UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Análises Clínicas

Estudo da interação de peptídeos mimotopos da LDL
eletronegativa com células endoteliais e macrófagos

Gustavo Luis Tripodi

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulcineia S. P. Abdalla

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Análises Clínicas

Estudo da interação de peptídeos mimotopos da LDL
eletronegativa com células endoteliais e macrófagos

Gustavo Luis Tripodi

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Tripodi, Gustavo Luis
T835e Estudo da interação de peptídeos mimotopos da LDL eletronegativa
com células endoteliais e macrófagos / Gustavo Luis Tripodi.
-- São Paulo, 2016.
106p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

I. Patologia fisiológica I. T. II. Abdalla, Dulcineia Saes
Parra, orientador.

616.07 CDD

Gustavo Luis Tripodi

**Estudo da interação de peptídeos mimotopos da LDL
eletronegativa com células endoteliais e macrófagos**

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre.

Orientador/presidente

Prof^a. Dr^a. Dulcineia S. P. Abdalla

Profa. Dra. Flávia Carla Meotti

Profa. Dra. Cristiane Damas Gil

São Paulo, ____ de _____ de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que transitaram por este período da minha vida, e que vida foi essa, por tempo determinado ou não. Pois teve gente que veio só pra me testar mesmo, teve gente que veio, foi e veio de novo. Mas agradeço mesmo assim.

Agradeço aos meninos (e menina) da república, que mais parece um bando de filósofos discutindo de madrugada o futuro do mundo, mas também roubando meu nescau. Mas é por esses momentos lúdicos que eu agradeço. Obrigado Felipe, Cassio, Mari e Erick (primeira geração) e Rafael e Guilherme (segunda geração). Uma família tradicional brasileira (*sqn*).

Obrigado aos meus pais que até hoje não entenderam o que eu estou fazendo e o motivo de eu não tentar a iniciativa privada, mas todo pós-graduando deve enfrentar esse problema. Obrigado Sueli e Mauricio. Agradeço a minha vó Neide por aturar as brincadeiras, pois mesmo ela tendo mais de 80 anos ainda jogo almofada nela.

Existem amigos que não estão sempre presentes fisicamente, mas o sentimento não muda, obrigado Stefani e agora é sua vez de entrar no mestrado ok? Obrigado ao alemão mais brasileiro de todos, Julius. E Evelin, “tamo junto” como os mais ferrados, sempre.

Aos meus amigos de laboratório e amigos de laboratório vizinho, pois a bioquímica não é grande o suficiente para tanto amor junto. Obrigado pelas broncas Marcela! Eu sei que sou bagunceiro, mas juro que tento me organizar. Soraya e Jaqueline companheiras inseparáveis do bandeirão. E poderei terminar o doutorado (espero que em breve) e serei sempre o mestrando para o Walter. Obrigado por me aturar (e alimentar) Silene, Maysa, Maryana e Marcela. Felipe, provavelmente será o primeiro brasileiro ganhador do prêmio Nobel, sim, já desisti da nossa aposta, dá muito trabalho.

Mesmo estando longe, 9304 km aproximadamente, seria leviano da minha parte se não agradecesse a Martina, sem ela eu não estaria aqui (literalmente não estaria).

Obrigado mesmo pela oportunidade Dulcineia, pois sem ela não seria quem eu sou hoje, e olha, eu gosto bastante de quem me tornei, agradeço imensamente por esses anos da minha vida no seu grupo de pesquisa, pelos puxões de orelha e paciência comigo e meus textos hemorrágicos.

Agradeço a FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro para a execução deste projeto e pelo auxílio mensal por meio de bolsas.

Um acontecimento é nada mais do que um ponto de quatro coordenadas no plano espaço-tempo. Espero que existam muitos pontos na vida de cada um de vocês e que eu tenha sido um deles.

.....

Obrigado

"Imagine um astronauta em órbita lunar fazendo o gato girar em volta da própria cabeça, numa cápsula espacial. (Sim, sei que uma cápsula espacial não é o local adequado para se girar gatos; seja compreensivo.) O gato gira periodicamente em torno do astronauta, o astronauta gira periodicamente em torno da lua, a Lua gira em torno da Terra, a Terra em torno do Sol, e o Sol faz sua revolução em torno do centro da galáxia. São cinco movimentos periódicos superpostos."

(Será que Deus joga dados? – Ian Stewart)

Resumo: TRIPODI, G. L. Estudo da interação de peptídeos mimotopos da LDL eletronegativa com células endoteliais e macrófagos. 2016. 106f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Introdução: Dentre as diversas formas modificadas da lipoproteína de baixa densidade (LDL), a LDL eletronegativa, LDL (-), contribui para o processo aterosclerótico, promovendo o recrutamento leucocitário para a intima arterial e modulando a resposta inflamatória. Mimotopos são moléculas que podem se ligar à porção variável de um anticorpo, a enzimas ou a receptores. Os peptídeos mimotopos da LDL (-) são moléculas capazes de mimetizar a conformação de epítomos expostos apenas quando a LDL sofre modificações *in vivo*. **Objetivo:** Avaliar os efeitos de peptídeos mimotopos da LDL(-), previamente selecionados pela técnica de *phage display* e denominados p1A3 e p2C7, em células endoteliais e macrófagos. **Metodologia:** Avaliou-se a atividade dos peptídeos mimotopos sobre a expressão de RNAm de genes relacionados tanto à ativação quanto à disfunção endotelial, assim como a atividade citotóxica e a captação dos peptídeos por células endoteliais (HUVEC, HAEC e EA.Hy 926). Verificou-se também a atividade pró-inflamatória dos peptídeos em cultura primária de macrófagos murinos derivados da medula óssea (BMDM), investigando-se a ativação do complexo proteico inflamassoma, assim como a internalização dos peptídeos por essas células, utilizando citometria de fluxo e microscopia confocal. **Resultados:** As células endoteliais e os macrófagos internalizaram os peptídeos mimotopos p1A3 e p2C7. Nos macrófagos houve inibição (50%) da internalização dos peptídeos p1A3 e p2C7 na presença de brefeldina A, indicando que esses peptídeos são majoritariamente captados por endocitose independente de clatrina. Nas células HAEC, observou-se 25% de inibição da captação de ambos os peptídeos se bloqueando o receptor scavenger LOX-1 com anticorpo anti-LOX-1. Quanto à atividade citotóxica, observou-se acentuada redução na atividade mitocondrial das células endoteliais EA.Hy 926 e HAEC apenas com o peptídeo p1A3, não sendo observada citotoxicidade para os macrófagos tanto para p1A3 quanto p2C7 nas concentrações estudadas (12,5 a 200 µg/mL). Nos macrófagos, o peptídeo p2C7 induziu o aumento da expressão de RNAm de genes relacionados com a polarização para o fenótipo M1 (iNOS, TNF- α , IL-1 α) e da produção de $\bullet$ NO, assim como, a ativação do sinal 1 (transcricional) do complexo proteico inflamassoma, o que também se observou para a LDL (-). O peptídeo p1A3 modulou a expressão gênica da linhagem HAEC, diminuindo a expressão de RNAm dos genes relacionados à proliferação celular (VEGFr1 e 2, TGF β , PDGF β e eNOS). **Conclusão:** Os peptídeos mimotopos p1A3 e p2C7 interagem com as células endoteliais e macrófagos de maneiras distintas. O p2C7 induz uma resposta pró-inflamatória em macrófagos, mimetizando a LDL (-), sugerindo assim, que esse peptídeo possa atuar como um DAMP (padrão molecular associado ao perigo) importante para o processo inflamatório da placa aterosclerótica.

Palavras-Chave: LDL eletronegativa, peptídeos, mimotopo, macrófago, endotélio

Abstract: TRIPODI, G. L. Study of the interaction between mimotope peptides of electronegative LDL with endothelial cells and macrophages. 2016. 106f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Introduction: Among the different subtypes of modified low-density lipoprotein (LDL), the electronegative LDL [LDL (-)] contributes to the progression of atherosclerosis, promoting leukocyte recruitment into the arterial intima and modulating the inflammatory response. Mimotopes are molecules capable of binding to the variable portion of an antibody, to enzymes or receptors. The mimotope peptides of LDL (-) are molecules mimicking the conformation of epitopes exposed only when LDL undergoes *in vivo* changes. **Objective:** To evaluate the effects of two mimotope peptides of LDL (-), previously selected by phage display and called p1A3 and p2C7, on endothelial cells and macrophages. **Methodology:** We evaluated the activity of the mimotope peptides on gene mRNA expression related to both the activation and endothelial dysfunction as well as the cytotoxic activity and uptake of peptides by endothelial cells (HUVEC, HAEC and EA.Hy 926). It was also investigated the pro-inflammatory activity of the peptides on murine primary macrophage derived from bone marrow (BMDM), evaluating the activation of the protein complex inflammasome, as well as the internalization of peptides by these cells by flow cytometry and confocal microscopy. **Results:** The endothelial cells and macrophages internalized both peptides. In macrophages, brefeldin A inhibited the internalization of p1A3 and p2C7 around 50%, indicating that these peptides are mostly taken up by clathrin-independent bulk endocytosis. In HAEC it was observed a 25 % inhibition of the uptake of both peptides by blocking the LOX scavenger receptor with an anti-LOX-1 antibody. In relation to cytotoxicity, a reduction on mitochondrial activity was induced by p1A3 peptide only in endothelial cells (EA.Hy 926 and HAEC). No cytotoxic activity was observed for p2C7 peptide in macrophages or endothelial cells at the studied concentration range (12.5 to 200 µg/mL). In macrophages, the p2C7 peptide increased mRNA expression of genes related to the polarization to *M1* phenotype (iNOS, TNF- α and IL-1 α) and of •NO production, as well as, protein complex signal 1 activation (transcriptional) what was also observed for LDL (-). The p1A3 peptide modulated the expression of genes related with cell proliferation (VEGFr1 e 2, TGF β , PDGF β and eNOS) in HAEC. **Conclusion:** The mimotope peptides p2C7 and p1A3 interact with the endothelial cells and macrophages by different ways. The p2C7 induces a pro-inflammatory response in macrophages, mimicking LDL (-), thus suggesting that this peptide can act as a DAMP (*Damage-associated molecular pattern*) important in the inflammatory process of atherosclerotic plaque.

Keywords: electronegative LDL, peptides, mimotope, macrophages, endothelial

Lista de Figuras

Figura 1: Os seis países com maior índice de morte por DCV a cada 100.000 homens e mulheres. Dentre os países com maiores taxas de morte por doença cardíaca, acidente vascular encefálico e pressão arterial elevada, entre homens e mulheres na faixa etária entre 35 a 74 anos, o Brasil encontra-se em sexto lugar (adaptado de American Heart Association, 2016)..... **18**

Figura 2: Modelo tridimensional da partícula de LDL. A LDL é uma nanopartícula esférica de aproximadamente 22 nm, composta de um núcleo apolar formado por triglicérides e ésteres de colesterol e uma superfície hidrofílica onde se encontram fosfolipídios e colesterol livre. Possui uma única cópia da apolipoproteína ApoB-100 (adaptado de JOHS, 2006)..... **19**

Figura 3: Início do processo aterosclerótico promovido pela LDL (-). A LDL (-) estimula o recrutamento leucocitário para o interior da parede arterial estimulando a liberação de quimiocinas e moléculas de adesão pelas células endoteliais, assim como promovendo a ativação leucocitária e a transformação dos macrófagos em células espumosas. Este ambiente pró-inflamatório promove, também, a proliferação e a migração das células musculares lisas da camada média arterial para o espaço intimal para a formação da capa fibrosa. Adaptado de Estruch, 2013..... **22**

Figura 4: Aminoácido lisina e modificações com MDA ou metilação. Aminoácido Lisina (lys) com os grupos amina carregados positivamente e o grupo carboxila carregado negativamente. O aducto de malondialdeído em resíduos de lisina faz com que a carga positiva do grupo amina seja perdida enquanto o processo de metilação mantém a carga do mesmo (HABERLAND, 1984). **24**

Figura 5: Peptídeos mimotopos. A utilização de uma biblioteca CX8C (8 aminoácidos com cisteínas nas extremidades formando uma ponte dissulfeto) possibilitou a seleção de ligantes para os alvos [anticorpos monoclonais 1A3 e 2C7 anti-LDL (-)]. **26**

Figura 6: Estrutura primária dos peptídeos. Os aminoácidos que compõem os peptídeos p1A3 e p2C7 foram classificados como apolar, polar neutro, polar básico ou polar ácido. A porcentagem de cada tipo de aminoácido está representada na figura. **26**

Figura 7: Modelo de anel peptídico: Esboço da construção do anel circular. d: distância entre o raio de 2 aminoácidos; N: número de aminoácidos do anel; R: raio do anel composto pelos aminoácidos. **31**

Figura 8: Dados de SAXS para as amostras p1A3 e p2C7. (a) Dados de SAXS para amostras à 100 cm de distância do detector e duas temperaturas, 20 °C e 36 °C. Símbolos: dados experimentais; Linha sólida: IFT. (b) curvas de $p(r)$ para cada amostra calculada pela IFT. (c) Dados experimentais de SAXS para p2C7 à 38 cm e 20 °C. Símbolos: dados experimentais; Linha sólida: IFT. (d) curva de $p(r)$ para p2C7 à 38 cm e 20°C. **32**

Figura 9: Dados de SAXS obtidos utilizando o modelo de anel circular para p1A3 p2C7. (a) Modelagem dos dados coletados à 100 cm. Símbolos: dados experimentais; Linha sólida: Modelo ajustado. (b) Modelagem dos dados colhidos à 38 cm (p2C7). Símbolos: dados experimentais; Linha sólida: Modelo ajustado. 33

Figura 10: Efeito da ativação de células endoteliais por TNF- α sobre a expressão gênica de CD-31 e CD-144. 1×10^6 células por poço foram estimuladas com 1 ng/mL de TNF- α por 4 horas. A análise dos dados resultantes de PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. ** $p < 0,001$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 40

Figura 11: Efeito da ativação de células endoteliais por TNF- α sobre a expressão gênica de ICAM-1, VCAM-1, LOX-1 e CD-62E. 1×10^6 células por poço foram estimuladas com 1 ng/mL de TNF- α por 4 horas. A análise dos dados resultantes de PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. **** $p < 0,00001$, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 41

Figura 12: Efeito da ativação de células endoteliais por TNF- α sobre a expressão gênica de CSF2 e IL-8. 1×10^6 células por poço foram estimuladas com 1 ng/mL de TNF- α por 4 horas. A análise dos dados resultantes de PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. **** $p < 0,00001$, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 42

Figura 13: Efeito da ativação de células endoteliais por TNF- α sobre a expressão gênica de IL-1a e IL-1b. 1×10^6 células por poço foram estimuladas com 1 ng/mL de TNF- α por 4 horas. A análise dos dados resultantes de PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 42

Figura 14: Efeito da ativação de células endoteliais por TNF- α sobre a expressão gênica de eNOS. 1×10^6 células por poço foram estimuladas com 1 ng/mL de TNF- α por 4 horas. A análise dos dados resultantes de PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 42

Figura 15: Ensaio de viabilidade celular com MTT. 1×10^4 células foram tratadas com concentrações (12,5 até 200 $\mu g/mL$) de LDL (-), p1A3 ou p2C7 por 24 horas. Foi avaliada a capacidade mitocondrial de conversão do sal MTT em formazana das células (A) EA.Hy 926 e (B) HAEC, comparado com o controle não tratado. Dados expressos como média $\pm$ SD. ** $p < 0.005$ e *** $p < 0.0005$ quando comparada a LDL (-) com o controle não tratado; ## $p < 0.005$ e ### $p < 0.0005$ quando comparado o p1A3

com o controle não tratado; \$ $P < 0.05$ quando comparado p2C7 com o controle não tratado. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n = 3$ **43**

Figura 16: Ciclo celular das células HAEC tratadas com p1A3 ou p2C7. 1×10^6 células HAEC foram tratadas com $50 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 24 horas. As células foram então fixadas e marcadas com iodeto de propídeo para avaliar a quantidade de DNA por célula por citometria de fluxo. Os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi aplicado o teste estatístico TwoWay Anova com a correção de Sidak para múltiplas comparações. * $p < 0,05$, $n = 3$ **44**

Figura 17: Porcentagem de células endoteliais marcadas pelos peptídeos mimotopos ou LDL (-). (A) 1×10^5 células EA.Hy 926 foram tratadas por até 5 horas com $25 \mu\text{g/mL}$ do controle LDL (-) marcada com Dil, $25 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 marcado com Cy5 ou $25 \mu\text{g/mL}$ de p2C7 marcado com Cy5 e (B) 1×10^5 células HAEC foram tratadas por até 5 horas com $50 \mu\text{g/mL}$ do controle LDL (-) marcada com Dil, $50 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 marcado com Cy5 ou $50 \mu\text{g/mL}$ de p2C7 marcado com Cy5. A leitura foi feita por citometria de fluxo e foi avaliada a porcentagem de células marcadas, $n=1$ **45**

Figura 18: Mediana da intensidade de fluorescência de células endoteliais tratadas com os peptídeos mimotopos ou LDL (-). (A) 1×10^5 células EA.Hy 926 foram tratadas por até 5 horas com $25 \mu\text{g/mL}$ do controle LDL (-) marcada com Dil, $50 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 marcado com Cy5 ou $25 \mu\text{g/mL}$ de p2C7 marcado com Cy5 e (B) 1×10^5 células HAEC foram tratadas por até 5 horas com $50 \mu\text{g/mL}$ do controle LDL (-) marcada com Dil, $50 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 marcado com Cy5 ou $50 \mu\text{g/mL}$ de p2C7 marcado com Cy5. A leitura foi feita por citometria de fluxo e foi avaliada a MIF, $n=1$ **45**

Figura 19: Inibição da captação de p1A3 ou p2C7 por LOX-1. 1×10^5 células foram tratadas previamente por 30 minutos com 0, 4 ou $8 \mu\text{g/mL}$ de anti-LOX1, para então serem tratadas com $50 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 – Cy5 ou p2C7 – Cy5. Foi Avaliada a MIF das células e calculado a porcentagem de peptídeo por células baseado na MIF basal ($0 \mu\text{g/mL}$ de anti-LOX1). Os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi aplicado o teste estatístico TwoWay Anova com a correção de Sidak para múltiplas comparações, $n = 3$ **46**

Figura 20: Efeito dos peptídeos p1A3 e p2C7 sobre a expressão do gene eNOS e GAPDH nas células HAEC. 1×10^6 células por poço foram estimulados com $50 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. A análise dos dados resultantes das PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. * $p < 0,05$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ **46**

Figura 21: Efeito dos peptídeos p1A3 e p2C7 sobre a expressão dos receptores das células HAEC. 1×10^6 células por poço foram estimulados com $50 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. A análise dos dados resultantes das PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), os dados são expressos como

média $\pm$ SD. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 47

Figura 22: Efeito dos peptídeos p1A3 e p2C7 sobre a expressão de genes relacionados ao perfil inflamatório das células HAEC. 1×10^6 células por poço foram estimulados com 50 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. A análise dos dados resultantes das PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. ** $p < 0,005$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 47

Figura 23: Efeito dos peptídeos p1A3 e p2C7 sobre a expressão de genes relacionados proliferação celular de células endoteliais HAEC. 1×10^6 células por poço foram estimulados com 50 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. A análise dos dados resultantes das PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. * $p < 0,05$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 48

Figura 24: Efeito dos peptídeos p1A3 e p2C7 sobre a expressão de fatores de crescimento celular de células endoteliais HAEC. 1×10^6 células por poço foram estimulados com 50 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. A análise dos dados resultantes das PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. * $p < 0,05$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 48

Figura 25: Efeito dos peptídeos p1A3, p2C7 ou LDL (-) sobre a expressão dos genes VEGF-A, CCL2, TGF- β e VEGF-r2 nas células EA.Hy 926 . 1×10^6 células por poço foram estimulados com 25 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 4 horas, os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) para a análise dos dados resultantes das PCR. Foi aplicado o teste T para comparação entre dois grupos, $n=3$ 49

Figura 26: Efeito dos peptídeos p1A3, p2C7 ou LDL (-) sobre a expressão dos genes eNOS, IL-1 α e CD-62E nas células EA.Hy 926. 1×10^6 células por poço foram estimulados com 25 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. Foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) para a análise dos dados resultantes das PCR, os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi aplicado o teste T para comparação entre dois grupos, $n=3$ 49

Figura 27: Diferenciação de células medulares murinas em macrófagos. Após 7 dias diferenciação, 1×10^5 células foram marcadas com anticorpo F4/80 - FITC (1:1000) e analisadas por citometria de fluxo, afim de confirmar a mudança de fenótipo, os dados são expressos como média $\pm$ SD. As células foram comparadas com a linhagem de macrófagos Raw 264.7, $n=3$ 59

Figura 28: Efeito da ativação dos macrófagos com LPS sobre a expressão dos genes de IL-10 e TNF- α . 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS por 3 horas. A análise dos dados resultantes das análises das PCR foi realizada com o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). *** $p < 0,0005$; ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$, os

dados são expressos como média $\pm$ SD. Utilizou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 59

Figura 29: Efeito da ativação dos macrófagos com LPS sobre a expressão dos genes COX2, CCL2, CXCL3 e IL-18. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 3 horas. A análise dos dados resultantes das análises das PCR foi realizada com o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). *** $p < 0,0005$; ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$, os dados são expressos como média $\pm$ SD. Utilizou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 60

Figura 30: Efeito da ativação dos macrófagos com LPS sobre a expressão dos genes IL-6 e iNOS. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 3 horas. A análise dos dados resultantes das análises das PCR foi realizada com o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ os dados são expressos como média $\pm$ SD. Utilizou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 60

Figura 31: Efeito da ativação dos macrófagos com LPS sobre a expressão dos genes CD-36, IL-1 α , NF- κ B e TGF- β . 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 3 horas. A análise dos dados resultantes das análises das PCR foi realizada com o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$. Utilizou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 61

Figura 32: Produção de óxido nítrico no estado basal, pós ativação ($10 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 24 horas) e Δ ativação (após ativação – Basal). O sobrenadante de 1×10^6 células foi utilizado para avaliar a concentração de NO após 24 horas de estímulo com $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS. *** $p < 0,0005$; ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$, os dados são expressos como média $\pm$ SD. Utilizou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 62

Figura 33: Ensaio de viabilidade celular por MTT. 1×10^4 macrófagos murinos foram tratados com diferentes concentrações de LDL (-), p1A3 e p2C7 por 24 horas. Foi avaliada a capacidade mitocondrial da conversão do sal MTT em formazana comparando-se com o controle não tratado, os dados são expressos como média $\pm$ SD. ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$ 63

Figura 34: Internalização dos peptídeos pelos macrófagos visualizados por microscopia confocal. 1×10^5 macrófagos murinos foram tratadas por 3 ou 5 horas com $100 \mu\text{g/mL}$ do Cy5-P1A3, Cy5-P2C7 ou Dil-LDL (-). As imagens foram adquiridas por microscopia confocal, com aumento de 40x e profundidade de $5,11 \mu\text{m}$. $n=1$ 64

Figura 35: Ensaio de internalização dos peptídeos na presença de inibidores de endocitose. 1×10^5 macrófagos murinos por poço foram tratados com diferentes inibidores de endocitose por 1 horas antes da incubação com $100 \mu\text{g/mL}$ de p1A3-Cy5 ou p2C7-Cy5 por 2 horas. A análise foi realizada por citometria de fluxo, avaliando-se a mediana da intensidade da fluorescência e, por fim, relativizando a MIF das células

tratadas com as células não tratadas, os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi utilizado o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Dunnett para múltiplas comparações, verificando a diferença entre o tratamento com os inibidores e o valor basal, *** $p < 0,0001$; $n = 4$ 65

Figura 36: Efeito do estímulo com p1A3, p2C7 ou LDL (-) sobre a expressão dos genes TNF α e IL-1 α nos tempos de 3 e 14 horas. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3, p2C7 ou LDL (-) por 3 ou 14 horas. Os dados resultantes das análises de qPCRs foram avaliados utilizando-se o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi utilizado o teste T para comparar os tempos de 3 e 14 horas, onde *** $p < 0,0005$; ** $p < 0,005$, $n = 3$ 66

Figura 37: Efeito do estímulo com p1A3, p2C7 ou LDL (-) sobre a expressão dos genes TNF α e IL-1 α . 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3, p2C7 ou LDL (-) por 3 horas. Os dados resultantes das análises de qPCRs foram avaliados utilizando-se o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). O controle positivo da reação [LDL (-)] está representada no eixo y à direita.), os dados são expressos como média $\pm$ SD. Aplicou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações para verificar a diferença entre os três tratamentos *** $p < 0,0005$. Utilizou-se o teste T pareado para avaliar a diferença entre os dois peptídeos (eixo y à esquerda) ## $p < 0,005$, $n = 3$ 67

Figura 38: Efeito do estímulo com p1A3, p2C7 ou LDL (-) sobre a expressão dos genes TGF β e IL-10. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3, p2C7 ou LDL (-) por 3 horas. Os dados resultantes das análises de qPCRs foram avaliados utilizando-se o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). O controle positivo da reação [LDL (-)] está representada no eixo y à direita.), os dados são expressos como média $\pm$ SD. Aplicou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, para verificar a diferença entre os três tratamentos * $p < 0,05$. Utilizou-se o teste T pareado para avaliar a diferença entre os dois peptídeos (eixo y à esquerda) # $p < 0,05$, $n = 3$ 67

Figura 39: Efeito do estímulo com p1A3, p2C7 e LDL (-) sobre a expressão dos genes COX2 e iNOS. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3, p2C7 ou LDL (-) por 3 horas. Os dados resultantes das análises de qRT-PCR foram avaliados utilizando-se o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). O controle positivo da reação [LDL (-)] está representado no eixo y à direita. Aplicou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, para verificar a diferença entre os três tratamentos *** $p < 0,0005$. Utilizou-se o teste T pareado para avaliar a diferença entre os dois peptídeos (eixo y à esquerda) ### $p < 0,0005$, $n = 3$. .. 68

Figura 40: Efeito do estímulo com p1A3, p2C7 ou LDL (-) sobre a expressão dos genes componentes do inflamassoma. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3, p2C7 ou LDL (-) por 3 horas. Os dados resultantes das análises de qRT-PCR foram avaliados utilizando-se o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). O controle positivo da reação [LDL (-)] está representada no eixo y à direita. Aplicou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, para

verificar a diferença entre os três tratamentos *** $p < 0,0005$; ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$. Foi realizado o teste T pareado para avaliar a diferença entre os peptídeos (eixo y à esquerda) ## $p < 0,005$ e # $p < 0,05$, $n = 3$ 68

Figura 41: Efeito do estímulo com p1A3, p2C7 e LDL (-) sobre a expressão de genes de componentes da via de ativação do inflamassoma. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3, p2C7 ou LDL (-) por 3 horas. Os dados resultantes das análises de qRT-PCR foram avaliados utilizando-se o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). O controle positivo da reação [LDL (-)] está representado no eixo y à direita. Aplicou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, para verificar a diferença entre os tratamentos com os peptídeos ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$. Foi realizado o teste T pareado para avaliar a diferença entre os peptídeos (eixo y à esquerda) # $p < 0,05$, $n = 3$ 69

Figura 42: Concentração de TNF α e CCL2 no sobrenadante da cultura de macrófagos murinos tratados com p1A3 ou p2C7. Foram plaqueados 10^6 macrófagos por poço e estimulados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 24 h. O sobrenadante, então, foi coletado e armazenado em freezer -80°C até a sua utilização. Foi utilizado o BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit para este ensaio. Aplicou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, para verificar a diferença entre os tratamentos com os peptídeos ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ 69

Figura 43: Produção de óxido nítrico pelos macrófagos murinos. O sobrenadante de 1×10^6 células foi utilizado para avaliar a concentração de $\bullet\text{NO}$ após 24 horas de estímulo com 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3, p2C7 ou LDL (-). A barra basal representa a produção de $\bullet\text{NO}$ nas células sem estímulo. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n = 3$ 70

Figura 44: Modulação do fenótipo de macrófagos através de enzimas do metabolismo da L-Arginina. ODC: Ornitina Decarboxilase; OAT: Ornitina aminotransferase. O metabolismo da L-arginina nos macrófagos é um limitante para o seu fenótipo, de tal maneira que o p2C7 consegue modular esse equilíbrio, deslocando-o para esquerda (adaptado de MONCADA, 1993). 77

Figura 45: Ensaio de Viabilidade Celular. 2×10^5 células HUVEC foram plaqueadas em placa de 24 poços. Após 16 horas em RPMI 1% SFB, as células foram encubadas por 24h com os diferentes tratamentos e então marcadas com anexina (ligante de fosfatidil serina) e Iodeto de propídeo (intercalante de DNA). Apenas foi observada diferença estatística com o teste OneWay Anova em relação a condição basal entre o tratamento LDLMM 100 $\mu\text{g/mL}$ para Células Viáveis (não marcadas) e células Apoptóticas (Anexina). 94

Figura 46: Cinética de Captação dos Peptídeos e LDL (-) por células endoteliais. Foram plaqueadas 1×10^5 células em placa de 24 poços e, após sincronização com meio RPMI 1% SFB, foram tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 e p2C7 (marcados com FITC) e

LDL (-) marcada com Dil. As células foram tratadas de hora em hora, a fim de se ter uma cinética que compreende do tempo 3 a 8 horas. Como é possível observar, P2C7 e LDL (-) já estavam saturados no menor tempo testado. 95

Figura 47: qPCR para LDL (-), P1A3 e P2C7 (50 ug/mL) e LPS (10 ug/mL), tratamento por 4 horas. Entre os genes testados, apenas foi observada diferença estatística entre o controle positivo LPS e os demais tratamentos para os genes ICAM1, IL-8, IL-6 e CCL2 (n = 4). 96

Figura 48: qPCR para LDL (-), P1A3 e P2C7 (50 ug/mL) e LPS (10 ug/mL), tratamento por 8 horas. Como resultados preliminares, o tempo de 8 horas de tratamento não mostrou significativa alteração para os genes eNOS, VCAM1, IL-8, NF- κ B, AP1A3 e AKT. Apenas o controle positivo (LPS 10 ug/mL) apresentou efeito deletério nas células endoteliais (n = 1). 97

Figura 49: qPCR para LDL (-), P1A3 e P2C7 (50 ug/mL) e LPS (10 ug/mL), tratamento por 8 horas. Os peptídeos se mostraram inertes em relação aos genes CCL2, IL-6, FGF, eSELECTINA, THBS1 e ICAM1, já o tratamento com LDL(-) aumentou a expressão de CCL2 (n = 1). 98

Figura 50: qPCR para LDL(-), P1A3 e P2C7 (50 ug/mL) e LPS (10 ug/mL), tratamento por 8 horas. Os tratamentos testados para os genes PDGF, TGF, VEGF, IL18 não mostraram diferença em relação a condição basal. Apenas o controle positivo (LPS 10ug/mL) estimulou a expressão de LOX1 em quanto que houve um aumento para todos os tratamentos em relação ao gene NFAT (n = 1). 99

Figura 51: qPCR para LDL(-), P1A3 e P2C7 (50 ug/mL) e LPS (10 ug/mL), tratamento por 8 horas. Apenas houve estímulo para expressão dos genes TNFa, CSF2, CXCL3 e IL-1b para o controle positivo LPS (10 ug/mL), em quanto os tratamentos testados se mostraram inertes (n=1). 100

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1: Parâmetros obtidos a partir da IFT.</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 2: Parâmetros obtidos utilizado o modelo de anel circular com a formação de agregados</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 3: Inibidores de endocitose e seus respectivos alvos</i>	<i>66</i>

Lista de Abreviações

DCV	Doenças cardiovasculares
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
•NO	Óxido nítrico
AP-1	Proteína ativadora 1
ApoB-100	Apolipoproteína B100
BMDM	Macrófagos derivados de medula óssea
CE	Células espumosas
CPP	<i>Cell-penetrating peptides</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
HIF-1 α	Fator-1 alfa induzido por hipóxia
ICAM-1	Molécula-1 de adesão intercelular
IFN-g	Interferon gama
IL	Interleucina
LDL (-)	Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa
LDLm	Lipoproteína de baixa densidade modificada
LDLn	Lipoproteína de baixa densidade nativa
LDLr ou B/E	Receptor de LDL
Lys	Lisina
MCP- 1/CCL2	Proteína quimiotática para monócitos
MDA	Malondealdeído
MIF	Medida da intensidade da fluorescência
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
NF- κ B	Fator Nuclear kappa B
rM-CSF	Proteína recombinante M-CSF
SR	Receptores <i>scavenger</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Molécula-1 de adesão de células vasculares
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

Sumário

1.	<i>Introdução</i>	18
1.1.	Aterosclerose.....	18
1.2.	Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa	18
1.3.	O papel da LDL (-) no processo aterosclerótico	21
1.4.	Apolipoproteína B100.....	23
1.5.	Peptídeos mimotopos da LDL (-) humana	25
1.6.	Caracterização dos peptídeos mimotopos p1A3 e p2C7.....	26
2.	<i>Objetivos</i>	28
2.1.	Objetivo Geral:	28
2.2.	Objetivos Específicos:	28
3.	<i>Material e Métodos</i>	29
3.1.	Peptídeos p1A3 e p2C7	29
3.2.	Espalhamento de raios X a Baixo Ângulo	29
4.	<i>Resultados:</i>	31
5.	<i>Discussão:</i>	34
6.	<i>Material e Métodos:</i>	36
6.1.	Isolamento da fração LDL	36
6.1.1.	Isolamento da subfração da LDL eletronegativa.....	36
6.2.	Peptídeos p1A3 e p2C7	36
6.3.	Cultura celular	37
6.3.1.	HUVEC	37
6.3.2.	HAEC.....	37
6.3.3.	EA.Hy 926.....	37
6.4.	Ensaio de Viabilidade Celular.....	37
6.4.1.	MTT	37
6.4.2.	Ensaio de Morte Celular (Anexina/PI).....	37
6.5.	PCR em tempo Real (qPCR)	38
6.5.1.	Extração do RNA.....	38
6.5.2.	Construção do cDNA.....	38
6.5.3.	Quantificação da expressão gênica (mRNA).....	38
6.6.	Ensaio de captação dos peptídeos por células endoteliais	39
6.6.1.	Citometria de fluxo.....	39
6.6.2.	Inibidor de captação pelo receptor LOX-1.....	39
6.7.	Ciclo Celular.....	39
7.	<i>Resultados</i>	40
7.1.	Padronização dos ensaios com as células endoteliais	40
7.2.	Ensaio com os Peptídeos Mimotopos da LDL (-)	43

7.1.1.	Viabilidade Celular (MTT)	43
7.1.2.	Ciclo Celular	43
7.3.	Captação dos Peptídeos por Células EA.Hy 926 e HAEC	44
7.4.	Quantificação da expressão gênica (mRNA)	45
8.	Discussão	50
9.	Material e Métodos:	55
9.1.	Peptídeos (p1A3, p2C7) e LDL (-)	55
9.2.	Cultura celular	55
9.2.1.	Fibroblastos L929	55
9.2.2.	Macrófagos Raw 264.7	55
9.2.3.	Macrófagos murinos primários (BMDM)	55
9.3.	Viabilidade Celular (MTT) e expressão gênica (qPCR)	56
9.4.	Detecção de Endotoxina Bacteriana (LAL test)	57
9.5.	Ensaio de captação dos peptídeos por macrófagos	57
9.5.1.	Citometria de fluxo	57
9.5.2.	Microscopia Confocal	58
9.5.3.	Inibidores de endocitose	58
9.6.	Quantificação de citocinas: CBA	58
9.7.	Quantificação de Oxido Nítrico: NOA	58
10.	Resultados	59
10.1.	Padronização da diferenciação de macrófagos murinos	59
10.1.1.	Efeitos dos peptídeos mimotopos da LDL (-) sobre os macrófagos murinos	62
11.	Discussão	71
11.1.	Padronização da diferenciação de macrófagos	71
11.2.	Efeito dos peptídeos mimotopos da LDL (-) sobre macrófagos murinos primários	72
11.2.1.	Captação dos peptídeos e polarização dos macrófagos	72
11.2.2.	Efeito dos peptídeos mimotopos da LDL (-) em macrófagos murinos primários:	
Inflamassoma	77	
12.	Conclusões	79
13.	Bibliografia	80
	Anexo I: Resultados anteriores com a linhagem HUVEC	94
	Anexo II: Aprovação no comitê de ética em experimentação animal:	101
	Anexo III: Lattes	102
	Anexo III: Janus	105

1. Introdução

1.1. Aterosclerose

As doenças cardiovasculares (DCVs) representam um grave problema de saúde pública, sendo a principal causa de morte no mundo. Em 2012, as DCVs causaram 17,5 milhões de mortes no mundo (WHO, 2015). No Brasil, as DCVs representam 29,4% da mortalidade no país, totalizando 308 mil mortes anuais, o que coloca o Brasil entre os 10 países com maior índice de mortes por DCVs (*Figura 1*) (BRASIL, 2014).

Figura 1: Os seis países com maior índice de morte por DCV a cada 100.000 homens e mulheres. Dentre os países com maiores taxas de morte por doença cardíaca, acidente vascular encefálico e pressão arterial elevada, entre homens e mulheres na faixa etária entre 35 a 74 anos, o Brasil encontra-se em sexto lugar (adaptado de American Heart Association, 2016).

A aterosclerose é a base fisiopatológica das DCVs, sendo um processo que ocorre na parede de artérias de grande e médio calibre, podendo ser descrita como um processo inflamatório, lento e progressivo de origem multifatorial. Desse modo, o acúmulo de lípides na íntima arterial, bem como a resposta imune são de fundamental importância, podendo culminar em um evento trombótico (LUSIS, 2000).

Zonas com menor velocidade do fluxo sanguíneo são mais propensas a desenvolver placas ateroscleróticas, sendo estas mais frequentes no segmento arterial ílio-femoral, no nível da bifurcação carotídea, aorta abdominal e região encefálica. A formação de placas ateroscleróticas cardio-cerebrovasculares pode causar estenose, sendo a principal causa de infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico (CUNNINGHAM e GOTLIEB, 2005).

1.2. Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa

O colesterol é transportado para as células periféricas, principalmente, pela lipoproteína de baixa densidade (LDL), a qual é internalizada por endocitose mediada pelo receptor de LDL (LDLr ou B/E). A LDL é então transportada por endossomas e

transferida para o citosol pelas proteínas Niemann–Pick C1 e C2 até ser degradada em aminoácidos, colesterol livre e ácidos graxos. Entretanto, o acúmulo de colesterol intracelular pode causar diversas patologias, incluindo a aterosclerose (GO e MANI, 2012).

A partícula de LDL (*Figura 2*) tem um diâmetro de 22 nm e possui um núcleo formado por ésteres de colesterol e triglicérides (moléculas altamente polares) e uma superfície de fosfolipídios e colesterol não esterificado. Os lipídeos apolares são separados do meio aquoso por lipídeos polares e por uma proteína específica, a apolipoproteína B100 (ApoB-100) (SIQUEIRA et al, 2006).

Figura 2: Modelo tridimensional da partícula de LDL. A LDL é uma nanopartícula esférica de aproximadamente 22 nm, composta de um núcleo apolar formado por triglicérides e ésteres de colesterol e uma superfície hidrofílica onde se encontram fosfolipídios e colesterol livre. Possui uma única cópia da apolipoproteína ApoB-100 (adaptado de JOHS, 2006).

Devido ao seu tempo de meia vida plasmática (2-3 dias), a LDL está susceptível a sofrer modificações tanto em sua parte proteica quanto em sua porção lipídica, ainda na circulação, o que torna essa partícula imunogênica (STEINBERG, 2009). A formação de LDL modificada (LDLm) pode estar associada a outras patologias de base como, por exemplo, diabetes descompensada, onde existe maior probabilidade de glicação não enzimática de lipoproteínas, inflamações crônicas associadas ao estresse oxidativo, que podem aumentar a oxidação desta lipoproteína, em pacientes com doença renal crônica submetidos à hemodiálise, onde há maior chance de recombinação da ApoB-100 com a hemoglobina (revisado em MELLO et al, 2011).

O metabolismo da LDL nativa (LDLn), ou seja, aquela que não sofreu modificações, se diferencia da LDLm principalmente quanto à sua remoção mediada por receptor. Enquanto a remoção da LDLn ocorre por endocitose mediada pelo B/E, via reconhecimento do domínio N-terminal da ApoB-100, a LDLm não pode usar esta via devido as modificações estruturais/conformacionais e se liga a diferentes receptores *scavenger* (SR), primordialmente em macrófagos, promovendo um quadro inflamatório (GOLDSTEIN et al, 1979). Além disso, a captação mediada pelo receptor B/E é negativamente controlada pelos níveis de colesterol intracelular, enquanto a internalização via SR não tem esse controle por *feedback* negativo, consequentemente, ocorre a formação de macrófagos com alto teor de colesterol devido à sobrecarga lipídica. Estas células são denominadas células espumosas (CE) (GO e MANI, 2012).

Apesar de serem formadas por diferentes processos, as partículas de LDLm possuem propriedades semelhantes, como:

- Elevada eletronegatividade, quando comparada com a LDLn;
- Capacidade de ativar o processo inflamatório;
- Menor afinidade pelos receptores de LDL no fígado (o que diminui seu catabolismo e aumenta seu tempo de meia vida na circulação sistêmica);
- Maior afinidade pelos proteoglicanos da matriz extracelular da íntima do vaso.

Pelo fato de várias modificações da LDL ocorrerem nos resíduos lisina da ApoB-100, que estão protonados em pH fisiológico, as partículas de LDLm perdem essas cargas positivas e apresentam-se mais negativas em comparação à LDLn. Sendo assim, este grupo de partículas de LDLm, mesmo que heterogêneo, foi designado como LDL eletronegativa [LDL (-)] por Avogaro et al (1988), baseando-se na migração eletroforética (eletroforese capilar) desta subfração de LDL.

A composição da LDL (-) difere em relação à LDLn por possuir um aumento de ácidos siálicos, apolipoproteína E, apolipoproteína C-III e ácidos graxos não esterificados (do inglês, NEFA) (QUESADA et al, 2004), que podem estar associados à sua eletronegatividade aumentada. As partículas de LDL (-) também são ricas em hidroperóxidos (SEVANIAN et al, 1997), dienos conjugados, óxidos de colesterol (CHANG et al, 1997), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e apresentam menores concentrações de α -tocoferol quando comparada com a LDLn (CAZZOLATO et al, 1991).

O primeiro indício de relação entre a LDL (-) e aterosclerose foi o aumento da sua concentração em pacientes com doenças associadas ao maior risco de eventos cardiovasculares como hipercolesterolemia familiar (BENÍTEZ et al, 2004; BARROS et al, 2006), hipertrigliceridemia (QUESADA et al, 2002) e diabetes mellitus tipo 1 e 2 (QUESADA et al, 1996). Também foram relatadas concentrações de LDL (-) aumentadas em pacientes com infarto agudo do miocárdio (CHANG et al, 2013) e doença arterial coronariana (NICCOLI et al, 2012) e obesidade infantil (SILVA et al, 2013).

É importante esclarecer as diferenças entre as terminologias empregadas para designar a subfração de partículas modificadas de LDL. Apesar dos processos redox contribuírem para a modificação da apoB-100 *in vivo*, o termo LDL oxidada (LDLox) é frequentemente utilizado para a LDL nativa que sofreu oxidação *in vitro*. As propriedades inflamatórias e de internalização celular diferem de acordo com a intensidade de oxidação dos lipídeos e das modificações da ApoB-100 dessas partículas de lipoproteínas, que são muito mais intensas *in vitro* do que *in vivo* (STEINBERG, 2009).

Os resíduos lisina da ApoB-100 são modificados por diferentes aldeídos formados na peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados. Quando mais de 15% dos resíduos de lisina da ApoB-100 são modificados, a partícula de LDLm deixa de

ser reconhecida pelo receptor B/E e passa a ser internalizada pelos receptores scavenger (HABERLAND e FOLGELMAN, 1984).

Assim, entende-se como LDL (-) a fração de LDL modificada *in vivo*, por diferentes processos fisiopatológicos, que resultam em modificação estruturais ou conformacionais da ApoB-100, assim como do seu conteúdo lipídico e que alteram seu reconhecimento pelos receptores B/E (revisado por FAULIN et al, 2008).

1.3. O papel da LDL (-) no processo aterosclerótico

O acúmulo de LDL (-) na camada íntima dos vasos pode afetar a função de células endoteliais, estimulando a secreção de mediadores químicos pró-inflamatórios, tais como a proteína quimiotática para monócitos (MCP-1/CCL2) e interleucina 8 (IL-8) (CASTELLARNAU et al, 2007), bem como a expressão de moléculas de adesão, tais como VCAM-1 e ICAM-1 (molécula-1 de adesão de células vasculares e molécula-1 de adesão intercelular) (QUESADA et al, 2003). Desse modo, a LDL (-) pode desempenhar um papel fundamental no recrutamento de monócitos, que adentram na íntima arterial por diapedese, desenvolvendo uma complexa disfunção endotelial (FAULIN et al, 2010).

Na camada subendotelial, os monócitos diferenciados em macrófagos reconhecem a LDL (-) como uma partícula contendo DAMP (do inglês, *danger-associated molecular patterns*), através do complexo de receptores TLR4/CD14/MD2 (MILLER et al, 2003) e, por conseguinte, levando à ativação de vias de sinalização intracelular, entre as quais a via de NF- κ B/AP-1 (Fator Nuclear kappa B/ proteína ativadora 1) (ESTRUCH et al, 2013), culminando em um evento inflamatório (JANABI et al, 2000).

Ocorre um rápido influxo da LDL (-) para o interior dos macrófagos por SR o que, por falta de regulação por *feedback* negativo, resulta na formação das células espumosas, bem como o acúmulo dessas no espaço subendotelial, promovendo o desenvolvimento de lesões designadas como estrias gordurosas, a primeira etapa da aterogênese (KAZUMA et al, 2013).

Os macrófagos ativados no espaço subendotelial produzem diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas 1, 6 e 12 (IL-1, IL-6 e IL-12), interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). As citocinas IL-1 e TNF- α são responsáveis pela expressão de moléculas de adesão no endotélio e, juntamente com IL-6, aumentam a produção de proteína C reativa pelo fígado. Por sua vez, a IL-12 é um mediador chave na resposta Th1, pois induz a produção de IFN- γ pelos linfócitos T e NK (ANDERSSON et al, 2010) (*Figura 3*).

Durante a progressão do ateroma, células endoteliais, musculares lisas e espumosas morrem, por apoptose ou necrose, liberando o conteúdo lipídico (composto basicamente por colesterol e seus ésteres) na íntima arterial. A consequência é a formação de um núcleo lipídico avascular que estimula o estado inflamatório, com alto recrutamento leucocitário e promovendo crescimento do

ateroma. Dependendo do seu tamanho, a placa pode causar estenose e angina. Como uma tentativa de conter e cicatrizar a placa, as células musculares lisas, altamente estimuladas, além de proliferarem, migram para a camada íntima arterial onde produzem uma matriz extracelular formando uma capa fibrosa, que pode tornar-se fina e frágil nas lesões ateroscleróticas instáveis (FALK, 2006).

O centro necrótico presente no interior da placa proporciona uma zona de hipóxia, a qual estimula a liberação de fatores pró-angiogênicos como HIF-1 α (fator-1 alfa induzido por hipóxia) e VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) (HO-TIN-NOÉ e MICHEL, 2011). A angiogênese, conceituada como formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, gera microvasos frágeis que se rompem facilmente, resultando em um extravasamento de proteínas plasmáticas, eritrócitos e células inflamatórias, agravando a instabilidade da placa aterosclerótica (HO-TIN-NOÉ et al, 2011).

A placa aterosclerótica torna-se cada vez mais complexa com calcificações, ulcerações na superfície luminal, hemorragia e instáveis devido a diversas proteinases (colagenases, gelatinases, metaloproteases) liberadas pelos macrófagos e que degradam a matriz extracelular, o que pode levar ao seu rompimento (SHAH, 2003). A ruptura da placa expõe o núcleo necrótico ao lúmen vascular, o que ativa a cascata de coagulação, promovendo a formação de um trombo que, por sua vez, pode se desprender e ocluir total ou parcialmente o vaso, ocasionando o evento cardiovascular aterotrombótico (LIBBY, 2009).

Figura 3: Início do processo aterosclerótico promovido pela LDL (-). A LDL (-) estimula o recrutamento leucocitário para o interior da parede arterial estimulando a liberação de quimiocinas e moléculas de adesão pelas células endoteliais, assim como promovendo a ativação leucocitária e a transformação dos macrófagos em células espumosas. Este ambiente pró-inflamatório promove, também, a proliferação e a migração das células musculares lisas da camada média arterial para o espaço intimal para a formação da capa fibrosa. Adaptado de ESTRUCH, 2013

1.4. Apolipoproteína B100

As apolipoproteínas (Apos) são proteínas que se ligam aos lipídeos estruturando as lipoproteínas, permitindo assim o transporte, tanto pelo sistema linfático quanto na circulação sistêmica, dos lipídeos insolúveis no meio aquoso do plasma sanguíneo. As Apos também são importantes para o metabolismo intravascular das lipoproteínas, atuando como cofatores enzimáticos e reconhecimento dessas partículas por receptores celulares (SACKS, 2015).

Existem diferentes classes de Apos e, entre elas, a ApoB-100 é a proteína constituinte primária da VLDL, LDL e IDL, formando uma ligação irreversível com os lipídeos da superfície dessas lipoproteínas. Enquanto as outras classes de Apos são transferidas via choque entre as lipoproteínas na circulação, a ApoB-100 é intransferível. Sua estrutura secundária é basicamente formada por 5 domínios α -hélices e folhas β -pregueadas alternados (NH- $\beta\alpha1$ - $\beta1$ - $\alpha2$ - $\beta2$ - $\alpha3$ -COOH). Estudos sugerem que as estruturas em folhas β -pregueadas são responsáveis por ancorar a proteína na superfície lipídica enquanto as estruturas em α -hélice adentram e ressurgem na superfície da partícula, conferindo flexibilidade conformacional dependente da composição lipídica (KUMAR et al, 2011).

Essa apolipoproteína é composta por 4563 aminoácidos e codificada pelo gene *APOB* (cromossomo 2 em humanos e 12 para camundongos) e possui massa molecular de 550 KDa. Mutações no gene da ApoB-100 são uma das causas da hipercolesterolemia familiar, uma doença hereditária, autossômica dominante que se caracteriza por concentrações elevadas do colesterol plasmático (DAVIDSON e SHELNESS, 2000).

Foi sugerido já na década de 80 que mudanças conformacionais na estrutura da ApoB-100 poderiam levar ao não reconhecimento da LDLn pelo receptor B/E, devido à derivatização dos resíduos de lisina (Lys) localizados no domínio de ligação da ApoB-100 a este receptor com aldeídos formados na peroxidação dos ácidos graxos insaturados esterificados aos fosfolípidos, triacilgliceróis e ésteres de colesterol da lipoproteína (*Figura 4*). Haberland et al (1984) mostraram *in vitro* que se até 15% dos resíduos de lisina da LDL humana fossem modificados por malondialdeído (MDA) o reconhecimento e a internalização da mesma ocorria pelo receptor B/E, enquanto acima deste limiar de modificações o reconhecimento e captação da LDL modificada ocorria via receptores *scavenger* com perda do reconhecimento pelo receptor B/E.

Figura 4: Aminoácido lisina e modificações com MDA ou metilação. Aminoácido Lisina (lys) com os grupos amina carregados positivamente e o grupo carboxila carregado negativamente. O aducto de malondialdeído em resíduos de lisina faz com que a carga positiva do grupo amina seja perdida enquanto o processo de metilação mantém a carga do mesmo (HABERLAND, 1984).

A derivatização dos resíduos de lisina da ApoB-100 leva a uma mudança da carga da proteína, que se torna cada vez mais negativa devido à perda das cargas positivas dos resíduos de lisina protonados, como mostrado na *Figura 4*. Portanto, o reconhecimento da LDL modificada via receptores scavenger está diretamente relacionado com a modificação das lisinas e as cargas alteradas da ApoB-100. A neutralização da carga positiva dos resíduos de lisina por MDA, anidrido acético ou glutaraldeído resulta na captação da LDLm pelos SR, entretanto, com a preservação da carga positiva por metilação, a LDLm é reconhecida pelo receptor B/E, não induzindo o acúmulo de colesterol pelos macrófagos e, portanto, impedindo a formação de células espumosas (HABERLAND et al, 1984).

Lund-Katz et al (1988) utilizaram da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) para detectar Lys, marcadas com o isótopo ^{13}C , da ApoB-100 de um *pool* de LDL isolada do plasma humano, identificando duas populações de Lys expostas. Essas subpopulações de lys diferem quanto à frequência de ressonância (42,8 ppm e 43,2 ppm), população relativa (70 e 30%) e basicidade (valores de pKa 10.5 e 8.9, respectivamente). Valores menores de pKa indicam um microambiente mais básico na proteína, tornando os resíduos Lys do domínio de ligação da apoB-100 ativos para seu reconhecimento pelo receptor B/E.

Para as partículas de LDL pequenas e densas, já conhecidas como aterogênicas, a proporção de lys ativas está reduzida, explicando assim sua menor afinidade pelo receptor B/E (NIGON et al, 1991). No entanto, o mesmo não foi observado para a população de LDL (-).

Em comparação com a LDLn, a LDL (-) apresenta um terceiro subtipo de lys, denominada “lisina intermediária”, possuindo um microambiente diferenciado e maior basicidade (pKa 10,7). Esses resultados indicam a existência de diferenças conformacionais entre a ApoB-100 da LDL (-) e da LDLn, sugerindo microambientes distintos, proporcionado pelos aminoácidos menos básicos, o que estaria relacionado com a perda da afinidade pelo receptor B/E (BLANCO et al, 2010).

1.5. Peptídeos mimotopos da LDL (-) humana

A terminologia mimotopo foi primeiramente utilizada por Geysen et al (1986), definindo-o como uma molécula capaz de se ligar à porção variável de um anticorpo, mimetizando assim, o epítipo do antígeno. Entretanto, este conceito já foi expandido para se referir a peptídeos que mimetizam qualquer sítio de ligação (SMITH et al, 1997), sendo útil para diversas áreas, como identificar alvos de medicamentos (TONG et al, 2002), diagnóstico (HSIUNG e WANG, 2008), finalidades terapêuticas (MACDOUGALL et al, 2009) e vacinas (KNITTELFELDER et al, 2009).

Considerando as diferenças conformacionais entre a estrutura da ApoB-100 da LDLn e da LDL (-), em um estudo inicial, nosso grupo desenvolveu 2 anticorpos monoclonais (1A3 e 2C7) a partir da imunização de camundongos Balb/c com a LDL (-) humana. Estes anticorpos são capazes de reconhecer epítipos derivados das modificações da ApoB-100 na LDL (-) e não possuem afinidade pela LDLn (FAULIN et al, 2008).

Em uma etapa seguinte, em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo José Giordano, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, foram mapeados os epítipos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais anti-LDL (-), utilizando-se de uma biblioteca de peptídeos aleatórios apresentados por fagos. Na construção da biblioteca, oligonucleotídeos aleatórios foram inseridos entre a sequência codificante para o peptídeo sinal e o N-terminal da proteína pIII do capsídeo do bacteriófago. Dessa forma, peptídeos aleatórios foram expressos como fusões da região N-terminal da proteína pIII dos fagos (GIORDANO et al, 2005).

A técnica de *phage display* utiliza-se de bacteriófagos modificados por biologia molecular, de tal forma que cada partícula viral apresenta um polipeptídeo exógeno na sua superfície (p.ex., um pequeno peptídeo ou um fragmento de um anticorpo). A coleção de fagos obtidos é, portanto, uma ‘biblioteca’ que pode conter milhões de elementos diferentes, onde os sítios de interação podem ser compostos por resíduos de aminoácidos contínuos (epítipos lineares) ou separados (epítipos conformacionais) da sequência primária da proteína. As bibliotecas de *phage display* são então utilizadas para isolar peptídeos ou moléculas ligantes de receptores, enzimas, células ou tecidos. (PANDE et al, 2010).

A utilização de uma biblioteca CX8C (10 aminoácidos, sendo duas cisteínas nas extremidades formando uma ponte dissulfeto) possibilitou a seleção de ligantes dos anticorpos monoclonais anti-LDL (-). Os peptídeos obtidos podem ser classificados como mimotopos, ou seja, moléculas que imitam a estrutura de um epítipo, não possuindo assim, a sequência linear de aminoácidos encontrados na ApoB-100. Devido a esta propriedade, é esperado que induzam uma resposta imunológica semelhante à obtida pelos epítipos da LDL (-) (*Figura 5*).

Figura 5: Peptídeos mimotópicos. A utilização de uma biblioteca CX8C (8 aminoácidos com cisteínas nas extremidades formando uma ponte dissulfeto) possibilitou a seleção de ligantes para os alvos [anticorpos monoclonais 1A3 e 2C7 anti-LDL (-)].

1.6. Caracterização dos peptídeos mimotópicos p1A3 e p2C7

Os peptídeos ligantes dos anticorpos monoclonais anti-LDL (-) foram nomeados como p1A3 e p2C7 (pedido de patente depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o número de registro BR 1020131063, em 30 de abril de 2013 com o título “Peptídeos Sintéticos Miméticos à LDL, seu Processo de Produção e seus Usos”).

Quanto à estrutura primária, ambos diferem quanto aos aminoácidos presentes, possuindo 40% de similaridade (considerando as cisteínas das extremidades) e características apolares, apesar de p2C7 possuir maior número de aminoácidos apolares que o p1A3 (*Figura 6*).

Figura 6: Estrutura primária dos peptídeos. Os aminoácidos que compõem os peptídeos p1A3 e p2C7 foram classificados como apolar, polar neutro, polar básico ou polar ácido. A porcentagem de cada tipo de aminoácido está representada na figura.

As duas cisteínas, nas posições 1 e 10 em ambos peptídeos, são de extrema importância para a estrutura conformacional, já que a presença do grupo tiol na cadeia lateral permite a formação de uma ponte dissulfeto entre elas e como consequência, a estrutura terciária possui formato de anel.

Estudo anteriores demonstraram que alguns peptídeos formados pela sequência linear da ApoB-100 humana podem ser utilizados para a imunização de camundongos e apresentam efeitos benéficos, como a redução do processo aterogênico (FREDRIKSON et al, 2003; FREDRIKSON et al, 2008; CHYU et al., 2005).

Fredrikson et al (2003) sintetizaram 302 peptídeos com 20 aminoácidos cada, representando a sequência inteira da ApoB-100 humana. A partir da premissa que a LDL modificada/oxidada é crucial no processo aterogênico, os autores derivatizaram os peptídeos com MDA antes da sua utilização como antígenos para detecção de anticorpos reativos no plasma humano. Foram detectados mais de 100 anticorpos reativos aos peptídeos desta biblioteca modificada.

Chyu et al (2005), utilizando a mesma biblioteca de peptídeos anteriormente citada, selecionaram 2 deles, os quais apresentavam homologia com a sequência da ApoB-100 murina entre 70 e 95%. Esses peptídeos foram utilizados para protocolos de imunização: a) ativa (resposta imune do camundongo contra o peptídeo); b) passiva (transferência de esplenócitos de camundongos previamente imunizados para outro não imunizado). Apenas o peptídeo com maior homologia com a ApoB-100 murina apresentou efeito ateroprotetor com a imunização ativa. Este estudo mostrou que a imunização ativa pode induzir o aumento de IgG anti-LDLox, da expressão de INF- γ , IL-4 e IL-10 e, conseqüentemente, reduzindo o tamanho da placa aterosclerótica, quando comparada com o controle não imunizado. Em relação a imunização passiva, o mesmo peptídeo obteve resultados positivos quando comparado o tamanho da placa com o controle não imunizado, porém sem aumentar os níveis de IgG ou IgM contra a LDLox.

Em outro estudo, Fredrikson et al (2008) imunizaram camundongos LDLr -/- transgênicos para a ApoB-100 humana com dois peptídeos selecionados a partir da biblioteca de peptídeos da sequência linear da ApoB-100 humana e sem nenhuma modificação. Os resultados demonstraram um aumento de IgM reativo à LDL nativa e LDL oxidada com cobre, porém sem aumento de IgG ou dos genes IL-10, FOXP3, CCR4 (marcadores de resposta Th2) ou TIM3 (marcador de resposta Th1). Entretanto, observou-se redução da placa aterosclerótica quando comparada com o controle não imunizado, sugerindo um efeito ateroprotetor a partir da resposta imune-humoral (FREDRIKSON et al, 2008).

O desenvolvimento dos peptídeos mimotopos da LDL eletronegativa pelo nosso grupo de pesquisa abre uma gama de possibilidades. Esses peptídeos não representam regiões da sequência linear da ApoB-100 humana, mas sim microdomínios conformacionais de epítomos da ApoB-100 da LDL (-), isolada do plasma humano, o que os tornaria mais específicos para a imunomodulação da aterogênese.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos de peptídeos mimotopos da LDL (-), p1A3 e p2C7 em células endoteliais e macrófagos.

2.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar a forma, tamanho e estabilidade dos peptídeos mimotopos através de SAXS (espalhamento de raios X em baixo ângulo);
- Avaliar os efeitos dos peptídeos mimotopos da LDL (-) em diferentes linhagens de células endoteliais humanas (HUVEC, HAEC e EA.Hy 926);
- Avaliar os efeitos dos peptídeos mimotopos da LDL (-) em macrófagos murinos primários derivados de medula óssea.

Os tópicos materiais e métodos, resultados e discussão para cada um dos objetivos específicos serão apresentados separadamente, a seguir.

Objetivo 1: Avaliar a forma, tamanho e estabilidade dos peptídeos mimotopos através de SAXS (espalhamento de raios X em baixo ângulo);

3. Material e Métodos

3.1. Peptídeos p1A3 e p2C7

Os peptídeos foram sintetizados e importados pela *Chinese Peptide Company* (Hangzhou, China) com pureza superior à 95%. Para as análises de SAXS, 1 miligrama de peptídeo foi diluído em 500 µL água ultrapura em frasco âmbar e refrigerado a 4 °C até as análises.

3.2. Espalhamento de raios X a Baixo Ângulo

Os experimentos de SAXS foram realizados na Universidade de São Paulo, com colaboração com o Prof. Dr. Cristiano L.P. Oliveira, membro do Grupo de Fluidos complexos do Instituto de Física (IFUSP). As medidas foram feitas no equipamento Xenocs-Xeuss™, para esse equipamento é feito o uso de uma fonte GENIX, espelhos Fox2D e composto de dois conjuntos de sistema de colimação *scatterless slits*, fornecendo um alto fluxo ($\sim 0.5 \times 10^8$ p/s/mm²) com baixo espalhamento parasita.

As Amostras (2 mg/mL de p1A3 ou p2C7) foram analisadas em capilares de quartzo reutilizáveis que são acomodados em uma estrutura de aço inoxidável. Com essa porta amostra podemos realizar todas as medidas de calibração com o mesmo suporte, isso minimiza o *background*, reduzindo erros de subtração, sendo eles relevantes para o caso, pois a amostra apresenta baixo espalhamento, além disso medidas do espalhamento da água nas mesmas condições foram feitas, e isso possibilitou ter dados em escala absoluta.

Para o tratamento dos dados de espalhamento utilizou-se o pacote SUPERSAXS (OLIVEIRA e PEDERSEN, dados não publicados), onde com o uso do espalhamento da água como padrão, finalmente o perfil de SAXS para os peptídeos são obtidos em escala absoluta (cm)⁻¹. A normalização dos dados a uma escala absoluta permite a estimativa do peso molecular das partículas (OLIVEIRA, 2011).

Foram utilizadas duas distâncias da amostra até o detector: 100 e 38 cm. Para dados com melhor estatística as medidas foram realizadas em vários frames de 1800 segundos de duração. Na distância a 100 cm dados de SAXS foram coletados em duas temperaturas, 20 e 36°C. Para a distância de 38 cm foi realizada apenas à 20 °C. Os frames foram analisados em cada caso comparados a média, a fim de verificar a estabilidade da amostra e melhorar a qualidade dos dados.

A intensidade espalhada é mostrada como uma função do módulo do vetor de transferência de momento no espaço recíproco, expresso por:

$$q = \frac{4\pi \sin(\theta)}{\lambda} /$$

Sendo λ o comprimento de onda da radiação incidente e 2θ o ângulo de espalhamento.

Duas abordagens de modelagem foram utilizadas para descrever os dados experimentais. Primeiramente, foi utilizada a transformada indireta de Fourier (IFT), assumindo que o sistema é composto por partículas idênticas (sistema monodisperso), e como resultado foi calculado a função distribuição de pares de distâncias $p(r)$ para a partícula espalhadora (GLATTER, 1977). A partir da forma da função $p(r)$ é possível ter indicativos sobre a forma geral das partículas dispersas e também possíveis agregados, raio de giro médio R_G e tamanho máximo da partícula $D_{\max}$ (Oliveira, 2011).

A segunda modelagem foi assumindo que as partículas poderiam ser descritas como um anel circular de aminoácidos. Assumimos que o anel peptídico é constituído por um arranjo circular de esferas e a intensidade é calculada utilizando a fórmula de Debye:

$$I_{\text{mod}}(q) = \sum_{i,j} f_i(q) f_j(q) \frac{\sin(qr_{ij})}{qr_{ij}}$$

Onde r_{ij} é a distância entre o centro das esferas i e j , respectivamente e $f(q)$ é a forma fatorada de uma esfera homogeneia de raio K :

$$f(q) = 3 \frac{\sin qK - qK \cos qK}{q^3 K^3}$$

As esferas são colocadas de modo a formar um anel circular (*Figura 7*). Cada esfera neste modelo representa um aminoácido, o único parâmetro ajustado é o raio do anel (R). A distância d entre os aminoácidos é presumida como fixa ($3,6\text{\AA}$) e N o número de aminoácidos do anel que pode ser expresso por: $N = 2\pi R / 3,6$

Em alguns casos foi observada a presença de agregados no sistema. Afim de combinar o fator do anel circular e da presença de agregados é utilizado o fator de estrutura global $S(q)$ para agregados com raio de rotação R_G (Oliveira, 2014).

$$S(q) = 1 + S_{c_2} e^{-\frac{q^2 R_G^2}{3}}$$

Sendo assim, o modelo final é dado por:

$$I_{\text{th}}(q) = S_{c_1} I_{\text{mod}}(q, R) \left(1 + S_{c_2} e^{-\frac{q^2 R_G^2}{3}} \right) + \text{back}$$

Portanto, neste modelo que temos como parâmetros de ajuste do fator de escala geral S_{c_1} , o raio do anel R , a escala do fator de agregados S_{c_2} , o raio de rotação dos agregados R_G e a constante de *background*.

Figura 7: Modelo de anel peptídico: Esboço da construção do anel circular. d : distância entre o raio de 2 aminoácidos; N : número de aminoácidos do anel; R : raio do anel composto pelos aminoácidos.

4. Resultados:

Os resultados obtidos a 100 cm de distância da amostra até o detector são mostrados na figura 8. Nesta distância foram realizadas medidas de p1A3 e p2C7 em duas temperaturas (*Figura 8A*). A função distribuição de pares de distância $p(r)$ calculada é mostrada na Fig.8B e os resultados obtidos através do método de IFT é mostrado na Tabela 1.

Em todos os perfis $I(q)$ vs q é possível observar um aumento na intensidade espalhada em torno de $q \sim 0.05 \text{ \AA}^{-1}$. Este aumento é um indicativo da presença de agregados no sistema. A presença de agregados é também observada no raio de giro médio e tamanho máximo obtidos (*Tabela 1*), o que indica a presença de partículas grandes com maior massa molecular.

Era esperado a formação de anéis peptídicos circulares de massa molecular de aproximadamente 1,5 kDa. O tamanho teórico deste anel, assumindo a distância típica entre os aminoácidos como 3,6 Å, seria entre 12-14 Å de diâmetro ou $\sim 6-7$ Å de raio. Calculando a intensidade teórica deste anel circular, observamos que no intervalo angular utilizado nesta análise ($0.015 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.4 \text{ \AA}^{-1}$) a contribuição da dispersão dos anéis seria quase constante (dados não apresentados) e, portanto, seria difícil detalhar o tamanho do anel peptídico. Entretanto, utilizamos uma distância menor entre a amostra e o detector (38 cm).

Nesta etapa, distância amostra-detector de 38 cm, utilizando uma janela espectral em q de $0.05 \text{ \AA}^{-1} < q < 1.0 \text{ \AA}^{-1}$, foi possível obter informações sobre a estrutura do anel.

Figura 8: Dados de SAXS para as amostras p1A3 e p2C7. (a) Dados de SAXS para amostras à 100 cm de distância do detector e duas temperaturas, 20 °C e 36 °C. Símbolos: dados experimentais; Linha sólida: IFT. (b) curvas de $p(r)$ para cada amostra calculada pela IFT. (c) Dados experimentais de SAXS para p2C7 à 38 cm e 20 °C. Símbolos: dados experimentais; Linha sólida: IFT. (d) curva de $p(r)$ para p2C7 à 38 cm e 20°C.

Na figura 8C foi demonstrado os resultados obtidos para o p2C7 à distância de 38 cm. Os dados de SAXS apresentam muito ruído devido à baixa dispersão promovida pela amostra, o que está relacionado ao pequeno tamanho do anel e à baixa concentração do peptídeo. A curva obtida de $p(r)$ (Figura 8D) é similar às obtidas para objetos ocós (OLIVEIRA, 2011), o que era esperado para o anel circular. Como demonstrado na tabela 1, a D_{max} obtida para as medidas à distância de 38 cm é similar à obtida pelo modelo teórico de anel circular, uma importante indicação da formação de anéis peptídicos circulares no sistema. Com os dados normalizados à uma escala absoluta, é possível estimar a massa molecular da partícula, com valor aproximado de $1,54 \pm 0,16$ kDa, o que está em completo acordo com o valor esperado para um anel de 10 aminoácidos.

Tabela 1: Parâmetros obtidos a partir da IFT.

Distância	Parâmetros	Amostras	
		P1A3	P2C7
100 cm	R_G [Å] (20 °C)	53(1)	112(2)
	R_G [Å] (36 °C)	67(5)	130(5)
	D_{max} [Å] (20 °C)	~120	~200
	D_{max} [Å] (36 °C)	~345	~370
	MW* [kDa] (20 °C)	~600	~3000
	MW* [kDa] (36 °C)	~1000	~9000
38 cm (20 °C)	R_G [Å]	---	6.8(2)
	D_{max} [Å]	---	~14.5
	MW [kDa]	---	1.54(16)

Afim de otimizar a modelagem, foi utilizado o modelo de anel circular para descrever os dados de SAXS. Como mencionado anteriormente, a 100 cm não foi possível otimizar os parâmetros, uma vez que a contribuição neste intervalo angular é quase constante. Portanto, mantivemos constante o raio do anel no modelo (assumindo um anel com 10 aminoácidos) e otimizamos os parâmetros. Esta abordagem permite detalhar a descrição dos agregados formados. Para uma distância menor (38 cm) a faixa angular permite otimizar os parâmetros de anel circular (*Figura 9A e Tabela 2*).

Figura 9: Dados de SAXS obtidos utilizando o modelo de anel circular para p1A3 p2C7. (a) Modelagem dos dados coletados à 100 cm. Símbolos: dados experimentais; Linha sólida: Modelo ajustado. (b) Modelagem dos dados colhidos à 38 cm (p2C7). Símbolos: dados experimentais; Linha sólida: Modelo ajustado.

Portanto, os valores obtidos do raio do anel estão em completo acordo com o esperado para um anel de 10 aminoácidos. Em resumo, os resultados de SAXS e a análise dos dados demonstram que o anel circular de aminoácidos é formado com sucesso, mas o sistema possui a formação de agregados com maior tamanho para o peptídeo p2C7.

Tabela 2: Parâmetros obtidos utilizando o modelo de anel circular com a formação de agregados

Distância	Parâmetros	Amostras			
		P1A3 (20 °C)	P2C7 (20 °C)	P1A3 (36 °C)	P2C7 (36 °C)
100 cm	Sc1	0.0005(1)	0.0004(1)	0.00008(1)	0.0004(1)
	R [Å]	5.7*	5.7*	5.7*	5.7*
	N**	10	10	10	10
	Sc2	9(5)	138(20)	30(15)	137(31)
	R _G [Å]	86(28)	98(4)	71(25)	98(5)
38 cm	Sc1	---	0.0006(1)	---	---
	R [Å]	---	5.8(1)	---	---
	N**	---	10.1(2)	---	---

5. Discussão:

Peptídeos cíclicos biologicamente ativos têm sido desenvolvidos, sendo úteis como agentes terapêuticos ou ferramentas bioquímicas (JOO, 2012). Como os peptídeos p1A3 e p2C7 não representam sequências lineares de aminoácidos correspondentes da ApoB-100 e por possuírem características predominantemente apolares, esses resíduos devem representar uma alteração conformacional da apoB-100 que se originou devido às modificações sofridas *in vivo*.

Foi utilizada a técnica de SAXS para mostrar a conformação de anéis circulares e a estabilidade dos peptídeos nas condições utilizadas, sendo que a atividade biológica e o reconhecimento dos peptídeos p1A3 e p2C7 são atreladas à sua conformação.

Medidas de SAXS para sistemas de polipeptídios circulares foram realizadas para amostras em solução. Duas metodologias de análise foram realizadas para a descrição dos dados. Em uma primeira tentativa as amostras apresentaram a formação de agregados e devido à baixa resolução não foi possível determinar os parâmetros das partículas espalhadoras no sistema com precisão. Apesar disso, foi possível observar um aumento na formação de agregados com a variação da temperatura. Em uma segunda rodada de experimentos, as condições experimentais foram otimizadas e novos dados de SAXS foram obtidos. Com a modelagem aos dados experimentais adotada a análise destes novos dados foi possível demonstrar a formação dos anéis peptídicos, sendo possível obter o raio do anel e o peso molecular.

Como mencionado anteriormente, medidas neste tipo de sistemas são extremamente difíceis devido à baixa intensidade espalhada. Utilizando o aparato experimental do IFUSP foi possível obter dados consistentes e demonstrar a formação dos anéis peptídicos. Quanto à estabilidade dos peptídeos, foi observado através de SAXS a agregação de p2C7 em ambas as temperaturas, porém foi necessário utilizar uma amostra altamente concentrada (2 mg/mL), podendo ser a causa da agregação.

Existem diversos peptídeos cíclicos com atividades biológicas diferentes, como antibactericidas, imunossuppressores, antitumorais entre outros. Usualmente, peptídeos cíclicos apresentam melhor atividade biológica quando comparados com sua forma linear devido à sua conformação (HORTON et al, 2002). A rigidez dos peptídeos cíclicos diminui a energia livre de Gibbs, permitindo assim, uma ligação mais estável com a molécula ou receptor alvo (JOO, 2012). Os peptídeos cíclicos são mais resistentes a degradação proteolítica do que seus isômeros lineares (MARCH, 1996) e a redução da flexibilidade de conformação melhora a permeabilidade celular destas moléculas (KWON e KODADEK, 2007). A manutenção da conformação dos peptídeos circulares p1A3 e p2C7 é de fundamental importância para sua atividade biológica.

A conformação dos peptídeos pode ser vista como importante para outros peptídeos derivados da ApoB-100. Nomeado como ApoBDS-1, o peptídeo linear composto por 20 aminoácidos sequenciais da ApoB-100 humana tem seu efeito pró-inflamatório inibido pela modificação do peptídeo com MDA (KETELHUTH et al, 2011). Apesar de ser um peptídeo linear, a total liberdade da cadeia permitiu assim uma conformação a qual é reconhecida pelas células THP-1 avaliadas no trabalho, a adição de uma molécula de MDA ao peptídeo desestruturou o sítio de reconhecimento pelas células.

Outros peptídeos cíclicos são descritos tendo sua atividade dependente da conformação. Os peptídeos L-22 e KP-Z-41, utilizados no tratamento para HIV, interferem na ligação entre a proteína transativadora do HIV (Tat) com o elemento responsivo (TAR) (LI et al, 2013).

Sendo assim, restringir a conformação dos peptídeos, formando uma ponte dissulfeto, é uma estratégia interessante e útil para garantir a conformação de epítomos ou domínios proteicos reconhecidos por anticorpos ou receptores celulares.

Objetivo 2: Avaliar os efeitos dos peptídeos mimotopos da LDL (-) em diferentes linhagens de células endoteliais humanas (HUVEC, HAEC e EA.Hy 926);

6. Material e Métodos:

6.1. Isolamento da fração LDL

A coleta de sangue de indivíduos voluntários foi realizada a vácuo através de punção em veia do antebraço. Foram coletados cerca de 30 mL de sangue em tubos estéreis Vacutainer® (6 mL) contendo EDTA como anticoagulante (1 mg/mL). Foi utilizado material estéril e descartável para essas coletas. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 500 g por 10 minutos a 4 °C para a obtenção do plasma. Ao plasma foi imediatamente adicionado o coquetel antioxidante contendo: hidroxitolueno butilado (BHT 20 mM) e inibidores de protease: aprotinina (2 µg/mL), benzamidina (2 mM) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF 1 mM). A amostra foi armazenada à -20 °C até o início do isolamento da fração LDL.

Para o isolamento da subfração eletronegativa da LDL, o plasma foi submetido à ultracentrifugação sequencial, utilizando-se a ultracentrífuga Beckman Coulter, modelo Optima™ XPN, com rotor Beckman Coulter de ângulo fixo T 70.1. A densidade do plasma foi ajustada para 1,019 g/mL com brometo de potássio e o plasma foi centrifugado a 215.000 g durante 7 horas a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante do tubo (halo branco contendo a VLDL) foi retirado com auxílio de uma pipeta. A densidade do infranadante foi então corrigida para 1,065 g/ml com adição de brometo de potássio e, então, novamente centrifugado a 215.000 g por 7 horas a 4 °C. O sobrenadante (halo laranja contendo a LDL) foi retirado e armazenado em frascos protegidos da luz, à -20 °C, até a separação das subfrações da LDL por cromatografia líquida (FPLC).

6.1.1. Isolamento da subfração da LDL eletronegativa

Para a separação da subfração da LDL eletronegativa, utilizou-se cromatografia de troca aniônica (coluna UNO Q) no cromatógrafo líquido (FPLC, ÄKTA), utilizando-se tampão Tris-HCL 10 mM (pH = 7,4) na bomba A e Tris-HCL 10 mM (pH = 7,4) com 1M de NaCl na bomba B. A LDL nativa é eluída no gradiente de 0-10% de tampão B (1,5 vezes o volume da coluna) e a subfração de LDL eletronegativa é isolada com a eluição isocrática com 30% de tampão B (3 vezes o volume da coluna).

6.2. Peptídeos p1A3 e p2C7

Além dos peptídeos p1A3 e p2C7, foram importados da *Chinese Peptide Company* (Hangzhou, China) os peptídeos p1A3-Cy5/FITC e p2C7-Cy5/FITC, obedecendo as especificações de pureza superior a 95%.

6.3. Cultura celular

6.3.1. HUVEC

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC, CRL-2873™) foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) contendo bicarbonato de sódio 2.0 g/L, penicilina 100 UI/mL, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) inativado, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C.

6.3.2. HAEC

As células endoteliais de artéria humana (HAEC, C-006-5C) foram obtidas comercialmente da *Thermo Fisher Scientific* e cultivadas em meio comercial EC 200 (Thermo), suplementadas com *Low Serum Growth Supplement* (LSGS, S-003-10, Thermo), de acordo com especificações da empresa, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C.

6.3.3. EA.Hy 926

As células endoteliais EA.Hy 926 (BCRJ, 0345) foram obtidas comercialmente pelo Banco de Células do Rio de Janeiro. Trata-se de um hibridoma de células primárias HUVEC com células de adenocarcinoma A549. Essas células foram cultivadas em meio DMEM High Glicose (Gibco) contendo bicarbonato de sódio 2,0 g/L e penicilina 100 UI/mL, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) inativado, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ à 37 °C.

6.4. Ensaio de Viabilidade Celular

6.4.1. MTT

Foram cultivadas 1×10^4 células por poço, em placa de cultura de 96 poços. As células foram tratadas com diferentes concentrações de LDL (-), p1A3 e p2C7, assim como um poço não tratado (controle). As células foram, então, incubadas por 24 horas. Após o tempo de incubação, o meio foi removido e substituído por 20 µL de solução de MTT 5 mg/mL em PBS + 80 µL de meio RPMI 10% SFB. Após incubação em estufa de CO₂ por 4 horas, o meio foi removido e adicionou-se 100 µL de DMSO. A placa foi mantida sob agitação por 30 minutos e lida em leitor de placas (Synergy, BioTek®) em 580 nm.

6.4.2. Ensaio de Morte Celular (Anexina/PI)

Para o ensaio de apoptose e necrose, foram cultivadas 2×10^5 células por poço em placa de cultura de 24 poços. As células foram tratadas por 24 horas e, após o tempo de incubação, a placa foi retirada da incubadora de CO₂ e dado início ao procedimento de marcação. O sobrenadante de cada poço foi aspirado para tubos específicos do citômetro e os poços lavados com 500 µL de tampão PBS 1X, tendo sido

aspirado para o mesmo tubo. Adicionou-se em cada poço da placa 200 µL de tripsina inativada com 400 µL de SFB e todo o volume foi transferido para o seu respectivo tubo do citômetro. As amostras foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Seguiu-se então para o procedimento de lavagem, onde o sobrenadante foi descartado, adicionando-se ao pellet de células 200 µL de tampão de reação contido no kit para detecção de apoptose e necrose (*Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit*, Sigma). Após ressuspender o pellet, foram adicionados 5 µL de Anexina V – FITC e 5,0 µL de iodeto de propídeo. Os tubos foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente, protegidos da luz, e levados ao citômetro para leitura imediata.

6.5. PCR em tempo Real (qPCR)

6.5.1. Extração do RNA

O RNA total foi extraído utilizando-se TRIzol (Life Technologies) segundo especificações do fabricante. A quantificação do RNA extraído foi realizada em espectrofotômetro, considerando-se de boa qualidade os RNAs que apresentaram uma razão da absorbância 260/280 nm com valores próximos de 2.

6.5.2. Construção do cDNA

Para sintetizar o cDNA foram utilizadas 2 µg de RNA para 4 µL de *SuperScript VILO Master Mix* (Life Technologies) para uma reação de 20 µL (volume acertado com H₂O ultrapura), de acordo com as especificações do fabricante. Os tubos foram incubados por 5 min a 65 °C, 120 min a 50 °C e 5 min a 95 °C. Após a reação, os tubos foram colocados imediatamente em gelo e armazenados a -20 °C.

6.5.3. Quantificação da expressão gênica (mRNA)

A quantificação da expressão gênica foi avaliada por reações de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR) realizadas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System® (Applied Biosystems), utilizando primers específicos obtidos da empresa Exxtend. Para investigação dos efeitos sobre a expressão gênica, o protocolo padrão de RT-qPCR descrito a seguir foi empregado: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60 °C por 60 segundos. Para este protocolo foram utilizados 1 µg de cDNA, 0,4 µL da mistura de um dos pares de primers sense e antisense de cada gene avaliado, 3,6 µL de água ultrapura estéril e 5 µL de SYBR Green Master Mix® (reação de 10 µL). Para a quantificação dos resultados foi utilizado o método comparativo Ct.

6.6. Ensaio de captação dos peptídeos por células endoteliais

6.6.1. Citometria de fluxo

Foram utilizados 1×10^5 células para cada poço em uma placa de cultura de 24 poços. As células foram tratadas por até 5 horas com os peptídeos p1A3, p2C7 ou LDL (-). A marcação da LDL (-) foi feita utilizando-se o corante fluorescente Dil (1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate) por 16 horas à 37°C em ambiente protegido de luz e os peptídeos foram obtidos comercialmente conjugado com FITC ou Cy5. Após a remoção das células da placa, elas foram encubadas em 5 mL de tripsina afim de remover qualquer peptídeo ou LDL (-) que estivesse ligada a membrana celular. Todos os experimentos foram realizados no citômetro FACSCanto™ Flow Cytometer e os resultados foram analisados através do software Flow Jow Versão 10.0.2.

6.6.2. Inibidor de captação pelo receptor LOX-1

Para inibir o receptor LOX-1, antes de serem tratadas com 50 µg/mL de p1A3-Cy5 ou p2C7-Cy5, as células foram tratadas com 4 µg/mL ou 8 µg/mL, por 30 minutos, com o anticorpo anti-LOX-1 (Abcam, ab81709). Após a remoção das células da placa, essas foram incubadas em 5 mL de tripsina afim de remover qualquer peptídeo que estivesse ligado à membrana celular. As células foram tratadas então com os peptídeos por 300 minutos a captação dos peptídeos pelas células foi analisada em citômetro de fluxo (FACSCanto™ Flow Cytometer).

6.7. Ciclo Celular

Foram plaqueadas 1×10^6 células em placa de 6 poços. As células foram sincronizadas com 1% de SFB inativado em RPMI 1640 por 24 horas para então serem tratadas com 50 µg/mL de p1A3 ou p2C7 em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB por 24 horas. As células foram fixadas com etanol 70% (v:v em água) por 30 minutos no gelo, lavadas com PBS 2 vezes e tratadas com 100 µg/mL de RNase A. Foram então adicionados 400 µL de iodeto de propídio (50 µg/mL) para serem lidas no citômetro de fluxo em fluxo lento. Todos os experimentos foram realizados no citômetro FACSCanto™ Flow Cytometer e os resultados foram analisados através do software Flow Jow Versão 10.0.2.

7. Resultados

7.1. Padronização dos ensaios com as células endoteliais

As células HUVEC são amplamente utilizadas para se estudar processos que afetam a função endotelial, tais como a aterosclerose. Apesar das células HUVEC terem sido escolhidas inicialmente para a realização dos ensaios observou-se grande variabilidade entre os ensaios dependendo do número de passagens da cultura (*Anexo I*), tendo sido necessário se avaliar a confiabilidade do uso destas células

Para isso, foram realizados ensaios de expressão gênica (qPCR) comparando três linhagens celulares (HAEC, HUVEC e EA.Hy926). Essas células foram ativadas com 1 ng/mL de TNF- α por 4 horas, avaliando-se a expressão de genes característicos de células endoteliais.

Figura 10: Efeito da ativação de células endoteliais por TNF- α sobre a expressão gênica de CD-31 e CD-144. 1×10^6 células por poço foram estimuladas com 1 ng/mL de TNF- α por 4 horas. A análise dos dados resultantes de PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. ** $p < 0,001$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

Foram avaliados, primeiramente, a expressão de dois genes constitutivos de células endoteliais, CD-31 (PCAM) e CD-144 (VE-Caderina) (*Figura 12*). As células HUVEC não expressaram CD-31 e apresentaram expressão gênica inferior de CD-144, em comparação com a HAEC e EA.Hy 926. As células endoteliais arteriais (HAEC) e venosas (EA.Hy 926) apresentaram valores de expressão iguais ao controle sem estímulo com o TNF- α , obtendo-se assim, valores de expressão relativa iguais a 1.

Quanto aos receptores endoteliais avaliados (*Figura 13*), as células HAEC e EA.Hy 926 tiveram aumento na expressão gênica de ICAM-1, VCAM-1 e CD-62E quando comparados com a célula HUVEC, a qual não apresentou alterações (valores de expressão relativa iguais a 1). Apesar das células HAEC e EA.Hy 926 apresentarem níveis de expressão gênica superiores aos encontrados na célula HUVEC, a linhagem arterial teve um aumento de expressão relativa de CD-62E quando comparada com a linhagem venosa. Apenas nas células HAEC a expressão de LOX-1 foi alterada com o

estímulo do o TNF- α , quando comparada com as outras linhagens, porém todos as culturas celulares apresentaram expressão deste gene.

Figura 11: Efeito da ativação de células endoteliais por TNF- α sobre a expressão gênica de ICAM-1, VCAM-1, LOX-1 e CD-62E. 1×10^6 células por poço foram estimuladas com 1 ng/mL de TNF- α por 4 horas. A análise dos dados resultantes de PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. **** $p < 0,00001$, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

Para os genes CSF2 e IL-8, importantes mediadores inflamatórios, o estímulo com TNF- α aumentou a expressão de ambos os genes, para as linhagens HAEC e EA.Hy 926, quando comparados com a HUVEC, porem com uma maior expressão de CSF2 para a linhagem HAEC quando comparada com a EA.Hy 926 (*figura 14*).

Os genes da família IL-1 (*Figura 15*), IL-1a e IL-1b, apresentaram expressão relativa superior nas células HAEC e EA.Hy 926 em resposta ao estímulo com TNF- α , quando comparadas com a HUVEC. Quanto ao gene eNOS (*Figura 16*), todas as linhagens celulares apresentaram valores de expressão relativa inferiores a 1, ou seja, menores do que o controle das células não estimuladas com TNF- α , sem haver diferença entre as três linhagens estudadas.

Figura 12: Efeito da ativação de células endoteliais por TNF- α sobre a expressão gênica de CSF2 e IL-8. 1×10^6 células por poço foram estimuladas com 1 ng/mL de TNF- α por 4 horas. A análise dos dados resultantes de PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. **** $p < 0,00001$, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

Figura 13: Efeito da ativação de células endoteliais por TNF- α sobre a expressão gênica de IL-1a e IL-1b. 1×10^6 células por poço foram estimuladas com 1 ng/mL de TNF- α por 4 horas. A análise dos dados resultantes de PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

Figura 14: Efeito da ativação de células endoteliais por TNF- α sobre a expressão gênica de eNOS. 1×10^6 células por poço foram estimuladas com 1 ng/mL de TNF- α por 4 horas. A análise dos dados resultantes de PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

7.2. Ensaios com os Peptídeos Mimotopos da LDL (-)

7.1.1. Viabilidade Celular (MTT)

Inicialmente foi avaliado o efeito citotóxico que os peptídeos mimotopos poderiam ter sobre as células endoteliais EA.Hy 926 (hibridoma de célula do endotélio venoso) e HAEC (célula do endotélio arterial), através do ensaio de viabilidade celular com o MTT (*Figura 15*).

Concentrações acima de 25 µg/mL e 50 µg/mL do peptídeo p1A3 diminuíram a viabilidade celular das linhagens EA.Hy 926 (*Figura 15A*) e HAEC (*Figura 15B*), respectivamente. Observou-se porcentagem de morte celular $\geq 50\%$ para a concentração de 200 µg/mL do p1A3 para as células EA.Hy 926, sem citotoxicidade observada para o p2C7. No caso das células HAEC, o p1A3 afetou a viabilidade celular, mas em menor intensidade, comparado ao hibridoma EA.Hy 926. O peptídeo p2C7 diminuiu a viabilidade celular na concentração de 200 µg/mL apenas nas células HAEC (*Figura 15B*).

Figura 15: Ensaio de viabilidade celular com MTT. 1×10^4 células foram tratadas com concentrações (12,5 até 200 µg/mL) de LDL (-), p1A3 ou p2C7 por 24 horas. Foi avaliada a capacidade mitocondrial de conversão do sal MTT em formazana das células (A) EA.Hy 926 e (B) HAEC, comparado com o controle não tratado. Dados expressos como média $\pm$ SD. ** $p < 0.005$ e *** $p < 0.0005$ quando comparada a LDL (-) com o controle não tratado; ### $p < 0.005$ e #### $p < 0.0005$ quando comparado o p1A3 com o controle não tratado; \$ $P < 0.05$ quando comparado p2C7 com o controle não tratado. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

7.1.2. Ciclo Celular

Verificamos o efeito dos peptídeos mimotopos sobre o ciclo celular das células HAEC, utilizando uma concentração não citotóxica, selecionada pelo ensaio de MTT. Observamos que o tratamento com 50 mg/mL de p1A3, mas não de p2C7, reduziu o número de células na fase S.

Ciclo Celular

Figura 16: Ciclo celular das células HAEC tratadas com p1A3 ou p2C7. 1×10^6 células HAEC foram tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 24 horas. As células foram então fixadas e marcadas com iodeto de propídeo para avaliar a quantidade de DNA por célula por citometria de fluxo. Os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi aplicado o teste estatístico TwoWay Anova com a correção de Sidak para múltiplas comparações. * $p < 0,05$, $n = 3$.

7.3. Captação dos Peptídeos por Células EA.Hy 926 e HAEC

A captação dos peptídeos foi avaliada no hibridoma EA.Hy 926 e nas células HAEC por citometria de fluxo (*Figura 17 e 18*). Para as células avaliadas, ambos os peptídeos apresentaram rápida ligação, com aproximadamente 100% das células marcadas com fluorescência em 15 minutos (*Figura 17A e B*). Observou-se visível diferença entre p1A3-Cy5 e p2C7-Cy5 apenas quando se avaliou a medida da intensidade da fluorescência (MIF, *Figura 17A e B*). Foi possível verificar que em tempos superiores a 180 minutos o peptídeo p1A3 teve maior captação pelo hibridoma (*Figura 17A*), quando comparado ao p2C7 e em todos os tempos a MIF para as células HAEC marcadas com p1A3 foi superior as células marcadas com p2C7 (*Figura 18B*). A captação da LDL (-) foi mais lenta e está de acordo com dados anteriormente descritos (CHANG, 2013).

Foi possível inibir a captação dos peptídeos bloqueando o receptor LOX-1. Houve uma redução de até 25%, quando comparado com o controle não tratado com o anticorpo anti-LOX1, de ambos os peptídeos (*Figura 19*). Foi demonstrado também que as maiores concentrações do anticorpo anti-LOX1 foram mais eficazes no bloqueio da captação dos peptídeos, porém sem diferença entre a inibição quando comparado os 2 tratamentos.

Figura 17: Porcentagem de células endoteliais marcadas pelos peptídeos mimotopos ou LDL (-). (A) 1×10^5 células EA.Hy 926 foram tratadas por até 5 horas com 25 $\mu\text{g/mL}$ do controle LDL (-) marcada com DiI, 25 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 marcado com Cy5 ou 25 $\mu\text{g/mL}$ de p2C7 marcado com Cy5 e (B) 1×10^5 células HAEC foram tratadas por até 5 horas com 50 $\mu\text{g/mL}$ do controle LDL (-) marcada com DiI, 50 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 marcado com Cy5 ou 50 $\mu\text{g/mL}$ de p2C7 marcado com Cy5. A leitura foi feita por citometria de fluxo e foi avaliada a porcentagem de células marcadas, $n=1$.

Figura 18: Mediana da intensidade de fluorescência de células endoteliais tratadas com os peptídeos mimotopos ou LDL (-). (A) 1×10^5 células EA.Hy 926 foram tratadas por até 5 horas com 25 $\mu\text{g/mL}$ do controle LDL (-) marcada com DiI, 50 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 marcado com Cy5 ou 25 $\mu\text{g/mL}$ de p2C7 marcado com Cy5 e (B) 1×10^5 células HAEC foram tratadas por até 5 horas com 50 $\mu\text{g/mL}$ do controle LDL (-) marcada com DiI, 50 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 marcado com Cy5 ou 50 $\mu\text{g/mL}$ de p2C7 marcado com Cy5. A leitura foi feita por citometria de fluxo e foi avaliada a MIF, $n=1$.

7.4. Quantificação da expressão gênica (mRNA)

Os ensaios de expressão gênica (qPCR) foram realizados na linhagem celular HAEC. Como é possível observar (*Figuras 20, 21, 22, 23 e 24*), o peptídeo p1A3 apresentou considerável redução da expressão dos genes avaliados, quando comparado com o controle não tratado (normalizado pelo gene S18). As células tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 por 4 horas apresentaram menor atividade transcricional para os genes eNOS, IL-8, VEGF-A, VEGF-r1 e VEGF-r2, PDGF- β e TGF- β . Não houve alteração na expressão gênica das células HAEC tratadas com p1A3 quando comparadas com o controle não tratado para os genes ICAM-1, VCAM-1, CD-62E, IL-6 e CCL2. Para o tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ de p2C7, as células HAEC apresentaram alterações na expressão gênica dos genes avaliados.

Inibição da captação dos peptídeos mimotópos por LOX-1

Figura 19: Inibição da captação de p1A3 ou p2C7 por LOX-1. 1×10^5 células foram tratadas previamente por 30 minutos com 0, 4 ou 8 µg/mL de anti-LOX1, para então serem tratadas com 50 µg/mL de p1A3 – Cy5 ou p2C7 – Cy5. Foi avaliada a MIF das células e calculado a porcentagem de peptídeo por células baseado na MIF basal (0 µg/mL de anti-LOX1). Os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi aplicado o teste estatístico TwoWay Anova com a correção de Sidak para múltiplas comparações, $n = 3$.

Figura 20: Efeito dos peptídeos p1A3 e p2C7 sobre a expressão do gene eNOS e GAPDH nas células HAEC. 1×10^6 células por poço foram estimuladas com 50 µg/mL de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. A análise dos dados resultantes das PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. * $p < 0,05$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

Figura 21: Efeito dos peptídeos p1A3 e p2C7 sobre a expressão dos receptores das células HAEC. 1×10^6 células por poço foram estimulados com $50 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. A análise dos dados resultantes das PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

Figura 22: Efeito dos peptídeos p1A3 e p2C7 sobre a expressão de genes relacionados ao perfil inflamatório das células HAEC. 1×10^6 células por poço foram estimulados com $50 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. A análise dos dados resultantes das PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. ** $p < 0,005$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

Figura 23: Efeito dos peptídeos p1A3 e p2C7 sobre a expressão de genes relacionados proliferação celular de células endoteliais HAEC. 1×10^6 células por poço foram estimulados com $50 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. A análise dos dados resultantes das PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. * $p < 0,05$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

Figura 24: Efeito dos peptídeos p1A3 e p2C7 sobre a expressão de fatores de crescimento celular de células endoteliais HAEC. 1×10^6 células por poço foram estimulados com $50 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. A análise dos dados resultantes das PCR em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), os dados são expressos como média $\pm$ SD. * $p < 0,05$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

Também foram realizados os ensaios de qPCR para o hibridoma EA.Hy 926, utilizando-se o gene normalizador glicose-6-fosfato desidrogenase (GAPDH) e o estímulo de $25 \mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. Os dados de expressão relativa são mostrados nas figuras 20 e 21. Foram avaliados os genes TGF- β , CCL2, VEGF-A, VEGF-r2, eNOS, IL-1 α e CD-62E, porém não foi encontrada diferença entre os tratamentos com os peptídeos ou com a LDL (-), que possuem expressão relativa em torno de 1.

Figura 25: Efeito dos peptídeos p1A3, p2C7 ou LDL (-) sobre a expressão dos genes VEGF-A, CCL2, TGF-β e VEGF-r2 nas células EA.Hy 926. 1×10^6 células por poço foram estimulados com 25 ug/mL de p1A3 ou p2C7 por 4 horas, os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) para a análise dos dados resultantes das PCR. Foi aplicado o teste T para comparação entre dois grupos, $n=3$.

Figura 26: Efeito dos peptídeos p1A3, p2C7 ou LDL (-) sobre a expressão dos genes eNOS, IL-1α e CD-62E nas células EA.Hy 926. 1×10^6 células por poço foram estimulados com 25 ug/mL de p1A3 ou p2C7 por 4 horas. Foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) para a análise dos dados resultantes das PCR, os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi aplicado o teste T para comparação entre dois grupos, $n=3$.

Foram realizados ensaios de viabilidade, captação e expressão gênica para o modelo HUVEC antes de percebermos que a linhagem já não possuía mais as características fenotípicas adequadas, sendo estes demonstrados no *Anexo I*.

8. Discussão

8.1. Linhagens de células endoteliais

Devido à importância do endotélio no contexto da aterosclerose, onde o evento mais precoce da fisiopatologia deste processo é a disfunção endotelial (DAVIGNON e GANZ, 2004), os efeitos dos peptídeos p1A3 e p2C7 foram comparadas em três linhagens celulares endoteliais humanas: HUVEC, EA.Hy 926 e HAEC.

Células endoteliais exibem características celulares que definem seu fenótipo, como a produção do fator de von Willebrand (vWF) (JAFFE et al, 1974), expressão de CD-31, CD-144 (PUSZTASZERI et al, 2006; BREIER et al, 1996) e os receptores de VEGF 1 e 2 (OLSSON et al, 2006), a expressão induzida por TNF- α de moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1 e CD-62E) (D’ALESSIO et al, 1998; RAHMAN et al, 1998) e a captação de LDL modificada (VOYTA, 1984). Dentre estes, foi escolhida a análise da expressão dos genes constitutivos endoteliais e os envolvidos na sinalização via TNF- α para comparação entre essas linhagens celulares.

As células endoteliais da veia umbilical humana (do inglês, Human Umbilical Vein Endothelial Cells – HUVEC) são bastante utilizadas, embora sejam de origem venosa (D’ONAT et al, 2011). Em nosso estudo, não pudemos utilizar a célula HUVEC porque as células disponíveis, em diversos laboratórios, não apresentaram características fenotípicas típicas de uma célula endotelial como visto nos resultados de expressão gênica. Deduzimos que, por se tratar de uma linhagem já antiga do laboratório, a HUVEC tenha perdido suas características fenotípicas com as sucessivas passagens em cultura, sendo que diversas características são relatadas como “dependentes de passagem” (NEUBERT et al, 1997). Entretanto, mostramos que o hibridoma EA.Hy 926 possui um padrão de ativação pelo TNF- α similar ao da linhagem HAEC, porém apresentando a vantagem de ser de mais fácil cultivo.

As células endoteliais venosas EA.Hy 926 foram estabelecidas a partir da fusão da célula HUVEC com o clone resistente a tioguanina de carcinoma de pulmão A549 e selecionadas em meio HAT, e podem ser mantidas por mais de 100 passagens sem perder suas características (BAUER et al, 1992). Essa linhagem celular é comumente utilizada como modelo *in vitro* para angiogênese, sendo a linhagem permanente de células endoteliais melhor caracterizada (ARANDA e OWEN, 2009; MA et al, 2012).

A maioria dos estudos atualmente são conduzidos em linhagens celulares de origem venosa (HUVEC) (GREEN et al, 1994). Entretanto, as linhagens endoteliais arteriais estão mais próximas das condições fisiopatológicas encontradas *in vivo*, apresentando respostas diferentes das linhagens celulares venosas *in vitro* (SUNG et al, 2006). Com isso, foi avaliada a resposta via ativação por TNF- α das três linhagens celulares endoteliais (HUVEC, HAEC e EA.Hy 926).

O TNF- α promoveria tanto a disfunção (queda na produção de óxido nítrico através de uma menor atividade da enzima eNOS) (ZHANG et al, 2009) como a ativação das células endoteliais (aumento das moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias) (MODUR et al, 1996). Todas as linhagens celulares tiveram a expressão gênica de eNOS diminuída, porém as HUVECs não apresentaram características de células endoteliais ativadas pelo TNF- α . As células endoteliais venosas (EA.Hy 926) e arteriais (HAEC) apresentaram níveis aumentados de expressão dos genes avaliados responsivos ao TNF- α , que são importantes na formação e progressão do ateroma.

Esperava-se que todos as linhagens celulares expressassem valores basais dos genes CD-144 e CD-31 iguais aos do controle não tratado, considerando-se que se utilizou uma concentração baixa de TNF- α (1 ng/mL) e por um curto período de tempo (4 horas), obtendo-se assim, valores de expressão relativa iguais a 1. A expressão das moléculas CD-31 e CD-144 são moduladas negativamente por TNF- α , como demonstrado por HOFMANN et al (2002) e SAWA et al (2007), aumentando a permeabilidade do vaso sanguíneo em processos inflamatórios. No entanto, as condições *in vitro* utilizadas foram com concentrações dessa citocina 10 vezes superior à utilizada neste trabalho e com o tempo de exposição de 24 horas, não tendo sido relatadas alterações na expressão destes genes em tempos inferiores a 18 horas.

As diferenças entre as células HAEC e EA.Hy 926 estão na expressão dos receptores LOX-1 e CD-62E e no fator de diferenciação celular CSF2, sendo todos mais expressos nas células endoteliais arteriais. A expressão induzida por TNF- α de CD-62E e CSF2 para as células EA.Hy 926 está de acordo com a literatura. Essa linhagem endotelial derivada de HUVEC apresenta diferenças substanciais quanto à interação “leucócito-endotélio”, características trazidas da célula de carcinoma A549, tendo baixa expressão de CD-62E (LIDINGTON et al, 1999) e CSF2 (UNGER et al, 2002) quando ativada. Também já foi demonstrada a baixa expressão do receptor LOX-1 para esta linhagem celular (NOWICKI et al, 2007), demonstrando que a linhagem EA.Hy 926 precisa ser repensada em estudos envolvendo lipoproteínas e no contexto inflamatório.

8.2. Efeito dos peptídeos mimotopos da LDL (-) sobre as células endoteliais.

O endotélio exerce diversas funções vasoprotetoras, como a vasodilatação, restringe o crescimento das células musculares lisas e a atividade anti-inflamatória (DAVIGNON e GANZ, 2004). A interação entre as LDL modificadas e as células endoteliais inicia diferentes processos danosos à parede vascular. Observa-se diferentes respostas de acordo com a subpopulação de LDLm utilizada e linhagem celular avaliada *in vitro*, havendo diferentes receptores para seu reconhecimento e internalização dependente do grau de modificação da lipoproteína.

A captação dos peptídeos mimotopos pelas células endoteliais estudadas (EA.Hy 926 e HAEC) se deu logo nos primeiros minutos de exposição aos mesmos, porém a diferença quanto ao reconhecimento dos peptídeos pelas células endoteliais é evidenciada quando se analisa a quantidade de peptídeo captado pelas células.

Apesar de uma rápida marcação por ambos os tratamentos, a quantidade de p1A3 que é captado, tanto pelo hibridoma EA.Hy 926 quanto pela linhagem HAEC, é superior quando comparado com o peptídeo p2C7.

O principal receptor de reconhecimento da LDLox pelo endotélio é o LOX-1 (CHEN et al, 2002), estando presente, também, em células musculares lisas (HOFNAGEL, 2004) e macrófagos (CRUCET et al, 2013). Com isso, foi avaliada a importância do receptor LOX-1 para a captação dos peptídeos mimotopos da LDL (-). A captação dos peptídeos p1A3 e p2C7 foi inibida de uma maneira concentração-dependente do anticorpo anti-LOX-1.

A sinalização via LOX-1 também está relacionada à disfunção endotelial promovida pela LDLox, promovendo a diminuição da expressão de eNOS e consequentemente a redução de NO, ocasionando a vasoconstrição (ZHOU et al, 2013). A modulação gênica de eNOS foi observada para o p1A3, que foi capaz de reduzir em 60% a expressão gênica de eNOS pelas células HAEC, o mesmo não sendo observado para o peptídeo p2C7, que manteve os níveis basais de expressão de eNOS.

A contribuição do receptor LOX-1 para a aterogênese é suportada por diversas evidências. Este receptor é responsável pelo reconhecimento, internalização e degradação da LDLox pelas células endoteliais (SAWAMURA et al, 1997), a ativação pela LDLox promove o recrutamento leucocitário para o interior do vaso arterial (LI e MEHTA, 2000), assim como ativa vias de apoptose (LI et al, 2000). O reconhecimento da LDLox via LOX-1 se dá pelo domínio *lectina-like*, com grande importância dos resíduos de aminoácidos básicos presentes nesta região, promovendo uma interação eletrostática com a carga negativa da LDLox (CHEN et al, 2001). A LDL (-) também é um ligante de LOX-1, promovendo a produção de espécies reativas de oxigênio pelas células endoteliais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (CHU et al, 2013).

A composição alterada da LDL (-), rica em ácidos graxos não esterificados e lisofosfatidilcolina, é descrita como indutora do aumento de expressão de IL-8 e CCL2 em células endoteliais HUVEC, mesmo não sofrendo processos oxidativos (BENITEZ et al, 2004). Estudos mostraram que a LDLox ativa as células endoteliais HUVEC aumentando a adesão leucocitária (CHEN et al, 2015). Os peptídeos mimotopos não alteraram a expressão de genes relacionadas à atividade pró-inflamatória (IL-6), moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1, CD-62E) e quimiotaxia (IL-8 e CCL2). Provavelmente a parte lipídica da LDLm seja importante para este processo e as modificações estruturais da ApoB-100 sejam relevantes para outras vias de sinalização no endotélio.

A LDL (-) e a LDLox possuem atividade citotóxica para o endotélio. A LDL (-) compromete seriamente o potencial de membrana mitocondrial em células HUVEC, promovendo uma disfunção mitocondrial que é sugerida como o mecanismo que leva à apoptose celular (CHEN et al, 2012). Outra via sugerida é pela depleção de FGF2 estudada em BAECs (células endoteliais arteriais bovinas). Por sua vez, a LDLox

promove a apoptose de células endoteliais por causar um distúrbio no influxo de diversos íons, incluindo o cálcio, o que foi atribuído como a causa da sua citotoxicidade (SEVANIAN et al, 1995).

De fato, o peptídeo p1A3, assim como a LDL (-), mas não o p2C7, mostrou atividade citotóxica para a linhagens celulares venosa EA.Hy 926 e arterial HAEC. Concentrações acima de 25 e 50 µg/mL de p1A3 promoveram uma queda na viabilidade das linhagens EA.Hy 926 e HAEC, respectivamente. Para a EA.Hy 926 houve 50% de perda de viabilidade na concentração igual a 200 µg/mL de p1A3 e para a HAEC houve redução de 25% nessa mesma concentração. Ainda não sabemos qual é via de morte celular ativada por este peptídeo, o que deverá ser esclarecido em estudos futuros.

Mesmo sendo um hibridoma, o que lhe confere maior resistência, a linhagem EA.Hy 926 é descrita como mais sensível a alterações no estado redox celular promovido pela LDLox (CLAISE et al, 1997). Claise e colaboradores (1999) mostraram que a LDL oxidada com cobre induz apoptose nas células endoteliais HUVEC e necrose na linhagem EA.Hy 926, de modo dose-dependente.

A disfunção mitocondrial parece ser um importante mecanismo para a morte celular observada neste estudo. Células HASMC (células musculares lisas da aorta humana), quando incubadas com LDLox, apresentam uma supressão da enzima GAPDH e conseqüentemente uma depleção de ATP dependente de tempo de exposição e da concentração da LDLox (SUKHANOV et al, 2006). O peptídeo p1A3 reduziu a expressão gênica de GAPDH em células HAEC em uma concentração não citotóxica, assim como acentuada redução de VEGF-A e dos receptores de VEGF 1 e 2, importantes para a proliferação celular.

A LDLm realmente apresenta importante efeito regulador no processo angiogênico. Foi demonstrada inibição da angiogênese, via redução da expressão de VEGFr1, em modelo de *zebrafish* hipercolesterolêmico (AVRAHAM et al, 2012) e redução da proliferação celular e expressão de VEGFr2 em cultura de HUVEC com LDLox (ZHANG, 2016).

Esses dados indicam que o p1A3 não apenas pode induzir a morte das células endoteliais, mas também poderia diminuir a proliferação das mesmas. Outros fatores de crescimento celular foram suprimidos pelo p1A3, como os genes PDGF-β e TGF-β. O TGF-β possui ação autócrina nas células endoteliais, promovendo a sobrevivência celular em modelo *in vitro* de angiogênese (VINALS e POUYSSEGUR, 2001). O PDGF-β pode contribuir para a angiogênese *in vitro*, assim como a ativação do receptor de PDGF é importante para a proliferação celular e formação de tubos *in vitro*, amplificando a angiogênese via ação diretamente relacionada com a expressão de PDGF-β (BATTEGAY et al, 1994). Apesar de ser uma quimiocina, a IL-8 possui importante papel na proliferação, manutenção e regulação da angiogênese nas células endoteliais (LI, 2003), possuindo uma expressão basal em todas as linhagens celulares endoteliais (KOCH et al, 1992), tendo sua expressão diminuída pela ação do p1A3. A

ação moduladora da expressão de TGF- β também é descrita para a LDLox que, apesar de aumentar a expressão dos três subtipos de receptor para TGF, diminui a expressão do TGF- β , dependente da ativação de LOX-1, em linhagem celular HCAEC (células da coronária arterial humana) (ZHOU et al, 2013).

Corroborando com os dados de expressão gênica, foi observada a redução da fase S (duplicação de DNA) para as células HAEC tratadas com p1A3. A LDL modificada de pacientes diabéticos possui efeito similar já descrito via sinalização STAT5B e p21 (BRIZZI et al, 2002), assim como a LDLox (ZETTLER et al, 2004). Em ambos os casos, o tratamento dependente de dose e tempo foi capaz de interromper a progressão do ciclo celular nas células avaliadas. Interessantemente, o mecanismo pelo qual a LDLox inibe a progressão do ciclo celular está atrelado à regulação negativa da transcrição dos fatores de crescimento, também modulados pelo p1A3.

Outros peptídeos mimotopos foram relatados com atividade pró-apoptótica e antiangiogênica para células endoteliais. Yates-Binder et al (2012), mostrou que o peptídeo nomeado IP-10p, mimetizando o ligante de CXCL10, inibe o desenvolvimento de novos vasos *in vitro* via inibição da sinalização de VEGF em células HUVEC.

O peptídeo cíclico CIGB-300 possui características similares ao p1A3, por apresentar rápida penetração em células endoteliais e acúmulo citoplasmático, além de induzir a apoptose e alterar a expressão gênica de VEGF em células HUVEC (FARINA et al, 2011).

Esses dados sugerem que o peptídeo p1A3 pode apresentar atividade antiangiogênica e citotóxica para as células HAEC, visto que o gene GAPDH também é regulado pelo tratamento com p1A3.

Objetivo 3: Avaliar os efeitos dos peptídeos mimotopos da LDL (-) em macrófagos murinos primários derivados de medula óssea, afim de investigar a importância desses peptídeos no processo de polarização e ativação dos macrófagos.

9. Material e Métodos:

9.1. Peptídeos (p1A3, p2C7) e LDL (-)

Foram obtidos nas mesmas condições descritas nos itens 6.1 e 6.2

9.2. Cultura celular

9.2.1. Fibroblastos L929

A linhagem de fibroblastos L929 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em meio DMEM High Glicose (Gibco) contendo bicarbonato de sódio 2,0 g/L e penicilina 100 UI/mL, suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB, Gibco) inativado, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ à 37 °C. Após a terceira passagem, em garrafa de 75 cm³, foi adicionado 55 mL de DMEM high glucose suplementado com 10% de SFB inativado e as células foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ à 37 °C por uma semana. O sobrenadante foi centrifugado a 1200 RPM por 8 minutos à temperatura ambiente e então filtrado em membrana hidrofílica com poro de 0.45 µm. O meio condicionado obtido foi congelado a -20 °C até o uso como estímulo para diferenciação dos monócitos em macrófagos.

9.2.2. Macrófagos Raw 264.7

Linhagem de células leucêmicas (Raw 264.7) de monócitos e macrófagos murinos descritas por Raschke e colaboradores (1978), foram cultivados em meio RPMI 1640 contendo bicarbonato de sódio 2 g/L, estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL e 10% SFB (soro fetal bovino) inativado em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ à 37 °C.

9.2.3. Macrófagos murinos primários (BMDM)

O protocolo utilizado para a obtenção de macrófagos murions foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FCFUSP (*Anexo II*). Os macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) foram obtidos a partir da diferenciação de células medulares de camundongos C57BL/6 selvagens, saudáveis, com idade em torno de 60 dias, peso aproximado de 20 g, machos. Os animais foram tratados sem restrição alimentar ou de água, até o momento da eutanásia, quando foram anestesiados 25 µL com cloridrato de xilasina (5 mg/Kg) mais 50 µL de cloridrato de cetamina (10 mg/Kg). A eutanásia foi por deslocamento cervical.

Após eutanasiado, borrifou-se álcool 70% sobre o animal e, com auxílio de tesoura cirúrgica e pinça, a pele foi removida em torno da perna. O fêmur e a tíbia foram separados com um corte na junção dos ossos. Com o bisturi, músculos e tecido adiposo foram removidos, deixando exposto apenas o osso. As epífises foram cortadas e com auxílio de seringa e agulha o interior do osso (medula) foi lavado com meio de cultura RPMI suplementado com SFB 10% (10 mL por animal) para se obter o máximo de células.

O material foi coletado em tubo e homogeneizado com pipeta Pasteur desfazendo os grumos celulares. O material coletado foi centrifugado a 900 RPM por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de solução de lise (solução hipotônica de cloreto de amônia) afim de romper as hemácias. Após centrifugar por 8 minutos à 900 RPM, o sobrenadante foi desprezado e 2 mL de meio de cultura RPMI 1640 foi adicionado ao *pellet* e homogeneizado. As células foram diluídas na razão 1:10 em 0,1% de azul de tripan para prosseguir a contagem de células em câmara de Neubauer.

9.2.3.1. Diferenciação de monócitos com rM-CSF

Foi utilizado RPMI 1640, suplementado com 15% de SFB inativado e 10 ng/mL da proteína recombinante M-CSF (PeproTech). Vinte mililitros da suspensão de células (1×10^6 células) foi plaqueado em garrafa de 75 cm³. As garrafas foram incubadas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C por 7 dias. O meio foi trocado a cada 3 dias. A mudança de fenótipo foi acompanhada por microscopia (microscópio invertido ZEIS, Axio) e as células foram utilizadas a partir do sétimo dia.

9.2.3.2. Diferenciação de monócitos com meio condicionado dos fibroblastos L929

O meio de cultivo foi composto de 30 mL de RPMI 1640 (com 10% de soro bovino fetal), 15 mL de meio condicionado de células L929 (cultura de fibroblastos que produzem o fator de diferenciação M-CSF) e 5 mL de soro fetal bovino. Vinte mililitros da suspensão de células (1×10^6 células) foi plaqueado em garrafa de 75 cm³. As garrafas foram incubadas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C por 7 dias. O meio foi trocado a cada 3 dias. A mudança de fenótipo foi acompanhada por microscopia microscópio invertido ZEIS, Axio) e as células foram utilizadas a partir do sétimo dia.

9.3. Viabilidade Celular (MTT) e expressão gênica (qPCR)

As duas técnicas foram realizadas nas mesmas condições descritas nos itens 6.4.1 e 6.5.

9.4. Detecção de Endotoxina Bacteriana (LAL test)

Afim de confirmar que todos os ensaios foram feitos em condições livres de endotoxinas bacterianas (LPS), as vidrarias utilizadas, assim como água e meio de cultura celular foram avaliados de acordo com instruções do fabricante (LONZA). Testou-se a contaminação por endotoxinas nas vidrarias, água, soluções de LDL e de peptídeos. Toda vidraria passou pelo processo de descontaminação antes de ser avaliada ou utilizada para os experimentos (250 °C por 30 minutos), sendo devidamente armazenada. Como todos os materiais plásticos eram descartáveis e já vinham especificados como livres de endotoxinas, assim como os meios RPMI 1640, DMEM High Glucose e PBS, os experimentos seguintes foram conduzidos em condições livres de endotoxinas.

Como a solução de LDL (-) possui cor amarela (faixa de comprimento de onda no qual o produto medido pelo reagente do kit LAL absorve), foi necessário utilizar-se um outro branco (50 µL de LDL (-) + 250 µL de água). Os resultados obtidos foram:

Padrão (0,1 EU/mL):	DO: 0,4265
Branco de reagentes :	DO: 0,2095
Pool de plasma contendo LDLmm:	DO: 0,446
Branco de amostra (Soro+H ₂ O)	DO: 0,353

$$\text{LPS da amostra} = \{0,1 * (0,446-0,353)\}/(0,4265-0,2095) = 0,04 \text{ EU/mL}$$

Os valores abaixo de 0,1 EU/mL são consideráveis aceitáveis, de acordo com o fabricante.

9.5. Ensaio de captação dos peptídeos por macrófagos

9.5.1. Citometria de fluxo

Foram utilizados 1×10^5 células para cada poço em uma placa de cultura de 24 poços. As células foram tratadas por até 4 horas. Os macrófagos murinos apresentam forte aderência ao plástico, sendo necessária sua remoção da placa para a realização dos ensaios de citometria de fluxo. A utilização de tripsina, acutase ou *scraper* promoveu morte celular. Assim, a melhor forma de remoção das células, sem danificá-las, foi utilizando PBS livre de cálcio e magnésio, acrescido de 10 mM de EDTA (4 °C), e mantê-los a 4 °C por 20 minutos. Após a remoção das células da placa, elas foram encubadas em 5 mL de tripsina afim de remover qualquer peptídeo ou LDL (-) que estivesse ligada a membrana celular.

A marcação da LDL (-) foi feita utilizando o corante fluorescente Dil (1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate) por 16 horas, à 37°C,

em ambiente protegido de luz. Os peptídeos p1A3 e p2C7 foram obtidos comercialmente conjugados com FITC ou Cy5.

Todos os experimentos foram realizados no citômetro FACSCanto™ Flow Cytometer e os resultados foram analisados através do software Flow Jo Versão 10.0.2.

9.5.2. Microscopia Confocal

A técnica de microscopia confocal foi utilizada a fim de confirmar a internalização dos peptídeos pelos BMDM. Para isso, foram cultivados $2,5 \times 10^5$ células em placas de cultura de 4 poços especiais para ensaios de fluorescência. Nesse experimento, os peptídeos foram marcados com Cy5. As imagens foram obtidas através de um microscópio confocal de varredura a laser Carl Zeiss LSM510 Meta e iluminador HAL.

9.5.3. Inibidores de endocitose

Foram utilizados 1×10^5 células (BMDM) para cada poço em uma placa de cultura de 6 poços. As células foram tratadas por 1 hora com os inibidores:

- Azida de Sódio, 1 mM
- Brefeldina A, 1 μ M
- Citocalasina D, 40 μ M
- Dynasore, 80 μ M
- Monensina de Sódio, 20 μ M

O meio foi então removido e as células lavadas com PBS. Foi utilizado p1A3-Cy5 e p2C7-Cy5, ambos a 100 μ g/mL e a incubação com as células foi por 2 horas.

9.6. Quantificação de citocinas: CBA

Após tratados por 24 horas, o sobrenadante dos BMDM foi analisado através da tecnologia de *beads* BD® CBA – *Cytometric Bead Array*. O ensaio consistiu na incubação da amostra com *beads* de tamanho conhecido, contendo anticorpos primários marcados com PE que promovem a quantificação do analito em questão através da detecção de um sinal fluorescente. O ensaio foi realizado com o BD que analisa IL-12p70, TNF α , INF-g, CCL2, IL-10 e IL-6.

9.7. Quantificação de Óxido Nítrico: NOA

Foram plaqueados 2×10^5 BMDM e tratados por 24 horas com 100 μ g/mL de LDL (-), p1A3 ou p2C7, só então foi dosada a concentração de NO através da técnica de quimiluminescência. As medidas foram realizadas por meio de um analisador de óxido nítrico (NOA modelo 280, *Sievers Instruments*), que é um detector altamente sensível para a medida do NO, baseado na reação de quimiluminescência gás-fase entre o NO e o ozônio.

10. Resultados

10.1. Padronização da diferenciação de macrófagos murinos

Primeiramente avaliou-se a diferenciação de precursores obtidos da medula óssea de camundongos por dois protocolos de diferenciação. As células medulares diferenciadas com o meio condicionado por L929 ou a utilização da proteína recombinante (rM-CSF) foram comparadas com a linhagem de macrófagos RAW 264.7.

Quando comparadas quanto à homogeneidade da população celular, não foi observada diferença significativa entre as metodologias escolhidas e a linhagem RAW 264.7 (*Figura 27*), portanto, prosseguiu-se com os ensaios de ativação, avaliados por qPCR, onde 1×10^6 células foram estimuladas com $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 3 horas, sendo avaliados os genes COX2, CCL2, CXCL3, IL-18, IL-10, TNF- α , IL-6, iNOS, CD-36, IL-1 α , NF- κ B e TGF- β .

Figura 27: Diferenciação de células medulares murinas em macrófagos. Após 7 dias diferenciação, 1×10^5 células foram marcadas com anticorpo F4/80 - FITC (1:1000) e analisadas por citometria de fluxo, afim de confirmar a mudança de fenótipo, os dados são expressos como média $\pm$ SD. As células foram comparadas com a linhagem de macrófagos Raw 264.7, $n=3$.

Figura 28: Efeito da ativação dos macrófagos com LPS sobre a expressão dos genes de IL-10 e TNF- α . 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 3 horas. A análise dos dados resultantes das análises das PCR foi realizada com o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). *** $p < 0,0005$; ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$, os dados são expressos como média $\pm$ SD. Utilizou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

Figura 29: Efeito da ativação dos macrófagos com LPS sobre a expressão dos genes COX2, CCL2, CXCL3 e IL-18. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 3 horas. A análise dos dados resultantes das análises das PCR foi realizada com o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). *** $p < 0,0005$; ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$, os dados são expressos como média $\pm$ SD. Utilizou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

Figura 30: Efeito da ativação dos macrófagos com LPS sobre a expressão dos genes IL-6 e iNOS. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 3 horas. A análise dos dados resultantes das análises das PCR foi realizada com o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ os dados são expressos como média $\pm$ SD. Utilizou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

Figura 31: Efeito da ativação dos macrófagos com LPS sobre a expressão dos genes CD-36, IL-1α, NF-κB e TGF-β. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 3 horas. A análise dos dados resultantes das análises das PCR foi realizada com o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$. Utilizou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n = 3$.

Para os genes IL-6 e iNOS (*Figura 30*) foi observada diferença entre os macrófagos primários e a linhagem RAW 264.7. Isso mostra que os macrófagos primários foram mais responsivos à ativação pelo LPS, o que seria adequado para se avaliar a resposta pró-inflamatória dos peptídeos sobre os macrófagos.

Não foram observadas diferenças quanto à expressão dos genes CD36, NF-κB e TGF-β (*Figura 31*) entre os macrófagos primários e a linhagem RAW 264.7, um resultado já esperado pois o CD-36 é constitutivo para macrófagos. O NF-κB possui apresenta baixa modulação quanto ao RNA mensageiro, sendo sua maior atividade relacionada à sua fosforilação. O TGF-β não é estimulado via LPS, sendo um gene altamente expresso em fenótipos M2 de macrófagos.

Figura 32: Produção de óxido nítrico no estado basal, pós ativação (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS por 24 horas) e Δ ativação (após ativação – Basal). O sobrenadante de 1×10^6 células foi utilizado para avaliar a concentração de NO após 24 horas de estímulo com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS. *** $p < 0,0005$; ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$, os dados são expressos como média $\pm$ SD. Utilizou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n = 3$.

Para todos os outros genes avaliados (*Figuras 28, 29 e 31*), os macrófagos diferenciados com a proteína recombinante rM-CSF apresentaram níveis de expressão gênica aumentados em relação aos obtidos através do meio condicionado por células L929. Portanto, decidiu-se utilizar a rM-CSF para os próximos ensaios.

Quanto à produção de óxido nítrico, um importante indicador do fenótipo *M1* e mediador pró-inflamatório, observamos que a produção basal dos macrófagos obtidos com o meio condicionado é maior quando comparado com os obtidos com a rM-CSF ou as células RAW, sugerindo uma prévia ativação dos macrófagos ainda no processo da sua obtenção (*Figura 29*).

10.1.1. Efeitos dos peptídeos mimotopos da LDL (-) sobre os macrófagos murinos

10.1.1.1. Viabilidade celular

Para avaliar possíveis efeitos citotóxicos dos peptídeos sobre os macrófagos e escolher a melhor concentração desses para realização dos ensaios de atividade, realizou-se o teste de viabilidade celular por MTT (*Figura 30*). Quando comparados ao controle não tratado, apenas as concentrações superiores a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a LDL (-)

apresentou atividade citotóxica para os macrófagos, sendo assim, padronizou-se a concentração de 100 µg/mL também para os peptídeos nos ensaios seguintes.

Figura 33: Ensaio de viabilidade celular por MTT. 1×10^4 macrófagos murinos foram tratados com diferentes concentrações de LDL (-), p1A3 e p2C7 por 24 horas. Foi avaliada a capacidade mitocondrial da conversão do sal MTT em formazana comparando-se com o controle não tratado, os dados são expressos como média $\pm$ SD. ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n = 3$.

10.1.1.2. Captação dos peptídeos por macrófagos

murinos

Para avaliar a interação entre os peptídeos mimotopos e os BMDM, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo (*Figura 34*). Apesar de não ser observada diferença entre a porcentagem de células marcadas na cinética realizada (15 a 280 minutos), foi possível evidenciar a diferença na quantidade de peptídeo captado pelos macrófagos através da MIF (mediana da intensidade de fluorescência). Com tempos superiores a 60 minutos, os macrófagos tratados com p1A3-Cy5 apresentam MIF superior aos tratados com p2C7-Cy5, mostrando assim que apesar das células interagirem com os peptídeos, uma maior quantidade de p1A3 foi captada no mesmo tempo comparado com o p2C7. Para a LDL (-) observa-se uma internalização mais lenta com cerca de 90% de células marcadas aos 180 minutos (*Figura 31 B*), conforme descrito anteriormente (KAZUMA, 2013). Adicionalmente, ao final de 4 horas, a MIF para a LDL (-) foi inferior à dos peptídeos (*Figura 34 A*).

Figura 34 Ensaio de captação dos peptídeos pelos macrófagos avaliada por citometria de fluxo. 1×10^5 macrófagos murinos foram tratados por até 4 horas com 100 $\mu\text{g/mL}$ do controle LDL (-) marcada com Dil, 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 marcado com Cy5 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de p2C7 marcado com Cy5. A análise foi feita por citometria de fluxo, avaliando-se a mediana da intensidade da fluorescência (A) e a porcentagem de células marcadas (B), $n=1$.

Para confirmar a internalização dos peptídeos pelos macrófagos utilizou-se a técnica de microscopia confocal. As fotos foram adquiridas após 3 ou 5 horas de incubação das células com os peptídeos ou a LDL (-), com aumento de 40x e profundidade (eixo z) de 5,11 μm . Como é possível observar (*Figura 35*), tanto os peptídeos como a LDL (-) não estão apenas adsorvidos à superfície celular (o que poderia ser questionável pelo ensaio de citometria de fluxo), mas foram internalizados pelos macrófagos.

Figura 35: Internalização dos peptídeos pelos macrófagos visualizados por microscopia confocal. 1×10^5 macrófagos murinos foram tratadas por 3 ou 5 horas com 100 $\mu\text{g/mL}$ do Cy5-P1A3, Cy5-P2C7 ou Dil-LDL (-). As imagens foram adquiridas por microscopia confocal, com aumento de 40x e profundidade de 5,11 μm . $n=1$.

Afim de identificar os mecanismos pelos quais os peptídeos são internalizados pelos macrófagos murinos, foram utilizados os inibidores listados na *tabela 3*, com suas respectivas ações. Foi observada redução na endocitose de p1A3 mediada por Brefeldina A (35%), Citocalasina D (11%), Dynasore (15%) e Monensina de Sódio (11%) de Sódio. A endocitose do p2C7 foi reduzida por Brefeldina A (38%), Dynasore (24 %) e Monensina de Sódio (13%). Para os dois peptídeos a redução mais relevante foi promovida pela Brefeldina A (*Figura 36*).

Tabela 3: Inibidores de endocitose e seus respectivos alvos.

Inibidor (concentração utilizada)	Interferência
Azida de Sódio (1 mM)	Inibidor de fosforilação oxidativa, depleção de ATP.
Brefeldina A (1 μM)	Interrompe o tráfego de proteínas do complexo de Golgi/retículo endoplasmático, assim como a reciclagem de vesículas derivadas da endocitose. Inibe atividade de ARF. Inibe endocitose independente de clatrina.
Citocalasina D (40 μM)	Polimerização da actina, endocitose regulada por actina.
Dynasore (80 μM)	Inibidor de endocitose dependente de dinamina.
Monensina de Sódio (20 μM)	Gradiente de prótons, funções dependentes de pH, endocitose dependente de receptor.

Figura 36: Ensaio de internalização dos peptídeos na presença de inibidores de endocitose. 1×10^5 macrófagos murinos por poço foram tratados com diferentes inibidores de endocitose por 1 horas antes da incubação com 100 μ g/mL de p1A3-Cy5 ou p2C7-Cy5 por 2 horas. A análise foi realizada por citometria de fluxo, avaliando-se a mediana da intensidade da fluorescência e, por fim, relativizando a MIF das células tratadas com as células não tratadas, os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi utilizado o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Dunnett para múltiplas comparações, verificando a diferença entre o tratamento com os inibidores e o valor basal, *** $p < 0,0001$; $n = 4$.

10.1.1.3. Avaliação do efeito dos peptídeos sobre a ativação dos macrófagos

Para avaliar o efeito do p1A3, p2C7 e LDL (-)] sobre a ativação dos macrófagos, primeiramente foi testada a resposta dos macrófagos frente a esses estímulos comparando-se os níveis de expressão dos genes de IL-1 α e TNF- α nos tempos de 3 e 14h. Foi observada significativa redução nos níveis de expressão de RNAm dos genes testados em 14h em comparação ao tempo de 3h (*Figura 37*). Sendo assim foi escolhido o tempo de 3h para realizar os demais ensaios de expressão gênica.

Figura 37: Efeito do estímulo com p1A3, p2C7 ou LDL (-) sobre a expressão dos genes TNF α e IL-1 α nos tempos de 3 e 14 horas. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 100 μ g/mL de p1A3, p2C7 ou LDL (-) por 3 ou 14 horas. Os dados resultantes das análises de qPCRs foram avaliados utilizando-se o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct), os dados são expressos como média $\pm$ SD. Foi utilizado o teste T para comparar os tempos de 3 e 14 horas, onde *** $p < 0,0005$; ** $p < 0,005$, $n=3$.

A resposta da expressão gênica do controle positivo [LDL (-)] foi superior à dos peptídeos p1A3 e p2C7 nas concentrações utilizadas. Isto deve estar relacionado ao fato de que a apoB100 da LDL eletronegativa apresenta diversos microdomínios que são reconhecidos por diferentes receptores celulares, incluindo os receptores *scavenger* e *toll-like* (TLR4-CD14-MD2), importantes na aterogênese, o que contribuiria para essa resposta mais exacerbada da partícula de LDL (-). Adicionalmente, a parte lipídica da LDL (-) também poderia estar contribuindo para essa resposta pró-inflamatória.

Para o gene TNF- α foi possível verificar um valor superior a 1, ou seja, um aumento da expressão gênica comparado ao controle não tratado, para ambos os peptídeos, não sendo observada diferença para os genes TGF- β e COX2 (*Figuras 35,36 e 37*).

Entretanto, foi possível observar uma maior atividade pró-inflamatória promovida pelo p2C7, em comparação ao p1A3, como indicado pela maior expressão de IL-1 α e iNOS (*Figuras 38 e 40*). Outro dado importante, foi o aumento da expressão dos genes NLRP3, IL-1 β e IL-18 que estão relacionados ao complexo proteico Inflamassoma (*Figura 41*).

Avaliou-se também a concentração de mediadores inflamatórios no sobrenadante da cultura de macrófagos murinos, observando-se aumento significativo das proteínas TNF- α e CCL2, após o tratamento por 24h com p2C7 (Figura 43). As citocinas IL-12p70, IL-6, IL-10 ou INF- γ não foram detectadas no sobrenadante das culturas.

Figura 38: Efeito do estímulo com p1A3, p2C7 ou LDL (-) sobre a expressão dos genes TNF α e IL-1 α . 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 100 μ g/mL de p1A3, p2C7 ou LDL (-) por 3 horas. Os dados resultantes das análises de qPCRs foram avaliados utilizando-se o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct). O controle positivo da reação [LDL (-)] está representada no eixo y à direita.), os dados são expressos como média $\pm$ SD. Aplicou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações para verificar a diferença entre os três tratamentos *** $p < 0,0005$. Utilizou-se o teste T pareado para avaliar a diferença entre os dois peptídeos (eixo y à esquerda) ## $p < 0,005$, $n = 3$.

Figura 39: Efeito do estímulo com p1A3, p2C7 ou LDL (-) sobre a expressão dos genes TGF β e IL-10. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 100 μ g/mL de p1A3, p2C7 ou LDL (-) por 3 horas. Os dados resultantes das análises de qPCRs foram avaliados utilizando-se o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct). O controle positivo da reação [LDL (-)] está representada no eixo y à direita.), os dados são expressos como média $\pm$ SD. Aplicou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, para verificar a diferença entre os três tratamentos * $p < 0,05$. Utilizou-se o teste T pareado para avaliar a diferença entre os dois peptídeos (eixo y à esquerda) # $p < 0,05$, $n = 3$.

Figura 40: Efeito do estímulo com p1A3, p2C7 e LDL (-) sobre a expressão dos genes COX2 e iNOS. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3, p2C7 ou LDL (-) por 3 horas. Os dados resultantes das análises de qRT-PCR foram avaliados utilizando-se o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). O controle positivo da reação [LDL (-)] está representado no eixo y à direita. Aplicou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, para verificar a diferença entre os três tratamentos *** $p < 0,0005$. Utilizou-se o teste T pareado para avaliar a diferença entre os dois peptídeos (eixo y à esquerda) ### $p < 0,0005$, $n = 3$.

Figura 41: Efeito do estímulo com p1A3, p2C7 ou LDL (-) sobre a expressão dos genes componentes do inflamassoma. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3, p2C7 ou LDL (-) por 3 horas. Os dados resultantes das análises de qRT-PCR foram avaliados utilizando-se o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). O controle positivo da reação [LDL (-)] está representada no eixo y à direita. Aplicou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, para verificar a diferença entre os três tratamentos *** $p < 0,0005$; ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$. Foi realizado o teste T pareado para avaliar a diferença entre os peptídeos (eixo y à esquerda) ## $p < 0,005$ e # $p < 0,05$, $n = 3$.

Figura 42: Efeito do estímulo com p1A3, p2C7 e LDL (-) sobre a expressão de genes de componentes da via de ativação do inflamassoma. 1×10^6 macrófagos por poço foram estimulados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3, p2C7 ou LDL (-) por 3 horas. Os dados resultantes das análises de qRT-PCR foram avaliados utilizando-se o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). O controle positivo da reação [LDL (-)] está representado no eixo y à direita. Aplicou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, para verificar a diferença entre os tratamentos com os peptídeos ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$. Foi realizado o teste T pareado para avaliar a diferença entre os peptídeos (eixo y à esquerda) # $p < 0,05$, $n = 3$.

Figura 43: Concentração de TNF α e CCL2 no sobrenadante da cultura de macrófagos murinos tratados com p1A3 ou p2C7. Foram plaqueados 10^6 macrófagos por poço e estimulados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de p1A3 ou p2C7 por 24 h. O sobrenadante, então, foi coletado e armazenado em freezer -80°C até a sua utilização. Foi utilizado o *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit* para este ensaio. Aplicou-se o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, para verificar a diferença entre os tratamentos com os peptídeos ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.

A produção de óxido nítrico também foi avaliada (Figura 44), corroborando com os resultados de expressão gênica. Além do aumento da expressão da enzima iNOS, observou-se o aumento da produção de $\bullet\text{NO}$ pelos macrófagos quando estimulados com p2C7 e LDL (-).

Figura 44: Produção de óxido nítrico pelos macrófagos murinos. O sobrenadante de 1×10^6 células foi utilizado para avaliar a concentração de $\bullet\text{NO}$ após 24 horas de estímulo com $100 \mu\text{g/mL}$ de p1A3, p2C7 ou LDL (-). A barra basal representa a produção de $\bullet\text{NO}$ nas células sem estímulo. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Foi realizado o teste estatístico OneWay Anova, com o teste de Tukey para múltiplas comparações, $n=3$.

11. Discussão

11.1. Padronização da diferenciação de macrófagos

Com as diferentes metodologias descritas na literatura para a obtenção de macrófagos primários murinos, foi necessário padronizar a obtenção dos mesmos para atingir os objetivos desse trabalho (WADA et al, 2000). Para isso, foram comparados os macrófagos obtidos através do lavado medular de fêmur e tíbia de camundongos C57BL/6, estimulados com o sobrenadante de cultura de fibroblastos L929 (meio condicionado) ou com a proteína recombinante M-CSF, com a linhagem RAW 264.7. A cultura de fibroblastos L929, quando mantida sob estresse (alta confluência e pouca disponibilidade de nutrientes), secreta entre outras proteínas o M-CSF, responsável pela maturação de células precursoras mieloides a macrófagos/monócitos.

Apesar de ter sido obtido rendimento superior a 95% após uma semana de estímulo com o meio condicionado da cultura de fibroblastos L929, esse meio contém diversos outros fatores, como o GM-CSF, interleucinas e outras proteínas providas da morte dos fibroblastos. Uma das hipóteses levantadas seria que o meio composto pelo sobrenadante da cultura de fibroblastos L929, por conter diversos outros fatores, além do próprio M-CSF, promove uma prévia ativação dos macrófagos, diminuindo a diferença entre o controle não tratado e as células estimuladas com LPS. Quando se comparou a produção de •NO dos macrófagos diferenciados com os dois protocolos, confirmamos que aqueles obtidos pelo meio condicionado já possuem um nível basal aumentado de •NO, mostrando uma prévia ativação, o que explicaria uma menor expressão gênica dos marcadores inflamatórios.

O protocolo de obtenção dos macrófagos derivados de medula óssea com o cultivo de células medulares em meio RPMI 1640, suplementado com 15% de SFBi e 20 ng/mL de rM-CSF apresenta uma população predominantemente de macrófagos não polarizados mais responsivos ao estímulo com LPS, sendo o melhor protocolo para o estudo de ativação dessas células com os peptídeos.

A célula RAW 264.7 é uma linhagem transformada por vírus e, apesar de ser amplamente utilizada, apresentou baixa sensibilidade ao estímulo LPS. Portanto, a utilização da rM-CSF para diferenciação de células medulares em macrófagos, consiste em um sistema limpo e eficiente para se avaliar o efeito de diversos estímulos na ativação de macrófagos, permitindo melhor avaliação das diferenças entre as células estimuladas e não estimuladas.

11.2. Efeito dos peptídeos mimotopos da LDL (-) sobre macrófagos murinos primários

11.2.1. Captação dos peptídeos e polarização dos macrófagos

Não foram observados efeitos citotóxicos nos macrófagos murinos para as concentrações de peptídeos utilizadas nesse estudo, como observado no ensaio de MTT. Em contraste, a LDL (-) reduziu significativamente a atividade mitocondrial destas células em concentrações acima de 100 µg/mL, corroborando dados encontrados na literatura sobre a citotoxicidade da LDL (-) em macrófagos (DEMUTH et al, 1996).

A interação dos peptídeos com os macrófagos murinos foi inicialmente avaliada através de citometria de fluxo. A rápida captação dos peptídeos pelos macrófagos pode estar relacionada à estrutura dos mesmos. Os peptídeos mimotopos p1A3 e p2C7 são circulares e possuem apenas 10 aminoácidos, com predominância de aminoácidos apolares, o que pode sugerir maior interação com a superfície das células, que estão em meio aquoso.

Quando observada a inclinação da curva da MIF (mediana da intensidade de fluorescência), a curva do p1A3 é superior à do p2C7, mostrando que os peptídeos possuem comportamentos diferentes em relação à captação pelos macrófagos. Apesar de ambos os peptídeos serem rapidamente captados pelos macrófagos, a MIF nos sugere que mesmo o p2C7 sendo mais lipofílico, e o p1A3 possuir maior estabilidade em meio aquoso devido às cadeias laterais de seus aminoácidos, essa não é a única característica que rege a captação dos mesmos, possuindo assim algum fator limitante para a interação 'macrófago x peptídeo'.

Os dados de citometria de fluxo não mostram a localização do peptídeo no macrófago, mesmo utilizando a tripsina para remover os peptídeos ou a LDL (-) que estava adsorvida na membrana celular, tendo sido necessário utilizar a microscopia confocal para afirmar que os peptídeos haviam sido internalizados. As imagens obtidas na microscopia mostraram que existe uma difusão dos peptídeos por toda a célula, ultrapassando a membrana nuclear, o que não é observado para a [LDL (-)], que é internalizada com a formação de um endossomo que se funde aos lisossomos para a degradação da partícula de lipoproteína. O tráfego intracelular desses peptídeos pode estar relacionado ao seu tamanho e lipofilicidade e ainda precisa ser investigado mais detalhadamente.

Outro fator importante que rege a endocitose de peptídeos seria a interação eletrostática com os proteoglicanos (POON e GARIEPY, 2007) e fosfolípidos (PERSSON et al, 2001) de carga negativa da membrana celular. Sendo assim, peptídeos catiônicos teriam maior facilidade de penetrar pela membrana celular. De fato, ambos os peptídeos possuem cargas positivas em pH 7,4 (carga efetiva para p1A3 = +1; p2C7 = +2), sendo a conformação cíclica dos peptídeos de fundamental importância para a

manutenção dessa carga. A interação com diferentes componentes da membrana plasmática (seja por interação eletrostática ou hidrofóbica) é fortemente controlada pelo número de cargas positivas, pontes de hidrogênio, tamanho e estrutura secundária dos peptídeos (DESHAYES et al, 2008; LUNDIN et al, 2008).

Apesar das características físico-químicas implicarem em maior facilidade do p2C7 ser captado pelas células, o que observamos nos experimentos *in vitro* foi o oposto. Tanto para as células endoteliais quanto para os macrófagos o p1A3 foi o mais endocitado. Provavelmente a explicação deste fenômeno está na diferença entre a sequência de aminoácidos dos peptídeos mimotopos, em especial o triptofano.

CPP (do inglês, *cell-penetrating peptides*) são descritos como peptídeos capazes de atravessar membranas celulares, não sendo uma habilidade comum. De fato, diversos peptídeos circulantes possuem atividade fisiológica no organismo, porém não possuem a capacidade de atingir o citoplasma celular (revisado por BECHARA e SAGAN, 2013). Além das características já citadas, resíduos de triptofano são determinantes para peptídeos básicos, não só para a translocação direta pela membrana, mas também para endocitose mediada por glucosaminaglicanos (BECHARA et al, 2013). O triptofano é um dos resíduos de aminoácido presentes no p1A3, porém não no p2C7. Com apenas um resíduo de triptofano a endocitose de seis peptídeos, comparados no estudo de Bechara et al (2013), pelas células CHO foi aumentada em 2 vezes, seguidos por 10 vezes com 2 resíduos e 20 vezes com 3 resíduos de triptofano, mostrando um aumento linear de endocitose com o aumento de triptofano na molécula.

Para melhor entender os possíveis mecanismos de endocitose dos peptídeos mimotopos foram utilizados 5 diferentes inibidores, evidenciando que a internalização dos peptídeos não ocorre exclusivamente por difusão passiva dos mesmos através da membrana plasmática dos macrófagos.

Para o p1A3, foram eficazes a brefeldina A, citocalasina D, *dynasore* e monensina. A polimerização da actina é inibida pela citocalasina D, tendo maior relevância para os processos de fagocitose e macropinocitose (MORTENSEN e LARSSON, 2003). Apesar de uma pequena interferência, ambos os processos são para grandes partículas em solução aquosa. Devido ao tamanho e o caráter apolar dos peptídeos, apenas uma pequena parte da sua captação foi inibida pela citocalasina.

Na endocitose mediada pela clatrina, a dinamina promove a formação das vesículas revestidas com clatrina. O *dynasore* é um inibidor específico da dinamina, inibindo sua atividade de GTPase, o que impede a fissura do endossomo da membrana citoplasmática (MACIA et al, 2006). Sua participação na endocitose do p1A3 possui a mesma relevância que a citocalasina D, de forma que ambos inibiram a captação do p1A3 na mesma intensidade.

A monensina é um ionóforo carboxílico que promove o transporte de prótons e outros cátions monovalentes através das membranas lipídicas, sendo importante no transporte Na^+/H^+ . A monensina não inibe a ligação de ligantes aos macrófagos mas

inibe a transferência do material do endossomo para o lisossomo e aumenta o pH dos lisossomos dos macrófagos, induzindo o acúmulo intracelular dos complexos ligante-receptor (WILEMAN et al, 1984). Em macrófagos, demonstrou-se que a monensina inibe a reciclagem dos complexos ligante-receptor de manose no compartimento pré-lisossômico (WILEMAN et al, 1984). Uma porcentagem da endocitose de p1A3 foi inibida pela monensina, sugerindo a participação de receptores de manose neste processo. Os receptores de manose estão presentes no fenótipo *M2* dos macrófagos (STEIN et al, 1992). Pelo fato dos macrófagos utilizados em nossos experimentos não terem sido previamente ativados, seria esperado que não apresentassem este receptor em abundância, explicando a sua baixa participação na endocitose do p1A3.

A captação do p2C7 foi inibida pela brefeldina A, *dynasore* e monensina. Como citado anteriormente, o *dynasore* interfere com a endocitose dependente de dinamina, entretanto, diferentemente do p1A3, este processo inibiu de forma significativa (24% na concentração utilizada de *dynasore*) a endocitose do p2C7. Como não houve alteração com o uso da citocalasina D, nos deparamos com um processo de endocitose mediado por dinamina independente de actina, sugerindo a endocitose mediada por caveolina ou clatrina (TAKEI et al, 2005). Entretanto, processos mediados por clatrina estão relacionados à endocitose mediada por receptores e à internalização de partículas extracelulares grandes (TAKEI et al, 2005). A monensina, apesar de reduzir a captação de p2C7, não teve uma participação tão relevante quanto o *dynasore*, sugerindo assim, uma maior participação da endocitose dependente de dinamina via cavéolas mediada ou não por caveolina. A endocitose mediada por caveolina é uma rota importante para a internalização de peptídeos. A internalização por esta via é facilitada pelas *lipid rafts* da membrana celular. Essas *rafts* contém caveolina-1, que forma os endossomos transportados para o interior das células (WICKSTROM et al, 2010).

A inibição de endocitose mais acentuada ocorreu com a utilização do inibidor brefeldina A (BFA), para ambos os peptídeos. Apesar de comumente utilizada para interromper o tráfego intracelular de proteínas do retículo endoplasmático (ER) ao Golgi (MISUMI et al, 1986), a BFA também inibe diversos mecanismos de endocitose, incluindo a reciclagem das vesículas endocíticas (BALUSKA et al, 2002). Assim, proteínas como a clatrina podem permanecer ancoradas no ER enquanto a via secretora de proteínas é inibida (VON KLEIST e HAUCKE, 2012). A BFA inibe o domínio Sec7 dos fatores de troca de nucleotídeos guanina para a GTPase Arf1 (*ADP ribosylation factor 1*), inibindo assim o recrutamento de componentes de revestimento das vesículas endocíticas para a membrana na endocitose independente de clatrina (VON KLEIST e HAUCKE, 2012). A BFA também promove a co-localização de proteínas na membrana plasmática (PIN1, PM-ATPase) aos marcadores endossomais, bloqueando a reciclagem das vesículas endocíticas (BALUSKA et al, 2002).

Em resumo, os dados indicam que o p1A3 e o p2C7 são endocitados por processos dependentes e independentes de dinamina, em diferentes proporções,

necessitando-se de um estudo com inibidores mais específicos para se elucidar detalhadamente o processo de endocitose desses peptídeos.

Quando observados os dados de expressão gênica, verificamos que o p1A3 não promoveu alterações quanto à ativação dos macrófagos. Entretanto, o p2C7 foi capaz de estimular a expressão de TNF- α , IL-1 α e iNOS, importantes marcadores da polarização de macrófagos.

A polarização dos macrófagos vem sendo amplamente estudada e seu papel ganhando destaque em diversas patologias que vão do câncer as doenças cardiovasculares (MARTINEZ e GORDON, 2014). Visto isso, os peptídeos mimotopos da LDL (-) são uma promissora ferramenta de estudo, considerando que são epítomos peptídicos que representam uma região imunogênica da partícula de LDL modificada *in vivo* e podem auxiliar a investigação da resposta imune inata. Esses epítomos da LDL (-) foram expostos apenas quando a LDL nativa sofreu modificações, sejam elas por oxidação, proteólise, glicação, entre outras, o que possivelmente originou alterações conformacionais, uma vez que os mimotopos não correspondem à sequência linear da ApoB-100 (resultados do grupo ainda não publicados). Assim, esses peptídeos podem ser úteis para auxiliar na elucidação dos mecanismos da ação pró-inflamatória da LDL (-) sobre as células do sistema imune e outras envolvidas no processo aterosclerótico.

Podemos agrupar os fenótipos de macrófagos em duas grandes famílias, de acordo com suas características e ativação:

- I. Macrófago M1 (ativação clássica)
- II. Macrófago M2 (ativação alternativa) (JABLONSKI, 2015)

Trabalhos recentes (MEDBURY et al, 2013) mostraram a presença de macrófagos com esses fenótipos em placas ateroscleróticas, sendo o M1 considerado aterogênico e com propriedades pró-inflamatórias e o M2 com papel no remodelamento e cicatrização, com atividade anti-inflamatória.

Bioquimicamente, o macrófago M1 difere do M2 principalmente no metabolismo da arginina, sendo a via L-Arginina/Arginase, primordialmente ativa e o metabolismo da L-arginina pela iNOS ocorrendo apenas quando estimulado (RATH et al, 2014). O aumento da expressão de iNOS induzido pelo p2C7 sugere que esse peptídeo possa ser um candidato a DAMP (do inglês: *Damage-associated molecular pattern*/Padrões moleculares associados ao perigo), podendo participar na indução da resposta pró-inflamatória da LDL (-) sobre os macrófagos, o que poderia contribuir para o aumento da instabilidade da placa aterosclerótica.

A resposta imune inata tem início com o reconhecimento de assinaturas moleculares conservadas através do processo evolutivo e que são associadas ao perigo pelo organismo. Estas moléculas possuem origem microbiana (padrões moleculares associados a patógenos – PAMPs) ou auto antígenos que não deveriam ser expressos ou estarem acessíveis ao sistema imune, a não ser em casos de injúria ou morte celular (DAMPs) (TANG et al, 2012).

Uma das hipóteses aceitas para o início da aterogênese é o reconhecimento da LDLm como um DAMP, sendo este o gatilho para a ativação da resposta imune inata (WICK et al, 2004). De fato, as diferentes classes de LDLm são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrão molecular (PRRs) distintos, resultando em variadas respostas. Na aterosclerose, diversos DAMPs já foram descritos como pró-inflamatórios, dentre os quais podemos citar cristais de colesterol, OSEs (epítomos específicos de oxidação) e IL-1 α (DUEWELL et al, 2010).

O aumento de TNF- α e IL-1 α são outros dois indícios de que o p2C7 esteja modulando a resposta pró-inflamatória dos macrófagos. Existe um grande sinergismo já descrito entre a família da Interleucina 1 e TNF- α , ambos sendo citocinas pró-inflamatórias que regulam a resposta imune inata (KELLEY et al, 2007). O papel da IL-1 α é evidenciado em placas ateroscleróticas avançadas, as quais apresentam morte exacerbada de células musculares lisas do endotélio vascular (VSMC). As VSMC necróticas liberam IL-1 α que pode ativar VSMC viáveis adjacentes, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e CCL2 (CLARKE et al, 2009). Além disso, Rao et al (2007) sugerem que a IL-1 α proveniente de células endoteliais necróticas poderia constituir o elo entre as respostas imune adaptativa e inata na aterogênese. Neste mesmo estudo, a IL-1 α derivada de células necróticas induziu a proliferação de células T de memória, bem como a secreção de IL-17 e IFN- γ (RAO et al, 2007).

Como marcadores da polarização do tipo M2, avaliou-se a expressão de TGF β e IL-10. A ausência de efeito sobre o TGF β , associado com o aumento de marcadores como iNOS, TNF- α e IL-1 α , mostraram que o p2C7 pode mimetizar um epítomo imunodominante da LDL (-), possuindo propriedades similares, mas de menor intensidade.

O aumento da expressão de IL-10 não é contraditório, já que, como controle da resposta pró-inflamatória, existem subclasses de macrófagos M2 que são induzidos pelo estímulo “DAMP + IL-1 β ” (MANTOVANI et al, 2004), outra citocina que teve sua expressão aumentada, embora não tenha sido observado a tradução desta interleucina.

O tratamento dos macrófagos com p2C7 não apenas modulou a expressão gênica, mas aumentou a tradução de proteínas importantes para a resposta pró-inflamatória (TNF- α e CCL2). O TNF- α está intimamente relacionado com a modulação do fenótipo M1 e a CCL2 é importante no recrutamento de monócitos, células T de memória e células dendríticas para os locais de lesão tecidual. A expressão desta quimiocina pró-inflamatória está aumentada em lesões ateroscleróticas (NIEMANN-JONSSON et al, 2007).

Os dados de polarização foram confirmados com a maior produção de •NO quando os macrófagos foram tratados com o p2C7, mostrando um deslocamento para a via L-arginina/iNOS/•NO, mostrando assim, a importância deste epítomo da LDL (-) no papel pró-inflamatório desta partícula (Figura 45).

Figura 45: Modulação do fenótipo de macrófagos através de enzimas do metabolismo da L-Arginina. ODC: *Ornitina Decarboxilase*; OAT: *Ornitina aminotransferase*. O metabolismo da L-arginina nos macrófagos é um limitante para o seu fenótipo, de tal maneira que o p2C7 consegue modular esse equilíbrio, deslocando-o para esquerda (adaptado de MONCADA, 1993).

11.2.2. Efeito dos peptídeos mimotopos da LDL (-) em macrófagos murinos primários: Inflamassoma

Inflamassoma é o nome dado ao complexo proteico de alto peso molecular, em formato de anel, responsável pela maturação do zimogênio da Caspase-1, assim como pela piroptose. É importante ressaltar que a ativação do inflamassoma é dependente de dois sinais: sinal 1 (transcricional) e sinal 2 (pós-transducional) (TALL e YVAN-CHARVET, 2015).

O sinal 1 corresponde à ativação da via NF- κ B, através da sinalização por PRR (receptores de reconhecimento padrão), resultando na transcrição da pró-IL-1 β , pró-IL-18, pró-Caspase-1 e componentes do inflamassoma. Entretanto, apenas com a ativação do sinal 2 é que ocorre a oligomerização do complexo com a proteína adaptadora ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e a clivagem da pró-caspase-1 em sua forma ativa. ASC é formada por um domínio PYD, responsável pela interação homotípica com o NLRP3, e um domínio CARD que faz a comunicação com a forma inativa da Caspase-1 (TALL e YVAN-CHARVET, 2015).

A caspase-1 é uma importante enzima proteolítica, pró-inflamatória, responsável pela maturação da pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas (HEID et al, 2013). IL-18 e IL-1 β , por sua vez, são citocinas pró-inflamatórias importantes, cruciais para o desenvolvimento da placa aterosclerótica. De fato, essas citocinas podem ativar

as células endoteliais, estimular a formação de células espumosas, induzir a proliferação de VSMC, a expressão de IL-6, TNF- α e PCR. Diversos estudos mostram que o bloqueio dessas interleucinas reduz a formação da placa aterosclerótica, assim como o processo inflamatório envolvido (BADIMON, 2012; SHEEDY e MOORE, 2013).

Os receptores NOD-like (NLRs) são sensores intracelulares de PAMPs fagocitados ou associados ao estresse oxidativo. Fazem parte da família de PRRs e possuem papel chave na regulação da resposta imune inata. Os NLRs podem interagir com TLRs e regular a resposta inflamatória e apoptótica. São descritos em células imunes (macrófagos, linfócitos e célula dendríticas) e não imunes como células endoteliais, sendo que foram altamente conservados durante a evolução (FUKATA et al, 2009).

Estruturalmente, os NLRs possuem 3 domínios: NACHT central (domínio de ligação nucleotídica - NBD), o qual é comum para todos NLRs; uma porção C-terminal rica em leucina (LRR); e um domínio N-terminal de interação variável. O NBD apresenta ativação dependente de ATP enquanto o LRR é sensível a ligantes (DAMPs/PAMPs).

Dentre os NLR, a família NLRP, em especial o NLRP3 é o melhor caracterizado e mais estudado devido à sua ativação ocorrer tanto por PAMPs como por DAMPs (ATP e glicose extracelular, cristais de urato, pirofosfato de cálcio diidratado, alumínio, colesterol e LDLm), sendo atualmente, correlacionado com o processo inflamatório decorrente da aterosclerose (TING et al, 2009).

O entendimento da ativação do sinal 2 ainda não está bem elucidado, mas sempre é acompanhado do aumento de efluxo de K⁺ e produção de ROS (espécies reativas de oxigênio). Além dos DAMP/PAMP como ativadores do NLRP3, evidências mostram que este receptor seria um sensor para detectar estresse do retículo endoplasmático e/ou a desestabilização do lisossomo (TALL e YVAN-CHARVET, 2015).

Foi demonstrado por Estruch et al (2015) que a LDL (-) ativa o inflamassoma, sendo está reconhecida pelo complexo TLR4-CD14-MD2, ativando assim a cascata pró-inflamatória culminando no aumento, principalmente, de IL-1 β . Entretanto, é discutido que a ativação do inflamassoma pela LDL (-) estaria associado às alterações da composição lipídica da partícula, como aumento de ceramidas e ácidos graxos livres.

Como já discutido anteriormente, alterações conformacionais da LDL (-) expõem epítomos imunogênicos da ApoB-100, sendo um deles o p2C7, um peptídeo capaz de ativar o sinal 1 do inflamassoma e promover o aumento da expressão de pró-IL-1 β , Caspase-1 e NLRP3, apresentando maior capacidade de estímulo do que a própria LDL (-) para a expressão de pró-IL-18, além do aumento da expressão de um dos componentes de sinalização intracelular MyD-88. Portanto, as evidências aqui mostradas suportam a hipótese de que o peptídeo p2C7 seria um DAMP presente na partícula de LDL (-), que pode contribuir para o processo inflamatório da placa aterosclerótica via ativação do inflamassoma NLRP3.

12. Conclusões

Neste trabalho concluímos que:

- Os dois peptídeos derivados da LDL (-), nomeados p1A3 e p2C7, apresentam estrutura em anel circular, confirmada através de SAXS o que validou o estudo das suas ações sobre macrófagos murinos;
- O peptídeo p1A3 foi citotóxico para células endoteliais, enquanto o peptídeo p2C7 não apresentou citotoxicidade para as linhagens celulares avaliadas;
- Os peptídeos p1A3 e p2C7 foram captados por macrófagos murinos por diferentes vias endocíticas;
- O peptídeo p2C7 ativou o inflamassoma NLRP3 em macrófagos murinos, podendo representar um padrão molecular associado ao perigo (DAMP) presente na LDL eletronegativa.

13. Bibliografia

AHA. Highest cardiovascular disease death rates infographic. Disponível em: <http://news.heart.org/american-heart-association-statistical-report-tracks-global-figures-first-time/stat-story-12-17-03/>. Acesso em: 25 abril de 16.

ALLEN, I. C. et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 556-65, Apr 17 2009. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19362020> >.

ANDERSSON, J.; LIBBY, P.; HANSSON, G. K. Adaptive immunity and atherosclerosis. **Clin Immunol**, v. 134, n. 1, p. 33-46, Jan 2010. ISSN 1521-7035 (Electronic)

1521-6616 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635683> >.

ARANDA, E.; OWEN, G. I. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. **Biol Res**, v. 42, n. 3, p. 377-89, 2009. ISSN 0717-6287 (Electronic)

0716-9760 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915746> >.

AVOGARO, P.; BON, G. B.; CAZZOLATO, G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. **Arteriosclerosis**, v. 8, n. 1, p. 79-87, Jan-Feb 1988. ISSN 0276-5047 (Print)

0276-5047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3341993> >.

AVRAHAM-DAVIDI, I. et al. ApoB-containing lipoproteins regulate angiogenesis by modulating expression of VEGF receptor 1. **Nat Med**, v. 18, n. 6, p. 967-73, Jun 2012. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22581286> >.

BRASIL. Radílson Carlos Gomes. Ministério da Saúde. Doenças cardiovasculares causam quase 30% das mortes no País. 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>>. Acesso em: 14 mar. 2015.

BADIMON, L. Interleukin-18: a potent pro-inflammatory cytokine in atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, v. 96, n. 2, p. 172-5; discussion 176-80, Nov 1 2012. ISSN 1755-3245 (Electronic)

0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922166> >.

BALUSKA, F. et al. F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from brefeldin A-induced compartments. **Plant Physiol**, v. 130, n. 1, p. 422-31, Sep 2002. ISSN 0032-0889 (Print)

0032-0889 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12226521> >.

BARROS, M. R. et al. Identification of mildly oxidized low-density lipoprotein (electronegative LDL) and its auto-antibodies IgG in children and adolescents hypercholesterolemic offsprings. **Atherosclerosis**, v. 184, n. 1, p. 103-7, Jan 2006. ISSN 0021-9150 (Print)

0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899483> >.

BATTEGAY, E. J. et al. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. **J Cell Biol**, v. 125, n. 4, p. 917-28, May 1994. ISSN 0021-9525 (Print)

0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514607> >.

BAUER, J. et al. In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. **J Cell Physiol**, v. 153, n. 3, p. 437-49, Dec 1992. ISSN 0021-9541 (Print)

0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1280276> >.

BECHARA, C. et al. Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. **FASEB J**, v. 27, n. 2, p. 738-49, Feb 2013. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070606> >.

BECHARA, C.; SAGAN, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? **FEBS Lett**, v. 587, n. 12, p. 1693-702, Jun 19 2013. ISSN 1873-3468 (Electronic)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669356> >.

BENITEZ, S. et al. Increased lysophosphatidylcholine and non-esterified fatty acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cells. Relationship with electronegative LDL. **Atherosclerosis**, v. 177, n. 2, p. 299-305, Dec 2004. ISSN 0021-9150 (Print)

0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530903> >.

BLANCO, F. J. et al. 2D-NMR reveals different populations of exposed lysine residues in the apoB-100 protein of electronegative and electropositive fractions of LDL particles. **J Lipid Res**, v. 51, n. 6, p. 1560-5, Jun 2010. ISSN 1539-7262 (Electronic)

0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20110441> >.

BREIER, G. et al. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. **Blood**, v. 87, n. 2, p. 630-41, Jan 15 1996. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8555485> >.

BRIZZI, M. F. et al. Diabetic LDL inhibits cell-cycle progression via STAT5B and p21(waf). **J Clin Invest**, v. 109, n. 1, p. 111-9, Jan 2002. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781356> >.

CAZZOLATO, G.; AVOGARRO, P.; BITTOLO-BON, G. Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. **Free Radic Biol Med**, v. 11, n. 3, p. 247-53, 1991. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1937142> >.

CHANG, P. Y. et al. Aspirin protects human coronary artery endothelial cells against atherogenic electronegative LDL via an epigenetic mechanism: a novel cytoprotective role of aspirin in acute myocardial infarction. **Cardiovasc Res**, v. 99, n. 1, p. 137-45, Jul 1 2013. ISSN 1755-3245 (Electronic)

0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519265> >.

CHANG, Y. H.; ABDALLA, D. S.; SEVANIAN, A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. **Free Radic Biol Med**, v. 23, n. 2, p. 202-14, 1997. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9199882> >.

CHEN, C. Y. et al. The most negatively charged low-density lipoprotein L5 induces stress pathways in vascular endothelial cells. **J Vasc Res**, v. 49, n. 4, p. 329-41, 2012. ISSN 1423-0135 (Electronic)

1018-1172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22627396> >.

CHEN, M. et al. Requirements of basic amino acid residues within the lectin-like domain of LOX-1 for the binding of oxidized low-density lipoprotein. **FEBS Lett**, v. 499, n. 3, p. 215-9, Jun 22 2001. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11423119> >.

CHEN, M.; MASAKI, T.; SAWAMURA, T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. **Pharmacol Ther**, v. 95, n. 1, p. 89-100, Jul 2002. ISSN 0163-7258 (Print)

0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163130> >.

CHEN, Z. et al. Oxidative stress activates endothelial innate immunity via sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) transactivation of microRNA-92a. **Circulation**, v. 131, n. 9, p. 805-14, Mar 3 2015. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550450> >.

CHU, C. S. et al. Electronegative low-density lipoprotein increases C-reactive protein expression in vascular endothelial cells through the LOX-1 receptor. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e70533, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23950953> >.

CHYU, K. Y. et al. Immunization using an Apo B-100 related epitope reduces atherosclerosis and plaque inflammation in hypercholesterolemic apo E (-/-) mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 338, n. 4, p. 1982-9, Dec 30 2005. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16288717> >.

CLAISE, C. et al. Comparison of oxidized low-density lipoprotein toxicity on EA.hy 926 cells and human vein endothelial cells: influence of antioxidant systems. **Cell Mol Life Sci**, v. 53, n. 2, p. 156-61, Feb 1997. ISSN 1420-682X (Print)

1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9118004> >.

CLAISE, C. et al. Oxidized-LDL induce apoptosis in HUVEC but not in the endothelial cell line EA.hy 926. **Atherosclerosis**, v. 147, n. 1, p. 95-104, Nov 1 1999. ISSN 0021-9150 (Print)

0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10525130> >.

CLARKE, M. C. et al. Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1-directed inflammation: effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis. **Circ Res**, v. 106, n. 2, p. 363-72, Feb 5 2010. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926874> >.

CRUCET, M. et al. Hypoxia enhances lipid uptake in macrophages: role of the scavenger receptors Lox1, SRA, and CD36. **Atherosclerosis**, v. 229, n. 1, p. 110-7, Jul 2013. ISSN 1879-1484 (Electronic)

0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23706521> >.

- CUNNINGHAM, K. S.; GOTLIEB, A. I. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. **Lab Invest**, v. 85, n. 1, p. 9-23, Jan 2005. ISSN 0023-6837 (Print) 0023-6837 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15568038> >.
- D'ALESSIO, P. et al. ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF-alpha are inhibited by a glutathione peroxidase mimic. **Free Radic Biol Med**, v. 24, n. 6, p. 979-87, Apr 1998. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9607608> >.
- DAVIDSON, N. O.; SHELNESS, G. S. APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. **Annu Rev Nutr**, v. 20, p. 169-93, 2000. ISSN 0199-9885 (Print) 0199-9885 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940331> >.
- DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, n. 23 Suppl 1, p. III27-32, Jun 15 2004. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15198963> >.
- DE CASTELLARNAU, C. et al. Atherogenic and inflammatory profile of human arterial endothelial cells (HUAEC) in response to LDL subfractions. **Clin Chim Acta**, v. 376, n. 1-2, p. 233-6, Feb 2007. ISSN 0009-8981 (Print) 0009-8981 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16956600> >.
- DEMUTH, A. et al. Differential regulation of cytokine and cytokine receptor mRNA expression upon infection of bone marrow-derived macrophages with *Listeria monocytogenes*. **Infect Immun**, v. 64, n. 9, p. 3475-83, Sep 1996. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8751887> >.
- DESHAYES, S. et al. Structural polymorphism of two CPP: an important parameter of activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1778, n. 5, p. 1197-205, May 2008. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316038> >.
- DUEWELL, P. et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1357-61, Apr 29 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428172> >.
- ESTRUCH, M. et al. CD14 and TLR4 mediate cytokine release promoted by electronegative LDL in monocytes. **Atherosclerosis**, v. 229, n. 2, p. 356-62, Aug 2013. ISSN 1879-1484 (Electronic) 0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23880187> >.
- ESTRUCH, M. et al. Electronegative LDL induces priming and inflammasome activation leading to IL-1beta release in human monocytes and macrophages. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 11, p. 1442-9, Nov 2015. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26327597> >.
- FALK, E. Pathogenesis of atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol**, v. 47, n. 8 Suppl, p. C7-12, Apr 18 2006. ISSN 1558-3597 (Electronic) 0735-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631513> >.

FARINA, H. G. et al. CIGB-300, a proapoptotic peptide, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 12, p. 1677-88, Jul 15 2011. ISSN 1090-2422 (Electronic) 0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21565189> >.

FAULIN, Tanize do Espirito Santo; CAVALCANTE, Marcela Frota; ABDALLA, Dulcineia Saes Parra. Role of electronegative LDL and its associated antibodies in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clinical Lipidology*, São Paulo, Brasil, v. 5, n. 5, p.719-729, 2010.

FREDRIKSON, G. N. et al. Treatment with apo B peptide vaccines inhibits atherosclerosis in human apo B-100 transgenic mice without inducing an increase in peptide-specific antibodies. **J Intern Med**, v. 264, n. 6, p. 563-70, Dec 2008. ISSN 1365-2796 (Electronic) 0954-6820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783480> >.

FREDRIKSON, G. N. et al. Identification of immune responses against aldehyde-modified peptide sequences in apoB associated with cardiovascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 5, p. 872-8, May 1 2003. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649091> >.

FUKATA, M.; VAMADEVAN, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Semin Immunol**, v. 21, n. 4, p. 242-53, Aug 2009. ISSN 1096-3618 (Electronic) 1044-5323 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19748439> >.

GEYSEN, H. M.; RODDA, S. J.; MASON, T. J. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. **Mol Immunol**, v. 23, n. 7, p. 709-15, Jul 1986. ISSN 0161-5890 (Print) 0161-5890 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2432410> >.

GIORDANO, R. J. et al. Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. **Chem Biol**, v. 12, n. 10, p. 1075-83, Oct 2005. ISSN 1074-5521 (Print) 1074-5521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16242650> >.

Glatter, O. (1977). *Journal of Applied Crystallography* 10, 415-421.

GO, G. W.; MANI, A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. **Yale J Biol Med**, v. 85, n. 1, p. 19-28, Mar 2012. ISSN 1551-4056 (Electronic) 0044-0086 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461740> >.

GOEDEKE, L.; FERNANDEZ-HERNANDO, C. Regulation of cholesterol homeostasis. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, n. 6, p. 915-30, Mar 2012. ISSN 1420-9071 (Electronic) 1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009455> >.

GOLDSTEIN, J. L. et al. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 1, p. 333-7, Jan 1979. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/218198> >.

GREEN, S. A. et al. The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. **J Cell Biol**, v. 124, n. 4, p. 435-48, Feb 1994. ISSN 0021-9525 (Print)

0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7508941> >.

HABERLAND, M. E.; OLCH, C. L.; FOLGELMAN, A. M. Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages. **J Biol Chem**, v. 259, n. 18, p. 11305-11, Sep 25 1984. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6088540> >.

HEID, M. E. et al. Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. **J Immunol**, v. 191, n. 10, p. 5230-8, Nov 15 2013. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24089192> >.

HOFMANN, S. et al. The tumour necrosis factor-alpha induced vascular permeability is associated with a reduction of VE-cadherin expression. **Eur J Med Res**, v. 7, n. 4, p. 171-6, Apr 30 2002. ISSN 0949-2321 (Print)

0949-2321 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010652> >.

HOFNAGEL, O. et al. Proinflammatory cytokines regulate LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 10, p. 1789-95, Oct 2004. ISSN 1524-4636 (Electronic)

1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271788> >.

HORTON, D. A.; BOURNE, G. T.; SMYTHE, M. L. Exploring privileged structures: the combinatorial synthesis of cyclic peptides. **Mol Divers**, v. 5, n. 4, p. 289-304, 2002. ISSN 1381-1991 (Print)

1381-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12549678> >.

HO-TIN-NOE, B.; DEMERS, M.; WAGNER, D. D. How platelets safeguard vascular integrity. **J Thromb Haemost**, v. 9 Suppl 1, p. 56-65, Jul 2011. ISSN 1538-7836 (Electronic)

1538-7836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21781242> >.

HO-TIN-NOE, B.; MICHEL, J. B. Initiation of angiogenesis in atherosclerosis: smooth muscle cells as mediators of the angiogenic response to atheroma formation. **Trends Cardiovasc Med**, v. 21, n. 7, p. 183-7, Oct 2011. ISSN 1873-2615 (Electronic)

1050-1738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22867696> >.

HSIUNG, P. L.; WANG, T. In vivo biomarkers for targeting colorectal neoplasms. **Cancer Biomark**, v. 4, n. 6, p. 329-40, 2008. ISSN 1574-0153 (Print)

1574-0153 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19126961> >.

JABLONSKI, K. A. et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145342, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26699615> >.

JAFFE, E. A.; HOYER, L. W.; NACHMAN, R. L. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 71, n. 5, p. 1906-9, May 1974. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4209883> >.

JANABI, M. et al. Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 8, p. 1953-60, Aug 2000. ISSN 1079-5642 (Print)

1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10938017> >.

JOHS, A. et al. Modular structure of solubilized human apolipoprotein B-100. Low resolution model revealed by small angle neutron scattering. **J Biol Chem**, v. 281, n. 28, p. 19732-9, Jul 14 2006. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704977> >.

JOO, S. H. Cyclic peptides as therapeutic agents and biochemical tools. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 20, n. 1, p. 19-26, Jan 2012. ISSN 1976-9148 (Print)

1976-9148 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24116270> >.

KAZUMA, S. M. et al. Cloning and expression of an anti-LDL(-) single-chain variable fragment, and its inhibitory effect on experimental atherosclerosis. **MAbs**, v. 5, n. 5, p. 763-75, Sep-Oct 2013. ISSN 1942-0870 (Electronic)

1942-0862 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23924793> >.

KELLEY, M. J. et al. Synergism of TNF and IL-1 in the induction of matrix metalloproteinase-3 in trabecular meshwork. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 48, n. 6, p. 2634-43, Jun 2007. ISSN 0146-0404 (Print)

0146-0404 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525194> >.

KETELHUTH, D. F. et al. Identification of a danger-associated peptide from apolipoprotein B100 (ApoBDS-1) that triggers innate proatherogenic responses. **Circulation**, v. 124, n. 22, p. 2433-43, 1-7, Nov 29 2011. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064596> >.

KNITTELFELDER, R.; RIEMER, A. B.; JENSEN-JAROLIM, E. Mimotope vaccination--from allergy to cancer. **Expert Opin Biol Ther**, v. 9, n. 4, p. 493-506, Apr 2009. ISSN 1744-7682 (Electronic)

1471-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344285> >.

KOCH, A. E. et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, v. 258, n. 5089, p. 1798-801, Dec 11 1992. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281554> >.

KUMAR, V. et al. Three-dimensional cryoEM reconstruction of native LDL particles to 16A resolution at physiological body temperature. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e18841, May 09 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21573056> >.

KWON, Y. U.; KODADEK, T. Quantitative comparison of the relative cell permeability of cyclic and linear peptides. **Chem Biol**, v. 14, n. 6, p. 671-7, Jun 2007. ISSN 1074-5521 (Print)

1074-5521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17584614> >.

LI, A. et al. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. **J Immunol**, v. 170, n. 6, p. 3369-76, Mar 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print)

- 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626597> >.
- LI, C. H. et al. The interactions and recognition of cyclic peptide mimetics of Tat with HIV-1 TAR RNA: a molecular dynamics simulation study. **J Biomol Struct Dyn**, v. 31, n. 3, p. 276-87, Mar 2013. ISSN 1538-0254 (Electronic)
0739-1102 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22943434> >.
- LI, D.; MEHTA, J. L. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. **Circulation**, v. 101, n. 25, p. 2889-95, Jun 27 2000. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869259> >.
- LIBBY, P. Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S352-7, Apr 2009. ISSN 0022-2275 (Print)
0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19096046> >.
- LIDINGTON, E. A. et al. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. **Transpl Immunol**, v. 7, n. 4, p. 239-46, Dec 1999. ISSN 0966-3274 (Print)
0966-3274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10638837> >.
- LUNDIN, P. et al. Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates. **Bioconjug Chem**, v. 19, n. 12, p. 2535-42, Dec 2008. ISSN 1520-4812 (Electronic)
1043-1802 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19012426> >.
- LUND-KATZ, S. et al. A ¹³C NMR characterization of lysine residues in apolipoprotein B and their role in binding to the low density lipoprotein receptor. **J Biol Chem**, v. 263, n. 27, p. 13831-8, Sep 25 1988. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3138240> >.
- LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 233-41, Sep 14 2000. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001066> >.
- MA, C. et al. Angiogenesis related gene expression profiles of EA.hy926 cells induced by irbesartan: a possible novel therapeutic approach. **Chin Med J (Engl)**, v. 125, n. 8, p. 1369-75, Apr 2012. ISSN 0366-6999 (Print)
0366-6999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22613637> >.
- MACDOUGALL, I. C. et al. A peptide-based erythropoietin-receptor agonist for pure red-cell aplasia. **N Engl J Med**, v. 361, n. 19, p. 1848-55, Nov 5 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19890127> >.
- MACIA, E. et al. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. **Dev Cell**, v. 10, n. 6, p. 839-50, Jun 2006. ISSN 1534-5807 (Print)
1534-5807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16740485> >.

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

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

MAXFIELD, F. R.; TABAS, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. **Nature**, v. 438, n. 7068, p. 612-21, Dec 1 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319881> >.

MEDBURY, H. J. et al. Differing association of macrophage subsets with atherosclerotic plaque stability. **Int Angiol**, v. 32, n. 1, p. 74-84, Feb 2013. ISSN 1827-1839 (Electronic)
0392-9590 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435395> >.

MELLO, A. P. et al. Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact on health and disease. **Atherosclerosis**, v. 215, n. 2, p. 257-65, Apr 2011. ISSN 1879-1484 (Electronic)
0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292266> >.

MILLER, Y. I. et al. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 3, p. 1561-8, Jan 17 2003. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424240> >.

MISUMI, Y. et al. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. **J Biol Chem**, v. 261, n. 24, p. 11398-403, Aug 25 1986. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2426273> >.

MODUR, V. et al. Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor alpha. Ceramide-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase cascades. **J Biol Chem**, v. 271, n. 22, p. 13094-102, May 31 1996. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8662702> >.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, n. 27, p. 2002-12, Dec 30 1993. ISSN 0028-4793 (Print)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504210> >.

MORTENSEN, K.; LARSSON, L. I. Effects of cytochalasin D on the actin cytoskeleton: association of neoformed actin aggregates with proteins involved in signaling and endocytosis. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 5, p. 1007-12, May 2003. ISSN 1420-682X (Print)
1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12827288> >.

NEUBERT, K. et al. The ratio of formation of prostacyclin/thromboxane A2 in HUVEC decreased in each subsequent passage. **Prostaglandins**, v. 54, n. 1, p. 447-62, Jul 1997. ISSN 0090-6980 (Print)
0090-6980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9271783> >.

NICCOLI, G. et al. Impact of electronegative low-density lipoprotein on angiographic coronary atherosclerotic burden. **Atherosclerosis**, v. 223, n. 1, p. 166-70, Jul 2012. ISSN 1879-1484 (Electronic)

0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22640815> >.

NIEMANN-JONSSON, A. et al. Medial Expression of TNF-alpha and TNF Receptors Precedes the Development of Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein E/LDL Receptor Double Knockout Mice. **Int J Biomed Sci**, v. 3, n. 2, p. 116-22, Jun 2007. ISSN 1550-9702 (Print) 1550-9702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675033> >.

NIGON, F. et al. Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. **J Lipid Res**, v. 32, n. 11, p. 1741-53, Nov 1991. ISSN 0022-2275 (Print) 0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1770294> >.

NOWICKI, M. et al. No upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in serum-deprived EA.hy926 endothelial cells under oxLDL exposure, but increase in autophagy. **Eur J Cell Biol**, v. 86, n. 10, p. 605-16, Oct 2007. ISSN 0171-9335 (Print) 0171-9335 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643551> >.

Oliveira, C. L. P. (2011). Current Trends in X-Ray Crystallography, edited by D. A. Chandrasekaran, pp. 367-392: InTech.

Oliveira, C. L. P., Monteiro, A. M. & Figueiredo Neto, A. M. (2014). Brazilian Journal of Physics 44,753-764.

OLSSON, A. K. et al. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 5, p. 359-71, May 2006. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16633338> >.

ONAT, D. et al. Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis. **Curr Diab Rep**, v. 11, n. 3, p. 193-202, Jun 2011. ISSN 1539-0829 (Electronic) 1534-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21337131> >.

PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnol Adv**, v. 28, n. 6, p. 849-58, Nov-Dec 2010. ISSN 1873-1899 (Electronic) 0734-9750 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20659548> >.

PERSSON, H. L.; NILSSON, K. J.; BRUNK, U. T. Novel cellular defenses against iron and oxidation: ferritin and autophagocytosis preserve lysosomal stability in airway epithelium. **Redox Rep**, v. 6, n. 1, p. 57-63, 2001. ISSN 1351-0002 (Print) 1351-0002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11333118> >.

POON, G. M.; GARIEPY, J. Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 4, p. 788-93, Aug 2007. ISSN 0300-5127 (Print) 0300-5127 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635149> >.

PUSZTASZERI, M. P.; SEELENTAG, W.; BOSMAN, F. T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal

human tissues. **J Histochem Cytochem**, v. 54, n. 4, p. 385-95, Apr 2006. ISSN 0022-1554 (Print)

0022-1554 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16234507> >.

RAHMAN, A. et al. E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation. **Am J Physiol**, v. 275, n. 3 Pt 1, p. L533-44, Sep 1998. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9728048> >.

RAO, D. A.; TRACEY, K. J.; POBER, J. S. IL-1alpha and IL-1beta are endogenous mediators linking cell injury to the adaptive alloimmune response. **J Immunol**, v. 179, n. 10, p. 6536-46, Nov 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982042> >.

RATH, M. et al. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. **Front Immunol**, v. 5, p. 532, 2014. ISSN 1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25386178> >.

RINK, R. et al. To protect peptide pharmaceuticals against peptidases. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 61, n. 2, p. 210-8, Mar-Apr 2010. ISSN 1873-488X (Electronic)

1056-8719 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176117> >.

SACKS, F. M. The crucial roles of apolipoproteins E and C-III in apoB lipoprotein metabolism in normolipidemia and hypertriglyceridemia. **Curr Opin Lipidol**, v. 26, n. 1, p. 56-63, Feb 2015. ISSN 1473-6535 (Electronic)

0957-9672 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25551803> >.

SANCHEZ-QUESADA, J. L.; BENITEZ, S.; ORDONEZ-LLANOS, J. Electronegative low-density lipoprotein. **Curr Opin Lipidol**, v. 15, n. 3, p. 329-35, Jun 2004. ISSN 0957-9672 (Print)

0957-9672 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15166790> >.

SANCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. **J Lipid Res**, v. 43, n. 5, p. 699-705, May 2002. ISSN 0022-2275 (Print)

0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11971940> >.

SANCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 166, n. 2, p. 261-70, Feb 2003. ISSN 0021-9150 (Print)

0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12535738> >.

SANCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control. **Diabetologia**, v. 39, n. 12, p. 1469-76, Dec 1996. ISSN 0012-186X (Print)

0012-186X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8960828> >.

SANTO FAULIN TDO, E. et al. Validation of a novel ELISA for measurement of electronegative low-density lipoprotein. **Clin Chem Lab Med**, v. 46, n. 12, p. 1769-75, 2008. ISSN 1434-6621 (Print)

1434-6621 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19055454> >.

SAWA, Y. et al. Effects of TNF-alpha on leukocyte adhesion molecule expressions in cultured human lymphatic endothelium. **J Histochem Cytochem**, v. 55, n. 7, p. 721-33, Jul 2007. ISSN 0022-1554 (Print)

0022-1554 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17371935> >.

SAWAMURA, T. et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. **Nature**, v. 386, n. 6620, p. 73-7, Mar 6 1997. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9052782> >.

SEVANIAN, A. et al. LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. **J Lipid Res**, v. 38, n. 3, p. 419-28, Mar 1997. ISSN 0022-2275 (Print)

0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9101423> >.

SEVANIAN, A. et al. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. **J Lipid Res**, v. 36, n. 9, p. 1971-86, Sep 1995. ISSN 0022-2275 (Print)

0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8558085> >.

SHAH, P. K. Pathophysiology of plaque rupture and the concept of plaque stabilization. **Cardiol Clin**, v. 21, n. 3, p. 303-14, v, Aug 2003. ISSN 0733-8651 (Print)

0733-8651 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14621447> >.

SHEEDY, F. J.; MOORE, K. J. IL-1 signaling in atherosclerosis: sibling rivalry. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 1030-2, Oct 2013. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048132> >.

SILVA, I. T. et al. Is plasma alpha-tocopherol associated with electronegative LDL in obese adolescents? **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 59, n. 2, p. 100-7, 2013. ISSN 1881-7742 (Electronic)

0301-4800 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727639> >.

SIQUEIRA, A. F.; ABDALLA, D. S.; FERREIRA, S. R. [LDL: from metabolic syndrome to instability of the atherosclerotic plaque]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 50, n. 2, p. 334-43, Apr 2006. ISSN 0004-2730 (Print)

0004-2730 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16767300> >.

SMITH, A. D.; ARNOLD, E.; ARNOLD, G. F. Protein engineering to create biologically active peptides: recombinant human rhinoviruses that display peptide sequences. **Behring Inst Mitt**, n. 98, p. 229-39, Feb 1997. ISSN 0301-0457 (Print)

0301-0457 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382744> >.

SPECTOR, A. A. Plasma lipid transport. **Clin Physiol Biochem**, v. 2, n. 2-3, p. 123-34, 1984. ISSN 0252-1164 (Print)

0252-1164 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6386279> >.

STEIN, M. et al. Interleukin 4 potentially enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **J Exp Med**, v. 176, n. 1, p. 287-92, Jul 1 1992. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613462> >.

STEINBERG, D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S376-81, Apr 2009. ISSN 0022-2275 (Print)

0022-2275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19011257> >.

- SUKHANOV, S. et al. Novel effect of oxidized low-density lipoprotein: cellular ATP depletion via downregulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Circ Res**, v. 99, n. 2, p. 191-200, Jul 21 2006. ISSN 1524-4571 (Electronic)
0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778134> >.
- SUNG, S. H. et al. Blockade of vascular endothelial growth factor signaling ameliorates diabetic albuminuria in mice. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, n. 11, p. 3093-104, Nov 2006. ISSN 1046-6673 (Print)
1046-6673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988063> >.
- TAKEI, K.; YOSHIDA, Y.; YAMADA, H. Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis. **J Biochem**, v. 137, n. 3, p. 243-7, Mar 2005. ISSN 0021-924X (Print)
0021-924X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809324> >.
- TALL, A. R.; YVAN-CHARVET, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 2, p. 104-16, Feb 2015. ISSN 1474-1741 (Electronic)
1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25614320> >.
- TANG, D.; BILLIAR, T. R.; LOTZE, M. T. A Janus tale of two active high mobility group box 1 (HMGB1) redox states. **Mol Med**, v. 18, p. 1360-2, Dec 20 2012. ISSN 1528-3658 (Electronic)
1076-1551 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23073660> >.
- TONG, A. H. et al. A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. **Science**, v. 295, n. 5553, p. 321-4, Jan 11 2002. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743162> >.
- UNGER, R. E. et al. In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. **Microvasc Res**, v. 64, n. 3, p. 384-97, Nov 2002. ISSN 0026-2862 (Print)
0026-2862 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453433> >.
- VINALS, F.; POUYSSEGUR, J. Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 21, p. 7218-30, Nov 2001. ISSN 0270-7306 (Print)
0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585905> >.
- VON KLEIST L, HAUCKE V (2012) At the crossroads of chemistry and cell biology: inhibiting membrane traffic by small molecules. **Traffic** 13: 495–504
- VOYTA, J. C. et al. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. **J Cell Biol**, v. 99, n. 6, p. 2034-40, Dec 1984. ISSN 0021-9525 (Print)
0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6501412> >.
- WADA, Y. et al. In vitro model of atherosclerosis using coculture of arterial wall cells and macrophage. **Yonsei Med J**, v. 41, n. 6, p. 740-55, Dec 2000. ISSN 0513-5796 (Print)
0513-5796 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204825> >.

WICK, G.; KNOFLACH, M.; XU, Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 361-403, 2004. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032582> >.

Wickstrom SA, Lange A, Hess MW, Polleux J, Spatz JP, et al. (2010) Integrin linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae. **Dev Cell** 19: 574–588).

WILEMAN, T. et al. Monensin inhibits recycling of macrophage mannose-glycoprotein receptors and ligand delivery to lysosomes. **Biochem J**, v. 220, n. 3, p. 665-75, Jun 15 1984. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6087792> >.

YATES-BINDER, C. C. et al. An IP-10 (CXCL10)-derived peptide inhibits angiogenesis. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40812, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22815829> >.

ZETTLER, M. E. et al. Oxidized low-density lipoprotein retards the growth of proliferating cells by inhibiting nuclear translocation of cell cycle proteins. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 4, p. 727-32, Apr 2004. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764420> >.

ZHANG, H. et al. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. **Clin Sci (Lond)**, v. 116, n. 3, p. 219-30, Feb 2009. ISSN 1470-8736 (Electronic) 0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19118493> >.

ZHOU, J. et al. ox-LDL downregulates eNOS activity via LOX-1-mediated endoplasmic reticulum stress. **Int J Mol Med**, v. 32, n. 6, p. 1442-50, Dec 2013. ISSN 1791-244X (Electronic) 1107-3756 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24085225> >.

Zhang, M., Jiang, L. "Oxidized low-density lipoprotein decreases VEGFR2 expression in HUVECs and impairs angiogenesis". *Experimental and Therapeutic Medicine* 0.0 (1899): 0-0.

Anexo I: Resultados anteriores com a linhagem HUVEC

Foi realizado o ensaio de viabilidade celular na linhagem HUVEC através do Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit, dentre todas as concentrações testadas, apenas a de 100 $\mu\text{g/mL}$ de LDL (-) foi citotóxica, com aumento do número de células em apoptose, mas não em necrose (Figura 46). Sendo assim, excluiu-se dos próximos ensaios a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de todos os tratamentos.

Figura 46: Ensaio de Viabilidade Celular. 2×10^5 células HUVEC foram plaqueadas em placa de 24 poços. Após 16 horas em RPMI 1% SFB, as células foram encubadas por 24h com os diferentes tratamentos e então marcadas com anexina (ligante de fosfatidil serina) e Iodeto de propídeo (intercalante de DNA). Apenas foi observada diferença estatística com o teste OneWay Anova em relação a condição basal entre o tratamento LDLMM 100 $\mu\text{g/mL}$ para Células Viáveis (não marcadas) e células Apoptóticas (Anexina).

Para averiguar se os peptídeos eram internalizados pelas células, foi realizada uma cinética de captação com 50 ug/mL de p1A3, p2C7 e LDL (-). Os peptídeos foram obtidos comercialmente conjugados com FITC, já a LDL (-) foi conjugada com Dil um dia antes do experimento (figura 47). Dil para cada 250 ug de LDL (-) e incubados por 16h a 37°C em ambiente protegido da luz. Os tempos de tratamento foram de 3 a 8h com amostras de 1 em 1 hora.

Figura 47: Cinética de Captação dos Peptídeos e LDL (-) por células endoteliais. Foram plaqueadas 1×10^5 células em placa de 24 poços e, após sincronização com meio RPMI 1% SFB, foram tratadas com 50 ug/mL de p1A3 e p2C7 (marcados com FITC) e LDL (-) marcada com Dil. As células foram tratadas de hora em hora, a fim de se ter uma cinética que compreende do tempo 3 a 8 horas. Como é possível observar, P2C7 e LDL (-) já estavam saturados no menor tempo testado.

Como é possível observar, P2C7 mostrou comportamento semelhante a LDL (-), sendo que, em ambos os casos, as células endoteliais já estavam saturadas no menor tempo do tratamento (3h). O P1A3, entretanto, alcançou aproximadamente 90% de saturação apenas no maior tempo testado (8h).

Foi realizado ensaio de qPCR com tratamentos de 4 horas (figura 48) e 8 horas.

Figura 48: qPCR para LDL (-), P1A3 e P2C7 (50 ug/mL) e LPS (10 ug/mL), tratamento por 4 horas. Entre os genes testados, apenas foi observada diferença estatística entre o controle positivo LPS e os demais tratamentos para os genes ICAM1, IL-8, IL-6 e CCL2 (n = 4).

Figura 49: qPCR para LDL (-), P1A3 e P2C7 (50 ug/mL) e LPS (10 ug/mL), tratamento por 8 horas. Como resultados preliminares, o tempo de 8 horas de tratamento não mostrou significativa alteração para os genes eNOS, VCAM1, IL-8, NF-kB, AP1A3 e AKT. Apenas o controle positivo (LPS 10 ug/mL) apresentou efeito deletério nas células endoteliais (n = 1).

Figura 50: qPCR para LDL (-), P1A3 e P2C7 (50 ug/mL) e LPS (10 ug/mL), tratamento por 8 horas. Os peptídeos se mostraram inertes em relação aos genes CCL2, IL-6, FGF, eSELECTINA, THBS1 e ICAM1, já o tratamento com LDL(-) aumentou a expressão de CCL2 (n =1).

Figura 51: qPCR para LDL(-), P1A3 e P2C7 (50 ug/mL) e LPS (10 ug/mL), tratamento por 8 horas. Os tratamentos testados para os genes PDGF, TGF, VEGF, IL18 não mostraram diferença em relação a condição basal. Apenas o controle positivo (LPS 10ug/mL) estimulou a expressão de LOX1 em quanto que houve um aumento para todos os tratamentos em relação ao gene NFAT (n =1).

Figura 52: qPCR para LDL(-), P1A3 e P2C7 (50 ug/mL) e LPS (10 ug/mL), tratamento por 8 horas. Apenas houve estímulo para expressão dos genes TNFα, CSF2, CXCL3 e IL-1b para o controle positivo LPS (10 ug/mL), em quanto os tratamentos testados se mostraram inertes (n=1).

Anexo II: Aprovação no comitê de ética em experimentação animal:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 43.2015-P492

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Estudo da Interação de Peptídeos Mimotopos da LDL Eletronegativa com Macrófagos Murinos Primários e Células Endoteliais (HUVEC)**" (Protocolo CEUA/FCF/492), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Gustavo Luis Tripodi**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **10 de abril de 2015**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 6 de julho de 2015.

Prof. Dr. Jolison de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Anexo III: Lattes

Gustavo Luis Tripodi

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9700752516945844>

Última atualização do currículo em 04/10/2016

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Cruzeiro do Sul (2013) e curso técnico em Biodiagnóstico pelo CNSL (2007). Atualmente é aluno do programa de mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e estuda os efeitos de peptídeos mimotopos da LDLmm em macrófagos e células endoteliais, sob orientação da professora doutora Dulcineia Saes Parra Abdalla. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome: Gustavo Luis Tripodi

Nome em citações bibliográficas: TRIPODI, G. L.; TRIPODI, GUSTAVO L.

Endereço

Endereço Profissional: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Cidade Universitária
Butantã
05508900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (011) 30913637

Formação acadêmica/titulação

- 2014** Mestrado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Estudo da Interação de Peptídeos Mimotopos da LDL Eletro negativa com Macrófagos Murinos Primários e Células Endoteliais (HUVEC). Orientador: Dulcineia Saes Parra Abdalla.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
- 2010 - 2013** Graduação em Farmácia.
Universidade Cruzeiro do Sul, UNICSUL, Brasil.
Título: MicroRNAs e Aterosclerose.
Orientador: Sandra Castro Poppe.
- 2006 - 2007** Curso técnico/profissionalizante em Técnico em Biodiagnóstico.
Colégio Nossa Senhora de Lourdes, CNSL, Brasil.

Formação Complementar

- 2016 - 2016** Obesidade: da bancada à clínica. (Carga horária: 3h).
Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Brasil.
- 2008 - 2008** Introdução ao Cálculo Tensorial e a Teoria de Grupos.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2008 - 2008 Experiências Didáticas e de Divulgação Científica.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Regime: Dedicção exclusiva.

Universidade Cruzeiro do Sul, UNICSUL, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - 2013 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Regime: Dedicção exclusiva.

Projetos de pesquisa

2012 - 2013 Efeito do Carotenoide Astaxantina no Balanço Redox de Células Hepáticas Carcinogênicas (HepG2)

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Gustavo Luis Tripodi - Integrante / Marcelo Paes de Barros - Coordenador.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. RUDNICKI, MARTINA ; **TRIPODI, GUSTAVO L.** ; FERRER, RENILIA ; BOSCA, LISARDO ; PITTA, MARINA G.R. ; PITTA, IVAN R. ; ABDALLA, DULCINEIA S.P. . New thiazolidinediones affect endothelial cell activation and angiogenesis. *European Journal of Pharmacology* **XXX**, v. 782, p. 98-106, 2016.
2. SILVA, JACQUELINE C. ; CÉSAR, FERNANDA A. ; DE OLIVEIRA, EDSON M. ; TURATO, WALTER M. ; **TRIPODI, GUSTAVO L.** ; CASTILHO, GABRIELA ; MACHADO-LIMA, ADRIANA ; DE LAS HERAS, BEATRIZ ; BOSCA, LISARDO ; RABELLO, MARCELO M. ; HERNANDES, MARCELO Z. ; PITTA, MARINA G.R. ; PITTA, IVAN R. ; PASSARELLI, MARISA ; RUDNICKI, MARTINA ; ABDALLA, DULCINEIA S.P. . New PPARγ partial agonist improves obesity-induced metabolic alterations and atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. *Pharmacological Research* **XXX**, v. 104, p. 49-60, 2016.

Citações: 2 | 2

Apresentações de Trabalho

1. SILVA, J. C. ; PITTA, M. G. ; PITTA, I. R. ; RUDNICKI, M. ; **TRIPOLI, GUSTAVO L.** ; ABDALLA, D. S. P. . GQ-11: A novel PPAR α agonist with beneficial effects in high fat diet-induced obesity. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. **TRIPOLI, G. L.**; GIORDANO, R. ; FAULIN, T. ; ABDALLA, D. S. P. . Efeito de peptídeos mimotópicos da LDL eletronegativa em macrófagos murinos. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Demais tipos de produção técnica

1. **TRIPOLI, G. L.**. XI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular. 2016. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. XXXI Reunião da Federação de Sociedade de Biologia Experimental - FeSBE. Efeito de peptídeos mimotópicos da LDL eletronegativa em macrófagos murinos. 2016. (Congresso).
2. VI Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas. 2015. (Simpósio).
3. XIV SIMPÓSIO DE BIOSSEGURANÇA E DESCARTES DE PRODUTOS QUÍMICOS PERIGOSOS E ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (OGMs) EM INSTITUIÇÕES DE ENSINO E PESQUISA. 2015. (Simpósio).
4. III Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular. 2012. (Oficina).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 31/10/2016 às 10:38:30

Anexo III: Janus

31/10/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 9123806/1 - Gustavo Luis Tripodi

Email:	gustavolt90@usp.br
Data de Nascimento:	02/09/1990
Cédula de Identidade:	RG - 35.259.003-8 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Farmácia - Universidade Cruzeiro do Sul - São Paulo - Brasil - 2013

Curso:	Mestrado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	09/06/2014
Início da Contagem de Prazo:	09/06/2014
Data Limite para o Depósito:	09/12/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 09/06/2014 até o presente. Email: dspa@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 09/06/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 20/08/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 09/06/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2016

Impresso em: 31/10/2016 14:20:19

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 9123806/1 - Gustavo Luis Tripodi

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-6/1	Tópicos em Análises Clínicas II	05/08/2014	17/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5709-5/2	Biologia Molecular em Análises Clínicas	22/09/2014	27/10/2014	75	5	100	A	N	Concluída
FBF5805-1/3	Delimitação de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	24/09/2014	28/10/2014	45	3	80	A	N	Concluída
QBQ5747-8/1	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	24/11/2014	30/11/2014	15	1	80	A	N	Concluída
FBC5793-12/2	Tópicos em Análises Clínicas I	03/03/2015	16/06/2015	15	1	87	A	N	Concluída
ICB5744-1/1	Fisiopatologia do Inflamassoma: The Good, The Bad and The Ugly (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	18/05/2015	31/05/2015	60	4	80	B	N	Concluída
FBC5734-3/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	03/08/2015	09/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída
QBQ5715-8/1	Planejamento de Aulas Práticas de Bioquímica e Biologia Molecular (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	18/08/2015	09/11/2015	120	8	80	A	N	Concluída
FBC5700-6/2	Aterosclerose: Fisiopatologia, Diagnóstico e Terapêutica	03/11/2015	30/11/2015	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2016

Impresso em: 31/10/2016 14:20:19