MARCIA CRISTIANE JURADO

**Efeito dos oxisteróis na sinalização através de
cavéolas e sua relevância na aterosclerose**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Jurado, Marcia Cristiane

Efeito dos oxisteróis na sinalização através de caveolas e sua relevância na aterosclerose / Marcia Cristiane Jurado. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientador: Heraldo Possolo de Souza.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.Oxisterol 3.Cavéolas 4.Óxido nítrico sintase tipo III

USP/FM/DBD-441/10

Aos meus pais Marilda e Manoel

Por ensinarem os valores que até hoje me acompanham

Por iluminarem meu caminho

Por incentivarem as minhas escolhas...

Sempre !

Aos meus sobrinhos

Gabriela e João Victor

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, meus sinceros agradecimentos por me acompanhar nestes anos, por direcionar meus passos, me apresentar às cavéolas e, pelo apoio incondicional. Obrigada por aceitar este desafio, acreditar em mim e exercer o dom da paciência em todos os momentos!

À Dra. Sayuri Miyamoto pela execução das análises em espectrometria de massa. Obrigada pela disponibilidade, paciência em traduzir todos aqueles termos de um universo único e, por sempre me receber tão bem.

À Dra. Ana Lochabel pelas sugestões e pelo auxílio na execução durante todo o trabalho. Obrigada pela companhia incansável e por sempre estar presente em todos os experimentos.

À equipe do Laboratório de Lípidos do LIM10, Jussara, Sérgio Catanozi e Valeria Nunes por autorizarem o uso da ultracentrífuga e sempre manterem as portas e o sorriso abertos para mais uma separação de cavéolas.

À colaboração inesquecível de Suely Ariga no cuidado com as células. “Su”, obrigada por sempre estender sua mão quando precisei e obrigada por fazê-lo tão facilmente e com um sorriso contagiante.

À Thais Lima Salgado pela presença leve e constante neste último ano. “Thais”, obrigada pela companhia, pelas discussões, pela disponibilidade e por me acompanhar com extremo bom humor todos os dias!

Às minhas amigas Ester e Vivian, pelo apoio constante, pelo bom humor, por dividirem este desafio comigo, pela companhia agradável.... cafés.... e por fazerem tanto, com tanta generosidade. Ester, obrigada pelas discussões literárias além de tudo. E, Vivian, obrigada por realizar meus PCRs além de tudo !!!

Ao Prof. Dr. Francisco Soriano pelas sugestões dadas durante o processo de qualificação.

À Laura, do Laboratório de Biologia Vascular do INCOR, pela dedicação e cuidado na análise por luminescência.

Aos meus colegas Victor Debas e Denise de Castro Fernandes, do Laboratório de Biologia Vascular do INCOR, pela receptividade, pela paciência, por me receber de braços abertos e nunca me dizerem “não” !!! Obrigada para sempre!

À equipe do laboratório de Emergências Clínicas: Kelli, Fátima, Hermes, Denise e Geraldo pela colaboração e por tornar todas as manhãs divertidas.

Aos amigos do LIM, Mariana, Ana Lúcia, Lúcia, Flavia, Ricardo, Luis, Nancy, Edielle, Stella, Francisco, Amanda e Luis Fonseca pela companhia, conversas, sorrisos e boa disposição todos os dias. Obrigada por tornar esta, uma jornada espetacular!

Ao Prof. Dr. Paolo Dimascio, do laboratório de Bioquímica das Lesões, por disponibilizar o espectrômetro de massa de seu laboratório.

À minha família, meu agradecimento especial. Não existem palavras que possam traduzir o quanto sou grata pelo apoio, companhia, compreensão... Meu porto seguro.

À minha irmã, Cecília, pelo incentivo diário e por seus pensamentos práticos. Obrigada por me trazer até aqui !!!

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aterosclerose e disfunção endotelial	1
1.2	Aterosclerose, disfunção endotelial e óxido nítrico	2
1.3	Lipídeos e aterosclerose	3
1.4	Oxisteróis	6
1.5	Cavéolas	9
1.6	Oxisteróis, cavéolas e aterosclerose	14
2	HIPÓTESE	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo geral	19
3.2	Objetivos específicos	19
3.2.1	Definir se os oxisteróis podem se acumular nas Cavéolas	19
3.2.2	Determinar se o tratamento com oxisterol pode alterar a expressão gênica e protéica de caveolina-1 e a expressão protéica de eNOS	19
3.2.3	Determinar se o acúmulo de oxisterol nas cavéolas modifica a atividade da eNOS	20
3.2.4	Determinar se o acúmulo de oxisterol nas cavéolas pode modificar outras via de sinalização como CD40/CD40L e do Fator de Crescimento de fibroblastos	20
3.2.5	Determinar se o tratamento com oxisterol pode modificar a expressão gênica agindo em fatores de transcrição nucleares como PPAR γ e LXR	20

	3.2.6 Determinar se o tratamento com oxisterol pode alterar a liberação de fatores pró-inflamatórios	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	
4.1	Cultura celular	22
4.2	Isolamento das cavéolas	22
4.2.1	Extração de lípidos oxidados presentes na cavéola	24
4.2.2	Cromatografia Líquida (HPLC-MS/MS)	24
4.3	Co-imunoprecipitação	25
4.3.1	Análise da interação entre caveolina-1 e eNOS	25
4.3.2	Análise da expressão de eNOS fosforilada	26
4.4	Avaliação da expressão protéica por western blotting	27
4.5	Determinação de proteínas nitrosiladas	28
4.6	Determinação da produção de óxido nítrico em meio de cultura	28
4.7	Avaliação da influência do 7 β hidroxicolesterol sobre a via de sinalização do FGF	29
4.8	Determinação da produção de citocinas	29
4.9	Análise da expressão gênica de ABCA1 por PCR em tempo real	30
4.9.1	Extração de RNA	30
4.9.2	Eletroforese em gel de agarose	31
4.9.3	Reação de PCR em tempo real	31
4.10	Análise estatística	32
5	RESULTADOS	33
5.1	Separação de frações de membrana do tipo cavéola	33
5.2	Incorporação de 7 β hidroxicolesterol às cavéolas	34
5.3	Alteração da sinalização da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)	41
5.3.1	Interação eNOS-caveolina-1	41
5.3.2	Expressão gênica e protéica de caveolina-1 e expressão protéica de eNOS	43
5.3.3	Determinação da produção de óxido nítrico	46

5.4	Incorporação de 7 β hidroxicolesterol e seus efeitos sobre outras vias de sinalização	49
5.4.1	Via de sinalização do fator de crescimento de fibroblastos	49
5.4.2	Via de sinalização CD40/CD40L	51
5.5	7 β OHCHOL e seus efeitos sobre a inflamação	53
5.5.1	Produção do fator de necrose tumoral α e interleucina 10	53
5.6	7 β OHCHOL e seus efeitos sobre os fatores de transcrição PPAR γ e LXR	56
5.6.1	Expressão protéica de PPAR γ	56
5.6.2	Expressão gênica de ABCA1	57
5.7	7 β OHCHOL e a fosforilação da eNOS	59
6	DISCUSSÃO	
6.1	Caracterização dos domínios de membrana do tipo cavéola ..	62
6.2	Análise da incorporação de 7 β OHCHOL na cavéola	66
6.3	Efeito da incorporação de oxisterol sobre as proteínas de membrana	68
6.3.1	Via de sinalização da eNOS	69
6.3.2	Via de sinalização CD40/CD40L	73
6.3.3	Via de sinalização do FGF-2	75
6.3.4	Via de sinalização do PPAR-LXR	77
6.4	Limitações do estudo	79
7	CONCLUSÕES	81
8	REFERÊNCIAS	82

Lista de Abreviaturas

µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micromolar
µM/mL	Micromol/mililitro
25OHCHOL	25 hidroxicolesterol
7βOHCHOL ou 7β	7βhidroxicolesterol
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i> – Transportador A1 cassete ligante de adenosina trifosfato
ABCG1	<i>ATP-binding cassette transporter G1</i> – Transportador G1 cassete ligante de adenosina trifosfato
APCI	<i>Atmospheric pressure chemistry ionization</i> – Ionização química em pressão atmosférica
APOB 100	Apolipoproteína B 100
ApoE	Apolipoproteína E
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> – Ácido bicinconínico

BH ₄	Tetrahidrobiopterina
Cav-1	Caveolina-1
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHOL	Colesterol
CSD	<i>Caveolin scaffolding domain</i> - Domínio ancoradouro da caveolina
CT	Controle
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i> - Fator Relaxante Derivado do Endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> – quinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigênio
eV	Electron volt
FGF	<i>Fibroblasts growth factor</i> - Fator de crescimento de fibroblastos

FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> – Receptor de hormônio de crescimento de fibroblastos
Fr	Fração
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
FRS-2	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i> – Substrato 2 do receptor de fator de crescimento de fibroblasto
GRB-2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i> – Proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento
HDL	<i>High density lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
HPLC-MS	Cromatografia líquida de Alta Pressão acoplada à espectrometria de massa
HUVECs	Células endoteliais de veia umbilical humana
I	intensidade
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ip	imunoprecipitado
KDa	Kilodalton

LDL	<i>Low density lipoprotein</i> - Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	<i>Oxidized Low density lipoprotein</i> - Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LOX-1	<i>Lectin-like receptor for oxLDL</i> – Receptor lecitina-símile para LDLoxidada
LPS	Lipopolissacarídeo
LXR	Liver X receptor - Receptor X hepático
m/z	Relação massa/carga
MAPk	Proteína quinase ativada por mitógeno
MHCII	<i>Major histocompatibility complex</i> - Complexo principal de histocompatibilidade
min	Minuto
mL/min	Mililitro por minuto
mM	Milimolar
MMP-9	Metalloproteinase-9
MOPS	ácido 3-[N-morfolino]butanosulfônico
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i> – Monitoração múltipla de reações

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NFκB	<i>Nuclear factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cell</i> – Fator nuclear Kappa de células B ativadas
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
NO	<i>Nitric Oxide</i> - Óxido nítrico
NO ₃	Nitrato
NP40	Solução detergente tergitol tipo NP40
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PLCγ	Fosfolipase C γ
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> - Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PUFA	<i>Poli-unsaturated fatty acid</i> - Ácidos graxos poli-insaturados
RNAi	RNA de interferência
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SNO	αNitrosocisteína
SRBI	<i>Scavenger Receptor class B member 1</i> – Receptor

T	Tempo
TBST	<i>Tris buffered saline</i> – Tampão tris salino com tween
TEMED	N´N´N´N´tetrametiletilenodiamina
TNF α	Fator de necrose tumoral α
Tyr-f	Tirosina fosforilada
u.a.	Unidades arbitrárias
uv/vis	ultravioleta/visível
V	Volt
v/v	Volume/volume
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i> – Proteína de adesão celular 1
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> - Lipoproteína de densidade muito baixa
wb	Western blotting

Lista de Figuras

Figura 1	Representação esquemática da molécula de colesterol, seus derivados oxidados (oxisteróis) e suas origens	7
Figura 2	Visualização de cavéola por microscopia eletrônica de transmissão e representação da estrutura com seus componentes.	12
Figura 3	Isolamento das frações de cavéola	34
Figura 4	Detecção de lipídeos por espectrometria de massa (HPLC-MS) da fração 9	39
Figura 5	Detecção de lipídeos por espectrometria de massa (HPLC-MS) em diferentes frações de domínios de membrana	40
Figura 6	7 β OHCHOL aumenta a interação entre eNOS e Cav-1	42
Figura 7	7 β OHCHOL não altera a expressão gênica de caveolina-1	43
Figura 8	7 β OHCHOL não altera a expressão proteica de caveolina-1	45
Figura 9	7 β OHCHOL não altera a expressão proteica de eNOS	46
Figura 10	7 β OHCHOL não altera a produção de nitrato (NO ₃)	47
Figura 11	7 β OHCHOL diminui a nitrosilação de proteínas	48
Figura 12	7 β OHCHOL aumenta fosforilação de MAPk	50
Figura 13	7 β OHCHOL concentra o receptor CD40 nas frações ricas em caveolina-1	52
Figura 14	7 β OHCHOL não altera a expressão proteica de CD40	53
Figura 15	7 β OHCHOL não altera a produção de TNF α e IL-10	55
Figura 16	7 β OHCHOL não altera a expressão proteica de PPAR γ	57
Figura 17	7 β OHCHOL não altera a expressão gênica de ABCA-1	58
Figura 18	7 β OHCHOL diminui a fosforilação sítio-específica da eNOS	60

RESUMO

Jurado MC. *Efeito dos oxisteróis na sinalização através de cavéolas e sua relevância na aterosclerose* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 89p.

Oxisteróis (por exemplo, 7 β hidroxicolesterol) são gerados por modificações oxidativas que ocorrem na molécula de colesterol. Podem ser encontrados em elevados níveis plasmáticos em pacientes com aterosclerose e como componentes da placa aterosclerótica. Considerando que o colesterol é o principal componente da cavéola (domínios específicos da membrana plasmática que ancoram diversas proteínas de sinalização) formulamos a hipótese que os oxisteróis podem ser incorporados a estes domínios, interferindo com as vias de sinalização aí localizadas. Células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) em cultura foram expostas a 7 β hidroxicolesterol (10 μ g/mL) por diferentes tempos. Analisamos a incorporação desse oxisterol à cavéola utilizando espectrometria de massa e a atividade das proteínas de sinalização presentes neste domínio: óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), CD40/CD40L, receptor do fator de crescimento de fibroblastos (rFGF), utilizando PCR quantitativo e imunoblots. Inicialmente mostramos que o 7 β hidroxycolesterol, em concentrações fisiológicas, foi incorporado às cavéolas mais acentuadamente que em outros domínios de membrana. Esse fenômeno impediu o desligamento entre eNOS e caveolina, prejudicando a função dessa enzima. Também mostramos que o receptor CD40 apresentou uma maior incorporação à cavéola e o rFGF manteve uma ativação mais longa quando células foram expostas ao 7 β hidroxicolesterol. Esses efeitos gerados pelo oxisterol não estavam relacionados à sua ação sobre mediadores inflamatórios ou receptores nucleares, desde que nenhuma diferença foi observada no perfil de citocinas ou na expressão de genes dependentes da ativação de LXR. Assim, concluímos que a incorporação de 7 β hidroxycolesterol nos domínios de cavéola pode interferir com vias de sinalização sabidamente envolvidas na aterogênese ou na ruptura da placa.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.Oxisterol 3.Cavéolas 4.Óxido Nítrico Sintase Tipo III

Summary

Jurado MC. *Effect of oxysterols in cell signaling through caveolae and its relevance to atherosclerosis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 89p.

Oxysterols (for example, 7 β hydroxycholesterol) are generated by oxidative modifications to cholesterol molecules. They have been described in high levels in patients with atherosclerosis and as components of the atherosclerotic plaque. Since cholesterol is the main component of caveolae (plasma membrane domains that anchor several signaling proteins), we hypothesized that oxysterol could be incorporated to these domains, interfering with the signaling networks that use this pathway. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in culture were exposed to 7 β hydroxycholesterol (10 μ g/mL) for different times. We analyzed incorporation of this oxysterol to caveolae using mass spectroscopy and the activity of signaling pathways present in these domains: endothelial nitric oxide synthase (eNOS), CD40/CD40L, fibroblast growth factor receptor (FGFr), using quantitative PCR and immunoblots. Initially we showed that 7 β hydroxycholesterol, in physiological concentrations, was incorporated to caveolae more prominently than to other plasma membrane domains. This phenomenon caused a difficulty in eNOS release from caveolin, impairing its function. We also showed that the receptor CD40 presented a stronger incorporation to caveolae and FGFr maintained a longer activation when cells were exposed to 7 β hydroxycholesterol. These oxysterol effects were not related to its action in inflammatory mediators or nuclear receptors, since no difference could be observed in cytokine profiles or in the expression of genes dependent on LXR activation. Therefore we conclude that 7 β hydroxycholesterol incorporation in caveolae domains may interfere with signaling pathways known to be involved in atherogenesis or in plaque rupture.

Descriptors: 1.Atherosclerosis 2.Oxysterol 3.Caveolae 4.Endothelial Nitric Oxide Synthase

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aterosclerose e disfunção endotelial

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico que acomete os vasos de médio e grande calibre e que pode levar a síndromes coronarianas agudas ou isquêmicas cerebrais ¹.

O processo evolutivo da formação da lesão aterosclerótica na parede arterial pode ser entendido como uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas que, em conjunto, pode ser descrito como um processo inflamatório crônico ².

Neste contexto, a formação das placas de ateroma tem uma característica progressiva. A hipótese corrente para a patogênese dessa doença enfatiza a disfunção endotelial como o primeiro passo na formação da lesão aterosclerótica. Na disfunção endotelial há diminuição do relaxamento vascular endotélio-dependente, aumento da expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais e acúmulo de macrófagos e linfócitos no espaço subendotelial ³. Possíveis causadores da disfunção endotelial são tabagismo, hipertensão, níveis elevados de LDL oxidada (lipoproteína de baixa densidade), ou ainda, a combinação desses e outros fatores que compreendem as mesmas causas para o desenvolvimento da aterosclerose ^{2, 4}.

São múltiplas as vias de sinalização envolvidas nos fenômenos pró-aterogênicos. Disfunção nos mecanismos de transdução de sinal repercute, tanto na formação e crescimento da placa quanto no desencadeamento e sua ruptura ⁵. Algumas dessas vias são bem conhecidas, como a da produção de óxido nítrico (NO) e a de mediadores inflamatórios ⁶.

1.2 Aterosclerose, disfunção endotelial e óxido nítrico

Dentre as principais substâncias secretadas pelo endotélio que atuam no controle do tônus vascular podemos citar o óxido nítrico (NO), originalmente identificado como Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF) ⁷. Este gás desenvolve um importante papel como marcador da disfunção endotelial, onde uma diminuição de sua biodisponibilidade resulta em um aumento da vasoconstrição, da agregação plaquetária, da proliferação de células musculares lisas que, culminam na intensificação do processo aterosclerótico ⁸.

O NO é formado, na célula endotelial, a partir do aminoácido L-arginina que, sob ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em presença de cálcio e calmodulina é capaz de formar L-citrulina e NO. O NO liberado é direcionado à célula muscular lisa resultando no relaxamento vascular ⁹.

A eNOS é uma das três isoformas capaz de gerar NO e está sob ação de diversos estímulos extracelulares como a angiotensina II ¹⁰, bradicinina,

além de outros co-fatores como a tetrahidrobiopterina (BH₄) e a nicotimamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) ⁷.

É reconhecido o papel dos lipídeos circulantes na patogênese da aterosclerose desde a década de 70 ¹¹ e, atualmente, Blair e cols (1999) ¹² demonstraram que a presença de colesterol é capaz de modular indiretamente a atividade da eNOS através de sua ligação a matriz lipídica da membrana plasmática alterando a produção de NO. Adicionalmente, Deliconstantinos e cols (1995) ¹³ propuseram uma relação inversa entre colesterol e atividade da eNOS demonstrando que uma elevada concentração deste lipídeo poderia prejudicar a atividade enzimática ao diminuir a fluidez da membrana celular resultando em uma menor produção de NO.

Assim, nesse novo paradigma, passa a ser importante as interações dos lípidos circulantes com as vias de sinalização que controlam o processo inflamatório na parede vascular e, nesse campo, nosso conhecimento ainda está incompleto.

1.3 Lipídeos e Aterosclerose

Diferentes hipóteses foram sugeridas para tentar explicar o acúmulo de lípidos envolvidos no processo aterosclerótico. Uma das hipóteses propõe que o acúmulo de lípidos, essencialmente colesterol, ocorra devido a uma elevada síntese lipídica na íntima arterial ¹⁴. Outra hipótese relaciona o aumento de lípidos às concentrações de lípidos plasmáticos provenientes,

principalmente, das lipoproteínas que, atravessando o endotélio vascular, se infiltram nas diversas camadas da parede arterial onde são internalizadas por macrófagos, gerando assim, as células espumosas ^{4, 15}. Outros fatores relevantes são a qualidade e a concentração destes lípidos na circulação, pois determinadas frações ricas em colesterol, como as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), são mais susceptíveis a se depositarem na sub-íntima arterial ⁴.

A LDL é constituída principalmente por lipídeos, vitaminas lipossolúveis e uma parte protéica, a apolipoproteína B-100 (apoB-100) que é glicosilada com aproximadamente 4500 aminoácidos e confere um diâmetro de 18 a 25 µm e uma densidade entre 1,019 e 1,063 g/mL ¹⁶. Seu conteúdo lipídico é formado de aproximadamente 600 moléculas de fosfolípidos, 600 moléculas de colesterol, 1600 moléculas de ésteres de colesterol e 185 moléculas de triacilgliceróis ^{17, 18}, além disto, a LDL apresenta 2700 moléculas de ácidos graxos compostas, principalmente, por poli-insaturados (PUFAs) como o ácido linolêico e o ácido araquidônico ¹⁷.

O processo de oxidação da LDL passa a ser considerado uma etapa crítica na iniciação e desenvolvimento da lesão aterosclerótica, onde determinados componentes desta partícula, principalmente o colesterol em sua forma oxidada, podem estimular macrófagos para a produção de citocinas e enzimas hidrolíticas intensificando o processo inflamatório ¹⁹. Em condições fisiológicas, as moléculas lipídicas da LDL nativa são reconhecidas como componentes estruturais que farão parte da constituição celular e são regulados por um mecanismo de feedback negativo que resulta

em uma diminuição do influxo de colesterol a medida que este se acumula intracelularmente. Já o processo de captação dos lípidos oxidados envolve a participação de receptores do tipo scavengers, como o CD36, por exemplo, e sua internalização não sofre o mesmo processo regulatório o que favorece o seu acúmulo intracelular resultando na formação de células espumosas²⁰.

A LDL oxidada (LDLox) é capaz ainda de induzir uma resposta inflamatória ocasionando aumento da expressão de moléculas do tipo MHC II²¹, induzindo a presença de células T específicas para LDLox na placa de ateroma, bem como, a presença de anticorpos contra LDLox na circulação e na placa²². Estudos recentes têm demonstrado que a LDL oxidada exerce efeito necrótico/apoptótico em cultura de células endoteliais onde o principal componente tóxico presente é representado pelos oxisteróis, ou seja, a forma de colesterol oxidado²³.

O papel dos oxisteróis na patogenia da aterosclerose pode demonstrar uma nova perspectiva para a compreensão do mecanismo de desenvolvimento desta doença. Neste sentido, BROWN e cols (1997)²⁴ demonstraram que durante a oxidação da LDL *in vitro*, ocorre uma perda substancial de colesterol esterificado dando origem a esteróis oxigenados principalmente na posição 7, ou seja, a oxidação da LDL implica na formação de 7 α hidroxicolesterol, 7 β hidroxicolesterol e 27hidroxicolesterol, como também, 7cetocolesterol, indicando essas estruturas como principais componentes iniciadores da lesão²⁵.

1.4 Oxisteróis

Os oxisteróis são compostos resultantes de modificações oxidativas, de origem enzimática ou não, que podem ocorrer na molécula de colesterol. Estes compostos, são constituídos quimicamente por 27 carbonos, sendo 19 distribuídos em 4 cadeias carbônicas cíclicas (ciclopentanoperidrofenantreno) ligados a 8 carbonos em cadeia aberta lateral, porém, apresentando um ou mais grupamentos hidroxila (OH), em que a sua localização determina a nomenclatura destes compostos (ver figura 1). Assim, podemos encontrar como as principais classes de oxisteróis, os seguintes componentes: 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, 7cetocolesterol, 24-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol e 27-hidroxicolesterol e, aproximadamente, mais 20 outras moléculas²⁵.

A biossíntese do oxisterol foi primeiramente documentada em 1956 por Frederickson e Ono que incubaram colesterol radioativamente marcado com frações subcelulares ricas em mitocôndria²⁶. A partir desta descoberta, foi demonstrado, mais tarde, que estes compostos exerciam um poder inibitório da síntese de esteróis em cultura celular. Esta demonstração sugeriu um papel regulatório dos oxisteróis no metabolismo lipídico e tem servido com um estímulo para explorar suas ações fisiológicas²⁵.

Figura 1: Representação esquemática da molécula de colesterol, seus derivados oxidados (oxisteróis) e suas origens

Na molécula de colesterol estão representados os anéis carbônicos (A-D) e os carbonos numerados de 1 a 27. À esquerda estão localizados os oxisteróis de origem não-enzimática, à direita, enzimática e, ao centro os de origem mista. ERO= Espécies Reativas de Oxigênio; Enzimas: Ch25h = colesterol-25hidroxilase; CYP27 = esterol-27hidroxilase e CYP7A = 7αhidroxilase.

Esquema adaptado de Brown e Jessup (2009) ²⁷.

Nos anos seguintes, as pesquisas revelaram que os oxisteróis participam de diferentes etapas do metabolismo lipídico, atuando como reguladores da expressão gênica ²⁸, como substratos para a síntese de ácidos biliares ²⁹ e mediadores do transporte de esteróis ³⁰. Além destas

ações, experimentos *in vitro* têm relacionado a ação dos oxisteróis a eventos patológicos como apoptose³¹, necrose, inflamação³² e imunossupressão³³.

A presença de esteróis oxidados (oxisteróis) no plasma humano e, essencialmente, nas lesões ateromatosas tem sido relacionada ao desencadeamento e progressão da aterosclerose³⁴. Neste quadro, Ohtsuka e cols (2006)³¹ demonstraram uma relação entre o aumento do conteúdo de oxisterol e o aumento da gravidade da lesão. Esta descoberta foi evidenciada principalmente pela quantificação de 27hidroxicolesterol e 7cetocolesterol, sendo este último o principal responsável pela complicação da lesão ao induzir elevado nível de apoptose das células musculares lisas *in vitro*. Larsson e cols (2006)²³ também demonstraram intensa morte celular quando 7 β hidroxicolesterol e 7cetocolesterol são adicionados à cultura de células monocíticas U937, provavelmente devido à potencialização da produção de radicais livres contribuindo para a morte celular.

É interessante notar que o acúmulo de oxisteróis ocorre em regiões específicas da membrana plasmática, chamadas lipid rafts. O efeito citotóxico de oxisteróis pode ser decorrente da ligação com uma proteína receptora específica (Osh4), presente neste domínio, e que ativaria canais de cálcio²³.

Além disso, os oxisteróis podem alterar a composição lipídica de membranas, através da mobilização do colesterol no local²⁵. Ainda não está

claro se esse feito pode ocorrer também em outros domínios da membrana relacionados à sinalização celular, como as cavéolas.

1.5 Cavéolas

A década de 70 forneceu à comunidade acadêmica uma seqüência de informações importantes para o entendimento da morfologia da membrana plasmática. O mais significativo trabalho publicado por Singer – Nicolson mostrou, pela primeira vez, a presença de proteínas distribuídas em uma bicamada lipídica. Nasceu aí o clássico modelo do mosaico fluido de membranas ³⁵. Nesta mesma década, diversos outros trabalhos surgiram demonstrando que as proteínas de membrana não se encontravam em um estado inerte e, sim, poderiam se comportar de maneira dinâmica acompanhando alterações na constituição lipídica em regiões específicas da membrana ^{36, 37}.

À medida que novos conhecimentos foram adquiridos, novas definições passaram a se incorporar neste universo. Surgiu assim, o conceito dos *lipid rafts*, do inglês, balsas lipídicas, que de acordo com o Simpósio de Keystone, realizado em 2006, passaram a ser definidas como “pequenos domínios (10-200 nm), heterogêneos, altamente dinâmicos, ricos em esteróis e esfingolípídeos e que compartimentalizam os processos celulares” ³⁸.

Do mesmo modo, evoluíram as informações sobre um subgrupo de rafts, as cavéolas que, ainda na década de 50, foram descritas apenas como

uma invaginação da superfície celular, porém, sem um papel conhecido³⁹. Atualmente, o estudo de patologias como Parkinson, Alzheimer, hipertensão, sepse, infecções (bacterianas e virais) e aterosclerose entre outras, tem focado os lipid rafts, mais precisamente as cavéolas, como o principal alvo para a compreensão dos mecanismos de desenvolvimento destas doenças⁴⁰.

No entanto, ainda não se chegou a um consenso quanto à caracterização destes domínios devido a uma incompleta padronização da metodologia de separação que em parte é uma consequência da complexidade destas estruturas como a variedade e a concentração das moléculas lipídicas em sua constituição.

Assim, cavéolas são definidas como invaginações morfológicamente identificáveis da membrana plasmática com aproximadamente 50 a 100 nm de tamanho, originalmente descobertas por meio da microscopia eletrônica³⁹ (ver figura 2). Investigações adicionais mostraram ainda que sua distribuição poderia atingir limites mais internos à membrana plasmática, formando vesículas no interior celular desde a membrana até o núcleo e que poderiam ainda agrupar-se formando pequenas estruturas em forma de “cachos de uva”⁴¹. No entanto, sua atuação permaneceu adormecida até 1992 quando uma proteína denominada caveolina-1 foi clonada e posteriormente identificada como estrutura integrante e principal marcador da cavéola⁴².

As cavéolas são amplamente distribuídas por diversos tipos celulares, incluindo células musculares lisas, pneumócitos tipo I, macrófagos, adipócitos, mononucleares circulantes. Essas estruturas compõem cerca de

95% da superfície das células endoteliais ⁴¹ e podem alcançar uma densidade de aproximadamente 73 unidades por μm^2 em células endoteliais de capilares intramusculares ⁴³.

As cavéolas são formadas por uma porção lipídica caracterizada pela presença de colesterol, esfingomielina e glicoesfingolipídeos e, por uma porção protéica que corresponde à caveolina-1, uma proteína de 22KDa. O arranjo CSD (caveolin scaffoldig domain, do inglês, domínio ancoradouro da caveolina) é uma seqüência de 20 aminoácidos dentro da molécula caveolina capaz de mediar a sua interação com as diversas proteínas associadas à cavéola ⁴¹. Desta maneira, esta região está envolvida em uma série de funções celulares agindo, possivelmente, como uma ponte coordenadora entre moléculas de sinalização e domínios de membrana de composição lipídica.

Figura 2: Visualização de cavéola por microscopia eletrônica de transmissão e representação da estrutura com seus componentes

(A) Eletromicroscopia de transmissão de corte transversal de aorta de coelho mostrando a superfície da membrana plasmática com diversas cavéolas (setas). (B) Desenho esquemático da morfologia do lipid raft (estrutura linear) e da cavéola (invaginação da membrana) e seus constituintes.

Em (A) eletromicroscopia eletrônica obtida de Derblade e cols (2001) ⁴⁴.

Em (B) esquema obtido de Razani e cols (2002) ⁴¹.

Após a sua descoberta, têm sido atribuídos à cavéola diversos papéis que compreendem desde a mediação da captação seletiva e transporte de diversas moléculas por meio de diferentes processos ^{41, 45} até o transporte de moléculas intracelulares ⁴⁶. Dentre eles, pode-se citar a transcitose, processo na qual as proteínas podem ser transportadas da superfície luminal da célula endotelial para o compartimento intersticial a fim de serem capturadas pelos tecidos adjacentes através da lâmina basal. Na endocitose, a cavéola pode captar a proteína a partir da membrana plasmática e fundi-la com os compartimentos intracelulares, i.e. complexo de Golgi ^{41, 47}.

Mais especificamente, a cavéola é capaz de atuar intrinsecamente na homeostase do colesterol intracelular, pois é altamente sensível à depleção de colesterol ⁴⁸. Corroborando este experimento, Murata e cols (1995) ⁴⁹ demonstraram a relação entre colesterol e caveolina-1 na proporção de 1:1 quando na presença de 0,2% de SDS (duodecil sulfato de sódio). Além disto, ligantes de colesterol como a filipina e a nistatina podem desagregar a estrutura caveolar ^{42, 50}. Do mesmo modo, níveis adequados de colesterol podem favorecer a formação das cavéolas e até mesmo induzir sua formação em células previamente depletadas de cavéola. Tem-se demonstrado ainda uma íntima relação entre colesterol e cavéolas em que o tratamento de células com colesterol oxidase (que converte o colesterol à uma forma oxidada, o colestenoína), por exemplo, causa a migração da caveolina-1 para o complexo de golgi ⁵¹. Já a adição de LDL a uma cultura de fibroblastos resulta no aumento de RNA mensageiro para a caveolina-1 ²⁸.

O mais interessante sobre as cavéolas é o fato de múltiplas moléculas envolvidas na sinalização celular estarem aí localizadas. Diversas quinases, proteínas G, receptores de fatores de crescimento e a eNOS se agrupam nas cavéolas, usando a caveolina ou a estrutura lipídica diferenciada como arcabouço para sua função ^{41, 45}. Assim, alterações na sequência de aminoácidos da caveolina-1 ou na composição lipídica das cavéolas poderiam alterar cascatas de sinalização e levar a situações patológicas.

1.6 Oxisteróis, Cavéolas e Aterosclerose

Pelo exposto acima, ficou claro que as cavéolas desempenham importante papel na sinalização celular e sua composição lipídica pode ser um fator de desequilíbrio nessa sinalização.

Existem evidências experimentais de que alterações nos lípides circulantes, como as observadas em pacientes com aterosclerose, podem modificar as vias de sinalização presentes nas cavéolas ⁵². Foi demonstrado que células endoteliais de aorta bovina quando tratadas com soro hipercolesterolêmico, aumentavam a expressão de caveolina-1 em comparação com culturas celulares tratadas com soro normocolesterolêmico e que, esta estimulação resultava na diminuição da produção de óxido nítrico, possivelmente pelo aumento de caveolina-1 e formação do complexo caveolina-1/eNOS, gerando uma enzima quiescente ⁵³.

Outros experimentos mostraram que a estimulação de células por LDL oxidada foi capaz de estimular o efluxo de colesterol da cavéola,

diminuindo a interação entre caveolina-1 e eNOS e, conseqüentemente translocando o complexo caveolina-1/eNOS para outros compartimentos mais internos da célula, i.e. o complexo de golgi, onde a enzima não poderia ser estimulada por quaisquer de seus agonistas ¹². Paralelamente a estimulação com oxLDL, demonstrou-se que células endoteliais estimuladas com HDL apresentaram um restabelecimento do equilíbrio da constituição da fração de colesterol da cavéola e, conseqüentemente ativação da eNOS resultando em um aumento da produção de óxido nítrico ⁵⁴.

Mais intrigante é o fato de que a deleção do gene da caveolina-1 em animais hipercolesterolêmicos e deficientes em ApoE provocou níveis mais elevados de VLDL e LDL circulantes ⁵². Estas alterações lipídicas sugerem uma deficiência no metabolismo de LDL-colesterol, LDLox e ácidos graxos que pode ser observada pela diminuição da captação de colesterol da LDL através da cavéola, implicando na importância desta estrutura no influxo de lipídeos, que poderia resultar no aumento dos níveis circulantes. Contrariamente aos efeitos pró-aterogênicos sistêmicos, a análise histológica na aorta destes animais mostrou uma redução de aproximadamente 80% no tamanho da lesão ateromatosa sugerindo que a perda de caveolina-1 diminui drasticamente a captação lipídica pelas células endoteliais ⁵⁵. Os autores sugerem que a desestruturação da cavéola foi capaz de diminuir a atividade do CD36 consistente com a idéia de que este receptor necessita de caveolina-1 para a estabilização do transporte de colesterol para a membrana plasmática. Além disto, a ausência da cavéola

---

poderia gerar maior disponibilização de eNOS com conseqüente aumento da produção de óxido nítrico diminuindo a inflamação local ⁵⁵.

Estes dados revelam uma íntima relação entre cavéolas e vias de sinalização abrindo uma grande oportunidade de estudo para o entendimento dos mecanismos das vias de produção de óxido nítrico modulados pela caveolina-1.

2 HIPÓTESE

Os mecanismos pelos quais os lípides circulantes, especialmente aqueles sabidamente relacionados à patogênese da aterosclerose como as LDLs oxidadas, influenciam diversas vias de sinalização responsáveis pela orquestração do processo inflamatório na parede vascular ainda não estão completamente esclarecidas.

As cavéolas, por serem centros de localização de múltiplas vias de sinalização e pela sua composição lipídica distinta do restante da membrana, parecem um alvo potencial para o efeito dos lípides na transdução de sinal. Existem dados que sugerem essa participação, inclusive em vasos ateroscleróticos, porém, o conhecimento a respeito ainda é incompleto.

Levantamos a hipótese que oxisteróis, produtos derivados da oxidação do colesterol e que podem estar aumentados em pacientes com doença coronariana podem alterar a composição lipídica das cavéolas e dessa maneira interferir na transdução de sinal. Entre as vias que podem sofrer influência caso haja alterações na cavéola podemos encontrar a via de produção do NO pela eNOS, CD40/CD40L e FGF. Todas essas vias sabidamente desempenham algum papel no desenvolvimento da placa aterosclerótica na parede vascular.

Se nossa hipótese estiver correta, acreditamos poder encontrar novas maneiras de se programar a prevenção da doença aterosclerótica, levando-

se em conta os oxisteróis circulantes e não só a LDL. Além disso, os oxisteróis poderão se tornar alvos terapêuticos na luta contra a evolução da placa aterosclerótica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel dos oxisteróis sobre as vias de sinalização cujos componentes se localizam nas cavéolas.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Definir se oxisteróis podem se acumular nas cavéolas.

Estratégia: HUVECs foram tratadas com 7 β hidroxicolesterol para se determinar se houve sua incorporação às cavéolas. Estes domínios celulares foram isolados por gradiente de densidade em ultracentrifugação e a sua composição lipídica foi determinada por cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa (HPLC-MS).

3.2.2 Determinar se o tratamento com oxisterol pode alterar a expressão gênica e protéica de caveolina-1 e a expressão protéica de eNOS.

Estratégia: Em HUVECs tratadas com 7 β hidroxicolesterol por diferentes tempos foi analisada a expressão gênica de RNAm para caveolina-1. A expressão protéica de caveolina-1 e eNOS foi avaliada por imunoblot.

3.2.3 Determinar se o acúmulo de oxisterol nas cavéolas modifica a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).

Estratégia: A atividade da eNOS foi medida através da produção de NO (por luminescência), da presença de proteínas nitrosiladas (por dot-blot) e pela sua ligação com caveolina-1, avaliada por co-imunoprecipitação.

3.2.4 Determinar se o acúmulo de oxisterol nas cavéolas pode modificar outras vias de sinalização como CD40/CD40L e do Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) também localizados na cavéola.

Estratégia: Em HUVECs tratadas com 7 β hidroxicolesterol foi analisada a expressão de CD40 nas diferentes frações de membrana por western blotting. Também foi analisada a função do receptor de FGF, através da quantificação da fosforilação da MAPK.

3.2.5 Determinar se o tratamento com oxisterol pode modificar a expressão gênica agindo em fatores de transcrição nucleares como PPAR γ e LXR.

Estratégia: Em HUVECs tratadas com 7 β hidroxicolesterol determinamos a expressão protéica do fator de transcrição PPAR γ e do RNAm para ABCA-1, cuja expressão gênica depende exclusivamente da atividade de LXR, por PCR quantitativo.

3.2.6 Determinar se o tratamento com oxisterol pode alterar a liberação de fatores pró-inflamatórios.

Estratégia: O meio de cultura de HUVECs tratadas com 7 β hidroxicolesterol foi submetido à análise da produção de citocinas TNF α e IL-10 por imunoensaio.

4 MÉTODOS

4.1 Cultura Celular

Células Endoteliais de Cordão Umbilical Humano (Human Umbilical Vein Endothelial Cells - HUVEC) foram mantidas em meio de cultura RPMI1640 contendo penicilina (0,05 g/mL), estreptomicina (0,03 g/mL), bicarbonato de sódio (2 g/mL) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino. As células foram cultivadas em monocamada e plaqueadas com uma densidade que variou de 2×10^5 células/mL à 2×10^6 células/mL de acordo com cada experimento. Após 24 horas, atingindo-se 100% de confluência, as células foram privadas de soro fetal por 18 horas e, então, tratadas com 7 β hidroxicoolesterol (10 μ g/mL) em diferentes tempos de acordo com o objetivo de cada experimento e comparadas às células não tratadas (controle).

O colesterol e o 7 β hidroxicoolesterol (colesterol oxidado) utilizado para estimular a cultura de células endoteliais foi obtido da Sigma (Sigma-Aldrich, EUA).

4.2 Isolamento das Cavéolas

Frações de membrana do tipo cavéolas foram isoladas de acordo com o método descrito a seguir. Após o tratamento com colesterol ou 7 β hidroxicoolesterol, 10×10^6 células (cultivadas em P100) foram lavadas e

retiradas da cultura em tampão de base sacarose pH7.8 composto por (20 mM Tris-HCL; 250 mM sucrose; 1 mM CaCl_2 e 1mM MgCl_2). Logo após, foram centrifugadas por 2 min 250g. O sobrenadante foi dispensado e ressuspenso novamente em 1 mL de tampão de base complementado com os seguintes reagentes em uma concentração final de (Aminoethyl benzene sulfonyl fluoride 0,2 mM; Aprotinina 1 $\mu\text{g/mL}$; Bestatina 10 μM ; E-64 3 μM ; Leupeptina 10 $\mu\text{g/mL}$; Pepstatina 2 μM e Inibidor I de calpaina 50 $\mu\text{g/mL}$). As células foram, então, lisadas com agulha 22 g x 3", 20 vezes e centrifugadas à 1000g, 10 min. O sobrenadante foi recolhido e transferido para outro tubo (sobrenadante 1). Ao pellet remanescente foi adicionado novamente 1 mL de tampão de base mais cátions divalentes e inibidores de protease, no qual foi lisado por mais 20 vezes com uma agulha e seringa e submetido a centrifugação 1000g, 10 min (sobrenadante 2), quando, então, foram combinados os dois sobrenadantes. Posteriormente, foi adicionado um volume equivalente (2 mL) de tampão de base contendo 50% Optiprep, transferindo-os para um tubo de centrífuga de 10 mL. À esta amostra foi adicionado um volume de 5 mL de um gradiente de solução Optiprep em tampão de sacarose onde as densidades variaram em unidades de 5, sendo assim, 20%, 15%, 10%, 5% e 0%. Esta amostra foi submetida à ultracentrifugação à 52000g, 90 min [rotor SW-41]. Após o gradiente de centrifugação, o equivalente a 1 mL de tampão de cada gradiente a partir do topo foi coletado e numerado de 1 à 9 e avaliados por western blotting quanto à presença de caveolina-1⁵⁶.

4.2.1 Extração de lípides oxidados presentes na cavéola

As frações obtidas por ultracentrifugação foram submetidas à extração de lípides de acordo com Bligh & Dyer (1959)⁵⁷. A 500 µL de cada fração foi adicionado 0,3 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio:metanol (1:1; v/v) e colocados sob leve agitação. Este último passo foi repetido duas vezes com o objetivo de realizar uma melhor extração quando a fase orgânica fosse coletada e seca sob jato de nitrogênio. Essa fração foi reconstituída em 100 µL de etanol e injetada em HPLC-MS para a detecção do 7βhidroxicolesterol.

4.2.2 Cromatografia Líquida (HPLC-MS/MS)

A análise dos oxisteróis foi realizada por um sistema composto por HPLC acoplado a um detector de absorbância UV-Vis (SPD-10AVVP, Shimadzu, Tokyo, Japão) e a um espectrômetro de massa Quattro II da Micromass (Manchester, Reino Unido) em *tandem* (HPLC-MS/MS). Os oxisteróis foram primeiramente separados por HPLC utilizando uma coluna C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm, Gemini, Phenomenex) e uma fase móvel composta de metanol:acetonitrila (70:30, fase móvel B) e água (fase móvel A). A separação foi realizada mantendo-se inicialmente em 95% de B por 15 min, indo a 100% em 10 min, mantendo em 100% por 10 min e voltando para 95% em 10 min com fluxo de 1 ml/min.

O detector de UV foi programado para detecção no comprimento de onda de 210 nm. A detecção dos oxisteróis e do colesterol no espectrômetro

de massa foi feita no modo de ionização química a pressão atmosférica (APCI) positiva utilizando as seguintes condições: temperatura do probe 500°C; temperatura da fonte 150°C, voltagem do cone 25 V e energia de colisão 25 eV. Para a detecção específica dos oxisteróis utilizamos o modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) de análise no espectrômetro de massa, no qual é feita a detecção de uma transição específica do analito, selecionando-se o íon principal no primeiro quadrupolo (Q1) e após fragmentação provocada na câmara de colisão, o principal fragmento foi monitorado no segundo quadrupolo (Q2). A seguinte transição foi monitorada para detecção do 7 β hidroxicolesterol: m/z 367 $\rightarrow$ 159 e para o colesterol: m/z 369 $\rightarrow$ 95.

4.3 Co-imunoprecipitação.

4.3.1 Análise da interação entre caveolina-1 e eNOS

Esta metodologia permite a ligação do anticorpo contra a proteína de interesse a uma proteína G (ou A) que lhe confere peso permitindo que a proteína de interesse seja separada do lisado celular total após uma centrifugação simples. Neste processo, as proteínas ligadas à proteína de interesse também são precipitadas, sendo este método, também chamado de co-imunoprecipitação. Assim, foram colocados em um eppendorf 200 μ g de proteína, 50 μ L de proteína G a 4% em PBS (Sigma-Aldrich) e 2 μ g do anticorpo anti-caveolina-1 (polyclonal rabbit, clone 7C8 UPSTATE) que foram submetidas à agitação por 2 horas a 4°C. Posteriormente, as

amostras foram centrifugadas a 4500 rpm, por 20 minutos. O pellet foi lavado com 1 mL de PBS por 2 vezes, em que, a cada lavagem, foi realizada uma centrifugação a 4500 rpm, por 20 minutos. Finalmente, o pellet remanescente foi ressuspenso em tampão de amostra e aquecidos a 100°C para separação da proteína G da proteína de interesse que foi, então, aplicada em gel de poliacrilamida 8% para realização de western blotting e posterior transferência para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com leite desnatado 5%, lavada com TBS-Tween 0,5%. O anticorpo primário utilizado foi anti-eNOS (1:2000; Chemikon) incubado a 4°C, por 18 horas e o anticorpo secundário anti-rabbit (1:2500; Santa Cruz) foi incubado à temperatura ambiente por 2 horas com agitação leve.

4.3.2 Análise da expressão de eNOS fosforilada

A técnica de co-imunoprecipitação também foi aplicada para a detecção de eNOS fosforilada. Esta técnica se baseou no princípio da imunoprecipitação com anticorpo contra eNOS (anti-eNOS 1:2000; Chemikon) e posterior revelação com anticorpo contra resíduos de tirosina fosforilada PY20 (mouse; 1:5000; BD Transduction) e anticorpo secundário anti-mouse 1:2500 (Sigma_Aldrich) de acordo com o protocolo de western blotting descrito abaixo.

4.4 Avaliação da expressão protéica por western blotting

As amostras foram submetidas à quantificação de proteínas pelo método de BCA (de acordo com recomendações do kit). Em seguida, 200µg de proteína foram acrescidas de tampão de amostra (2% SDS, 60mM Tris pH 6.8, 5% de mercaptoetanol, e 0,01% de azul de bromofenol) e submetidas à eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel 10% de poliacrilamida (1.5M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amonia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em aparelho semi-dry transfer (Bio-Rad). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio 5% de leite desnatado em tampão TBS-T (50 mM de tampão Tris, pH 8,0, 100mM NaCl, 1% Tween 20) por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em TBS-T (0,1%) e incubadas com o anticorpo primário contra as proteínas de interesse por 18 horas, a 4°C. Os anticorpos utilizados foram caveolina-1 diluídos a 1:1000 (mouse, BD Transduction); eNOS 1:2000 (rabbit, Chemikon); MAP fosforilada [Phospho-p44/42 MAPK(Erk1/2)] 1:5000 (mouse, Cell Signaling); MAP total [p44/42 MAP Kinase] 1:5000 (mouse, Cell Signaling); CD40 1:1000 (rabbit, santa cruz) e PPARγ 1:1000 (mouse, Chemikon). Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução contendo anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído a 1:2500 (anti-mouse ou anti-rabbit, Sigma-Aldrich) e expostas ao sistema de detecção Super Signal (Pierce). A expressão da proteína foi comparada por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público "Image J", criado por Wayne Rasband do National Institutes

of Mental Health, NIH, USA. Os resultados foram representados pela média de 3 testes por grupo.

4.5 Determinação de proteínas nitrosiladas

O lisado total de HUVECs tratadas com 7 β hidroxicolesterol foi submetido a um sistema de DOT-BLOT onde 10ug de proteínas totais foram aplicadas em uma membrana de nitrocelulose previamente umedecida com PBS, posteriormente bloqueadas com leite desnatado 5% e incubadas com anticorpo primário S-nitrosocisteína 1:10000 (rabbit, ABcam) por 18 horas. Em seguida, incubadas com anticorpo secundário 1:2500 (igG anti-rabbit, Sigma-Aldrich). A expressão de proteínas nitrosiladas pode ser observada pela intensidade dos *spots* formados.

4.6 Determinação da produção de óxido nítrico em meio de cultura

A biodisponibilidade de NO foi determinada por meio da dosagem de nitrato por quimioluminescência (Sievers, modelo 280A, EUA). Este método requer a redução de nitrato para NO através da reação de cloreto de vanádio em ácido clorídrico à 95°C. O NO gerado é carregado pelo gás nitrogênio, um gás inerte, a uma câmara de geração de ozônio. A reação entre NO e ozônio gera luz, quantificada por fotomultiplicadoras. As curvas de calibração em níveis múltiplos foram realizadas com padrão externo, nitrato de sódio

(SIGMA-ALDRICH), utilizando-se um programa específico (Sievers versão 2.2, EUA) ⁵⁸.

Assim, HUVECs foram tratadas com 7 β hidroxicolestero (10 μ g/mL) ou A23187 (1mM) por 1 hora ou, com 7 β hidroxicolesterol mais A23187, totalizando 2 horas de estímulo. Os valores medidos de nitrato em μ M correspondem à produção definida por $2,5 \times 10^5$ células por well.

4.7 Avaliação da influência do 7 β hidroxicolesterol sobre a via de sinalização do FGF (Fibroblasts Growth Factor).

HUVECs (2×10^6 cels/mL) foram tratadas com 7 β hidroxicolesterol (10 μ g/mL) por 1 hora e, após, com FGF (1 μ g/mL) por 5 minutos e comparadas aos grupos tratados com apenas 7 β hidroxicolesterol (1 hora) ou FGF (5 minutos). Após o tratamento, as células foram lisadas com tampão de lise NP40 e o lisado total submetido a western blotting para análise da expressão protéica de MAP fosforilada. Os resultados são demonstrados pela expressão de MAP fosforilada em relação à expressão de MAP total.

4.8 Determinação da produção de citocinas

O sobrenadante da cultura de células foi colhido para análise das citocinas TNF α (Tumor Necrosis Factor α) e IL-10 por meio de imunoensaio (ELISA), utilizando-se kits comercialmente disponíveis BD®.

4.9 Análise da expressão gênica de ABCA1 (ATP binding cassette A1) por PCR (Polimerase Chain Reaction) em tempo real

4.9.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente TRIZOL (Life Technologies, USA). As células coletadas por centrifugação foram homogeneizadas em 1 mL do reagente de extração e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e, após adição de 0,2 mL de clorofórmio, foram agitadas vigorosamente por 15 segundos e incubadas à temperatura ambiente, por 3 minutos. A separação de fases foi feita por centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C. O RNA presente na fase aquosa (superior) foi transferido para outro tubo e precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol a 75% (com o uso de vórtex), centrifugado a 7000g por 5 minutos, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em água contendo DEPC (dietilpirocarbonato).

Para a quantificação do RNA foram feitas alíquotas equivalentes a 2 µg acrescidas de água para totalizar a diluição de 1:150. A absorbância da amostra foi determinada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280 nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas).

4.9.2 Eletroforese em gel de agarose

A agarose (1%) foi dissolvida em água, adicionando-se 1/10 do volume final de gel de tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino]butanosulfônico) (200 mM de MOPS, cloreto de sódio 50 mM, pH 7,0; EDTA 10 mM – solução 10 X concentrada) e 4% de formaldeído. O material foi vertido em cuba eletroforética com pente para formação de poços. Após resfriamento, o tampão de corrida (MOPS 20 mM, formaldeído 8%) foi adicionado. As amostras (1 µg de RNA) foram preparadas pela adição de um volume de tampão de amostra (63 µL de água nanopura, 81 µL de formaldeído, 48 µL de glicerol – azul de bromofenol, 48 µL de MOPS 10 X, 0,5 µL de brometo de etídeo). O material foi aquecido por 10 minutos à 70°C, em seguida resfriado por 2 minutos e aplicado no gel. Após eletroforese, o aparecimento de bandas foi verificado por exposição do gel à luz ultravioleta.

4.9.3 Reação de PCR em tempo real

A expressão do gene foi avaliada por PCR em tempo real utilizando o equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, California USA) com o kit SuperScript III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen) que contém SYBR® Green I como fluoróforo. O kit realiza a síntese do cDNA e a amplificação da sequência de interesse ao mesmo tempo. A quantificação da expressão gênica foi realizada por $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ^{59, 60}, usando o gene da caveolina-1 ou do ABCA1 como controles internos. As sequências

dos iniciadores específicos utilizados, assim como as temperaturas de hibridização e tamanhos dos fragmentos encontram-se na Tabela 1.

GENE	Iniciador 3'	Iniciador 5'	Temperatura de Hibridização (°C)	Tamanho do Fragmento (pb)
Caveolina-1	GAAAAGTC CCCAAAGG CAGAAT	GAAAAGTC CCCAAAGG CAGAAT	57.5	148
ABCA-1	TCCGTGTT CTTGATCTT CCCAC	GTTTCGTC CCACCAAG TCCC	55	143

4.10 Análise Estatística

Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão. As análises foram realizadas utilizando-se o programa InStat3 onde foi aplicado análise ANOVA não paramétrico seguida de pós-teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 0,05 para todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Separação de frações de membrana do tipo cavéola

O processo de obtenção de frações de membrana tem como princípio a utilização de substâncias tamponadas com diferentes graus de densidade que, submetidos a uma ultracentrifugação, permitem a separação de diferentes estruturas com diferentes densidades.

A figura 3 mostra a expressão protéica de caveolina-1, uma proteína de 21 kDa, nas frações 7, 8, 9 e 10, correspondentes a porção mais inferior do gradiente. Não foi visualizada a presença de caveolina-1 nas frações 1 a 6, ou seja, nas frações mais superiores do gradiente. Nesta figura também está esquematizado a concentração de optiprep presente nas frações quando o gradiente é gerado. Assim, observa-se a presença de caveolina-1 nas porções onde há maior concentração de optiprep. Esta figura é representativa de uma dentre as dez extrações realizadas em nosso laboratório.

Estabelecido o método de separação de cavéolas, o próximo passo foi avaliar a constituição lipídica deste domínio da membrana celular.

Figura 3 - Isolamento das frações de cavéola

Homogenato de HUVECs (10×10^6 cels) foi submetido a gradiente de sacarose/optiprep (parte superior da figura). Amostras das frações obtidas após ultracentrifugação foram separadas em gel de agarose e a expressão da caveolina-1 foi determinada por imunoblot. Observamos que a caveolina-1 foi detectada nas frações do gradiente 7, 8, 9 e 10.

5.2 Incorporação de 7β hidroxicolesterol às cavéolas

Para a avaliação da incorporação de oxisterol à fração de membrana do tipo cavéola, HUVECs tratadas com 7β hidroxicolesterol foram submetidas a gradiente de centrifugação, confirmação das frações ricas em cavéola por western blotting e posterior análise da composição lipídica das frações por meio de espectrometria de massa acoplada a um cromatógrafo líquido.

Esta metodologia tem por princípio a cromatografia líquida de fase reversa onde, em uma dada amostra, suas moléculas lipídicas podem ser separadas de acordo com a polaridade e, posteriormente fragmentadas em um espectrômetro de massa onde, cada molécula é capaz de gerar um subproduto específico o qual será fornecido uma carga. O fragmento resultante será representado por um valor correspondente ao tamanho do fragmento em relação à carga adquirida e expresso como massa/carga (m/z).

Os gráficos representados pelo perfil obtido em espectrometria de massa (HPLC-MS) são assim representados em suas coordenadas: o eixo da ordenada representa o tempo de retenção de cada molécula, ou seja, o tempo que cada molécula leva para se desprender da coluna de sílica e o seu sinal ser imediatamente detectado. A abscissa é representada por um valor em porcentagem. A porcentagem relativa do sinal é uma representação à transição de massa, ou seja, a fragmentação da molécula que resulta em um subproduto particular e específico monitorado. Assim, para o colesterol foi monitorada a transição 369→95, ou seja, o colesterol apresenta uma massa molecular de 386 e, o valor 369 corresponde à massa resultante da perda de uma molécula de água do colesterol e, o valor 95 é o subproduto característico gerado pelo colesterol. Já, para o 7βhidroxicolesterol, monitorou-se a transição 367→159, ou seja, a massa molecular deste composto é de 402 e, o valor 367 corresponde a massa resultante da perda de duas moléculas de água formando o fragmento característico 159. Deste modo, os principais valores buscados para análise dos dados na abscissa dos gráficos foi representado em 95% para o colesterol e 159% para o 7βhidroxicolesterol.

Desta maneira, para avaliar o método de detecção, células endoteliais foram tratadas com colesterol (10 µg/mL) ou 7βOHCHOL (10 µg/mL) por 1 hora e submetidas ao processo de ultracentrifugação para detecção das frações de cavéolas e, em seguida, foi escolhida uma fração representativa de cavéola (fração 9) para avaliação de seus constituintes lipídicos.

A figura 4 reflete o perfil de 6 cromatogramas da fração 9 de HUVECs tratadas com colesterol (Figuras 4C e 4D) e 7 β OHCHOL (Figuras 4E e 4F) e comparadas à HUVECs controle (Figura 4A e Figura 4B) que foram submetidas à fase móvel metanol:acetonitrila (70:30; v/v) e observados a 210 nm.

Estes resultados revelaram que, células controle apresentaram em sua constituição a molécula de colesterol encontrada em 30 minutos de corrida e que pode ser identificada pelo método de transição 369→95 (Figura 4A). Além disso, quando estas células são avaliadas pelo método de transição 367→159 que corresponde ao fragmento de 7 β OHCHOL, não foi observado nenhum sinal (Figura 4B).

Este padrão de análise foi aplicado, então, para os dois tratamentos seguintes. Assim, nas células submetidas ao estímulo com colesterol, podemos visualizar um sinal emitido pelo fragmento 369→95 correspondente ao colesterol (Figura 4C) e, nenhum sinal de emissão na fragmentação para o 7 β OHCHOL (Figura 4D).

Finalmente, quando HUVECs foram submetidas ao tratamento com 7 β OHCHOL, podemos observar a presença de fragmentos de origem 369→95, ou seja, colesterol aos 30 minutos de corrida (Figura 4E), bem como, de origem 367→159, ou seja, 7 β OHCHOL visualizados em aproximadamente 11 minutos de corrida (Figura 4F).

Nas figuras (4A, 4C e 4E) também estão expressos os valores 184, 800 e 593 que correspondem à área referente ao íon monitorado, ou seja, o

colesterol. Já, na figura 4F, está expresso o valor 315, ou seja, a área do sinal emitido pelo 7 β OHCHOL. Esta área está relacionada à intensidade do sinal que é captado pelo detector e, portanto, pode fornecer uma indicação da concentração do fragmento encontrado.

Para avaliar se a cavéola de células endoteliais tratadas com oxisterol poderiam incorporar este lipídeo, HUVECS foram tratadas com 7 β hidroxicolesterol (10 μ g/mL) por 1 hora e suas frações foram analisadas.

Estabelecidas as condições ideais para análise da constituição lipídica das frações obtidas por ultracentrifugação, o passo seguinte foi avaliar a constituição de outras frações para um estudo mais completo.

Assim, a figura 5 mostra o perfil cromatográfico de 4 diferentes frações correspondentes a frações não caveolares (1 e 2) e frações ricas em caveolina-1 (7 e 8) de HUVECs tratadas com 7 β hidroxicolesterol (10 μ g/mL) por 1 hora e posterior análise quanto ao conteúdo de colesterol e 7 β hidroxicolesterol por meio de seus respectivos fragmentos.

Na figura 5 também podemos observar fragmentos derivados da molécula de colesterol em todas as frações estudadas, ou seja, tanto em frações de cavéola como em frações não caveolares, porém, com diferentes intensidades de sinal detectadas. Para as frações não caveolares, a intensidade do colesterol calculada foi de 567 e 449 (frações 1 e 2, respectivamente) (Figura 5A e 5B) e para as frações ricas em cavéola, 568 e 385 (frações 7 e 8, respectivamente) (Figura 5C e 5D).

Quando a detecção do 7 β hidroxicolesterol foi avaliada, os resultados mostraram que as frações ricas em cavéolas apresentam incorporadas em sua constituição os fragmentos correspondentes aos valores de transição 367→195 (7 β OHCHOL) com intensidades de 315 e 477, para as frações 7 e 8 respectivamente, visualizados em aproximadamente 15 minutos de corrida (Figura 5C e 5D). Além disto, as frações 1 e 2 não caveolares, também apresentaram os fragmentos de 7 β OHCHOL com intensidades de 374 e 339, respectivamente (Figura 5A e 5B).

O valor das áreas expresso para cada um dos fragmentos constitui uma ferramenta importante, pois, permite que seja estabelecida uma relação matemática da constituição de cada um dos compostos encontrados em cada fração. Assim, para a constituição de 7 β OHCHOL em relação ao colesterol podemos aplicar a seguinte fórmula, aqui convencionada:

$$[ ] \text{ 7}\beta\text{OHCHOL/CHOL} = I (367 \rightarrow 159) / I (369 \rightarrow 95), \text{ onde lê-se:}$$

A concentração de 7 β OHCHOL em relação ao colesterol equivale a intensidade de 7 β OHCHOL representada pela fragmentação em transição 367→159 dividida pela intensidade de CHOL representada pela fragmentação em transição 369→95.

Assim, ficaram estabelecidas as seguintes concentrações de 7 β OHCHOL em relação ao CHOL nas frações: Fração 1 de 0,66 correspondente a 374/567 (Figura 5A); Fração 2 de 0,75 correspondente a 339/449 (Figura 5B); Fração 7 de 0,55 correspondente a 315/568 (Figura 5C) e, finalmente fração 8 de 1,24 correspondente a 477/385 (Figura 5D).

Figura 4 - Detecção de lipídeos por espectrometria de massa (HPLC-MS) da fração 9

HUVECS (10×10^6 cels) tratadas com CHOL, 7βOHCHOL ($10 \mu\text{g/mL}$) por 1 hora ou não (CT) foram submetidas a gradiente de ultracentrifugação. A fração 9 foi submetida à extração de lípidos totais e injetada em HPLC-MS. A figura representa o perfil cromatográfico, onde a abscissa mostra o sinal referente à transição de massa e a ordenada representa o tempo de retenção em HPLC. Para detecção do CHOL, foi monitorada a transição 369→95 e para o 7βOHCHOL, 367→159. Os valores no gráfico representam a área do sinal do íon monitorado.

Figura 5 - Detecção de lipídeos por espectrometria de massa (HPLC-MS) em diferentes frações de domínios de membrana

HUVECS (10×10^6 cels) tratadas com $7\beta\text{OHCHOL}$ ($10 \mu\text{g/mL}$) por 1 hora foram submetidas a gradiente de ultracentrifugação. As frações 1, 2, 7 e 8 foram submetidas a extração de lípidos totais e injetadas em HPLC-MS. A figura representa o perfil cromatográfico, onde a abscissa mostra o sinal referente à transição de massa e a ordenada representa o tempo de retenção das diferentes frações analisadas. Para detecção do CHOL, foi monitorada a transição $369 \rightarrow 95$ e para o $7\beta\text{OHCHOL}$, $367 \rightarrow 159$. Os valores no gráfico representam a área do sinal do íon monitorado.

5.3 Alteração da sinalização da Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS)

Após avaliar a capacidade de incorporação do oxisterol aos domínios de membrana de células endoteliais, o passo seguinte teve por objetivo avaliar a influência dessa incorporação sobre vias de sinalização de moléculas residentes num domínio específico, a cavéola.

5.3.1. Interação eNOS – caveolina-1

Para avaliar se a incorporação de oxisterol foi capaz de interferir na interação eNOS – caveolina-1, realizamos um ensaio de co-imunoprecipitação. Assim, HUVECs tratadas com 7 β hidroxicolesterol (10 μ g/mL) por 1 hora foram lisadas e imunoprecipitadas com anticorpo anti-caveolina-1. Esta amostra foi submetida à eletroforese e a membrana foi incubada com anticorpo anti-eNOS.

A figura 6 mostra, em unidades arbitrárias, um aumento da expressão da proteína eNOS ligada à caveolina-1 quando HUVECs foram tratadas com 7 β hidroxicolesterol por 1 hora comparada ao controle ($p < 0,01$).

Este resultado mostra que o tratamento com 7 β OHCHOL foi capaz de induzir uma maior interação entre eNOS e caveolina-1, provavelmente em resposta à uma maior incorporação deste lipídeo nas frações de cavéola.

Figura 6 - 7βOHCHOL aumenta a interação entre eNOS e Cav-1

HUVECs (2×10^6 cells) foram estimuladas com 7βOHCHOL (10 μg/mL) por 1 hora. O homogenato foi imunoprecipitado com caveolina-1 e em seguida submetido a imunoblot contra eNOS. Observamos que o 7βOHCHOL aumentou a interação entre caveolina-1 e eNOS em relação ao controle. * $p < 0,01$ 7βOHCHOL vs CT. $n=3$.

5.3.2. Expressão gênica e protéica de caveolina-1 e expressão protéica de eNOS

Para avaliar se o aumento da interação entre caveolina-1 e eNOS ocorreu devido a um aumento da expressão destas proteínas em detrimento do efeito da incorporação do oxisterol, buscamos estudar a expressão protéica das duas proteínas e expressão gênica da caveolina-1.

Como podemos ver na figura 7 a expressão de RNAm para caveolina-1 de HUVECs não apresenta alterações significantes ao longo de até 24 horas de tratamento com 7 β hidroxicolesterol (10 μ g/mL).

Figura 7 - 7 β OHCHOL não altera a expressão gênica de caveolina-1

HUVECs (2×10^6 cells) foram estimuladas com 7 β OHCHOL (10 μ g/mL) por 2, 6, 12 e 24 horas e o homogenato foi submetido à análise da expressão gênica por PCR quantitativo. Observamos que não houve alteração da expressão gênica de caveolina-1 nos diferentes tempos analisados em relação ao controle. n=6.

Do mesmo modo, quando analisamos a figura 8 que mostra a expressão protéica, não foi possível observar nenhuma alteração significativa no mesmo período analisado anteriormente, ou seja, por até 24 horas de tratamento.

A expressão protéica de eNOS em células tratadas com colesterol oxidado também foi avaliada. Como pode ser visto na figura 9, não houve alteração significativa da expressão de eNOS em HUVECs tratadas com 7 β OHCHOL por 1 hora quando comparadas ao grupo controle.

Estes resultados mostram que a maior interação entre eNOS e caveolina-1 observada na figura 6 não é resultado de uma maior expressão protéica, enfatizando-se assim, o papel da incorporação de oxisterol à fração de cavéola agindo sobre a interação destas duas proteínas.

Figura 8 - 7βOHCHOL não altera a expressão proteica de caveolina-1

HUVECs (2×10^6 cels) foram estimuladas com 7βOHCHOL (10 μg/mL) por 2, 6, 12 e 24 horas. O homogenato foi submetido à análise da expressão protéica para caveolina-1 por imunoblot. Observamos que o estímulo com 7βOHCHOL não alterou a expressão de caveolina-1 em relação ao controle nos diferentes tempos analisados. n=3.

Figura 9 - 7βOHCHOL não altera a expressão proteica de eNOS

HUVECs (2×10^6 cels) foram estimuladas com 7βOHCHOL (10μg/mL) por 1 hora. O homogenato foi submetido à análise da expressão proteica para eNOS por imunoblot. Observamos que o estímulo com 7βOHCHOL não alterou a expressão de caveolina-1 em relação ao controle. n=5.

5.3.3. Determinação da produção de óxido nítrico

Para investigar o efeito biológico gerado pela maior interação da eNOS com a caveolina-1, foi determinada a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais em resposta ao tratamento com oxisterol.

A figura 10 mostra a produção de óxido de células endoteliais tratadas com 7βhidroxicolesterol por 1 hora e comparadas ao grupo controle. Neste experimento também foi utilizado o composto sintético A23187 (1mM), que atua como mobilizador de cálcio intracelular, sendo utilizado, portanto, como controle positivo. Esta figura mostra que o tratamento com 7βOHCHOL e com A23187 separadamente não foram capazes de induzir uma maior

produção de NO_3 quando comparados ao controle. No entanto, quando as células foram tratadas com $7\beta\text{OHCHOL}$ mais A23187 foram capazes de produzir aproximadamente o dobro de NO_3 quando comparadas aos estímulos aplicados isoladamente ($p < 0,01$).

Figura 10 - $7\beta\text{OHCHOL}$ não altera a produção de nitrato (NO_3)

HUVECs (2×10^5 cells) foram estimuladas com $7\beta\text{OHCHOL}$ ($10 \mu\text{g/mL}$) ou A23187 (1mM) por 1 hora ou, $7\beta\text{OHCHOL}$ mais A23187 por 1 hora cada estímulo. O meio condicionado sem fenol foi submetido à quantificação de NO_3 por luminescência. Observamos que tanto o $7\beta\text{OHCHOL}$ como o A23187 não foram capazes de induzir uma maior produção de NO_3 em relação ao controle. No entanto, HUVECs tratadas com $7\beta\text{OHCHOL}$ concomitante ao A23187 apresentaram um aumento significativo de NO_3 quando comparadas ao controle. * $p < 0,01$ $7\beta\text{OHCHOL} + \text{A23187}$ vs CT e # $p < 0,01$ $7\beta\text{OHCHOL} + \text{A23187}$ vs $7\beta\text{OHCHOL}$. $n = 4$.

O NO produzido intracelularmente é capaz de se ligar, reversivelmente, a outros resíduos de cisteína de uma proteína formando um composto denominado nitroso-cisteína e que pode ser detectado com um anticorpo específico, mostrando indiretamente a produção de NO. A figura

11 mostra a quantificação de proteínas totais nitrosiladas em que podemos observar uma diminuição tempo-dependente da formação de compostos nitrosilados, atingindo-se uma menor produção por volta de 24 horas.

Assim, estes resultados revelam que o tratamento com 7 β OHCHOL foi capaz de diminuir a biodisponibilidade de NO de maneira tempo-dependente, como observado pela análise de proteínas nitrosiladas. No entanto, não foram encontradas diferenças na produção de NO₃ por 1 hora.

Figura 11 - 7 β OHCHOL diminui a nitrosilação de proteínas

HUVECs (2×10^5 cels) foram estimuladas com 7 β OHCHOL (10 μ g/mL) por 2, 6, 12 e 24 horas e o homogenato foi submetido à quantificação de α Snitrosocisteína. Nossos dados demonstram que há uma diminuição tempo dependente de proteínas nitrosiladas sugerindo uma menor concentração de NO disponível para a sinalização. * $p < 0,05$ 12h vs CT ** $p < 0,01$ 24h vs CT. n=3.

5.4. Incorporação de 7 β hidroxicolesterol e seus efeitos sobre outras vias de sinalização

Se o oxisterol é capaz de se incorporar às cavéolas alterando a via de sinalização da eNOS, seu efeito deve ser observado em outras vias de sinalização que aí residem. Portanto, a próxima etapa consistiu na análise dos efeitos do oxisterol na sinalização do FGF e na expressão do CD40.

5.4.1. Via de sinalização do Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF)

A via das MAPk compreende uma família de proteínas do tipo serina-treonina altamente conservadas envolvidas em uma série de funções celulares como proliferação, diferenciação e mobilidade e que podem ser ativadas em resposta a diversos estímulos celulares, sendo um deles, o fator de crescimento de fibroblastos (FGF).

Assim, buscamos observar as possíveis alterações geradas em HUVECs estimuladas com FGF (1 μ g/mL) por 5 minutos previamente tratadas com 7 β hidroxicolesterol por 1 hora e analisamos a expressão de MAPK fosforilada.

A figura 12 mostra um aumento da fosforilação da MAPk em HUVECs tratadas com FGF por 5 minutos em relação ao controle e, o tratamento prévio com 7 β OHCHOL foi capaz de reduzir substancialmente a fosforilação levando-a à níveis basais. Adicionalmente, o tratamento com 7 β OHCHOL isolado também foi capaz de estimular a fosforilação da MAP.

Estes resultados mostram que o 7 β OHCHOL pode induzir um comportamento diferente de acordo com o maneira do estímulo, ou seja, isolado ou em associação com o FGF.

Figura 12 - 7 β OHCHOL aumenta fosforilação de MAPk

HUVECs (2×10^6 cels) foram estimuladas com 7 β OHCHOL (10 μ g/mL) por 1 hora, FGF (1 μ g/mL) por 5 minutos ou, 7 β OHCHOL (1h) + FGF (5min). O homogenato foi submetido à análise da expressão protéica de MAPk fosforilada (fosfo p44/42) e MAPk (p44/42) por imunoblot. Os resultados são apresentados como MAPfosforilada/MAP total. Observamos que o 7 β OHCHOL é capaz de estimular a fosforilação da MAP por até 1 hora de tratamento do mesmo modo que o FGF. No entanto, não houve alteração da fosforilação quando os dois estímulos foram aplicados ao mesmo tempo. Estes dados sugerem que o 7 β OHCHOL é capaz de alterar a sinalização do receptor de FGF. n=2.

5.4.2. Via de sinalização CD40/CD40L

Outra via de sinalização importante e que seu receptor está localizado na cavéola é representada pela via CD40/CD40L. Deste modo, nosso objetivo foi avaliar se o tratamento com 7 β OHCHOL e, conseqüentemente se sua incorporação à cavéola poderia alterar a localização deste receptor em diferentes domínios da membrana plasmática.

A figura 13 mostra um western representativo de HUVECs tratadas com 7 β OHCHOL por 1 hora e as frações de cavéolas colhidas e submetidas a eletroforese onde a membrana foi revelada contra a proteína CD40. A figura 13A mostra as frações obtidas de células controle. Sob esta condição, parece haver uma distribuição homogênea de CD40 por toda a membrana celular, representada pelas frações 1 a 6 e, também a presença de CD40 nas frações correspondentes às cavéolas 7 a 9. Adicionalmente, a figura 13B nos mostra a expressão de CD40 em células tratadas com 7 β OHCHOL onde podemos ver uma maior expressão desta molécula principalmente nas frações 7 a 9, ricas em cavéolas e, uma sensível diminuição nas frações 1 a 6.

Para avaliar se o aumento da expressão de CD40 encontrado nas frações ricas em cavéola foi devido a um aumento total da expressão do CD40, o lisado de HUVECs tratadas com 7 β OHCHOL foi colhido em uma cinética de tempo (15, 30, 45 e 60 minutos) e a expressão protéica do CD40 foi analisada.

A figura 14 mostra que não houve alteração significativa da expressão de CD40 em células tratadas com 7β OHCHOL por até 1 hora quando comparadas às células não estimuladas (controle).

Estes resultados revelam que o tratamento com 7β OHCHOL foi capaz de deslocar moléculas de CD40 de frações não caveolares para a cavéola e que este deslocamento não foi dependente de uma maior expressão de CD40.

A

B

Figura 13 - 7β OHCHOL concentra o receptor CD40 nas frações ricas em caveolina-1

HUVECs (10×10^6 cels) foram estimuladas com 7β OHCHOL por 1 hora e comparadas ao controle. O homogenato foi submetido a gradiente de ultracentrifugação em sacarose/optiprep e, nas frações obtidas foi analisada a expressão de CD40. Observamos uma maior expressão de CD40 nas frações ricas em cavéolas (6, 7, 8 e 9) de HUVECs tratadas com 7β OHCHOL (B) quando comparadas ao grupo não tratado (6, 7, 8 e 9) (A) sugerindo que o tratamento com este oxisterol é capaz de impedir o deslocamento de CD40 para fora da cavéola.

Figura 14 - 7βOHCHOL não altera a expressão proteica de CD40

HUVECs (2×10^6 cels) foram estimuladas com 7βOHCHOL (10μg/mL) por 15, 30, 45 e 60 minutos e o homogenato foi submetido à análise da expressão proteica de CD40 por imunoblot. Observamos que o tratamento com 7βOHCHOL não alterou a expressão protéica do receptor CD40 nos diferentes tempos analisados em relação ao controle. n=2.

5.5. 7βOHCHOL e seus efeitos sobre a inflamação

5.5.1. Produção de Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) e Interleucina-10 (IL-10)

Para avaliar se a concentração de 7βOHCHOL foi capaz de induzir vias inflamatórias a partir da produção de interleucinas, nosso objetivo foi determinar a produção de duas importantes citocinas representadas pelo TNFα e IL-10, citocinas pró e anti-inflamatória, respectivamente.

A figura 15 mostra a quantificação da produção de citocinas, em meio de cultura sem fenol, por radioimunoensaio onde está representada, no eixo das abscissas, a concentração em pg/mL. Assim, a figura 15A representa HUVECs tratadas com 7 β OHCHOL por 1 hora e podemos observar uma produção de IL-10 ao redor de 40 pg/mL. Valores semelhantes foram encontrados quando HUVECs do grupo controle foram analisadas.

Quando a produção de TNF foi avaliada (Figura 15B), também não foram encontradas diferenças significantes com o tratamento. O meio de cultura de HUVECs tratadas com 7 β OHCHOL apresentaram valores aproximados de 80 pg/mL, valores semelhantes aos encontrados nas células controle.

Estes dados revelam que o 7 β OHCHOL foi incapaz de gerar uma resposta inflamatória, ao menos no período de 1 hora de tratamento, avaliados sob a prisma da produção de citocinas.

Figura 15 - 7βOHCHOL não altera a produção de TNFα e IL-10

O meio condicionado de HUVECs (2×10^6 cels) estimuladas com 7βOHCHOL (10 μg/mL) por 1 hora foi submetido à análise de citocinas por imunoenensaio. Nossos resultados mostram que o tratamento com 7βOHCHOL não foi capaz de alterar a produção de TNFα (A), bem como IL-10 (B) no período analisado. n=3.

5.6. 7 β OHCHOL e seus efeitos sobre fatores de transcrição PPAR γ e LXR

5.6.1 Expressão protéica de PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ)

PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ , do inglês, Receptores γ Ativados por Proliferadores de Peroxissoma) compreendem um grupo de receptores nucleares que atuam principalmente no metabolismo de lípidos e que apresentam diversas funções, dentre elas imunomoduladora e anti-inflamatória. Com o objetivo de avaliar se nosso tratamento era capaz de desencadear uma resposta mediada por este receptor, buscamos analisar a expressão protéica, por western blotting, de células tratadas com 7 β OHCHOL em um período de 24 horas.

A figura 16 mostra a expressão de PPAR γ , por imunoblotting, de células endoteliais tratadas com 7 β OHCHOL em diferentes tempos (2h, 6h, 12h e 24h), onde os valores são representados pela expressão da proteína em comparação ao controle (vezes do controle). Estes dados mostram não haver diferenças significantes na expressão deste receptor nuclear, apesar de uma menor expressão em 2 horas. Os valores encontrados para os tempos de 6h e 12h são semelhantes ao controle.

Estes dados revelam que o tratamento com 7 β OHCHOL foi incapaz de gerar uma resposta mediada por um receptor nuclear por até 24 horas, ao menos, quando avaliada sob o prisma da expressão de PPAR γ .

Figura 16 - 7βOHCHOL não altera a expressão protéica de PPARγ

HUVECs (2×10^6 cels) foram estimuladas com 7βOHCHOL (10μg/mL) por 2, 6, 12 e 24 horas. O homogenato foi submetido à análise da expressão protéica para PPARγ por imunoblot. Observamos que o estímulo com 7βOHCHOL não alterou a expressão de PPARγ em relação ao controle nos diferentes tempos analisados. n=3.

5.6.2. Expressão gênica de ABCA1 (ATP Binding Cassete A1)

A superfamília de proteínas codificadas pelo gene ABCA-1 são responsáveis pelo efluxo de colesterol e fosfolípidos, bem como pelo transporte intracelular de colesterol a partir do complexo de golgi para as membranas.

É importante ressaltar que a proteína ABCA1 é expressa diretamente em resposta à estimulação do receptor nuclear LXR. Neste contexto, nosso objetivo foi avaliar pela expressão gênica de ABCA1 se o 7βOHCHOL pode estimular o receptor nuclear LXR.

Assim, a figura 17 mostra, por meio de RT-PCR a expressão gênica da proteína ABCA-1 e o resultado revela que HUVECs tratadas com 7 β OHCHOL por 2 horas apresentam uma expressão semelhante ao controle e, há um aumento da expressão gênica tempo-dependente a partir de 6 horas e que perdura por até 24 horas ($p<0,05$), apresentando uma expressão significativa em 12 horas.

Estes dados revelam que o tratamento com 7 β OHCHOL foi capaz de induzir uma maior expressão gênica de ABCA1, porém, apenas 12 horas após o estímulo.

Figura 17 - 7 β OHCHOL não altera a expressão gênica de ABCA-1

HUVECs (2×10^6 cels) foram estimuladas com 7 β OHCHOL (10 μ g/mL) por 2, 6, 12 e 24 horas e o homogenato foi submetido à análise da expressão gênica por PCR quantitativo. Observamos que houve um aumento significativo da expressão gênica de ABCA-1 a partir de 12 horas de estímulo sugerindo que o 7 β OHCHOL possa exercer seus efeitos nucleares apenas em tempos iguais ou superiores a 12 horas. * $p<0,01$ (12h vs CT e 24 vs CT). $n=6$.

5.7. 7 β OHCHOL e a fosforilação da eNOS

A produção de óxido nítrico por meio da eNOS é um evento altamente regulado e influenciado por diversas alterações pós-traducionais como a interação proteína-proteína (caveolina-1 e eNOS), presença de co-fatores (BH4 e calmodulina) e pelo estado de fosforilação gerado por quinases e fosfatases. Nosso objetivo foi, então, avaliar o estado de fosforilação da eNOS em resposta ao tratamento com oxisterol.

A figura 18 mostra a expressão, em unidades arbitrárias, de tirosina fosforilada obtida de lisado total. Assim, podemos observar uma evidente diminuição tempo-dependente da fosforilação a partir de 15 minutos de tratamento com 7 β OHCHOL em relação ao controle. E, esta diminuição torna-se mais evidente em 60 minutos de tratamento.

Este dado mostra que o tratamento com 7 β OHCHOL é capaz de diminuir o estado de fosforilação da eNOS de maneira tempo dependente.

Figura 18 - 7βOHCHOL diminui a fosforilação sítio-específica da eNOS

HUVECs (2×10^6 cels) foram estimuladas com 7βOHCHOL (10 μg/mL) por 15, 30, 45 e 60 min. O homogenato foi imunoprecipitado com eNOS e em seguida submetido a imunoblot contra resíduos de tirosina fosforilada. Observamos uma diminuição tempo-dependente da fosforilação da eNOS quando HUVECs são tratadas com 7βOHCHOL em relação ao controle. Estes dados sugerem uma diminuição da atividade da eNOS quando HUVECs são tratadas com 7βOHCHOL. n=2.

6 DISCUSSÃO

Diversas moléculas são candidatas como fatores-chave na patogênese das doenças cardiovasculares. Uma das mais importantes é representada pela LDL oxidada (LDLox), um complexo heterogêneo formado basicamente por lipídeos e proteínas. Neste trabalho, nosso grupo apresenta evidências de que um colesterol oxidado específico – o 7 β hidroxicolesterol, genericamente denominado oxisterol – mais do que a estrutura completa da LDL, pode levar a alterações na sinalização celular importantes na aterosclerose.

Oxisteróis são moléculas classificadas como derivados oxigenados do colesterol e podem ser formados através de uma reação enzimática, por exemplo, como um produto da formação de sais biliares ou, como resultado de reações oxidativas causadas pela auto-oxidação em presença de oxigênio ou radicais livres. Nesta classe, estes lípides modificados são descritos como participantes em diferentes processos biológicos como apoptose, necrose e inflamação. Além disso, tem sido atribuída grande importância dos oxisteróis no desenvolvimento da aterosclerose, principalmente pela sua presença em altos níveis circulantes em pacientes ateroscleróticos ou ainda, como componentes da placa aterosclerótica.

Baseado nestes achados, nosso grupo acredita que os oxisteróis e, particularmente o 7 β hidroxicolesterol, são capazes de se incorporar nos domínios, do tipo cavéola, da membrana plasmática e perturbar a via de

sinalização através da modulação da atividade das proteínas aí localizadas como a eNOS, CD40 e FGF e que serão analisadas por meio de diferentes abordagens.

Assim, o primeiro passo foi utilizar uma metodologia que permitisse a separação e caracterização da cavéola e que pudesse funcionar como uma ferramenta para o estudo deste domínio de membrana.

6.1 Caracterização dos domínios de membrana do tipo cavéola

As opções metodológicas para a detecção dos domínios de membrana podem ser a microscopia eletrônica, microscopia de força atômica, transferência de energia eletrônica (FRET, do inglês, Förster Resonance Energy Transfer), porém, para o isolamento dos diversos rafts faz-se necessário o uso de gradientes de densidade ⁶¹. A grande questão reside na falta de concordância na classificação entre estes diversos domínios, ou seja, alguns métodos podem ser precisos para a separação dos rafts (estruturas lineares e pequenas da bicamada), porém, se mostram ineficientes na separação de estruturas mais complexas como as cavéolas. Neste aspecto, o tipo de detergente utilizado e a sua concentração implicam em rafts de diferentes características químicas e composições ⁶².

É importante lembrar que os métodos de separação habituais são baseados na lise das células com um detergente e este material é submetido a gradiente de sacarose que distribui as frações de acordo com seu respectivo peso específico. Por definição os rafts são compostos por

esfingolípídeos e colesterol que, apesar da característica apolar destes elementos, podem ser encontrados tão intrinsecamente ligados que, conseqüentemente, impossibilitam a ação de detergentes do tipo Triton X-100, Brij 58, ou mesmo CHAPS ^{63, 64} tornando imprecisa a utilização destas metodologias para a separação de cavéolas, por exemplo.

A partir de nossos resultados iniciais testando algumas metodologias de separação, escolhemos o método de Macdonald & Pike (2005) ⁵⁶ que mostrou ser a técnica de isolamento sem utilização de detergente mais adequada à separação de cavéolas.

Os procedimentos de Song e cols (1996) ⁶⁵ e Smart e cols (1995) ⁶⁶ igualmente baseados na separação por densidade são os mais utilizados, entretanto, também apresentam restrições importantes. Em Song e cols (1996) ⁶⁵, por exemplo, a utilização de um tampão de pH elevado, no momento da formação do lisado celular, auxilia na separação das proteínas de membrana através do gradiente, porém, a formação de uma interface acima de 30% de detergente, como estabelecido na metodologia, impede uma boa separação ⁶⁷. Um segundo ponto é a exigência de uma sonicação pré-ultracentrifugação. Este processo revela-se muito traumático à medida que é capaz de lisar membranas intracelulares, lembrando-se que cavéolas podem ser encontradas distribuídas pelo citoplasma sob a forma de vesículas ⁴⁵ tornando este procedimento uma etapa limitante.

Um segundo método por nós avaliado e descrito por Smart e cols (1995) ⁶⁶ compreende a utilização de tampão carbonato que, apesar de permitir uma ótima separação entre as diferentes membranas – complexo de

golgi, mitocôndria, núcleo, por exemplo – é capaz de consumir um elevado tempo de ultra-centrifugação, favorecendo intercorrências durante a execução do método.

É sempre importante ressaltar que os métodos baseados em separação de domínios por meio de detergente podem apresentar outras armadilhas como a impossibilidade de flotação de uma dada proteína se esta estiver ligada a uma proteína do citoesqueleto, por exemplo. Ou ainda, a associação entre a proteína de estudo e o raft pode ser desfeita caso sua ligação seja fraca o suficiente para ser solubilizada pelo detergente, como é o caso das tirosina-quinases⁶⁷. Deve-se, portanto, analisar detalhadamente quais os objetivos ao se escolher uma metodologia para isolar um domínio plasmático.

Assim, a metodologia por nós utilizada, apresentou-se adequada aos nossos propósitos por ser confiável, altamente reprodutível e de execução mais simples. Apesar de as cavéolas serem ricas em lipídios, de uma maneira geral, esperávamos observar estes domínios nas porções mais superiores do gradiente, ou seja, apresentarem maior capacidade de flotação. Como este método foi adaptado às condições de nosso laboratório, esta nova característica de baixa flotação por nós encontrada nos permite fazer algumas considerações. Basicamente, o trabalho original de Macdonald & Pike (2005)⁵⁶ gera um volume de gradiente ao redor de 10 mL adicionados aos 2 mL já existentes de amostra em optiprep® e, além disso, o gradiente formado acima desta amostra varia linearmente e ponto à ponto migrando sutilmente de 25% à 0% de optiprep® e, finalmente, as frações

coletadas ao final do gradiente correspondem à 18 frações de 670 μ L cada. As adaptações realizadas para que este método se enquadrasse as condições de nosso laboratório residiram nestes principais pontos onde, (1) Volume do gradiente: o volume adicionado acima da amostra foi limitado à um menor valor correspondente à 8 ml; (2) Gradação sacarose-optiprep®: O gradiente de optiprep®- sacarose gerado também sofreu alterações à medida que, realizados manualmente, variaram em unidades de 5, ou seja, a partir da amostra em 25%, as concentrações seguintes corresponderam à 20, 15, 10, 5 e 0% de optiprep® e, finalmente, (3) Distribuição de cavéola ao longo do gradiente: as frações coletadas ao final da ultra-centrifugação correspondiam a um volume de 1 mL distribuídos em 10 frações.

No entanto, apesar das alterações realizadas, as cavéolas foram visualizadas, por meio de western blotting, nas frações 7 a 10 que correspondem à porcentagem de optiprep® ao redor de 20% a 25%, na mesma porção do gradiente de Macdonald. Além disso, é notadamente conhecida a grande variabilidade de proteínas residentes nas cavéolas onde proteínas do citoesqueleto como actina, anexina II e IV e dinamina estão aí localizadas ⁴¹ favorecendo uma menor flotação por maior densidade deste domínio concentrando as cavéolas na parte mais inferior o que fortalece os resultados por nós encontrados. Contudo, as frações visualizadas em nosso método ainda se apresentaram concentradas e restritas à apenas quatro frações, diferente dos resultados encontrados por Macdonald & Pike, onde as frações ricas em cavéolas puderam ser observadas distribuídas amplamente entre 12 das 18 frações obtidas.

6.2 Análise da incorporação de 7 β hidroxicolesterol na cavéola

Após a escolha do método de separação de cavéolas, a caracterização dos componentes lipídicos que a constituem tornou-se o próximo alvo para responder as perguntas que envolvem o seu papel sobre a via de sinalização celular. Dentro deste contexto, a constituição lipídica do domínio citoplasmático exerce influência direta sobre o tipo de proteína aí encontrada, pois, diversas alterações pós-traducionais – como palmitoilação, sequência de aminoácidos e fosforilação - podem ocorrer favorecendo a localização da proteína em domínios ricos em lípidos saturados (rafts) ou insaturados (bicamada lipídica), porém, o mecanismo desta afinidade ainda não está bem esclarecido ^{61, 68}.

Assim, após o isolamento destas estruturas, o próximo objetivo foi avaliar o conteúdo lipídico por meio de espectrometria de massa que representa o método mais sensível, acurado e direto para análise e caracterização de lípidos que possa ser aplicado para o estudo dos domínios de membrana.

No micro-ambiente da cavéola, o colesterol pode atuar como um esqueleto ancoradouro onde os esfingolípides se distribuem de maneira organizada para a formação do domínio citoplasmático ^{61, 69}. Também existe uma maior afinidade do colesterol por lípidos saturados em detrimento dos insaturados, favorecendo uma maior concentração deste lipídeo nos domínios raft. Assim, podem-se encontrar duas vezes mais moléculas de colesterol nos rafts, aproximadamente 32 mol%, do que no lisado total, com aproximadamente 12 mol% ^{67, 70}.

Além disso, está claro o papel dos lipídeos oxidados no desenvolvimento de doenças cardiovasculares contribuindo para os processos oxidativos, inflamatórios e imunológicos ³⁴, porém, não se estabeleceu uma relação direta entre o tipo e conteúdo de colesterol oxidado e as interações moleculares dos domínios plasmáticos.

Neste sentido, nossos resultados se apresentam promissores à medida que são capazes de detectar a presença de oxisterol em cavéolas de células tratadas com 7 β hidroxicolesterol quando comparadas ao grupo controle. Interessantemente, essa incorporação ocorre precocemente após o tratamento (1 hora) e parece ser mais evidente na cavéola, quando comparado as outras frações de membrana, embora um método quantitativo ainda não tenha sido utilizado.

É importante notar que estes resultados foram obtidos em concentrações fisiológicas de oxisterol, ou seja, estas células endoteliais foram expostas à aproximadamente 0,25 μ M/mL (equivalente à 10 μ g/mL de meio), concentração muito semelhante a encontrada nos pacientes ateroscleróticos ³⁴. Outros autores utilizam uma concentração ao redor de 28 μ M/mL, notoriamente mais elevada e mais propensa a causar apoptose ou necrose, o que mascararia o efeito dos oxisteróis na sinalização celular ^{71, 72}.

A incorporação de 7 β hidroxicolesterol também nas regiões não-caveolares ainda precisa ser analisada cuidadosamente. Xu e cols (2008) ⁷³ já demonstraram que 98% da superfície de células endoteliais pode ser apresentada sob a forma de cavéola, assim, qualitativamente, os dados encontrados nos permitem concluir uma significativa incorporação ocorrida

nesta fração celular sobreposta a outros domínios de membrana. Contudo, uma análise mais apurada ainda deve ser realizada. Assim, tendo estabelecida uma metodologia reprodutível, o próximo passo seria a quantificação da incorporação através da utilização de um padrão interno.

6.3 Efeito da incorporação de oxisterol sobre as proteínas de membrana

A maneira como o colesterol se distribui dentro da membrana plasmática influencia diretamente a capacidade das proteínas aí ancoradas em desencadear o processo de sinalização ^{74, 75, 76, 77}. A natureza das interações moleculares ainda não está bem compreendida, porém, representa assunto para especulações com alguns modelos propostos de acordo com tipo de interação como proteína-proteína que é o que ocorre com a caveolina-1 e eNOS ou, lipídeo-proteína que ocorre entre o CD40 e os fosfolipídeos da membrana plasmática. Este tipo de interação também pode ser visto com o receptor do fator de crescimento de fibroblasto (FGF) que se ancora diretamente à bicamada lipídica ⁶¹.

Assim, buscamos analisar o efeito da incorporação de moléculas de colesterol oxidado às cavéolas e avaliar seu efeito sobre algumas vias de sinalização.

6.3.1 Via de sinalização da eNOS

A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é uma enzima constitutiva e está presente na cavéola em um estado quiescente que é mantido devido a sua ligação ao domínio ancoradouro (“scaffolding domains”) da caveolina-1. Esta capacidade de ligação da caveolina à eNOS já foi demonstrada por Razani e cols (2002) ⁴¹ que, além desta, listaram uma série de outras proteínas sinalizadoras como SRC ⁷⁸, ERK ⁷⁹, receptores de bradicinina ⁸⁰, CD36 e SRBI ⁵⁴ (ambos ligados ao metabolismo do colesterol), por exemplo.

Neste contexto, alguns estudos têm avaliado a relação entre lipídes e a geração de óxido nítrico sugerindo que o colesterol não exerce seus efeitos sobre a produção de óxido nítrico (NO) afetando diretamente a eNOS^{12, 53, 54}, mas sim, através de sua ligação à matriz lipídica da bicamada exercendo uma modulação da atividade da enzima ^{12, 13}. Adicionalmente, também foi proposto que existe uma relação proporcionalmente inversa entre colesterol e atividade da eNOS em que uma concentração de 0,2 mM de colesterol pode desestabilizar a atividade da eNOS ao diminuir a fluidez da membrana ¹³. No entanto, nenhuma referência foi feita ao 7βhidroxicolesterol ou a outros oxisteróis modulando a eNOS através da incorporação à cavéolas até o momento.

Nossos dados analisando o imunoprecipitado com caveolina-1 e revelado contra eNOS mostraram que a adição de 7βhidroxicolesterol pôde aumentar de maneira significativa a interação entre essas duas proteínas. Este efeito não estava relacionado a mudanças na expressão protéica da eNOS e na expressão gênica e protéica da caveolina-1, desde que nenhuma

diferença foi observada quando o conteúdo de proteínas totais foi analisado por imunoblot no lisado total. Uittenbogaard e cols (2000) demonstrou a possível ação de oxLDL sobre domínios do tipo cavéola levando à formação de complexos protéicos e internalização de caveolina-1-eNOS resultando em uma perda de sua função, porém, sem considerar a expressão de eNOS total ⁵⁴.

Assim, nossos dados preliminares sugerem que a eNOS é mais resistente à se desligar da caveolina-1 em presença de oxisterol, o que nos levaria a esperar uma menor taxa de geração de óxido nítrico em células tratadas com 7 β hidroxicolesterol. Para confirmar esta hipótese analisamos a produção de óxido nítrico por fluorescência (Sievers) utilizando A23187 como controle positivo e, a quantificação de proteínas totais nitrosiladas por Dot-Blot.

Nossos resultados mostraram que o 7 β OHCHOL isoladamente foi incapaz de alterar a produção de NO₃, porém, quando células endoteliais foram tratadas com 7 β OHCHOL mais A23187 houve um aumento significativo da produção de NO₃ quando comparadas à ação do ionóforo isolado ou mesmo do 7 β OHCHOL. O A23187 é uma substância capaz de mobilizar o cálcio intracelular, resultando em uma maior estimulação da eNOS ^{81, 82} e seu mecanismo de ação pode se dar de três maneiras: (1) aumento do influxo de cálcio por meio da ativação dos respectivos canais de membrana; (2) Mobilização do cálcio intracelular por meio da ativação da fosfolipase C e (3) Liberação de cálcio intracelular já armazenado que é dependente do tipo de célula em que ocorre o estímulo ⁸³. Os oxisteróis

podem atuar em pelo menos dois destes mecanismos onde, o primeiro deles foi demonstrado por Erridge e cols (2007) ⁸⁴ em que especificamente o 7 β OHCHOL pode induzir a produção de IL-8 através da ativação dos canais de cálcio. Além disso, a estimulação com pequenas doses (3 μ g/mL) de 25OHCHOL, outra classe dos oxisteróis, é capaz de agir estimulando a fosfolipase A2, aumentando o influxo de cálcio e levando à apoptose ⁸⁵. Estes achados vão ao encontro de nossos resultados que demonstraram uma ação potencializadora de 7 β OHCHOL em conjunto com o A23187 na produção de NO₃. Desta maneira, acreditamos ser necessário a utilização de uma nova abordagem para o estudo da interação entre oxisterol e a eNOS que não envolva a via de fornecimento de cálcio, já que esta resposta também sofre ação do 7 β OHCHOL.

Por outro lado, a ação do 7 β OHCHOL sobre a produção de NO pôde ser observada quando analisamos a produção de proteínas nitrosiladas. A nitrosilação é uma modificação pós-traducional onde o NO produzido se liga aos resíduos de cisteína de uma determinada proteína alterando a sua função ⁸⁶. Essa modificação é um processo reversível onde a sua detecção por western blotting pode funcionar como uma ferramenta indireta para análise da produção de NO. Neste sentido, nossos resultados revelaram uma menor produção de proteínas nitrosiladas, embora não pudemos observar uma menor produção de NO. Esses dados sugerem que o 7 β OHCHOL foi capaz de atuar sobre a produção de NO diminuindo a sua biodisponibilidade para sinalização celular.

Paralelamente à ligação com a caveolina-1, a eNOS também pode ser regulada por meio da fosforilação em diversos de seus resíduos como serinas, treoninas ou tirosinas ⁸⁷. Trabalhos publicados pelo mesmo grupo de pesquisadores, porém, com uma década de diferença apresentam resultados opostos na regulação da eNOS. Enquanto Fulton e cols (2008) ⁸⁸ demonstraram que a fosforilação sobre o aminoácido tirosina da eNOS seria capaz de estimular a produção de NO e, uma mutação específica neste aminoácido poderia reverter este efeito, Garcia-Cardena e cols (1997) ⁸⁹ demonstraram que um aumento da fosforilação da eNOS foi capaz de diminuir o NO produzido.

Em um experimento preliminar, pudemos observar que o 7 β OHCHOL foi capaz de induzir uma diminuição tempo-dependente da fosforilação da eNOS. Analisando-se conjuntamente, nossos resultados podem indicar que há uma sutil fosforilação da eNOS suficiente para a produção de óxido nítrico basal e, à medida que o oxisterol incorpora à membrana, a fosforilação tende a diminuir, diminuindo sua ativação ao mesmo tempo em que se aumenta a sua interação com a caveolina-1. Ainda não está claro o efeito da fosforilação sobre cada um destes aminoácidos, porém, já foram descritos efeitos como ativação por aumento da atividade catalítica da enzima ou, inibição ao potencializar seu sítio de ligação com outras proteínas como a caveolina-1 ⁸⁷, por exemplo. O estudo do comportamento da eNOS quando o processo de fosforilação ocorre no resíduo de tirosina representa um novo mecanismo de regulação da eNOS além da caveolina-1

e acreditamos que experimentos que utilizem mutações sítio-específicas possam agregar mais informações a respeito desta regulação.

6.3.2 Via de Sinalização CD40/CD40L

Já está bem estabelecida a participação do receptor CD40 no desenvolvimento de doenças inflamatórias e imunes, dentre elas, a aterosclerose ⁹⁰. Já foi demonstrado que o bloqueio do CD40L, com anticorpo monoclonal em camundongos, resultou em uma diminuição da formação da placa, da deposição lipídica e uma menor expressão de VCAM-1 ⁹¹.

Esta via de sinalização é objeto de estudo em nosso grupo dentro do modelo inflamatório da aterosclerose onde já demonstramos uma elevada expressão de CD40 em resposta ao stress oxidativo estimulado por angiotensina II ⁹² e que, esta modulação pode estar relacionada à alterações pós-traducionais como a nitrosilação do CD40 (ligação de NO aos resíduos de cisteína do receptor) ⁹³.

Outro aspecto que pode ser analisado no estudo desse receptor e que pode atuar como um regulador de sua função é a sua localização. O CD40 pode ser encontrado nos lipid rafts e também na cavéola, onde, após a sua ligação com o CD40L sofre um processo de internalização importante para desencadear a cascata de sinalização celular. Chen e cols (2005) ⁹⁴ demonstraram que o uso de RNA de interferência (RNAi) para caveolina-1 foi capaz de diminuir a internalização de CD40. Além disso, a ativação do

CD40 implica em seu deslocamento das regiões de cavéola para outras regiões de lipid rafts onde ocorrerá a associação com outras moléculas adaptadoras como a TRAF-6 iniciando a cascata de sinalização ⁹⁵.

Nossos experimentos mostraram que o tratamento com 7 β OHCHOL não foi capaz de alterar a expressão total de CD40 por até 1 hora. Adicionalmente, quando células endoteliais foram submetidas à separação para frações de cavéola, pudemos visualizar uma distribuição de CD40 ao longo de todas as frações das células controle, porém, um sensível aumento de CD40 quando as células foram submetidas ao tratamento com 7 β OHCHOL.

Apesar da estreita relação entre CD40 e aterosclerose, e esta por sua vez, com os lipídeos, ainda não está claro como o colesterol pode reger as vias de sinalização do CD40. Li e cols (2003) ⁹⁶ demonstraram que a LDLox (lipoproteína de alta densidade oxidada) pode aumentar a expressão de CD40 de maneira dose e tempo-dependente e que, esta estimulação é uma resposta lipídeo-específica já que o bloqueio com LOX-1 (do inglês, lectin-like receptor for oxLDL), um receptor específico, é capaz de reduzir a estimulação causada pela LDLox.

Analizados paralelamente, nossos resultados parecem indicar que o 7 β OHCHOL foi capaz de concentrar a expressão do CD40 nas regiões de cavéola. Se estes dados estiverem corretos, reforçam a idéia de que o oxisterol foi capaz de alterar o comportamento da membrana impedindo a migração do CD40. Estes dados são apresentados de maneira muito preliminar, já que outras moléculas da via de sinalização do CD40 ainda não

foram estudadas em resposta ao estímulo com 7 β OHCHOL, nem a ativação de seu ligante. No entanto, quando avaliamos a produção de TNF α não observamos nenhuma alteração. Essa ausência de uma resposta pró-inflamatória reforça a importância da baixa concentração de estímulo por nós utilizada de 10 μ g/mL de oxisterol contra 80 μ g/mL de LDL oxidada utilizada para aumentar a expressão de CD40. Assim, nosso estímulo lipídico pode estar gerando uma resposta direta nas vias de sinalização mais proeminente do que uma resposta mediada por uma via inflamatória.

Deste modo parece ser evidente a influência lipídica sobre a regulação do CD40 tanto pela sua localização num ambiente rico em lípidos como é o caso da cavéola como pela sua resposta exacerbada desencadeada pela estimulação com LDL oxidada, onde, os componentes e os mecanismos que aí atuam revelam uma ampla área de estudo.

6.3.3 Via de sinalização do FGF-2

A família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) regula um amplo espectro do comportamento celular que varia desde a proliferação e diferenciação até a sobrevivência e que é reconhecida por quatro receptores de tirosina-quinases altamente conservados classificados como FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4⁹⁷.

Estudos realizados em células musculares lisas obtidas de pacientes com placas ateroscleróticas instáveis mostraram que há uma maior expressão de FGF-2 com conseqüente aumento da expressão de iNOS

(óxido nítrico sintase induzida) e MMP-9 (metaloproteínas-9) modulado por uma maior expressão de NFkB⁹⁸. Por outro lado, o FGF-2 é capaz de estimular o desenvolvimento de vasos favorecendo uma maior circulação colateral em modelo de isquemia e, atuar na proliferação de células musculares lisas endoteliais contribuindo para a regeneração de vasos após injúria sendo considerado um importante alvo terapêutico⁹⁹.

Nossos resultados foram surpreendentes ao mostrar que o tratamento com 7βOHCHOL foi capaz de estimular a fosforilação de MAPk (ERK1/2) até três vezes mais em relação ao valor basal e, mais ainda, manter esta fosforilação pelo tempo de estímulo de 1 hora, enquanto que o FGF foi capaz de ativar a MAP por apenas 5 minutos. Sabe-se que após a ativação do receptor de FGF, esta molécula é internalizada estimulando a fosforilação em cadeia da fração gama da fosfolipase C (PLCγ), Ras-Raf, MEK e finalmente, MAP. A fosforilação da MAP é capaz de regular negativamente esta via de sinalização ao estimular paralelamente dois complexos protéicos, o FRS-2 e o GRB-2. A diminuição do recrutamento do GRB-2 interrompe a cascata impedindo que a via de ativação continue para seu destino final correspondente à fosforilação de AKT e MAPs⁹⁷. Sob este aspecto, os resultados obtidos nos permitem acreditar que a incorporação do 7βOHCHOL pôde alterar o estado funcional da membrana ao impedir o deslocamento lateral do complexo protéico GRB-2, mantendo assim, a via da MAP em constante ativação.

Por outro lado, a ação conjunta de 7βOHCHOL (1 hora) e FGF-2 (5 minutos) apresentou uma expressão de MAP fosforilada semelhante ao

basal. Ainda não são conhecidos os mecanismos que regem a regulação por competitividade entre uma molécula lipídica e o FGF propriamente dito, mas possivelmente, a resposta gerada por um receptor apresenta-se de maneira específica em resposta ao seu ligante em detrimento da ação de lípide gerando uma ativação mais controlada da MAP.

6.3.4 Via de sinalização do PPAR – LXR

O ABCA-1 em conjunto com o ABCG-1 são responsáveis pelo efluxo de colesterol transferindo o lípide à apolipoproteína A1 e HDL, respectivamente, sendo consideradas moléculas anti-aterogênicas ¹⁰⁰. Macrófagos silenciados para o gene ABCA1 apresentaram maior produção de citocinas pró-inflamatórias como MIP-1 α , TNF α , IL-6 e IL-8 concomitante a uma maior formação de lipid rafts mediado por uma maior ativação de receptores do tipo Toll-Like 4 quando ativados por LPS¹⁰⁰. Os autores sugeriram uma possível alteração da fluidez da membrana devido a um acúmulo de colesterol livre contribuindo para uma maior dimerização do receptor TLR4 intensificando o processo inflamatório.

A ativação do gene ABCA1 está sob a regulação do eixo PPAR γ -LXR que são receptores nucleares para hormônios esteroidais expressos na célula endotelial ¹⁰¹. Chawla e cols (2001) ¹⁰² propuseram um modelo onde, em resposta a estimulação com LDLox, o eixo PPAR γ -LXR poderia ser ativado estimulando uma maior captação de lípidos oxidados via CD36 e um

maior efluxo de colesterol via ABCA-1 favorecendo o transporte e metabolização de lípides diminuindo a formação da placa aterosclerótica.

A maior expressão do gene ABCA1 está intrinsecamente ligada à ativação do receptor LXR β em resposta à algumas classes de oxisterol em modelo de célula endotelial tratadas por 18 horas ¹⁰³. Nossos dados mostraram não haver uma estimulação imediata na expressão do gene ABCA1 em resposta ao oxisterol, onde pudemos observar um aumento somente a partir de 12 horas. Nossos resultados reforçam o conceito de que a ação do 7 β OHCHOL sobre as vias de sinalização, até o momento estudadas, reflete uma resposta exclusiva da incorporação à membrana e não da ação via um receptor nuclear, como o LXR.

Além disso, ao avaliar a expressão do PPAR γ não observamos nenhuma alteração da expressão ao longo de 24 horas de tratamento. Sabe-se que diversos lípides são considerados ligantes de PPAR, entre estes, ácidos graxos, derivados de eicosanóides, prostaglandinas ¹⁰⁴ e a LDLox ¹⁰². A LDLox é um complexo protéico formado por diversas classes de lípides, entre eles, ácidos graxos como os fosfolípides e também colesterol, caracterizando-a como um amplo componente capaz de estimular tanto PPAR como LXR. Já, os ligantes de LXR estão relacionados ao núcleo de esterol compreendendo os oxisteróis de origem enzimática como o 25OHCHOL e 27OHCHOL. Neste contexto, a molécula por nós utilizada parece exercer ação específica sobre o LXR, não sendo capaz de ativar o PPAR γ .

Finalmente, nossos resultados mostraram que a estimulação de células endoteliais com 7 β OHCHOL na concentração de 10 μ g/mL não foi capaz de ativar uma resposta inflamatória mediada por um receptor nuclear no período inicial de 1 hora de estímulo. Esses dados corroboram com a análise de citocinas realizadas onde não observamos alteração do padrão inflamatório pela produção de TNF α .

6.4 Limitações do estudo

Este trabalho mostra uma nova perspectiva para o entendimento da ação dos lípides sobre a aterosclerose e, particularmente, sobre as vias de sinalização envolvidas nesta patologia. Para que nossos achados sejam adequadamente compreendidos, precisamos discutir algumas limitações de nosso estudo.

O primeiro ponto a ser considerado é o modelo de nosso estudo centrado em HUVECs - células endoteliais de origem humana, porém não arteriais. Sendo a aterosclerose um processo inflamatório característico de artérias coronárias, aorta abdominal ou mesmo carótidas, um estudo realizado com estes tipos celulares poderia fornecer um resultado mais acurado.

Um segundo ponto é o fato de termos utilizado um estímulo com um oxisterol isolado, o 7 β hidroxicolesterol. Sabemos que *in vivo*, a ação dos oxisteróis dá-se de maneira conjunta, pois são encontrados na circulação ou mesmo nas placas ateroscleróticas diversas classes destas moléculas. Uma

abordagem utilizando exposição a múltiplos oxisteróis poderia ser mais fidedigna, do ponto de vista fisiológico, mas traria complicações metodológicas e de interpretação dos dados experimentais. Por esse motivo, optamos por utilizar somente um oxisterol como estímulo.

Finalmente, um problema enfrentado por todos os pesquisadores que estudam cavéolas é que não existe um método ideal para separação dessas estruturas. Essa afirmação é verdadeira principalmente quando o objetivo é estudar vias de sinalização que dependem de interações proteína-proteína, como é o nosso caso. Assim, todas as metodologias utilizadas pelos pesquisadores do assunto, apresentam pontos falhos e, por isso, optamos por uma metodologia que melhor se adaptava as nossas necessidades e possibilidades, porém, ainda não é a ideal.

Por último, devemos ter em mente que nossos dados foram obtidos em células em cultura e devem ser interpretados com cuidado quando traduzidos para o paciente com distúrbio no metabolismo lipídico.

Apesar dessas limitações, acreditamos que nosso estudo ajuda a esclarecer muitos dos pontos relacionados ao efeito dos lipídeos na sinalização celular no endotélio e poderão abrir novos campos de estudo na área.

---

7 CONCLUSÕES

O 7 β hidroxicolesterol é capaz de se incorporar à membrana plasmática de células endotéliais, mais acentuadamente nos domínios do tipo cavéola e é capaz de interferir na biodisponibilidade de óxido nítrico, na localização do receptor de membrana CD40 e na atividade da via de sinalização mediada pelo receptor de FGF.

8 REFERÊNCIAS

1. Hansson GK. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2009; Suppl 1:328-31
2. Ross R. Mechanisms of disease: Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N. Engl. J. Med*. 1999; 340 (2): 115-26
3. Lusis, AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407(6801): 233-41
4. Keaney JF Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med*. 2000; 21(4-5):99-166
5. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109(23 Suppl 1):III27-32
6. Freedman JE, Loscalzo J, Benoit SE, Valeri CR, Barnard MR, Michelson AD. Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis. *J Clin Invest*. 1996; 97(4):979-87
7. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009; 196(2):193-222
8. Moncada S, Higgs, EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006; (176 Pt 1):213-54
9. Umar S, Van der Laarse, A. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem*. 2010; 333(1-2):191-201
10. Chung IM, Kim YM, Yoo MH, Shin MK, Kim CK, Suh SH. Immobilization stress induces endothelial dysfunction by oxidative stress via the activation of the angiotensin II/its type I receptor pathway. *Atherosclerosis*. 2010 [Epub ahead of print]
11. Brown MS, Goldstein JL. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science* 1974; 185(4145): 61-3
12. Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J. Biol. Chem*. 1999; 274 (45): 32512-9
13. Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC. Modulation of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in cholesterol enriched endothelial cell membranes. *Biochem. Pharmacol*. 1995; 49 (11): 1589-1600
14. Libby P, Aikawa M, Schönbeck U. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1529(1-3):299-309

15. Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol.* 2001; 22(12):665-9
16. Havel RJ. The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res.* 1984; 25(13):1570-6
17. Esterbauer H, Puhl H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Rabl H. Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann Med.* 1991; 23(5):573-81
18. Gotto Jr, AM, Farmer, JA. Risk factors for coronary artery disease. In: Braunwald, E. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine.* 1998; Saunders, Philadelphia, p. 1153-1190
19. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 2006; 37(7):1923-32
20. Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2007; 75(3):468-77
21. Frostegård J, Nilsson J, Haegerstrand A, Hamsten A, Wigzell H, Gidlund M. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(3):904-8
22. Gidlund M, Damasceno NR, Lindoso JA, Abdalla DS, Goto H. Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29(12):1625-8
23. Larsson DA, Baird S, Nyhalah D, Yuan XM, Li W. Oxysterol mixtures, in atheroma-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects. *Free Rad. Biol. Med.* 2006; 41: 902-10
24. Brown AJ, Leong SL, Dean RT, Jessup W. 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lipid Res.* 1997; 38(9):1730-45
25. Schroepfer GJ Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev.* 2000; 80(1): 361-554
26. Fredrickson DS, Ono K. The in vitro production of 25- and 26-hydroxycholesterol and their in vivo metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1956; 22: 183-4
27. Brown AJ, Jessup, W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med.* 2009; 30:111-122
28. Fielding CJ, Bist A, Fielding PE. Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(8):3753-8

29. Björkhem I. Are side-chain oxidized oxysterols regulators also in vivo? *J Lipid Res.* 2009; 50 Suppl:S213-8
30. Yvan-Charvet L, Wang N, Tall AR. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(2):139-43
31. Ohtsuka M, Miyashita Y, Shirai K. Lipids deposited in human atheromatous lesions induce apoptosis of human vascular smooth muscle cells. *J. Atheroscler. Thromb.* 2006; 13 (5): 256-62
32. Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gambert P, Néel D, Lizard G. Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol.* 2005; 21(2):97-114
33. Vejux A, Malvitte L, Lizard G. Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41(7):545-56
34. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999; 142(1):1-28
35. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175(23):720-31
36. Lee AG, Birdsall NJ, Metcalfe JC, Toon PA, Warren GB. Clusters in lipid bilayers and the interpretation of thermal effects in biological membranes. *Biochemistry.* 1974; 13(18):3699-705
37. Wunderlich F, Kreutz W, Mahler P, Ronai A, Heppeler G. Thermotropic fluid goes to ordered "discontinuous" phase separation in microsomal lipids of *Tetrahymena*. An X-ray diffraction study. *Biochemistry.* 1978; 17(10):2005-10
38. Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res.* 2006; 47(7):1597-8
39. Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1955; 1(5): 445-58
40. Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* 2002; 110(5):597-603
41. Razani B, Woodman S, Lisanti P. Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology 2002; 54 (3): 431-67
42. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992; 68(4): 673-82
43. Gabella G, Blundell D. Effect of stretch and contraction on caveolae of smooth muscle cells. *Cell Tissue Res.* 1978; 190(2):255-71
44. Darblade B, Caillaud D, Poirot M, Fouque M, Thiers JC, Rami J, Bayard F, Arnal JF. Alteration of plasmalemmal caveolae mimics

- endothelial dysfunction observed in atheromatous rabbit aorta. *Cardiovasc Res.* 2001; 50(3):566-76.
45. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 2004; 84(4):1341-79
  46. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(2):125-38
  47. Jiang J, Cyr D, Babbitt RW, Sessa WC, Patterson C. Chaperone-dependent regulation of endothelial nitric-oxide synthase intracellular trafficking by the co-chaperone/ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem.* 2003; 278(49):49332-41
  48. Li XA, Everson WV, Smart EJ. Caveolae, lipid rafts, and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15(3): 92-6
  49. Murata M, Peränen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(22):10339-43
  50. Zhang J, Chu W, Crandall I. Lipoprotein binding preference of CD36 is altered by filipin treatment. *Lipids Health Dis.* 2008;7:23
  51. Smart EJ, Ying YS, Conrad PA, Anderson RG. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol.* 1994; 127(5):1185-97
  52. Frank PG, Lisanti MP. Caveolin-1 and caveolae in atherosclerosis: differential roles in fatty streak formation and neointimal hyperplasia. *Curr Opin Lipidol.* 2004; 15(5):523-9
  53. Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 897-905
  54. Uittenbogaard A, Shaul, PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart E. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J. Biol. Chem.* 2000; 275 (15): 11272-83
  55. Frank PG, Lee H, Park DS, Tandon NN, Scherer PE, Lisanti MP. Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(1):98-105
  56. Macdonald JL, Pike LJ. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res.* 2005; 46(5):1061-7
  57. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37(8):911-7
  58. Carrillo-Sepúlveda MA, Ceravolo GS, Fortes ZB, Carvalho MH, Tostes RC, Laurindo FR, Webb RC, Barreto-Chaves ML. Thyroid

- hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes. *Cardiovasc Res.* 2010;85(3):560-70
59. Livak K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25: 402-8.
  60. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29, 40-45.
  61. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(1):31-9 Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol* 200; 2(3):216
  62. Calder PC, Yaqoob P. Lipid rafts--composition, characterization, and controversies. *J Nutr.* 2007; 137(3):545-7
  63. Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(10):5795-800
  64. Patel HH, Insel PA. Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(6):1357-72
  65. Song KS, Li Shengwen, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem.* 1996; 271(16):9690-7
  66. Smart EJ, Ying YS, Mineo C, Anderson RG. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(22):10104-8
  67. Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res.* 2003; 44(4):655-67
  68. Pike LJ. The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res.* 2009; 50 Suppl:S323-8
  69. Fielding CJ, Fielding PE. Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1529(1-3):210-22
  70. Ikonen E, Heino S, Lusa S. Caveolins and membrane cholesterol. *Biochem Soc Trans.* 2004 ;32(Pt 1):121-3
  71. Lizard G, Lemaire S, Monier S, Gueldry S, Néel D, Gamber P. Induction of apoptosis and of interleukin-1B secretion by 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol : partial inhibition by Bcl-2 overexpression. *FEBS letters*1997; 419: 276-80
  72. Napolitano M, Bravo E. Lipid metabolism and TNF-α secretion in response to dietary sterols in human monocyte derived macrophages. *Eur. J. Clin. Invest.* 2005; 35: 482-90

-
73. Xu Y, Buikema H, van Gilst WH, Henning RH. Caveolae and endothelial dysfunction: filling the caves in cardiovascular disease. *Eur J Pharmacol.* 2008; 585(2-3):256-60
  74. Pike LJ, Casey L. Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry.* 2002; 41(32):10315-22
  75. Bach D, Epand RF, Epand RM, Wachtel E. Interaction of 7-ketocholesterol with two major components of the inner leaflet of the plasma membrane: phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. *Biochemistry* 2008; 47(9):3004-12
  76. Massey JB, Pownall HJ. Structures of biologically active oxysterols determine their differential effects on phospholipid membranes. *Biochemistry.* 2006; 45(35):10747-58
  77. Burger K, Gimpl G, Fahrenholz F. Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57(11):1577-92
  78. Shajahan AN, Timblin BK, Sandoval R, Tiruppathi C, Malik AB, Minshall RD. Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(19):20392-400
  79. Furuchi T, Anderson RGW. Cholesterol Depletion of Caveolae Causes Hyperactivation of Extracellular Signal-related Kinase (ERK). *J. Biol. Chem.* 1998; 273(33): 21099–104
  80. Haasemann M, Cartaud J, Muller-Esterl W, Dunia I.. Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae. *Journal of Cell Science* 1998; 111:917-928
  81. Sowa G, Pypaert M, Sessa WC. Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(24):14072-7
  82. Pritchard KA Jr, Ackerman AW, Gross ER, Stepp DW, Shi Y, Fontana JT, Baker JE, Sessa WC. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2001; 276(21):17621-4
  83. Dedkova EN, Sigova AA, Zinchenko VP. Mechanism of action of calcium ionophores on intact cells: ionophore-resistant cells. *Membr Cell Biol.* 2000; 13(3):357-68
  84. Erridge, C., Webb, D. J., Spickett, C. M. 25-Hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol upregulate interleukin-8 expression independently of toll-like receptor 1, 2, 4 or 6 signalling in human macrophages. *Free Rad. Res.* 2007; 41 (3): 260-6
  85. Sankhavaram R. Panini, Lin Yang, Rusinol AE, Sinensky MS, Bonventre JV, Leslie CC. Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol. *J. Lipid Res.* 2001; 42:(10)1678-1686

-
86. Mannick JB, Schonhoff CM. NO means no and yes: regulation of cell signaling by protein nitrosylation. *Free Radic Res.* 2004; 38(1):1-7
  87. Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res.* 2007; 75(2):247-60
  88. Fulton D, Ruan L, Sood SG, Li C, Zhang Q, Venema RC. Agonist-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation and vascular relaxation. Role of eNOS phosphorylation at Tyr83. *Circ Res.* 2008; 102(4):497-504
  89. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BSS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti M P, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin: Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* 1997; 272 (41): 25437-40
  90. Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998; 394:200-3
  91. Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(5):1931-6
  92. Souza HP, Frediani D, Cobra AL, Moretti AI, Jurado MC, Fernandes TR, Cardounel AJ, Zweier JL, Tostes RC. Angiotensin II modulates CD40 expression in vascular smooth muscle cells. *Clin Sci (Lond).* 2009; 116(5):423-31
  93. Godoy LC, Moretti AI, Jurado MC, Oxer D, Janiszewski M, Ckless K, Laurindo FR, Souza HP. Loss of CD40 Endogenous S-Nitrosylation During Inflammatory Response in Endotoxemic Mice and Septic Patients. *Shock* 2009; [Epub ahead of print]
  94. Chen J, Chen L, Wang G, Tang H. Cholesterol-dependent and -independent CD40 internalization and signaling activation in cardiovascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(9):2005-13
  95. Li H, Nord EP. Functional caveolae are a prerequisite for CD40 signaling in human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004; 286(4):F711-9
  96. Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T, Mehta JL. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(5):816-21
  97. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(2):116-29

-
98. Sigala F, Savvari P, Liontos M, Sigalas P, Pateras IS, Papalampros A, Basdra EK, Kolettas E, Kotsinas A, Papavassiliou AG, Gorgoulis VG. Increased expression of bFGF is associated with carotid atherosclerotic plaques instability engaging the NF-kappaB pathway. *J Cell Mol Med*. 2010; [Epub ahead of print]
  99. Yang X, Qiao D, Meyer K, Friedl A. Signal transducers and activators of transcription mediate fibroblast growth factor-induced vascular endothelial morphogenesis. *Cancer Res*. 2009; 69(4):1668-77
  100. Yvan-Charvet L, Welch C, Pagler TA, Ranalletta M, Lamkanfi M, Han S, Ishibashi M, Li R, Wang N, Tall AR. Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation*. 2008; 118(18):1837-47
  101. Töröcsik D, Szanto A, Nagy L. Oxysterol signaling links cholesterol metabolism and inflammation via the liver X receptor in macrophages. *Mol Aspects Med*. 2009; 30(3):134-52
  102. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*. 2001; 7(1):161-71
  103. Morello F, Saglio E, Noghero A, Schiavone D, Williams TA, Verhovez A, Bussolino F, Veglio F, Mulatero P. LXR-activating oxysterols induce the expression of inflammatory markers in endothelial cells through LXR-independent mechanisms. *Atherosclerosis* 2009; 207(1):38-44
  104. Marx N, Bourcier T, Sukhova GK, Libby P, Plutzky J. PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19(3):546-51