Cristina Pio de Almeida

**Captação celular de uma nanoemulsão semelhante a
LDL (LDE): efeito da variação na composição química
e expressão de receptores de lipoproteínas**

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: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo
Orientador: Raul Cavalcante Maranhão

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

Pio de Almeida, Cristina

Captação celular de uma nanoemulsão semelhante à LDL (LDE) : efeito da variação na composição química e expressão de receptores de lipoproteínas / Cristina Pio de Almeida. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: Raul Cavalcante Maranhão.

Descritores: 1.Nanopartículas 2.Receptores de lipoproteínas 3.Colesterol 4.Lipídeos

USP/FM/DBD-204/10

“Dizem que o que procuramos é um sentido para a vida. Penso que o que procuramos são experiências que nos façam sentir que estamos vivos.”

(J.Campbell)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Neusa e Adalberto, pessoas fundamentais na
construção da minha história, pela eterna dedicação,
intenso incentivo, confiança e pelo amor incondicional!

Ao meu grande amor Junior, pela parceria,
pelas alegrias e por sua fortaleza!

Ao meu filho Lucas, grande inspirador,
minha razão de viver!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a Deus por me dar saúde para a realização dos meus sonhos, e por abrir os caminhos que me levaram a pessoas tão especiais, que sem elas esta tese não seria possível!!

Ao meu orientador Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, pela confiança, por suas sábias palavras, e pensamentos científicos que me mostram uma nova forma de ver o mundo da ciência!

Ao Prof. Dr. Durvanei Maria pelos ensinamentos e pela colaboração científica!

Ao Instituto do Coração - diretores, docentes e funcionários, pela oportunidade de trabalhar nesta instituição e ter usufruído de toda infraestrutura que viabilizou a realização deste trabalho!

À Dra. Lourdes e ao Prof. Dr. Francisco Laurindo por gentilmente terem aberto as portas de seus laboratórios e colaborado com a execução desta tese!

Aos funcionários do Laboratório de Patologia, Renata, Tatiane, Sueli, Márcia, Nádia, Antônio, Solange e Gerson, pelo auxílio, atenção e amizade!

Ao Funcionário Vitor do laboratório de Biologia Vascular, pelo inquestionável prontidão para auxiliar no que for possível e pela amizade!

Às funcionárias da secretaria da pós-graduação da faculdade de medicina da USP, Angélica e Rose, por serem sempre tão prestativas, pela atenção e competência!

À FAPESP pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto!

À Banca Julgadora pelo tempo atribuído à leitura desta tese!

À Creusa Dal Bó pela ajuda nos cálculos estatísticos incluídos nesse trabalho!

Às amigas Claudete Valduga e Carmen Vinagre, pelos ensinamentos e acolhimento desde a minha chegada ao laboratório!

À funcionária e amiga Débora Deus, meus sinceros agradecimentos pelos grandes auxílios e ótimas discussões científicas!

À funcionária e mais nova amiga Priscila Carvalho, por toda sua intensa dedicação e auxílio nas análises de biologia Molecular e pelos renovadores “cafés da tarde”!

Aos amigos e colegas do laboratório de Metabolismo de Lípidos, Thaís Contente, Iara Kretzer, Marina Bertato, Ana Carolina Gagliardi, Carolina Piras, Fernanda Pozzi, Marília Oliveira, Juliana Vinagre, Fernanda Maniero, Tatiane Oliveira, Fabíola Filippin, Tatiana Solano, Antônio Carlos Junior, Jeferson da Silva, Fátima Freitas, Elaine Tavares, Jane Oba, Claudete Valduga, Rosane Stefani, Cristiane Guerreiro, Maria da Conceição Latrilha e Maria das Dores pela parceria, pelo acolhimento, pelas alegrias, pelas discussões científica, pelo incentivo, pelo apoio, pela paciência, pelos deliciosos “cafés da tarde”!

Aos meus queridos amigos, Ana Paula Arruda, Oberdan, Willian, Ana Paula Bittencourt e Oswaldo Ramos pelo carinho, compreensão e pelos momentos maravilhosos de lazer!

Aos meus amigos gaúchos, pela compreensão da minha ausência e pelo apoio!

À minha GRANDE amiga Adriana Bulgarelli, pelo carinho, amizade e parceria. Muito obrigada pela incansável ajuda em TODOS os momentos e a qualquer hora, que foi fundamental na elaboração desta tese!

À Silvia Azevedo, a querida “Baah” do Lucas, com sua incansável colaboração, pelo amor dedicado ao Lucas, pelo seu grande e inimaginável apoio!

Aos meus cunhados, Adriana, Sheila e Adriano pelo apoio e incentivo!

Aos meus irmãos, Liciane, Marcelo e Camila, pelo amor e amizade, por todo apoio e carinho e pela compreensão da minha ausência!

Aos meus amados pais, Neusa e Adalberto, pelo amor inquestionável, por me ensinarem o verdadeiro sentido da vida, pelo incentivo constante, pela dedicação e por tornarem meus sonhos possíveis!

Ao meu marido, Junior, pelo amor puro, pela compreensão, pelo apoio e parceria, por me dar força nos momentos mais difíceis!

Ao meu filho Lucas, por permitir que os anjos te enviassem para mim, por iluminar a minha vida, pelo carinho, pelo amor sincero e pelas alegrias!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Metabolismo do Colesterol.....	1
1.2	Lipoproteínas de baixa densidade (LDL).....	2
1.3	Nanoemulsão lipídica artificial semelhante a LDL (LDE).....	7
1.4	Células endoteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos, e H292.....	11
2	Objetivos	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Materiais utilizados.....	18
3.2	Esterilização dos materiais.....	18
3.3	Preparação da LDE fabricada com oleato de colesterol (LDE-CO).....	19
3.4	Preparação das LDEs fabricada com linoleato de colesterol (LDE-CL) e estearato de colesterol (LDE-CE).....	20
3.5	Preparação das lipoproteínas plasmáticas.....	21
3.6	Manutenção das linhagens celulares.....	21
3.6.1	Cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).....	22
3.6.2	Cultura de células de fibroblasto.....	22
3.6.3	Cultura de células de linhagem monocítica humana (THP-1).....	23
3.6.4	Cultura de células de carcinoma mucoepidermoidal de pulmão (NCL-H292).....	24
3.7	Protocolo padrão de preparo das células para os ensaios de captação, competição, imunocitoquímica, PCR em tempo real e citometria de fluxo.....	24
3.8	Captação de LDE e das LDEs modificadas pelas linhagens celulares.....	25
3.9	Competição entre lipoproteína de baixa densidade (LDL) e LDE-CO.....	26
3.10	Dosagem de proteína.....	26
3.11	Extração de RNA e síntese de cDNA para análise de expressão do RNA mensageiro (RNAm) dos receptores de lipoproteínas.....	27

3.11.1	Genes selecionados.....	28
3.11.2	Reações de PCR em tempo real.....	29
3.12	Imunocitoquímica dos receptores de lipoproteínas.....	31
3.13	Citometria de fluxo para análise dos receptores.....	34
3.14	Citotoxicidade celular na presença de diferentes concentrações de LDE.....	34
3.15	Tamanho das partículas de LDE.....	35
3.16	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	36
3.17	Análise Estatística.....	36
4	RESULTADOS.....	38
4.1	CAPTAÇÃO DE LDE-CO POR DIFERENTES TIPOS CELULARES E EXPRESSÃO DOS RECEPTORES LDL-r, LRP-1, CD36 e CD68.....	38
4.1.1	Captação de [³ H]-colesterol livre e [¹⁴ C]-éster de colesterol da LDE-CO por HUVEC, fibroblasto, monócito, macrófago e H292.....	38
4.1.2	Comparação entre a captação de de [³ H]-colesterol livre e [¹⁴ C]-éster de colesterol da LDE-CO por HUVEC, fibroblasto, monócito, macrófago e H292.....	40
4.1.3	Efeito da adição da LDL na captação de [³ H]-colesterol livre em HUVEC.....	42
4.1.4	Análise da expressão gênica e protéica dos receptores: LDL-r, LRP-1, CD36 e CD68 em diferentes concentrações de LDE-CO.....	43
4.1.5	Expressão gênica do LDL-r nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por PCR em tempo real.....	43
4.1.6	Expressão protéica do LDL-r nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por imunocitoquímica.....	44
4.1.7	Expressão protéica do LDL-r nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por citometria de fluxo.....	47
4.1.7.1	Expressão protéica do LDL-r em fibroblasto.....	47
4.1.7.2	Expressão protéica do LDL-r em monócito.....	48
4.1.7.3	Expressão protéica do LDL-r em macrófago.....	48

4.1.7.4	Expressão protéica do LDL-r em H292.....	49
4.1.8	Expressão gênica do receptor LRP-1 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por PCR em tempo real.....	50
4.1.9	Expressão protéica do receptor LRP-1 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por imunocitoquímica.....	51
4.1.10	Expressão protéica do receptor LRP-1 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por citometria de fluxo.....	54
4.1.10.1	Expressão protéica do LRP-1 em fibroblasto.....	54
4.1.10.2	Expressão protéica do LRP-1 em monócito.....	55
4.1.10.3	Expressão protéica do LRP-1 em macrófago.....	55
4.1.10.4	Expressão protéica do LRP-1 em H292.....	56
4.1.11	Expressão gênica do receptor CD36 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por PCR em tempo real.....	57
4.1.12	Expressão protéica do receptor CD36 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por imunocitoquímica.....	58
4.1.13	Expressão protéica do receptor CD36 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por citometria de fluxo.....	60
4.1.13.1	Expressão protéica do CD36 em fibroblasto.....	60
4.1.13.2	Expressão protéica do CD36 em monócito.....	61
4.1.13.3	Expressão protéica do CD36 em macrófago.....	61
4.1.13.4	Expressão protéica do CD36 em H292.....	62
4.1.14	Expressão gênica do receptor CD68 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por PCR em tempo real.....	63
4.1.15	Expressão protéica do receptor CD68 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por imunocitoquímica.....	64
4.1.16	Expressão protéica do receptor CD68 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por citometria de fluxo.....	66
4.1.16.1	Expressão protéica do CD68 em fibroblasto.....	66
4.1.16.2	Expressão protéica do CD68 em monócito.....	67
4.1.16.3	Expressão protéica do CD68 em macrófago.....	67
4.1.16.4	Expressão protéica do CD68 em H292.....	68
4.1.17	Citotoxicidade celular na presença de diferentes concentrações de LDE-CO.....	69
4.2	MODIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA NANOEMULSÃO (LDE-CO).....	70

4.2.1	Tamanho e polidispersão da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237 dias.....	70
4.2.2	Potencial hidrogeniônico da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237.....	72
4.2.3	Peroxidação lipídica da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237.....	73
4.2.4	Captação de concentrações crescentes de LDE-CO LDE-CL e LDE-CE por HUVEC.....	74
4.2.5	Captação de concentrações crescentes de LDE-CO LDE-CL e LDE-CE por fibroblasto.....	75
4.2.6	Captação de concentrações crescentes de LDE-CO LDE-CL e LDE-CE por monócito.....	76
4.2.7	Captação de concentrações crescentes de LDE-CO LDE-CL e LDE-CE por macrófago.....	77
4.2.8	Captação de concentrações crescentes de LDE-CO LDE-CL e LDE-CE por H292.....	78
4.2.9	Peroxidação lipídica em HUVEC na presença de LDE-CO LDE-CL e LDE-CE	79
4.2.10	Peroxidação lipídica em fibroblasto na presença de LDE-CO LDE-CL e LDE-CE.....	80
4.2.11	Peroxidação lipídica em monócito na presença de LDE-CO LDE-CL e LDE-CE.....	81
4.2.12	Peroxidação lipídica em macrófago na presença de LDE-CO LDE-CL e LDE-CE.....	81
4.2.13	Peroxidação lipídica em H292 na presença de LDE-CO LDE-CL e LDE-CE.....	83
4.2.14	Captação de colesterol livre e éster de colesterol da LDE-CL.....	84
4.2.15	Captação de colesterol livre e éster de colesterol da LDE-CE.....	85
4.2.16	Citotoxicidade celular na presença de diferentes concentrações de LDE-CO LDE-CL e LDE-CE.....	86
5	DISCUSSÃO	87
6	CONCLUSÕES	96
7	REFERENCIAS	98
8	ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Captação de LDL e de éster de colesterol.....	4
Figura 2	Diagrama esquemático dos membros da família dos receptores <i>scavenger</i> com papel na aterosclerose.....	6
Figura 3	Estrutura química das moléculas do oleato de colesterol, linoleato de colesterol e estearato de colesterol.....	21
Figura 4	Curva Padrão do gene GAPDH	29
Figura 5	Captação celular de ³ H-colesterol livre (A) e ¹⁴ C-éster de colesterol da LDE (B) por monócito, fibroblasto, HUVEC, H292 e macrófago	39
Figura 6	Captação de ³ H-colesterol livre e ¹⁴ C-éster de colesterol por (A) HUVEC, (B) fibroblasto, (C) monócito, (D) macrófago e (E) H292 nas concentrações crescentes de LDE	41
Figura 7	Efeito da LDL sobre a captação do ³ H-colesterol livre da LDE em HUVEC.....	42
Figura 8	Expressão do receptor LDL-r nas diferentes células com 0 mg (controle), 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO	44
Figura 9	Expressão do receptor LDL-r nas diferentes células com 0 mg (controle), 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO.....	45

Figura 10	Imagens representativas das lâminas de imunocitoquímica para análise da expressão do receptor LDL-r nas diferentes células nas concentrações: 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO	46
Figura 11	Expressão do receptor LDL-r nas populações R1 e R2 de fibroblasto. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes	47
Figura 12	Expressão do receptor LDL-r nas populações R1 e R2 de monócito. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população	48
Figura 13	Expressão do receptor LDL-r nas populações R1 e R2 de macrófago. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população.....	48
Figura 14	Expressão do receptor LDL-r nas populações R1 e R2 de H292. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população	49
Figura 15	Expressão do receptor LDL-r nas diferentes células com 0 mg (controle), 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL LDE-CO	50
Figura 16	Expressão do receptor LRP-1 nas diferentes células com 0 mg (controle), 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO.....	51
Figura 17	Imagens representativas das lâminas de imunocitoquímica para análise da expressão do receptor LRP-1 nas diferentes	

	células nas concentrações: (A) 0mg/mL (B) 0,15 mg/mL (C) 4,14 mg/mL (D) 5,0 mg/mL de LDE-CO.....	52
Figura 18	Expressão do receptor LRP-1 nas populações R1 e R2 de fibroblasto. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população.	53
Figura 19	Expressão do receptor LRP-1 nas populações R1 e R2 de monócito. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população.	54
Figura 20	Expressão do receptor LRP-1 nas populações R1 e R2 de macrófago. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população.	55
Figura 21	Expressão do receptor LRP-1 nas populações R1 e R2 de H292. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população.	55
Figura 22	Expressão do receptor CD36 nas diferentes células com 0 mg (controle), 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE	56
Figura 23	Expressão do receptor CD36 nas diferentes células com 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO.....	57
Figura 24	Imagens das lâminas de imunocitoquímica para análise da expressão do receptor CD36 nas diferentes células nas concentrações: 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO.....	58

Figura 25	Expressão do receptor CD36 nas populações R1 e R2 de fibroblasto. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população	59
Figura 26	Expressão do receptor CD36 nas populações R1 e R2 de monócito. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população	60
Figura 27	Expressão do receptor CD36 nas populações R1 e R2 de macrófago. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população	61
Figura 28	Expressão do receptor CD36 nas populações R1 e R2 de H292. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população.....	62
Figura 29	Expressão do receptor CD68 nas diferentes células com 0 mg/mL (controle), 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO	63
Figura 30	Expressão do receptor CD68 nas diferentes células com 0 mg/mL, 0,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO	64
Figura 31	Imagens das lâminas de imunocitoquímica para análise da expressão receptor CD68 nas diferentes células nas concentrações: (A) 0mg/mL (B) 0,15 mg/mL (C) 4,14 mg/mL (D) 5,0 mg/mL de LDE-CO.	65
Figura 32	Expressão do receptor CD68 nas populações R1 e R2 de fibroblasto. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes	66

Figura 33	Expressão do receptor CD68 nas populações R1 e R2 de monócito. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população	67
Figura 34	Expressão do receptor CD68 nas populações R1 e R2 de macrófago. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população	68
Figura 35	Expressão do receptor CD68 nas populações R1 e R2 de H292. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população.....	69
Figura 36	Ensaio de citotoxicidade para LDE-CO realizados nos tipos celulares fibroblasto, macrófago, HUVEC e H292.	70
Figura 37	(A) Tamanho da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237 após sua fabricação.(B) Polidispersão da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237	72
Figura 38	pH da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237 após sua fabricação	73
Figura 39	Lipoperoxidação da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237 após sua fabricação	73
Figura 40	Captação de éster de colesterol por HUVEC nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE.	74
Figura 41	Captação de éster de colesterol por fibroblasto nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE. ..	75

Figura 42	Captação de éster de colesterol por monócito nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ..76
Figura 43	Captação de éster de colesterol por macrófago nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ..77
Figura 44	Captação de [¹⁴ C] colesterol éster por H292 nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE78
Figura 45	Lipoperoxidação em HUVEC nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL, LDE-CE.79
Figura 46	Lipoperoxidação em Fibroblasto nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CL80
Figura 47	Lipoperoxidação em Monócito nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE.81
Figura 48	Lipoperoxidação em Macrófago nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE82
Figura 49	Lipoperoxidação em H292 nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE83
Figura 50	Captação de (A) [3H]-colesterol livre e (B) [14C]-éster de colesterol da LDE-CL por HUVEC, fibroblasto, monócito, macrófago e H292.....84
Figura 51	Captação de (A) [3H]-colesterol livre e (B) [14C]-éster de colesterol da LDE-CE por HUVEC, fibroblasto, monócito, macrófago e H292.....85

Figura 52	Índice de sobrevivência celular após a adição de concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE em (A) HUVEC e (B) H292	86
------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais ligantes para LDL-r, LRP-1-1, CD36 e CD68	7
Tabela 2	Captação tecidual de [³ H]oleyl éter colesterol da LDE injetada, LDE-apoB em ratos.....	9
Tabela 3	Lista de genes selecionados para análise de expressão dos receptores e gene selecionado como “housekeeping” (normalizador)	29

LISTA DE ABREVIATURAS

CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CD68	<i>Cluster of differentiation 68</i>
cDNA	DNA complementar
CE	Éster de colesterol
FN-1	Linhagem derivada de fibroblasto de derme humana
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
H292	Linhagem derivada de carcinoma pulmonar mucoepidermóide
HMGCoA	3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A redutase
HUVEC	Linhagem endotelial de veia umbilical humana
IL-1	Interleucina-1
LDE-CE	Estearato de colesterol
LDE-CL	Linoleato de colesterol
LDE-CO	Oleato de colesterol
LDL	Lipoproteína de baixa densidade ()
LDLox	LDL oxidada
LDL-r	Receptor de LDL
LPDS	Soro deficiente em lipoproteínas
LRP-1	Receptor da proteína 1 relacionada ao LDL-r
PMA	Acetato de forbol miristato
SFB	Soro fetal bovino
SREBPs	Proteínas de ligação de elementos regulatórios de esterol
SREs	Elementos de resposta sensível ao esterol

TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
THP-1	Linhagem monocítica humana
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VLDL-R	Receptor de lipoproteína muito baixo

RESUMO

Almeida, CP. ***Captação celular de uma nanoemulsão semelhante a LDL (LDE): efeito da variação na composição química e expressão de receptores de lipoproteínas*** [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

A nanoemulsão LDE tem composição lipídica semelhante à da LDL natural e é utilizada para estudos do metabolismo da LDL. Estudos anteriores mostraram que a LDE é captada pelas células pelo LDL-r, porém outros receptores podem estar envolvidos nesta captação, como LRP-1, CD36 e CD68. Os objetivos deste estudo foram: investigar a captação da LDE por células endoteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos e H292, identificar os receptores envolvidos na captação da LDE pelas mesmas células e avaliar os efeitos da modificação química da LDE sobre a estabilidade, captação celular, lipoperoxidação celular e citotoxicidade. A LDE marcada com [³H]-colesterol livre e [¹⁴C]-éster de colesterol foi incubada por 4 horas com as linhagens celulares. Após a incubação, foram realizados os testes de captação da LDE e competição da LDE com a LDL natural. A expressão dos receptores LDL-r, LRP, CD36 e CD68 foi avaliada pelos métodos de imunocitoquímica, citometria de fluxo e PCR real time. Para investigar os efeitos da modificação da LDE (LDE-CO), o éster de colesterol-oleato de colesterol (monoinsaturado), foi substituído por linoleato de colesterol (LDE-CL) (poliinsaturado) e por estearato de colesterol (LDE-CE) (saturado). Estas nanoemulsões foram submetidas a testes de estabilidade (tamanho, polidispersão, pH e peroxidação), captação celular, peroxidação lipídica celular e citotoxicidade. Nos resultados, foi observado que todas as células estudadas internalizaram o colesterol livre e éster de colesterol proporcionalmente às concentrações de LDE-CO incubadas com diferença de saturação entre elas, sendo o colesterol livre mais captado que o éster de colesterol da LDE-CO por todas as células estudadas. Além disso, os monócitos (THP-1) demonstraram maior captação de LDE-CO que as demais células. No estudo de competição com a LDL natural ocorreu uma diminuição da captação ($r^2=0,73$), sugerindo que as duas partículas

competem pelo mesmo receptor. A LDE-CO foi capaz de inibir a expressão protéica dos receptores LDL em HUVEC (3,98 vezes), monócito (6,25 vezes) e fibroblasto (3,70 vezes) e a expressão gênica em monócito e HUVEC. Por citometria de fluxo, a expressão protéica do LDL-r em H292 e fibroblasto diminuiu. Em HUVEC a LDE-CO aumentou a expressão protéica em 3,57 vezes, já em monócito, a LDE-CO diminuiu a expressão gênica e protéica (3,15 vezes) do LRP-1. Em macrófago e em H292, a LDE-CO aumentou a expressão gênica do LRP-1. A LDE-CO foi capaz de aumentar a expressão gênica e protéica (3,1 vezes) do CD36 em HUVEC, diminuir a expressão protéica (4,34 vezes) em macrófago e diminuir a expressão gênica e protéica (2,94 vezes) em H292. A LDE foi capaz de aumentar a expressão protéica (2,09 vezes) do CD68 em H292, e aumentar a expressão gênica em monócito e macrófago. A linhagem celular que apresentou maior taxa de sobrevivência na presença da LDE-CO foi o fibroblasto. Nas análises dos efeitos da modificação química da LDE, a LDE-oleato apresentou o tamanho e a lipoperoxidação menores que a LDE-linoleato e LDE-estearato. Nenhuma das LDEs apresentou modificação da estabilidade antes de 30 dias. As células apresentaram maior lipoperoxidação na presença de LDE-CL quando comparada à presença de LDE-CO e LDE-CE. A captação de [³H]-colesterol livre foi maior que de éster de colesterol das três LDEs por todas as células estudadas. A composição da LDE com oleato de colesterol foi a que apresentou características mais favoráveis em termos de tamanho de partículas e susceptibilidade à peroxidação. A captação celular do colesterol livre foi maior do que a do éster de colesterol em todas as linhagens estudadas das três LDEs, sugerindo que o colesterol livre possa dissociar-se da LDE e ser captado pelas células por vias não específicas. Os dados obtidos neste trabalho ajudam na compreensão dos mecanismos de captação e da influência da composição na estabilidade e adequação do sistema LDE e outros similares às suas potenciais aplicações terapêuticas ou diagnósticas.

Descritores: Nanopartículas, lipídeos, receptores de lipoproteínas e colesterol

ABSTRACT

Almeida, CP. ***Low density lipoprotein like (LDE) nanoemulsion cell uptake: chemical composition and lipoprotein receptor expression.*** São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

With fat composition similar to natural LDL, the LDE nanoemulsion can be used to study the metabolism of LDL. Other studies have shown that LDE is uptaken by cells by LDL-r receptors. Other receptors such as LRP-1, CD36 and CD38 may also be involved in the uptake. The objectives of this study were to investigate the uptake of LDE by endothelial and tumor cells, fibroblasts, monocytes and macrophages, to identify those receptors involved in this process and to evaluate the effects on LDE uptake by changing its chemical composition. A labeled LDE with [³H]-cholesterol and [¹⁴C]-cholesteryl ester was incubated for 4 hours with cells, after which LDE uptake and competition tests were evaluated. LDL-r, LRP, CD36 and CD38 were evaluated by using immunocytochemistry methods, cytometric flow and real time PCR. To investigate the effects of LDE chemical composition modifications, cholesteryl oleate (LDE-CO) was replaced with cholesteryl linoleate (LDE-CL) and cholesterol stearate (LDE-CE). These were then tested for stability, cellular uptake, lipoperoxidation and cytotoxicity. Results showed that all cells internalized [³H]-cholesterol and [¹⁴C]-cholesteryl ester proportionally to incubated LDE-CO concentrations albeit with some saturation differences. LDE-CO lipid uptake had a higher cholesterol uptake than the cholesteryl ester uptake. Furthermore, monocytes (THP-1) had a higher LDE-CO uptake than other cells. LDE-CO uptake decreased ($r^2 -0.73$) in the presence of natural LDL, suggesting that these two particles may be competing for the same receptors. LDE-CO appeared to inhibit LDL protein receptor expression in HUVEC (3.98 times), in monocytes (6.25 times) and in fibroblasts (3.70 times), as well as the gene expression in monocytes and HUVEC. A decrease in LDL-r expression in both H292 and fibroblasts was also observed. LDE-CO increased the protein expression in HUVEC 3.75

times while in monocytes, it was able to decrease gene and protein expression of LRP-1, 3.15 times. In macrophages and H292, there was an increase in genetic expression of LRP-1. LDE-CO increased the CD36 in HUVEC gene and protein expressions 3.1 times, decreased the macrophage protein expression 4.34 times and decreased the H292 gene and protein expression 2.94 times. LDE increased protein expression 2.09 times in CD68 in H292 and increase gene expression in both monocytes and macrophages. Fibroblasts presented the highest survival rate in the presence of LDE-CO of all cells studied. The LDE chemical modification effect studies, presented smaller sized LDE-CO and less lipoperoxidation than LDE-CL and LDE-CE presented no stability modifications in less than 30 days. Cells presented higher lipoperoxidation in the presence of LDE-CL when compared to the presence of LDE-CO and LDE-CE. [³H]-cholesterol was greater than cholesteryl ester for all three LDE types in all the studied cells. LDE-CO presented favorable characteristics in terms of particle size and susceptibility to peroxidation. Cholesterol cell uptake was higher than that of cholesteryl ester for all LDEs of all the studied cells which suggests that that cholesterol may be capable of disassociating itself from LDE and being uptaken by cells through non-specific pathways. The results of this study can help to better understand the mechanisms of uptake by cells, the effects of stability and LDE system adequation for therapeutic and diagnostic applications.

Descriptors: Nanoparticle, lipids, lipoprotein receptors and cholesterol

Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo do Colesterol

O colesterol é um componente vital para as células, além de ser o precursor de todos os hormônios esteróides, sais biliares e oxisteróis, que são moléculas reguladoras para muitos processos metabólicos. Ácidos graxos e colesterol são estruturas da membrana plasmática que devem ter sua síntese controlada a fim de manter seus níveis fisiológicos. Quantidades excessivas de colesterol nas células podem prejudicar a função da membrana. O colesterol se precipita como cristais, os quais irão causar a morte das células ou resultar em dano aterosclerótico caso espalhe-se no sangue (1). A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é o principal carreador de colesterol no plasma (2) e quando internalizada na célula através de receptores específicos é degradada em vesículas que se fundem aos lisossomas (3).

A distribuição aleatória do colesterol e dos lípidos nas membranas celulares é organizada em domínios chamados de *rafts* e cavéolas. Estas estruturas desempenham um papel de transporte de colesterol mantendo a homeostase e a sinalização celular. A regulação do colesterol ocorre pela enzima 3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A redutase (HMGCoA), por lipoproteínas que mantêm o nível de colesterol no sangue e pela regulação da síntese de colesterol pelos elementos de resposta sensível ao esteroide

(SREs). A homeostase lipídica via SREs em células é realizada pelos fatores de transcrição chamados de proteínas de ligação de elementos regulatórios de esterol (SREBPs) (1). Cada proteína do SREBP tem o peso molecular de 125 kDa e consiste de 1150 aminoácidos e estão localizadas nas membranas do retículo endoplasmático e na membrana nuclear. Os SREBPs ativam diretamente a expressão de mais de 30 genes dedicados à síntese e captação do colesterol, ácidos graxos, triglicerídeos e fosfolípidos (4). Altas concentrações de colesterol inibem a maturação do SREBP e suspende a síntese de colesterol e do receptor de LDL (LDL-r) (5).

Para o uso do colesterol da LDL, as células devem hidrolisar os ésteres de colesterol da lipoproteína, pois para a síntese das membranas celulares é utilizado o colesterol não esterificado (6). Depois da hidrólise dos ésteres de lipoproteínas pela lipase lisossomal, o colesterol livre é reesterificado pela ACAT para ser estocado em vesículas (7). A entrada de colesterol nas células e o caminho do transporte reverso do colesterol são dependentes das forças que afetam o balanço entre o colesterol livre e esterificado nas células. Dois terços do colesterol do plasma humano estão contidos na LDL (6).

1.2 Lipoproteína de baixa densidade (LDL) e os receptores de lipoproteínas

A LDL é uma lipoproteína produzida *in vivo* através da cascata de delipidação da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína

rica em triglicérides produzida pelo fígado. A lipase lipoproteica, estimulada pela apolipoproteína CII hidrolisa os triglicérides da VLDL, forma remanescentes progressivamente mais pobres em triglicérides e mais densos, até chegar à LDL (2, 8). A LDL é uma partícula esférica, constituída de um núcleo apolar de ésteres de colesterol (aproximadamente 45-50% do peso lipídico total) e um resíduo de triglicérides estabilizado por uma monocamada de fosfolípidos, onde há também colesterol livre. A apoB-100 constitui a parte protéica da LDL e é o componente que liga as partículas da LDL a receptores específicos, os receptores da LDL, situados na superfície da membrana plasmática (2). A família dos receptores de LDL consiste em receptores de superfície de membrana que reconhecem e internalizam ligantes extracelulares seguida pela degradação em lisossomas. Além dos receptores de LDL, também fazem parte desta família, o receptor de lipoproteína muito baixo (VLDL-R), receptor 2 de apolipoproteína E, LRP-1 e megalina.

O receptor de LDL (LDL-r) é uma glicoproteína transmembrana responsável pela ligação e endocitose de lipoproteínas contendo apoB e apoE, especificamente o LDL rico em colesterol (9). Este processo envolve o reconhecimento da LDL do meio extracelular pelo receptor LDL-r localizado na superfície de membranas celulares, sua captação através de *clathrin-coated pits* e seu transporte no meio intracelular por vesículas. As vesículas são degradadas e fundidas com lisossomas liberando os lípidos no citoplasma (10). Os ésteres de colesterol, os triglicerídeos e os fosfolípidos são hidrolisados pelas hidrolases ácidas para gerar colesterol livre e ácidos

graxos livres (11). O LDL-r é reciclado para retornar a superfície de membrana e se ligar a outra partícula de LDL, como mostra a figura 1(10).

(adaptado de Rhainds, 1999)

Figura 1. Captação de LDL e de éster de colesterol. Esquerda: o LDL-r é localizado nas invaginações (*clathrinas-coated pits*) na superfície celular. Direita: Captação seletiva de éster de colesterol da LDL pela interação da LDL com sítios de ligação de lipoproteínas (LBS). Aminoácidos resultantes da degradação da APOB (AA), ácidos graxos livres (FFA), éster de colesterol (CE).

O receptor da proteína 1 relacionada ao LDL-r (LRP-1) é um dos maiores receptor endocítico da família do LDL-r, o qual consiste em uma cadeia pesada de 515 kDa contendo domínios de ligantes extracelulares e pode ser encontrado em cavéolas (12). O LRP-1 é expresso em hepatócitos, macrófagos, trofoblastos, neurônios, fibroblastos, pneumócitos e células de músculo liso. Faz a mediação da captação celular de lipoproteínas contendo apoE e lipase lipoprotéica e colabora com o LDL-r na remoção do colesterol de lipoproteínas remanescentes da circulação (10). Além disso, o LRP-1 é um receptor de captação e catabolismo de vários ligantes do ambiente

pericelular incluindo macromoléculas da matrix extracelular, proteinases ativas e complexos inibidores de proteinases. A endocitose dependente do LRP-1 previne o remodelamento excessivo da matrix extracelular e a degradação de membrana, dois elementos chaves para a progressão do câncer e a metástase (13).

Outro sistema de captação da LDL é o chamado receptor tipo *scavenger*, que reconhece formas modificadas da LDL, esta via é considerada pró-aterogênica, e pouco se sabe sobre o seu papel fisiológico (14-15). Os receptores *scavenger* são capazes de internalizar lipoproteínas modificadas como a LDL acetilada e oxidada. Diferente do LDL-r, a atividade dos receptores *scavengers* não é regulada pela concentração intracelular de colesterol. Contudo, a contínua captação da LDL modificada leva a uma grande acumulação de colesterol dentro das células (16).

A modificação oxidativa do LDL (LDLox) pode desenvolver um papel importante na aterosclerose. Uma das propriedades da LDLox é que ela pode ser reconhecida por macrófagos através do receptor *scavenger*, levando a formações de células espumosas (17). Os receptores *scavenger*, como os da classe A, B, C, D, E, F e G (figura 2) (18) participam da captação da LDLox por macrófagos, a especificidade varia de acordo com o grau da oxidação. Os receptores *scavenger* da classe B como CD36 e os da classe D macrosialina/CD68 podem também mediar a captação e a degradação da LDLox. Os receptores da classe B, como o CD36, tem uma de importância primária na aterogênese (19). O CD36 é uma glicoproteína de membrana com 88KD que foi primeiramente identificada em monócitos e posteriormente

em plaquetas. Esta glicoproteína é expressa em vários tipos celulares, como célula endotelial microvascular e células de músculo liso (20).

Adaptado (Moore, 2006)

Figura 2. – Diagrama esquemático dos membros da família dos receptores *scavenger* com papel na aterosclerose.

O CD68 e seu homólogo são proteínas transmembranas tipo que são glicosiladas que predominantemente são expressos em endossomos e lisossomos de macrófagos. Estes receptores são identificados com ligantes para LDLox, e podem contribuir para o processo endolisossomal de LDLox. Os níveis de macrosialina são regulados pela LDLox, e este receptor é expresso em células espumosas nas placas de ateroma (18).

A interiorização de lipoproteínas via receptores *scavenger* não é regulada pelo conteúdo intracelular de colesterol, isso pode levar a um excessivo acúmulo de ésteres de colesterol no citoplasma, contribuindo para a formação de células espumosas (19).

Tabela 1. Principais ligantes para LDL-r, LRP-1, CD36 e CD68

LDL-r	ApoB e ApoE
LRP-1	ApoE, quilomicron, lipase lipoproteica, α_2 -macroglobulina, ativadores de plasminogênio, complexo inibidor de proteases, e lipase.
CD36	LDLox, células apoptóticas
CD68	LDLox, células apoptóticas

Adaptado de Chung, 2004; Rhainds, 1999(10-11)

1.3 Nanoemulsão lipídica artificial semelhante à LDL (LDE)

O aumento da expressão dos receptores de LDL em processos proliferativos pode propiciar uma nova estratégia de direcionamento específico de fármacos aos tecidos acometidos (21-22). Essa possibilidade está baseada no fato de que a LDL é capaz de transportar grandes quantidades de componentes lipofílicos que podem ter efeitos citotóxicos, sendo internalizada na célula pelo mesmo receptor. Conseqüentemente, há uma maior concentração do fármaco incorporado nas células alvo e uma diminuição da toxicidade celular não-específica.

A utilização da LDL natural está restrita às experiências de laboratório, pois sua obtenção a partir do plasma humano, os procedimentos de incorporação dos fármacos e armazenamento dos complexos, inviabiliza sua utilização na prática clínica. Além disso, por ser um hemoderivado, a LDL natural pode provocar respostas imunológicas e contaminação por vírus da hepatite ou do HIV (22). Devido a estas dificuldades iniciou-se a formulação de nanoemulsões semelhantes a LDL.

O grupo de Maranhão RC desde 1993, tem produzido uma nanoemulsão semelhante a LDL natural, denominada LDE. A LDE apresenta a composição lipídica semelhante a da LDL natural, porém sem a parte protéica da lipoproteína. Ao ser injetado na circulação plasmática, e em contato com as lipoproteínas naturais, a LDE adquire apo E, que pode ser reconhecida pelo receptor da LDL. É importante ressaltar que a LDE pode ser produzida em escala industrial, tornando factível a sua utilização na rotina, além de apresentar um baixo risco de contaminação (23).

A LDL natural não possui apo E, ligando-se ao receptor através da sua única proteína, a apo B-100. Estudos de competição em linfócitos mostraram que a LDL natural compete com LDE pela captação celular, sugerindo que a remoção de ambas se dá pelo mesmo receptor (23). No entanto, a nanopartícula artificial LDE tem mais afinidade pelos receptores da LDL do que a própria LDL natural. Isto acontece porque o meio ligante ao receptor utilizado pela LDE é a apo E, que tem mais afinidade pelo receptor do que a apo B-100 da LDL natural como mostra a tabela 2 (24).

Tabela 2. Captação tecidual de [^3H]oleyl éter colesterol da LDE injetada, LDE-apoB em ratos

Captação Tecidual (% da dose injetada)			
Tecido	<i>LDE (10)</i>	<i>LDE-apoB (8)</i>	<i>LDL-nativa (3)</i>
<i>Fígado</i>	48,64±5,05	43,34±4,78	39,35±9,19
<i>Baço</i>	0,95±0,31	1,38±0,30	2,54±0,44
<i>Adrenal</i>	0,58±0,21	0,55±0,07	0,25±0,09
<i>Intestino</i>	0,53±0,20	0,54±0,24	0,88±0,41
<i>Pulmão</i>	0,23±0,10	0,26±0,07	1,01±0,40
<i>Coração</i>	0,15±0,1	0,17±0,06	0,12±0,08
<i>Rim</i>	0,20±0,12	0,25±0,07	0,43±0,16
<i>Músculo</i>	3,14±1,4	4,14±1,95	4,73±0,40
<i>Adiposo</i>	2,18±1,3	2,79±0,95	1,61±0,14

Hirata, 1999.(24)

A LDE, usada como instrumento de investigação, permite o estudo do metabolismo da LDL em indivíduos de uma forma muito mais prática e eficiente que a LDL. Com uma única preparação é possível estudar vários pacientes, enquanto que no caso da LDL, devido ao risco de contaminação e reações imunes, é obrigatório isolar-se e marcar-se a LDL do indivíduo e reinjetá-la apenas nele mesmo, o que torna o procedimento muito trabalhoso. Além disso, a LDE é marcada facilmente por radioisótopos ou por outros meios e é possível manipular sua composição para fins experimentais. A LDE foi injetada em indivíduos normolipidêmicos e em portadores de hipercolesterolemia familiar, onde há defeito dos receptores da LDL, a LDE foi removida lentamente, mostrando a adequação do modelo

(25). Em vários trabalhos, foi demonstrado que a associação de quimioterápicos à LDE resulta em preparações com maior atividade antineoplásica, demonstrado em modelos oncológicos animais, e com drástica redução da toxicidade, assim como foi demonstrado em estudos realizados em pacientes com câncer avançado (26-27). Pesquisas recentes em coelhos com aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol demonstraram que a LDE se concentra nas lesões ateroscleróticas e que estas apresentam marcante redução quando os animais são tratados com o quimioterápico de ação antiproliferativa paclitaxel associado à LDE (28).

O primeiro estágio da aterosclerose é a da disfunção endotelial que ativa as moléculas de adesão e a expressão de moléculas quimiotáticas que recrutam os monócitos circulantes para dentro da íntima e passam a expressar receptores *scavenger*. Como estes receptores não são regulados pelo acúmulo de colesterol intracelular (mecanismo de retroalimentação negativa), a constante captação das lipoproteínas faz com que, no espaço subendotelial, os macrófagos se tornam repletos de lípidos, convertendo-se em células espumosas (29).

A disfunção endotelial pode ser induzida pela LDLox. Quando a LDL infiltra na íntima ela pode ser oxidada pelos macrófagos residentes ou por células endoteliais (20).

Foram escolhidas as células endoteliais, os monócitos e os macrófagos para este estudo, pois elas participam das primeiras fases do processo proliferativo da aterosclerose. E o fibroblasto por ser uma célula muito utilizada para estudos de receptores de lipoproteínas. Além disso, para

contribuir com os estudos desenvolvidos com a LDE, foi escolhida também uma célula tumoral para observar o seu comportamento na presença LDE.

1.4 Células endoteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos e H292

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica na qual ocorre a formação de ateromas (placas de gordura e tecido fibroso) dentro dos vasos sanguíneos. Os monócitos e macrófagos são importantes na iniciação e progressão da doença. O recrutamento dos monócitos para dentro da parede da artéria é um dos primeiros eventos na aterosclerose (20).

Na íntima, os monócitos se transformam em macrófagos, importantes mediadores da inflamação e da resposta imune na aterosclerose. Os macrófagos contribuem para inflamação local através da produção de citocinas, radicais livres e proteases. A captação de lipoproteínas modificadas leva a acumulação de ésteres de colesterol e formação de células espumosas. Os macrófagos também contribuem para o remodelamento da lesão e para a ruptura da placa pela secreção das metaloproteinases. Os macrófagos contribuem para a evolução da aterosclerose em diversos caminhos. O recrutamento dos monócitos no endotélio, como na hipercolesterolemia, estimula a produção de moléculas quimiotáticas, as quais estimulam receptores no rolamento dos monócitos levando a adesão dependente de integrinas no endotélio e subsequente diapedese (7).

In vitro, macrófagos derivados de monócitos humanos têm sido utilizados para estudos de armazenamento de LDL e LDLox. Contudo, o isolamento de monócitos humanos do sangue é um processo longo e dispendioso. Os efeitos da variação por contaminação de outros tipos de células é um risco que não pode ser eliminado. Por isso, as células da linhagem monocítica humana (THP-1) são amplamente escolhidas para diversos estudos (30).

A linhagem THP-1 é caracterizada por distintos marcadores monocíticos de superfície, atividades enzimáticas e habilidade de fagocitose, secreção de potentes citocinas como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF). Estas células também sintetizam e secretam apoE e lipase lipoproteica. Quando estimuladas com acetato de forbol miristato (PMA) adquirem características de macrófagos (5) e se tornam ancoragem-dependente, interrompem a divisão e aumentam intensamente a secreção de apoE e lipase lipoproteica. As células em divisão THP-1 têm receptores que ligam e degradam LDL por um caminho LDL-específico. O tratamento com PMA resulta em uma transiente super-indução do mRNA do receptor de LDL seguido de uma perda gradual da habilidade de ligação e degradação da LDL (5).

Estas células têm a habilidade de estocar éster de colesterol na presença de LDL ou LDL modificada, e exibem receptores de LDL que desaparecem quando elas são diferenciadas em resposta a presença de PMA (30).

Os receptores *scavenger* aparecem nas células diferenciadas concomitante à perda dos receptores de LDL. Os macrófagos utilizam receptores *scavenger*, como o CD36, para a captação da LDL modificada. Muitos estudos mostraram que macrófagos expressam altos níveis de CD36 para ligar e interiorizar as lipoproteínas oxidadas (5).

O carcinoma pulmonar mucoepidermóide (H292) é uma linhagem derivada de um nodo linfático da metástase. As células mantêm as características mucoepidermóides na cultura como determinado por suas ultra-estruturas expressão de múltiplos marcadores de diferenciação escamosa. (ATCC, 2009). Um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a captação e a atividade citotóxica do quimioterápico etoposide associado à LDE pelas células NCI-H292 foi mediada pelo LDL-r (31).

A LDE tem potencial bastante amplo: além de instrumento para estudos de fisiologia e fisiopatologia de lípidos, pode ser usada como veículo no tratamento do câncer e das doenças cardiovasculares. Porém um aspecto ainda não explorado é o uso da LDE para estudar o processo de formação de células espumosas a partir de macrófagos. A nanopartícula pode ter a sua composição em ésteres de colesterol, ácidos graxos de cadeia saturada, monoinsaturada ou poliinsaturada modificada de forma sistemática. A habilidade dos macrófagos em fagocitar a LDE de composição modificada ou com diferentes graus de oxidação pode ajudar a compreender os fenômenos ligados à formação de células espumosas e

eventualmente dividir novas formas de tratamento da doença, com base nas propriedades da LDE.

Os estudos de competição com a LDL têm indicado que a lipoproteína natural desloca a LDE, sugerindo que o receptor da LDL é importante na captação celular da nanopartícula, outros receptores podem também estar envolvidos na captação. Neste caso, receptores como o LRP-1, o CD36 e CD68 podem desempenhar um papel na captação da LDE. Diferentes linhagens celulares apresentam diferentes graus de expressão dos diversos receptores. Além disso, é possível que a LDE utilize outras vias de captação celular além da mediada pelo receptor da LDL.

.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Investigar a captação da LDE por células endoteliais, fibroblastos, monócito, macrófagos e H292;
2. Identificar os receptores envolvidos na captação da LDE pelas mesmas células;
3. Avaliar os efeitos da modificação química da LDE sobre a estabilidade, captação celular, lipoperoxidação celular e citotoxicidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais utilizados

Os isótopos radioativos ^3H -colesterol livre e ^{14}C -éster de colesterol foram obtidos da Amersham International (Little Chalfont, Inglaterra), ambos com marcação no anel esteroide. Os lípidos trioleína, oleato de colesterol, linoleato de colesterol, estearato de colesterol, colesterol e fosfatidilcolina, utilizados para o preparo da nanoemulsão e suas modificações, foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA). A pureza dos lípidos foi avaliada pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) (0,5mm de espessura), utilizando sílica gel 60H e sistema solvente de hexano: éter etílico: ácido acético (70: 30: 1).

Os demais reativos e solventes foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Os materiais utilizados para realização das técnicas imunocitoquímica e para a preparação de cultura celular foram adquiridos na indústria químico-farmacêutica local (Invitrogen e Biogen, São Paulo – Brasil).

3.2 Esterilizações dos materiais

Toda vidraria utilizada neste estudo foi submetida à esterilização e despirogenização a seco (estufa 180°C, por 90 min.) e a vapor

(autoclavagem a 120°C, 1,5 atm, 30min.). Todo material plástico e de borracha utilizados foram de uso descartável. Os procedimentos de preparo das emulsões foram realizados em capela de fluxo laminar vertical. Alíquotas das emulsões artificiais foram submetidas a teste de presença de pirogênios e esterilidade, no Laboratório de Metabolismo de Lípides do InCor e no setor de Bacteriologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.3 Preparação da LDE fabricada com oleato de colesterol (LDE-CO)

Em um frasco foram pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol, diluídos em clorofórmio: metanol (2:1). Em seguida, foram adicionados à mistura de lípidos 10^6 cpm dos isótopos ^3H -colesterol livre e ^{14}C -éster de colesterol. Os solventes residuais foram evaporados da mistura sob fluxo de nitrogênio e dessecação a vácuo, por 16h, a 4°C. Após a adição de 10 ml de tampão tris-HCl 0,01M, pH 8, a mistura de lípides foi emulsificada por irradiação ultrassônica, utilizando-se sonicador (Branson Ultrasonic Corporation, USA) potência 125 watts, durante 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 a 55°C. Para obtenção da LDE na faixa de diâmetro e tamanho desejados, a solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (ultracentrífuga, rotor Beckman SW –41). Na primeira etapa, o material da parte superior do tubo, resultante da centrifugação a 200.000 x g por 30 minutos, a 4°C, foi removido por

aspiração (1 ml) e desprezado. Ao restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr) ajustando a densidade para 1,21g/ml. Após a segunda centrifugação (200.000 x g por 2 horas a 4°C), a LDE foi recuperada no topo do tubo por aspiração. O excesso de KBr foi removido por diálise, contra 2 trocas de 1000 volumes tampão tris HCl 0,01 M, pH 8. Finalmente, a emulsão foi esterilizada por filtração em membrana Milipore (0,22µ de porosidade) sob fluxo laminar e armazenada a 4°C (23). A LDE foi chamada de LDE-CO ao longo deste trabalho para diferenciá-la das LDEs modificadas

3.4 Preparação das LDEs formuladas com linoleato de colesterol (LDE-CL) e estearato de colesterol (LDE-CE)

A preparação das LDEs, LDE-CL e da LDE-CE, foi igual à descrita anteriormente, no entanto substituímos o oleato de colesterol (18:1, monoinsaturado) por linoleato de colesterol (18:2, poliinsaturado) e por estearato de colesterol (18:0, saturado). Foram escolhidos estes dois tipos de colesterol para substituir o oleato de colesterol, por serem bastante semelhantes ao oleato, tendo como a principal diferença o número de saturações como mostra a figura 2.

Oleato de colesterol Linoleato de colesterol Estearato de colesterol

Figura 2. Estrutura química das moléculas do oleato de colesterol, linoleato de colesterol e estearato de colesterol

3.5 Preparação das lipoproteínas plasmáticas

O plasma foi obtido de doadores normais. A LDL ($1,019 < d < 1,063$ g/cm³) e foi isoladas por ultra-centrifugação diferencial.

3.6 Manutenção das linhagens celulares

No presente estudo foram utilizados os tipos celulares: células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), Fibroblasto da derme humana (FN-1, estabelecidas pelo Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, CAPPesq-HCFMUSP, nº 921/06), linhagem monocítica humana (THP-1), macrófago derivado da linhagem monocítica humana (THP-1), linhagem de células de carcinoma mucoepidermoidal de pulmão (NCI-H292). Todos os tipos celulares foram cultivados até atingirem 80% de subconfluência entre o repique 5 e 8, para posteriores experimentos.

3.6.1 Cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC)

A linhagem HUVEC, número ATCC PCS100-010, foi mantida em estufa umidificada (5% de CO₂, 95% de ar), a 37 °C, em meio de cultura M199, com glutamina, enriquecido com bicarbonato de sódio (2,2 g/l), 10% de soro fetal bovino (SFB), 50 µg/mL de estreptomicina e 50 UI/mL de penicilina. As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² e repicadas a cada dois dias.

O repique foi feito pela ação de uma solução de tripsina-versene (0,2%) e mantidas de 2 a 3 minutos em estufa umidificada (5% de CO₂, 95% de ar) a 37°C. A seguir foram destacadas da parede da garrafa com adição de 10 mL de meio M199 enriquecido. A suspensão celular foi centrifugada a 1.500 rpm por 3 minutos. O botão celular foi novamente suspenso e colocado em cultura a uma densidade de 1 x 10⁶ células/mL.

3.6.2 Cultura de células de fibroblastos

Os fibroblastos, doados pelo laboratório de Bioquímica e Biofísica (Butantã-USP), foram mantidos em estufa umidificada (5% de CO₂, 95% de ar), a 37 °C, em meio de cultura RPMI-1640, sem glutamina, enriquecido com bicarbonato de sódio (2 g/l), 10% de SFB, 50 µg/mL de estreptomicina e 50 UI/mL de penicilina. As células foram mantidas em cultura de monocamada em garrafas de 75 cm² e repicadas a cada dois dias.

As células foram submetidas à ação de uma solução de tripsina-versene (0,2%) e mantidas de 2 a 3 minutos em estufa umidificada (5% de CO₂, 95% de ar) a 37°C. Posteriormente foram destacadas da parede da garrafa com adição de 10 mL de meio RPMI 1640 enriquecido. A suspensão celular foi centrifugada a 1.500 r.p.m. por 3 minutos. O botão celular foi novamente suspenso e colocado em cultura a uma densidade de 1×10^6 células/mL.

3.6.3 Cultura de células de linhagem monocítica humana (THP-1)

A linhagem THP-1 foi doada pelo laboratório de Biologia Vascular do Incor, foi mantida em estufa umidificada (5% de CO₂, 95% de ar), a 37 °C, em meio de cultura RPMI-1640, sem glutamina, enriquecido com bicarbonato de sódio (2 g/l), 10% de SFB, 50 µg/mL de estreptomicina e 50 UI/mL de penicilina. As células foram mantidas em cultura de suspensão em garrafas de 75 cm² e repicadas a cada dois dias. As células foram retiradas da garrafa e colocadas em falcon de 50 mL. A suspensão celular foi centrifugada a 1.500 r.p.m. por 3 minutos. O botão celular foi novamente suspenso e colocado em cultura a uma densidade de 1×10^6 células/mL.

Para diferenciar os monócito (THP-1) em macrófagos foi adicionado as células o acetato de forbol miristato (PMA) na concentração final de 50 nM e mantido em cultura por 48 horas.

3.6.4 Cultura de células de carcinoma mucoepidermoidal de pulmão, epitélio brônquico (NCI-H292)

A linhagem NCI-H292 foi mantida em estufa umidificada (5% de CO₂, 95% de ar), a 37 °C, em meio de cultura RPMI-1640, sem glutamina, enriquecido com bicarbonato de sódio (2 g/l), 10% de SFB, 50 µg/mL de estreptomicina e 50 UI/mL de penicilina. As células foram mantidas em cultura de monocamada em garrafas de 75 cm² e repicadas a cada dois dias.

As células foram submetidas à ação de uma solução de tripsina-versene (0,2%) e mantidas de 2 a 3 minutos em estufa umidificada (5% de CO₂, 95% de ar) a 37°C. Posteriormente foram destacadas da parede da garrafa com adição de 10 mL de meio RPMI 1640 enriquecido. A suspensão celular foi centrifugada a 1.500 r.p.m. por 3 minutos. O botão celular foi novamente suspenso e colocado em cultura a uma densidade de 1 x 10⁶ células/mL.

3.7 Protocolo padrão de preparo das células para os ensaios de captação, competição, imunocitoquímica, PCR em tempo real e citometria de fluxo

As células HUVEC, fibroblasto, monócito, macrófago e H292 foram plaqueadas (5x10⁵/mL) em placas de *Petri* de 35 mm de diâmetro com meio de cultura apropriado acrescida de 10% SFB por 24 horas. Os macrófagos

foram plaqueados em meio de cultura RPMI (10% SFB) por 48 horas na presença PMA. Após as 48 horas de incubação dos macrófagos e 24 horas das demais células o meio de cultura com SFB foi substituído por um meio de cultura com 10% de soro bovino fetal deficiente em lipoproteínas (LPDS). Após 24 horas o meio de cultura contendo LPDS foi substituído pelo meio de cultura com SFB e foram adicionadas as concentrações crescentes de LDE-CO de acordo com o experimento.

3.8 Captação de LDE e das LDEs modificadas pelas linhagens celulares

Após o preparo das células descritos no item 3.7, foram adicionadas as concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL ou LDE-CE marcadas com [^3H]-colesterol livre e [^{14}C]-éster de colesterol. Quatro horas depois da incubação com as concentrações crescentes das LDEs à 37°C, as células foram lavadas com PBS por 2 vezes, retiradas das placas com tripsina e centrifugadas em *ependorfs* (1,5 mL) em 14000 RPM por 8 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 500 mL de PBS para ressuspensão do *pellet* de célula. As células foram lisadas no sonicador (Branson Ultrasonic Corporation, USA). A radioatividade foi medida em uma solução de cintilação no contador β .

3.9 Competição entre lipoproteína de baixa densidade (LDL) e LDE-CO

A competição entre LDE-CO e LDL foi medida pela captação celular de 0,6 mg/mL LDE marcada com [3 H]-colesterol livre na presença de concentrações crescentes de LDL: 1,25; 2,5; 5,0; 10; 50; 75; 100; 250 e 500 μ g/mL. Após o preparo das células descritos no item 3.7 adicionou-se, em todas as placas, 0,6 mg/mL de lípidos de LDE marcado com [3 H]-colesterol livre, além das concentrações crescentes de LDL natural: 1,25; 2,5; 5,0; 10; 50; 75; 100; 250 e 500 μ g/mL. Quatro horas depois da incubação a 37°C, as células foram lavadas com PBS por duas vezes, retiradas das placas com tripsina e centrifugadas em *eppendorfs* (1,5 mL) em 14000 RPM por 8 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 500 mL de PBS para ressuspensão do *pellet* de células. As células foram lisadas no sonicador (Branson Ultrasonic Corporation, USA). A radioatividade foi medida em uma solução de cintilação no contador β .

3.10 Dosagem de Proteína

A concentração total de proteínas das amostras foi quantificada pelo método de Bradford, utilizando-se albumina bovina como padrão (32).

3.11 Extração de RNA e síntese de cDNA para análise de expressão do RNA mensageiro (RNAm) dos receptores de lipoproteínas

Após o preparo das células descritos no item 3.7, foram adicionadas as concentrações crescentes de LDE-CO (0,15 mg/mL, 1,15, mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípides). A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen®), segundo especificações do fabricante. A qualidade das amostras foi verificada através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% e as concentrações das mesmas foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 e 280 nm no aparelho *ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies, Inc), considerando-se satisfatórias as razões 260/280 entre 1,8 a 2,0. As amostras não diluídas foram estocadas a -70°C e uma alíquota foi utilizada para a transcrição reversa.

As moléculas de cDNA foram sintetizadas através de um sistema de transcrição *ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Em resumo, 0,25 µg de RNA total foram adicionados 0,5 µL de Oligo dT (500 µg/mL), com um volume final de 5 µL. Essa mistura foi mantida a temperatura de 70°C por 5 minutos e, imediatamente, resfriada em gelo por 5 minutos.

Em seguida, a essas amostras foram adicionados 1 µL dNTP Mix (10mM), 1,6 uL MgCl₂ (25mM), 4 µL de tampão de reação 5X (*ImProm-IITM 5X Reaction Buffer*), 0,5 µL de inibidor de RNase (*RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor*, 40 U/µL), 1 µL da enzima *ImProm-IITM Reverse Transcriptase*, e

água DEPC para um volume final de reação de 20 uL. A reação foi incubada a 42°C por 1 hora, sendo finalizada com uma incubação a 70°C por 15 minutos. No final, cada amostra de cDNA obtida foi diluída dez vezes (cDNA 1:10) com água DEPC.

3.11.1 Genes selecionados

Os genes dos receptores estudados neste trabalho foram LDL-r, LRP-1, CD36 e CD68, e utilizou-se o GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) como gene normalizador. Para a elaboração das curvas de calibração ou padrão de cada sonda foram preparadas cinco diluições do cDNA 1:10, com fator de diluição de 1:5, como pode ser observado na Figura 3 a curva padrão do gene GAPDH. Os resultados obtidos foram analisados de acordo com o software deste equipamento.

Os iniciadores e sondas para cada gene foram obtidos de Applied Biosystems (tabela 3).

Figura 3. Curva Padrão do gene GAPDH

Tabela 3. Lista de genes selecionados para análise de expressão dos receptores e gene selecionado como *housekeeping* (normalizador).

Gene	Gene ID	Sequência sonda	Descrição gene
LDL-r	NM_000527.3	CCTGTTTCATGGCTTCATG	Receptor da lipoproteína de baixa densidade
LRP-1	NM_002332.2	CAGCTGTGAACTCTC	Receptor da proteína relacionada à LDL - 1
CD36	NM_001001548.2	TTGACCTGCAAATATC	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CD68	NM_001251.2	CTGGAGGTCCTGCATGCATGAAT	<i>Cluster of differentiation 68</i>
GAPDH	NM_002046.3	ATGAGCCCCAGCCTTC	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

3.11.2 Reações de PCR em tempo real

A expressão do RNAm dos receptores foi verificada pela técnica de PCR em tempo real através do método de detecção Taqman, que utiliza, além dos *primers*, sondas fluorescentes para permitir a detecção do produto

de PCR alvo. Por esse motivo, esse tipo de detecção é altamente específico, não necessitando padronização da reação.

As reações foram realizadas no aparelho StepOne Plus™ Real-Time PCR System da Applied Biosystems, com um volume final de 12 uL, onde foram adicionados 6 uL de Taqman Universal PCR Master Mix, 4,2 uL de água DEPC, 0,6 uL de sonda 20x do sistema Taqman (*Custom Taqman Gene Expression Assays*) e 1,2 uL cDNA (1:10). Os resultados obtidos foram analisados de acordo com o software deste equipamento.

O programa gera um gráfico de intensidade de fluorescência em função do número de ciclos de amplificação. Um limiar (*threshold*) é definido manualmente, no qual a intensidade de fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (*background*) e a curva encontra-se na fase logarítmica de amplificação. O ciclo da reação onde a fluorescência da amostra intercepta o *threshold* é chamado Ct (*cycle threshold*). A diferença entre os valores de Ct (ΔCt) entre as amostras, após normalização com genes de expressão estável, reflete sua expressão diferencial. Todas as reações foram realizadas em duplicata e foram consideradas aceitáveis reações cujo desvio padrão entre as duplicatas foi menor que 0,4 ou menor que um Ct de diferença. A expressão gênica relativa foi calculada através da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (33). O valor inferido à ΔCt equivale à diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene normalizador, onde o valor do Ct representa o ciclo do PCR em que a quantidade de fluorescência produzida na reação atinge um limite pré-estabelecido. O cálculo da fórmula $\Delta\Delta Ct$ envolve a subtração do valor de ΔCt de cada amostra incubada com

diferentes concentrações de LDE do valor de ΔCt da amostra controle, ou seja, sem a incubação com a LDE, nos diferentes tipos celulares estudados. O resultado representa o número de vezes que o gene analisado tem a sua expressão aumentada ou diminuída nas células incubadas com LDE-CO em relação às células não incubadas com LDE-CO. É importante ressaltar que foram realizados dois experimentos independentes, calculando-se a média e o erro padrão de ambos para a apresentação dos resultados.

Foi estabelecido um valor de corte de razão de expressão de $-1 > ER > 1$, indicando que valores de ER entre 1 e -1 foram considerados com expressão igual ao grupo calibrador (controle), o qual foi utilizado para determinar os valores de expressão das amostras com diferentes concentrações de LDE-CO.

3.12 Imunocitoquímica dos receptores de lipoproteínas

Após o preparo das células descritos no item 3.7, foram adicionadas as concentrações crescentes de LDE-CO (0,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos). Quatro horas depois da incubação de LDE-CO à 37°C, as células foram lavadas com PBS por 2 vezes, retiradas das placas com tripsina (células aderidas) e centrifugadas em *eppendorfs* (1,5 mL) em 1500 RPM por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 1 mL do meio de cultura para ressuspensão do *pellet* de célula. Para preparar as lâminas, as células foram centrifugadas (*cytospin 3*) em 1500 RPM por 10 min. A imunocitoquímica foi realizada para investigar a expressão dos

receptores LDL-r, CD36, CD68 e LRP-1 nos diferentes tipos celulares estudados.

Para verificar a expressão do receptor LDL-r, após fixação, seguida da reação de bloqueio com albumina bovina a 1% por 30 minutos, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-receptor humano de LDL (OncogeneTM, classe e subclasse IgG2_{ak}, clone 15C8, camundongo) na concentração de 1/30 por 18h, *overnight*, a 4°C, seguida de incubação com anticorpo secundário (LSAB) por 30 min. Após cada incubação, as células foram lavadas 4 vezes com PBS por 5 minutos. O controle positivo utilizado para esta marcação foi coronária humana com placa rota.

Para a marcação do CD36, após fixação, seguida da reação de bloqueio com albumina bovina a 1% por 30 minutos, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti CD36 humano (Serotec Product ®, isotipo IgM, clone SM0, camundongo), com título 1:50 por 18h, *overnight*, a 4°C, seguida de incubação com anticorpo secundário (LSAB) por 30 min. Após cada incubação, as lâminas foram lavadas 4 vezes com PBS por 5 minutos. O controle positivo utilizado para esta marcação foi de tecido coletado de amígdala humana.

Para verificar a presença do CD68, após fixação, seguida da reação de bloqueio com albumina bovina a 1% por 30 minutos, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti CD68 humano (DAKO ®, isotipo IgG, clone kp1, camundongo), com título 1:2500 por 18h, *overnight*, a 4°C, seguida de incubação com anticorpo secundário (LSAB) por 30 min.

Após cada incubação, as lâminas foram lavadas 4 vezes com PBS por 5 minutos. O controle positivo utilizado para esta marcação foi amígdala humana.

Para análise do LRP-1 (CD91), após fixação, seguida da reação de bloqueio com albumina bovina a 1% por 30 minutos, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-CD91a humano (Zymed, isótopo IgG₁-kappa, clone A2MRa-2, camundongo) com título 1:20 por 18h, *overnight*, a 4°C, seguida de incubação com anticorpo secundário (LSAB) por 30 min. Após cada incubação, as lâminas foram lavadas 4 vezes com PBS por 5 minutos. O controle positivo utilizado para esta marcação foi fibroblasto de linhagem de célula humana.

A revelação das marcações foi determinada utilizando-se DAB (1:50) por 2 a 10 minutos. O corte foi em seguida contra-corado com solução de hematoxilina de Harris por 30 segundos. Toda a vidraria exposta ao DAB foi cuidadosamente lavada com hipoclorito de sódio a 1%, assim como, utilizado material de proteção adequado para o seu manuseio devido ao seu caráter carcinogênico.

As lâminas foram montadas após desidratação em álcool a 70, 95 e 100%, por aproximadamente dois minutos cada, seguida de duas passagens por xileno (a primeira por um minuto e a segunda por tempo suficiente para montagem). Todos os resultados foram analisados no Leica QWin Image Analysis System (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3.13 Citometria de fluxo para análise dos receptores

Após o preparo das células descritos no item 3.7, foram adicionadas as concentrações crescentes de LDE-CO (0,15 mg/mL e 4,14 mg/mL de lípidos). Quatro horas depois da incubação de LDE-CO à 37°C, as células foram lavadas com PBS por 2 vezes, retiradas das placas com tripsina (células aderidas) e centrifugadas em *eppendorfs* (1,5 mL) em 1500 RPM por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 1 mL do meio de cultura para ressuspensão do *pellet* de célula. Para marcação dos receptores foram utilizados: o anticorpo primário monoclonal anti-receptor humano de LDL (OncogeneTM, classe e subclasse IgG2_{ak}, clone 15C8, camundongo); anticorpo primário monoclonal anti CD68 humano (DAKO®, isotipo IgG, clone kp1, camundongo); e anticorpo primário monoclonal anti CD36 humano (Serotec Product®, isotipo IgM, clone SM0, camundongo) e o anti LRP-1 (Zymed, mAb to CD91 (5A6), isotipo IgG1, camundongo) e como anticorpo secundário utilizou-se o alexiafluor. A citometria de fluxo foi realizada no sistema FACScan de citometria de fluxo (Scalibur-Becton Dickinson) e a análise no WinMDI 2.8 software, no programa *Cell-Quest*.

3.14 Citotoxicidade celular na presença de diferentes concentrações de LDE

A citotoxicidade foi avaliada com intuito de verificar a saturação celular na presença de LDE. Após o preparo das células descritos no item 3.7,

foram adicionadas as concentrações crescentes de LDE. Para avaliação do índice de sobrevivência celular na presença de LDE-CO, foram estudadas as linhagens HUVEC, fibroblasto, macrófago e H292 com a adição de 0,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL. Para avaliação do índice de sobrevivência celular na presença de LDE-CL e LDE-CL, foram estudadas as linhagens HUVEC e H292 com a adição de 0,15 mg/mL, 1,15, mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL.e Quatro horas depois da incubação com as crescentes concentrações de LDE à 37°C, as células foram lavadas com PBS por 2 vezes, retiradas das placas com tripsina e centrifugadas em *eppendorfs* (1,5 mL) em 14000 RPM por 8 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionado meio de cultura para ressuspensão do *pellet* de célula. Para análise da sensibilidade foi empregado o método MTT, segundo Mosmann, 1983.

3.15 Tamanho das partículas de LDE

O tamanho das partículas de LDE foi determinado por espalhamento de luz (*light scattering*) utilizando o equipamento *Laser Light Scattering* (ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp.). A solução resultante foi filtrada por membrana Millipore® com 0,22µ de porosidade. O diâmetro (nm) das partículas da LDE em solução foi determinado por coleta das leituras obtidas do espalhamento de luz em ângulo de 90°, sendo os resultados expressos pela média obtida de 5 leituras.

3.16 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A lipoperoxidação das diferentes preparações de LDE foi estimada pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Para isso, foi adicionado a 100 μ L de LDE, ácido tricloroacético (10%) e ácido tiobarbitúrico (0,86%). Foi realizada incubação a 100°C e 0°C por 20 minutos cada incubação. Os resultados foram obtidos a partir da leitura de absorbância a 535 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína (34).

A peroxidação lipídica das células foi analisada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. O meio de cultura sobrenadante das células foi coletado após a incubação com as diferentes concentrações de LDE. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteína (35).

3.17 Análise Estatística

Os dados estão apresentados com média $\pm$ erro padrão. As diferenças entre os dados foram avaliados utilizando o programa GraphPad Prism[®] 5.0. Os estudos de captação, competição, imunocitoquímica e citometria de fluxo foram avaliados pela análise de variância ANOVA, com testes de Bonferroni e Turkey. Valores de $P = 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 CAPTAÇÃO DE LDE-CO POR DIFERENTES TIPOS CELULARES E EXPRESSÃO DOS RECEPTORES LDL-r, LRP-1, CD36 e CD68

4.1.1 Captação de [³H]-colesterol livre e [¹⁴C]-éster de colesterol da LDE-CO por HUVEC, fibroblasto, monócito, macrófago e H292.

A figura 5 mostra a captação celular de [³H]-colesterol livre e [¹⁴C]-éster de colesterol da LDE-CO pelos diferentes tipos celulares. O monócito é a célula que capta mais colesterol livre e colesterol éster da LDE-CO e o macrófago foi o tipo celular que menos captou a LDE-CO com diferença significativa, somente, na concentração de 2,2 mg/mL de lípides de LDE-CO quando comparada à captação por fibroblasto.

(A)

(B)

Figura 5 Captação celular de ^3H -colesterol livre (A) e ^{14}C -éster de colesterol (B) da LDE-CO por monócito, fibroblasto, HUVEC, H292 e macrófago, dados obtidos da duplicata de três experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão).

* $p < 0,05$: monócito vs. as demais células

$p < 0,05$: fibroblasto vs. macrófago

4.1.2 Comparação entre a captação de [^3H]-colesterol livre e [^{14}C]-éster de colesterol da LDE-CO por HUVEC, fibroblasto, monócito, macrófago e H292

A figura 6 mostra que em todas as células o colesterol livre foi mais captado que o éster de colesterol. O Colesterol livre em HUVEC, monócito, H292 e o éster de colesterol em macrófago continuam sendo captados proporcionalmente às maiores concentrações de LDE-CO. O éster de colesterol em HUVEC e H292 e o colesterol livre em macrófago apresentam um platô de captação a partir da concentração de 1,15 mg de lípides de LDE-CO, sendo que na concentração de 5,0 mg LDE-CO a H292 tem um aumento de captação. O macrófago foi o único tipo celular que apresentou a mesma captação celular de colesterol livre e éster de colesterol na concentração de 5,0 mg de lípides de LDE-CO.

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

Figura 6. Captação de $[^3\text{H}]$ -colesterol livre e $[^{14}\text{C}]$ -éster de colesterol por (A) HUVEC, (B) fibroblasto, (C) monócito, (D) macrófago e (E) H292 nas concentrações crescentes de LDE-CO, dados obtidos da duplicata de três experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão).

4.1.3 Efeito da adição de LDL na captação de [³H]-colesterol livre em HUVEC

A figura 7 mostra que quanto maior a quantidade de LDL menor é a captação do [³H]-colesterol livre, com o índice de correlação negativo e significativo com $r^2=0,73$.

Figura 7. Efeito da LDL sobre a captação do [³H]-colesterol livre da LDE-CO em HUVEC, dados obtidos da duplicata de três experimentos independentes (média ± erro padrão).

* $p < 0,05$ concentração inicial (1,25 µg/mL de lípides de LDE) vs. concentração final (500 µg/mL de lípides de LDE).

4.1.4 Análise da expressão gênica e protéica dos receptores: LDL-r, LRP-1, CD36 e CD68 em diferentes concentrações de LDE-CO

Os resultados apresentados a seguir mostram os resultados da expressão dos receptores LDL-r, LRP-1, CD36 e CD68 após incubação por 4 horas de concentrações crescentes de LDE-CO em HUVEC, fibroblasto, monócito, macrófago e H292.

4.1.5 Expressão gênica do LDL-r nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por PCR em tempo real

Em HUVEC, na menor concentração de LDE-CO, o gene do LDL-r ficou hipoexpresso em relação ao controle e mostrou uma tendência a diminuir sua expressão na presença das maiores concentrações de LDE-CO. Em monócito, na menor concentração de LDE-CO, o gene do LDL-r apresentou-se hiperexpresso com relação ao controle, porém o aumento da concentração de LDE-CO diminuiu a expressão do receptor. Em macrófago, na menor concentração de LDE-CO, a expressão do LDL-r, ficou hipoexpresso com relação ao controle, com uma tendência a aumentar a expressão nas maiores concentrações de LDE-CO e H292 não houve diferença na expressão gênica na presença da LDE-CO.

Figura 8. Expressão do LDL-r nas diferentes células com 0 mg/mL (controle), 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO. Análise comparativa realizada somente entre as concentrações de cada célula. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão).

* $P < 0,05$ em 0 vs. 0,15; 1,15, 4,14.

$p < 0,05$ em 0,6 vs. 1,15, 4,14, 5,0

// $p < 0,05$ em 5,0 vs. 1,15 e 4,14.

4.1.6 Expressão protéica do LDL-r nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por imunocitoquímica

Os resultados estão expressos em porcentagem, considerando 100% o número total de células. Foram analisados dez campos de duas lâminas de cada concentração de LDE.

A figura 9 mostra que a expressão do LDL-r diminuiu 1,16 e 3,98 vezes nas concentrações de 4,14 e 5,0 mg/mL de lípidos, respectivamente,

em HUVEC. Em fibroblasto, a expressão do LDL-r diminuiu 2,66, 7,77 e 3,70 vezes após a adição de 0,15, 4,14 e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE, respectivamente. Em monócito, a expressão do LDL-r diminuiu 2,26, 7,13 e 6,25 vezes com a adição de 0,15, 4,14 e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE, respectivamente. Todas as análises foram comparadas ao controle (0 mg/mL). A figura 9 mostra imagens das lâminas de imunocitoquímica da proteína LDL-r

Figura 9. Expressão do receptor LDL-r nas diferentes células com 0 mg/mL (controle), 0,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO, (média $\pm$ erro padrão),.

* $p < 0,05$ em HUVEC 5,0 mg/mL vs. 0, 0,15, 4,14 mg/mL de lípidos de LDE-CO.

* $p < 0,05$ em fibroblasto e monócito 0 mg/mL vs. 0,15, 4,14 e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO

HUVEC

(A)

(B)

(C)

(D)

Fibroblasto

(A)

(B)

(C)

(D)

Monócito

(A)

(B)

(C)

(D)

Macrófago

(A)

(B)

(C)

(D)

H292

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 10. Imagens representativas das lâminas de imunocitoquímica para análise da expressão do receptor LDL-r nas diferentes células nas concentrações: (A) 0 mg/mL (B) 0,15 mg/mL (C) 4,14 mg/mL (D) 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO (40x).

4.1.7 Expressão protéica do LDL-r analisada por citometria de fluxo

Nos estudos de citometria de fluxo foram encontradas duas populações distintas com relação ao tamanho, que foram classificadas como R1: população de células grandes e R2: população de células pequenas.

4.1.7.1 Expressão protéica do LDL-r em Fibroblasto

A figura 11 mostra que na população R1 de fibroblasto houve redução da expressão do LDL-r quando adicionada 5,0 mg de lípides de LDE-CO e que na população R2 não houve alteração da expressão deste receptor.

Figura 11. Expressão do LDL-r nas populações R1 e R2 de fibroblasto. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão), * ($p < 0,05$) 4,14 mg/mL vs. 0 e 0,15 mg/mL de lípides de LDE-CO

4.1.7.2 Expressão protéica do LDL-r em Monócito

A figura 12 mostra que em monócito não houve expressão LDL-r na população R1 somente na população R2. Na população R2 não teve diferença de expressão quando foram adicionadas as concentrações crescentes de LDE-CO.

Figura 12. Expressão do LDL-r nas populações R1 e R2 de monócito. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão).

4.1.7.3 Expressão protéica do LDL-r em macrófago

A figura 13 mostra que em macrófago não houve expressão do receptor na população R1 somente na população R2. Na população R2 não teve diferença quando adicionadas as concentrações crescentes de LDE-CO.

Figura 13. Expressão do receptor LDL-r nas populações R1 e R2 de macrófago. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão).

4.1.7.4 Expressão protéica do LDL-r em H292

A figura 14 mostra que na população R1 de H292 houve redução da expressão do receptor de LDL-r quando adicionada 0,15 e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO com relação ao controle (0 mg/mL). Na população R2 houve uma redução da expressão quando adicionada 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO.

Figura 14. Expressão do receptor LDL-r nas populações R1 e R2 de H292. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão). R1: (* $p < 0,05$), 0 mg/mL vs. 0,15 e 4,14 mg/mL e (# $p < 0,05$), 0,15 mg/mL vs. 4,14 mg/mL de lípidos de LDE-CO. R2: (* $p < 0,05$), 4,14 mg/mL vs. 0 e 0,15 mg/mL de lípidos de LDE-CO.

4.1.8 Expressão gênica do receptor LRP-1 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por PCR em tempo real

Em monócito, o gene do LRP-1 mostrou-se hiperexpresso e diminuiu com as concentrações crescentes de LDE. Em macrófagos, a expressão gênica aumentou com a presença das concentrações da LDE. Em H292, a expressão gênica aumentou na presença das maiores concentrações da LDE-CO.

Figura 15. Expressão do receptor LRP-1 nas diferentes células com 0 mg/mL (controle), 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO, (média $\pm$ erro padrão).

HUVEC: (* $p < 0,05$), 1,15 mg/mL vs. as demais concentrações.

Monócito: (* $p < 0,05$), 0 vs. 4,14 e 5,0 mg/mL; 1,15 vs. 4,14 e 5,0 mg/mL

Macrófagos e H292: (* $p < 0,05$), 5,0 mg/mL vs. as demais concentrações

4.1.9 Expressão protéica do receptor LRP-1 nas diferentes concentrações de LDE-CO em HUVEC, fibroblasto, monócito, macrófago e H292

Os resultados estão expressos em porcentagem, considerando 100% o número total de células. Foram analisados dez campos de duas lâminas de cada concentração.

A figura 16 mostra que a expressão do LRP-1 em HUVEC aumentou 4,24, 5,57 e 3,57 vezes quando foi adicionada 0,15, 4,14 e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO, respectivamente, quando comparada com o controle (0 mg/mL), porém, houve uma redução de 1,56 vezes da expressão do LRP-1

com a concentração mais alta de LDE-CO (5,0 mg/mL) quando comparada à concentração de 4,14 mg de lípidos de LDE-CO. Em monócito houve uma redução de 3,15 vezes com a adição de 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO com relação ao controle. A figura 16 mostra imagens das lâminas de imunocitoquímica da proteína LRP-1.

Figura 16. Expressão do receptor LRP-1 nas diferentes células com 0 mg (controle), 0,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO, HUVEC: (* $p < 0,05$), todas as concentrações vs. 0 mg/mL de lípidos de LDE-CO e 5,0 vs. 4,14 mg/mL
Monócito: (* $p < 0,05$), 5,0 mg/mL vs. as demais concentrações de lípidos de LDE-CO

HUVEC **Fibroblasto** **Monócito** **Macrófago** **H292**

Figura 17. Imagens representativas das lâminas de imunocitoquímica para análise da expressão do LRP-1 nas diferentes células nas concentrações: (A) 0mg/mL (B) 0,15 mg/mL (C) 4,14 mg/mL (D) 5,0 mg/mL de LDE-CO (40x).

4.1.10 Expressão protéica do receptor de LRP-1 analisada por citometria de fluxo

Nos estudos de citometria de fluxo foram encontradas duas populações distintas com relação ao tamanho que foram classificadas como R1 população de grandes células e R2: população de pequenas células.

4.1.10.1 Expressão protéica do receptor de LRP-1 em fibroblasto

A figura 18 mostra que em fibroblasto a população R1 apresentou maior expressão do receptor que a população R2, porém nenhuma das populações apresentou mudança de expressão do receptor nas diferentes concentrações de LDE-CO

Figura 18. Expressão do receptor LRP-1 nas populações R1 e R2 de fibroblasto. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão).

4.1.10.2 Expressão protéica do receptor de LRP-1 em monócito

A figura 19 mostra que não há expressão do LRP-1 na população R1 e na população R2 não há diferença de expressão nas diferentes concentrações de LDE-CO

Figura 19. Expressão do receptor LRP-1 nas populações R1 e R2 de monócito. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão).

4.1.10.3 Expressão protéica do receptor de LRP-1 em macrófago

A figura 20 mostra que a população R2 apresenta maior expressão do LRP-1, porém não apresenta diferença de expressão nas diferentes concentrações da LDE-CO.

Figura 20. Expressão do receptor LRP-1 nas populações R1 e R2 de macrófago. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão).

4.1.10.4 Expressão protéica do receptor de LRP-1 em H292

A figura 21 mostra que a população R2 apresenta maior expressão do LRP-1 e nenhuma das populações apresenta mudança na expressão do receptor com as diferentes concentrações de LDE-CO

Figura 21. Expressão do receptor LRP-1 nas populações R1 e R2 de H292. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão)

4.1.11 Expressão gênica do receptor CD36 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por PCR em tempo real

Em monócito, ocorreu um aumento da expressão gênica nas concentrações crescentes de LDE-CO. A expressão gênica do CD36 nas demais células mostrou uma tendência de regulação na presença da LDE-CO, porém não apresentou diferença significativa.

Figura 22. Expressão do receptor CD36 nas diferentes células com 0 mg/mL (controle), 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO, (média $\pm$ desvio padrão).

Monócito: (* $p < 0,05$). 5,0 mg/mL vs. todas as concentrações de lípidos de LDE-CO e (# $p < 0,05$) 0 mg/mL vs. 4,14 mg/mL de lípidos de LDE-CO

4.1.12 Expressão protéica do receptor CD36 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por imunocitoquímica

A figura 23 mostra que a expressão do CD36 em HUVEC aumentou 1,85, 3,2 e 3,1 vezes quando adicionadas as concentrações 0,15, 4,14 e 5,0 mg/mL de lípides de LDE-CO comparada com o controle. Em macrófago, a expressão do CD36 diminuiu 1,51, 2,21, 4,34 vezes quando adicionada 0,15 4,14 e 5,0 mg/mL de lípides de LDE-CO, respectivamente, quando comparada com o controle. Em H292, a expressão do CD36 reduziu 1,21, 3,85 e 2,94 vezes quando adicionada 0,15, 4,14 e 5,0 mg/mL de lípides de LDE-CO comparada com o controle. As demais células não apresentaram diferença significativa. A figura 23 mostra imagens das lâminas de imunocitoquímica da proteína CD36.

Figura 23 Expressão do receptor CD36 nas diferentes células com 0 mg/mL, 0,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípides de LDE-CO. Dados obtidos de 2 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão). Análise realizada entre cada tipo celular (* $p < 0,05$). Controle (0 mg/mL) comparado com as demais concentrações

HUVEC

(A)

(B)

(C)

(D)

Fibroblasto

(A)

(B)

(C)

(D)

Monócito

(A)

(B)

(C)

(D)

Macrófago

(A)

(B)

(C)

(D)

H292

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 24 Imagens das lâminas de imunocitoquímica para análise da expressão do receptor CD36 nas diferentes células nas concentrações: (A) 0mg/mL (B) 0,15 mg/mL (C) 4,14 mg/mL (D) 5,0 mg/mL de LDE-CO (40x).

4.1.13 Expressão protéica do receptor CD36 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por citometria de fluxo

Os estudos de citometria de fluxo foram encontradas duas populações distintas com relação ao tamanho que foram classificadas como R1 população de grandes células e R2: população de pequenas células.

4.1.13.1 Expressão protéica do receptor CD36 em fibroblasto

A figura 25 mostra que na população R1 há uma redução da expressão do CD36 na presença das concentrações crescente de LDE-CO e na população R2 ocorre um aumento da expressão do CD36 concentrações nas crescentes de LDE-CO.

Figura 25. Expressão do receptor CD36 nas populações R1 e R2 de fibroblasto. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão). R1 e R2: * ($p < 0,05$), 0 mg/mL vs 0,15 e 4,14 mg/mL.

4.1.13.2 Expressão protéica do receptor CD36 em monócito

A figura 26 mostra que a população R1 não expressa o CD36, e que na população R2 não há diferença de expressão quando adicionada as concentrações crescentes de LDE-CO.

Figura 26. Expressão do receptor CD36 nas populações R1 e R2 de monócito. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão).

4.1.13.3 Expressão protéica do receptor CD36 em macrófago

A figura 27 mostra que a população R1 não apresenta expressão do CD36 e na população R2 não há diferença de expressão do CD36 quando adicionada as concentrações crescentes de LDE-CO

Figura 27. Expressão do receptor CD36 nas populações R1 e R2 de macrófago. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão).

4.1.13.4 Expressão protéica do receptor CD36 em H292

A figura 28 mostra que a população R2 tem maior expressão do CD36. Na população R1 a expressão do CD36 foi maior na concentração de 4,14 mg/mL de lípides de LDE-CO que na concentração de 0,15 mg/mL. Na população R2 ocorre uma queda e depois um aumento na expressão do CD36.

Figura 28. Expressão do receptor CD36 nas populações R1 e R2 de H292. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão), R1: * (p<0,05), 4,14 mg/mL vs 0 e 0,15 mg/mL; R2: * (p<0,05), 0,15 mg/mL vs 0 e 4,14 mg/mL.

4.1.14 Expressão gênica do receptor CD68 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por PCR em tempo real

A expressão gênica do CD68 em monócito aumentou até a concentraçõess de 4,14 mg/mL de LDE-CO e em macrófago, houve um aumento da expressão gênica na maior concentração de LDE-CO

Figura 29. Expressão do receptor CD68 nas diferentes células com 0 mg/mL (controle), 0,15 mg/mL, 1,15 mg/mL, 4,14 mg/mL e 5,0 mg/mL de lípidos de LDE-CO, (média $\pm$ desvio padrão).

Em monócito: * $P < 0,05$, 4,14 vs 0 e 0,15 mg/mL

Em macrófago: * $P < 0,05$, 5,0 vs 0, 0,15, 1,15 e 4,14 mg/mL

4.1.15 Expressão protéica do receptor CD68 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por imunocitoquímica

A figura 30 mostra que em H292 a expressão do CD68 aumentou 1,83 e 2,09 vezes com adição de 4,14 e 5,0 mg/mL de lípides de LDE-CO quando comparado ao controle (0 mg/mL). As demais células não mostraram diferença com as concentrações crescentes de LDE-CO. A figura 30 mostra as Imagens das lâminas de imunocitoquímica da proteína CD68.

Figura 30 Expressão do receptor CD68 nas diferentes células com 0, 0,15, 4,14, e 5,0 mg/mL de lípides de LDE-CO. Dados obtidos de dois experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão), * $p < 0,05$.

HUVEC

(A) (B) (C) (D)

Fibroblasto

(A) (B) (C) (D)

Monócito

(A) (B) (C) (D)

Macrófago

(A) (B) (C) (D)

H292

(A) (B) (C) (D)

Figura 31. Imagens das lâminas de imunocitoquímica para análise da expressão do receptor CD68 nas diferentes células nas concentrações: (A) 0mg (B) 0,15 mg/mL (C) 4,14 mg/mL (D) 5,0 mg/mL de LDE-CO (40x).

4.1.16 Expressão protéica do receptor CD36 nas diferentes concentrações de LDE-CO analisada por citometria de fluxo

Os estudos de citometria de fluxo foram encontradas duas populações distintas com relação ao tamanho que foram classificadas como R1 população de grandes células e R2: população de pequenas células.

4.1.16.1 Expressão protéica do receptor CD68 em fibroblasto

A figura 32 mostra que a população R1 expressa o receptor CD68 e na população R2 não há diferença com a adição das concentrações crescentes de LDE-CO.

Figura 32. Expressão do receptor CD68 nas populações R1 e R2 de fibroblasto. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão).

4.1.16.2 Expressão protéica do receptor CD68 em monócito

A figura 33 mostra que a população R1 expressa o receptor CD68 e na população R2 não há diferença com a adição das concentrações crescentes de LDE-CO.

Figura 33. Expressão do receptor CD68 nas populações R1 e R2 de monócito. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão).

4.1.16.3 Expressão protéica do receptor CD68 em macrófago

A figura 34 mostra a população R1 não apresenta expressão do CD68 e na população R2 não houve diferença de expressão do CD68 nas diferentes concentrações de LDE-CO.

Figura 34. Expressão do receptor CD68 nas populações R1 e R2 de macrófago. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão).

4.1.16.4 Expressão protéica do receptor CD68 em H292

A figura 35 mostra que a expressão do CD68 foi maior na população R2 e não houve diferença de expressão nas diferentes concentrações de LDE-CO.

Figura 35. Expressão do receptor CD68 nas populações R1 e R2 de H292. As comparações foram realizadas entre as concentrações de cada população. Dados obtidos da duplicata de dois experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão).

4.1.17 Citotoxicidade celular na presença de diferentes concentrações de LDE-CO

Os ensaios de citotoxicidade realizados nos tipos celulares estudado podem ser visualizados na figura 36. O Fibroblasto foi o tipo celular que apresentou maior índice de sobrevivência na presença da LDE-CO.

Figura 36. Foram realizados três ensaios em triplicata para cada tipo celular. As concentrações utilizadas de LDE-CO foram 0,15 mg/mL, 14,4 mg/mL e 5,0 mg/mL.

4.2 MODIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA NANOEMULSÃO (LDE-CO)

Para a modificação de LDE-CO, o éster de colesterol (oleato de colesterol) foi substituído por linoleato de colesterol (LDE-CL) e estearato de colesterol (LDE-CE). Foram avaliados os parâmetros físico-químicos ao longo de 237 dias de observação, captação celular das nanoemulsões, peroxidação lipídica celular e índice de sobrevivência da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE.

4.2.1 Tamanho e polidispersão da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237 dias

A figura 37 (A) mostra que LDE-CE apresentou maior tamanho com relação às outras LDEs e a LDE-CO mostrou menor tamanho que a LDE-CL e LDE-CE até 74 dias e a partir deste dia passou a aumentar. A figura x (B) mostra que a LDE-CO apresentou maior polidispersão que a LDE-CL e LDE-CE, além de uma variação mínima ao longo do tempo. A polidispersão da LDE-CL foi menor desde as primeiras análises e apresentou algumas variações ao longo da observação, ao contrário da polidispersão da LDE-CE que reduziu abruptamente até o dia 148, e apresentou um leve aumento nos sucessivos dias.

(A)

(B)

Figura 37. (A) Tamanho da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237 dias. Dados da média de duas análises (B) Polidispersão da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237 dias. Dados da média de duas análises

4.2.2 Potencial hidrogeniônico da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237 dias

Nas três LDEs o pH reduziu, sendo que o pH da LDE-CE permaneceu mais alto ao longo do tempo comparando com a LDE-CO e LDE-CL.

Figura 38. pH da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237 dias. Dados da média de duas análises

4.2.3 Peroxidação lipídica da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237 dias

A LDE-CO não apresentou variação de peroxidação lipídica ao longo do tempo, além de ter apresentado menor oxidação. A oxidação da LDE-CL foi maior que da LDE-CO, seguida pela LDE-CE.

Figura 39. Peroxidação lipídica da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE ao longo de 237. Dados da média de duas análises

4.2.4 Captação de concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE por HUVEC

A figura 40 mostra que a captação de LDE-CO por HUVEC foi maior que LDE-CL e LDE-CE, uma diferença que aparece a partir da concentração de 0,15 mg/mL das nanoemulsões e diminui na concentração de 4,14 mg/mL quando ocorre, aparentemente, um *plateau* de captação de LDE-CO.

Figura 40 Captação de $[^{14}\text{C}]$ -éster de colesterol por HUVEC nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

4.2.5 Captação de concentrações crescentes LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE por fibroblasto

A figura 41 mostra que a captação da LDE-CO por fibroblasto é maior que da LDE-CE e LDE-CL. E a captação da LDE-CE foi crescente até a concentração de 5,0 mg/mL onde ocorreu uma queda.

Figura 41 Captação de [^{14}C]-éster de colesterol por fibroblasto nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

4.2.6 Captação de concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE por monócito

A figura 42 mostra que a captação das três nanoemulsões foi semelhante até a concentração de 2,2 mg/mL, e nas concentrações seguintes a captação de LDE-CO foi menor que a captação das outras duas nanoemulsões.

Figura 42 Captação de [^{14}C]-éster de colesterol por monócito nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

4.2.7 Captação de crescentes concentrações de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE em macrófago

A figura 43 mostra a captação da LDE-CO e LDE-CL foi muito pequena em todas as concentrações de lípides, enquanto a captação da LDE-CE foi continuamente aumentando conforme as concentrações da nanoemulsão.

Figura 43 Captação de [^{14}C]-éster de colesterol por macrófago nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

4.2.8 Captação de concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE em H292

A figura 44 mostra que, em H292, a captação de LDE-CO foi maior as outras nanoemulsões e crescente até a concentração de 4,14 mg/mL de lípidos com queda na captação da LDE-CE.

Figura 44. Captação de [^{14}C]-éster de colesterol por H292 nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

4.2.9 Peroxidação lipídica em HUVEC na presença da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE

Figura 45 Lipoperoxidação em HUVEC nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL, LDE-CE. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

4.2.10 Peroxidação lipídica em fibroblasto na presença da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE

A figura 46 mostra a peroxidação lipídica em fibroblasto foi mínima nas presença das concentrações crescentes de LDE-CO e mais pronunciada na presença das concentrações crescentes de LDE-CE e, principalmente, de LDE-CL

Figura 46. Lipoperoxidação em fibroblasto nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

4.2.11 Peroxidação lipídica em monócito na presença da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE

A figura 47 mostra a peroxidação lipídica em monócito foi mínima não somente na presença das concentrações crescentes de LDE-CO mas também de LDE-CE.

Figura 47. Lipoperoxidação em monócito nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

4.2.12 Peroxidação lipídica em macrófago na presença da LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE

A figura 48 mostra a peroxidação lipídica em macrófago foi maior na presença das concentrações crescentes de LDE-CO seguida da LDE-CL e LDE-CE.

Figura 48. Peroxidação lipídica em macrófago nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

4.2.13 Peroxidação lipídica em H292 na presença da LDE-CO, LDE-CL E LDE-CE

A figura 49 mostra que a peroxidação lipídica, em H292, na presença das concentrações crescentes de LDE-CO, apresentou mínima variação, e com LDE-CL a peroxidação lipídica aumentou a partir da concentração 2,2 mg/mL de lípidos.

Figura 49. Peroxidação lipídica em H292 nas concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

4.2.14 Captação de colesterol livre e éster de colesterol da LDE-CL

A figura 50 mostra que o monócito foi o tipo celular que mais captou tanto colesterol livre quanto o éster de colesterol e o macrófago que menos captou. Além disso, o colesterol livre é mais captado que o éster de colesterol por todas as células.

(A)

(B)

Figura 50. Captação de (A) $[^3\text{H}]$ -colesterol livre e (B) $[^{14}\text{C}]$ -éster de colesterol da LDE-CL por HUVEC, fibroblasto, monócito, macrófago e H292. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

4.2.15 Captação de colesterol livre e éster de colesterol da LDE-CL

A figura 51 (A) mostra que o macrófago captou mais colesterol livre da LDE-CE após a concentração de 4,14 mg/mL de lípidos e o (B) monócito capta mais éster de colesterol e a HUVEC e a H292 foram as células que menos captaram colesterol livre (A) e éster de colesterol (B).

(A)

(B)

Figura 51. Captação de $[^3\text{H}]$ -colesterol livre e $[^{14}\text{C}]$ -éster de colesterol da LDE-CE por HUVEC, fibroblasto, monócito, macrófago e H292. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

4.2.16 Citotoxicidade celular na presença de diferentes concentrações de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE

A figura 52 mostra (A) em HUVEC, maior taxa de sobrevivência com LDE-CE e menor taxa com LDE-CE. Em H292 (B), a taxa de sobrevivência foi maior com a incubação de LDE-CE, principalmente, nas maiores concentrações

(A)

(B)

Figura 52. Índice de sobrevivência celular após a adição de concentrações crescentes de LDE-CO, LDE-CL e LDE-CE em (A) HUVEC e (B) H292. Resultados da média de três experimentos realizados em duplicata.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A LDE-CO é utilizada para vários estudos de metabolismo de LDL e veiculação de fármacos para doenças proliferativas. Tem sido observado, que tanto a LDL natural como a nanopartícula artificial LDE-CO são captadas pelo LDL-r (22-24). No entanto, além do LDL-r e LRP-1, os receptores *scavenger* da classe A, como o SR-A e os da classe B, como CD36 e SR-B1 também podem desempenhar um papel na captação da LDL (11) e o mesmo pode ocorrer com LDE-CO. Neste estudo o ensaio de competição entre LDL e LDE revelou que a remoção da LDE pode estar sendo realizada pelos mesmos receptores da LDL natural. Sabe-se que a presença e a expressão de receptores variam de acordo com o tipo e função celular (36), neste trabalho todas as células estudadas apresentaram expressão do LDL-r, LRP-1, CD36 e CD68, porém com grande variação de resposta na presença de LDE-CO.

O colesterol livre e o éster de colesterol foram mais captados por monócito que pelas demais células estudadas, considerando que esta linhagem é de origem leucêmica e por isso alta expressão do LDL-r. Além disso, a expressão gênica e protéica do LDL-r é alta, além de sofrerem uma redução com a adição concentrações crescentes de LDE-CO. Em macrófago, a captação do colesterol livre e do éster de colesterol da LDE-CO é baixa em relação as demais células, além da expressão do gene e da proteína do LDL-r não terem sofrido nenhuma regulação na presença da LDE-CO. Os resultados deste estudo concordam o trabalho de Noriyasi,

1998, que mostrou, depois da diferenciação dos monócitos por PMA, a diminuição da expressão do LDL-r. Tem sido documentado, que monócitos (THP-1) exibem receptores de LDL que desaparecem quando são diferenciados em resposta a presença de PMA. Os receptores *scavenger* aparecem nas células diferenciadas concomitante à perda dos receptores de LDL (30). Foi observado que os macrófagos apresentaram uma captação crescente de éster de colesterol, sendo que na última concentração de LDE-CO, a captação de livre e de éster de colesterol foi a mesma, diferindo das demais células estudadas. Este resultado pode ser explicado pela habilidade dos macrófagos em estocar éster de colesterol na presença de LDL ou LDL modificada (37)

Em todas as células, a LDE-CO foi capaz de regular a expressão gênica e/ou protéica do LDL-r. Estes resultados sugerem que o LDL-r participa ativamente da captação da LDE-CO.

A captação hepática de lipoproteínas remanescentes ricas em triacilglicerol é mediada pela apoE, a qual é facilitada pela via direta do LDL-r e pelo LRP-1 por endocitose (38-39). A expressão gênica e protéica do LRP-1, em monócito, mostrou uma diminuição dose-resposta dependente nas concentrações crescentes de LDE-CO. Em macrófago, houve um aumento da expressão gênica sem alteração da expressão protéica, esta baixa evidencia da ação do LRP-1 em macrófago discorda de estudos que mostram que expressão da apoE aumenta quando diferenciado pelo PMA, além de aumentar a expressão do LRP-1 (16). Na circulação, a LDE adquirir apoE (23) e o LRP-1 é um ligante para apoE (36), isto explica a regulação do

LRP-1 na presença da LDE-CO como observado, principalmente, em HUVEC e monócito.

Em HUVEC, a presença de LDE-CO aumentou a expressão protéica, porém a expressão gênica não alterou. Em monócito, a expressão gênica do CD36 aumentou sem diferença na expressão protéica deste receptor. Em macrófago e H292, a expressão protéica do CD36 diminuiu nas concentrações crescentes de LDE-CO.

A expressão gênica do receptor CD68, em macrófago, aumentou sem alteração na expressão protéica deste receptor, com a adição das concentrações crescentes de LDE-CO. Os resultados sugerem que o CD68 não participa da captação da LDE nas demais linhagens. Mesmo com as diferenças na expressão dos receptores entre as linhagens celulares, a captação do colesterol livre foi maior que de éster de colesterol em todas as linhagens.

Estudos anteriores mostraram que em fibroblastos quiescentes humanos a taxa de endocitose mediada por receptor de lipoproteínas intactas foi pequena, mas o colesterol livre da LDL foi rapidamente internalizado (40). A diferença de captação do colesterol livre e do éster de colesterol da LDE-CO pode ser explicada pelo trabalho de Rhainds, (1999) que descreveu que a captação do colesterol livre possa estar relacionada à cavéola, uma estrutura da membrana plasmática abundante em adipócitos, fibroblastos e músculo liso (11).

A HUVEC apresentou uma captação crescente de éster de colesterol da LDE-CO até a concentração de 1,15 mg/mL, isso pode ser explicado por

um mecanismo possivelmente específico para o endotélio vascular, a inibição por contato das células confluentes é associado a um bloqueio quase completo da interiorização LDL e degradação da superfície de ligação da LDL (40). Com relação à captação de LDE-CO e sobrevivência celular, observou-se que o fibroblasto foi o 2º tipo celular que mais captou os lípidos da LDE-CO e a célula que apresentou maior sobrevivência nas concentrações crescente de LDE-CO. Sendo assim, é possível sugerir que a morte celular não está diretamente relacionada à presença de LDE-CO, mas pode estar relacionada à sensibilidade celular à presença de lípidos. Além disso, os resultados de sobrevivência, captação e análise da expressão dos receptores mostram uma importante variação do comportamento celular na presença da LDE-CO.

Com a finalidade de investigar os efeitos da modificação da LDE-CO, trocou-se o éster de colesterol desta nanoemulsão para ésteres de colesterol com diferentes graus de saturação, o linoleato de colesterol (18:2) (LDE-CL); estearato de colesterol (18:0) (LDE-CE).

Nos estudos de estabilidade das nanoemulsões, a LDE-CE apresentou o maior tamanho de partícula com uma pronunciada variação ao longo dos 237 dias de estudo. Por outro lado, as partículas da LDE-CO e LDE-CL apresentaram o menor tamanho, mas o tamanho da LDE-CO aumentou ao longo do período de observação. A polidispersão das partículas da LDE-CE tendeu a diminuir ao longo do tempo, enquanto a polidispersão da LDE-CO e LDE-CL não mudaram. Durante os 237 dias de observação, o pH das nanoemulsões tiveram uma tendência a diminuir.

Contudo, a queda no pH da LDE-CE foi menor que a LDE-CO e LDE-CL. A peroxidação lipídica do LDE-CL inicialmente foi maior que as demais, mas a LDE-CE apresentou um pronunciado aumento da peroxidação lipídica ao longo do tempo de observação. A LDE-CO apresentou menor peroxidação lipídica e sem modificações ao longo do tempo.

No trabalho de D. Zapolska-Downar (2005) onde foram analisados os efeitos do ácido elaídico (18:1) (monoinsaturado), um isômero do ácido oléico, e ácido linoelaídico (18:2) (poliinsaturado) sobre a HUVEC, foi observado que o ácido linoelaídico é um potente indutor da produção das espécies reativas de oxigênio, mais potente que o ácido elaídico (41). Nos resultados da peroxidação lipídica celular as células apresentaram maior oxidação na presença de LDE-CL quando comparada à presença de LDE-CO e LDE-CE.

Nos resultados de captação de colesterol livre e éster de colesterol da LDE-oleato, LDE-linoleato e LDE-estearato por todas as células estudadas a captação de colesterol livre foi maior que a captação de éster de colesterol. Em estudos anteriores, uma nanoemulsão com dupla-ligação foi injetada em pacientes com doença arterial coronariana, a análise plasmática mostrou mais éster de colesterol que colesterol livre, e nos fragmentos da artéria radial, femoral, aorta e veia safena a captação de colesterol livre foi maior que éster de colesterol (42-43). Em animais com indução de dislipidemia e aterosclerose enquanto a remoção do colesterol livre do plasma foi maior que de éster de colesterol, a captação de colesterol livre pelo fígado foi maior que de éster de colesterol (44). Estes resultados indicam que a forma

livre do colesterol possa ter uma segunda via de internalização celular, baseada na dissociação deste componente das partículas da LDE e um segundo mecanismo de captação, por via não específica (42, 44). Outra explicação para este fenômeno de maior captação de colesterol livre é o fato que a acil COA acetiltransferase (ACAT) sintetizada no retículo endoplasmático das células é ativada pelo colesterol, promovendo a formação de éster de colesterol, principalmente oleato de colesterol. O acúmulo de colesterol intracelular eventualmente inibe a renovação dos receptores de LDL na superfície celular, através disso bloqueando a captação e acumulação de colesterol. Tanto a nanoemulsão mimetiza a lipoproteína natural que este fenômeno também ocorre em lipoproteínas nativas (44).

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A captação da LDE marcada radioativamente foi acentuadamente maior na linhagem de células monocíticas humanas, que tem origem leucêmica. Nas demais linhagens, tanto as não-tumorais, como os fibroblastos e HUVEC quanto na linhagem tumoral H292 a captação foi aproximadamente igual.

- A captação celular do colesterol livre foi maior do que a do éster de colesterol em todas as linhagens estudadas, sugerindo que o colesterol livre possa dissociar-se da LDE e ser captado pelas células por vias não-específicas.

-A LDE compete com a LDL pela captação por HUVEC, indicando que a preparação artificial é captada pelos mesmos mecanismos celulares que captam a LDL natural.

-A LDE foi capaz de inibir a expressão protéica dos receptores LDL em HUVEC, monócito e fibroblasto e a expressão gênica em monócito e HUVEC.

-A LDE induziu aumento da expressão protéica dos receptores LRP-1 em HUVEC e a inibiu em monócito, além de aumentar a expressão gênica em HUVEC, macrófago e H292.

-A LDE foi capaz de inibir a expressão protéica dos receptores CD36 em macrófago e H292 e a aumentou em HUVEC e monócito.

-A LDE foi capaz de aumentar a expressão protéica do CD68 em H292 e aumentou a expressão gênica em monócito e macrófago.

-A linhagem celular que apresentou maior taxa de sobrevivência na presença da LDE foi o fibroblasto.

-A composição da LDE com oleato de colesterol foi a que apresentou características mais favoráveis em termos de tamanho de partículas e susceptibilidade à peroxidação.

Os dados obtidos neste trabalho ajudam na compreensão dos mecanismos de captação e da influência da composição na estabilidade e adequação do sistema LDE e outros similares às suas potenciais aplicações terapêuticas ou diagnósticas.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol*. 2004 Nov 1;10(21):3081-7.
2. Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science*. 1976 Jan 16;191(4223):150-4.
3. Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol*. 1985;1:1-39.
4. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1125-31.
5. Mosig S, Rennert K, Buttner P, Krause S, Lutjohann D, Soufi M, et al. Monocytes of patients with familial hypercholesterolemia show alterations in cholesterol metabolism. *BMC Med Genomics*. 2008;1:60.
6. Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Jul;76(7):3330-7.
7. Linton MF, Fazio S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Dec;27 Suppl 3:S35-40.
8. Young SG. Recent progress in understanding apolipoprotein B. *Circulation*. 1990 Nov;82(5):1574-94.
9. Kong WJ, Liu J, Jiang JD. Human low-density lipoprotein receptor gene and its regulation. *J Mol Med*. 2006 Jan;84(1):29-36.
10. Chung NS, Wasan KM. Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004 May 7;56(9):1315-34.
11. Rhainds D, Brissette L. Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholesteryl ester selective uptake. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Sep;31(9):915-31.
12. Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest*. 2001 Sep;108(6):779-84.
13. Dedieu S, Langlois B. LRP-1: a new modulator of cytoskeleton dynamics and adhesive complex turnover in cancer cells. *Cell Adh Migr*. 2008 Apr;2(2):77-80.
14. Hiltunen TP, Yla-Herttuala S. Expression of lipoprotein receptors in atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. 1998 Apr;137 Suppl:S81-8.
15. Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation*. 2000 Jul 4;102(1):82-7.
16. Nishimura N, Harada-Shiba M, Tajima S, Sugano R, Yamamura T, Qiang QZ, et al. Acquisition of secretion of transforming growth factor-beta 1 leads to autonomous suppression of scavenger receptor activity in a monocyte-macrophage cell line, THP-1. *J Biol Chem*. 1998 Jan 16;273(3):1562-7.
17. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):801-9.

18. Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Aug;26(8):1702-11.
19. Chnari E, Nikitzuk JS, Wang J, Uhrich KE, Moghe PV. Engineered polymeric nanoparticles for receptor-targeted blockage of oxidized low density lipoprotein uptake and atherogenesis in macrophages. *Biomacromolecules.* 2006 Jun;7(6):1796-805.
20. Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2007 Aug 1;75(3):468-77.
21. Mosley ST, Goldstein JL, Brown MS, Falck JR, Anderson RG. Targeted killing of cultured cells by receptor-dependent photosensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Sep;78(9):5717-21.
22. Glickson JD, Lund-Katz S, Zhou R, Choi H, Chen IW, Li H, et al. Lipoprotein nanoplatform for targeted delivery of diagnostic and therapeutic agents. *Mol Imaging.* 2008 Mar-Apr;7(2):101-10.
23. Maranhao RC, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids.* 1993 Aug;28(8):691-6.
24. Hirata RD, Hirata MH, Mesquita CH, Cesar TB, Maranhao RC. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jan 29;1437(1):53-62.
25. Maranhao RC, Roland IA, Toffoletto O, Ramires JA, Goncalves RP, Mesquita CH, et al. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids.* 1997 Jun;32(6):627-33.
26. Dias ML, Carvalho JP, Rodrigues DG, Graziani SR, Maranhao RC. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007 Jan;59(1):105-11.
27. Azevedo CH, Carvalho JP, Valduga CJ, Maranhao RC. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2005 Apr;97(1):178-82.
28. Maranhao RC, Tavares ER, Padoveze AF, Valduga CJ, Rodrigues DG, Pereira MD. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis.* 2008 Apr;197(2):959-66.
29. Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. *JAMA.* 1990 Dec 19;264(23):3047-52.
30. Banka CL, Black AS, Dyer CA, Curtiss LK. THP-1 cells form foam cells in response to coculture with lipoproteins but not platelets. *J Lipid Res.* 1991 Jan;32(1):35-43.
31. Valduga CJ, Fernandes DC, Lo Prete AC, Azevedo CH, Rodrigues DG, Maranhao RC. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J Pharm Pharmacol.* 2003 Dec;55(12):1615-22.
32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

33. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
34. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giamberardino MA, Cuccurullo F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2001 Aug 1;31(3):331-5.
35. Fuhrman B, Judith O, Keidar S, Ben-Yaish L, Kaplan M, Aviram M. Increased uptake of LDL by oxidized macrophages is the result of an initial enhanced LDL receptor activity and of a further progressive oxidation of LDL. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(1):34-46.
36. de Winther MP, van Dijk KW, Havekes LM, Hofker MH. Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Feb;20(2):290-7.
37. Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS, Edwards PA. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Apr;77(4):2214-8.
38. Lambert MS, Avella MA, Berhane Y, Shervill E, Botham KM. The fatty acid composition of chylomicron remnants influences their binding and internalization by isolated hepatocytes. *Eur J Biochem*. 2001 Jul;268(14):3983-92.
39. Zheng X, Rivabene R, Cavallari C, Napolitano M, Avella M, Bravo E, et al. The effects of chylomicron remnants enriched in n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on the transcription of genes regulating their uptake and metabolism by the liver: influence of cellular oxidative state. *Free Radic Biol Med*. 2002 Jun 1;32(11):1123-31.
40. Fielding CJ, Vlodavsky I, Fielding PE, Gospodarowicz D. Characteristics of chylomicron binding and lipid uptake by endothelial cells in culture. *J Biol Chem*. 1979 Sep 25;254(18):8861-8.
41. Zapolska-Downar D, Kosmider A, Naruszewicz M. Trans fatty acids induce apoptosis in human endothelial cells. *J Physiol Pharmacol*. 2005 Dec;56(4):611-25.
42. Couto RD, Dallan LA, Lisboa LA, Mesquita CH, Vinagre CG, Maranhao RC. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. *Lipids*. 2007 May;42(5):411-8.
43. Santos RD, Hueb W, Oliveira AA, Ramires JA, Maranhao RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in subjects with or without coronary artery disease. *J Lipid Res*. 2003 Mar;44(3):464-9.
44. Padoveze AF, Maniero F, Oliveira TV, Vitorio TS, Couto RD, Maranhao RC. Effect of a cholesterol-rich diet on the metabolism of the free and esterified cholesterol components of a nanoemulsion that resembles LDL in rabbits. *Braz J Med Biol Res*. 2009 Feb;42(2):172-8.

ANEXOS

Figuras representativas dos diagramas de citometria de fluxo com as duas populações descritas nesta tese

Morfologia de Macrófago

Morfologia de Monócito

Morfologia de H292

Morfologia de Fibroblasto