FERNANDA MAGALHÃES GONÇALVES

**Efeitos do LDL oxidado em macrófagos M2.
Implicações na aterosclerose**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Elias Kalil Filho

São Paulo

2017

(Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca FMUSP).

FERNANDA MAGALHÃES GONÇALVES

**Efeitos do LDL oxidado em macrófagos M2.
Implicações na aterosclerose**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Elias Kalil Filho

São Paulo

2017

(Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca FMUSP).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gonçalves, Fernanda Magalhães

Efeitos do LDL oxidado em macrófagos M2. Implicações na aterosclerose /
Fernanda Magalhães Gonçalves. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Jorge Elias Kalil Filho.

Descritores: 1.Macrófagos 2.Aterosclerose 3.Lipoproteínas LDL
4.Lipoproteína de baixa densidade oxidada 5.M2 6.Matriz extracelular

*Aos meus pais, Neide e Álvaro...
responsáveis por tudo que sou hoje,
por terem me incentivado a
sonhar e a ir cada vez mais longe!*

Amo vocês!

Agradecimentos

À Deus, que me deu força para continuar e me colocou ao lado de pessoas tão especiais.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Kalil pela orientação, discussões científicas e oportunidade de realizar esse trabalho em seu laboratório.

À minha co-orientadora, Dra. Maristela Hernandez que me ajudou em absolutamente tudo com muita paciência, amizade, carinho e confiança.

Às Maristeletes mais lindas, Moni Baron (que me abandonou no Brasil), Karla e Van por todo carinho, amizade, apoio, milhares de sorrisos e me mostrarem que nem tudo está perdido. Muito obrigada.

À Déia Kuramoto que tanto me ajudou em todos os momentos, nas inúmeras vezes que eu não sabia onde alguma coisa estava e por sempre salvar a minha vida.

Aos meus queridos amigos do laboratório, Amandinha Cabral, Pri Carmona, Darlan Candido, Tiff e Pê. Agradeço a vocês pelas risadas, amizade, incentivo e por tornarem meus dias mais felizes.

Ao Sr. Jair, Sônia e Cléber, pela atenção, amizade e por toda ajuda administrativa.

Aos amigos do Laboratório de Vacina do InCor, Samar, Karen, Malu, Simoninha, Fê Alegria, Washington, pela amizade e convívio.

Aos amigos do HLA e equipe Hemocentro que sempre me receberam tão bem.

À Rai e Elaine e toda equipe do Laboratório de Imunologia do InCor, pela amizade, dedicação, disponibilidade e cuidado com o nosso trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Vascular do InCor, especialmente Victor Debbas, Luciana Pescatore, Patricia Nolasco, Ana Moretti e Leonardo Tanaka, sempre dispostos a ajudar. Obrigada pela amizade.

À professora Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla, Dra. Viviane Zorzanelli e Dra. Alessandra Soares Schanoski, pelas valiosas sugestões feitas a este trabalho durante minha qualificação.

À Ana Garippo do InCor e ao Dr. Thiago Aloia do Hospital Albert Einstein por toda ajuda com os microscópios de fluorescência e confocal.

Ao professor Andrés Rodríguez Morales da Universidad del Bío-Bío do Chile, por toda ajuda e colaboração nas análises das fibras de matriz extracelular.

À Eleni Arruda, pela paciência, dedicação e infindáveis resoluções burocráticas.

À minha amiga desde sempre e para sempre, Luciana Soares que esta comigo em todos os momentos, sempre me incentivando para não desistir.

À minha querida amiga Jéssica, que me fez companhia durante os 2 anos do aprimoramento. E no dia em que entrei no mestrado Deus resolveu que você deveria ficar ao lado Dele. Você me ensinou tanto, até mesmo após sua partida, que apesar de toda saudade, a vida tem que continuar.

Ao Arttur Xavier, companheiro, amigo e conselheiro, que sempre acreditou em mim mais que eu mesma e vem me ensinando e incentivando a enfrentar todos os obstáculos da vida com muita força, foco e fé. Obrigada por nunca desistir de mim.

Ao meu pai Álvaro e à mãe mais dedicada e amiga que esse mundo já viu, Neide, por serem simplesmente os melhores e mais amados pais do mundo. Por estarem comigo em todos os momentos, me apoiarem em absolutamente tudo e por terem por mim um sentimento único chamado de amor incondicional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro, processo nº 2014/20328-3 (bolsa de mestrado).

**“Talvez não tenha conseguido fazer
o melhor, mas lutei para que o
melhor fosse feito. Não sou o que
deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes”.**

Marthin Luther King

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA.....	I
LISTA DE FIGURAS	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aterosclerose.....	1
1.2 Macrófagos	8
1.2.1 Macrófagos na Aterosclerose.....	12
2. HIPÓTESE	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral:.....	19
3.2 Abordagem experimental:.....	19
4. DESENHO EXPERIMENTAL	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1 Purificação de Monócitos e Diferenciação de Macrófagos	21
5.2 Purificação e oxidação de LDL	22
5.3 Eletroforese de LDL.....	23
5.4 Caracterização fenotípica dos monócitos e macrófagos.....	23
5.5 Análise de viabilidade dos macrófagos M2.....	24
5.6 Dosagem de citocinas.....	25
5.7 Análise de fagocitose pelos macrófagos M2.....	25
5.8 Análise da expressão gênica de proteínas da matriz extracelular e moléculas de adesão.....	26
5.8.1 Extração do mRNA.....	26
5.8.2 Transcrição reversa (cDNA).....	27
5.8.3 PCR de HPRT	27
5.8.4 Reação de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR).....	28
5.8.5 Procedimento para análise dos dados de expressão gênica	30
5.9 Análise de TSP1 e ColVI por microscopia confocal	31

5.10 Obtenção e cultura de MEFs para avaliação da matriz extracelular incubada com sobrenadante de macrófagos M2	32
5.10.1 Análise e Processamento das Imagens de Matriz extracelular	34
5.10.2 Filtro de imagem baseado em Hessian	34
5.10.3 Detecção de pico.....	35
5.11 Análise da expressão gênica de TSP1	36
5.12 Análise da expressão proteica de TSP1 por DotBlot	36
5.13 Cultura de HUVECs para avaliação da indução de angiogênese na presença ou ausência de sobrenadante de macrófagos M2	37
6. RESULTADOS	39
7. DISCUSSÃO	74
8. CONCLUSÕES	87
9. ANEXOS	89
Anexo A	89
Anexo B	90
Anexo C	91
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
Ct	Ciclo de amplificação
CUSO ₄	Sulfato de cobre
DCV	Doença cardiovascular
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FSC	Forward scatter
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPRT	Hipoxantina fosforibosil transferase ¹
HUVEC	Células endoteliais do cordão umbilical humano
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleucina
KBr	Brometo de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL _n	LDL nativa
LDLox	LDL oxidada
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
MEFs	Fibroblastos embrionários de camundongos
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase
MR	Receptor de manose
M Φ	Macrófago
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease

RPM	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Transcrição reversa
RT-PCR	PCR Quantitativo em Tempo Real
SFB	Soro fetal bovino
SMC	Célula muscular lisa
SSC	Side scatter
TAE	Tris base, ácido acético e EDTA
TGF	Fator de crescimento de transformação
TSP1	Trombospondina-1
TNF	Fator de necrose tumoral
u.a.	Unidades arbitrárias
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
ΔCt	Delta Ct
$\Delta\Delta Ct$	Delta delta Ct

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura da lipoproteína de baixa densidade.....	4
Figura 2.	Estágios de desenvolvimento da lesão de aterosclerose.....	8
Figura 3.	Cultura de macrófagos e coloração Oil Red O.....	17
Figura 4.	Purificação de células CD14+ a partir de células mononucleares do sangue periférico.....	40
Figura 5.	Análise por citometria de fluxo de macrófagos M1 e M2.....	42
Figura 6.	Eletroforese de LDL em gel de agarose 0,8%.....	43
Figura 7.	Avaliação da viabilidade dos macrófagos M2 após estímulos com LDL.....	45
Figura 8.	Análise por citometria de fluxo de macrófagos M2 estimulados com LDLn ou LDLox.....	46
Figura 9.	Análise por citometria de fluxo da produção de citocinas no sobrenadante de culturas de macrófagos M1 e M2.....	49
Figura 10.	Avaliação da capacidade de fagocitose dos macrófagos M1 e M2 após estímulos com LDL.....	52
Figura 11.	Análise do efeito dos macrófagos M2 sobre a formação de túbulos por HUVECs.....	54
Figura 12.	Análise da matriz extracelular secretada por MEFs incubados com o sobrenadante de cultura de macrófagos M2.....	56
Figura 13.	Eletroforese do RNA de macrófagos M2 em gel de agarose 1%.....	57
Figura 14.	Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação de HPRT.	58
Figura 15.	Avaliação da expressão gênica de macrófagos M2 estimulados ou não com LDLn ou LDLox.....	59
Figura 16.	Ciclo de amplificação (Ct) dos genes candidatos a endógenos presentes no kit Taq Man Array Extracellular Matrix & Adhesion Moleculares.....	60

Figura 17. Percentual de genes cuja expressão foi ou não detectada nas culturas de macrófagos M2.....	62
Figura 18. Volcano plot. Valor de P (Log de 10) e valor de Fold change (log de 2).....	64
Figura 19. Expressão relativa (Fold Change) dos genes com variação significativa em células estimuladas com LDLox quando comparadas com controles não estimulados.....	68
Figura 20. Avaliação da expressão gênica de TSP1 em macrófagos M2 estimulados com LDL por 3 e 6 horas.....	69
Figura 21. Detecção de TSP1 no sobrenadante das culturas de macrófagos por DotBlot.....	70
Figura 22. Análise da expressão de ColVI e TSP1 em macrófagos M2 por microscopia confocal.....	72

RESUMO

Gonçalves FM. Efeitos do LDL oxidado em macrófagos M2. Implicações na aterosclerose [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A aterosclerose é uma doença crônica onde duas características marcantes são observadas: retenção de lipídios e inflamação. Compreender as interações entre as células do sistema imunológico e as lipoproteínas envolvidas na aterogênese são desafios urgentes, uma vez que as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. Os macrófagos são cruciais para o desenvolvimento de placas ateroscleróticas e para a perpetuação da inflamação em tais lesões; estas células também estão diretamente envolvidas na ruptura de placa instável. Recentemente diferentes populações de macrófagos estão sendo identificadas nas lesões ateroscleróticas. Embora macrófagos M2 tenham sido identificados, a função destas células na aterosclerose ainda não está definida. Neste projeto, avaliamos se a adição de LDLox altera a função de macrófagos M2. Resultados: 1- Foi possível observar que os M2 se mantêm viáveis após o estímulo com as lipoproteínas. 2- Quando avaliamos a expressão de moléculas co-estimulatórias, receptores *Scavenger*, lectinas e integrinas na superfície das células, observamos que a adição de LDLn ou LDLox em 2 concentrações diferentes (5 e 50µg/ml), por diferentes períodos de tempo não alterou a expressão de nenhum dos marcadores avaliados. A presença de LDL também não alterou outra função primordial dos M2, a capacidade de fagocitose. 3- Quando investigamos a presença de citocinas no sobrenadante das culturas estimuladas ou não com as lipoproteínas, identificamos um aumento na secreção de IL-8, uma citocina pró-inflamatória, na presença de LDLox, semelhante ao observado com a população de macrófagos M1. 4- Avaliamos se os macrófagos M2 estimulados ou não com LDL mantem sua capacidade de favorecer a angiogênese. Observamos que nas culturas estimuladas com o sobrenadante das culturas dos M2 mantidos na presença de LDLox houve uma inibição significativa da formação de túbulos pelas HUVECs. 5- Observamos que na presença do meio condicionado dos M2 estimulados com LDLox ocorreu uma intensa degradação dos filamentos de matriz extracelular produzida por MEFs. 6- Avaliamos a expressão gênica de componentes de matriz, membrana basal, moléculas de adesão, proteases e também inibidores de protease nestas células. Dos 96 genes avaliados, observamos que a adição de LDLox reduziu a expressão de 10 genes de maneira significativa, entre eles: β -Actina (ACTB), Colágeno 6A2 (Col6A2), Integrina alfa 6 (ITGA6), Metaloproteinase 15 (MMP15), molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM) e Inibidor de metalopeptidase 2 (TIMP2). A adição de LDLox aumentou significativamente somente a expressão de trombospondina (TSP1). A adição de LDLn não alterou a expressão de nenhum gene de forma significativa. 7- A adição de LDLox induziu aumento da expressão da TSP1 e redução da expressão de colágeno 6, quando comparadas aos macrófagos M2 sem estímulo. Nossos resultados indicam que a adição de LDLox altera diversas funções dos macrófagos M2 *in vitro*. Em especial detectamos uma inibição significativa na angiogênese e também a secreção de mediadores que induzem a degradação da matriz extracelular. A adição de LDLox também inibiu a expressão de genes envolvidos com a estabilização da matriz extracelular. Nossos resultados sugerem que esta população de células pode contribuir para a perpetuação do processo inflamatório e degradação tecidual observados na lesão dos pacientes. Assim, acreditamos que este projeto contribuiu para o esclarecimento da participação dos M2 na patologia da aterosclerose.

Descritores: Macrófagos; Aterosclerose; Lipoproteínas LDL; Lipoproteína de baixa densidade oxidada; M2; Matriz extracelular; Colágeno tipo VI; Trombospondina 1

ABSTRACT

Gonçalves FM. Effects of oxidized LDL in M2 macrophages. Implications in atherosclerosis [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Atherosclerosis is a chronic disease where two key characteristics are observed: lipid retention and inflammation. Understanding the interactions between the cells of the immune system and the lipoproteins involved in atherogenesis are urgent challenges, since cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world. Macrophages are crucial for the development of atherosclerotic plaques and for the inflammation in such lesions; These cells are also directly involved in unstable plaque rupture. Recently different populations of macrophages are being identified in atherosclerotic lesions. Although M2 macrophages has been identified, the function of these cells in atherosclerosis has not yet been defined. This project, we evaluated whether the addition of OxLDL alters the function of M2 macrophages. Results: 1- M2 macrophages remain viable after stimulation with the lipoproteins. 2- When evaluated the expression of co-stimulatory molecules, Scavenger receptors, lectins and integrins on the surface of the cells. We observed that the addition of LDLn or OxLDL at 2 different concentrations (5 and 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$) for different time periods did not alter the expression of any of the evaluated markers. 3- The presence of LDL also did not alter other primordial function of M2 cells, phagocytosis. 4- Was observed that cultures stimulated with conditioned medium of OxLDL-stimulated M2 there was a significant inhibition of tubule formation by HUVECs. 5- We observed that in the presence of OxLDL-stimulated M2 cells conditioned médium an intense degradation of the matrix filaments occurred. 6- We evaluated the gene expression of matrix components, basement membrane, adhesion molecules, proteases and also protease inhibitors in these cells. Of the 96 evaluated genes, we observed that the addition of OxLDL significantly reduced the expression of 10 genes, among them: Actin- β (ACTB), Collagen 6A2 (Col6A2), Integrin alfa 6 (ITGA6), Metaloproteinase 15 (MMP15), Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) and metalloproteinase 2 inhibitor (TIMP2). The addition of OxLDL significantly increased only the expression, thrombospondin-1 (TSP1). Addition of LDLn did not significantly alter the expression of any gene. 7- That OxLDL addition induced increased TSP1 expression and reduced collagen 6 expression, when compared to M2 macrophages without stimulation. Our results indicate that the addition of OxLDL alters several M2 macrophages functions *in vitro*. In particular we detected a significant inhibition in angiogenesis and also the secretion of mediators that induce the degradation of the extracellular matrix. The addition of OxLDL also inhibited the expression of genes involved in extracellular matrix stabilization. Our results suggest that this cell population may contribute to the perpetuation of the inflammatory process and tissue degradation observed in the lesion of the patients. Thus, we believe that this project contributed to better understand the participation of M2 in the pathology of atherosclerosis.

Descriptors: Macrophages; Atherosclerosis; Lipoproteins, LDL; Oxidized low density lipoprotein; M2; Extracellular matrix; Collagen Type VI; Thrombospondin 1

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) representam a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo, reduzindo a expectativa de vida de milhares de pessoas (Crimmins e Beltrán-Sánchez, 2011).

Segundo a OMS (Oms, 2017), anualmente morrem mais pessoas por DCV do que por qualquer outra causa. Cerca de 17,7 milhões de pessoas morreram por DCV em 2015, representando 31% de todas as mortes globais. No Brasil não é diferente, as DCV são responsáveis por grande parte da mortalidade da população, correspondendo a 31% do total de mortes (Bertolucci *et al.*, 2017). Estima-se que, em 2030, de cada 10 mortes, 7 serão devido a doenças crônicas, e as doenças cardiovasculares como causa mais comum de morte (Krishna e Golledge, 2013).

As DCV tem custo mais elevado em países em desenvolvimento quando comparados a países desenvolvidos, tendo grande impacto na economia destes países (Ribeiro *et al.*, 2012).

As principais manifestações das DCV são eventos clínicos da aterosclerose como, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico, e o infarto do miocárdio é responsável por aproximadamente 12 milhões de mortes por ano no mundo (Ishigaki *et al.*, 2008; Puri *et al.*, 2013; Oms, 2017).

1.1 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença multifatorial, degenerativa, inflamatória crônica da camada íntima de artérias de médio e grande calibre, as lesões são encontradas comumente em locais de estresse hemodinâmico. As lesões

ateroscleróticas resultam de uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas e dinâmicas, que se estabeleceu em resposta ao acúmulo de lipídeos e à inflamação na íntima das artérias, onde as placas de ateroma são encontradas (Lusis, 2000).

As lesões podem permanecer silenciosas por anos e estabilizar-se, mas podem também progredir, regredir, ou manifestar-se como um evento vascular agudo, como descreveremos a seguir, na dependência de uma série de fatores (Aikawa e Libby, 2004; Hansson, 2005).

Os estudos epidemiológicos em aterosclerose realizados nos últimos 60 anos revelam inúmeros fatores de risco, que podem ter natureza genética ou ambiental (Lusis, 2000). Podemos listar como fatores de risco que participam da formação de placas aterogênicas e/ou progressão da doença idade, sexo, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2, resistência periférica à insulina, obesidade, sedentarismo e histórico familiar de infarto do miocárdio precoce (Ross, 1999). Atualmente outros fatores como níveis séricos aumentados de homocisteína, fibrinogênio e proteína C reativa vêm sendo investigados quanto a suas possíveis implicações neste processo (Ridker *et al.*, 2009).

A aterosclerose é uma doença altamente relacionada às disfunções do endotélio, causada por fatores como o estresse oxidativo, resultando em um vaso não responsivo às alterações de fluxo sanguíneo e a outros estímulos (Stocker e Keaney, 2004).

Outro fator classicamente associado à doença é a dislipidemia, altas taxas de LDL (lipoproteína de baixa densidade) e baixas taxas de HDL (lipoproteína de alta densidade) (Tajeu *et al.*, 2017). Por muito tempo, a

aterosclerose foi considerada simplesmente como resultado do acúmulo de lipídios na parede arterial. No entanto, nas últimas duas décadas, o crescente aumento de estudos no campo vascular tem fornecido inúmeros detalhes à definição inicial da doença aterosclerótica (Ohkuma *et al.*, 2015).

As placas de aterosclerose não são distribuídas aleatoriamente, mas tendem a se formar nas curvaturas interiores dos pontos de ramificação de artérias em que o fluxo laminar é perturbado ou insuficiente para suportar o estado normal do endotélio (Tabas *et al.*, 2007). Nestes locais ocorre então a ativação do endotélio e o aumento da permeabilidade vascular às lipoproteínas, um evento ainda mal compreendido. Assim, para desencadear as lesões de aterosclerose, é preciso que ocorra a absorção e retenção da LDL na parede da artéria (Paulson *et al.*, 2010).

A LDL é a lipoproteína mais abundante no plasma e a principal transportadora de colesterol para as células. Do colesterol circulante, 80% é internalizado pelo fígado e cerca de 20% pelos tecidos periféricos (Brown e Goldstein, 1986). O colesterol transportado pela LDL é essencial para a síntese de membranas celulares, de hormônios, sais biliares e vitamina D. A partícula de LDL apresenta forma esférica com um diâmetro médio de 22nm, é formada por uma monocamada externa de fosfolipídios contendo colesterol não esterificados livres, e uma única molécula de apolipoproteína B (apoB-100) composta de 4536 aminoácidos. Já a parte interna é formada por um núcleo apolar composto por 1600 ésteres de colesterol e uma pequena quantidade de triglicerídeos, cerca de 170 e colesterol não esterificados (Figura 1) (Prassl e Laggner, 2009).

A apoB-100 está localizada em torno da superfície da partícula da LDL, estabilizando a estrutura do complexo proteína-lipídeo. Sua principal função é controlar o metabolismo da lipoproteína ligando-se a receptores de membrana específicos. É altamente insolúvel em solução aquosa e apresenta uma massa molecular de 550 kDa para forma glicosilada (Segrest *et al.*, 2001).

Figura 1. Estrutura da lipoproteína de baixa densidade. O núcleo da LDL consiste em triglicerídeos e ésteres de colesterol enquanto a superfície consiste em colesterol, fosfolípidos e apoproteínas livres.

As lipoproteínas sequestradas na parede arterial são susceptíveis a várias modificações (como oxidação, clivagem e agregação), o que as torna pró-inflamatórias e desencadeantes de ativação do endotélio (Liu *et al.*, 2017). Quando presa na parede endotelial, a LDL pode se tornar minimamente oxidada através das modificações de enzimas ou espécies reativas de oxigênio, ou mesmo chegar à forma extensivamente oxidada (LDL_{ox}), resultando em partículas pró-inflamatórias (Leopold e Loscalzo, 2008).

Alguns estudos em aterosclerose investigam a hipótese oxidativa como precursora do processo de formação das placas de ateroma (Witztum, 1994). Essa hipótese indica que a modificação oxidativa da LDL é uma característica fundamental para o desenvolvimento desta patologia. De acordo com essa

hipótese, a LDL em seu estado nativo (LDL_n) não apresenta propriedades aterogênicas, sendo necessária a modificação oxidativa dessa lipoproteína para que ela se torne altamente lesiva ao endotélio vascular e um agente pró-inflamatório (Witztum e Steinberg, 2001; Parthasarathy *et al.*, 2010).

Com o acúmulo de lipoproteínas do plasma na camada íntima de artérias de médio e grande calibre, o endotélio ativado expressa moléculas de adesão, como VCAM e ICAM, e juntamente com as células musculares vasculares secretam quimiocinas, favorecendo assim o recrutamento de monócitos e linfócitos (Fleming e Mosser, 2011; Choromańska *et al.*, 2017).

As lesões iniciais da aterosclerose, as “estrias gordas”, são o resultado do acúmulo subendotelial de monócitos infiltrantes que se diferenciam em macrófagos, internalizam as lipoproteínas modificadas utilizando receptores *Scavengers* como CD36 e SR-AI, e dão origem às *Foam Cells*, “células espumosas” devido ao grande acúmulo lipídeos em seu citoplasma (Figura 2A) (Gleissner *et al.*, 2007; Yazgan *et al.*, 2017). O acúmulo de leucócitos, lipídeos e elementos fibrosos nas artérias induz o remodelamento da artéria e a inflamação na camada íntima destas artérias, contribuindo para o desenvolvimento da lesão (Jonasson *et al.*, 1986; Amberger *et al.*, 1997; Hansson, 2001; Moore *et al.*, 2013).

Na lesão são encontradas ainda células dendríticas, mastócitos e poucos linfócitos B. Na progressão da lesão, no entanto, o lúmen arterial permanece suficientemente grande para alimentar o órgão distal exterior, devido ao remodelamento da parede arterial (Hansson *et al.*, 2006; Moore e Tabas, 2011).

À medida que a lesão progride, ela pode se estender para o lúmen do vaso e ocorre a migração de células musculares vasculares lisas da camada média para a íntima (Figura 2B). Na camada íntima, as células musculares lisas secretam moléculas de matriz extracelular, incluindo colágeno intersticial e elastina, formando a capa fibrosa, que cobre a superfície da placa. Na parte central da lesão as células espumosas, agregados de lipídeos e debris provenientes de um intenso processo de morte celular nas lesões podem formar um centro necrótico. As lesões que apresentam esse perfil, contendo centro necrótico, muitos macrófagos e outros leucócitos inflamatórios, com capa fibrosa fina e pouco colágeno intersticial são chamadas "placas vulneráveis" (Ross, 1999; Tabas *et al.*, 2015).

Após a formação das placas de aterosclerose podem ocorrer diferentes complicações clínicas, que incluem o estreitamento do lúmen dos vasos sanguíneos, levando à angina. No entanto, os principais problemas clínicos relacionados à aterosclerose decorrem da formação de trombos no interior da artéria e a interrupção do fluxo sanguíneo (Figura 2C), tendo como consequência mais grave o infarto do miocárdio e o acidente vascular encefálico. A formação de trombos no interior das artérias, em muitos casos, decorre da desestabilização da placa vulnerável, com a ruptura da capa fibrosa (Sherer e Shoenfeld, 2006; Dutta *et al.*, 2012).

O sucesso no tratamento dos eventos agudos reduziu significativamente a mortalidade hospitalar decorrente das DCV. No entanto, muitos sobreviventes desses eventos desenvolvem cardiomiopatia isquêmica e/ou insuficiência cardíaca, a principal causa de mortalidade e limitação da qualidade de vida para os pacientes. Apesar de processos de revascularização muito eficazes e

tratamentos farmacológicos bem-sucedidos, com o uso de ácido acetilsalicílico e outros agentes antiplaquetários, bloqueadores beta-adrenérgicos e dos agentes hipolipidêmicos, a incidência dos eventos agudos permanece alta (Quillard *et al.*, 2017).

Além do processo onde a instabilidade da placa vulnerável e sua ruptura levam às complicações clínicas, há outros fatores que contribuem para a instabilidade das lesões, incluindo aí a calcificação e a erosão do endotélio (Lusis, 2000).

A erosão da placa é um processo menos conhecido, identificado pelo grupo de Virmani e colaboradores (Virmani *et al.*, 1999). Em contraste com a ruptura da placa instável, a placa que sofre erosão é rica em células musculares lisas e proteoglicanos e contém menos macrófagos, linfócitos T e calcificações. A inflamação não parece desempenhar um papel tão importante na erosão quanto na ruptura da placa. A taxa de erosão da placa em estudos de necropsia de pacientes após morte súbita coronariana foi de 25 - 44% (Burke *et al.*, 1997). Imagens de tomografia indicam que até um terço dos eventos coronarianos agudos na atualidade, mesmo com o sucesso crescente na terapia de redução de LDL, resulta da erosão em vez da ruptura da placa de aterosclerose (Jia *et al.*, 2013). Desta forma, a erosão da placa não deve ser ignorada quando se trata de desenvolver estratégias de prevenção para a placa vulnerável (Henriques De Gouveia *et al.*, 2002).

Adaptado de (Libby *et al.*, 2011).

Figura 2. Estágios de desenvolvimento da lesão de aterosclerose. (A) Os processos iniciais da aterosclerose estão relacionados a um estímulo inflamatório que causa uma disfunção no endotélio e permitir o acúmulo de LDL no espaço subendotelial, onde este sofrerá modificações como a oxidação. As células endoteliais se tornam ativadas e secretam quimiocinas que estimulam o recrutamento de células como linfócitos e principalmente monócitos, que maturam em macrófagos, para a monocamada endotelial. Essas células recrutadas rolam e aderem sobre as células endoteliais e entram no espaço subendotelial por diapedese. (B) A progressão da lesão ocorre com a migração de células musculares lisas, células T e disfunções do endotélio que aumentam a retenção de LDL na monocamada. A LDL oxidada pode ser fagocitada via receptores *scavengers* transformando os macrófagos em células espumosas ou permanecer em formato de cristais de colesterol, ocorre também a migração de células musculares lisas que migram da camada média para íntima e juntamente com o colágeno isolam o conteúdo da lesão, formando a placa fibrosa que se estenderá pelo lúmen do vaso. (C) A ruptura da capa e formação do trombo. Ela acontece quando ocorre uma degradação da matriz extracelular tornando a placa instável podendo levar a ruptura da capa fibrosa. Quando há a ruptura da capa, os componentes da coagulação do sangue entram em contato com os fatores teciduais que estavam no interior da placa, provocando o trombo que se estende para o lúmen do vaso, pode impedir o fluxo sanguíneo.

1.2 Macrófagos

Os macrófagos humanos são células mielóides que possuem diâmetro entre 25 a 50µm, e um núcleo é grande e central. Quando observados ao microscópio eletrônico, o núcleo dos macrófagos apresenta cromatina frouxa e grumos elétron-densos. O citoplasma contém complexo de Golgi bem desenvolvido, uma grande quantidade de vesículas pinocíticas, lisossomos e vacúolos. Também são encontradas vesículas em processo de fusão com fagossomos, formando os fagolisossomos. O citoesqueleto formado por filamentos de actina e microtúbulos é bem organizado e confere a superfície da célula um aspecto ondulado. O citoesqueleto desempenha importante função

na formação de pseudópodes durante os eventos fagocíticos e de locomoção da célula (Elhelu, 1983).

Os monócitos e macrófagos são essenciais para a homeostase e para o desencadeamento de processos inflamatórios nos tecidos. Os monócitos são encontrados no sangue e constituem cerca de 10% dos leucócitos. Já os macrófagos são encontrados nos tecidos normais, não inflamados. Durante processos inflamatórios, os monócitos são recrutados para os tecidos e lá se diferenciam em macrófagos (Kozicky e Sly, 2015). Durante a homeostase, a renovação de macrófagos teciduais e células dendríticas não dependem (exclusivamente) do recrutamento de monócitos, essas populações são mantidas pela proliferação local (Stiehm, 2012).

Os macrófagos são reguladores chave das respostas imune inata e adaptativa. Durante o processo inflamatório exercem três principais funções: fagocitose, apresentação de antígenos e imunomodulação, através da produção de várias citocinas e fatores de crescimento (Chambers *et al.*, 2013). Eles exercem funções homeostáticas tais como cicatrização, remodelamento de tecidos, angiogênese e remoção de células apoptóticas (Horwood, 2015). Estas células podem proteger a integridade dos tecidos e reparar tecidos danificados ou em diferentes contextos, como por exemplo, na inflamação crônica, podem ser grandes destruidores de tecidos graças à produção de citocinas inflamatórias e enzimas proteolíticas (Sica *et al.*, 2015).

Os macrófagos são células muito plásticas e assim têm a capacidade de alterar sua função para responder a um estímulo específico, seja ele uma lesão tecidual, um estímulo infeccioso ou estéril. Além disso, nos sítios inflamatórios *in vivo*, os macrófagos são expostos a sinais complexos e o fenótipo celular se

altera ao longo do tempo. Esses estímulos alteram a expressão gênica para produzir "macrófagos ativados" que estão mais bem equipados para eliminar a causa de seu influxo e restaurar a homeostase (Stiehm, 2012).

Os macrófagos podem assumir diferentes perfis, dependendo do estímulo que recebem do ambiente e assim, estas células podem ser agrupadas em diferentes subpopulações. Atualmente, parece haver um consenso de que a ativação clássica de macrófagos se dá pelo estímulo com IFN- γ resultando na polarização para macrófagos M1, com alto potencial microbicida e secretores de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α (Mantovani *et al.*, 2004; Mosser e Edwards, 2008).

O conceito de macrófagos alternativamente ativados surgiu no momento em que ficou evidenciado que a IL-4 causava o recrutamento de macrófagos que adquiriam um perfil fenotípico e funcional distinto dos macrófagos classicamente ativados (Stein *et al.*, 1992). Posteriormente, foi descrito que outros estímulos poderiam favorecer uma modificação no perfil funcional dos macrófagos. Dentre estes estímulos se destacavam os glicocorticóides, IL-10 e imunocomplexo (Mosser, 2003; Mantovani *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2008).

O fato de estes estímulos favorecerem nos macrófagos um perfil similar ao adquirido com IL-4 levou a uma confusão no conceito de macrófagos clássicos e alternativos e, por isso, várias classificações foram propostas. Delas define os macrófagos classicamente ativados como M1, e os macrófagos ativados por uma via alternativa, como M2a-c (Murray *et al.*, 2014). De acordo com Mantovani e colaboradores (Mantovani *et al.*, 2005) os macrófagos M2a são induzidos pelas citocinas IL-4 e IL-13. Por sua vez, estas células expostas a imunocomplexos, na presença de agonistas dos receptores do tipo Toll

diferenciam-se em M2b, e tornam-se produtores de altos níveis de IL-10 e baixos níveis de IL-12, ainda que conservem a secreção de IL-1, IL-6 e TNF- α . Os macrófagos M2c são induzidos por IL-10 e glicocorticóides.

Contudo, outros grupos (Gordon e Taylor, 2005; Mosser e Edwards, 2008), referem-se principalmente ao conceito de M2a e M2b, ainda que os M2a estejam envolvidos com o reparo tecidal e os M2b sejam reguladores. Os M2a foram considerados também como responsáveis pelo controle de infecções helmínticas (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002). Já os macrófagos reguladores são caracterizados pela capacidade de secretar altos níveis de IL-10 após estimulação, podem preservar a capacidade de secretar NO e ativar células T naíve sem a secreção de IL-12 (Anderson *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2004; Mosser e Edwards, 2008).

Semelhante ao observado *in vivo*, tem sido demonstrado que os macrófagos derivados de monócitos podem ser polarizados em subconjuntos *in vitro*. Para polarizar macrófagos ativados classicamente (M1) são utilizados lipopolissacarídeo (LPS) e interferon- γ (IFN γ). Os M1 são caracterizados pela expressão de CD86 e produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral TNF- α , IL-1 e IL-6 (Hirose *et al.*, 2011).

Para a diferenciação de células alternativamente ativadas, macrófagos são mantidos na presença de citocinas Th2, tais como IL-4 e/ou IL-13. Estes são de natureza anti-inflamatória, promovem fibrose, estão associados com reparo tecidual e são caracterizados por expressão de receptores de manose (CD206) (Lawrence e Natoli, 2011). Além disso, os macrófagos M2 demonstram potencial pró-angiogênico, com expressão elevada de IL-10 (citocina anti-inflamatória) e secreção reduzida de TNF- α e IL-12 (Gordon,

2003). Células M2 tem geralmente elevada expressão de CD163 (receptor *scavenger* de hemoglobina-haptoglobina), CD206 (receptor de manose) e CD209 (célula dendrítica-SIGN), com uma ausência de expressão de CD80 (Chambers *et al.*, 2013).

1.2.1 Macrófagos na Aterosclerose

A participação dos macrófagos é determinante em todas as fases da aterosclerose. Já foi evidenciado que o número de monócitos acumulados no ateroma era proporcional ao tamanho da lesão, sendo ainda sugerido um acúmulo contínuo de macrófagos ao longo da progressão da doença (Swirski *et al.*, 2006).

Os macrófagos presentes na lesão desempenham diversas funções. Além de internalizarem lipoproteínas modificadas dando origem às células espumosas, estas células secretam citocinas pró-inflamatórias como $\text{TNF}\alpha$ e IL-8 quando estimuladas com LDL modificada (Jovinge *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). Estas células também secretam o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), um fator quimiotático que induz a migração das células musculares lisas (SMC) da camada média para a íntima, favorecendo a formação da capa fibrosa. Mais recentemente, também tem sido discutida a participação dos macrófagos no desenvolvimento da capa fibrosa (Xu e Shi, 2014). Os macrófagos parecem contribuir para a síntese da matriz extracelular de forma indireta, induzindo outras células a proliferar e a liberar componentes da matriz e, diretamente, através da secreção de componentes da matriz extracelular tais como a fibronectina e o colágeno (Schnoor *et al.*, 2008).

A produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pelos macrófagos promove a angiogênese e a neovascularização na lesão. Assim, os macrófagos participam do estabelecimento da lesão, bem como o processo inflamatório observado nelas (Owen e Mohamadzadeh, 2013).

Tem sido descrito na literatura que as lesões instáveis, aquelas que podem sofrer ruptura e levar a eventos vasculares agudos, apresentam um intenso e persistente processo inflamatório (Halvorsen *et al.*, 2008).

A participação dos macrófagos na perpetuação da inflamação e sua participação direta na ruptura da placa através de diversos mecanismos têm sido amplamente descrita. Além disso, já foi evidenciado que macrófagos secretam proteases que degradam o colágeno e outras moléculas da matriz extracelular presentes na capa fibrosa. De fato, Gough e colaboradores (Gough *et al.*, 2006) evidenciaram a expressão de MMP9 (metaloproteinase9) em macrófagos de lesões dos camundongos apoE^{-/-}.

Recentemente, estudos vêm identificando a heterogeneidade dos macrófagos presentes no ateroma. Bouhler, colaboradores, Gordon e Plüddemann (Bouhler *et al.*, 2007; Gordon e Plüddemann, 2017) identificaram a presença de células M1 e M2 em lesões de aterosclerose. A expressão de CD68, uma glicoproteína presente no lisossomo de monócitos e macrófagos, foi encontrada em toda a área da lesão. No entanto, macrófagos M2, identificados pela expressão do CD206, estavam localizados em áreas diferentes dos macrófagos M1, identificados pela expressão da proteína quimiotática de monócitos (MCP1). Os M2 foram encontrados na região periférica das lesões, em áreas distantes do centro necrótico. Foi ainda detectada a expressão gênica associada à diferenciação dos M2 como CD36,

CD163 e CCL18 (De Gaetano *et al.*, 2016). Bobryshev e colaboradores (Bobryshev *et al.*, 2016) também demonstraram a presença de diferentes populações de macrófagos na lesão aterosclerótica. Foram identificados macrófagos CD14+/CD68+ e CD14-/CD68+. Também foram observados alguns aglomerados de macrófagos expressando o marcador de ativação 25F9. Tanto os macrófagos CD14+/CD68+ como os CD14-/CD68+ apresentaram acúmulo de lipídeos no citoplasma, mostrando que diferentes tipos de macrófagos podem dar origem a células espumosas (Waldo *et al.*, 2008).

Em experimentos utilizando camundongos knockout de ApoE, Khallou-Laschet e colaboradores (Khallou-Laschet *et al.*, 2010) identificaram que as lesões iniciais (estrias gordurosas) presentes em camundongos jovens contêm macrófagos Arginase I⁺, classificados como M2. No entanto, as lesões mais avançadas contêm tanto macrófagos Arginase I⁺ como Arginase II⁺, M2 e M1, respectivamente. Nestes animais quanto maior a proporção de M2 menor a área da lesão.

De acordo com Cho e colaboradores (Cho *et al.*, 2013) em estudo de imuno-histoquímica das placas de ateroma de pacientes que sofreram ataque isquêmico agudo e em pacientes assintomáticos foi observado que as placas do grupo sintomático tinham uma maior concentração de macrófagos M1 (CD68, CD11c-positivo), enquanto placas do grupo assintomático tinham maior número de macrófagos M2 (CD163+) e estes resultados foram confirmados por *Western blotting*.

A análise histopatológica revelou que os macrófagos M1 e M2 persistentemente se acumulam na placa e aumentam a gravidade da

lesão. Macrófagos M1 pró-aterogênicos apresentam propensão à ruptura da camada íntima, mas não exibem tal predominância nas regiões da capa fibrosa. Assim, M1 e M2, estão presentes no desenvolvimento da placa humana, mas apresentam localizações morfológicas distintas nestas placas. Os macrófagos M1 predominam no ombro da placa, local com maior propensão a ruptura, já macrófagos M2 são identificados em placas estáveis (Stöger *et al.*, 2012).

Em uma avaliação dos subgrupos de macrófagos em placas de aterosclerose em humanos, por transcriptômica e imuno-histoquímica, Stöger e colaboradores (Stöger *et al.*, 2012) verificaram que M1 e M2 persistem por toda a progressão da placa.

Embora estes estudos indiquem a presença de macrófagos M2 nas lesões de aterosclerose, a função desempenhada por estas células ainda não está muito bem definida.

Os macrófagos M2 presentes na lesão de aterosclerose, devido à sua fisiologia, têm o potencial para promover processos de reparo do tecido e aumentar a estabilidade da placa, em virtude da sua capacidade de promover a imunorregulação (Hirata *et al.*, 2011). Esta subpopulação celular secreta moléculas de matriz extracelular, como fibronectina (Röszer, 2015), e promove a síntese de colágeno (Shaikh, S. 2012), como também secretam fatores de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) que induz a proliferação de miofibroblastos e a síntese de colágeno, favorecendo o reparo tecidual (Wynes e Riches, 2003). Por conseguinte, fica então evidenciado que os M2 secretam fatores tróficos que promovem a angiogênese e reparo tecidual induzindo remodelamento da matriz extracelular (Mosser, 2003).

Os macrófagos M2 ainda podem ajudar na resolução da inflamação através da produção de citocinas anti-inflamatórias (Ricardo *et al.*, 2008). A expressão do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) inibe os efeitos desta citocina pró-inflamatória. A secreção de IL-10 e TGF- β contribuem para o efeito inibitório destas células (Martinez *et al.*, 2008).

Deste modo, os M2 são uma população de células que pode contribuir para a estabilização do processo inflamatório observado na aterosclerose. A participação destas células pode ser importante na eliminação de debris celulares, favorecendo o reparo tecidual e ainda secretando citocinas anti-inflamatórias (Bobryshev *et al.*, 2016).

Estudar o papel dos lipídeos na modulação do fenótipo dos macrófagos é de vital importância para entender o mecanismo fisiológico destas células e também a participação deles em patologias com incidência crescente.

Em nosso laboratório demos início a este projeto com o objetivo de avaliar se a LDL oxidada modulava a função de macrófagos M2. Em experimentos iniciais avaliamos a diferenciação de células espumosas *in vitro*. Macrófagos foram diferenciados a partir de monócitos do sangue periférico e a LDLox foi adicionada a estas culturas, foi possível observar o acúmulo de lipídios no citoplasma destas células, *in vitro*. A figura 3B mostra que os macrófagos estimulados com LDLox por 24 horas apresentam citoplasma avermelhado após coloração com *OilRed*, devido ao acúmulo de lipídeos.

Figura 3. Cultura de macrófagos e coloração *OilRed O*. Macrófagos M2 foram estimulados (B) ou não (A) com LDLox por 6 horas e posteriormente submetidos ao método de coloração de *OilRed O*, que marca em vermelho células que tem lipídeos no seu citoplasma. Foi possível observar que os macrófagos M2 diferenciados *in vitro* fagocitam a LDLox que foi adicionada (B), já as células sem estímulo com LDLox (A) não apresentaram a coloração avermelhada no citoplasma, já que não apresentam LDLox.

Assim, demos início ao presente trabalho onde avaliamos se a adição de LDLox altera diferentes funções dos macrófagos M2. Com os resultados obtidos trazemos uma contribuição importante para esclarecer a função dos M2 na aterosclerose e compreendermos melhor os mecanismos envolvidos na patogênese desta doença.

2. HIPÓTESE

Nossa hipótese é que na presença de LDLox os macrófagos M2 humanos têm sua função alterada. Nestas células ocorreria uma redução da função de reparo tecidual, maior secreção de mediadores pró-inflamatórios e o favorecimento da resposta inflamatória persistente na aterosclerose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar se macrófagos M2 têm sua função alterada na presença de LDL oxidada.

3.2 Abordagem experimental:

Investigar se na presença de LDLox:

1. Ocorre a morte dos M2;
2. Ocorre modulação dos marcadores de ativação celular, receptores *Scavenger* e secreção de citocinas pró-inflamatórias;
3. Há alteração na capacidade de fagocitose
4. Há alteração na angiogênese
5. Há mudança na formação da matriz extracelular
6. Os M2 tem mudança na expressão gênica de moléculas de adesão e proteínas da matriz extracelular.

4. DESENHO EXPERIMENTAL

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Purificação de Monócitos e Diferenciação de Macrófagos

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis doadores de plaquetas, obtidas após aprovação dos comitês de ética em pesquisa do Instituto do Coração nº 498/13 (Anexo A) e Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo (Anexo B), e assinatura do Termo de consentimento livre esclarecido (Anexo C) foram purificadas por gradiente de densidade de Ficoll Hypaque (Armstrong Biosciences, Suécia). Os monócitos foram purificados utilizando anticorpos anti CD14 conjugado a “beads” magnéticas e MACS® Cell Separation Columns 25LD, de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi, Auburn, CA). Os monócitos purificados foram plaqueados na concentração final de $0,5 \times 10^6$ células/ml em meio RPMI 1640 Gibco®™ Glutamax (Life Technologies, Canadá) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM de Glutamax, 100µg/ml de kanamicina, 1mM de piruvato de sódio Gibco® (Life Technologies, Canadá), e 50ng/ml de fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) (Peprotec, Rock Hill, NJ) por 7 dias a 37°C, 5% de CO₂ para geração de macrófagos. Posteriormente foi feita a diferenciação de macrófagos M1 e M2 pelo cultivo por 24 horas na presença de 1µg/ml de LPS e 20ng/ml de IFNγ para M1 e 20ng/ml de IL-4 para M2. LDL nativa e oxidada foi adicionada às culturas a concentração de 50µg/ml. Células não estimuladas, foram utilizadas como controle em todos os experimentos.

5.2 Purificação e oxidação de LDL

Para separar as lipoproteínas adicionamos 1mM de EDTA (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*) a 40 ml de plasma de indivíduos saudáveis, doadores de sangue (Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo). Em seguida a densidade do plasma foi ajustada a 1,019 g/ml utilizando brometo de potássio (KBr) (Merck, Alemanha). Esta amostra foi submetida à ultracentrifugação a 40.000 rpm por 12 horas a 4°C. O sobrenadante contendo lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) foi descartado.

A densidade foi novamente ajustada para 1,063 com KBr e a amostra foi submetida à ultracentrifugação, 40.000 rpm por 20 horas a 4°C. O LDL presente na fração superior foi coletado. Para remover o KBr presente na amostra parte da LDL foi submetida à diálise em tampão salina fosfato (PBS) suplementado ou não com 1mM de EDTA. Após 24 horas, a LDL dialisada na presença de EDTA foi coletada e armazenada a 4°C, protegida da luz para se manter na forma nativa, LDLn.

Para oxidar a fração de LDL dialisada apenas em PBS, foi adicionado 20uM de sulfato de cobre (CuSo4) (Merck, Alemanha) por 18 horas a 37°C. Para interromper a reação foi adicionado 1 mM de EDTA. Em sequência, a amostra foi submetida a nova diálise em PBS 1mM EDTA por 24 horas para remover o CuSo4. Desta forma foi obtida a LDL oxidada, LDLox.

A quantificação de proteínas foi determinada pelo método de Bradford utilizando albumina de soro bovino (BSA) para o preparo da curva de concentração.

A LDL foi armazenada a 4°C por um período máximo de 10 dias. Após este período, nova amostra era processada.

5.3 Eletroforese de LDL

As lipoproteínas purificadas foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão barbital sódico 5,5 g/L e ácido cítrico 0,25 g/L com pH 8,4. As amostras foram mantidas por 1 hora em uma corrente estabilizada de 60mA. Transcorrido o período de 1 hora o gel foi colocado em 100 ml de uma solução etanol:ácido acético 9:1 contendo 0,5g de *Sudan Black* por 10 horas. A visualização das lipoproteínas foi feita em luz branca.

5.4 Caracterização fenotípica dos monócitos e macrófagos

As PBMCs e os monócitos purificados utilizando *beads* CD14+ foram marcados com anticorpo anti CD14 e anti CD16, por 20 minutos no gelo, lavadas em tampão FACS (PBS, 2% SFB, 0.1% azida sódica) e analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur. As amostras foram analisadas utilizando o software CellQuest. Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos.

Os macrófagos não diferenciados, macrófagos M1 e M2 foram avaliados quanto à expressão dos seguintes receptores: CD14, CD36, CD80 e CD206 (BD Biosciences, CA). Após 20 minutos no gelo, as células foram lavadas em tampão FACS a 300g por 8 minutos e adquiridas em citômetro de fluxo FACS Calibur. As amostras foram analisadas utilizando o software CellQuest. Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos.

Os macrófagos antes e após estímulo com 50µg/ml de LDLox por 2 e 5 dias foram marcados com anticorpos para: CD14, CD163, CD36, CD209, CD86, CD31, CD11b, HLA-DR, CD44 e CD206 (BD Biosciences, CA). Após 20 minutos no gelo, as células foram lavadas em tampão FACS a 300g por 8 minutos e adquiridas em citômetro de fluxo FACS Calibur. As amostras foram

analisadas utilizando o software CellQuest. Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos.

5.5 Análise de viabilidade dos macrófagos M2

O Kit *Ready Probes® Cell Viability Imaging* (Thermo Scientific, EUA) foi utilizado para avaliar a viabilidade dos macrófagos mantidos em cultura por 2 e 4 dias na presença de LDLn e LDLox na concentração de 50µl/ml. De acordo com as instruções do fabricante, às culturas de macrófagos M2, foram adicionadas duas gotas do corante *NucBlue® Live* por ml de meio de cultura, para marcar o núcleo de todas as células em azul e igual quantidade do corante *NucGreen® Dead* que marca apenas células mortas em verde. Após uma incubação de 5 minutos em temperatura ambiente, as células foram observadas e fotografadas em microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX51) – Unidade de ensino e pesquisa do Hospital Albert Einstein.

Foram adquiridas em média 5 imagens por condição, de forma randomizada. A análise quantitativa das células totais e mortas foi feita utilizando o software *ImageJ*.

A análise estatística foi feita utilizando o One Way ANOVA para amostras não pareadas, comparando a média entre todas as colunas, ou seja, análise quantitativa das células totais X células mortas nas amostras controle (sem estímulo), estimuladas com LDLn e estimuladas com LDLox, utilizando o software *Graphpad Prism6*.

5.6 Dosagem de citocinas

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos M1 e M2 sem estímulos ou estimulados com LDLn ou LDLox durante 5 dias foram coletados e armazenados em freezer -80°C até sua utilização.

As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL12-p70 e TNF α foram dosadas utilizando o teste comercial *Cytometric Bead Assay* (CBA), (BD Biosciences, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Foram adquiridas 2.000 esferas por amostra no citômetro FACSCanto. Os dados foram analisados utilizando o software FCAP 3.1. (BD Biosciences, CA).

5.7 Análise de fagocitose pelos macrófagos M2

Após 24 horas de estímulo com as lipoproteínas, os sobrenadantes das culturas de macrófagos M1 e M2 foram substituídos por *Opti-Mem*® (Life Technologies, EUA) e as células foram mantidas na estufa a 37°C, 5% de CO₂. Após 1 hora o *Opti-Mem*® foi substituído no escuro por 0,5mg/ml de *pHrodo*® *Red E. Coli Bioparticles*® e as células foram mantidas na estufa a 37°C, 5% de CO₂ por mais 1 hora. Após esse período, as biopartículas foram retiradas e as células foram lavadas duas vezes com tampão Hepes 1M Gibco® (Life Technologies, Canadá) e permaneceram nesse tampão durante a análise.

A análise foi realizada em microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axiovert 200M) – Multiusuários Fapesp 2014/20328-3 - Rede premium/FMUSP.

Foram adquiridas em média 5 imagens por condição, de forma randomizada. A análise quantitativa da fluorescência das células foi avaliada utilizando o software *ImageJ*.

A análise estatística, utilizando o One Way ANOVA para amostras não pareadas, comparando a média entre todas as colunas, ou seja, comparando a intensidade de fluorescência das células controle (sem estímulos) X estimuladas com LDLn x estimuladas com LDLox, utilizando o software *Graphpad Prism6* e resultados apresentados em mediana e desvio padrão.

5.8 Análise da expressão gênica de proteínas da matriz extracelular e moléculas de adesão

5.8.1 Extração do mRNA

O Kit PureLink® RNA (Life Technologies, EUA) foi utilizado para a extração do RNA através de coluna de afinidade. Foram utilizados 2×10^6 de macrófagos M2 estimulados com 50µg/ml de LDLn ou LDLox por um período de 6 horas. Células não estimuladas mantidas em cultura, foram utilizadas como controle em todos os experimentos.

Após o processo de extração do RNA, de acordo com as instruções do fabricante, a eluição foi feita em 25µl de água livre de RNase. As amostras foram preservadas a -80°C até o uso.

A análise quantitativa foi feita utilizando o equipamento NanoDrop®, por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Foram utilizadas somente amostras cuja razão 260/280 foi superior a 1,8.

A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X (40 mM tris base, 40mM ácido acético e 1mM EDTA) contendo 1µg/ml de brometo de etídio. Em 0,5µg de cada amostra de RNA foi adicionado 5µl tampão de ureia (400µl TAE 50X, 3ml glicerol, 4,2g ureia, 1µg azul de bromofenol e 6,5 ml água livre de RNase) e 4µl de água livre de

RNase. As amostras foram mantidas por 1 hora em uma corrente estabilizada de 60mA. A visualização dos ácidos nucleicos foi feita em luz ultravioleta.

5.8.2 Transcrição reversa (cDNA)

O RNA extraído das células em cultura foi transcrito em cDNA, utilizando o kit *High Capacity RNA - to cDNA Master Mix*® (Applied Biosystems, EUA). De acordo com as instruções do fabricante, foram colocados 4µl de Master Mix Completo junto a 1µg do RNA eluído em água e o volume total da reação foi elevado a 20µl com água livre de RNase. As amostras foram colocadas em termociclador para a transcrição reversa por 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. As amostras foram preservadas a - 20°C até o uso.

5.8.3 PCR de HPRT

A reação de PCR para a amplificação do Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT), foi feita utilizando 1 unidade de *TaqDNA Polimerase I* (Applied Biosystems, EUA), 1µl de tampão de PCR 4x, Cloreto de Magnésio 1mM, dNTP 0,1mM, 2,5% do produto final do cDNA, 0,5µM dos Primer 5' e 3' (5' CCTGCTGGATTACATCAAAGCA – 3' TCCAACACTTCGTGGGGTCCT) e 7µl de água livre de RNase. As reações foram realizadas em placas de 96 poços em triplicatas técnicas para cada amostra. A amplificação foi feita em termociclador onde as amostras foram mantidas por 2 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C. A reação foi mantida por 10 minutos a 72°C e posteriormente a 4°C. As amostras foram preservadas a -20°C até o uso.

O produto da reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1x e brometo de etídio 1µg/ml. A visualização do cDNA amplificado foi feita em luz ultravioleta.

5.8.4 Reação de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

O cDNA obtido foi utilizado para avaliar a expressão dos genes listados na tabela 1, utilizando o kit *Taq Man Array Extracellular Matrix & Adhesion Moleculares* 96 – Well Plate (Applied Biosystems, EUA). A utilização desta metodologia nos permitiu avaliar a expressão de 87 genes alvos e 9 genes endógenos em cada amostra. Entre os genes de interesse estão proteases, inibidores de proteases, constituintes da matriz extracelular, membrana basal e integrinas. Foram usados 20µl de cDNA, 1060µl água *DNase free* 1080µl de TaqMan® máster mix para cada placa. Foram adicionados 20µl por poço. A placa foi coberta com uma película adesiva óptica MicroAmp, centrifugada por 1 minuto a 300g e colocada em termociclador 7500 Real-Time PCR system® por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, por 40 ciclos.

A tabela 1 mostra os genes avaliados agrupados por função.

Tabela 1 – Lista dos genes incluídos no Array por PCR em tempo real

GENES AVALIADOS	
Moléculas Transmembranas	CD44, CDH1, HAS1, ICAM1, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGAL, ITGAM, ITGAV, ITGB1, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, MMP14, MMP15, MMP16, NCAM1, PECAM1, SELE, SELL, SELP, SGCE, SPG7, VCAM1
Adesão Célula-Célula	CD44, CDH1, COL11A1, COL14A1, COL6A2, CTNND1, ICAM1, ITGA8, VCAM1.
Adesão Célula-Matriz	ADAMTS13, CD44, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGAL, ITGAM, ITGAV, ITGB1, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, SGCE, SPP1, TSP3.
Outras Moléculas de Adesão	CNTN1, COL12A1, COL15A1, COL16A1, COL5A1, COL6A1, COL7A1, COL8A1, VCAN, CTGF, CTNNA1, CTNNB1, CTNND2, FN1, KAL1, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMB1, LAMB3, LAMC1, TSP1, TSP2, CLEC3B, TNC, VTN.
Constituintes da Membrana Basal	COL4A2, COL7A1, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMB1, LAMB3, LAMC1, SPARC.
Constituintes da Matriz e Colágenos	COL11A1, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL1A1, COL4A2, COL5A1, COL6A1, COL6A2, COL7A1, COL8A1, FN1, KAL1.
Proteases de Matriz	ADAMTS1, ADAMTS13, ADAMTS8, MMP1, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, SPG7, TIMP1
Inibidores de Proteases de Matriz	COL7A1, KAL1, TSP1, TIMP1, TIMP2, TIMP3.
Outras Moléculas de Matriz	VCAN, CTGF, ECM1, HAS1, SPP1, TGFBI, TSP2, TSP3, CLEC3B, TNC, VTN.
Endógenos	18S, GAPDH, HPRT1, GUSB, ACTB, B2M, RLP0, HMBS, TBP

18S(Eukaryotic 18S rRNA;**ACTB** (actin, beta); **ADAMTS1** - ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1; **ADAMTS13** - ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 13; **ADAMTS8** - ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8;**B2M** (beta-2-microglobulin); **CD44** – Cluster of Differentiation 44; **CDH1** - cadherin 1, type 1, E-cadherin; **CLEC3B** - C-type lectin receptor; **CNTN1** - contactin 1; **COL11A1** - collagen, type XI, alpha 1; **COL12A1** - collagen, type XII, alpha 1; **COL14A1** - collagen, type XIV, alpha 1; **COL15A1** - collagen, type XV, alpha 1; **COL16A1** - collagen, type XVI, alpha 1; **COL1A1** - collagen, type I, alpha 1; **COL4A2** - collagen, type VI, alpha 2; **COL5A1** - collagen, type V, alpha 1; **COL6A1** - collagen, type VI, alpha 1; **COL6A2** - collagen, type VI, alpha 2; **COL7A1** - collagen, type VII, alpha 1; **COL8A1** - collagen, type VIII, alpha 1; **CTGF** – connective tissue growth factor; **CTNND1** - catenin (cadherin-associated protein), delta 1; **CTNND2** - catenin (cadherin-associated protein), delta 2; **ECM1** - extracellular matrix protein 1; **FN1** - fibronectin 1;**GAPDH** (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase);**GUSB** (glucuronidase, beta); **HAS1** - hyaluronan synthase 1;**HMBS** (hydroxymethylbilane synthase);**HPRT1** (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1);**ICAM1** - intercellular adhesion molecule 1; **ITGA1** - integrin, alpha 1; **ITGA2** - integrin, alpha 2; **ITGA3** - integrin, alpha 3; **ITGA4** - integrin, alpha 4; **ITGA5** - integrin, alpha 5; **ITGA6** - integrin, alpha 6; **ITGA7** - integrin, alpha 7; **ITGA8** - integrin, alpha 8; **ITGAL** - integrin, alpha L (antigen CD11A, lymphocyte function-associated antigen 1); **ITGAM** - integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit); **ITGAV** - integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51); **ITGB1** - integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29); **ITGB2** - integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit); **ITGB3** - integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61); **ITGB4** - integrin, beta 4; **ITGB5** - integrin, beta 5; **KAL1** - Kallmann syndrome 1 sequence; **LAMA1** - laminin, alpha 1; **LAMA2** - laminin, alpha 2; **LAMA3** - laminin, alpha 3; **LAMB1** - laminin, beta 1; **LAMB3** - laminin, beta 3; **LAMC1** - laminin, gamma 1; **MMP1** - matrix metalloproteinase 1; **MMP10** - matrix metalloproteinase 10; **MMP11** - matrix metalloproteinase 11; **MMP12** - matrix metalloproteinase 12; **MMP13** - matrix metalloproteinase 13; **MMP14** - matrix metalloproteinase 14;

MMP15 - matrix metalloproteinase 15; **MMP16** - matrix metalloproteinase 16; **MMP2** - matrix metalloproteinase 2; **MMP3** - matrix metalloproteinase 3; **MMP7** - matrix metalloproteinase 7; **MMP8** - matrix metalloproteinase 8; **MMP9** - matrix metalloproteinase 9; **NCAM1** - neural cell adhesion molecule 1; **PECAM1** - platelet/endothelial cell adhesion molecule; **RPLP0** (ribosomal protein, large, P0); **SELE** - Selectin E; **SELL** - Selectin L; **SELP** - Selectin P; **SGCE** - sarcoglycan, epsilon; **SPARC** - secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin); **SPG7** - spastic paraplegia 7; **SPP1** - secreted phosphoprotein 1; **TBP** (TATA box binding protein); **TGFB1** - transforming growth factor, beta 1; **TSP1** - thrombospondin 1; **TSP2** - thrombospondin 2; **TSP3** - thrombospondin 3; **TIMP1** - TIMP metalloproteinase inhibitor 1; **TIMP2** - TIMP metalloproteinase inhibitor 2; **TIMP3** - TIMP metalloproteinase inhibitor 3; **TNC** - Tenascin C; **VCAM1** - vascular cell adhesion molecule 1; **VCAN** - versican; **VTN** - vitronectin.

5.8.5 Procedimento para análise dos dados de expressão gênica

A análise da expressão gênica foi feita da seguinte maneira: para selecionar o gene endógeno a ser usado como normalizador nas análises de expressão dos genes alvos, foi feita a comparação dos Cts (Ciclo de amplificação) de cada um dos 9 genes candidatos a endógenos incluídos no kit *Taq Man Array Extracellular Matrix & Adhesion Moleculares* 96. As análises subsequentes foram feitas usando a média de três genes normalizadores que apresentaram menor Ct e desvio padrão quando comparados aos demais endógenos, são eles: B2M, GUSB e HPRT.

Para a normalização subtraímos o Ct do gene alvo da média do Ct dos 3 genes normalizadores e assim obtivemos o valor do delta Ct (ΔCt). Na sequência o valor do delta Ct de cada gene detectado na amostra estimulada com LDLox ou LDLn foi subtraído do valor encontrado na amostra controle, delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) e por fim foi feito o cálculo da expressão relativa, o *Fold Change*. A fórmula utilizada para a quantificação relativa foi: $Fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ como descrito por (Schmittgen e Livak, 2008). Consideramos inibição da expressão gênica amostras onde o *Fold change* foi menor que 0,5. Aumento da expressão gênica, *Fold change* maior que 2. Genes com *Fold change* entre 0,5 e 2 foram considerados como sem alteração. A análise estatística, usando o teste t pareado, foi feita comparando o delta Ct da amostra estimulada com o

delta Ct da amostra controle, utilizando o software *Graphpad Prism6*. Os genes com Ct maior que 38 não foram considerados nas análises.

5.9 Análise de TSP1 e ColVI por microscopia confocal

Macrófagos M2 foram removidos da placa de cultura com auxílio de solução de PBS 0,5mM EDTA e foram replaqueados em *chamber slides* tratadas com *permanox* (Nunc® Lab-Tek® Thermo Scientific, EUA) na concentração de $0,6 \times 10^5$ de células por poço. Essas células foram estimuladas com 50µg/ml de LDLn ou LDLox durante 5 dias e mantidas na estufa a 37°C, 5% de CO₂.

Após 5 dias os poços foram lavados 2 vezes com 400µl de PBS e 300µl de metanol gelado foram adicionados por 10 minutos. O metanol foi retirado e os poços lavados 2 vezes com 300µl de PBS. Após a segunda lavagem as amostras foram mantidas na presença de 300µl de PBS por 10 minutos para reidratar. Após esse período, foram adicionados 300µl de PBS- BSA 2% durante 1 hora e 30 minutos a 37°C para o bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida as células foram incubadas com anticorpos anti trombospondina 1 (*mouse monoclonal* A6.1; Abcam, Inglaterra) diluído 1:50 e anticolágeno 6A1 (*rabbit policlonal*; Abcam, Inglaterra) também diluído 1:50 em PBS-BSA 2%, volume final 100µl por poço a 4°C por 18 horas.

Após a incubação, os poços foram lavados 3 vezes com 300µl de PBS e incubados com anticorpos secundários; *Donkey anti mouse* conjugado com Alexa 647nm 1:200 (Abcam, Inglaterra), *Donkey anti rabbit* conjugado com Alexa 546nm 1:200 (Abcam, Inglaterra), faloidina conjugada com Alexa 488nm

1:200 (Abcam, Inglaterra) e dapi 300nM (Abcam, Inglaterra) em PBS-BSA 2%, volume final 100µl por poço, em temperatura ambiente, protegido da luz por 1 hora e 30 minutos. Após a incubação os poços foram lavados 3 vezes com 300µl de PBS.

As lâminas foram montadas com PBS contendo glicerol 1:1. As fotos foram obtidas utilizando microscópio confocal (Zeiss LSM510-Meta) – Multiusuários Fapesp 2014/20328-3 - Rede premium/FMUSP.

Foram adquiridas em média 5 imagens por condição, de forma randomizada. A fluorescência das células foi avaliada utilizando o software *ImageJ*.

A análise estatística, utilizando o One Way ANOVA ANOVA para amostras não pareadas, comparando a média entre todas as colunas, ou seja, foi comparada a intensidade de fluorescência das células controle (sem estímulos) X estimuladas com LDLn X estimuladas com LDLox, utilizando o software *Graphpad Prism6*.

5.10 Obtenção e cultura de MEFs para avaliação da matriz extracelular incubada com sobrenadante de macrófagos M2

Os experimentos para o estabelecimento das culturas de MEFs (fibroblastos embrionários de camundongos) foram feitos em colaboração com a aluna de doutorado Patrícia Nolasco do laboratório de biologia vascular – Instituto do Coração, sob supervisão do Professor Doutor Francisco Laurindo.

Camundongos da linhagem C129 foram acasalados, e os embriões resultantes foram utilizados para a extração dos MEFs. Após a separação para

o acasalamento, as fêmeas foram checadas nos dias seguintes para verificação da formação do “plug vaginal” que indica o acasalamento.

Transcorridos 13-14 dias do acasalamento, as fêmeas foram submetidas à eutanásia por anestesia com uma mistura de 3,5mg/Kg xilazina e 30mg/Kg ketamina seguida de deslocamento cervical.

O útero foi removido para coleta dos embriões. Em condições estéreis, os embriões foram isolados e lavados com PBS estéril. Em seguida os embriões foram macerados (cada embrião separadamente) e submetidos à digestão enzimática com solução de tripsina 0,25% + EDTA 0,02%, por 30 minutos a 37°C. A digestão foi interrompida pela adição de meio de cultura DMEM baixa glicose, suplementado com 10% de SFB, 400U/ml penicilina e 50mg/ml estreptomicina.

Para a produção da matriz extracelular os MEFs foram plaqueados nas *chamber slides* tratadas com *permanox*, na concentração de 5×10^4 células/ml e mantidas a 37°C, 5% CO₂ por 3 dias. Após esse período parte do meio de cultura foi substituído por sobrenadantes previamente coletados das culturas de macrófagos M2 estimulados ou não com 50µg/ml de LDLn, LDLox. As culturas de MEFs estimulados com este meio condicionado foram mantidas por 5 dias a 37°C, 5% CO₂ para avaliarmos se os macrófagos M2 secretam mediadores que degradam a matriz extracelular. Após esse período os poços foram lavados 2 vezes com 400µl de PBS e foram adicionados 300µl de metanol gelado por 10 minutos. O metanol foi retirado e os poços lavados 2 vezes com 300µl de PBS. Após a segunda lavagem, as amostras foram mantidas na presença de 300µl de PBS por 10 minutos para reidratar. Após esse período, foram adicionados 300µl de PBS- BSA 2% durante 1 hora e 30

minutos a 37°C para o bloqueio. Em seguida as células foram incubadas com anticorpo anti Fibrilina1 (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Francisco Laurindo, Laboratório de biologia vascular – Instituto do Coração), e dapi 300nM (Abcam, Inglaterra).

Após a incubação os poços foram lavados 3 vezes com 300µl de PBS e incubados com anticorpo secundário *Donkey anti rabbit* conjugado com Alexa 546nm 1:200 (Abcam, Inglaterra) em PBS-BSA 2%, volume final 100µl por poço, em temperatura ambiente, protegido da luz por 1 hora e 30 minutos. Após a incubação os poços foram lavados 3 vezes com 300µl de PBS.

A lâmina foi montada com PBS contendo glicerol 1:1. As imagens foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência confocal (Zeiss LSM510-Meta) – Multiusuários Fapesp 2014/20328-3 - Rede premium/FMUSP.

5.10.1 Análise e Processamento das Imagens de Matriz extracelular

A análise das imagens de matriz extracelular foi feita em colaboração com o Dr. Andrés Ignacio Rodríguez Molaes, professor da Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Bio-Bio, Chillán, Chile.

5.10.2 Filtro de imagem baseado em Hessian

Matematicamente, as fibras podem ser representadas como estruturas curvilíneas que possuem variações de intensidade locais (mínimos ou máximos). Essas variações de valor local podem ser detectadas usando uma matriz de Hessian, que descreve a informação de segunda ordem ou a curvatura dessas variações de intensidade (Sato *et al.*, 1998). Assim, as

imagens foram analisadas usando um filtro com base na matriz Hessian que especificamente extrai informações de linhas da imagem original.

Consequentemente, as imagens da matriz extracelular foram extraídas por recurso através de um filtro baseado em Hessian software *ImageJ* (versão 1.44), e plugin *FeatureJ* (Meijering, 2003). Vários parâmetros são selecionáveis neste plugin. Com base nos melhores resultados obtidos na nossa "análise de perfil de varredura de linha" descrita no parágrafo abaixo, selecionamos as seguintes opções de parâmetros de forma empírica: 1) "Maior autovalor da força do tensor de Hessian" e 2) opção de "Comparação do autovalor absoluto" E configure o fator "Escala de Suavização" para 2.0. Esta configuração gera uma imagem resultante de autovalores maiores após comparar os valores absolutos das matrizes de Hessian. Escolhemos a opção de comparação absoluta, uma vez que a alteração no sinal (positivo ou negativo) do valor de intensidade, dependendo da curvatura ao longo de uma linha, é irrelevante para o nosso propósito de contagem de fibras. As imagens resultantes foram convertidas em 8 bits antes da análise de varredura de linha.

5.10.3 Detecção de pico

As matrizes de intensidade com linhas de base ajustadas foram então processadas através de um macro de excel de alta detecção. O número total de picos foi então dividido pelo comprimento de cada linha para produzir o número médio de picos por mm de varredura. A intensidade de cada pico foi utilizada para estimar a espessura da fibra.

5.11 Análise da expressão gênica de TSP1

Para avaliarmos a expressão gênica de TSP1, as culturas de M2 foram estimuladas ou não com lipoproteínas durante 3 e 6 horas. O RNA foi extraído e o cDNA sintetizado como descrito anteriormente (seções 5.8.1 e 5.8.2).

As reações de qRT-PCR foram feitas utilizando o reagente *SYBR-Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA). Para cada reação foram utilizados 5µl do *Master Mix*, 50nM de cada um dos primers TSP1 5' e 3' (5' GACTCTCCAATTGATGGATGCC –3' CACTGGATGCCATTTCCACTGT) e HPRT 5' e 3' (5' TCCAACACTTCGTGGGGTCCT –3' CCTGCTGGATTACATCAAAGCACTG), 5µl de cDNA em 10µl de volume final de reação. Foi utilizado o equipamento 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, EUA). As reações foram realizadas em placas de 96 poços contendo triplicatas técnicas para cada amostra. A amplificação foi feita em 40 ciclos de 30 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. A curva de dissociação foi feita em seguida. O gene endógeno HPRT foi utilizado como normalizador.

A análise foi feita pelo método de ΔC_t e a expressão relativa calculada utilizando a fórmula, expressão relativa = $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A análise estatística foi feita utilizando o teste t pareado.

5.12 Análise da expressão proteica de TSP1 por DotBlot

Os experimentos de DotBlot foram realizados utilizando a cubeta *Minifold® / Dot-Blot System* (Whatman®, EUA). O equipamento foi montado usando papel de filtro, membranas de nitrocelulose e então acoplado à bomba de vácuo.

Cada poço da cubeta foi lavado 3 vezes com 200µL de PBS. Em seguida, 200µL do sobrenadante das culturas de macrófagos, diluído 1:50 foi adicionado a cada poço, que então foi lavado mais 3 vezes com 200µL de PBS. A membrana foi retirada da cubeta e mantida em Tampão de Bloqueio (TBS+Tween e 0,75 g do Tampão Blotting) durante 2 horas em um agitador horizontal.

Em seguida a membrana foi lavada com PBS+Tween e o anticorpo primário anti-TSP1 1:2000 (anticorpo monoclonal feito em camundongos – Abcam [ab1823], Cambridge, MA), foi adicionado durante 18 horas, em um agitador horizontal a 4°C. A membrana então foi lavada 3 vezes com PBS+Tween, durante 10 minutos cada lavagem.

Ao fim deste processo, adicionamos o anticorpo secundário IRDye® 680RD *Donkey anti mouse* IgG (Li-Cor, Lincoln, NE) 1:10000, por 2 horas. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS+Tween, por 10 minutos cada lavagem.

As imagens foram obtidas e a intensidade de fluorescência analisada utilizando o software *Odyssey Infrared Imaging System* (Li-CorBiosciences Lincoln, NE), versão 3.0. Os parâmetros usados para a aquisição das imagens foram: resolução de 169µm, focus offset 0.0mm e intensidade de 3.0 no canal de 700.

5.13 Cultura de HUVECs para avaliação da indução de angiogênese na presença ou ausência de sobrenadante de macrófagos M2

Células endoteliais do cordão umbilical humano, HUVECs (do inglês, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) (gentilmente cedidas pelo Prof. Dr

Francisco Laurindo, Laboratório de biologia vascular – Instituto do Coração) foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células em garrafas de 75 cm² e mantidas a 37°C, 5% CO₂, por aproximadamente 4 dias até atingirem confluência de 80%. As HUVECs foram removidas da garrafa com o auxílio de solução tripsina EDTA 0.25% (Thermo-Fisher, MA) contadas e ressuspensas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB.

Os poços de placas de cultura foram revestidos utilizando 50 µL de solução Geltrex® (Applied Biosystems, EUA) por cm² da superfície do poço, seguindo as instruções do fabricante. A placa revestida foi incubada a 37° C durante 30 minutos para permitir que a solução de geltrex® solidificasse. As HUVECs foram plaqueadas com DMEM suplementado com 10% de SFB na concentração de $2,5 \times 10^4$ célula/poço, sobre o geltrex®. Após o plaqueamento, foram adicionados 20% de sobrenadante previamente coletado das culturas de macrófagos M2 estimulados ou não com 50µg/ml de LDLn ou LDLox. As culturas de HUVECs mantidas na presença deste meio condicionado foram incubadas por 18 horas a 37°C, 5% CO₂ e então avaliadas em microscópio Axiovert 25 – Carl Zeiss.

Foram adquiridas em média 5 imagens por condição, de forma randomizada. O número de nós formado pelas HUVECs foi avaliado utilizando o software *ImageJ* e o plug-in *Angiogenesis Analyser*.

A análise estatística, utilizando o One Way ANOVA, foi feita comparando a média entre todas as colunas do número de nós de HUVECs pura X HUVECs com sobrenadante de culturas controle (sem estímulos) X HUVECs com sobrenadante de culturas com LDLn X HUVECs com sobrenadante de culturas com LDLox, utilizando o software *Graphpad Prism6*.

6. RESULTADOS

Com o desenvolvimento deste projeto, tivemos por objetivo avaliar se a LDLox modula diferentes funções dos macrófagos M2.

Inicialmente descrevemos a padronização das metodologias utilizadas para o estabelecimento do nosso modelo de diferenciação celular *in vitro*, como a purificação de monócitos, a diferenciação de macrófagos e também a purificação e oxidação de LDL. Após o estabelecimento destas metodologias avaliamos diretamente o efeito da LDL oxidada sobre a fisiologia dos macrófagos M2.

A etapa inicial para o desenvolvimento do nosso projeto era a purificação de monócitos a partir da PBMC de indivíduos saudáveis. A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a pureza dos monócitos obtidos. A PBMC de duas populações celulares foram observadas usando parâmetros de tamanho, FSC (do inglês, *forward scatter*) e granularidade, SSC (do inglês, *side scatter*), tipicamente linfócitos e monócitos (Figura 4 painel esquerdo). Após a separação magnética utilizando anticorpos anti CD14 conjugados a “beads” magnéticas, observamos, ainda usando critérios de FSC x SSC que nas células selecionadas positivamente houve o enriquecimento da população de maior tamanho (Figura 4, painel central inferior). Já na população CD14- havia predomínio da população de menor tamanho (Figura 4, painel central superior). A análise da expressão de CD14 confirmou a predominância (pureza de 95%, não mostrado) de monócitos na população purificada. Células CD16+ foram identificadas na população CD14-, sugerindo a presença de células NK (Figura 4, painel direito superior). A dupla marcação com CD16 indicou a presença de

monócitos tanto CD14+CD16+ como CD14+CD16- na população purificada (Figura 4, painel direito inferior).

Estes resultados indicaram que a separação magnética poderia ser utilizada de forma eficiente para o enriquecimento da população de monócitos necessários para a diferenciação de macrófagos *in vitro*.

Figura 4. Purificação de células CD14+ a partir de células mononucleares do sangue periférico. A PBMC foi incubada com anticorpos anti CD14 acoplado a *beads* magnéticas. Após processo de separação, as 3 amostras de células: PBMC, células CD14- e células CD14+ foram avaliadas por citometria de fluxo. A presença de 2 populações celulares foi detectada na PBMC utilizando FSC x SSC (painel esquerdo), tipicamente linfócitos e monócitos. Foi possível observar um enriquecimento da população de maior tamanho após a separação magnética com CD14 (painel central inferior) e da população de menor tamanho nas células não positivas para CD14 (painel central superior). Duas subpopulações de monócitos, CD14+CD16- e também CD14+ CD16+, foram detectadas na população purificada (painel direito inferior). Células CD16+ foram encontradas na população CD14, indicando a presença de células NK (painel direito superior). Dados representativos de 3 experimentos.

Os monócitos purificados foram colocados em cultura na presença de M-CSF durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após este período, os macrófagos foram polarizados para M1 utilizando IFN γ e LPS, e para macrófagos M2 utilizando IL-4, por 24 horas.

A presença dos marcadores de superfície destas duas populações foi avaliada por citometria de fluxo. Foram utilizadas as seguintes moléculas:

CD14, CD36, CD80 e CD206 (Figura 5). O CD36, um receptor *Scavenger* capaz de reconhecer a LDLox e o CD206, receptor de manose, uma lectina tipo C, são preferencialmente expressos em macrófagos M2. O CD80, uma molécula co-estimulatória é preferencialmente expressa em macrófagos ativados e M1 (Martinez e Gordon, 2014).

Observamos em nossos experimentos que as diferentes populações de macrófagos são CD14 positivas, já que todos os macrófagos possuem este marcador em sua superfície. Com relação ao CD36, observamos a expressão em macrófagos não diferenciados (MΦ) e nos M2, mas não nos M1. O CD80 mostrou forte expressão nos M1, CD80^{high}, porém com uma expressão mais discreta nos MΦ e no M2, CD80^{low}. Já a expressão de CD206 foi detectada preferencialmente nos M2 (Figura 5). Estes resultados indicam que a diferenciação dos macrófagos em M2 foi feita de forma adequada em nosso modelo *in vitro*.

Figura 5. Análise por citometria de fluxo de macrófagos M1 e M2. Macrófagos não polarizados ($M\Phi$), macrófagos M1, diferenciados utilizando IFN γ e LPS, e macrófagos M2, diferenciados usando IL-4, foram avaliados quanto à expressão de CD14, CD36, CD80, CD206. Nos histogramas a linha preta indica células não marcadas e a linha verde células marcadas com o respectivo anticorpo. Foi possível observar que todas as populações celulares avaliadas expressam CD14. CD36 foi detectado em macrófagos não polarizados e em M2. CD80 foi preferencialmente detectado em macrófagos M1 e o CD206 em M2. Dados representativos de 3 experimentos.

Foram feitos experimentos para purificação e oxidação da LDL presente no plasma de indivíduos saudáveis, doadores de sangue. Para evitar variações interindividuais na LDL a ser usada como estímulo nas culturas, o plasma de 4 indivíduos foi misturado antes da purificação por ultracentrifugação. A LDL obtida foi mantida na forma nativa ou oxidada na presença de $CuSO_4$.

Para analisarmos se o processo de oxidação da LDL foi eficaz, as lipoproteínas foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose, que foi

corado com *Sudan Black*. Após 10 horas foi possível visualizar bandas de LDLn e LDLox no gel (Figura 6). Observou-se que a amostra de LDLox apresenta maior mobilidade em direção ao polo positivo quando comparado à amostra da LDLn, indicando que a LDLox estava negativamente carregada. Este resultado indica que o processo de oxidação foi efetivo. Nossos resultados foram semelhantes ao descrito por Massaeli e colaboradores (Massaeli *et al.*, 1999). As amostras de LDLn e LDLox foram então utilizadas nos experimentos de cultura celular.

Figura 6. Eletroforese de LDL em gel de agarose 0,8%. A LDL purificada do plasma de indivíduos saudáveis antes (a) e depois da oxidação com CuSO_4 (b) foi submetida à eletroforese em gel de agarose com tampão barbital sódico e corado com *Sudan Black* por 10 horas. Foi possível observar que a amostra de LDLox apresenta maior mobilidade em direção ao polo positivo quando comparado à amostra da LDLn indicando que a LDLox estava negativamente carregada. Figura representativa de 4 experimentos.

Em nossos experimentos subsequentes, demos início à análise do efeito da LDLox diretamente nos macrófagos M2. Investigamos se a adição de LDLox era capaz de induzir a morte das células. Para avaliar a viabilidade dos macrófagos M2 mantidos em cultura por 2 e 4 dias, na presença ou não de LDLn ou LDLox, utilizamos o kit *Ready Probes® Cell Viability Imaging*,

Blue/Green. O reagente *NucBlue® Live* marcou o núcleo de todas as células em azul, mas apenas células com comprometimento da integridade da membrana plasmática apresentam fluorescência verde após a utilização do reagente *NucGreen® Dead*. Após 5 minutos de incubação com os corantes, as culturas foram visualizadas utilizando microscópio de fluorescência invertida e o percentual de células mortas e vivas foi avaliado utilizando o software *ImageJ*. Em todas as condições testadas foi possível observar que o percentual de células mortas não ultrapassou 1% do total de células investigadas (Figura 7). Estes dados sugerem que o estímulo com LDL não altera de forma significativa a viabilidade dos macrófagos M2.

Em seguida, investigamos se a adição de LDLox era capaz de modular a expressão de diversos receptores de superfície nos macrófagos M2, por citometria de fluxo.

Avaliamos a expressão de receptores *Scavenger* como: CD36, CD163, lectinas CD206 (receptor de manose) e CD209 (DC-SIGN); moléculas co-estimulatórias como CD86; moléculas de adesão como CD31 (PECAM), CD44 e a integrina CD11c (ITGAX); e ainda HLA-DR, envolvido na apresentação antigênica. As células foram estimuladas com 50ug/ml de LDLn ou LDLox por diferentes períodos de tempo e analisadas por citometria de fluxo. Foi possível observar que a adição de LDL oxidada ou nativa não alterou a expressão de nenhum destes receptores após 1, 2 ou 3 dias em cultura (Figura 8A, B e C, respectivamente).

Figura 7. Análise da viabilidade dos macrófagos M2 após estímulos com LDL. Macrófagos M2 estimulados ou não com LDLn ou LDLox durante 2 (A) e 4 (B) dias foram incubados com *ReadyProbes® Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green* durante 5 minutos. A fluorescência foi detectada em microscópio de fluorescência invertido e o número de células totais e mortas foi quantificado utilizando o software *ImageJ*. Imagens representativas de culturas de macrófagos não estimulados (C), e estimulados com LDLn (D) ou LDLox (E). Aumento de 20X. Figura representativa de 4 experimentos.

Figura 8. Análise por citometria de fluxo de macrófagos M2 estimulados com LDLn ou LDLox. Os macrófagos M2 foram mantidos em cultura por 1 (A), 2 (B) ou 3 (C) dias na presença de LDLn (50ug/ml) ou LDLox (5 ou 50ug/ml). Após esse período as células foram avaliadas quanto à expressão de: CD14, CD36, CD163, CD206, CD209, CD44, CD31, CD86, CD31, HLA-DR e CD11b. Nos histogramas a linha escura indica células não marcadas, a linha verde células estimuladas com LDLn, a rosa e a azul indicam M2 estimulados com 5 ou 50ug/ml de LDLox, respectivamente, marcadas com o anticorpo indicado. A adição de lipoproteínas não alterou a expressão de nenhuma das moléculas avaliadas. Dados de um experimento representativo de 5.

A secreção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL12-p70 e TNF α foi avaliada no sobrenadante das culturas de macrófagos estimulados ou não com LDLn ou LDLox. Para investigar se estas células eram capazes de modular a produção destas citocinas, utilizamos o kit *Cytometric Bead Assay (CBA)*. Como este kit detecta a presença de diversas citocinas pró-inflamatórias, foram incluídas na análise amostras do sobrenadante das culturas de macrófagos M1 também estimulados com LDL. Foi possível observar que a adição de LDLox aumentou a secreção da citocina pró-inflamatória IL-8. No sobrenadante das culturas de macrófagos M1 não estimuladas detectamos $33038 \pm 2101,9$ pg/ml de IL-8. Já nas culturas estimuladas com LDLox foram detectados $37873,1 \pm 3248,8$ pg/ml de IL-8, um aumento de 14,6%. Nas culturas de macrófagos M2 não estimuladas foram detectados $1166 \pm 473,1$ pg/ml de IL-8. O estímulo com LDLox induziu a secreção de $2999,5 \pm 590,9$ pg/ml de IL-8, um aumento de 157% em relação as células sem estímulo (Figura 9A).

Quando avaliamos a expressão de IL-6 nas culturas não estimuladas, foram detectados $170,1 \pm 54,5$ pg/ml em M1 e $26,6 \pm 13,4$ pg/ml em M2, mas em células estimuladas com LDLox houve uma redução de 15% na expressão de IL-6 em M1 e 21% em M2 (Figura 9B). Observamos na expressão de IL-10 tanto em M1 como em M2, apresentou uma diminuição de 33% e 34% respectivamente, em sua expressão, em células estimuladas com LDLox quando comparadas com culturas não estimuladas (Figura 9C). As citocinas IL-1 β , IL-12p70 e TNF α não foram detectadas após 5 dias de estímulo no sobrenadante das culturas de macrófagos M2 (resultados não mostrados).

Figura 9. Análise por citometria de fluxo da produção de citocinas no sobrenadante de culturas de macrófagos M1 e M2. As células foram estimuladas ou não com LDLn ou LDLox durante 5 dias. Os sobrenadantes foram analisados por CBA para detectar a secreção de IL-10, IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-12p70 e TNF α . Observou-se que os macrófagos M2 secretam IL-8 quando estimulados com LDLox. Na presença de LDLox uma discreta redução secreção de IL-6 e IL-10 foi detectada. As citocinas IL-1 β , IL-12p70 e TNF α não foram detectadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos M2. (n=3)

Posteriormente foram feitos experimentos para avaliar se a presença de LDL altera outra função primordial dos macrófagos, a fagocitose. Nestes experimentos também foram utilizados macrófagos M1, já que a função fagocítica desta subpopulação também está bem descrita na literatura

(Mantovani *et al.*, 2004). Os macrófagos M1 e M2 mantidos na presença de 50µg/ml de LDLn ou LDLox durante 24 horas foram então expostos ao *pHrodo® Red E. coli BioParticles® Conjugate for Phagocytosis* durante 1 hora. Estas biopartículas de *E. coli* são conjugadas com corante sensível ao pH. Em pH neutro nenhuma fluorescência é observada, no entanto em pH ácido uma intensa fluorescência vermelha pode ser detectada. Desta forma, nas culturas de macrófagos, uma fluorescência vermelha brilhante no citoplasma pode ser observada somente após a fagocitose das biopartículas, pois após a fusão com o lisossomo ocorre a acidificação do fagolisossomo para pH de aproximadamente 4,5 (Weiss e Schaible, 2015).

Em todas as condições testadas foi possível observar, em microscópio de fluorescência invertida, a presença de biopartículas vermelhas no citoplasma das células, de forma homogênea (Figura 10). A intensidade de fluorescência foi quantificada utilizando o software *ImageJ*.

Nas culturas de macrófagos M1 não estimuladas, a intensidade de fluorescência detectada, em unidades arbitrárias, foi 37338 ± 3084 . Nas culturas com estímulo de LDLn, 20151 ± 29610 e com LDLox, 20610 ± 20812 (Figura 10A). Nas culturas de macrófagos M2 não estimuladas a intensidade de fluorescência detectada foi 42815 ± 19610 . Nas culturas com estímulo de LDLn 35529 ± 18537 e com LDLox 45323 ± 24141 (Figura 10B). Foi possível observar que tanto os macrófagos M1 (Figura 10A) como M2 (Figura 10B) na presença ou não de LDLn ou LDLox apresentam intensidade de fluorescência semelhante, sugerindo que a LDL não alterada a capacidade de fagocitose dos macrófagos. Cada ponto apresentado nos gráficos representa a intensidade de fluorescência de uma célula analisada. As figuras 10C e 10D mostram imagens

representativas de um experimento com macrófagos M1 e M2, respectivamente. Nas culturas onde não houve a adição do *pHrodo® Red* nenhuma fluorescência foi detectada (controle negativo).

Figura 10. Avaliação da capacidade de fagocitose dos macrófagos M1 e M2 após estímulos com LDL. Macrófagos M1 e M2 estimulados ou não com LDLn ou LDLox foram incubados com *pHrodo® Red E. coli Bio Particles® Conjugate for Phagocytosis* por 1 hora. A intensidade de fluorescência foi detectada em microscópio de fluorescência invertido e quantificada utilizando o software *ImageJ*. Nas culturas estimuladas ou não com LDLn ou LDLox foi possível observar a presença de biopartículas vermelhas no citoplasma das células. A intensidade de fluorescência foi avaliada em 50 células randomicamente selecionadas. Macrófagos M1 (A) e M2 (B) tiveram intensidade de fluorescência semelhante, independente do estímulo prévio com LDL. Imagens representativas de 4 experimentos utilizando macrófagos M1 (C) e M2 (D). O controle negativo mostra células não estimuladas com as biopartículas (C e D, painéis da esquerda). Aumento de 20X. Figura representativa de 4 experimentos.

Avaliamos também se os macrófagos M2 estimulados ou não com LDLn ou LDLox mantem sua capacidade de estímulo da angiogênese. Para isso, foram feitos experimentos *in vitro* utilizando HUVECs plaqueadas sobre matriz geltrex®. A essas culturas, foram adicionados 20% do sobrenadante das culturas de macrófagos M2, estimulados ou não com LDLn ou LDLox. Estas células foram mantidas em cultura durante 18 horas e então avaliadas em microscópio ótico invertido.

Foi possível observar que as HUVEC plaqueadas na ausência de geltrex® formam uma monocamada (Figura 11B). No entanto, quando estas células são plaqueadas sobre a matriz geltrex® elas formam as redes vasculares semelhantes a túbulos (Figura 11C). As HUVECs foram então mantidas na presença de meio condicionado contendo 20% do sobrenadante das culturas de macrófagos M2. Na presença do sobrenadante de macrófagos M2 não estimulados (Figura 11D) ou estimulados com LDLn (Figura 11E) também observamos a formação de túbulos. Entretanto, a adição do sobrenadante de células estimuladas com LDLox inibiu a formação de túbulos pelas HUVECs após 18 horas (Figura 11F).

A análise quantitativa dos experimentos foi feita utilizando o software *ImageJ* e o plugin *Angiogenesis Analyser*, através da contagem dos nós das redes vasculares semelhantes a túbulos (Chevalier *et al.*, 2014). O nó são as regiões onde ocorre a ramificação das redes em pelo menos 3 ramos diferentes. As imagens foram fotografadas e o número de nós foi determinado. A Figura 11A mostra que a adição do sobrenadante das culturas estimuladas com LDLox inibiu de forma significativa a formação dos nós.

Figura 11. Análise do efeito dos macrófagos M2 sobre a formação de túbulos por HUVECs. As HUVECs foram estimuladas com o sobrenadante de cultura de macrófagos M2 estimulados ou não com lipoproteínas e o número de nós foi quantificado utilizando o software ImageJ. A adição do sobrenadante de culturas estimuladas com LDLox inibiu de forma significativa a formação dos nós (F). Imagens de um experimento representativo podem ser visualizadas nas figuras B-F. HUVECs plaqueadas sobre Geltrex (C); e estimuladas com meio condicionado de cultura de M2 não estimulados (D), estimulados com LDLn (E) ou LDLox (F). HUVECs plaqueadas na ausência de Geltrex podem ser visualizadas em (B). Aumento de 5x. (n=4)

Foram feitos também experimentos para avaliar se os macrófagos M2 estimulados com LDLox secretaram mediadores capazes de destruir a matriz extracelular. Para esse fim, fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) foram mantidos em cultura por 3 dias, após este período o sobrenadante das culturas de macrófagos M2 estimulados ou não com LDLn ou LDLox foi adicionado às culturas. Após 24 horas a matriz extracelular formada e organizada a partir de proteínas secretadas pelos MEFs foi identificada através da marcação com anticorpo anti-fibrilina1. Foi possível observar que não houve a degradação das fibras da matriz produzida pelos MEFs (Figura 12B). Observamos o mesmo resultado quando avaliamos as fibras da matriz na presença do sobrenadante de macrófagos M2 sem estímulo (Figura 12C) e sobrenadante das culturas estimuladas com LDLn (Figura 12D). No entanto, a adição do sobrenadante de células estimuladas com LDLox induziu forte degradação dos filamentos de matriz secretada pelos MEFs (Figura 12E).

As imagens da matriz extracelular foram analisadas utilizando uma varredura de linhas com o intuito de realizar uma contagem das fibras. Usando este modelo matemático foi possível identificar que a adição do meio condicionado de macrófagos M2 estimulados com LDLox reduziu de forma significativa o número de fibras identificadas nas culturas (Figura 12A). Este resultado sugere que macrófagos M2 estimulados com LDLox podem induzir a degradação da matriz extracelular.

Figura 12. Análise da matriz extracelular secretada por MEFs incubados com o sobrenadante de cultura de macrófagos M2. Os MEFs foram mantidos em cultura por 3 dias e então parte do sobrenadante das culturas foi substituído por meio de cultura de macrófagos (B), sobrenadante dos macrófagos M2 controle (C) e sobrenadante dos macrófagos M2 estimulados com 50µg/ml de LDLox (D). Após 5 dias, as culturas foram coradas com dapi, para identificar o núcleo das células, e anticorpo anti-fibrilina 1, presente na matriz extracelular produzida por essas células. A adição do sobrenadante das culturas de macrófagos M2 estimuladas com LDLox reduziu de forma significativa o número de filamentos de matriz extacelular (A). Imagens representaivas de 3 experimentos. Aumento de 20X.

Sabendo então que os M2 estimulados com LDLox favorecem a degradação da matriz extracelular, avaliamos a expressão gênica de componentes de matriz, membrana basal, moléculas de adesão, proteases e também inibidores de protease em macrófagos M2 mantidos em cultura na presença ou não de LDLox durante 6 horas. Após este período de estímulo, o RNA das células foi extraído, quantificado e avaliado por eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes. Em todas as amostras avaliadas observou-se a integridade das bandas das subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal (Figura 13), indicando que todas as amostras de RNA apresentavam-se íntegras e poderiam ser utilizadas nos experimentos para a análise da expressão gênica.

Figura 13. Eletroforese do RNA de macrófagos M2 em gel de agarose 1%. Os macrófagos M2 foram mantidos em cultura na ausência de estímulo (A) ou estimulados com LDLn (B) e LDLox (C) por 6 horas. O RNA foi extraído e as amostras foram submetidas à eletroforese em condições desnaturantes, com tampão de uréia. A visualização das bandas 28S e 18S em todas as amostras indica que o RNA purificado estava íntegro. Figura representativa de 4 experimentos.

O RNA foi então transcrito reversamente em cDNA. Para avaliar se a transcrição reversa foi eficaz em todas as amostras utilizadas, foi realizada uma reação de PCR para o gene HPRT, um gene de expressão constitutiva. O produto de PCR, com 300 pares de base, foi detectado indicando que em todas as amostras testadas ocorreu a transcrição reversa do cDNA (Figura 14).

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação de HPRT. RNA de macrófagos M2 mantidos em cultura sem estímulo (A) ou na presença de LDLn (B) ou LDLox (C) foi transcrito em cDNA e submetido à amplificação por PCR de HPRT. O produto do PCR de 300pb foi detectado em todas as amostras, utilizando gel de agarose 1%. MWM - Padrão de peso molecular 100pb. Figura representativa de 4 experimentos.

O cDNA foi utilizado na análise da expressão dos genes de matriz extracelular e moléculas de adesão com o kit *Taq Man Array Extracellular Matrix & Adhesion Moleculares* (Tabela 1).

A curva de amplificação das amostras testadas pode ser observada na figura 15A. Foram selecionados para análise os genes com Ct maior que 15, e

os genes com Ct maior que 38 não foram incluídos. A figura 15B mostra o percentual de genes amplificados em cada Ct da reação de PCR. A maioria dos genes teve amplificação detectada entre os Ct 25 e 35.

Para selecionar os genes endógenos a serem usados como normalizadores na análise de expressão dos genes alvos, analisamos os Cts da amplificação de cada um dos genes indicados pelo fabricante, em cada uma das amostras. Desta forma, as 3 amostras (M2 estimulados com LDLn, LDLox e sem estímulo) dos 4 sujeitos de pesquisa, totalizando n amostral de 12.

Figura 15. Avaliação da expressão gênica de macrófagos M2 estimulados ou não com LDLn ou LDLox. (A) Curvas de amplificação das amostras dos 4 sujeitos de pesquisa estudados. (B) Percentual de genes amplificados em cada faixa de Ct da reação de PCR detectada no *TaqMan Array* e daqueles sem amplificação.

Dos 9 genes indicados pelo fabricante como candidatos a endógenos, observamos que a expressão dos genes β 2M, GUSB e HPRT era muito similar, com menor desvio padrão e expressão homogênea para todas as amostras avaliadas. Desse modo, as análises de expressão gênica foram então realizadas utilizando a média aritmética do Ct dos genes β 2M, GUSB e HPRT para a normalização das amostras.

O resultado obtido após amplificação de todos os genes candidatos a endógeno está na Figura 16. Os números acima das barras indicam média $\pm$ DP dos Cts obtidos.

Figura 16. Ciclo de corte de amplificação (Ct) dos genes candidatos a endógenos presentes no kit *TaqMan Array Extracellular Matrix & Adhesion Moleculares*. Macrófagos M2 foram mantidos em cultura e estimulados ou não com 50 μ g/ml de LDLn ou LDLox, por 6 horas. Genes indicados pelo fabricante como candidatos a endógenos: 18S (*Eukaryotic 18S rRNA*); GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), HPRT1 (*hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1*), GUSB (*glucuronidase, beta*), ACTB (*actin, beta*); B2M (*beta-2-microglobulin*); RPLP0 (*ribosomal protein, large, P0*); HMBS (*hydroxy methyl bilane synthase*) e TBP (*TATA box bindingprotein*). Os números acima da barra indicam média $\pm$ desvio padrão dos Cts avaliados. A expressão dos genes β 2M, GUSB e HPRT se mostrou muito similar, com menor desvio padrão e expressão homogênea para todas as amostras (n=12).

Após a normalização dos dados foi possível observar a amplificação de 60 genes em todas as amostras, aproximadamente 62,5% do total (Figura 17A). Não detectamos a amplificação de 36 genes, o que corresponde a 37,5% do total. Este resultado sugere que estes genes são pouco expressos pelos macrófagos M2 mantidos em cultura.

Com os dados obtidos no RT-PCR foi feita a análise da expressão relativa, o *Fold Change* e assim identificamos quais genes têm sua expressão

alterada após o estímulo com LDLn e LDLox. A figura 17B mostra a porcentagem de genes com expressão gênica aumentada (*Fold Change* >2), diminuída (*Fold Change* <0,5) e sem alteração na expressão (*Fold Change* entre 0,5 e 2) nas culturas estimuladas com LDLn e LDLox em relação às células não estimuladas. Foi possível observar que a adição de LDLox inibiu a expressão de 32 genes, 53% do total dos genes detectados. Somente observamos aumento na expressão em 3,3% dos alvos, que corresponde a 2 genes. Os outros 26 genes, 43% do total, não sofreram alterações. A adição de LDLn reduziu somente a expressão de 2 genes, aumentou a expressão de 4 genes e 90% dos genes não sofreram alterações (Figura 17B).

Para melhor entender o efeito da LDLox sobre a expressão gênica nos macrófagos M2, as moléculas foram agrupadas com base em categorias de classe e função molecular. A Figura 17C mostra o percentual de genes, em cada categoria funcional, cuja expressão sofreu alteração em resposta ao estímulo com LDLox. É possível observar que a adição de LDLox impactou na expressão de 14,29% dos genes constituintes da membrana basal expressos pelos M2. Por outro lado, a LDLox alterou a expressão de aproximadamente 40% dos genes de proteases e inibidores de proteases expressos pelos M2.

Figura 17. Análise da expressão gênica em M2, percentual de genes cuja expressão foi ou não detectada nas culturas de macrófagos M2. A área azul representa o percentual de genes com amplificação detectada no *Taqman Array*, enquanto a área em vermelho representa o percentual de genes sem amplificação, (A). Porcentagem de genes com expressão gênica modificada ou não após estímulo com LDLox e LDLn nos macrófagos M2 por 6 horas. *Fold Change* >2, aumento relativo na expressão gênica da amostra estimulada em relação à amostra controle; *Fold Change* <0,5 redução da expressão gênica. *Fold Change* entre 0,5 e 2 sem alteração. Observamos a inibição da expressão de 54% dos genes na presença de LDLox. Já em culturas estimuladas com LDLn, 90% dos genes não apresentaram modificação de expressão (B). Percentual de genes por categoria funcional cuja expressão sofreu alteração em resposta ao estímulo com LDLox (C).

Após a análise da expressão relativa, onde identificamos o aumento ou diminuição da expressão gênica em resposta ao estímulo com a LDLox, iniciamos a análise estatística dos dados. O ΔC_t da amostra estimulada foi comparado ao ΔC_t da amostra controle utilizando o teste t, para amostras

pareadas. O valor de $p < 0,05$ e $p > 2$ foi utilizado como indicador de diferença significativa entre as amostras.

Os valores da expressão relativa (Log 2) e o valor de p (Log 10) foram plotados em um *volcano plot* (Figura 18A e B). Neste gráfico fica evidenciado que a adição de LDLn não alterou de forma significativa a expressão de nenhum dos genes investigados (Figura 18A). Já os genes que apresentaram uma redução significativa em sua expressão em resposta ao LDLox estão identificados em rosa, e aquele com aumento da expressão gênica em azul. Genes cuja expressão não teve alteração significativa estão representados em verde (Figura 18B).

A expressão gênica relativa (*Fold change*) das amostras estimuladas com LDLox ou LDLn em relação às amostras controles e também os valores de p (Teste t) obtidos para todos os genes avaliados estão listados na tabela 2.

Figura 18. Volcano plot. Valores de P (Log de 10) e valor de *Fold change* (log de 2). A expressão gênica de macrófagos M2 estimulados com LDLn (A) ou LDLox (B) durante 6 horas foi avaliada utilizando o kit *Taq Man Array Extracellular Matrix & Adhesion Molecules*. A expressão relativa da amostra estimulada foi comparada à da amostra controle (Fold Change) e a análise estatística feita utilizando o teste t para amostras pareadas. Genes com significativa expressão relativa diminuída estão indicados em rosa, genes com aumento da expressão relativa em azul e genes sem alteração na expressão gênica em verde. Foi possível observar que o estímulo com LDLn não alterou de forma significativa a expressão de nenhum dos genes avaliados (A). O estímulo com LDLox reduziu significativamente a expressão de 10 genes e aumentou a expressão de apenas 1 dos genes avaliados (B). (n=4).

Tabela 2. Lista dos genes identificados nas culturas de macrófagos M2 utilizando o kit *Taq Man Array Extracellular Matrix & Adhesion Moleculares 96 – Well Plate* (Applied Biosystems, EUA). O *Fold Change* das amostras estimuladas com 50µg/ml de LDLox ou LDLn foi comparado em relação à amostra controle. Análise estatística foi feita com teste t, utilizando parâmetros de ΔC_t das mesmas amostras.

Gene	LDLox		LDLn	
	Fold Change	P value	Fold Change	P value
LAMB3	0,17	0,092	0,57	0,504
MMP 14	0,22	0,353	1,40	0,384
ITGAL	0,22	0,081	1,53	0,735
TNC	0,23	0,104	1,22	0,845
ACT β	0,29	0,022	0,87	0,963
CLEC3 β	0,32	0,285	0,78	0,654
ITG β 3	0,33	0,081	1,21	0,898
SPG7	0,35	0,047	0,77	0,835
THBS3	0,36	0,505	1,01	0,878
MMP 2	0,36	0,054	0,92	0,856
CTNNA1	0,37	0,082	0,82	0,814
COL6A2	0,37	0,047	0,48	0,186
VCAM 1	0,38	0,169	2,12	0,066
ITG β 2	0,38	0,066	0,91	0,970
HMBS	0,38	0,008	0,86	0,621
18 S	0,39	0,095	0,86	0,250
CDH1	0,39	0,071	0,85	0,905
FN1	0,39	0,081	0,95	0,919
ITGA5	0,39	0,076	0,83	0,859

ITGAM	0,40	0,051	0,70	0,675
KAL1	0,40	0,026	0,90	0,952
MMP 9	0,41	0,051	0,99	0,868
MMP 15	0,42	0,015	1,45	0,726
TIMP 3	0,42	0,188	1,18	0,669
ITGA6	0,44	0,005	0,87	0,795
ITGA3	0,44	0,306	0,97	0,869
ITGA4	0,44	0,560	2,74	0,328
ITG β 5	0,47	0,053	0,91	0,944
ECM1	0,47	0,213	0,82	0,924
CTNND 1	0,47	0,098	1,08	0,475
COL6A1	0,47	0,064	0,92	0,411
SELL	0,48	0,196	0,89	0,982
UBC	0,51	0,053	0,88	0,980
GAPDH	0,52	0,049	1,00	0,645
LAMA3	0,54	0,226	1,49	0,312
LAMC1	0,55	0,165	0,84	0,886
ICAM 1	0,55	0,362	1,48	0,385
SPARC	0,56	0,103	1,03	0,664
TIMP 2	0,58	0,036	0,94	0,690
PGK1	0,59	0,106	0,93	0,813
ITG β 1	0,59	0,207	0,83	0,837
CD 44	0,60	0,123	0,83	0,757
CTNNB 1	0,61	0,370	0,95	0,772

PECAM	0,62	0,050	1,03	0,971
MMP 10	0,63	0,875	0,85	0,885
VCAN	0,63	0,150	1,17	0,651
MMP 1	0,68	0,661	0,34	0,495
ADAMTS13	0,68	0,391	2,25	0,136
TBP	0,71	0,127	0,94	0,837
ITGA7	0,84	0,242	1,03	0,671
PPIA	0,84	0,087	0,99	0,695
COL4A2	0,85	0,083	0,75	0,967
RPLP0	0,87	0,245	1,08	0,247
MMP 7	0,92	0,563	0,99	0,918
TIMP 1	0,92	0,522	1,06	0,459
TGFβ I	0,95	0,959	1,08	0,681
SPP1	1,15	0,222	1,08	0,248
MMP 12	1,24	0,709	1,07	0,697
ITGAV	8,89	0,250	29,69	0,201
TSP1	12,31	0,029	1,87	0,177

Observamos que na presença de LDLox ocorreu modulação significativa da expressão de 11 genes. Eles são: β -Actina (ACT β), colágeno 6A2 (Col6A2), Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), gene da hidroximetilbilano sintase (HMBS), integrina alfa 6 (ITGA6), gene da síndrome de Kallmann 1 (Kal1), metaloproteinase 15 (MMP15), molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM), gene da paraplegia espástica 7 (SPG7), inibidor de metalopeptidase 2 (TIMP2) e trombospondina 1 (TSP1). Dentre estes, o gene TSP1 foi o único que

apresentou aumento significativo na expressão gênica em resposta ao LDLox. As células estimuladas apresentaram expressão 12 vezes maior que as células sem estímulo ($p = 0,029$) (Tabela 2 e Figura 18). A figura 19 mostra a expressão relativa dos 11 genes com modulação significativa da expressão gênica em resposta a LDLox.

Figura 19. Expressão relativa (Fold Change) dos genes com variação significativa em células estimuladas com LDLox quando comparadas com controles não estimulados. A expressão dos genes foi avaliada em macrófagos M2 estimulados com LDLn ou LDLox durante 6 horas, utilizando o kit *Taq Man Array Extracellular Matrix & Adhesion Molecules*. Os 11 genes mostrados tiveram alteração significativa em sua expressão gênica em resposta ao estímulo com LDLox, mas não com LDLn. (n=4)

Foram feitos experimentos para validação dos resultados obtidos em relação à expressão gênica de TSP1. Para isso foram desenhados iniciadores (*primers*) específicos para este gene e os experimentos foram realizados utilizando o reagente *SYBR-Green PCR Mix* em amostras de macrófagos M2 estimulados por 3 e 6 horas com LDLn ou LDLox.

A figura 20A mostra a curva de amplificação do gene endógeno HPRT e a Figura 20B à do gene TSP1. Nenhuma amplificação foi detectada no controle negativo (Figura 20C). Após a análise da expressão relativa, o *Fold Change*, foi possível observar um aumento da expressão gênica de 8 ± 5 vezes e 32 ± 20 vezes na expressão de TSP1 após o estímulo com LDLox nos tempos de 3 e 6 horas respectivamente. Já nos M2 estimulados durante 3 e 6 horas com LDLn foi observado uma pequena indução, $2,5 \pm 0,9$ e $1,2 \pm 1,4$ respectivamente (Figura 20D).

Figura 20. Avaliação da expressão gênica de TSP1 em macrófagos M2 estimulados com LDL por 3 e 6 horas. Curva de amplificação do HPRT (A), da TSP1 (B) e do controle negativo das amostras (C). Análise da expressão relativa (*Fold change*) da TSP1 em macrófagos M2 após estímulo LDLn ou LDLox (D). Observamos que após 3 e 6 horas de estímulo com LDLox, mas não LDLn, ocorre um aumento da expressão gênica de TSP1.

Utilizamos a técnica de DotBlot para identificar a TSP1 no sobrenadante de macrófagos mantidos em cultura na presença ou não de LDLn ou LDLox, em diferentes concentrações, por 24 horas. Foi possível identificar TSP1 no sobrenadante das culturas de macrófagos (Figura 21A). A análise quantitativa da intensidade de fluorescência indicou que a LDLox induz a secreção desta proteína de forma dose dependente (Figura 21B), corroborando com os dados obtidos nos experimentos de análise de expressão gênica.

Figura 21. Detecção de TSP1 no sobrenadante das culturas de macrófagos por DotBlot. (A) O sobrenadante das culturas de macrófagos estimulados ou não com LDLn ou LDLox, em diferentes concentrações foram transferidos para membranas de nitrocelulose e a presença de TSP1 avaliada utilizando anticorpos específicos. (B) Densitometria dos “Dots”, em unidades arbitrárias (u.a.). Foi possível identificar que a LDLox induz a secreção de TSP1 de forma dose dependente (n=3).

Uma vez que já identificamos alterações na expressão gênica de trombospondina 1 e Colágeno VI foram feitos então experimentos para avaliar a presença destas proteínas no citoplasma e/ou na matriz extracelular dos

macrófagos M2. Após o processo de diferenciação, os macrófagos M2 foram removidos da placa de cultura com o auxílio de uma solução PBS 0,5mM EDTA e replaqueadas em *chamber slides*. As células foram estimuladas com 50µg/ml de LDLn ou LDLox e mantidas na estufa 37°C, 5% de CO₂ durante 5 dias. Após este período estas células foram fixadas com metanol e marcadas com dapi, corante de ácidos nucleicos que marca o núcleo em azul; faloidina (FAL), marcador que identifica os filamentos de actina no citoesqueleto dos macrófagos; anticorpo anti colágeno VI (Col6A1) e anticorpo anti TSP1 (Figuras 22D, E e F). As células foram então avaliadas por microscopia confocal e a intensidade de fluorescência quantificada utilizando o software *ImageJ*.

Foi possível observar que tanto nas células sem estímulos como nas estimuladas com LDLn ou LDLox não houve alteração significativa ($p=0,9$) da intensidade de fluorescência da faloidina nos macrófagos M2 (Figura 22A). Já quando avaliamos a expressão de colágeno VI, foi possível observar a diminuição significativa ($p<0,0001$) da expressão nos macrófagos estimulados com LDLox quando comparados aos macrófagos sem estímulo (Figura 22B). Assim como quando avaliamos a expressão de TSP1 após a adição de LDLox, é possível observar um aumento da expressão de forma significativa ($p<0,0001$) quando comparados aos macrófagos M2 sem estímulos (Figura 22C). A adição de LDLn não modulou a expressão desta proteína.

Figura 22. Análise da expressão de ColVI e TSP1 em macrófagos M2 por microscopia confocal. Os macrófagos M2 foram plaqueados em *chamber slides*, estimuladas com 50µg/ml de LDLn, 50µg/ml de LDLox ou mantidos sem estímulo por 5 dias. As células foram fixadas com metanol e marcadas com dapi (azul), Faloidina (verde), anti Colágeno 6A1 (vermelho) e anti Trombospondina1 (branco). A intensidade de fluorescência foi avaliada utilizando o software *ImageJ*. Observamos que não houve alterações significativas na expressão de faloidina em nenhuma das condições testadas (A) redução na expressão de colágeno VI em resposta ao estímulo com LDLox (B) e aumento da expressão de TSP1 em macrófagos estimulados com LDLox, quando comparados com macrófagos sem estímulo ou estimulado com LDLn (C). Imagens representativas de culturas de macrófagos M2 não estimulados (D), mantidos na presença de LDLn (E) ou LDLox (F). (n=5). Aumento de 40x.

7. DISCUSSÃO

Neste projeto vimos que a LDLox modula funções de macrófagos M2 humanos, como a produção de citocinas, a fagocitose, a expressão de moléculas co-estimulatórias, a angiogênese e a secreção de mediadores que degradam a matriz extracelular. A análise de diversas funções dos macrófagos foi incluída nesse estudo para oferecer uma visão mais abrangente das atividades exercidas pelos M2 na aterosclerose e assim contribuir para esclarecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese desta doença.

Foram feitos experimentos para avaliar se a adição de LDLox seria capaz de alterar a expressão de marcadores de superfície nos macrófagos M2. Incluímos na análise receptores *Scavengers*, moléculas de adesão, lectinas, moléculas co-estimulatórias e de apresentação de antígeno. No entanto, para nossa surpresa, observamos que a adição de LDLn ou LDLox em 2 concentrações diferentes (5 e 50µg/ml), por diferentes períodos de tempo (1, 3 e 5 dias) não alterou a expressão de nenhum dos marcadores avaliados (Figura 5).

Utilizando células THP-1, Seo e colaboradores (Seo *et al.*, 2015) descreveram que o estímulo com a LDL minimamente oxidada induzia aumento na expressão de CD86, resultado quantificado através da mediana da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo. Já o estímulo com LDL altamente oxidada (semelhante ao usado em nossos experimentos) induziu a expressão de CD206, avaliada por microscopia de fluorescência. Estes resultados indicam que o grau de oxidação da LDL afeta a diferenciação de

monócitos em macrófagos de diferentes subtipos. Contudo, os autores não avaliaram a expressão destes marcadores em células primárias e/ou diferenciadas *in vitro*.

Utilizando uma linhagem celular monocítica de camundongos RAW264.7, Shen e colaboradores demonstraram que estímulo com LDLox por 48 horas aumenta a expressão de CD83, CD40, CD86, MHC Classe II e CD1d (Shen *et al.*, 2008).

Macrófagos, derivados de medula óssea de camundongos tratados com LDLox (20 µg/mL) expressaram níveis elevados de mRNA para os marcadores de macrófagos M2 IL-10, arginase-1, receptor de manose e PPARγ e diminuição da expressão do mRNA da IL-12 (Rios *et al.*, 2013). Os autores sugerem que a presença de LDLox durante o processo de diferenciação de macrófagos favorece o desenvolvimento de células com o perfil M2. Nós não encontramos na literatura estudos que avaliem a expressão moléculas de superfície em M2 estimulados com LDLox *in vitro*. Para confirmar os resultados que obtivemos, serão feitas análises de expressão gênica de alguns receptores scavengers e lectinas. Experimentos de citometria de fluxo após a marcação intracelular podem também nos ajudar a avaliar a modulação dos receptores de superfície.

No sobrenadante das culturas de macrófagos M1 e M2 estimulados ou não com LDLn ou LDLox foi avaliada a secreção das citocinas IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL12-p70 e TNFα. Observamos o aumento de expressão de IL-8 (Figura 9A) nas culturas de macrófagos M2 estimulados com LDLox quando comparada às culturas não estimuladas ou estimuladas com LDLn. Hirose e colaboradores (Hirose *et al.*, 2011) observaram aumento da expressão gênica

de IL-8 em resposta ao LDLox tanto em macrófagos M1 como em M2, em experimentos de RT-PCR. Van Tits e colaboradores (Van Tits *et al.*, 2011) também observaram a produção de IL-8 em resposta ao LDL tanto em macrófagos diferenciados usando M-CSF como GM-CSF. Estes autores não detectaram IL-6 e IL-10 no sobrenadante das culturas. Em nossos experimentos, identificamos a expressão de IL-6 (Figura 9B) e IL-10 (Figura 9C) tanto no sobrenadante das culturas de macrófagos M1 como M2, por CBA. Embora o número de indivíduos avaliados até o momento nesses experimentos de dosagem de citocinas seja pequeno, os resultados que obtivemos até o momento são semelhantes aos já descritos na literatura.

Avaliamos também se a adição de LDL seria capaz de alterar a capacidade de fagocitose dos macrófagos M1 e M2. Já está descrito que após a fagocitose as lipoproteínas são eficientemente entregues para os lisossomos onde ocorre a sua degradação (Brown e Goldstein, 1983). Apesar disso, a LDLox é parcialmente resistente à degradação lisossomal e se acumula, juntamente com o colesterol, dentro dos lisossomos dos macrófagos. Esse acúmulo é pelo menos em parte responsável pela transformação de macrófagos em *Foam cells* (Greenspan *et al.*, 1997; Jessup e Kritharides, 2000).

Para avaliarmos se este acúmulo de lipídeos inibe a capacidade de fagocitose nos macrófagos, foram feitos experimentos utilizando biopartículas fluorescentes. Observamos que o estímulo com LDLn ou LDLox tanto nos macrófagos M1 (Figura 10A) como M2 (Figura 10B) não inibiu a capacidade de fagocitose destas células. Esse resultado nos sugere que os M2 presentes na placa de aterosclerose mantem sua capacidade de fagocitose e, que esta

população celular pode contribuir para a eliminação de debris celulares e teciduais observados na lesão. Durante a padronização da metodologia, como um controle negativo, também foram feitos experimentos para avaliar a fagocitose com as células mantidas no gelo. Nesta condição não ocorreu fagocitose em nenhuma das células estimuladas, na presença ou não de LDL (resultado não mostrado). Estes resultados são semelhantes aos descritos por (Chen *et al.*, 2015). A inclusão deste controle nos indicou que o método de análise de fagocitose com as biopartículas era funcional.

Além disso, foram feitos experimentos para avaliar a viabilidade dos macrófagos M2 após estímulos com LDLn ou LDLox (Figura 7). Foi possível observar em culturas macrófagos mantidos por 2 ou 4 dias na presença ou não de LDLn ou LDLox, apresentaram viabilidade semelhante, sugerindo que o estímulo com LDL não altera de forma significativa a integridade da membrana plasmática dos macrófagos M2. No entanto, Rios e colaboradores (Rios *et al.*, 2013) observaram um aumento da morte de macrófagos murinos após estímulos com LDLox, por ensaio de *MTT*.

Contudo, não conseguimos avaliar se a LDL foi capaz de induzir a morte dos macrófagos, já que os mesmos fagocitam células mortas, consequentemente, se existe diferença não conseguimos quantificá-la.

Avaliamos também se os macrófagos M2 estimulados ou não com LDLn ou LDLox mantem sua capacidade de estimular a angiogênese, uma vez que já está bem descrito na literatura que macrófagos M2 humanos são altamente angiogênicos. Jetten e colaboradores, Long e Campbell (Jetten *et al.*, 2014; Long e Campbell, 2015), utilizando células obtidas de camundongos C57BL/6

J, observaram que macrófagos polarizados para um fenótipo M2 possuem maior potencial angiogênico em comparação com outros subconjuntos.

Nas lesões de aterosclerose, as condições específicas locais (anoxia relativa, inflamação e estresse oxidativo) induzem fatores angiogênicos clássicos e não clássicos que promovem a angiogênese a partir da *vasa vasorum* pré-existente (Michel *et al.*, 2007). A neovascularização aumenta o fluxo local de nutrientes e O₂, desse modo, pode promover a progressão e o remodelamento da placa. No entanto, a maturação incompleta e a fragilidade dos neocapilares promovem hemorragias intraplaca que podem levar à sua instabilidade e ruptura (Michel *et al.*, 2014).

Em 1951, Geiringer confirmou a presença de neocapilares em placas ateroscleróticas e sugeriram que a neoangiogênese pode desempenhar um papel na progressão da placa aterosclerótica e suas complicações (Geiringer, 1951). A densidade de *vasa vasorum* é maior nas áreas propensas a aterosclerose e é um evento precoce na aterogênese. Em humanos, a angiogênese intraplaca com hemorragias está associada principalmente ao ateroma de capilar fino, infiltração de macrófagos e centros necróticos grandes, como nas placas vulneráveis. Os neocapilares da placa são frequentemente incompletos, podendo assim libertar eritrócitos no interior da placa e favorecer o processo de hemorragia (Sueishi *et al.*, 1997).

Em nossos experimentos *in vitro* foi possível observar que as HUVEC plaqueadas na ausência de geltrex® formaram uma monocamada (Figura 11A). Quando estas células foram plaqueadas sobre a matriz geltrex® foi possível observar a formação de túbulos pelas mesmas, tanto na presença do sobrenadante de macrófagos M2 não estimulados (Figura 11B) ou estimulados

com LDLn (Figura 11C). Contudo, a adição do sobrenadante de células estimuladas com LDLox inibiu a formação de túbulos pelas HUVECs (Figura 11D). Esses resultados sugerem que na presença de LDLox os M2 podem secretar mediadores capazes de inibir a angiogênese. Em nossos experimentos já identificamos que os M2 estimulados com LDLox secretam trombospondina-1. Essa proteína matricelular tem potente ação antiangiogênica e pode contribuir para a inibição na angiogênese observada em nossos ensaios. Sabendo que mediadores secretados pelos M2 podem afetar a função das células endoteliais é importante investigar se essa interação contribui para 1) a erosão da lesão de aterosclerose, já que este processo parece responsável por até 30% dos eventos agudos decorrentes da aterosclerose e 2) se os mediadores secretados pelos M2 podem favorecer os processos de hemorragia intraplaca através da maturação incompleta e/ou fragilidade dos neocapilares.

Daher e colaboradores (Daher *et al.*, 2014) avaliaram diretamente o papel da LDL oxidada (na presença da enzima mieloperoxidase) na disfunção das células endoteliais *in vitro*. Os resultados sugerem que a LDLox é capaz de inibir a mobilidade e a tubulogênese das células endotéliais, através de um aumento na expressão de miR-22 e heme oxigenase 1. Os autores ainda sugerem que níveis elevados de LDL no sangue prejudicariam a capacidade das células endoteliais para lidar com o endotélio danificado, contribuindo negativamente para a progressão da placa de ateroma, uma vez que a integridade da parede vascular é afetada e a interferência no reparo vascular.

O efeito principal de macrófagos na matriz extracelular costuma ser considerado destrutivo, já que secretam metaloproteinases que degradam o

tecido como parte do processo de remodelamento (Elkington *et al.*, 2009). Entretanto, os macrófagos também contribuem para síntese da matriz extracelular e, portanto, para a estabilização do tecido. Deste modo, a contribuição dos macrófagos pode se dar 1) de maneira indireta, através da indução da proliferação e secreção de componentes da matriz por outras células e 2) de maneira direta, através da secreção de componentes da matriz extracelular tais como a fibronectina e o colágeno (Weitkamp *et al.*, 1999).

Os experimentos para avaliar a expressão de genes da matriz extracelular e membrana basal, moléculas de adesão, proteases e também inibidores de protease em M2 mantidos em cultura na presença ou não de LDLox mostraram que a adição de LDLox reduziu a expressão de 54% dos genes (Figura 17B). A LDLox modulou a expressão de 11 genes de maneira significativa (Tabela 2 e Figura 19). Somente um dos genes, a TSP1 mostrou aumento na expressão. Contudo, na presença de LDLn aproximadamente 90% dos genes não sofreram modulação na expressão gênica e nenhuma diferença estatística foi identificada.

A matriz extracelular é uma estrutura altamente dinâmica, que é constantemente remodelada. Através das características físicas e bioquímicas a matriz extracelular gera funções tais como a sua resistência à tração, compressão e elasticidade (Frantz *et al.*, 2010). Ela ainda apresenta uma ação de tamponamento que mantém a homeostase extracelular e retenção de água. Além disso, interage com os receptores da superfície das células para induzir a transdução de sinal e regular a transcrição gênica (Lebleu *et al.*, 2007). O colágeno é a proteína mais abundante dentro da matriz extracelular intersticial, é seu principal elemento estrutural, proporciona resistência à tração, regula a

adesão celular e apoia a quimiotaxia e migração e desenvolvimento do tecido (Gelse *et al.*, 2003; Rozario e Desimone, 2010).

Nossos resultados mostram que macrófagos M2 expressam colágeno. Detectamos a expressão gênica de colágeno IV e VI, observamos ainda que a adição de LDLox reduziu em aproximadamente 20% a expressão do colágeno 4A2 nas culturas e uma redução significativa na expressão de colágeno 6A2 foi observada (Figura 19 e Tabela 2). Schnoor e colaboradores (Schnoor *et al.*, 2008) identificaram a expressão gênica de diversos tipos colágenos em monócitos e macrófagos e detectaram a secreção de colágeno VI por estas células. Eles sugerem que a produção de colágeno do tipo VI é um marcador para um fenótipo de macrófagos não destrutivos, de conservação de matriz que pode influenciar profundamente condições fisiológicas e fisiopatológicas *in vivo*. Desse modo, a menor secreção de colágeno 6A2 por macrófagos M2 na presença de LDLox pode contribuir e favorecer uma menor estabilidade de placa de aterosclerose.

O colágeno 6A2 é um componente importante da matriz extracelular, forma uma rede microfibrilar que se encontra em estreita associação com a célula e a membrana basal circundante (Bushby *et al.*, 2014). A função primária de colágeno tipo 6A2 secretada por macrófagos parece ser a modulação de interações célula-célula e célula-matriz.

Weitkamp e colaboradores (Weitkamp *et al.*, 1999) demonstraram que macrófagos, identificados como células CD68+ presentes nas lesões de aterosclerose são produtoras de colágeno VIII. Em cultura, monócitos e macrófagos humanos expressaram o colágeno tipo VIII, de 1 hora a 3 semanas após o isolamento. M1 mostraram diminuição da expressão de colágeno tipo

VIII quando comparados com macrófagos não polarizados, já em M2 foi observado aumento de sua expressão. Em nossos experimentos, não detectamos a amplificação do colágeno VIII, então não foi possível avaliar se a LDLox altera a sua expressão. Com base neste grupo de resultados sugerimos que a reduzida produção de colágeno pelos macrófagos na presença de LDLox pode contribuir para a desestabilização da lesão de aterosclerose.

Observamos em experimentos onde incubamos os MEFs com sobrenadante de macrófagos M2 sem estímulo e estimulado com LDLox, evidente degradação da matriz extracelular (Figura 12) quando comparados com MEFs estimulados com meio de cultura puro ou sobrenadante de macrófagos controle (sem estímulo). Desta forma, ficou evidenciado que os M2 estimulados com LDLox secretam mediadores capazes de destruir a matriz extracelular. Foram feitos experimentos na tentativa de identificar quais mediadores estariam envolvidos neste processo. Para isso, adicionamos inibidores de metaloproteinases, juntamente com a adição do meio condicionado às culturas de células MEF. No entanto, os experimentos não foram bem-sucedidos já que a matriz extracelular produzida pelos MEFs na presença dos inibidores utilizados se desprende das lâminas. Ainda não foram identificados os possíveis mediadores responsáveis pela degradação da matriz extracelular.

Em nossos experimentos de expressão gênica observamos também a expressão de diversas enzimas envolvidas com a degradação da matriz, entre elas: MMP-1, -2, -7, -9, 10, -12, -14, -15 e SPG7. Muitos estudos já demonstraram que as metaloproteinases da matriz (MMPs) derivadas de macrófagos podem estar envolvidas na instabilidade da capa fibrosa, visto que

as MMPs são uma família de enzimas que podem degradar vários tipos de proteínas da matriz extracelular (Newby, 2007; Moore e Tabas, 2011; Roycik *et al.*, 2013; Jabłońska-Trypuć *et al.*, 2016).

Com os resultados aqui obtidos observamos que os macrófagos M2 também podem contribuir para o processo de degradação da matriz. No entanto, a regulação das MMPs por fatores relevantes para a aterosclerose é complexa e influenciada por indutores da transcrição, repressores e ativadores de protease. Além disso, uma vez ativadas, certas MMPs podem ativar outras podendo ocasionar a ruptura da capa e a formação do trombo (Moore e Tabas, 2011). Em 1994, Galis e colaboradores (Galis *et al.*, 1994) mostraram uma correlação temporal entre a presença de macrófagos na região do “ombro” da artéria onde há propensão de ruptura de placas e afinamento da capa fibrosa por existir um acúmulo local de MMPs ativadas, especialmente MMP-2 e MMP-9, e estas têm estimulado grande interesse no possível papel das MMPs na ruptura da placa.

Avaliando o nível sérico de MMP-2, -3, -9, Timp-1 e -2. (Noji *et al.*, 2001) observaram que pacientes com aterosclerose coronariana prematura têm maiores níveis destas proteínas quando comparado a pacientes estáveis.

Em nossos experimentos, observamos que as células estimuladas com LDLox têm menor expressão gênica de MMP15 quando comparada às células não estimuladas. A MMP15 é uma enzima presente na membrana celular e sua participação em doenças cardiovasculares não está bem esclarecida. No entanto, esta enzima, além de clivar gelatinas, pode ativar a MMP2, que juntamente com a MMP9 apresenta sua expressão aumentada em diversas doenças cardiovasculares incluindo aterosclerose, hipertensão e infarto do

miocárdio (Yabluchanskiy *et al.*, 2013). SPG7 também é uma metaloproteinase, no entanto sua função não está bem esclarecida, mas sua expressão foi encontrada em doença arterial coronariana (Almontashiri *et al.*, 2014).

Por outro lado, em nossos resultados observamos que os M2 expressam TIMP-1, -2 e -3 e que na presença de LDLox ocorreu redução da expressão somente de TIMP2. A participação de TIMP2 na aterosclerose vem sendo descrita. Usando modelo murinho Johnson e colaboradores (Johnson *et al.*, 2006) evidenciaram que camundongos que super expressam TIMP2, mas não TIMP1, têm lesão menor e mais estável.

Deste modo, a estabilidade das placas pode depender de um equilíbrio entre as funções dos macrófagos. Tal interação, se existir, é provável que seja complexa. Pode-se sugerir que os fenótipos de macrófagos variam muito dentro da mesma lesão, e até mesmo dentro da mesma área de uma lesão. Liptay e colaboradores (Liptay *et al.*, 1993) mostraram que a produção de colágeno pelas células do músculo liso não é estimulada na proximidade de células espumosas derivadas de macrófagos, enquanto que os macrófagos não espumosos exercem um efeito estimulador. Assim, as características gerais de uma placa podem depender não só no número de macrófagos no interior da lesão, mas também o seu grau de ativação e localização (Orekhov *et al.*, 2015).

Com esses resultados observamos que a LDLox altera a expressão gênica de moléculas envolvidas com a síntese e estabilização da matriz extracelular.

Nossos resultados indicam também que a adição de LDLox aumentou significativamente a expressão gênica (Figura 20) e proteica (Figura 21) de

forma dose dependente no sobrenadante de culturas apenas de TSP1, assim como observamos também no citoplasma dos macrófagos M2 por microscopia confocal (Figura 22C).

A TSP1 é uma proteína matricelular que não apresenta um papel estrutural, mas quando incorporada à matriz é capaz de modular uma variedade de processos biológicos incluindo a interação célula-célula e célula-matriz (Wong e Rustgi, 2013). É uma proteína de ligação ao cálcio que regula a adesão celular e migração, a organização do citoesqueleto e a proliferação de células do músculo liso vascular. Ela interage com uma variedade de proteínas-chave que mantêm a estrutura e a homeostase vascular (Krishna e Golledge, 2013).

Diversos estudos têm visto que a TSP1 está envolvida na gênese de uma variedade de doenças cardiovasculares, apresentando-se aumentada (Lopez-Dee *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2015) inclusive na lesão arterial, daí a hipótese de que desempenha um importante papel na hiperplasia da camada íntima das artérias (Roth *et al.*, 1998). A TSP1 apresenta um domínio NH-2 terminal que se liga a heparina e interage com o LDL, na aterosclerose ela inibe a angiogênese através da ativação do CD36 e induz apoptose em células endoteliais contribuindo para a instabilidade da placa podendo causar sua ruptura e o trombo (Tan e Lawler, 2009). Entretanto, estudos em modelo murino mostram que camundongos TSP1^{-/-} apresentam placas de ateroma e a ausência de TSP1 acelerou o processo inflamatório (Mustonen *et al.*, 2013).

Em humanos a localização da TSP1 é relatada em lesões de aterosclerose calcificada. Níveis séricos elevados de TSP1 vêm sendo vistos como fator de risco para eventos agudos (Hansen *et al.*, 2009; Choi *et al.*,

2012). Nos macrófagos, a TSP1 age no reconhecimento e fagocitose dos leucócitos apoptóticos, participando posteriormente da resposta inflamatória (Roth *et al.*, 1998). Em experimentos futuros para avaliar a participação da TSP1 na resposta inflamatória induzida pela LDLox em macrófagos M2, serão feitos experimentos de silenciamento da expressão de TSP1 utilizando siRNA.

8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que o LDLox altera diversas funções dos macrófagos M2.

Em resposta ao estímulo in vitro com LDLox os M2 mantiveram-se viáveis. Observamos que a adição de LDLn ou LDLox em 2 concentrações diferentes, por diferentes períodos de tempo não alterou a expressão de nenhum dos marcadores avaliados. Além disso, a função primordial dos macrófagos, a fagocitose, manteve-se intacta.

Ao avaliarmos a secreção de citocinas no sobrenadante das culturas de macrófagos estimulados ou não com LDLn ou LDLox, foi possível observar que a adição de LDLox aumentou a secreção da citocina pró-inflamatória IL-8, resultado semelhante ao observado também nas culturas de macrófagos M1 estimulados com LDLox. O sobrenadante das culturas de macrófagos sem estímulo ou estimulado com LDLn não apresentaram alterações significativas.

Utilizando HUVECs plaqueadas sobre geltrex® foi possível observar que nas culturas estimuladas com o sobrenadante mantidos na presença de LDLox houve uma inibição significativa da formação de túbulos pelas HUVECs, inibindo a angiogênese.

Ainda utilizando o sobrenadante de culturas de macrófagos M2 estimulados com LDLox, secretam mediadores que degradam os filamentos da matriz extracelular produzida pelos MEFs.

Já a adição de LDLox reduziu a expressão de 10 destes genes de maneira significativa, entre eles: ACT β , Col6A2, ITGA6, MMP15, PECAM e

TIMP2. Apenas um único gene teve sua expressão aumentada de maneira significativa, a TSP1.

Ao validarmos os experimentos, observamos a presença de TSP1 e Col6 no citoplasma dos M2 por microscopia confocal. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos na análise da expressão gênica, já que podemos observamos que a adição de LDLox modulou o aumento da expressão da TSP1, proteína descrita na literatura como responsável por inibir a angiogênese através da ativação de CD36 e favorecer a degradação de matriz extracelular. E ocorreu a redução de Col6, um componente importante da matriz extracelular e sua redução pode favorecer a instabilidade da placa. Ao compararmos aos macrófagos M2 sem estímulos ou estimulados com LDLn, estas células não apresentaram alterações significativas.

Os dados obtidos dão suporte à nossa hipótese de que M2 mantidos na presença de LDLox têm sua função alterada. Nossos resultados descrevem, pela primeira vez, que os macrófagos M2 após a fagocitose de LDLox in vitro favorecem a degradação da matriz extracelular, inibem o processo de angiogênese e têm menor expressão de genes envolvidos com o reparo tecidual. Semelhante a dados já publicados na literatura observamos ainda que o estímulo com LDLox aumenta a secreção de mediadores pró-inflamatórios pelos M2. Assim, com base nos resultados obtidos, sugerimos que os macrófagos M2 modulam a resposta inflamatória persistente na aterosclerose.

9. ANEXOS

Anexo A

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **11/12/2013**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **498/13** intitulado: **“EFEITOS DO LDL OXIDADO EM MACRÓFAGOS M2. IMPLICAÇÕES NA ATEROSCLEROSE”** apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12).

Pesquisador (a) Responsável: Maristela Oliveira Hernandez

Pesquisador (a) Executante: Fernanda Magalhães Gonçalves

CEP-FMUSP, 12 de Dezembro de 2013.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo B **SECRETARIA
DA SAÚDE**

São Paulo, 13 de Outubro de 2014

Para: Dra. Maristela Hernandez

Laboratório de Imunologia do INCOR/HC-FMUSP

Fone: 2661-5914 e 98792-1212,

email: maristelahernandez@hotmail.com

Prezada Dra Maristela Hernandez,

Vimos por meio desta comunicar-lhe que seu projeto de pesquisa intitulado **“Efeitos do LDL oxidados em macrófagos M2. Implicações na aterosclerose”**, foi **aprovado** por este Comitê, podendo iniciar suas atividades junto ao Setor de Aférese da Fundação Pró-Sangue. Para tanto pedimos que procure o médico responsável por este setor, Dr. Cesar de Almeida Neto (Fone 3061 5544 r. 209/ e-mail: cesarnt@uol.com.br

Atenciosamente,

Dr. José Eduardo Levi – jelevi@prosangue.sp.gov.br

Coordenador do Comitê Científico

ISO 9001:2008

FS 558408

Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155 – 1º andar
Cerqueira César 05403-000 São Paulo – SP
jelevi@prosangue.sp.gov.br

Anexo C

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO – HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
NOME/TELEFONE PARA RECADO:

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
NOME/TELEFONE PARA RECADO:

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: TROMBOSPONDINA-1 POSSÍVEL NOVO EFETOR NA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA AO LDL EM MACRÓFAGOS

PESQUISADOR: Maristela Hernandez

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisadora Científica no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração – InCor
HC FMUSP.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 64158/01-D CRBio 01

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP

1 – Essas informações estão sendo fornecidas para esclarecer sobre a sua participação voluntária neste estudo. Nosso objetivo neste estudo é avaliar o papel da trombospondina-1 na resposta inflamatória induzida pelo LDL oxidado em macrófagos. As células que você está doando serão separadas no laboratório de Imunologia do Instituto do Coração e usadas em experimentos, onde vamos verificar se elas produzem fatores que reduzem a inflamação, nas condições do laboratório. Essas células não serão usadas em seres vivos.

2 – A sua participação nesta pesquisa será doar o filtro de leucócitos que seria descartado após a sua doação de sangue na Fundação Pró-Sangue - Hemocentro de São Paulo. Desta forma, não há qualquer risco ou desconforto a mais para você, com a sua participação neste estudo. A responsabilidade da coleta de sangue e outras intervenções necessárias serão assumidas pela referida fundação.

3 – Destacamos que os resultados desta pesquisa não trarão benefícios diretos para você. Os conhecimentos gerados com essas pesquisas poderão nos ajudar a entender melhor como os macrófagos participam da doença aterosclerose e como o colesterol influencia a função destas células. Essas células serão utilizadas em experimentos exclusivamente feitos em laboratório.

4 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra Maristela Hernandez, pesquisadora no Instituto do Coração– Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que pode ser encontrada no endereço: Laboratório de Imunologia – InCor - Rua Enéas de Carvalho Aguiar, 44, bloco II 9 andar. São Paulo, SP. Telefone(s) 11- 2661-5914. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 1º andar – tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004 – E-mail:

cep.fmusp@hcnet.usp.br;

5 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo para você;

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO – HCFMUSP**

6 – Não há procedimentos alternativos a este estudo que possam ser vantajosos;

07 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros doadores de sangue, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos doadores;

08 – Você terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

09 – Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação;

10 – Parte do material coletado e informações sobre este material serão armazenadas para análises em projetos futuros na área de imunologia por este mesmo grupo de pesquisa.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO - HCFMUSP**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“TROMBOSPONDINA-1 POSSÍVEL NOVO EFETOR NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AO LDL EM MACRÓFAGOS”**.

Eu discuti com a Dra. Maristela Hernandez sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a informações sobre a pesquisa. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKAWA, M.; LIBBY, P. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. **Cardiovasc Pathol**, v. 13, n. 3, p. 125-38, 2004 May-Jun 2004. ISSN 1054-8807. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15081469> >.

ALMONTASHIRI, N. A. et al. SPG7 variant escapes phosphorylation-regulated processing by AFG3L2, elevates mitochondrial ROS, and is associated with multiple clinical phenotypes. **Cell Rep**, v. 7, n. 3, p. 834-47, May 2014. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24767997> >.

AMBERGER, A. et al. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. **Cell Stress Chaperones**, v. 2, n. 2, p. 94-103, Jun 1997. ISSN 1355-8145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9250400> >.

ANDERSON, C. F.; GERBER, J. S.; MOSSER, D. M. Modulating macrophage function with IgG immune complexes. **J Endotoxin Res**, v. 8, n. 6, p. 477-81, 2002. ISSN 0968-0519. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12697094> >.

BERTOLUCI, M. C. et al. Brazilian guidelines on prevention of cardiovascular disease in patients with diabetes: a position statement from the Brazilian Diabetes Society (SBD), the Brazilian Cardiology Society (SBC) and the Brazilian Endocrinology and Metabolism Society (SBEM). **Diabetol Metab Syndr**, v. 9, p. 53, 2017. ISSN 1758-5996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28725272> >.

BOBRY SHEV, Y. V. et al. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 9582430, 2016. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27493969> >.

BOUHLEL, M. A. et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. **Cell Metab**, v. 6, n. 2, p. 137-43, Aug 2007. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681149> >.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. **Annu Rev Biochem**, v. 52, p. 223-61, 1983. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6311077> >.

_____. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 34-47, Apr 1986. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3513311> >.

BURKE, A. P. et al. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. **N Engl J Med**, v. 336, n. 18, p. 1276-82, May 1997. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9113930> >.

BUSHBY, K. M.; COLLINS, J.; HICKS, D. Collagen type VI myopathies. **Adv Exp Med Biol**, v. 802, p. 185-99, 2014. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24443028> >.

CHAMBERS, S. E. et al. The role of immune-related myeloid cells in angiogenesis. **Immunobiology**, v. 218, n. 11, p. 1370-5, Nov 2013. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23932437> >.

CHEN, H. Y. et al. Examination of galectins in phagocytosis. **Methods Mol Biol**, v. 1207, p. 201-13, 2015. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25253142> >.

CHEVALIER, F. et al. Glycosaminoglycan mimetic improves enrichment and cell functions of human endothelial progenitor cell colonies. **Stem Cell Res**, v. 12, n. 3, p. 703-15, May 2014. ISSN 1876-7753. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681520> >.

CHO, K. Y. et al. The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 22, n. 7, p. 910-8, Oct 2013. ISSN 1532-8511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23273713> >.

CHOI, K. Y. et al. Higher plasma thrombospondin-1 levels in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus. **Korean Circ J**, v. 42, n. 2, p. 100-6, Feb 2012. ISSN 1738-5555. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22396697> >.

CHOROMAŃSKA, B. et al. The role of CD36 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis. **Adv Clin Exp Med**, Jun 2017. ISSN 1899-5276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28691408> >.

CRIMMINS, E. M.; BELTRÁN-SÁNCHEZ, H. Mortality and morbidity trends: is there compression of morbidity? **J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci**, v. 66, n. 1, p. 75-86, Jan 2011. ISSN 1758-5368. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21135070> >.

DAHER, J. et al. Myeloperoxidase oxidized LDL interferes with endothelial cell motility through miR-22 and heme oxygenase 1 induction: possible involvement in reendothelialization of vascular injuries. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 134635, 2014. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530680> >.

DE GAETANO, M. et al. M1- and M2-Type Macrophage Responses Are Predictive of Adverse Outcomes in Human Atherosclerosis. **Front Immunol**, v. 7, p. 275, 2016. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27486460> >.

DUTTA, P. et al. Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. **Nature**, v. 487, n. 7407, p. 325-9, Jul 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763456> >.

ELHELU, M. A. The role of macrophages in immunology. **J Natl Med Assoc**, v. 75, n. 3, p. 314-7, Mar 1983. ISSN 0027-9684. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6343621> >.

ELKINGTON, P. T.; GREEN, J. A.; FRIEDLAND, J. S. Analysis of matrix metalloproteinase secretion by macrophages. **Methods Mol Biol**, v. 531, p. 253-65, 2009. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19347322> >.

FLEMING, B. D.; MOSSER, D. M. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 9, p. 2498-502, Sep 2011. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21952805> >.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 24, p. 4195-200, Dec 2010. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123617> >.

GALIS, Z. S. et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. **J Clin Invest**, v. 94, n. 6, p. 2493-503, Dec 1994. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989608> >.

GEIRINGER, E. Intimal vascularization and atherosclerosis. **J Pathol Bacteriol**, v. 63, n. 2, p. 201-11, Apr 1951. ISSN 0368-3494. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14851161> >.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 55, n. 12, p. 1531-46, Nov 2003. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623400> >.

GLEISSNER, C. A.; LEITINGER, N.; LEY, K. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. **Hypertension**, v. 50, n. 2, p. 276-83, Aug 2007. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548720> >.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511873> >.

GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. **BMC Biol**, v. 15, n. 1, p. 53, Jun 2017. ISSN 1741-7007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28662662> >.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 12, p. 953-64, Dec 2005. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322748> >.

GOUGH, P. J. et al. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. **J Clin Invest**, v. 116, n. 1, p. 59-69, Jan 2006. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16374516> >.

GREENSPAN, P. et al. Cholesterol deposition in macrophages: foam cell formation mediated by cholesterol-enriched oxidized low density lipoprotein. **J Lipid Res**, v. 38, n. 1, p. 101-9, Jan 1997. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9034204> >.

HALVORSEN, B. et al. Atherosclerotic plaque stability--what determines the fate of a plaque? **Prog Cardiovasc Dis**, v. 51, n. 3, p. 183-94, 2008 Nov-Dec

2008. ISSN 1873-1740. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19026853> >.

HANSEN, G. A. et al. Calumenin but not reticulocalbin forms a Ca²⁺-dependent complex with thrombospondin-1. A potential role in haemostasis and thrombosis. **Mol Cell Biochem**, v. 320, n. 1-2, p. 25-33, Jan 2009. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688696> >.

HANSSON, G. K. Immune mechanisms in atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 12, p. 1876-90, Dec 2001. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742859> >.

_____. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 352, n. 16, p. 1685-95, Apr 2005. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15843671> >.

HANSSON, G. K.; ROBERTSON, A. K.; SÖDERBERG-NAUCLÉR, C. Inflammation and atherosclerosis. **Annu Rev Pathol**, v. 1, p. 297-329, 2006. ISSN 1553-4006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039117> >.

HENRIQUES DE GOUVEIA, R. et al. Sudden unexpected death in young adults. Discrepancies between initiation of acute plaque complications and the onset of acute coronary death. **Eur Heart J**, v. 23, n. 18, p. 1433-40, Sep 2002. ISSN 0195-668X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208223> >.

HIRATA, Y. et al. Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. **J Am Coll Cardiol**, v. 58, n. 3, p. 248-55, Jul 2011. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737014> >.

HIROSE, K. et al. Different responses to oxidized low-density lipoproteins in human polarized macrophages. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 1, 2011. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21199582> >.

HORWOOD, N. J. Macrophage Polarization and Bone Formation: A review. **Clin Rev Allergy Immunol**, Oct 2015. ISSN 1559-0267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26498771> >.

HUANG, C. L. et al. Association of Plasma Thrombospondin-1 Level with Cardiovascular Disease and Mortality in Hemodialysis Patients. **Acta Cardiol**

Sin, v. 31, n. 2, p. 113-9, Mar 2015. ISSN 1011-6842. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27122857> >.

ISHIGAKI, Y. et al. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. **Circulation**, v. 118, n. 1, p. 75-83, Jul 2008. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559699> >.

JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, A.; MATEJCZYK, M.; ROSOCHACKI, S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 31, n. sup1, p. 177-183, 2016. ISSN 1475-6374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27028474> >.

JESSUP, W.; KRITHARIDES, L. Metabolism of oxidized LDL by macrophages. **Curr Opin Lipidol**, v. 11, n. 5, p. 473-81, Oct 2000. ISSN 0957-9672. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11048890> >.

JETTEN, N. et al. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. **Angiogenesis**, v. 17, n. 1, p. 109-18, Jan 2014. ISSN 1573-7209. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24013945> >.

JIA, H. et al. In vivo diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 19, p. 1748-58, Nov 2013. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23810884> >.

JOHNSON, J. L. et al. Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: involvement of macrophage migration and apoptosis. **Circulation**, v. 113, n. 20, p. 2435-44, May 2006. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702468> >.

JONASSON, L. et al. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. **Arteriosclerosis**, v. 6, n. 2, p. 131-8, 1986 Mar-Apr 1986. ISSN 0276-5047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2937395> >.

JOVINGE, S. et al. Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 16, n. 12, p. 1573-9, Dec 1996. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8977464> >.

KHALLOU-LASCHET, J. et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8852, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111605> >.

KOZICKY, L. K.; SLY, L. M. Phosphatase regulation of macrophage activation. **Semin Immunol**, v. 27, n. 4, p. 276-85, Aug 2015. ISSN 1096-3618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26216598> >.

KRISHNA, S. M.; GOLLEDGE, J. The role of thrombospondin-1 in cardiovascular health and pathology. **Int J Cardiol**, May 2013. ISSN 1874-1754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23664438> >.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 750-61, Nov 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025054> >.

LEBLEU, V. S.; MACDONALD, B.; KALLURI, R. Structure and function of basement membranes. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 232, n. 9, p. 1121-9, Oct 2007. ISSN 1535-3702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17895520> >.

LEOPOLD, J. A.; LOSCALZO, J. Oxidative mechanisms and atherothrombotic cardiovascular disease. **Drug Discov Today Ther Strateg**, v. 5, n. 1, p. 5-13, Mar 2008. ISSN 1740-6773. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21048889> >.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 317-25, May 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593864> >.

LIPTAY, M. J. et al. Neointimal macrophages colocalize with extracellular matrix gene expression in human atherosclerotic pulmonary arteries. **J Clin Invest**, v. 91, n. 2, p. 588-94, Feb 1993. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8432864> >.

LIU, H. H. et al. High-density lipoprotein cholesterol levels are associated with coronary severity but not with outcomes in new-onset patients with stable coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 263, p. 104-111, Jun 2017. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28623739> >.

LONG, M. D.; CAMPBELL, M. J. Pan-cancer analyses of the nuclear receptor superfamily. **Nucl Receptor Res**, v. 2, Dec 2015. ISSN 2314-5706. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27200367> >.

LOPEZ-DEE, Z.; PIDCOCK, K.; GUTIERREZ, L. S. Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2011, p. 296069, 2011. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21765615> >.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 233-41, Sep 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001066> >.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**, v. 23, n. 4, p. 344-6, Oct 2005. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226499> >.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 677-86, Dec 2004. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530839> >.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 13, 2014. ISSN 2051-7599. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24669294> >.

MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Front Biosci**, v. 13, p. 453-61, 2008. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981560> >.

MASSAELI, H. et al. Oxidized low-density lipoprotein induces cytoskeletal disorganization in smooth muscle cells. **Am J Physiol**, v. 277, n. 5 Pt 2, p. H2017-25, Nov 1999. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10564159> >.

MEIJERING, E. FeatureJ: An ImageJ Plugin Suite for Image Feature Extraction 2003. Disponível em: < <https://image science.org/meijering/software/featurej/> >. Acesso em: July, 30 2017.

MICHEL, J. B. et al. Pathology of human plaque vulnerability: mechanisms and consequences of intraplaque haemorrhages. **Atherosclerosis**, v. 234, n. 2, p. 311-9, Jun 2014. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24726899> >.

_____. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 6, p. 1259-68, Jun 2007. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395854> >.

MOORE, K. J.; SHEEDY, F. J.; FISHER, E. A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 10, p. 709-21, Oct 2013. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995626> >.

MOORE, K. J.; TABAS, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 341-55, Apr 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21529710> >.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **J Leukoc Biol**, v. 73, n. 2, p. 209-12, Feb 2003. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12554797> >.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-69, Dec 2008. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029990> >.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14-20, Jul 2014. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035950> >.

MUSTONEN, E.; RUSKOAHO, H.; RYSÄ, J. Thrombospondins, potential drug targets for cardiovascular diseases. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 112, n. 1, p. 4-12, Jan 2013. ISSN 1742-7843. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23074998> >.

NEWBY, A. C. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. **Trends Cardiovasc Med**, v. 17, n. 8, p. 253-8, Nov 2007. ISSN 1050-1738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18021934> >.

NOJI, Y. et al. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis. **Clin Chem Lab Med**, v. 39, n. 5, p. 380-4, May 2001. ISSN 1434-6621. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11434385> >.

OHKUMA, T. et al. Dose- and time-dependent association of smoking and its cessation with glycemic control and insulin resistance in male patients with type 2 diabetes mellitus: the Fukuoka Diabetes Registry. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0122023, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25822499> >.

OMS. Cardiovascular diseases (CVDs). May 2017 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> >.

OREKHOV, A. N. et al. Macrophages in immunopathology of atherosclerosis: a target for diagnostics and therapy. **Curr Pharm Des**, v. 21, n. 9, p. 1172-9, 2015. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25312739> >.

OWEN, J. L.; MOHAMADZADEH, M. Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. **Front Physiol**, v. 4, p. 159, 2013. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23847541> >.

PARTHASARATHY, S. et al. Oxidized low-density lipoprotein. **Methods Mol Biol**, v. 610, p. 403-17, 2010. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20013192> >.

PAULSON, K. E. et al. Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis. **Circ Res**, v. 106, n. 2, p. 383-90, Feb 2010. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893012> >.

PRASSL, R.; LAGGNER, P. Molecular structure of low density lipoprotein: current status and future challenges. **Eur Biophys J**, v. 38, n. 2, p. 145-58, Feb 2009. ISSN 1432-1017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18797861> >.

PURI, R. et al. Left main coronary atherosclerosis progression, constrictive remodeling, and clinical events. **JACC Cardiovasc Interv**, v. 6, n. 1, p. 29-35, Jan 2013. ISSN 1876-7605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23347860> >.

QUILLARD, T. et al. Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques. **Curr Opin Lipidol**, Jul 2017. ISSN 1473-6535. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28682809> >.

RIBEIRO, A. G.; COTTA, R. M.; RIBEIRO, S. M. [The promotion of health and integrated prevention of risk factors for cardiovascular diseases]. **Cien Saude**

Colet, v. 17, n. 1, p. 7-17, Jan 2012. ISSN 1678-4561. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22218533> >.

RICARDO, S. D.; VAN GOOR, H.; EDDY, A. A. Macrophage diversity in renal injury and repair. **J Clin Invest**, v. 118, n. 11, p. 3522-30, Nov 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18982158> >.

RIDKER, P. M. et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. **Lancet**, v. 373, n. 9670, p. 1175-82, Apr 2009. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19329177> >.

RIOS, F. J. et al. Oxidized LDL induces alternative macrophage phenotype through activation of CD36 and PAFR. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 198193, 2013. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24062612> >.

RODRÍGUEZ-SOSA, M. et al. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. **Infect Immun**, v. 70, n. 7, p. 3656-64, Jul 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065507> >.

ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 340, n. 2, p. 115-26, Jan 1999. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887164> >.

ROTH, J. J. et al. Thrombospondin-1 is elevated with both intimal hyperplasia and hypercholesterolemia. **J Surg Res**, v. 74, n. 1, p. 11-6, Jan 1998. ISSN 0022-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9536966> >.

ROYCIK, M. D. et al. Matrix metalloproteinase inhibition in atherosclerosis and stroke. **Curr Mol Med**, v. 13, n. 8, p. 1299-313, Sep 2013. ISSN 1875-5666. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23865428> >.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Dev Biol**, v. 341, n. 1, p. 126-40, May 2010. ISSN 1095-564X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854168> >.

RÖSZER, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 816460,

2015. ISSN 1466-1861. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26089604> >.

SATO, Y. et al. Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images. **Med Image Anal**, v. 2, n. 2, p. 143-68, Jun 1998. ISSN 1361-8415. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10646760> >.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc**, v. 3, n. 6, p. 1101-8, 2008. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546601> >.

SCHNOOR, M. et al. Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. **J Immunol**, v. 180, n. 8, p. 5707-19, Apr 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390756> >.

SEGREST, J. P. et al. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. **J Lipid Res**, v. 42, n. 9, p. 1346-67, Sep 2001. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518754> >.

SEO, J. W. et al. Macrophage Differentiation from Monocytes Is Influenced by the Lipid Oxidation Degree of Low Density Lipoprotein. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 235797, 2015. ISSN 1466-1861. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26294848> >.

SHEN, L. H. et al. Oxidized low-density lipoprotein induces differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic-like cells. **Atherosclerosis**, v. 199, n. 2, p. 257-64, Aug 2008. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18191861> >.

SHERER, Y.; SHOENFELD, Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 2, n. 2, p. 99-106, Feb 2006. ISSN 1745-8382. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16932663> >.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in pathology. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 21, p. 4111-26, Nov 2015. ISSN 1420-9071. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26210152> >.

STEIN, M. et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **J**

Exp Med, v. 176, n. 1, p. 287-92, Jul 1992. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613462> >.

STIEHM, E. R. Joseph A. Bellanti (ed) immunology IV: clinical applications in health and disease. **J Clin Immunol**, v. 32, n. 3, p. 647, Jun 2012. ISSN 1573-2592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22730565> >.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1381-478, Oct 2004. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383655> >.

STÖGER, J. L. et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 225, n. 2, p. 461-8, Dec 2012. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23078881> >.

SUEISHI, K. et al. Atherosclerosis and angiogenesis. Its pathophysiological significance in humans as well as in an animal model induced by the gene transfer of vascular endothelial growth factor. **Ann N Y Acad Sci**, v. 811, p. 311-22; 322-4, Apr 1997. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9186607> >.

SWIRSKI, F. K. et al. Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 27, p. 10340-5, Jul 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16801531> >.

TABAS, I.; GARCÍA-CARDEÑA, G.; OWENS, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. **J Cell Biol**, v. 209, n. 1, p. 13-22, Apr 2015. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25869663> >.

TABAS, I.; WILLIAMS, K. J.; BORÉN, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. **Circulation**, v. 116, n. 16, p. 1832-44, Oct 2007. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938300> >.

TAJEU, G. S. et al. Incident Cardiovascular Disease Among Adults with Blood Pressure < 140/90 mm Hg. **Circulation**, Jun 2017. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28634217> >.

TAN, K.; LAWLER, J. The interaction of Thrombospondins with extracellular matrix proteins. **J Cell Commun Signal**, v. 3, n. 3-4, p. 177-87, Dec 2009.

ISSN 1873-961X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19830595> >.

VAN TITS, L. J. et al. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Krüppel-like factor 2. **Atherosclerosis**, v. 214, n. 2, p. 345-9, Feb 2011. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167486> >.

VIRMANI, R.; BURKE, A. P.; FARB, A. Plaque rupture and plaque erosion. **Thromb Haemost**, v. 82 Suppl 1, p. 1-3, Sep 1999. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10695476> >.

WALDO, S. W. et al. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. **Am J Pathol**, v. 172, n. 4, p. 1112-26, Apr 2008. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18321997> >.

WANG, G.; DENG, Z.; QU, Z. [Effects of oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein on the expression of MCP-1 by monocytes]. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, v. 25, n. 4, p. 220-3, Aug 1996. ISSN 0529-5807. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9275656> >.

WEISS, G.; SCHAIBLE, U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunol Rev**, v. 264, n. 1, p. 182-203, Mar 2015. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25703560> >.

WEITKAMP, B. et al. Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque. **FASEB J**, v. 13, n. 11, p. 1445-57, Aug 1999. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428768> >.

WITZTUM, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, v. 344, n. 8925, p. 793-5, Sep 1994. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7916078> >.

WITZTUM, J. L.; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? **Trends Cardiovasc Med**, v. 11, n. 3-4, p. 93-102, 2001 Apr-May 2001. ISSN 1050-1738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11686009> >.

WONG, G. S.; RUSTGI, A. K. Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis. **Br J Cancer**, v. 108, n. 4, p. 755-61, Mar 2013. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322204> >.

WYNES, M. W.; RICHES, D. W. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. **J Immunol**, v. 171, n. 7, p. 3550-9, Oct 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500651> >.

XU, J.; SHI, G. P. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 11, p. 2106-2119, Nov 2014. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25045854> >.

YABLUCHANSKIY, A. et al. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. **Physiology (Bethesda)**, v. 28, n. 6, p. 391-403, Nov 2013. ISSN 1548-9221. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24186934> >.

YAZGAN, B. et al. CD36 expression in peripheral blood mononuclear cells reflects the onset of atherosclerosis. **Biofactors**, Jul 2017. ISSN 1872-8081. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28677864> >.