil de alteração obtido foi muito semelhante entre os macrófagos peritoneais e da linhagem U937, embora os valores basais de ambos os grupos sejam diferentes.

Alterações no potencial redox, como as obtidas nos nossos grupos celulares pelo tratamento das células com oxidantes e antioxidantes, além da PGA_2 , levam a uma série de respostas celulares que também foram estudadas. Processos oxidativos celulares têm papel fundamental na resposta inflamatória através da ativação de quinases de estresse (como a quinase N-terminal do c-Jun quinase - JNK, entre outras) e fatores de transcrição sensíveis ao estado redox, como NF- κ B e ativador proteína-1 (AP-1), os quais diferencialmente regulam os genes mediadores pró-inflamatórios e genes protetores antioxidantes, como a γ -GCS (Rahman & Macnee, 2000).

Quando macrófagos são retirados de seu meio natural (o organismo) e são colocados em cultura, o próprio mecanismo de manipulação destas células sensíveis a modificações do meio, pode gerar estresse nestas últimas, o que é

bem conhecido. Também está bem descrito que estas células podem, em situações de modificação redox, ativar o fator de transcrição NF- κ B.

Segundo Dröge (2002), o NF- κ B é um fator de transcrição capaz de responder diretamente ao estresse oxidativo gerado em certos tipos de células eucarióticas. Este último tem papel proeminente na regulação gênica das respostas imunológica e inflamatória (Galter et al, 1994). Mas, mais do que isto, modificações redox num geral ajudam a regular a ativação ou inativação do NF- κ B, pois em baixos níveis de GSSG, o NF- κ B está inibido, enquanto que em células muito oxidadas (altos níveis de GSSG), o NF- κ B é também oxidado, não conseguindo ligar-se à fita de DNA para transcrever genes (Dröge et al, 1994; Haddad et al, 2004).

A literatura mostra que as CP-PGs modificam fatores de transcrição e seus ativadores por, pelo menos, quatro importantes vias que estão intimamente relacionadas a aterosclerose e inflamação: NF- κ B, AP-1, Nrf2 e PPAR γ . Este último, não será discutido, pois sua ativação dá-se somente pela família das prostaglandinas J (Kim & Surh, 2006; Forman et al, 1995; Kliwer et al, 1995).

Alguns fatores de transcrição e moléculas sinalizadoras associadas possuem resíduos de cisteína, podendo ser moduladas pela ação de eletrófilos, dentre eles, as CP-PGs. Um exemplo disto é o NF- κ B, que possui resíduo de cisteína e reage covalentemente com 15d-PGJ₂. As CP-PGs também inibem a ativação do NF- κ B, por inibição direta das I κ B quinases, através da reação das CP-PGs com resíduos cisteína destas quinases, os quais são necessários para fosforilação e destruição dos I κ B e conseqüente ativação e atividade ligante ao DNA do NF- κ B (Rossi et al, 2000). As CP-PGs possuem efeitos antiinflamatórios bem descritos, e é sabido que a 15d-PGJ₂ atenua a expressão de mediadores pró-inflamatórios por inibir o NF- κ B em monócitos e macrófagos (Kim & Surh, 2006). Uma vez que, a ativação de NF- κ B dispara a transcrição de inúmeros genes envolvidos com a resposta imunológica, proliferação e diferenciação celular, o bloqueio da ativação do NF- κ B mediado pelas CP-PGs pode ter papel significativo no metabolismo lipídico de macrófagos.

Outras evidências mostraram existir uma íntima relação entre a resposta celular ao desbalanço redox e a atividade das HSP (Proteínas de Choque Térmico), sendo estas proteínas consideradas como marcadores de estresse celular. Assim, quando o organismo é submetido a situações estressantes, as HSP são utilizadas no processo de reparo de diferentes tipos de dano (Santoro et al., 1996). Os efeitos biológicos mediados por CP-PGs estão associados com a indução de proteínas de choque térmico de 72 kDa (HSP70), através da ativação dos fatores de transcrição de choque térmico (HSF), que passam de uma forma monomérica não-ligante de DNA, para uma forma trimérica, transcripcionalmente ativa, que se liga a seu sítio de controle no promotor dos genes para o choque térmico (HSG, do inglês, *Heat Shock Genes*) (Santoro & Amici, 1989). O efeito protetor das HSP também está relacionado ao fato de estas proteínas inibirem a ativação do NF- κ B, uma vez que as HSP ligam-se à IKK γ e ao complexo NF- κ B/I κ B (Chen et al, 2004). Assim, a ação antiinflamatória das CP-PGs está relacionada a interrupção da via do NF- κ B por ativação de HSP70 (Santoro, 2000).

Visto que muitos parâmetros inferem desbalanço redox, como medida ainda essencial para uma melhor visualização da resposta celular frente ao tratamento proposto, visou-se determinar a expressão da família das HSP70 nos distintos tipos celulares estudados.

O tratamento de macrófagos peritoneais por 6h só promoveu a expressão da HSP70 induzível (HSP72), isto é, a expressão da proteína que aumenta somente em situação de estresse celular, conforme visto (Feder & Hofmann, 1999). A resposta obtida em 6h e 24h de tratamento de macrófagos peritoneais com PGA₂ veio ao encontro com o que está descrito na literatura: houve indução significativa de produção de HSC73 (em 24h) e de HSP72 (em 6h e 24h), já que sabidamente as CP-PGs inibem a ativação do NF- κ B também por ativar os fatores de transcrição de choque térmico (Rossi et al, 1997; Santoro, 2000). Uma vez que a expressão de HSP inibe a ativação do NF- κ B, que promove inflamação, nota-se claramente a ação protetora da PGA₂ sobre a célula. Este mesmo perfil é encontrado quando se analisam macrófagos/ *foam cells*, em 24h de tratamento. Tanto na concentração de 1 μ M, quanto de 20 μ M, a PGA₂ provoca um aumento na expressão da HSP72 nestas *foam cells*,

demonstrando o efeito benéfico que pode ser gerado a partir da ação destes prostanóides. Além dos fatores citados, Kondo e colaboradores (1993) sugeriram que a síntese de GSH, através da γ -GCS e o transporte de metabólitos de GSH são responsáveis ao choque térmico, verificando aumento da expressão de ambos os mRNAs, da γ -GCS e de proteínas de choque térmico (HSP).

A adição de NAC ao meio, que é sabidamente um antioxidante, também gerou aumento de expressão da HSP72 em até 6h e de HSC73 e HSP72 em 6h e 24h. Nota-se que esta adição gera um desbalanço redox que altera HSP, e sabe-se que antioxidantes que contenham cisteínas (como o NAC) inibem a ativação do NF- κ B, o que explica porque algumas terapias com antioxidantes são utilizadas para o tratamento da aterosclerose (Gutierrez et al, 2007); muito possivelmente esta inibição observada esteja ocorrendo pelo aumento da HSP, que e realidade é uma resposta que protege a célula. Além disso, sabe-se que a NAC consegue elevar os níveis de GSH em situação de estresse oxidativo mas não em células não-estressadas (Cotgreave et al., 1991). Os grupos tratados com BSO/DEM, que são oxidantes, não apresentaram alteração de expressão em 6h e aumentaram sua expressão em de HSC73 e HSP72, já que é gerado desbalanço redox, como discutido anteriormente.

Viu-se que a combinação PGA_2 + NAC podia gerar estresse oxidativo, ao contrário do que se esperaria, uma vez que a ação do NAC pode não estar sendo suficiente para anular a PGA_2 . Assim, este estresse celular pode provocar um aumento de expressão de HSP72, que é induzida na célula como tentativa de proteção do macrófago, que tenta se adaptar a esta situação adversa. Ao mesmo tempo, os grupos tratados com os oxidantes BSO, DEM e PGA_2 não apresentaram uma oxidação intracelular muito acentuada, como esperado, mostrando a capacidade de adaptação celular, novamente, desta vez, provavelmente devido ao aumento de atividade e/ou expressão de enzimas antioxidantes, já que a região promotora da γ -GCS, por exemplo, contém subunidades que são ativadas pela AP-1 e pelo NF- κ B, que são regulados pelo estresse oxidativo (Rahman & Macnee, 2000; Rahman et al, 2005), o mesmo ocorrendo com os genes promotores da GST, que são regulados pelos fatores de transcrição AP-1 e Nrf2, via ARE, de modo que não

houve nem indução de expressão desta HSP. Uma vez que não houve aumento de HSP, o NF- κ B intracelular produzido pelo potencial redox diminuído induz aumento de γ -GCS e GST, conforme discutido (Ainbinder et al, 1997; Hayes et al, 2005).

Interessantemente, após 24h de tratamento, ocorreu a expressão das duas isoformas da família da HSP70: a HSC73 e HSP72. A HSC73 é expressa constitutivamente, ou seja, independe das condições de estresse, portanto, também ocorre nas células no repouso (Meyer & Silva, 1999), ao contrário da HSP72. Assim, em 24h, a adição de PGA_2 aos macrófagos peritoneais gerou expressão aumentada de HSC73, o que demonstra, novamente a ação protetora das CP-PGs. No entanto, os grupos PGA_2 + NAC e PGA_2 + BSO/DEM mostraram-se com estas expressões diminuídas, comparados ao Controle+ PGA_2 , e sem alterações significativas quando comparados aos seus controles, neste período, concluindo-se, deste modo, que a interação das PGA_2 com oxidantes e antioxidantes produzidos intracelularmente ou adicionados ao meio de cultura modificam a capacidade desta prostaglandina em induzir a expressão da HPS. Mesmo assim, esta indução de expressão foi significativamente maior nestas células tratadas com oxidantes e antioxidantes quando comparados com o grupo que não recebeu nenhum tratamento e que não teve expressão de HPS, portanto. O mesmo perfil foi encontrado em relação à expressão da HSP72, de onde se conclui que o estado redox interfere realmente na expressão das proteínas de choque térmico, porém, com certeza, não deve ser este o único modo de regulação de sua ativação, visto que a adição de PGA_2 sempre aumenta a expressão destas, independente do meio estar oxidado ou reduzido, quando comparado aos macrófagos peritoneais que não recebem tratamento algum.

Após a obtenção dos resultados de expressão da família das HSP70 em macrófagos peritoneais tratados com oxidantes e antioxidantes, visou-se a determinar o que ocorreria com as *foam cells*, oxidadas frente a ação da LDL oxidada, uma vez que o comportamento das *foam cells* podia ser diferente daquele verificado em macrófagos peritoneais. Encontramos um aumento de 73% na expressão da HSP70 nos macrófagos/ *foam cells* tratados com PGA_2 1 μ M, quando comparado com o controle tratado com PGA_2 , efeito semelhante

ao obtido em macrófagos peritoneais, corroborando com nossos resultados anteriores. A PGA_2 20 μ M também gerou aumento de HSP70 no controle+ PGA_2 20 μ M e LDLox+ PGA_2 20 μ M, no entanto, este aumento foi menor quando comparado com a PGA_2 1 μ M em macrófagos/ *foam cells*, o que nos leva crer que esta dosagem já não é tão efetiva quanto a de 1 μ M.

Teoricamente, a oxidação gerada intracelularmente pelo tratamento dos macrófagos peritoneais imita o que ocorre em *foam cells* e também em células inflamatórias. Como vimos, a inflamação gera estresse oxidativo e isto é essencial para que ocorra transcrição gênica de diversas moléculas pró-inflamatórias: uma delas é a iNOS que, inclusive, pode se modificar drasticamente no processo da aterosclerose. Esta enzima é a isoforma induzível da óxido nítrico sintase, tendo como função a produção de NO (Niess, 2000). Existem dois importantes sítios de ligação que se localizam na região promotora do gene da iNOS, regulando, assim, sua transcrição: um deles é o sítio de ligação do NF κ B (Zhou, 2006). Assim sendo, a expressão da iNOS tem seus níveis de transcrição regulados por vias de sinalização que envolvem agentes relacionados com a resposta do NF κ B ao estado redox (Dröge, 2002), assim como o AP-1, fator de transcrição que também é regulado pelo estado redox e é sabidamente inibido por 15d-PGJ₂, que tem efeitos antiinflamatórios, uma vez que AP-1 expressa enzimas pró-inflamatórias, como iNOS, COX-2 e outros (Kim & Surh, 2006). Deste modo, medir a expressão de iNOS nos faz ter uma melhor visão da ativação celular, assim como de seu grau de oxidação.

Observou-se nos experimentos com 6h e 24h de tratamento, que o grupo Controle+NAC apresentou aumento significativo na expressão da iNOS. Este resultado foi muito interessante e tornou, por este motivo, imprescindível a investigação do estado redox das células. Viu-se que macrófagos colocados em cultura podem apresentar estresse pela modificação do meio, embora se tente sempre mantê-los o mais próximo possível do fisiológico. Também discutiu-se que tanto em células com seu meio interno muito reduzido (baixos níveis de GSSG), quanto em células muito oxidadas (altos níveis de GSSG), ocorre a inibição do fator de transcrição NF- κ B (Dröge et al, 1994; Haddad et al, 2004). Fica clara, nestas situações, a importância da manutenção do estado redox em equilíbrio. É possível que os macrófagos peritoneais, colocados em

cultura, acabem tendo um aumento do estresse oxidativo, inibindo a ação do NF- κ B. Assim, quando o NAC foi adicionado ao meio, estas células se reduziram o suficiente para que este fator de transcrição fosse ativado e os macrófagos expressassem a iNOS. Os outros grupos não mostraram alterações em seus níveis de expressão em 6h; entretanto, em 24h de tratamento, o grupo que recebeu BSO/DEM também se apresentou aumentado significativamente, comparado ao seu controle, demonstrando a seqüência de resposta celular, nesta ordem: o estresse oxidativo, o aumento do NF- κ B e a expressão da iNOS. Nota-se, entretanto, que os grupos tratados com PGA₂ não tiveram alteração na expressão desta enzima, demonstrando mais uma vez a ação desta CP-PG: o aumento que ela provoca de HSP inibe o NF- κ B, que é o fator de transcrição responsável pela expressão da iNOS. Corroborando com estes achados, vê-se o mesmo efeito deste prostanóide em uma outra prostaglandina ciclopentenônica: o 15d-PGJ₂, que também inibe a expressão de iNOS, por inibir o NF- κ B (Kim & Surh, 2006).

Conforme visto, foi demonstrado que a PGA₂ 1 μ M, em macrófagos/ *foam cells* diminui a formação de colesterol endógeno, a partir da acetil- CoA (Homem de Bittencourt Jr. et al, 2007), isto é, ocorre modificação desta rota bioquímica por ação deste prostanóide em algum ponto que se fazia mister pesquisar. Como a enzima- chave da síntese endógena do colesterol é a HMG-CoA redutase, resolveu-se estudá-la, uma vez que os resultados encontrados sugeriam inibição da atividade ou diminuição da expressão desta enzima.

Começou-se estudando a atividade enzimática da HMG-CoA redutase. O ensaio da atividade da enzima é feito sem DTT (ditiotreitól) e com DTT pela seguinte razão: o DTT é um potente antioxidante, ao passo que a PGA₂ é um oxidante. Assim, durante o ensaio é possível que eles reajam entre si ou que o DTT desloque a PGA₂ ligada covalentemente por adição de Michael na cisteína da HMG-CoA redutase. A HMG-CoA redutase também possui resíduos de cisteína reativos localizados próximos ou no seu sítio catalítico (Capel & Hilbert, 1993); assim sendo, esta enzima também poderia ser, teoricamente, modulada pelo estado redox e/ou pela PGA₂.

Os resultados obtidos mostram que a PGA₂ 1 μ M adicionada a macrófagos peritoneais controle diminui drasticamente a atividade desta

enzima comparado às células que não receberam tratamento algum, em 1h e 24h, quando o ensaio é realizado sem DTT. Além disto, a depleção de GSH pela presença de BSO/DEM no meio, juntamente com a PGA_2 , promoveu redução da atividade da HMG-CoA redutase também em 1h de tratamento, neste ensaio. O tratamento das amostras de 24h com ditiotreitol (DTT, 10 mM) no momento do ensaio reverteu completamente a inibição, pois o DTT, como antioxidante, reage com a PGA_2 . O NAC adicionado ao meio de cultura não causou modificações significativas nos grupos.

Comparando-se os grupos experimentais entre eles mesmos em 1h e 24h, nota-se que no ensaio com e sem DTT, a atividade da HMG-CoA redutase aumentou significativamente no período de 24h de tratamento, em relação ao de 1h, em quase todos os grupos ($p < 0,05$). Este perfil encontrado é muito parecido com àquele visto em relação a ACAT, demonstrando, mais uma vez, que o próprio estresse pela cultura celular a que os macrófagos foram submetidos altera o estado redox destas células. Embora os valores basais nos dois tempos se modifiquem, a resposta celular encontrada é muito interessante, conforme discutido abaixo.

Uma vez que os grupos tratados com CP-PGs são ensaiados sem DTT e dão resultados mais baixos que os controles sem DTT e, quando ensaiados com DTT ambos (controles e CP-PGs) dão resultados equivalentes, é possível que a PGA_2 iniba a redutase por ligação às cisteínas da enzima. Assim, o perfil que se observa é o mesmo que se viu na ACAT: um meio oxidado faz com que a PGA_2 demonstre todo seu efeito biológico – a presença de BSO/DEM e a PGA_2 por si só, geram estresse oxidativo, diminuindo a quantidade de GSH intracelular e aumentando a chance deste prostanóide se ligar à cisteína reativa da HMG-CoA redutase.

Visto que, realmente, a adição de PGA_2 inibia a atividade da HMG-CoA redutase, faltava averiguar se esta CP-PG poderia interferir na expressão da enzima. Assim, foram feitos os ensaios para testar esta possibilidade. Verificou-se, então, que nenhum dos grupos experimentais apresentou alteração, com exceção do grupo $PGA_2 + BSO/DEM$, que comparado com seu controle e com os outros grupos, aumentou em 2,6 vezes, em 24h de tratamento, a expressão da HMG-CoA redutase. No entanto, o aumento da quantidade da enzima não gera resposta de aumento de atividade, como

sugere a medida da atividade da enzima, provavelmente pela ação da PGA_2 , que deve estar se ligando diretamente às cisteínas da HMG-CoA redutase, modulando sua resposta, conforme será discutido abaixo.

A HMG-CoA redutase é sabidamente inibida por fosforilação pela AMPK (Clarke & Hardie, 1990; Kanellis et al, 2006), que é ativa em situações fisiológicas de déficit de energia (Figura 1) (Kim & Novak, 2007). Obviamente, quando os níveis energéticos celulares diminuem (jejum), todo o processo de anabolismo fica interrompido e assim, o mesmo se dá com a síntese endógena de colesterol, que estará diminuída, como forma de se preservar o estoque energético da célula (Sato et al, 1993).

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que além de inibir a atividade da enzima por um processo dependente de reação com cisteínas, a PGA_2 , por bloquear a síntese de colesterol, induz um aumento na expressão e atividade total da HMG-CoA redutase, embora a enzima permaneça inibida na ausência de DTT. Isso sugere que parte do efeito benéfico da PGA_2 sobre o desenvolvimento da aterosclerose está relacionado a seu efeito inibitório sobre a atividade da HMG-CoA redutase sem nenhuma alteração na expressão ou no estado de fosforilação da enzima, já que as CP-PGs inibem a AMP quinase quinase (AMPKK), que, por sua vez, ativaria a AMP quinase (AMPK), enzima responsável pelo bloqueio da atividade redutase (Clarke & Hardie, 1990). Se a AMPK não está fosforilando a HMG-CoA redutase, porque esta quinase está inibida pela PGA_2 , tudo leva a crer que a enzima deve estar apresentando sua atividade diminuída por ligação direta da PGA_2 em sua cisteína.

No desenvolvimento da aterosclerose, a alta captação de ésteres de colesterol por receptores *scavenger* por macrófagos/ *foam cells* e células endoteliais contribuem para o acúmulo de colesterol no citoplasma, em forma de gotas lipídicas (Gutierrez et al, 2007). Logo, após ter sido demonstrado que ocorre a inibição da incorporação de colesterol exógeno em macrófagos/ *foam cells* tratados com PGA_2 1 μ M (Homem de Bittencourt Jr. et al, 2007), tornou-se essencial verificar se ocorria *down-regulation* de receptores *scavenger* na membrana dos macrófagos peritoneais. Dentre os muitos receptores *scavenger* que fazem a captação de colesterol do meio extracelular, um dos mais estudados e sabidamente envolvidos com o acúmulo de colesterol em macrófagos é o receptor CD36. Assim, sua expressão foi averiguada.

Os resultados obtidos do tratamento dos grupos experimentais em 6h, mostraram que a expressão do receptor *scavenger* CD36 está diminuída no grupo PGA_2 + NAC, comparado ao seu controle, assim como os grupos Controle+ BSO/DEM e PGA_2 + BSO/DEM apresentaram expressões diminuídas deste receptor comparadas com todos os outros grupos. Interessante perceber que, mais uma vez, quando há oxidação do meio (visto que PGA_2 + NAC também tiveram seu meio oxidado, conforme descrito anteriormente), o tratamento das células com PGA_2 diminui a expressão de CD36, diminuindo a captação de colesterol. Isto ocorre em macrófagos peritoneais e muito provavelmente nos macrófagos *foam cells* tratados com PGA_2 , pela resposta celular obtida por Homem de Bittencourt Jr e colaboradores, em 2007. Quando se analisa a resposta celular em 24h de tratamento, no entanto, nota-se que não há diferença significativa entre os grupos. Estes achados vêm de encontro com o que se observa em células tratadas com 15d-PGJ2, que também é uma CP-PG, e inibe a expressão de receptores *scavenger* (Kim & Surh, 2006).

Embora a discussão dos resultados obtidos em relação à atividade e/ ou expressão das enzimas envolvidas no metabolismo do colesterol se dêem separadamente, é necessário se ter em mente que o funcionamento destas está relacionado e é interdependente. Então, passe-se a discutir a ação coordenada destas enzimas nos macrófagos.

A ACAT age diminuindo o excesso de colesterol livre, formando ésteres de colesterol, que podem ser estocados, conforme descrito anteriormente. Esta estratégia celular em aliviar o acúmulo de colesterol livre, não obstante, pode ser perigosa, uma vez que isto impede a inibição por retroalimentação mediada pelo colesterol da HMG-CoA redutase e dos receptores de LDL, fazendo com que a célula continue produzindo e captando colesterol (Gutierrez et al, 2007). Prova disto é que macrófagos apresentam diminuição de acúmulo de ésteres de colesterol quando estas células são incubadas com atorvastatina, que é inibidor da HMG-CoA redutase. Ainda, as estatinas induzem a inibição dos intermediários não esteróis do mevalonato, o que pode diminuir a formação de macrófagos/*foam cells* por aumentar o efluxo de colesterol (Argmann et al, 2005). Sabe-se ainda que a dieta pode influenciar na ação das enzimas envolvidas no metabolismo do colesterol. Estudos descrevem que a síntese de ésteres de colesterol e a atividade da ACAT estão aumentadas *in vitro* em

aortas de animais alimentados com grande quantidade de triglicerídeos ou colesterol (Yang et al, 2004). O colesterol livre, ácidos graxos e ácido araquidônico (que podem ser obtidos da dieta) podem servir de substrato para a ACAT (Pollaud et al, 1995; Oliveros et al, 2004), levando ao acúmulo de ésteres de colesterol.

Após demonstrar que a PGA_2 reduz o acúmulo de colesterol em *foam cells* e em lesões ateroscleróticas *in vivo* (Homem de Bittencourt Jr. et al, 2007), através dos resultados agora obtidos, vê-se que pelo menos parte da ação da PGA_2 parece se dar pela inibição coordenada desta CP-PG sobre a ACAT e HMG-CoA redutase, assim como também por ação sobre a CEH, não testada neste trabalho. No entanto, Homem de Bittencourt e colaboradores (2007) acharam uma diminuição de formação de colesterol livre, o que indica uma diminuição da atividade e/ou da expressão da CEH.

A CEH exibe um modelo de regulação compatível com sua função fisiológica, respondendo a perturbações do metabolismo do colesterol e por este motivo, esta enzima pode estar envolvida com o acúmulo de lipídios intracelular e com a aterosclerose (Escary et al, 1999). Dietas ricas em colesterol suprimem a atividade e a formação de RNAm da CEH. Se a síntese de colesterol é estimulada por infusão intravenosa de mevalonato, a atividade, a enzima e o RNAm da CEH estão diminuídos; se a síntese for inibida pela infusão de um inibidor de HMG-CoA redutase, ocorre o aumento da atividade e do RNAm da CEH (Ghosh et al, 1998). A perda da atividade desta enzima ocorre na presença de substâncias reativas a grupamentos sulfidríla, sugerindo que cisteínas são essenciais na hidrólise dos substratos. Lohse e colaboradores (1997) substituíram a cisteína da posição 227 e da 236 por alanina, separadamente, e as duas cisteína destas duas posições por alanina, simultaneamente. Como resultados, encontraram reduções drásticas na atividade hidrolítica, demonstrando que estes resíduos são essenciais para o catabolismo lipídico mediado por lipase ácida lisossomal/ CEH ácida. Entretanto, Pagani e colaboradores, no mesmo ano do estudo de Loshe, após substituírem os resíduos de cisteína por mutações, propuseram que estes resíduos de cisteína estão envolvidos na hidrólise de ésteres de colesterol por afetar seletivamente o acesso do substrato ao sítio catalítico ativo. Atualmente, todas as rotas lipogênicas em mamíferos conhecidas são sensíveis ao estado

redox (Gutierrez et al, 2007). Assim, possivelmente esta enzima também responde à ação da PGA_2 , como o fazem a ACAT e a HMG-CoA redutase, embora esta enzima não tenha sido testada.

A HMG-CoA redutase é regulada, dentre outras coisas, por retroalimentação negativa, isto é, sempre que a quantidade de colesterol intracelular diminui, sua atividade/ expressão tende a aumentar. Sabidamente, no entanto, esta regulação é só uma parte do processo, pois se fosse simples assim, não seriam geradas as *foam cells*. Experimentando-se os diferentes tratamentos nos vários tipos celulares deste trabalho, viu-se que ocorre inibição da HMG-CoA redutase pela presença de PGA_2 no meio (macrófagos peritoneais), o que acarreta menor formação de colesterol livre; por sua vez, a ACAT também se encontra inibida pela PGA_2 , quando as células se encontram oxidadas (*foam cells* e macrófagos peritoneais), e o substrato desta enzima, que é o colesterol livre, também está diminuído pela via de sua síntese e também pela captação do meio extracelular, como encontramos nos resultados deste trabalho, gerando menor formação de ésteres de colesterol. Teoricamente, por si só, esta diminuição nos níveis de colesterol já deveria ser suficiente para ativar estas enzimas; porém, de algum modo, a PGA_2 está inibindo esta alça de retroalimentação. Assim, viu-se que a diminuição do colesterol intracelular observado nos experimentos publicados em 2007, tem parte de suas rotas metabólicas desvendadas no estudo atual.

Deve-se notar que mesmo aumentando a expressão de HMG-CoA redutase, a ação desta enzima continuou inibida pela presença de PGA_2 , o que suscita que os efeitos anti-colesterologênicos desta CP-PG devem envolver a modulação da atividade desta enzima, uma vez que sua atividade é dependente dos níveis de GSH e que esta enzima é modulada alostericamente pelo estado redox em condições fisiológicas (Roitelmand & Shechter, 1984), assim como deve ocorrer com a ACAT (Gutierrez et al, 2007) e a CEH, que também são reguladas pelo estado redox celular (Cristóbal et al, 1999).

A presença de resíduos de cisteínas críticas localizadas próximas ou no sítio ativo da ACAT, da HMG-CoA redutase e da CEH gerou nova luz para o esclarecimento do mecanismo anti-aterogênico mediado por CP-PGs, adicionalmente ao seu poder inibitório sobre o $NF\kappa B$: a modulação do

metabolismo lipídico através de ligações destes prostanóides a cisteínas reativas via adição de Michael com as enzimas acima citadas.

7. CONCLUSÃO

As CP-PGs, como visto, modificam a sinalização celular. Entretanto, a possível participação destes eicosanóides na regulação do metabolismo lipídico pela ligação destes em cisteínas reativas é uma novidade. Os resultados obtidos neste trabalho, assim como aqueles encontrados por outros grupos de pesquisa, mostram uma nova faceta do estudo das prostaglandinas ciclopentenônicas, uma vez que a sinalização redox é mediada por elas e podem guiar o metabolismo lipídico em situação de aterosclerose, conforme demonstrado por Homem de Bittencourt Jr e colaboradores, em 2007 e agora no atual estudo.

Viu-se que a PGA_2 gera profundos efeitos no estado redox celular, ativando as cascatas do Keap1/ Nrf2, que culminam na formação de estresse oxidativo e também de rotas protetoras contra este último, fato este que também é citoprotetor e anti-aterogênico, uma vez que ele também aumenta o metabolismo do GSH. Ainda, a habilidade da PGA_2 em bloquear a ativação do NF- κ B e aumentar a expressão de HSP70 reverte a inflamação. Sem dúvida, o resultado mais importante deste trabalho é que a PGA_2 bloqueia a produção de colesterol por inibição direta da atividade da HMG-CoA redutase, sem interferência na sua expressão ou estado de fosforilação, já que a PGA_2 é inibidora da cascata das AMPK, que reduzem fisiologicamente a atividade da redutase em situação de jejum ou depleção de ATP. Isto abre uma nova perspectiva para o tratamento da aterosclerose, uma vez que na atualidade, conforme discutido, não existe cura para esta doença e nem regressão de placa de ateroma, no máximo, a estabilização desta. Assim, é possível que esteja surgindo, aqui, uma nova classe de inibidores da HMG-CoA redutase, com efeitos mais efetivos, permitindo um melhor prognóstico para os pacientes. Interessante notar que este efeito de inibição nesta enzima é independente do estado redox celular. Além disto, este prostanóide também inibe a atividade da ACAT, que poderia levar ao acúmulo de ésteres de colesterol, gerando placas de ateroma, tanto em macrófagos/ *foam cells*, quanto em macrófagos peritoneais em meio oxidado (que teoricamente é o mesmo estado redox que se encontra em *foam cells*). Entretanto, observa-se que os efeitos da PGA_2 em doses farmacológicas são totalmente benéficos somente em células oxidadas.

Em células em equilíbrio redox, a PGA_2 apresenta efeitos semelhantes ou contrários aos encontrados em células oxidadas, o que fica claro quando os dados deste trabalho original são avaliados. Entretanto, o porquê destes efeitos não é conhecido. Assim, os efeitos encontrados neste trabalho, que corroboram com os dados já obtidos anteriormente, foram descritos em colorido na Figura 44A e B.

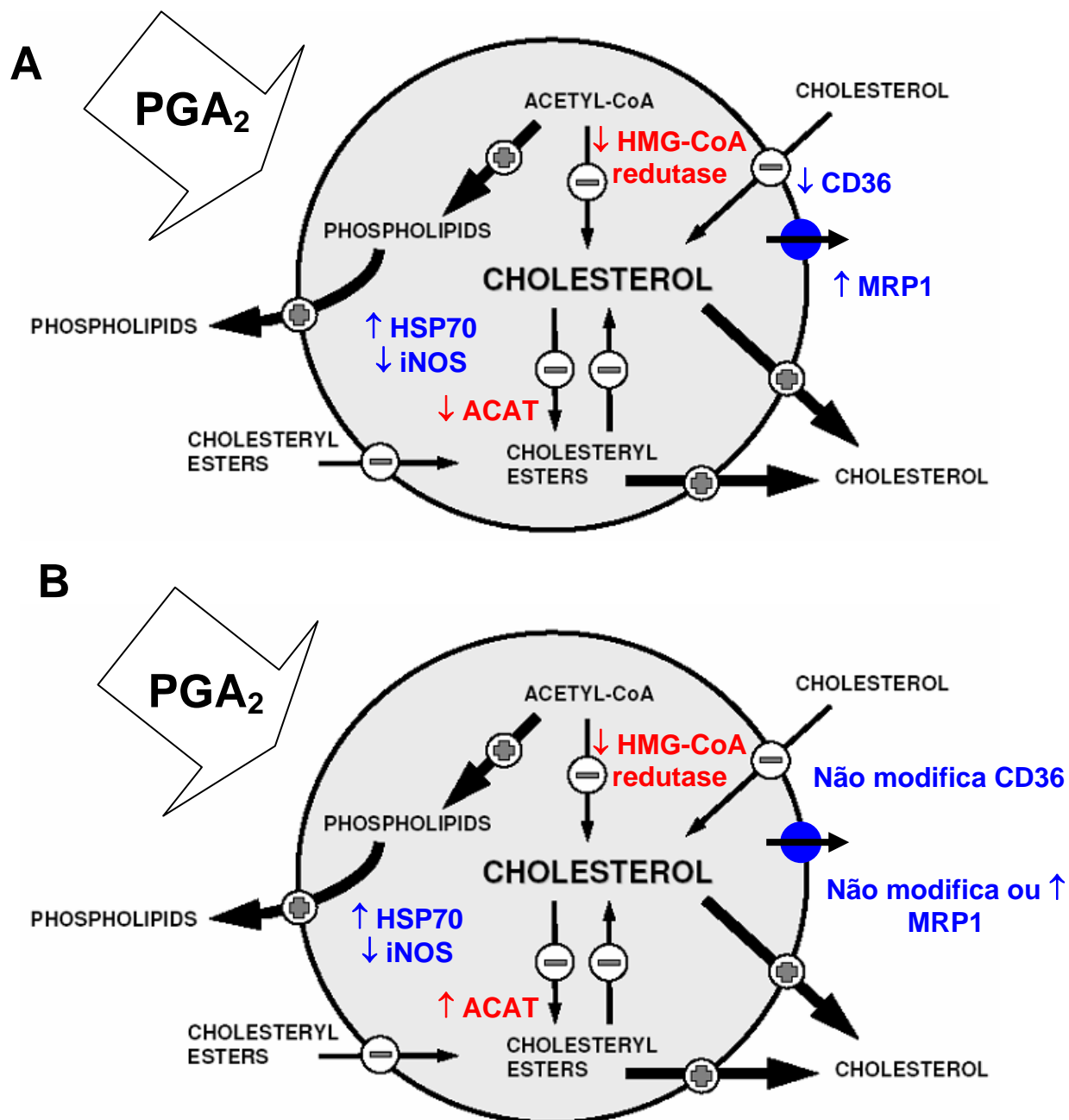


Figura 44: **A-** Efeitos da PGA_2 no metabolismo do colesterol em células oxidadas. **B-** Efeitos da PGA_2 no metabolismo do colesterol em células em equilíbrio redox. Os dados em colorido expressam os efeitos encontrados neste trabalho, sobre o metabolismo do colesterol.

Finalmente, considerando-se que uma doença inflamatória crônica, como a aterosclerose, pode originar-se de uma falha na resolução da inflamação mediada por CP-PGs fisiologicamente, é possível que uma melhor compreensão do porquê de as CP-PGs formadas fisiologicamente não conseguirem corrigir a inflamação possa explicar muitas questões ainda não solucionadas, gerando uma nova luz no tratamento da aterosclerose, doença que ainda ceifa muitas vidas ao redor do mundo.

8. REFERÊNCIAS

- ADLER, V.; YIN, Z.; TEW, K.D.; RONAI, Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*, 18:6104-11, 1999.
- AINBINDER, E.; BERGELSON, S.; PINKUS, R.; DANIEL, V. Regulatory mechanisms involved in activator-protein-1 (AP-1)-mediated activation of glutathione-S-transferase gene expression by chemical agents. *European Journal of Biochemistry*, 243(1-2):49-57, Jan 15, 1997.
- AKERBOOM, T.P.M. & SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology*, 77:373-82, 1981.

- AKERBOOM, T.P.M. & SIES, H. Transport of glutathione disulfide and glutathione S-conjugates in hepatocyte plasma membrane vesicles. *Methods in Enzymology*, 233:416-25, 1994.
- ALEXANDER, R.W. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis – Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension*, 25: 155-61, 1995.
- 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 América*, 89, 6227-31, 1992.
- AMICI, C.; GIORGI, C.; ROSSI, A.; SANTORO, M.G. Selective inhibition of virus protein synthesis by prostaglandin A₁: a translational block associated with HSP70 synthesis. *Journal of Virology*, 68:6890-9, 1994.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*, 113:548-55, 1985.
- ARGMANN, C.A.; EDWARDS, J.Y.; SAWYEZ, C.G.; O'NEIL, C.H.; HEGELE, R.A.; PICKERING, J.G.; HUFF, M.W. Regulation of macrophage cholesterol efflux through hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibition: a role for RhoA in ABCA1-mediated cholesterol efflux. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(23):22212-21, Jun 10, 2005.
- ARRIGO, A.P. Gene expression and thiol redox state. *Free Radical Biology & Medicine*, 27:936-44, 1999.
- ATSMON, J.; SWEETMAN, B.J.; BAERTSCHI, S.W.; HARRIS, T.M.; ROBERTS, L.J. 2nd. Formation of thiol conjugates of 9-deoxy-delta 9,delta 12(E)-prostaglandin D2 and delta 12(E)-prostaglandin D2. *Biochemistry*, 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*, 11:436-442, 1991.

- BANSAL, G.; SINGH, U.; BANSAL, M.P. Effect of beta-hydroxycholesterol on cellular redox status and heat shock protein 70 expression in macrophages. *Cellular physiology and biochemistry*, 11(5):241-6, 2001.
- BASSO, F.; AMAR, M.J.; WAGNER, E.M.; VAISMAN, B.; PAIGEN, B.; SANTAMARINA-FOJO, S.; REMALEY, A.T. Enhanced ABCG1 expression increases atherosclerosis in LDLr-KO mice on a western diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(2):398-404, Dec 15, 2006.
- BELKNER, J.; STENDER, H.; HOLZHUTTER, H.G.; HOLM, C.; KUHN, H. Macrophage cholesteryl ester hydrolases and hormone-sensitive lipase prefer specifically oxidized cholesteryl esters as substrates over their non-oxidized counterparts. *The Biochemical Journal*, 352 Pt 1:125-33, Nov 15, 2000.
- BELL-PARIKH, L.C.; IDE, T.; LAWSON, J.A.; MCNAMARA, P.; REILLY, M.; FITZGERALD, G.A. Biosynthesis of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ and the ligation of PPAR γ . *The Journal of Clinical Investigation*, 112:945-955, 2003.
- 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*, 1:43-50, 2001.
- BERLINER, J. Lipid oxidation products and atherosclerosis. *Vascular Pharmacology*, 38:187-91, 2002.
- BICKEL, P.E. & FREEMAN, M.W. Rabbit aortic smooth muscle cells express inducible macrophage scavenger receptor messenger RNA that is absent from endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 90:1450-7, 1992.
- 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*, 12(12):3221-7, Jun 15, 2004.

- BISHOP-BAILEY, D.; HLA, T.; WARNER, T. Intimal smooth muscle cells as a target for peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand therapy. *Circulation research*, August 9, 2002.
- BOULLIER, A.; GILLOTTE, K.L.; HÖRKKÖ, S.; GREEN, S.; FRIEDMAN, P.; DENNIS, E.; WITZTUM, J.; STEINBERG, D.; QUEHENBERGER, O. The binding of oxidized low density lipoprotein to mouse CD36 is mediated in part by oxidized phospholipids that are associated with both the lipid and protein moieties of the lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 9163-9, 2002.
- BOYLAND, E. & CHASSEAUD, L.F. Enzymes catalysing conjugations of glutathione with $\alpha\beta$ -unsaturated carbonyl compounds. *The Biochemical Journal*, 109(4): 651–661, 1968.
- 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*, 72:248-54, 1976.
- BRAVO, E.; NAPOLITANO, M.; RIVABENE, R. Role of pre-existing redox profile of human macrophages on lipid synthesis and cholesteryl ester cycle in presence of native, acetylated and oxidised low density lipoprotein. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 77(1):73-81, 2001.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. Analysis of a mutant strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein. *Cell*, 9(4 PT 2):663-74, Dec 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*, 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*, 52:223-61, 1983.

- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. The LDL receptor and HMG-CoA reductase--two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis. *Current Topics in Cellular Regulation*, 26:3-15, 1985.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. Lipoprotein receptors: therapeutic implications. *Journal of Hypertension, Supplement*, 8(1):S33-5; discussion S35-6, Mar 1990.
- BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20):11041-8, Sep 28, 1999.
- BUEGE, J.A. & AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52:302-310, 1978.
- CALDER, P.C.; BOND, J.A.; HARVEY, D.J.; GORDON, S.; NEWSHOLME, E.A. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *The Biochemical Journal*, 269:807-814, 1990. (adaptado de Mahoney, E.M.; Hanill, A.L.; Scott, W.A.; Cohn, Z.A. *PNAS*, 74:4895-4899, 1977).
- CAPPEL, R.E. & GILBERT, H.F. Oxidative inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA reductase and subunit cross-linking involve different dithiol/disulfide centers. *The Journal of Biological Chemistry*, 268:342-8, 1993.
- CARLBERG, I. & MANNERVIK, B. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113:484-90, 1985.
- CHEN. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *The Journal of Biological Chemistry*, 242:173-181, 1967.
- CHEN, M-H.; LI, Y-J.; KAWAKAMI, T.; XU, S-M.; CHUANG, P-T. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes & Development*, 18:641-59, 2004.

- 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*, 274(16): 10863-10868, 1999.
- CHINETTI, G.; LESTAVEL, S.; FRUCHART, J.C.; CLAVEY, V.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha reduces cholesterol esterification in macrophages. *Circulation Research*, 92(2):212-7, Feb 7, 2003.
- CLARKE, P.R. & HARDIE, D.G. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *The EMBO Journal*, 9(8):2439-46, Aug 1990.
- COLE, S.P. & DEELEY, R.G. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 20: 931-940, 1998.
- COLLINS, T.; READ, M.A.; NEISH, A.S.; WHITLEY, M.Z.; THANOS, D.; MANIATIS, T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF κ B and cytokine-inducible enhancers. *The FASEB Journal*, 9:899-909, 1995.
- CORRELL, C.C. & EDWARDS, P.A. Mevalonic acid-dependent degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in vivo and in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(1):633-8, Jan 7, 1994.
- COTGREAVE, I.; MOLDÉUS, P.; SCHUPPE, I. The metabolism of N-acetylcysteine by human endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 42:13-16, 1991.
- CRISTÓBAL, S.; OCHOA, B.; FRESNEDO, O. Purification and properties of a cholesteryl ester hydrolase from rat liver microsomes. *Journal of Lipid Research*, 40:715-25, 1999.
- DA LUZ, P.L.; UINT, L.; SERRANO JR., C.V.; PILEGGI, F. Endotélio e aterosclerose. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, 6 (2): 160-70, 1996.
- DÍAZ A, SANCHEZ F, GARCÍA J. Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminol-H₂O₂-horseradish peroxidase system: Comparative studies. *Analytica Chimica Acta*, 327: 161-5, 1996a.

- DÍAZ A, SANCHEZ F, GARCÍA J, LOVILLO J. Enhanced chemiluminescence kinetic ELISA of dichlorprop methyl ester. *Analytica Chimica Acta*, 321: 219-24, 1996b.
- DHALIWAL, B.S. & STEINBRECHER, U.P. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, 286:191-205, 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*, 15:353-363, 1993.
- DRÖGE, W.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; MIHM, S.; GALTER, D.; SCHENK, H.; ECK, H.-P.; ROTH, S.; GMÜNDER, H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *The FASEB Journal*, 8:1131-8, 1994.
- DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82:47-95, 2002.
- DUVAL, C.; CHINETTI, G.; TROTTEIN, F.; FRUCHART, J.-C.; STAELS, B. The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends in Molecular Medicine*, 8 (9): 422-30, 2002.
- EDWARDS, P.A.; LEMONGELLO, D. & FOGELMAN, A.M. Improved methods for the solubilization and assay of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Journal of Lipid Research*, 20:40-46, 1979.
- ELIA, G. & SANTORO, M.G. Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells. *The Biochemical Journal*, 300:201-9, 1994.
- ENGELKING, L.J.; LIANG, G.; HAMMER, R.E.; TAKAISHI, K.; KURIYAMA, H.; EVERS, B.M.; LI, W.P.; HORTON, J.D.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. Schoenheimer effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(9):2489-98, Sep 2005.
- ERDOGAN, A.; SCHAEFER, C.A.; MOST, A.K.; SCHAEFER, M.B.; MAYER, K.; TILLMANN, H.; KUHLMANN, C.R. Lipopolysaccharide-induced

- proliferation and adhesion of U937 cells to endothelial cells involves barium chloride sensitive hyperpolarization. *Journal of Endotoxin Research*, 12(4):224-30, 2006.
- ESCARY, J.L.; CHOY, H.A.; REUE, K.; SCHOTZ, M.C. Hormone-sensitive lipase overexpression increases cholesteryl ester hydrolysis in macrophage foam cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(6):991-8, Jun 1998.
- FEDER, M.E. & HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61:243-82, 1999.
- FEHRENBACH, E.; PASSEK, F.; NIESS, A.M.; POHLA, H.; WEINSTOCK, C.; DICKHUTH, H.H.; NORTHOFF, H. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(3): 592-600, 2000.
- 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 κ -B activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (30):17724-32, 1996.
- FITZPATRICK, F.A. & WYNALDA, M.A. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D₂: identification of products formed in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(19): 11713-8, 1983.
- FORMAN, B.M.; TONTONOV, P.; CHEN, J.; BRUN, R.P.; SPIEGELMAN, B.M.; EVANS, R.M. 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell*, 83: 803-12, 1995.
- 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*, 103:213-9, 1993.
- FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; AVIRAM, M. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of

- oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis*, 161: 307-16, 2002.
- FÜST, G.; BECK, Z.; BÁNHEGYI, D.; KOCSIS, J.; BIRÓ, A.; PROHÁSZKA, Z. Antibodies against heat shock proteins and cholesterol in HIV infection. *Molecular Immunology*, 42: 75-85, 2005.
- GALTER, D.; MIHM, S.; DRÖGE, W. Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factors κ B and the activator protein-1. *The Biochemical Journal*, 221: 639-648, 1994.
- GANDARIAS, J.M.; LACORT, M.; MARTINEZ, M.J.; DE NICOLAS, M.A.; OCHOA, B. Effect of sex, ovariectomy and female sex hormones on neutral cholesterol ester hydrolase in rat liver. *Experimental and Clinical Endocrinology*, 84(3):262-70, 1984.
- GARCIA JR, J.R.; CURI, R.; MARTINS, E.F.; CARPINELLI, A.R. Macrophages transfer [¹⁴C]-labelled fatty acids to pancreatic islets in culture. *Cell Biochemistry and Function*, 19(1):11-7, Mar 2001.
- GAYARRE, J.; STAMATAKIS, K.; RENEDO, M.; PÉREZ-SALA, D. Differential selectivity of protein modification by the cyclopentenone prostaglandins PGA_1 and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2 : Role of glutathione. *FEBS Letters*, 579(25):5803-8, Oct 24, 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*, 1096:78-85, Jan 2007.
- GESQUIÈRE, L.; LOREAU, N.; BLACHE, D. Impaired cellular cholesterol efflux by oxysterol-enriched high density lipoproteins. *Free Radical Biology & Medicine*, 23 (4): 541-7, 1997.
- GESQUIERE, L.; LOREAU, N.; MINNICH, A.; DAVIGNON, J.; BLACHE, D. Oxidative stress leads to cholesterol accumulation in vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(1-2):134-45, Jul 1999.

- 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*, 274:G662-G668, 1998.
- GHOSH, S. & NATARAJAN, R. Cloning of the human cholesteryl ester hydrolase promoter: identification of functional peroxisomal proliferator-activated receptor responsive elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284(4):1065-70, Jun 22, 2001.
- GHOSH, S.; ST CLAIR, R.W.; RUDEL, L.L. Mobilization of cytoplasmic CE droplets by overexpression of human macrophage cholesteryl ester hydrolase. *Journal of Lipid Research*, 44(10):1833-40, Oct 2003.
- GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, 46:897-930, 1977.
- GOLDSTEIN, J.; BASU, S.K.; BROWN, M.S. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods in Enzymology*, 98:241-260, 1983.
- GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343:425-430, 1990.
- GOUIN E.; VULLIEZ-LE, N.B.; GOUYETTE, A.; HAIDET, V.; NAGEL, M.; DRAY, F. Tumor cell biotransformation products of prostaglandin A1 with growth inhibitory activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 141(3):1254-60, 1986.
- GRIENDLING, K.K. & ALEXANDER, R.W. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *The FASEB Journal*, 10(2): 283-92, 1996.
- GROENER, J.E.; BAX, W.; STUANI, C.; PAGANI, F. Difference in substrate specificity between human and mouse lysosomal acid lipase: low affinity for cholesteryl ester in mouse lysosomal acid lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1487(2-3):155-62, 2000.

- GROGAN, W.M.; BAILEY, M.L.; HEUMAN, D.M.; VLAHCEVIC, Z. R. Effects of perturbations in hepatic free and esterified cholesterol pools on bile acid synthesis, cholesterol 7 α -hydroxylase, HMG-CoA reductase, acyl-CoA:cholesterol acyltransferase and cytosolic cholesteryl ester hydrolase. *Lipids*, 26:907-914, 1991.
- GROSS, S.S. & WOLIN, M.S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annual Review of Physiology*, 57: 737-69, 1995.
- GROVE, R.I.; MAZZUCCO, C.; ALLEGRETTO, N.; KIENER, P.A.; SPITALNY, G.; RADKA, S.F.; SHOYAB, M.; ANTONACCIO, M.; WARR, G.A. Macrophage-derived factors increase low density lipoprotein uptake and receptor number in cultured human liver cells. *Journal of Lipid Research*, 32:1889-97, 1991.
- GUDEWICZ, P.W. & FREWIN, M.B. Surface contact modulation of inflammatory macrophage antibody dependent cytotoxicity and prostanoid release. *Journal of Cellular Physiology*, 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*, 55:423-9, 1994.
- GUO, Z.Y.; CHANG, C.C.; LU, X.; CHEN, J.; LI, B.L.; CHANG, T.Y. The disulfide linkage and the free sulfhydryl accessibility of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 as studied by using mPEG5000-maleimide. *Biochemistry*, 44(17):6537-46, May 3, 2005.
- GUTIERREZ, L.L.; MASLINKIEWICZ, A.; CURI, R.; HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I. Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. *Atherosclerosis*, *submitted*, 2007.
- HADDAD, J.J. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(4):969-77, Apr 16, 2004.

- HALES, B.F. & HUANG, C. Regulation of the Yp subunit of glutathione S-transferase P in rat embryos and yolk sacs during organogenesis. *Biochemical Pharmacology*, 47(11):2029-37, Jun 1, 1994.
- HAMMAD, S.M.; TAHA, T.A.; NAREIKA, A.; JOHNSON, K.R.; LOPES-VIRELLA, M.F.; OBEID, L.M. Oxidized LDL immune complexes induce release of sphingosine kinase in human U937 monocytic cells. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 79(1-2):126-40, Mar 2006.
- HARRISON, D.G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*, 100 (9): 2153-7, 1997.
- HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45:51-88, 2005.
- 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*, 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*, 33(3):463-75, Jun 1994.
- HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I., & CURI, R. Transfer of cholesterol from macrophages to lymphocytes in culture. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 44: 347-62, 1998.
- HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I.; CURI, R.; WILLIAMS, J.F. Glutathione metabolism and glutathione S-conjugate export ATPase (MRP1/GS-X pump) activity in cancer. I. Differential expression in human cancer cell lines. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 45:1227-41, 1998a.
- HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I.; SENNA, S.M.; VIDOR, A.C.; MIYASAKA, C.K.; CURI, R.; WILLIAMS, J.F. Glutathione metabolism and glutathione S-conjugate export ATPase (MRP1/GS-X pump) activity in cancer. II. Cell-to-cell variability, relation with cellular activation state and

- functional absence of GS-X pump in lymphocytes. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 45:1243-54, 1998b.
- HOMEM DE BITTENCOURT JR., P.I.; MIYASAKA, C.K.; CURI, R.; WILLIAMS, J.F. Effects of the antiproliferative cyclopentenone prostaglandin A1 on glutathione metabolism in human cancer cells in culture. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 45:1255-64, 1998c.
- HOMEM DE BITTENCOURT JR. P.I. & CURI, R. Antiproliferative prostaglandins and MRP/GS-X pump: role in cancer immunosuppression and insight into new strategies in cancer gene therapy. *Biochemical Pharmacology*, 62: 811-9, 2001.
- 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*. 193: 245-258, 2007.
- HONN, K.V. & MARNETT, L.J. Requirement of a reactive α,β -unsaturated carbonyl for inhibition of tumor growth and induction of differentiation by "A" series prostaglandins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 129:34-40, 1985.
- IIDA, K.T.; KAWAKAMI, Y.; SUZUKI, H.; SONE, H.; SHIMANO, H.; TOYOSHIMA, H.; OKUDA, Y.; YAMADA, N. PPAR gamma ligands, troglitazone and pioglitazone, up-regulate expression of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase gene in THP-1 macrophages. *FEBS Letters*, 520(1-3):177-81, Jun 5, 2002.
- ISAKSON, P.; SEIBERT, K.; MASFERRER, J.; SALVEMINI, D.; LEE, L.; NEEDLEMAN, P. Discovery of a better aspirin. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*, 23: 49-53, 1995.
- ISHIKAWA, T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends in Biochemical Sciences*, 17: 463-468, 1992.

- JAESCHKE, H. Glutathione disulfide as index of oxidant stress in rat liver during hypoxia. *The American Journal of Physiology*, 258(4Pt1):G499-505, 1990.
- JANG, I.K.; LASSILA, R.; FUSTER, V. Atherogenesis and inflammation. *European Heart Journal*, 14(Supp. K):2-6, 1993.
- JANSSEN-HEININGER, Y.M.; POYNTER, M.E.; BAUERLE, P.A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappa B. *Free Radical Biology & Medicine*, 28:1317-27, 2000.
- JESSUP, W.; WILSON, P.; GAUS, K.; KRITHARIDES, L. Oxidized lipoproteins and macrophages. *Vascular Pharmacology*, 38:239-48, 2002.
- KANELIS, J.; KANDANE, R.K.; ETEMADMOGHADAM, D.; FRASER, S.A.; MOUNT, P.F.; LEVIDIOTIS, V.; KEMP, B.E.; POWER, D.A. Activators of the energy sensing kinase AMPK inhibit random cell movement and chemotaxis in U937 cells. *Immunology and Cell Biology*, 84(1):6-12, Feb 2006.
- 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*, 81: 1317-21, 1984.
- KIM, E-H. & SURH, Y-J. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochemical Pharmacology*, 72:1516-1528, 2006.
- KIM, S.K. & NOVAK, R.F. The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacology & Therapeutics*, 113(1):88-120, Jan 2007.
- 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*, 272 (2): 1402-11, 1997.
- KISILEVSKY, R. & TAM, S.P. Macrophage cholesterol efflux and the active domains of serum amyloid A 2.1. *Journal of Lipid Research*, 44(12):2257-69, Dec 2003.

- 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*, 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*, 33:243-253, 2000.
- KOLBERG, A.; ROSA, T.G.; PUHL, M.T.; SCOLA, G.; JANNER, D.R.; MASLINKIEWCZ, A.; LAGRANHAN, D.J.; CURI, R.; HOMEN DE BITTENCOURT JR., P.I. Low expression of MRP1/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumor-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. *Cell Biochemistry and Function*, Sep 19, 2005.
- KONDO, T.; YOSHIDA, K.; URATA, Y.; GOTO, S.; GASA, S.; TANIGUSHI, N. γ -Glutamylcysteine Synthetase and active transport of glutathione-S-conjugate are responsive to heat shock in K562 eruthroid cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 268:20366-20372, 1993.
- KULICZKOWSKA-PLAKSEJ, J.; BEDNAREK-TUPIKOWSKA, G.; PLAKSEJ, R.; FILUS, A. Scavenger receptor CD36: its expression, regulation, and role in the pathogenesis of atherosclerosis. Part I. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Online)*, 60:142-51, 2006.
- KULICZKOWSKA-PLAKSEJ, J.; BEDNAREK-TUPIKOWSKA, G.; PLAKSEJ, R.; FILUS, A. Scavenger receptor CD36: its expression, regulation, and role in the pathogenesis of atherosclerosis. Part I. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Online)*, 60:142-51, 2006.
- KUO, M.T.; BAO, J.; FURUICHI, M.; YAMANE, Y.; GOMI, A.; SAVARAJ, N.; MASUZAWA, T.; ISHIKAWA, T. Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and γ -Glutamylcysteine synthetase mRNA in Drug-resistant cells, untreated

- tumour cells and normal mouse tissue. *Biochemical Pharmacology*, 55: 605-615, 1998.
- LAURINDO, F.R.M. & DA LUZ, P.L. Espécies Ativas de Oxigênio Podem Contribuir para Aumento da Resistência Vascular Periférica na Hipertensão: Uma Hipótese. *Hiper Ativo*, 2(2), 1995.
- LAWRENCE, T. & GILROY, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution? *International Journal of Experimental Pathology*, 88(2):85-94, Apr 2007.
- LE BRAS, M.; CLEMENT, M.V.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and Histopathology*, 20(1):205-19, 2005.
- LEE, D.K.; DUAN, H.O.; CHANG, C. From androgen receptor to the general transcription factor TFIIH. Identification of cdk activating kinase (cak) as an androgen receptor NH₂-terminal associated coactivator. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 9308-9313, 2000.
- LEE, J.-Y.; & CARR, T. Dietary Fatty Acids Regulate Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase and Cytosolic Cholesteryl Ester Hydrolase in Hamsters. *The Journal of Nutrition*, 134(12):3239-44, Dec 2004.
- LEVENTHAL, A.R.; CHEN, W.; TALL, A.R.; TABAS, I. Acid Sphingomyelinase-deficient Macrophages Have Defective Cholesterol Trafficking and Efflux. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, Issue 48, 44976-44983, November 30, 2001.
- LI, L.; & POWNALL, H.J. Regulation of Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) Synthesis, Degradation, and Translocation by High-Density Lipoprotein₂ at a Low Concentration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(12):2636-42, Dec 2000.
- LINTON, M.F. & FAZIO, S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 27 Suppl 3:S35-40, Dec 2003.
- LIU, J.; CHANG, C.C.; WESTOVER, E.J.; COVEY, D.F.; CHANG, T.Y. Investigating the allostereism of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT)

- by using various sterols: in vitro and intact cell studies. *The Biochemical Journal*, 15;391(Pt 2):389-97, Oct 2005.
- LOHSE, P.; LOHSE, P.; CHAHROKH-ZADEH, S.; SEIDEL, D. Human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase and human gastric lipase: site-directed mutagenesis of Cys227 and Cys236 results in substrate-dependent reduction of enzymatic activity. *Journal of Lipid Research*, 38(9):1896-905, Sep 1997.
- LU, X.; LIN, S.; CHANG, C.; CHANG, T.Y. Mutant Acyl-coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase 1 Devoid of Cysteine Residues Remains Catalytically Active. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 711-718, 2002.
- LYONS, T.J.; LI, W.; WELLS-KNECHT, M.C.; JOKL, R. Toxicity of mildly modified low-density lipoproteins to cultured retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Diabetes*, 43:1090-5, 1994.
- MACKAY, J. & MENSAH, G.A. The Atlas of Heart Disease and Stroke. *World Health Organization* (World Health Organization Staff, Myriad Editions Limited Staff, Center for Disease Control Staff): Geneva, 2004; 112pp. Available online at WHO Website: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/ - Acesso em 25 May 2007.
- MADESH, M.; BENARD, O.; BALASUBRAMANIAN, K.A. Glutathione modulates lipid composition of human colon derived HT-29 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(12):1345-52, Dec 1998.
- MAOR, I.; BROOK, G.J.; AVIRAM, M. Platelet secreted lipoprotein-like particle is taken up by the macrophage scavenger receptor and enhances cellular cholesterol accumulation. *Atherosclerosis*, 88:163-174, 1991.
- MARUI, N.; OFFERMANN, M.; SWERLICK, R.; KUNSCH, C.; ROSEN, C.; AHMAD, M.; ALLEXANDER, R.W.; MEDFORD, R.M. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 92: 1866-74, 1993.

- MEYER, T.N. & DA SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 45(2):181-188, 1999.
- MICHEL, T. & FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how and why? *The Journal of Clinical Investigation*, 100 (9): 2146-52, 1997.
- MIHM, S.; GALTER, D.; DRÖGE, W. Modulation of transcription factor NF- κ B activity by intracellular glutathione levels and by variations of the extracellular cysteine supply. *The FASEB Journal*, 9: 246-252, 1995.
- MONKS, T.J.; ANDERS, M.W.; DEKANT, W.; STEVENS, J.L.; LAU, S.S.; VAN BLADEREN, P.J. Glutathione conjugate mediated toxicities. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 106:1-19, 1990.
- 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*, 14(4):182-95, Apr 2003.
- MORISHITA, H.; YUI, Y.; HATTORI, R.; AOYAMA, T.; KAWAI, C. Increased hydrolysis of cholesteryl ester with prostacyclin is potentiated by high density lipoprotein through the prostacyclin stabilization. *The Journal of Clinical Investigation*, 86(6):1885-91, Dec 1990.
- 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*, 280(42):35562-70, 2005.
- NA, H.K. & SURH, Y.J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation. *Biochemical Pharmacology*, 15;66(8):1381-91, Oct 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*, 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 γ . *Cell*, 93:229-240, 1998.
- NARUMIYA, S. & FUKUSHIMA, M. Delta 12-prostaglandin J₂, na ultimate metabolite os prostaglandin D₂ exerting cell growth inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 127 (3): 739-45, 1985.
- NATARAJAN, R.; GHOSH, S.; GROGAN, W. Regulation of the rat neutral cytosolic cholesteryl ester hydrolase promoter by hormones and sterols: a role for nuclear factor-Y in the sterol-mediated response. *Journal of Lipid Research*, 40:2091;-2098, 1999.
- NISS, A.M.; SOMMER, M.; SCHLOTZ, E.; NORTHOFF, H.; DICKHUTH, H.H.; FEHRENBACH, E. Expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human leukocytes: responses to running exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(7):1220-5, Jul 2000.
- NISHIYAMA-NARUKE, A. & CURI, R. Phosphatidylcholine participates in the interaction between macrophages and lymphocytes. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 278(3):C554-60, Mar 2000.
- 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*, 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*, Volume 37(3) 311-320, March 2004.
- OMKUMAR, R.V.; DARNAY, B.G.; RODWELL, V.W. Modulation of Syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity by phosphorylation. Role of serine 871. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(23):16518, Jun 10,1994.

- OOSTHUIZEN, M.M.; NEL, M.J.; GREYLING, D. Heat shock treated oesophageal cancer cells become thermosensitized against anticancer drugs. *Anticancer Research*, 20:2697-703, 2000.
- PAGANI, F.; PARIYARATH, R.; STUANI, C.; GARCIA, R.; BARALLE, F.E. Cysteine residues in human lysosomal acid lipase are involved in selective cholesteryl esterase activity. *The Biochemical Journal*, 326:265-9, 1997.
- PANOUSIS, C.G. & ZUCKERMAN, S.H. Regulation of cholesterol distribution in macrophage-derived foam cells by interferon-gamma. *Journal of Lipid Research*, 41(1):75-83, 2000.
- 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*, 105(4):1750-8, 2005.
- PIVA, R.; BELARDO, G.; SANTORO, M.G. NF-kappaB: a stress-regulated switch for cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(3-4):478-86, Mar-Apr 2006.
- POCKLEY, A.G. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 3(23):1-21, Sep 21, 2001.
- POLLAUD, C.; KRAUSE, S.; LEPERT, J.C.; ORFILA, C.; SEGUELAS, M.; FESTAL, D.; DECERPRIT, J.; PIPY, B. Acetylated low density lipoprotein inhibits the incorporation of arachidonic acid in phospholipids with a concomitant increase of cholesterol arachidonate in rat peritoneal macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta* 7, 1259(3):211-9, Dec 1995.
- PRAMFALK, C.; DAVIS, M.A.; ERIKSSON, M.; RUDEL, L.L.; PARINI, P. Control of ACAT2 liver expression by HNF1. *Journal of Lipid Research*, 46(9):1868-76, 2005.
- PRITCHARD JR., K.A. & SCHWARZ, S.M. Effect of low-density lipoprotein on endothelial cell membrane fluidity and mononuclear cell attachment. *The American Journal of Physiology*, 260:C43-C49, 1991.

- RAHMAN, I. & MACNEE, W. Regulation of redox Glutathion levels and gene trasncription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radical Biology & Medicine*, 28:1405-20, 2000.
- RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; JIMÉNEZ, L.A.; TORRES, M.; FORMAN, H.J. Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(1-2):42-59, Jan-Feb 2005.
- RAINES, E.W. & ROSS, R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *British Heart Journal*, 69(Supp):S30-S37, 1993.
- RESNICK, N. & GIMBRONE JR, M.A. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *The FASEB Journal*, 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 γ (PPAR γ) in hguman 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 América*, 95:7614-19, 1998a.
- RICOTE, M.; LI, A.C.; WILLSON, T.M.; KELLY, C.J.; GLASS, C.K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391(6662):79-82, 1998b.
- ROBERTS, J.R.; NARASIMHAN, C.; HRUZ, P.W.; MITCHELL, G.A.; MIZIORKO, H.M. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: expression and isolation of the recombinant human enzyme and investigation of a mechanism for regulation of enzyme activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 269:17841-6, 1994.
- ROITELMAN, J. & SHECHTER, I. Allosteric activation of rat liver microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by nicotinamide adenine dinucleotides. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(22):14029-32, Nov 25, 1984.

- ROITELMAN, J. & SHECHTER, I. Studies on the catalytic site of rat liver HMG-CoA reductase: interaction with CoA-thioesters and inactivation by iodoacetamide. *Journal of Lipid Research*, 30(1):97-107, Jan 1989.
- 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*, 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*, 87:90-9, 1991.
- ROSS, R. Cell biology of atherosclerosis. *Annual Review of Physiology*, 57:791-804, 1995.
- ROSSI, A. & SANTORO, M.G. Induction by prostaglandin A₁ of haem oxygenase in myoblastic cells: no effect independent of expression of the 70kDa heat shock protein. *The Biochemical Journal*, 308 (pt 2):455-63, 1995.
- ROSSI, A.; EIA, G.; SANTORO, M.G. Inhibition of nuclear factor kappa B by prostaglandin A₁: no effect associated with heat shock transcription factor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 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 κ -B kinase. *Nature*, 403:103-108, 2000.
- RU SU, Y.; DOVE, D.E.; MAJOR, A.S.; HASTY, A.H.; BOONE, B.; LINTON, M.F.; FAZIO, S. Reduced ABCA1-mediated cholesterol efflux and accelerated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice lacking macrophage-derived ACAT1. *Circulation*, 111(18):2373-81, May 10, 2005.
- SAKASHITA, N.; MIYAZAKI, A.; TAKEYA, M.; HORIUCHI, S.; CHANG, C.C.; CHANG, T.Y.; TAKAHASHI, K. Localization of Human Acyl-Coenzyme

- A:Cholesterol Acyltransferase-1 (ACAT-1) in Macrophages and in Various Tissues. *The American Journal of Pathology*, 156(1):227-36, Jan 2000.
- SANTORO, M.G.; GARACI, E.; & AMICI, C. Prostaglandins with antiproliferative activity induce the synthesis of a heat shock protein in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86:8407- 8411, 1989.
- SANTORO, G.; ELIA, G.; ROSSI, A. Cyclopenten- 1- one, a new inducer of heat shock protein 70 with antiviral activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 32192-96, 1996.
- SANTORO, M.G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*, 59: 66-63, 2000.
- SCHISSEL, S.L.; BEATINI, N.; ZHA, X.; MAXFIELD, F.R.; TABAS, I. Effect and cellular site of action of cysteine protease inhibitors on the cholesterol esterification pathway in macrophages and Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*, 34(33):10463-73, 1995.
- SCHMITZ, G.; HANKOWITZ, J.; KOVACS, E.M. Cellular processes in atherogenesis: potential targets of Ca²⁺ channel blockers. *Atherosclerosis*, 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*, 155 (4):1148-60, 1982.
- SEN, C.K. Cellular thiols and redox-regulated signal. *Current Topics in Cellular Regulation*, 36:1-30, 2000.
- 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*, 46:1007-18, 1998.
- SHIHABI, A.; LI, W.G.; MILLER JR, F.J.; WEINTRAUB, N.L. Antioxidant therapy for atherosclerotic vascular disease: the promise and the pitfalls. *American*

- Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 282(3):H797-802, Mar 2002.
- SKOCZYNSKA, A. The role of lipids in atherogenesis. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Online)*., 59:346-57, Jul 12, 2005.
- SOLOMONS, T.W.G. *Química Orgânica*. volume 2, 7.ed. pg 73. Rio de Janeiro: LTC, 2002.
- SPARROW, C.P.; PARTHASARATHY, S.; STEINBERG, D. Enzymatic modification of low density of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A2 mimics cell-mediated oxidative modification. *Journal of Lipid Research*, 29:745-53, 1988.
- SRINIVASAN, S.R.; RADHAKRISHNAMURTHY, B.; VIJAYAGOPAL, P.; BERENSON, G.S. Proteoglycans, lipoproteins, and atherosclerosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 285:373-81, 1991.
- STEINBERG, D.; PARTHASARTHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.C.; WITZTUM, J.L. The role of post-secretory structural modification of low density lipoproteins in atherogenesis. *The New England journal of medicine*, 320:915-24, 1989.
- STEINBRECHER, U.P.; PARTHASARTHY, S.; LEAKE, D.S.; WITZTUM, J.L. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*, 81:3883-7, 1984.
- STEINMAN, R.M.; MELLMAN, I.S.; MULLER, W.A.; COHN, Z.A. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *The Journal of Cell Biology*, 96:1-27, 1983.
- STRAUS, D.S. & GLASS, C.K. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Medicinal Research Reviews*, (3):185-210, 2001.
- STRYER, L. *Bioquímica*. 4ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996.

- SUNDERKÖTTER, C.; STEINBRINK, K.; GOEBELER, M.; BHARDWAJ, R.; SORG, C. Macrophages and angiogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 55:410-22, 1994.
- TABAS, I. The Importance of Lesion Stage and Phagocytic Efficiency. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(11):2255-64, Nov 2005.
- TODRYK, S.M.; GOUGH, M.J.; POCKLEY, A.G. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential. *Immunology*, 110(1):1-9, Sep 2003.
- TONTONOZ, P.; NAGY, L.; ALVAREZ, J.G.A.; THOMAZY, V.A.; EVANS, R.M. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 93:241-52, 1998.
- URADE, Y.; UJIHARA, M.; HORIGUCHI, Y.; IKAI, K.; HAYAISHI, O. The major source of endogenous prostaglandin D₂ production is likely antigen-presenting cells: localization of glutathione requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic and Kupffer cells in various rat tissues. *Journal of Immunology*, 143: 2982-9, 1989.
- VAN REYK, D.M. & JESSUP, W. The macrophage in atherosclerosis: modulation of cell function by sterols. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(4):557-61, Oct 1999.
- VASSAUX, G.; GAILLARD, D.; AILHAUD, G.; NÉGREL, R. Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation. Its dual role as a cAMP- and Ca²⁺-elevating agent. *The Journal of Biological Chemistry*, 267:11092-7, 1992a.
- VASSAUX, G.; GAILLARD, D.; DARIMONT, C.; AILHAUD, G.; NÉGREL, R. Differential response of preadipocytes and adipocytes to prostacyclin and prostaglandin E₂: physiological implications. *Endocrinology*, 131:2393-8, 1992b.
- VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. Membranas biológicas. In *Fundamentos de Bioquímica*, 1^a reimpressão, ed. Artmed, 239-278, 2002.
- VOGEL, C.F.; SCIULLO, E.; WONG, P.; KUZMICKY, P.; KADO, N.; MATSUMURA, F. Induction of proinflammatory cytokines and C-reactive

- protein in human macrophage cell line U937 exposed to air pollution particulates. *Environmental health perspectives*, 113(11):1536-41, Nov 2005.
- WANG, Y.; CASTORENO, A.B.; STOCKINGER, W.; NOHTURFFT, A. Modulation of endosomal cholesteryl ester metabolism by membrane cholesterol. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(12):11876-86, Mar 25, 2005.
- WATSON, K. Altered lymphocyte heat shock protein 70 expression in patients with HIV disease. *Reserch Letters*, 17: 1983-2000, AIDS 2003.
- WICK, G.; SCHETT, G.; AMBERGER, A.; KLEINDIENST, R.; XU, Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunology Today*, 16:27-33, 1995.
- WILLIAMSON, I.P. & RODWELL, V.W. Isolation and purification of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A by ion-exchange chromatography. *Journal of Lipid Research*, 22:84-187, 1981.
- WONG, H.R.; RYAN, M.; WISPÉ, J.R. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I κ -B degradation na NF κ -B nuclear translocation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 231:257-63, 1997.
- 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*, 43(9):1508-19, Sep 2002.
- XU, Q.; HU, Y.; KLEINDIENST, R.; WICK, G. Nitric oxide induces heat shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cell via activation of heat shock factor-1. *The Journal of Clinical Invetsigation*, 100:1089-97, 1997.
- YAMASHITA, S.; MARUYAMA, T.; HIRANO, K.; SAKAI, N.; NAKAJIMA, N.; MATSUZAWA, Y. Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hiperalphalipoprotenemia. *Atherosclerosis*, 152:271-85, 2000.

- YANG, L.; YANG, J.B.; CHEN, J.; YU, G.; ZHOU, P.; LEI, L.; WANG, Z.; CY CHANG, C.; YANG, X.; CHANG, T.; LI, B. Enhancement of human ACAT1 gene expression to promote the macrophage-derived foam cell formation by dexamethasone. *Cell Research* 14:315–323, 2004.
- YOKOYAMA, S. ABCA1 and biogenesis of HDL. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 13(1):1-15, Feb 2006.
- YOUNG, N.L. & RODWELL, V.W. Regulation of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase in rat leukocytes. *Journal of Lipid Research*, 18:572-581, 1977.
- ZHANG, K. & DAS, N.P. Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. *Biochemical Pharmacology*, 47:2063-8, 1994.
- ZHAO, B.; NATARAJAN, R.; GHOSH, S. Human liver cholesteryl ester hydrolase: cloning, molecular characterization, and role in cellular cholesterol homeostasis. *Physiological Genomics*, 23(3):304-10, Nov 17, 2005.
- ZHOU, R.; ZHENG, S.X.; TANG, W.; HE, P.L.; LI, X.Y.; YANG, Y.F.; LI, Y.C.; GENG, J.G.; ZUO, J.P. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by (5R)-5-hydroxytryptolide in interferon-gamma- and bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(1):121-8, Jan 2006.