



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2012

Ana Cristina Marques
Jesus Silva

**PERFIL LIPÍDICO E RESPOSTA IMUNE NO
ENFARTE AGUDO DO MIOCÁRDIO**



**Ana Cristina Marques
Jesus Silva**

**PERFIL LIPÍDICO E RESPOSTA IMUNE NO ENFARTE
AGUDO DO MIOCÁRDIO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada-Ramo Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e do Doutor Artur Augusto Paiva, Equiparado a Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Apoio financeiro da FCT no âmbito do projecto PTDC/QUI-BIQ/104968/2008 financiado pelo Compete Feder.

Dedico este trabalho aos meus Pais, Irmão e Namorado João...

o júri
presidente

Prof. Doutor João António de Almeida Seródio
Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Teresa Teixeira da Cruz Rosete
Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia na Universidade de Coimbra

Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Artur Augusto Paiva
Equiparado a Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

agradecimentos

Desejo agradecer muito à Professora Doutora Rosário Domingues pela orientação, boa disposição e pela constante motivação. Agradeço também ao Doutor Artur pela oportunidade e orientação.

Queria agradecer ainda a todos os meus colegas do Departamento de Química, em especial à Cláudia. Agradeço também a toda a equipa do Centro de Histocompatibilidade do Centro, em especial ao Tiaguinho.

Agradeço também à Doutora Natália do Hospital Universitário de Coimbra pela colaboração neste trabalho.

Aos meu Pais e Irmão por todo o apoio e amor incondicional e por continuarem a acreditar em mim.

E ao João por me apoiar, animar, por estar sempre, sempre comigo e depois de todas as minhas crises ainda me continuar a amar-me...

palavras-chave

Resposta imune, perfil lipido, enfarte agudo do miocardio, citometria de fluxo, espetometria de massa.

resumo

O enfarto agudo do miocárdio (EAM) é uma das principais causas de mortalidade a nível mundial. O EAM está associado a uma resposta inflamatória e alterações no metabolismo dos lípidos. Diversos estudos sugerem que as espécies reativas de oxigénio (ROS) podem desempenhar um papel importante na patogénese do EAM, uma vez que, os lípidos são um dos principais alvos de ROS, e sabe-se que os lípidos oxidados têm um papel ativo na ativação do processo inflamatório pelo que pode implicar o desenvolvimento do EAM. Por outro lado a oxidação lipídica pode estar associada a uma alteração do perfil lipídico, dado que as moléculas derivadas podem ser degradadas por ação de fosfolipases e assim alterar a proporcionalidade entre as diferentes classes. O objetivo deste estudo é avaliar as variações do perfil de lípidios em 12 pacientes após o enfarto agudo do miocárdio (M1) e 1 mês após o episódio (M2) e em 12 indivíduos saudáveis (CTR). Neste trabalho foi também realizado o estudo imunofenotípica e funcional de monócitos e células dendríticas em sangues dos mesmo doentes e os resultados, comparados com os de pacientes controlos saudáveis.

A avaliação do perfil lipídico de extrato lipídico do soro de pacientes e controlo foi realizado por HPLC-ESI-MS e MS/MS, permitindo a identificação da estrutura detalhada de triglicéridos e fosfolípidos. A comparação dos dados obtidos permitiu observar diferenças no perfil lipídico do soro de doentes após enfarte agudo do miocárdio e os CTR. As diferenças mais importantes no momento M1, quando comparados com M2 e CTR, foram: diminuição da quantidade de lisofosfatidiletanolaminas (LPE), lisofosfatidilcolina (LPC) e fosfatidilcolinas (PC), um aumento na quantidade de esfingomielinas (SM). Lisofosfolípidos e fosfolípidos oxidados são sinal de inflamação, verificando em aumento destes no grupo de enfartados comparando com o grupo de indivíduos.

As observações mais importantes no momento do M1, quando comparados com M2 e CTR, foram: a frequência mais elevada de TNF- α produzida por monócitos, células dendríticas mielóides, e $CD14^{low}CD16^{+}$; a frequência mais baixa de IL-6 produzida por monócitos mas maior frequência de IL-6 produzida pelas células dendríticas mielóides, e $CD14^{low}CD16^{+}$; uma diminuição na quantidade de CD36 produzido por monócitos, células dendríticas mielóides, e $CD14^{low}CD16^{+}$.

Os nossos dados demonstram que o EAM induz uma mudança significativa na homeostasia do sistema imune e no perfil de lípidos.

keywords

Immune response, lipid profile, myocardial infarction, flow cytometry, mass spectrometry

abstract

The acute myocardial infarction (AMI) is a major cause of mortality worldwide. The AMI is associated with an inflammatory response and alterations in lipid metabolism. Several studies suggest that reactive oxygen species (ROS) may play an important role in the pathogenesis of AMI, since lipids are a major target of ROS, and it is known that oxidized lipids have an active role in the activation inflammatory process that may involve the development of AMI. Moreover lipid oxidation may be associated with changes in lipid profile, since the molecules derived can be degraded by the action of phospholipases and thus changing the proportion between the different classes. The objective of this study is to evaluate changes in lipid profile in 10 patients after acute myocardial infarction (M1) and 1 month after the episode (M2) and in 10 healthy subjects (CTR). In this study was also performed phenotypical and functional study of monocytes and dendritic cells in periferal blood of the same patients and the results compared with healthy controls from patients. The evaluation of lipid extract lipid from the sera of patients and controls was performed by HPLC-ESI-MS and MS / MS, allowing the identification of the detailed structure of triglycerides and phospholipids. A comparison of data obtained allowed us to observe differences in serum lipid profile of patients after acute myocardial infarction and CTR. The most important differences in M1, M2 and compared with CTR were: decreased amount of lisofosfatidiletanolaminas (LPE), lysophosphatidylcholine (LPC) and phosphatidylcholines (PC), an increase in the amount of sphingomyelins (SM). Lysophospholipids and oxidized fosfolipifos are signs of inflammation, in checking increase of the myocardial infarction group compared with the group of individuals.

The most important observations at time of M1 when compared with CTR and M2 were: a higher frequency of TNF- α produced by monocytes, myeloid dendritic cells, and CD14^{-/low}CD16⁺; the lowest frequency of IL-6 produced by monocytes but higher frequency of IL-6 produced by myeloid dendritic cells, and CD14^{-/low}CD16⁺; decrease in the amount of CD36 produced by monocytes, myeloid dendritic cells, and CD14^{-/low}CD16⁺.

Our data demonstrate that AMI induces a significant change in the homeostasis of the immune system and on lipid profile.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	ix
1 LIPIDÓMICA.....	2
1.1 Lípidos.....	2
1.1.1 Lipoproteínas.....	3
1.1.2 Fosfolípidos.....	4
1.1.3 Stresse oxidativo e peroxidação lipídica.....	4
1.2 Técnicas na abordagem lipidómica.....	7
1.2.1 Extração de lípidos.....	8
1.2.2 Cromatografia líquida de alta precisão.....	8
1.2.3 Espectometria de Massa.....	9
1.1.1.1 Método de ionização por electrospray.....	10
1.2.3.1 Analisadores.....	11
1.2.3.2 Análise MS e MS/MS.....	11
2 RESPOSTA IMUNE.....	12
2.1 Monócitos.....	12
2.2 Células dendríticas.....	14
2.3 Recetores <i>scavenger</i> - CD36.....	15
2.4 Marcadores de inflamação.....	16
2.4.1 Moléculas quimiotáticas (quimiocinas).....	17
2.4.1.1 Fator de necrose tumoral (TNF).....	17
2.4.1.2 Interleucina-6 (IL-6).....	17
2.4.2 Proteína C reativa (PCR).....	18
2.5 Papel de fosfolípidos oxidados na resposta imune.....	19
2.6 Citometria de fluxo e análise de citocinas.....	19
2.6.1 Citometria de fluxo.....	20
3 ENFARTE AGUDO DO MIOCÁRDIO.....	20
3.1 Enquadramento epidemiológico.....	22
3.2 Enfarte agudo do miocárdio e inflamação.....	23
3.3 Enfarte agudo do miocárdio e perfil lipídico.....	24
3.4 Oxidação de fosfolípidos e doenças vasculares.....	24

4	Objetivo do estudo.....	26
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1	Produtos biológicos.....	28
5.2	Estudo fenotípico em monócitos e células dendríticas	29
5.2.1	Avaliação da expressão de CD36 por monócitos e células dendríticas.....	29
5.2.2	Aquisição e análise de dados de citometria de fluxo	29
5.2.3	Quantificação da Produção de Citocinas.....	30
5.2.4	Análise Estatística.....	30
5.3	Estudos funcionais em monócitos e células dendríticas.....	30
5.3.1	Avaliação da produção de citocinas <i>in vitro</i> por monócitos e células dendríticas...	30
5.3.2	Estimulação <i>in vitro</i> da produção de citocinas por DCs e monócitos	30
5.3.3	Marcação imunofluorescente	31
5.3.4	Aquisição e análise de dados de citometria de fluxo	31
5.3.5	Quantificação da Produção de Citocinas.....	32
5.3.6	Análise Estatística.....	32
5.4	Extração de fosfolípidos do soro	32
5.5	Quantificação fosfolípidos do soro usando o método Verde de Malaquite.....	32
5.6	Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de de FOX (<i>Ferous Oxidation- xylene Orange</i>)	33
5.6.1	Método de FOX (<i>Ferous Oxidation- xylene Orange</i>)	33
5.6.2	Análise Estatística.....	33
5.7	Instrumentação em cromatografia líquida e espectrometria de massa.....	34
5.7.1	Análise Estatística.....	34
6	Avaliação de parâmetros bioquímicos	36
7	Avaliação da quantidade de fosfolípidos no soro	37
8	Avaliação da peroxidação lipídica no soro	38
9	Análise do extrato lipídico total por HPLC e ESI-MS.....	39
9.1	Análise dos espectros de LC-ESI-MS e ESI-MS/MS no modo positivo.....	41
9.1.1	Triglicerídeos	42
9.1.2	Fosfatidilcolinas.....	46
9.1.3	Lisofosfatidilcolinas	51
9.1.4	Fosfatidiletanolaminas	54
9.1.5	Lisofosfatidiletanolaminas	57

9.1.6	Esfingomielina	59
9.2	Análise dos espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS no modo negativo.....	61
9.2.1	Fosfatidilinositois	62
9.2.2	Fosfatidiletanolaminas	65
9.2.3	Lisofosfatidiletanolaminas	67
10	Avaliação de parâmetros da Resposta imune.....	69
10.1	Frequência de monócitos e células dendríticas totais e suas subpopulações.....	70
10.2	Produção de citocinas por monócitos e subpopulações de células dendríticas.....	71
10.3	Quantidade da expressão de citocinas por monócitos e subpopulações de células dendríticas.....	73
10.4	Avaliação da expressão e frequência de CD36.....	74
11	Discussão	78
11.1	Avaliação de parâmetros bioquímicos.....	78
11.2	Stress oxidativo e peroxidação lipídica	79
11.3	Análise do extrato lipídico por ESI-MS e MS/MS	80
11.4	Avaliação de parâmetros da resposta imune.....	87
11.4.1	Frequência de monócitos e células dendríticas	87
11.4.2	Produção de citocinas por monócitos e células dendríticas	89
11.4.3	Avaliação da expressão de CD36.....	92
12	Conclusão	96
13	Bibliografia	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da classificação das diferentes classes lípidos. PE- fosfatidiletanolaminas; PI- fosfatitilinositol; PC-fosfatidilcolina; PS-fosfatidilserina SM-esfingomielina TAG-triglicerídeos [5]..	3
Figura 2. Esquema da redução (4 elétrões) da molécula de oxigénio a água.	5
Figura 3. Esquema da reação em cadeia da peroxidação lipídica.	6
Figura 4. Esquema ilustrativo da extração de lípidos utilizando mistura de solventes orgânicos. Abreviatura: Aq., aquoso e Org., orgânico.	8
Figura 5. Esquema geral dos vários componentes de HPLC.	9
Figura 6 Recetores de reconhecimento de padrão (PRR). Representação esquemática dos diferentes recetores de reconhecimento de padrões ancorados na membrana celular e seus respetivos ligandos (PAMP) [25]	13
Figura 7. Enfarte do miocárdio na da parede anterior do coração após a oclusão de um ramo da artéria coronária, levando á lesão do tecido cardíaco.	21
Figura 8. Gráfico da distribuição por género das principais causas de mortalidade mundial [68].	23
Figura 9. Esquema geral do trabalho. Para cada individuo foram colhidos diferentes tubos, com objetivos de diferentes análises.	29
Figura 10. Quantificação de fosfolípidos presentes no soro dos indivíduos dos diferentes grupos em estudo, pelo método verde de malaquite. M1- momento em que sofreram enfarte agudo do miocárdio; M2- Um mês após terem sofrido o enfarte; CTR- grupo controlo;	38
Figura 11. Quantificação da peroxidação lipídica pelo método de FOX no soro de doentes enfartados, um mês após ter ocorrido enfarte e num grupo controlo. M1- momento em que sofreram enfarte agudo do miocárdio; M2- Um mês após terem sofrido o enfarte; CTR- grupo controlo;	39
Figura 12. Separação das diferentes classes de lípidos por HPLC. (A) Separação dos TAG, PE, LPE, PC, SM, LPC modo positivo; (B) Separação dos PI, PE, LPE no modo negativo.	40
Figura 13. Diferentes classes de lípidos e o intervalo de m/z correspondente a cada uma.	41
Figura 14. Abundância relativa das SM, PC, e LPC presentes no soro de indivíduos enfartados (M1 e M2) e indivíduos saudáveis (CTR). Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2).	42

Figura 15. Espectros de LC-ESI-MS de triglicerídeos. Comparação dos diferentes espectros de LC-ESI-MS no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controlo (CTR).....	42
Figura 16. Espectro MS/MS característico de triglicerídeos no modo positivo. (A) Espectro MS/MS dos iões percussores característicos da fragmentação de aductos de amoníaco, para a estrutura 16:0/ 18:1/ 18:1. (B) Espectro MS/MS dos iões percussores característicos da fragmentação de aductos de amoníaco, para a estrutura 16:0/ 18:0/ 18:2.	44
Figura 17. Avaliação da quantidade de triglicerídeos. (A) Quantidade dos diferentes iões da classe triglicerídeos. (B) Quantidade relativa dos diferentes iões; (C)- Quantidade total dos triglicerídeos. M1-momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controlo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2).	46
Figura 18. Classes dos glicerofosfolipidos, acil, alquil e alquilacil, e respectiva estrutura e representação [89].....	47
Figura 19. Espectros de LC-ESI-MS de fosfatidilcolinas no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controlo (CTR).	47
Figura 20. Estrutura da fosfatidilcolina m/z 760.6 (18:1/16:0) e fragmentação e respetivo espectro MS/MS característico de $[M+H]^+$ no modo positivo.	49
Figura 21. Quantificação da classe fosfatidilcolina. (A) Quantidade dos diferentes iões da classe fosfatidilcolina. (B) Quantidade relativa dos diferentes iões; (C)- Quantidade total das fosfatidilcolina. M1-momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controlo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2)...	50
Figura 22. Espectros de LC-ESI-MS de lisofosfatidilcolinas no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controlo (CTR).....	51
Figura 23. Estrutura da lisofosfatidilcolina m/z 496.5 (16:0) e fragmentação e respetivo espectro característico de $[M+H]^+$ no modo positivo.	52
Figura 24. Quantificação da classe de lisofosfatidilcolina. (A) Quantidade dos diferentes iões da classe lisofosfatidilcolina. (B) Quantidade relativa diferentes iões; (C)- Quantidade total das lisofosfatidilcolina. M1-momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controlo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2).....	54

Figura 25. Espectros de LC-ESI-MS de fosfatidiletanolaminas no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controlo (CTR)	55
Figura 26. Estrutura da fosfatidiletanolaminas m/z 744.5 (18:0/18:2; 18:1/18:1) e fragmentação e respetivo espectro característico de $[M+H]^+$ no modo positivo e em modo negativo.....	57
Figura 27. Espectros de LC-ESI-MS de lisofosfatidiletanolaminas no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controlo (CTR).....	58
Figura 28. Estrutura da lisofosfatidiletanolaminas m/z 500.4 (20:5) e fragmentação e respetivo espectro característico de $[M+H]^+$ no modo positivo e em modo negativo.....	59
Figura 29. Espectros de LC-ESI-MS de esfingomielinas no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controlo (CTR)	59
Figura 30. Quantificação da classe esfingomielina. (A) Quantidade dos diferentes iões da classe esfingomielina. (B) Abundância relativa dos diferentes iões; (C)- Quantidade total das esfingomielinas. M1-momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controlo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste de Wilcoxon- c –M1 versus M2).....	61
Figura 31. Quantidade relativa das LPE, PE e PI presentes no soro de indivíduos enfartados (M1 e M2) e indivíduos saudáveis (CTR)	62
Figura 32. Espectros de LC-ESI-MS de fosfatidilinositois no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controlo (CTR).....	63
Figura 33. Estrutura da fosfatidilinositois m/z 857.5 (16:0/20:4), fragmentação e respetivo espectro característico de $[M-H]^-$ no modo negativo.....	64
Figura 34. Quantificação da classe fosfatidilinositois. (A) Quantidade dos diferentes iões da classe fosfatidilinositois. (B) Abundância relativa dos diferentes iões; (C)- Quantidade total das fosfatidilinositois. M1-momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controlo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b –M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c –M1 versus M2)...	65
Figura 35. Quantificação da classe fosfatidiletanolamina. (A) Quantidade dos diferentes iões da classe fosfatidiletanolaminas. (B) Abundância relativa dos diferentes iões; (C)- Quantidade total das fosfatidiletanolaminas. M1-momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controlo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b –M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c –M1 versus M2).....	67

Figura 36. Quantificação da classe lisofosfatidiletanolaminas. (A) Quantidade dos diferentes iões da classe lisofosfatidiletanolaminas. (B) Abundância relativa dos diferentes iões; (C)- Quantidade total das lisofosfatidiletanolaminas. M1-momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controlo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2)..... 69

Figura 37. Identificação da população de células dendríticas bem como das subpopulações. (A)-(C) células dendríticas totais. (D)-(G) Identificação das subpopulações..... 72

Figura 38. Frequência de monócitos e subpopulações de células detríticas que produzem TNF- α e IL-6 nos diferentes momentos e diferentes grupos. M1- momento em que sofreram enfarte agudo do miocárdio; M2- um mês após terem sofrido o enfarte; CTR- grupo controlo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2)..... 73

Figura 39. Quantidade de expressão de CD36 pelos monócitos nos diferentes grupos. Os resultados são expressos em média da intensidade de fluorescência. MFI- média de intensidade de fluorescência; Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U); a -M1 versus CTR..... 75

Figura 40. Quantidade de expressão de CD36 pelas subpopulações de DCs nos diferentes grupos. Os resultados são expressos em média da intensidade de fluorescência. MFI- média de intensidade de fluorescência; M1- momento em que sofreram enfarte agudo do miocárdio; M2- Um mês após terem sofrido o enfarte; CTR- grupo controlo. 75

Figura 41. Vias da biossíntese dos fosfolípidos. Mecanismo de que envolve a hidrólise do grupo fosfato pela enzima ácido fosfatídico fosfatase (PAP) e o mecanismo utilizando o trifosfato de citidina (CTP). PA- ácido fosfatídico; TAG- triglicerídeos; DAG- diglicerídeos; PE- fosfatidiletanolamina; LPE- lisofosfatidiletanolamina; PC- fosfatidilcolina; LPC- lisofosfatidilcolina; PS- fosfatidilserina; SM- esfingomiolina; PI- fosfatidilinositol; PIP- fosfoinosítídeos fosforiladas; LPCAT1- lecitinina-colesterol aciltransferase..... 82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Marcação utilizada nos diferentes tubos para o estudo funcional. Para cada amostra foram preparados dois tubos, um para cada citocina em estudo. 31

Tabela 2- Características clínicas e bioquímicas dos indivíduos que sofreram enfarte agudo do miocárdio nos diferentes momentos (M1; EMA2) e grupo controle (CTR).....	37
Tabela 3- Triglicerídeos mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controle.....	43
Tabela 4- Fosfatidilcolinas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controle.	48
Tabela 5- Lisofosfatidilcolinas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controle.....	52
Tabela 6- Fosfatidiletanolaminas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controle.....	55
Tabela 7- Lisofosfatidiletanolaminas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controle.....	58
Tabela 8- Esfingomielinas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controle.....	60
Tabela 9- Fosfatidilinosítois mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controle.	63
Tabela 10- Fosfatidiletanolaminas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controle.....	66
Tabela 11- Lisofosfatidiletanolaminas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controle.....	68
Tabela 12 - A análise comparativa de células brancas, monócitos, DCs e subpopulações de DCs (percentagem; número de células / μL de sangue periférico) no M1, M2 e CTR.....	71
Tabela 13. Quantidade de expressão de cada citocinas <i>per</i> célula nos diferentes grupos.	74

ABREVIATURAS

APC- Células apresentadoras de antígeno (do inglês *Antigen presenting cells*)

CAT – Catalase

CD- *Cluster of differentiation*

CT- Colesterol Total

DAG - Diacilglicerol

DC- Células dendríticas

EAM- Enfarte agudo do miocárdio

ESI - *electrospray ionization*

FOX- *Ferrous Oxidation- xylenol Orange*

FS- Dispersão frontal (do inglês *forward scatter*)

GPL- Gliceroglicolipidos

HDL- Lipoproteínas de alta densidade (do inglês *high density lipoproteins*)

HPLC - Cromatografia líquido de alto rendimento (do inglês *high performance liquid chromatography*)

IL - Interleucina

LDL- Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês *low density lipoproteins*)

LPA- Ácido lisofosfático (do inglês *lysophosphatidic acid*)

LPC- Lisofosfatidilcolina (do inglês *lysophosphatidylcholine*)

LPE – Lisofosfatidiletanolamina (do Inglês *lysophosphatidylethanolamine*)

LPS- Lipopolissacarideo

mDC- Células dendríticas mieloides

MFI- Intensidade média de fluorescência (do inglês *mean fluorescence intensity*)

MS – Espectrometria de massa (do inglês *mass spectrometry*)

MS/MS – Espectrometria de massa tandem

OMS- Organização mundial de saúde

oxLDL- Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas

oxPAPC- 1-palmitoil-2-aracidonoil-*sn*-glicero-3-fosfocholine oxidado

OxPL- Fosfolípidos oxidados

PAMP- Padrões moleculares associados a patogénico (do inglês *pathogen-associated molecular patterns*)

PC – Fosfatidilcolina (do inglês *phosphatidylcholine*)

PCR- Proteína C reativa

PE – Fosfatidiletanolamina (do Inglês *phosphatidylethanolamine*)

PI – Fosfatidilinositol (do inglês *phosphatidylinositols*)

PL – Fosfolípidos (do inglês *phospholipid*)

PS – Fosfatitilserina (do inglês *phosphatidylserine*)

PRR- Recetores de reconhecimento padrão (do inglês *pattern recognition receptors*)

ROS – Espécies reativas de oxigénio (do inglês *reactive oxygen species*)

SM – Esfingomielina (do inglês *sphingomyelin*)

SOD - Superóxido dismutase

SS- Dispersão lateral (do inglês *Side scatter*)

TAG - Triacilglicerídeos

TLR- Recetores *toll-like*

TNF- α - Fator de necrose tumoral α (do inglês *tumoral necrose factor α*)

TOF- Tempo de voo (do inglês *time of flight*)

VLDL- Lipoproteínas de muito baixa densidade (do inglês *very low density lipoproteins*)

INTRODUÇÃO

1 LIPIDÓMICA

Lipidómica é o campo emergente que se foca na análise de lípidos e dos fatores que interagem com estes [1], por apresentarem uma variedade de funções biológicas, tais como a formação de membranas celulares, o armazenamento de energia e a sinalização celular, é de esperar que os lípidos reflitam parcialmente o estado metabólico do organismo na presença ou ausência de patologias [2, 3]. Mais ainda, muitos estudos têm demonstrado que distúrbios metabólicos de lípidos podem levar a várias doenças humanas, como os diabetes, obesidade, arteriosclerose, doenças cardíacas ou lesões cerebrais. Por isto mesmo, a análise destes compostos em amostras biológicas tem assumido uma relevante importância na compreensão de distúrbios metabólicos e em diversas patologias [2, 3].

Recentemente, muitos estudos têm demonstrado que a abordagem lipidómica é essencial na determinação de novas espécies lipídicas que servem como potenciais biomarcadores de muitas doenças [2]. Para além das aplicações em doenças humanas, a estratégia da lipidómica direcionada para a descoberta de biomarcadores tem sido também utilizada para a promoção da saúde e prevenção de doenças [2]. A análise de lípidos através de amostras biológicas (tecidos, células, fluidos celulares, entre outros) permite uma melhor compreensão do metabolismo destes compostos, a perceção de alterações de respostas a diferentes estímulos ou situações, bem como as suas funções nos sistemas biológicos.

1.1 Lípidos

Os lípidos compreendem um grupo heterogéneo de compostos orgânicos, definidos por serem insolúveis em água e solúveis em solventes não polares, tais como o clorofórmio. Os lípidos podem incluir uma das principais classes dos constituintes da célula, como é o caso dos fosfolípidos [4]. Como podemos observar na figura 1, consoante a sua polaridade e estrutura, os lípidos encontram-se divididos em dois grupos: polares (glicerofosfolípidos e esfingolípidos) e não-polares (colesterol e triglicerídeos). Os principais lípidos no plasma humano, um dos principais fluidos corporais que permite estudar os lípidos em organismos, são o colesterol, ésteres de colesterol, triglicerídeos (TAG), fosfolípidos e os ácidos gordos não esterificados. Como são insolúveis em água, estes compostos encontram-se no plasma associados a proteínas, formando as lipoproteínas.

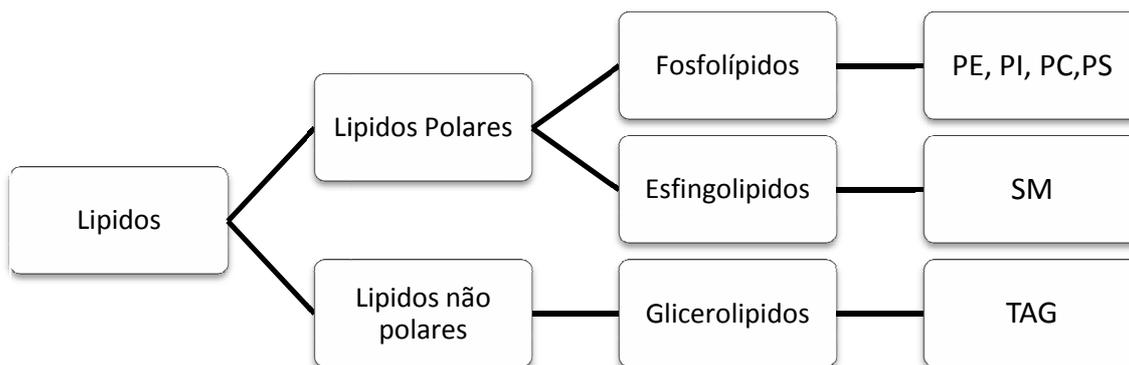


Figura 1. Esquema da classificação das diferentes classes lípidos. PE- fosfatidiletanolaminas; PI-fosfatilinositol; PC-fosfatidilcolina; PS-fosfatidilserina SM-esfingomielina TAG-triglicérides [5]

Algumas diferenças importantes nos lípidos são determinadas através da composição do ácido gordo, os quais incluem ácidos gordos insaturados (sem duplas ligações entre os carbonos), saturados (apresentam duplas ligações) [4].

1.1.1 Lipoproteínas

As lipoproteínas são partículas que transportam lipídios (insolúveis em água), no plasma que no seu todo são solúveis em água, devido à natureza hidrófila da parte proteica [4]. Estas proteínas são partículas complexas constituídas por um núcleo de lípidos neutros (triglicéridos e/ou ésteres de colesterol), núcleo esse rodeado por uma monocamada de lípidos anfipáticos (fosfolípidos e colesterol não esterificado), onde se encontra também uma proteína, apoproteína [4].

As principais lipoproteínas são geralmente classificadas em termos da densidade: lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e lipoproteínas de alta densidade (HDL) [4], [6]. As primeiras são compostas por aproximadamente 60% de TAG, 12% de colesterol, 10% de proteína e 18% de fosfolípidos, sendo responsáveis pelo transporte de TAG. Já as LDL são um produto catabólico de VLDL e são normalmente o transportador principal de colesterol no plasma, sendo compostas por 50% de colesterol, 25% de proteínas, 20% de fosfolípidos e 5% de TAG. Por sua vez, as HDL são as lipoproteínas mais densas devido ao seu elevado teor em proteínas, apresentando uma composição de aproximadamente 50% de proteínas, o 20% de colesterol, e 25% de fosfolípidos [4] [6]. A abundância relativa de TAG e ésteres de colesterol nas lipoproteínas pode afetar as propriedades físicas e metabólicas do organismo.

1.1.2 Fosfolípidos

Para além da presença em todos os organismos (desde *arcobacter* a plantas e animais) e da importância na compartimentação do citoplasma, no armazenamento de proteínas envolvidas na sinalização celular, na adesão intracelular, no suporte e precursores de mediadores biologicamente ativos, os fosfolípidos, são o principal constituinte da membrana celular, sendo os glicerofosfolípidos o grupo mais comum. Estes assumem um papel relevante no armazenamento de energia, estrutura e sinalização celular, proliferação e são considerados como potenciais biomarcadores de várias doenças. Os fosfolípidos são compostos pelos ácidos gordos, o grupo fosfato ligados a uma molécula de glicerol. O grupo fosfato, pode ainda ligar-se a uma molécula por ligações éster, formando o grupo da cabeça [7]. Para além de muito abundantes nas células, os glicerofosfolípidos são um grupo muito diverso, uma vez que abrangem muitas combinações de ácidos gordos, variando de acordo com o seu comprimento, grau de insaturação das cadeias acil e variando também a composição do grupo de cabeça polar [8]. A composição deste último grupo é importante para dividir os glicerofosfolípidos em diferentes classes, incluindo fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserinas (PS) e fosfatidilinositol (PI) entre outros [9]. Cada classe de fosfolípidos consiste numa combinação diferente de ácidos gordos, que podem variar no comprimento da cadeia e na posição *sn*-1 (R1) e *sn*-2 (R2) ligados ao glicerol [9]. O segundo maior conjunto dos lípidos polares são os esfingolípidos. Estes contêm a esfingosina como cadeia principal, sendo esta a característica comum deste grupo de lípidos. Este grupo também pode ter diferente composição em ácidos gordos, tal como acontece nos glicerofosfolípidos.

Quando ocorre um desequilíbrio nos sistemas biológicos, os lípidos podem sofrer modificações, nomeadamente por reações de oxidação, levando à perda ou alteração da função e por sua vez, comprometer a viabilidade celular.

A espectrometria de massa têm sido amplamente utilizadas para estudar a distribuição destas diferentes espécies de lípidos em sistemas biológicos e correlacionar as mudanças na resposta biológica [9].

1.1.3 Stresse oxidativo e peroxidação lipídica

O oxigénio é considerado o principal fornecedor de espécies reativas, em que, durante o metabolismo aeróbico mais de 95% do oxigénio consumido decorre da produção de energia nas mitocôndrias. O restante, não sendo completamente reduzido a água, produz espécies reativas de oxigénio numa sequência de reações de oxidação-redução.

A primeira redução do oxigénio molecular leva à formação do radical superóxido, composto este que logo após a sua formação pode desencadear outras reações, formando os radicais hidroxilo, podendo reagir também com o óxido nítrico (NO), formando peroxinitrito são um potente radical livre. A adição do segundo eletrão e de dois iões de hidrogénio aos aniões superóxido resulta no peróxido de hidrogénio. Este pode, através da reação de Fenton, originar o radical hidroxilo ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{+2}/\text{Cu}^+ \rightarrow \text{OH} \cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{+3}/\text{Cu}^{+2}$) (figura 2). Este último, a adição do quarto eletrão produz água, havendo ainda a reação do anião superóxido com o peróxido de hidrogénio formando radical hidroxilo e oxigénio molecular pela reação de Haber-Weiss [10].

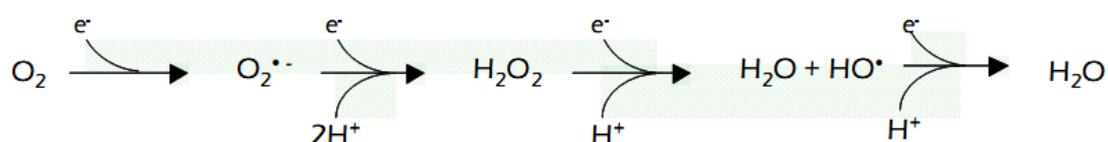


Figura 2. Esquema da redução (4 eletrões) da molécula de oxigénio a água.

Em alguns processos biológicos as espécies reativas de oxigénio (ROS) exercem um importante papel, estando envolvidas em vias de sinalização intracelular como por exemplo, para a diferenciação celular e apoptose, na imunidade e na defesa contra micro-organismos. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, ocorre stresse oxidativo. Nesta situação, as espécies reativas podem interagir com componentes celulares incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos causando danos moleculares [11].

A reação de radicais livres com ácidos gordos poli-insaturados, presentes nos lípidos das membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do stresse oxidativo celular, e muitas vezes associados ao desenvolvimento de diversos processos patológicos.

O processo de peroxidação lipídica inicia-se quando ROS abstraem um átomo de hidrogénio das cadeias de ácidos gordos polinsaturados (LH) presentes nas membranas ou de partículas de lipoproteínas, formando o radical lipídico (L.). Este, por sua vez, reage com oxigénio produzindo radical peroxil (LOO.), o qual na presença de um outro lípido (LH) ou outro doador de eletrões, forma hidroperóxido lipídico (LOOH) e um outro radical lipídico (L). O radical lipídico (L.) é reativo e pode iniciar a formação de novos radicais livres e assim, continuar a cascata de reações. E o hidroperóxido lipídico pode sofrer degradação catalisada por metais de

transição e produzir ainda mais radicais reativos, como o radical peróxil (LOO.) ou o radical alcoxil (LO.) que irão continuar a reação (figura 3).

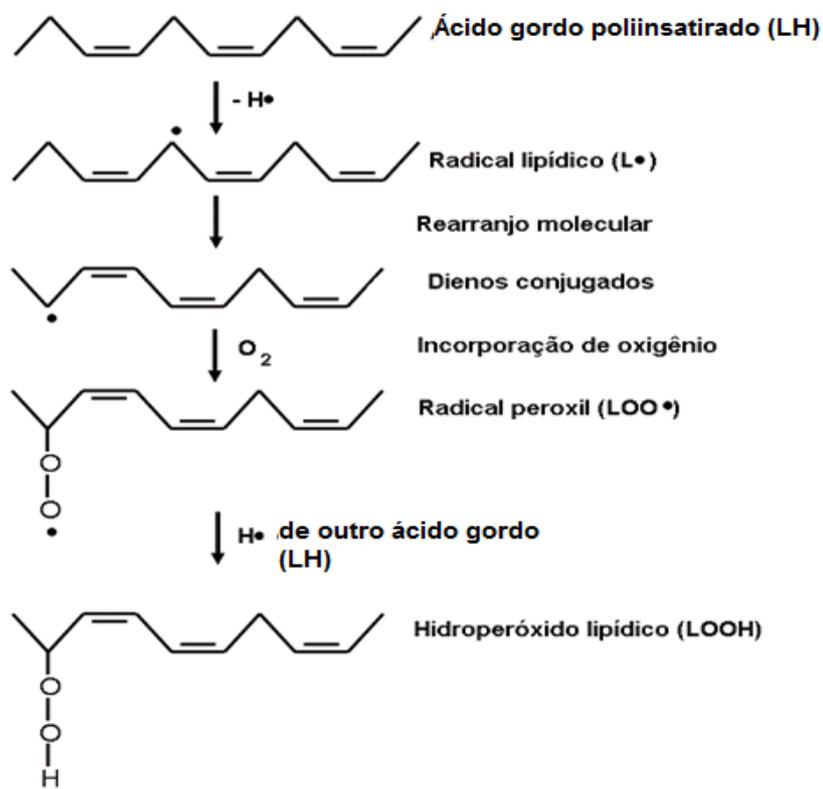


Figura 3. Esquema da reação em cadeia da peroxidação lipídica.

Uma vez que a membrana celular é permeável ao peróxido de hidrogénio (H₂O₂), este pode induzir danos oxidativo de biomoléculas longe do seu local de formação [10].

A oxidação de ácidos gordos polinsaturados dos fosfolípidios, principalmente, na posição *sn*-2 da molécula do glicerol, tem sido uma das alterações estruturais das lipoproteínas associadas ao desenvolvimento de propriedades pró-aterogénicas destas partículas. A oxidação dos fosfolípidios pode originar lisofosfolipídios como a lisofosfatidilcolina (LPC) e o ácido lisofosfático (LPA), devido à quebra da ligação éster da posição *sn*-2, ou produtos mais complexos [12].

A oxidação dos fosfolípidios pode originar numerosos produtos de oxidação, e é sabido que diferentes espécies oxidadas podem ter diferentes funções nos sistemas biológicos. Os produtos derivados da oxidação de ácidos gordos insaturados e do colesterol podem ser importantes para a avaliação da lipoperoxidação que ocorre em tecidos, fluidos biológicos e lipoproteínas. Dentre estes produtos, os mais estudados são: isoprostanos, hidroperóxidos

lipídicos, aldeídos, fosfolípidos oxidados e produtos produzidos durante os processos bioquímicos de oxidação do colesterol [13].

O processo de peroxidação lipídica tem atraído muitas atenções, devido às crescentes evidências do seu envolvimento em vários processos inflamatórios, em pacientes com diabetes, tumores, doenças do fígado e pulmão, doença Parkinson, doenças de Alzheimer e aterosclerose e por consequente, a enfarte agudo do miocárdio [14].

Os fosfolípidos estão relacionados com a resposta inflamatória, no entanto, os mecanismos como fosfolípidos oxidados (OxPL) induzem uma resposta inflamatória permanecem ainda por compreender. Visto que OxPL são estruturalmente semelhantes a alguns componentes de bactérias, é possível que esses lipídios modificados sejam reconhecidos pelas células como "sinais de perigo" o que leva a uma resposta do sistema inune, iniciando-se reações inflamatórias.

Inicialmente, pensava-se que a formação de OxPL só tinha efeito prejudicial, pois foi demonstrado que esses produtos tóxicos levavam a uma propagação da inflamação e de dano nos tecidos. Recentemente, tornou-se evidente que OxPL também podem exercer efeito anti-inflamatório e efeito protetor do tecido [15], dependendo das suas estruturas e concentração.

A oxidação dos fosfolípidos representa um mecanismo comum subjacente em muitas doenças em que está envolvido dano tecidual. A formação de OxPL é uma característica geral na inflamação crónica que muitas vezes leva a estados debilitantes em muitos pacientes. De entre as doenças de inflamação crónica, destacam-se as doenças cardiovasculares, diabetes e suas complicações, incluindo doenças do olho e doenças renais, mas também na modulação imunológica de doenças autoimunes [16]. Para poder compreender o papel dos lípidos na saúde e nas doenças tem-se desenvolvido diversas abordagens analíticas designadas por lipidómica.

1.2 Técnicas na abordagem lipidómica

O estudo de lípidos de amostras biológicas envolve várias etapas, começando pela extração de lípidos dos tecidos ou das células. Uma vez que os fosfolípidos obtidos dos extratos de amostras biológicas incluem espécies de diferentes classes, é necessário uma separação dos lípidos em diferentes classes e por fim, a análise do perfil lipídico por espetometria de massa. Neste trabalho acoplou-se à espetometria de massa a separação por cromatografia, mais concretamente cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

1.2.1 Extração de lípidos

Os lípidos por definição constituem uma classe de compostos que caracteriza-se pela alta solubilidade em solventes orgânicos. A baixa solubilidade destes compostos em água torna possível a sua separação das proteínas e ácidos nucleicos. Existem vários protocolos para a extração de lípidos, tendo todos em comum a utilização de solventes orgânicos. Os protocolos mais utilizados incluem as metodologias de extração em que se utilizam misturas de solventes orgânicos apolares e polares, uma vez que os lípidos apresentam uma grande faixa de relativa hidrofobicidade o que torna inviável a utilização de um único solvente para a extração dos lípidos. Neste trabalho, seguiu-se o método de Folch, utilizando clorofórmio e metanol na proporção de 2:1 (figura 4).

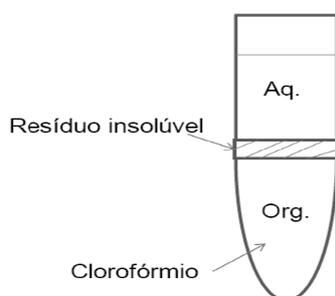


Figura 4. Esquema ilustrativo da extração de lípidos utilizando mistura de solventes orgânicos. Abreviatura: Aq., aquoso e Org., orgânico.

Os lípidos são recolhidos na fase do clorofórmio, que pela sua densidade fica na camada inferior (figura 4).

1.2.2 Cromatografia líquida de alta precisão

A cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) é um método de separação de substâncias, que constitui uma ferramenta de análise muito utilizada no estudo sorológico em conjunto com a espectrometria de massa (MS).

São precisamente as forças intermoleculares entre a amostra e a fase estacionária, e entre a amostra e a fase móvel, que permitem a separação dos componentes das amostras. Assim, a coluna retém os componentes que interagem mais fortemente com a fase estacionária, enquanto aqueles que possuem menor afinidade química para estas, são arrastados pela fase móvel e, por isso, primeiramente separadas e detetados (figura 5).

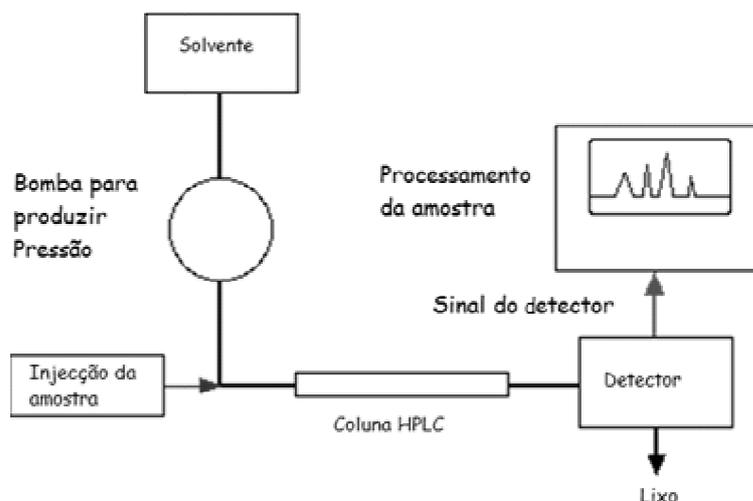


Figura 5. Esquema geral dos vários componentes de HPLC.

As principais vantagens da HPLC são a eficiência, seletividade e resolução. A variável da seletividade da coluna são controladas em grande parte pelo fabricante, enquanto que a eficiência e a resolução pode ser controlada, até certo ponto, pelo investigador por adaptação das fases miscíveis utilizadas.

1.2.3 Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa tem desempenhado um papel fundamental no estudo dos processos bioquímico dos lípidos, uma vez que esta técnica permite não apenas a deteção e determinação das estruturas destas moléculas mas também a sua quantificação. A combinação da sensibilidade, especificidade, seletividade e rapidez faz da espectrometria de massa uma técnica ideal para a análise de lípidos e produtos de oxidação lipídica [17, 18].

Os espectrómetros de massa são constituídos de quatro partes básicas: um sistema para introdução da amostra; uma fonte de iões, na qual é produzido um feixe de iões proveniente da amostra; um analisador que separa iões de acordo com a razão massa/carga; e um detetor, no qual os iões separados são recolhidos e caracterizados.

São várias as fontes de ionização que se podem utilizar. O primeiro método de ionização a surgir, foi o impacto eletrónico (EI) e mais tarde a ionização química (CI), que só são aplicáveis a compostos voláteis e termicamente estáveis. Por transmitirem grandes quantidades de energia induz à quebra das moléculas. Para ultrapassar esta limitação surgiu a ionização por bombardeamento com átomos ou iões rápidos (FAB) que permitiu a análise por espectrometria de massa de amostras não voláteis e termicamente instáveis. Mais recentemente surgiram técnicas de ionização mais suaves como o *electrospray* (ESI) e a ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI), usados hoje em dia para análise

de biomoléculas. Neste trabalho, de análise de fosfolípidos e produtos de oxidação destes, foi utilizado o método de ionização por *electrospray*.

Os analisadores mais usados hoje em dia são o quadrupolo, a armadilha de iões (*Ion Trap*) e o analisador de tempo de voo (TOF). Estes analisadores podem ser usados sozinhos ou em diferentes combinações, como por exemplo *Q-Trap*, combinação de um quadrupolo e um analisador *Trap*.

1.1.1.1 Método de ionização por *electrospray*

Esta técnica tem três características principais que permitem fazer uma distinção dos outros métodos de ionização. Em primeiro, é uma técnica suave que permite que as interações não covalentes entre moléculas que existam em solução sejam preservadas na fase gasosa. A segunda característica é que tem a capacidade de produzir iões multiplamente carregados, com números de cargas elevado, reduzindo assim a razão m/z , característica importante para compostos de alto peso molecular, como no caso de proteínas. Desta forma é possível analisar compostos de elevada massa molecular até centenas de kDa. Por fim, o facto de que as amostras a analisar devem ser introduzidas em solução, faz com que seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação, de que se destaca a HPLC. Assim, a substância a ser estudada está dissolvida num solvente que normalmente é muito mais volátil do que a amostra em estudo, e de seguida esta solução é injetado através de um capilar, de metal, num fluxo contínuo, por ação de uma bomba de seringa. Este processo é auxiliado por um gás inerte, geralmente nitrogénio e chamado de gás de nebulização, que é introduzido na fonte ESI, fluindo externamente ao capilar. Este fluxo de gás está a temperaturas elevadas e auxilia a evaporação do excesso solvente e na formação dum aerossol.

A ionização tem início pela formação do aerossol, produzido por um processo que envolve a formação do cone de Taylor, a partir da ponta do capilar. O cone começa a formar-se quando as microgotas do solvente expostas a fortes campos elétricos, causando uma deformação na superfície, que então surge como um cone. Conforme o campo elétrico aumenta excedendo a tensão do solvente, o cone inverte-se e um jacto é lançado, formando um *spray*. Neste momento ocorre a formação de minúsculas gotas de solvente contendo o analito e repleto de cargas elétricas positivas ou negativas à sua superfície, de acordo com o modo de análise. Como as microgotas de solvente sofrem a ação de um fluxo de azoto, gás não carregado, frequentemente utilizado, aquecido, elas passam a evaporar, sendo o seu diâmetro reduzido rapidamente. Com isso as cargas ali contidas passam a ter maior proximidade, e conseqüentemente maior repulsão eletrostática. Quando esta repulsão atinge uma força

maior do que a tensão do solvente ocorre um colapso, que promove rutura da microgota com consequente formação de outras gotas de solvente e analito menores.

O método ESI é o mais usado na análise de fosfolípidos por estes serem moléculas com pesos moleculares relativamente baixos, entre 600 e 1000 Da [19].

1.2.3.1 Analisadores

Os analisadores mais usados hoje em dia são o quadrupolo, a *Trap* e o TOF. Estes analisadores podem ser usados em diferentes combinações. Neste trabalho, como já foi referido, utilizou-se o analisador *ion Trap*. Neste analisadores os iões descrevem uma trajetória através do ambiente quadrupolar, e são aprisionados nele, daí o seu nome armadilha de iões [20]. Devido a sua capacidade de manter os iões aprisionados no interior, estes analisadores são capazes de proporcionar diversos ciclos de fragmentação, num processo chamado na espectrometria de massas de tandem- MS_n , onde n representa o número de fragmentações realizadas no analito [19].

1.2.3.2 Analise MS e MS/MS

As principais características dos espectros de massa obtidos com o método de ionização suave são a ausência de fragmentação, o que permite a determinação rigorosa de massas moleculares de constituintes de misturas. No entanto, nestas condições pouca informação é obtida acerca da estrutura molecular dos compostos analisados. Assim é necessário proceder à fragmentação do ião desejado induzindo a dissociação dos iões formados na fonte, por colisão, normalmente com um gás. *Tandem-MS* pode ser entendido como espectrometria de massas de modo sequencial, ou seja, uma sequência de análise que envolve vários estágios. O primeiro estágio é a seleção de um ião precursor (assim chamado porque deste serão formados outros iões). O segundo estágio consiste na fragmentação do ião precursor por colisão com o gás para gerar iões.

Usando esta tecnologia, podemos retirar várias conclusões sobre a estrutura das moléculas analisadas e os espectros obtidos dão-nos não só as formas de quebra molecular mais frequente, como as mais favoráveis. A espectrometria de massa por MS/MS tem sido utilizada no estudo detalhado e na caracterização de várias moléculas, entre as quais fosfolípidos [19]. Esta técnica é identificada como MS/MS, no entanto pode-se aumentar o número de passos de modo a efetuar MS_n (n representa o número de gerações de iões a ser analisados) [21] [19].

A MS tem sido usada na análise de PL, mas também de oxPL, uma vez que os PL estão relacionados com a resposta inflamatória e também com o desenvolvimento de patologias, nomeadamente de doenças cardiovasculares.

2 RESPOSTA IMUNE

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória, um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis, além de apresentar como sinais clínicos característicos rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional. A finalidade desse processo é remover o estímulo indutor da resposta e iniciar a recuperação tecidual local.

Uma resposta imune inicia-se quando há reconhecimento de um antígeno por parte das células apresentadoras de antígenos (APC), como os monócitos e células dendríticas, principalmente através dos seus recetores capazes de distinguir padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMP).

2.1 Monócitos

Os precursores dos monócitos têm origem na medula óssea, que se diferenciam em monócitos e entram na corrente sanguínea, onde constituem 3% a 8 % dos leucócitos circulantes, e migram para os tecidos periféricos onde se tornam residentes nos diferentes tecidos. Os monócitos apresentam uma grande heterogeneidade a nível de tamanho, granularidade e morfologia celular. Nos seres humanos, os monócitos são identificados pela expressão do CD33 e HLA-DR.

Os monócitos apresentam capacidade de fagocitose, apresentam antígeno, podendo assim participar nas respostas imunitárias inatas e adquiridas, podendo também os monócitos estar envolvidos na manutenção e regeneração de tecidos [22]. Os monócitos, após serem libertados na medula óssea, permanecem no sangue periférico por um curto período de tempo, acumulando-se depois junto ou dentro dos tecidos periféricos onde há maior probabilidade de ocorrer entrada de agentes patogénicos. Este recrutamento homeostático ocorre na ausência de inflamação e permite que os tecidos periféricos sejam povoados por células que tem como função a sentinela imunitária.

Para que possam exercer as suas funções nos tecidos periféricos, o recrutamento dos monócitos para o espaço extravascular é orientado por uma sequência de interações mediadas

por diversas moléculas. Este processo compreende a adesão das células às paredes dos vasos sanguíneos, que ocorre em várias etapas [22].

Numa situação de inflamação, as células do endotélio são ativadas expressando moléculas de adesão e produzindo quimiocinas e lípidos quimiotáticos [23].

Os monócitos, quer estando nos tecidos como sentinelas, quer sejam recrutados em condições de inflamação, reconhecem sinais que indicam infecção e que são essenciais para o desenvolvimento da resposta imunitária. Estas células vão ligar-se ao patogénico através de recetores que iniciam os mecanismos necessários para a fagocitose. A fagocitose é o primeiro passo no decorrer de uma resposta imunológica e é necessário para a renovação das células que morrem diariamente, no desenvolvimento embrionário e na remodelação e reparo tecidual [24]. A distinção entre possíveis patogénicos e moléculas próprias, depende de recetores reconhedores de padrões moleculares (PRR). Estes recetores reconhecem PAMPs presentes nos agentes patogénicos mas ausentes em organismos superiores. Entre os PRR expressos pelos monócitos e que estão envolvidos na fagocitose encontram-se recetores de manose, os recetores do tipo *Toll* (TLR) e recetores *scavenger* [24] (figura 6). Estes recetores são capazes de determinar a natureza específica de um patogénico sendo essenciais no desenvolvimento de uma resposta imunitária adequada.

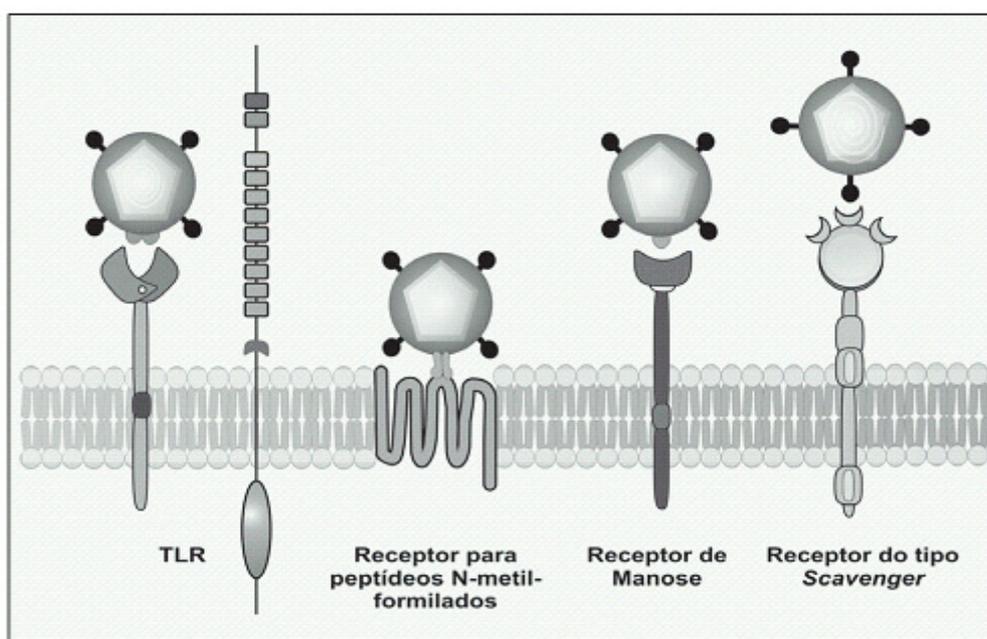


Figura 6 Recetores de reconhecimento de padrão (PRR). Representação esquemática dos diferentes recetores de reconhecimento de padrões ancorados na membrana celular e seus respectivos ligandos (PAMP) [25]

Após a fagocitose, ocorre síntese de uma série de proteínas que vão regular e catalisar a produção de ROS. Nos monócitos, a destruição de agentes fagocitados depende de um processo que envolve peróxido de hidrogénio e outras ROS, espécies intermediárias do azoto e mieloperoxidase. Os macrófagos, ao contrário dos monócitos, não possuem mieloperoxidase, possuindo enzimas análogas ou utilizando diretamente ROS para esse fim. Os monócitos podem ainda utilizar mecanismos independentes de oxigénio como proteases, hidrolases, perforinas, lisozimas entre outras moléculas [26].

Na infamação, os macrófagos atuam como APCs, potencializando a ativação de LT e LB pela expressão de moléculas coestimuladoras, e libertam citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e quimiocinas.

2.2 Células dendríticas

As células dendríticas (DCs), constituem uma população minoritária de leucócitos especializados na captura e apresentação de antígenos aos linfócitos T, são consideradas uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, por serem atraídas e ativadas por elementos da resposta inata e viabilizarem a sensibilização de LT da resposta imune adaptativa, desempenhando um papel fundamental no início e controlo das respostas imunológicas.

As DCs do sangue periférico caracterizam-se pela expressão intensa da molécula HLA-DR, na ausência de marcadores de linhagem T e B (CD3⁻ e CE19⁻) e monócitos (CD14⁻). As DCs encontram-se divididas em subpopulações, tais como as células dendríticas mielóide (mDC), as células dendríticas plasmócitoide e por fim as células dendríticas CD14^{-/+}CD16⁺. De acordo com as características fenotípicas, as mDC identificam-se pela expressão forte de HLA-DR, expressam na membrana o antígeno CD11c, o CD33, o CD58 entre outros. As DCs derivadas de monócitos distinguem-se por expressarem HLA-DR, o CD16 e apresentam uma baixa expressão do CD14, em conjunto com uma expressão intermédia de CD33 e CD123.

Estas células apresentam um elevado número de organelos e um núcleo irregular, diferenciando-se das outras células por apresentarem projeções citoplasmáticas de diferentes formas e tamanhos, designadas por dendrites, recebendo assim estas células o nome de células dendríticas.

As DCs apresentam um grande potencial no desencadear de respostas imunológicas, sendo consideradas as células imunológicas mais eficientes na estimulação de linfócitos T, sendo por

isso consideradas as APCs profissionais. As DCs imaturas são altamente eficientes na captura de antígenos, enquanto as maduras são muito eficientes na apresentação [27].

As células dendríticas têm origem na medula óssea, de onde migram os seus precursores para a corrente sanguínea para depois serão distribuídas pelos diferentes tecidos não linfoides do organismo onde originam as denominadas DC intersticiais. As DCs encontram-se no tecido conjuntivo da maioria dos órgãos sólidos e não linfoides como o fígado, coração, rins, tiroide, bexiga, pâncreas ou a pele.

2.3 Recetores *scavenger*- CD36

Os recetores *scavenger*, em particular o CD36, é encontrado nos monócitos/macrófagos e células dendríticas. Estes recetores reconhecem padrões, os quais mediam a internalização e degradação lisossomal das lipoproteínas modificadas, nomeadamente lipoproteínas oxidadas [28]. Ao contrário da resposta mediada por outros recetores, a captação por recetores *scavenger* não leva a uma inflamação direta, entretanto pode induzir a apresentação antigénica restrita ao MHC-II e até mesmo participar da apresentação cruzada de antígenos a linfócitos T citotóxicos podendo assim, estabelecer um elo de ligação entre a imunidade inata e adquirida. Há evidências de que a LDL estimula os macrófagos através de recetores *toll-like 4* (TLR4) induzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas [29]. Por outro lado, a interação de macrófagos com oxLDL também pode inibir a ativação de macrófagos. Além de reagir com recetores presentes na membrana, os produtos da oxidação lipídica têm sido atribuídos como reguladores de fatores de transcrição, agindo numa família de recetores nucleares que controlam o metabolismo lipídico [30].

O recetor CD36 foi inicialmente descrito em plaquetas e chamado de glicoproteína IV, sendo a sua função como recetor para a oxLDL, como já foi referido, e também como um transportador de ácidos gordos para os adipócitos. Trata-se de uma proteína transmembranar com peso molecular de 53 kDa contendo um largo domínio hidrofóbico extracelular. Estas características fazem com que seu domínio imunodominante (aminoácidos 155-183) se ligue a ácidos gordos, oxLDL e também a células apoptóticas [28].

Dados recentes mostram que o CD36 pode ser também considerado uma molécula reconhecedora de padrões moleculares associados a agentes patogénicos, possuindo baixa especificidade e que geralmente interage com moléculas não proteicas, as quais também podem ser encontradas na parede de bactérias e fungos.

2.4 Marcadores de inflamação

A inflamação, ou seja, a resposta do tecido a uma lesão, é caracterizada na fase aguda por aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, acumulação de fluido, leucócitos, e mediadores inflamatórios, tais como citocinas [31]. Tanto no processo de inflamação aguda ou crônica, uma variedade de fatores solúveis estão envolvidos no recrutamento de leucócitos através da expressão celular aumentada de moléculas de adesão e quimiotaxia [31]. Muitos destes mediadores solúveis regularam a ativação das células residentes, tais como fibroblastos, células endoteliais, e as células recentemente recrutadas para a inflamação, tais como monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos [31].

Os fatores solúveis que mediam essas respostas enquadram-se em quatro categorias principais: (1) metabolitos inflamatórios lipídicos como o fator de ativação plaquetária (PAF) e os derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas), que são gerados a partir de fosfolípidos celulares, (2) cascatas de proteases /substratos solúveis que geram numerosos péptidos pró-inflamatórias, (3) óxido nítrico, um potente vasodilatador endógeno e (4) um grupo de polipéptidos derivados de células, conhecidas como citocinas, são os principais determinantes na inflamação, do estado de ativação celular, e das respostas sistêmicas à inflamação. A maioria das citocinas são multifuncionais, podendo induzir efeitos regulatórios tanto negativos como positivos sobre as células-alvo [31].

As citocinas são glicoproteínas produzidas pelo sistema imune que atuam de forma endócrina sobre outras células relacionadas com a resposta imune. Durante o processo inflamatório, os monócitos/ macrófagos, os linfócitos T e outras células arteriais produzem peróxidos lipídicos, fatores quimiostáticos, moléculas de adesão e citocinas, que ampliam e perpetuam o processo inflamatório. Durante este processo, também ocorre a libertação de mediadores de fibrinogénio, incluído fatores de crescimento, que promovem a proliferação das células do músculo liso [32].

Vários estudos demonstraram um aumento do risco vascular em indivíduos com níveis basais altos para IL-6 e TNF- α [33], bem como para proteínas de fase aguda tais como a PCR [33, 34]. Para além de refletirem a necrose do miocárdio, estas proteínas de fase aguda tem um papel ativo nos processos de inflamação e nos mecanismos imunológicos.

Uma perturbação na imunidade inata pode fazer a ligação entre a obesidade, a aterosclerose e resistência à insulina [35]. De acordo com esta hipótese, os elevados níveis de IL-6 e PCR estão

ligados ao desenvolvimento da aterosclerose e ao surgimento de diabetes do tipo II, mesmo em indivíduos sem resistência à insulina [36].

2.4.1 Moléculas quimiotáticas (quimiocinas)

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular e são produzidas por várias células em resposta a estímulos inflamatórios, capazes de induzir a migração e a atração dos leucócitos circulantes para locais de inflamação. Existem diferentes citocinas, tais como a IL-8, IL-2, IL-6, IL-1 β , MIP-1 β , TNF- α entre outras. Neste trabalho deu-se particular atenção à IL-6 e TNF- α .

2.4.1.1 Fator de necrose tumoral (TNF)

O TNF- α é produzido pelos monócitos/macrófagos e tem uma ação na ativação das defesas do organismo e na reparação dos tecidos, embora a sua produção descontrolada possa ter consequências desastrosas [37]. Os receptores desta citocina são do tipo I (p55) e do tipo II (p75) e pertencem à família dos receptores do fator de necrose tumoral, onde estão incluídos o CD95/FAZ, o *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) receptores I e II, o CD40 e outros [38]. No ambiente citoplasmático, os TRAILS possuem uma proteína conhecida como o domínio de morte, que após ligação do TNF- α ao receptor, ativa a cascata da apoptose [39].

Diversos estudos confirmaram a associação do TNF- α com a insuficiência cardíaca e com a isquemia e a reperfusão do miocárdio [40]. Num estudo com 94 doentes com doença cardiovascular, quando comparados com 20 indivíduos saudáveis, verificou-se uma associação positiva entre os níveis de TNF- α e a doença coronária [41]. Outro estudo demonstrou que após 9 meses depois do primeiro EAM os pacientes com níveis elevados desta citocina, apresentaram um maior risco de recorrência de EAM [42].

2.4.1.2 Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é produzida por células tais como os monócitos/macrófagos, os linfócitos T, os fibroblastos, os hepatócitos, as células endoteliais, células do músculo liso, em resposta ao TNF- α e também à IL-1 β . A IL-6 tem a função de induzir a produção pelos hepatócitos das proteínas de fase aguda, a estimulação do crescimento e a diferenciação dos linfócitos T e B, dos hepatócitos e das células hematopoiéticas. Faz a ligação entre a resposta inflamatória aguda e a reação sistêmica que a acompanha, ou seja, resposta de fase aguda.

A IL-6 ao induzir a resposta de fase aguda, constitui uma ponte de ligação entre a inflamação e a doença cardiovascular. Foi demonstrado que indivíduos com síndromes coronárias agudas e

valores séricos elevados de IL-6, nas primeiras 48h, apresentaram um maior risco de complicações coronárias [43].

2.4.2 Proteína C reativa (PCR)

A PCR é o biomarcador pertencente à família das pentraxinas constituintes da imunidade inata e é um marcador de fase aguda. Ao contrário de outras proteínas ou citocinas, a PCR apresenta um longo tempo de vida, conferindo-lhe uma estabilidade nos níveis séricos sem grandes variações [44]. A síntese da PCR é essencialmente hepática, sob influência de citocinas tais como a IL-6 e o TNF- α . Estas moléculas são pró-inflamatórias, sintetizadas pelo tecido adiposo, o que pode justificar o relacionamento existente entre a obesidade abdominal e a doença cardiovascular.

A PCR é facilmente determinada através de métodos altamente sensíveis, com uma boa relação custo-eficácia, com resultados sobreponíveis no plasma fresco e congelado [45]. Deve-se evitar a determinação da PCR, quando utilizada como marcador de risco vascular, nas duas ou três semanas após uma infeção, inflamação ou outra doença aguda, uma vez que nesta situação se verifica um aumento dos níveis desta proteína. No entanto, o mesmo acontece para doenças inflamatórias crónicas, como a artrite reumatoide ou o lúpus eritematoso disseminado, apresentam níveis altos de PCR, mais elevados que os considerados valores normais [46], sendo por isso uma limitação da utilização deste biomarcador para a determinação de doenças cardiovasculares.

A PCR está envolvida em vários mecanismos inflamatórios e imunológicos, tais como ativação do complemento, indução da expressão de moléculas de adesão, facilitação da captação das LDL pelos macrófagos, aumento a produção do MCP-1 e da IL-8 e estimula o recrutamento dos monócitos para a parede arterial [47, 48]. Estudos *in vitro* demonstraram que a produção de IL-6 por monócitos com níveis séricos elevados de PCR e de IL-6, excedia a produção da mesma citocina pelos monócitos de indivíduos clinicamente semelhantes, mas com valores considerados normais para a PCR e IL-6 [49].

Apesar da associação entre os níveis aumentados da PCR e os riscos cardiovasculares, não é possível estratificar os riscos vasculares com os valores da PCR. A PCR apresenta numa dinâmica própria, apresenta uma concentração aumentada após EAM, começando a subir 4-6 horas após o início dos sintomas e atinge o seu máximo dentro de aproximadamente 50 horas [50]. Em relação ao tempo necessário para a cicatrização das lesões coronárias, estudos demonstraram uma estabilização dos níveis de PCR ao fim de três meses [51].

2.5 Papel de fosfolípidos oxidados na resposta imune

Em tecidos sujeitos a inflamação crónica, a resposta imune local é determinada por fatores ambientais, tais como a acumulação de produtos da oxidação lipídica. Após a oxidação, os fosfolípidos são reconhecidos por “receptores padrão de reconhecimento” (PRRs), que são detetados pelo sistema imune inato como sinais de perigo ou alteração do próprio que, se acumulam sob condições de stresse oxidativo e morte celular, e como tal agem como reguladores endógenos da resposta imune inata [52-54]. Os PRRs que são implicados no reconhecimento de fosfolípidos oxidados (OxPL) incluem receptores *scavenger*, como o CD36, os TLRs, o CD14, as proteínas ligação de lipopolissacarídeo (LPS) e a PCR [55-58]. O fato de que o processo de oxidação torna os fosfolípidos “visíveis” para o sistema imune inato tem implicações importantes para patologias de inflamação crónica e doenças autoimunes [59].

Estudos demonstram que OxPAPC compete com o LPS para a ligação a PRRs. Neste caso oxPL atuam como recetor antagonista do LPS e bloqueiam a via de sinalização induzida pelo LPS, incluindo a ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NFκB [54]. Este papel protetor dos oxPL durante uma inflamação aguda induzida por LPS pode representar um importante mecanismo de *feedback*, ao qual oxPL acumulados limitam o dano tecidual por bloquear a resposta imune inata [16], apresentando assim um efeito anti-inflamatório.

As alterações formadas durante a oxidação de fosfolípidos são também reconhecidas pela parte humoral do sistema imune adaptativo. Os anticorpos IgG e IgM dirigidos contra OxLDL estão presentes no plasma de humanos e dos animais e foi demonstrado estarem correlacionados com a progressão da aterosclerose [60], bem como em várias doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistémico e artrite reumatoide [61-63].

Recentes evidências *in vitro* e *in vivo* destacaram o impacto OxPL sobre o processo de maturação das DCs, onde estas moléculas mediam tanto efeitos estimulatórios, como inibitórios, influenciando assim passos decisivos da resposta imune adaptativa. Um estudo recente *in vitro* demonstrou que oxPOPE apresenta a capacidade de estimular os monócitos, bem como as DCs, a produzirem várias citocinas das quais, o TNF-α e a IL-6 [64].

2.6 Citometria de fluxo e análise de citocinas

A citometria de fluxo tem sido utilizada na análise de Vários parâmetros tais como o tamanho e complexidade morfológica das células, ADN (ploidia, ciclo celular), análise e classificação de cromossomas, proteínas, antígenos à superfície celular, proteínas intracelulares (citocinas,

proteínas envolvidas na tradução de sinal), antígenos nucleares, atividade enzimática, pH, apoptose, viabilidade celular [65].

2.6.1 Citometria de fluxo

A amostra a ser analisada por citometria de fluxo é constituída por uma suspensão de células ou de partículas, as quais, incluídas na corrente em fluxo laminar de um líquido condutor, serão forçadas a passar uma a uma através da câmara de fluxo. Um ou mais lasers com comprimento de onda pré-estabelecido, atravessam a câmara de fluxo e sempre que o laser intercepta uma célula, a radiação vai sofrer desvios que pelo citómetro serão convertidos em sinais eletrónicos, e reconhecidos pelos sensores. Um dos sensores é designado por *forward Angle Light Scatter (FS)*, uma vez que se encontra colocado no sentido da direção do feixe luminoso, dando informação sobre o tamanho da célula, baseado na difração e refração da luz. O outro sensor situa-se sensivelmente a 90º da direção frontal, designando-se *Side Scatter (SS)*, mede a luz dispersada, avaliando a granulosidade intracelular, constituída pelo núcleo, cromossomas, mitocôndrias e outros organitos ou partículas [65].

Com as informações provenientes dos variados sensores, a parte informática do citómetro, de acordo com as características das próprias células, agrupa-as em histogramas virtuais [65]. A citometria de fluxo é um método multiparamétrico utilizado na fenotipagem de células provenientes de vários tecidos, incluindo de tumores sólidos. Os citómetros de fluxo modernos são capazes de analisar várias partículas em cada segundo, em "tempo real", e podem ativamente separar e isolar partículas com propriedades específicas, o chamado "cell sorting".

Abordagens baseadas na citometria de fluxo têm sido amplamente utilizadas para estudar a diferente produção de citocinas por diferentes células e correlacionar com diferentes patologias ou diferentes respostas a um determinado estímulo, sendo por isso uma técnica importante ao nível de áreas como a medicina, oncologia, imunologia, mas também ao nível da investigação.

3 ENFARTE AGUDO DO MIOCÁRDIO

A cardiopatia isquémica é uma das causas que mais contribui para a taxa de mortalidade na sociedade ocidental. Parte destas mortes ocorre abruptamente como consequência da oclusão coronária aguda, podendo também ocorrer lentamente, ao longo de um período de semanas

ou anos, levando conseqüentemente ao estreitamento e enfraquecimento progressivo do mecanismo de propulsão do sangue (Figura 6).

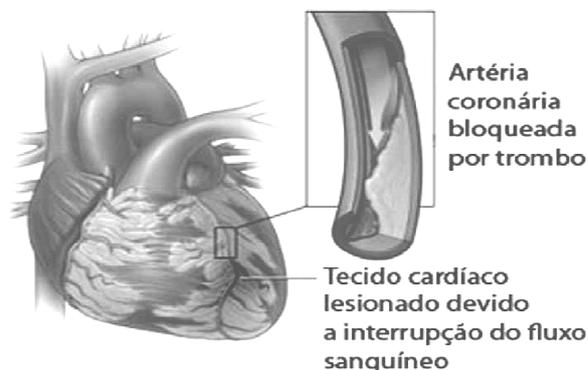


Figura 7. Enfarte do miocárdio na da parede anterior do coração após a oclusão de um ramo da artéria coronária, levando á lesão do tecido cardíaco.

Vários fatores de risco para doenças coronárias têm sido documentados, incluindo hipertensão, hiperlipidemia, diabetes, um historial familiar, tabagismo, obesidade, sedentarismo [66], níveis séricos alterados de LDL e HDL colesterol, diabetes, agentes infecciosos, fatores ambientais, e marcadores genéticos [67] [68]. No entanto, estes fatores explicam apenas parte da doença cardiovascular.

A insuficiência coronária aguda ocorre quando o miocárdio fica privado de oxigênio por um extenso período, levando a alterações na função do músculo cardíaco. Quando o músculo cardíaco sofre isquemia (privação do correto fluxo do sangue) intensa e contínua, causa lesões irreversíveis das células do miocárdio, apresentando-se o quadro clínico de EAM. Esta privação do fluxo sanguíneo pode ser desencadeada por um coágulo sanguíneo, por lesões ateroscleróticas, ou, ainda, por uma partícula da placa aterosclerótica que se desprende do seu local de origem e bloqueia uma ramificação vascular.

A aterosclerose tem uma evolução lenta no início, durante a qual se forma uma placa sólida, posteriormente, ocorre uma evolução rápida, onde se forma o trombo que obstruirá a artéria coronária, resultando no EAM. As três áreas do tecido lesado durante o EAM são bem distintas umas das outras. A primeira é a área da necrose, na qual as células do miocárdio encontram-se irreversivelmente lesadas. Ao redor destas células, encontra-se a área de tecido não-funcional, devido à incapacidade de contração e de condução de impulso nervoso, mas que pode ser recuperada se a oxigenação for adequadamente restabelecida. Por último, encontra-se a terceira área, que ainda mantém contração, porém fraco, na qual a recuperação do tecido isquêmico é mais fácil.

O EAM pode ser classificado quanto à localização da lesão. Denomina-se: infartoanterior, quando a obstrução encontra-se na artéria descendente anterior; infarto anterolateral, quando ocorre a obstrução da artéria diagonal; infarto inferior, quando a obstrução ocorre na coronária direita ou nos ramos da artéria circunflexa.

Após seis a oito horas do início do EAM sem retomar o fluxo sanguíneo, leucócitos migram para a área afetada, ajudando a remover as células mortas. No entanto, estudos demonstram que a isquemia seguida do retomar do fluxo sanguíneo provoca uma cascata de reações pró-inflamatórias que são conhecidos por levar à produção de ROS e a ativação do sistema do complemento, migração dos leucócitos e produção de citocinas [69]. Os marcadores de inflamação elevados, como a PCR, são alarmante, pois estão associados a um aumento do risco de eventos cardiovasculares futuros em pacientes que sofreram EAM [70, 71].

3.1 Enquadramento epidemiológico

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares ocupam o primeiro lugar no *ranking* das principais causas de mortalidade (figura 8). Atualmente estima-se que cerca de 20 milhões de indivíduos sofrem de doenças do aparelho cardiovascular em todo mundo, dos quais, aproximadamente 12 milhões são vítimas fatais de EAM [72]. As estimativas da OMS para o ano de 2030 apontam para que o número de óbitos por doenças cardiovasculares ronde os 23 milhões de óbitos [72], considerando a cardiopatia isquémica como sendo o principal contribuinte [68]. Em Portugal, e não fugindo à tendência mundial, o grupo das doenças do sistema cardiovascular é o principal responsável pela mortalidade.

As doenças cardiovasculares são responsáveis por 16,7 milhões de mortes anuais em todo o mundo, sendo que 7,2 milhões correspondem a doenças cardíacas coronárias [68]. As estimativas levam a querer que este problema deverá crescer nos próximos anos, e isto muito devido ao envelhecimento da população e ao aumento das taxas de sobrevivência pós-enfarte.

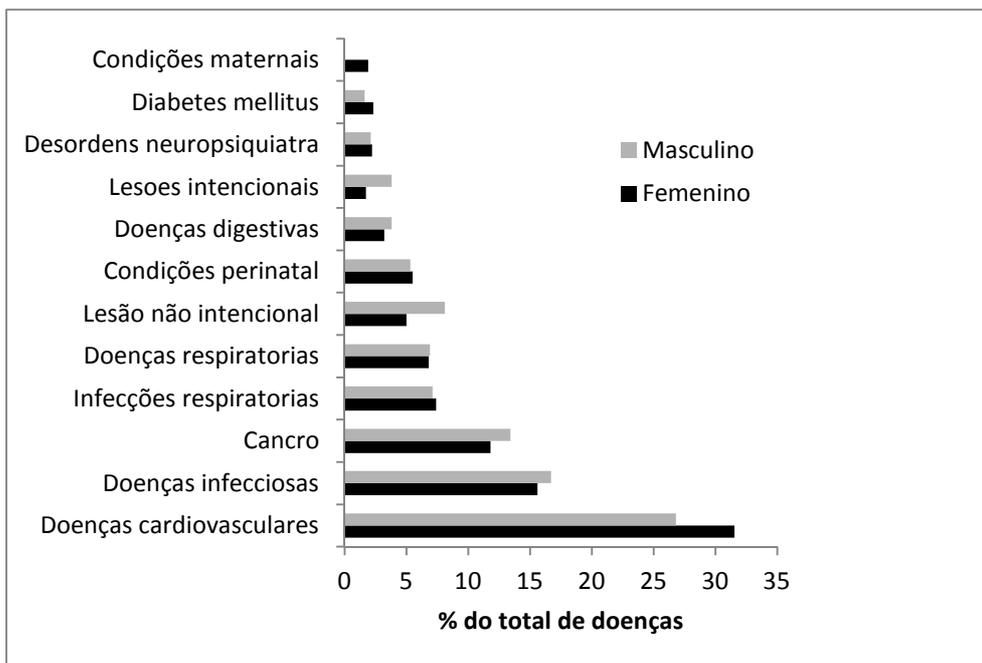


Figura 8. Gráfico da distribuição por gênero das principais causas de mortalidade mundial [68].

3.2 Enfarte agudo do miocárdio e inflamação

É consensual o papel da inflamação no desencadear e na progressão de lesões vasculares, comprovando-se a importância dos mecanismos de inflamação relacionados com as complicações vasculares, e sobre a sua importância como indicadores de diagnóstico e prognóstico [73].

No EAM a inflamação pode ser vista como duas vertentes, uma primeira associada á formação das placas ateroscleróticas [74] e numa segunda vertente associada ao processo de resposta imune aguda. O primeiro processo tem início quando o endotélio expressa moléculas quimiotácticas e moléculas de adesão, como a P-selectina ou CD62-P, E-selectina ou CD62-E, ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) ou CD54 e VCAM-1 ou CD106 (molécula de adesão da célula vascular), que recrutam leucócitos que, em conjunto com as células endoteliais, promovem, entre outros, a produção de fatores de crescimento e citocinas como é o caso da IL-6 que favorecem a formação da placa aterosclerótica, e que culmina com a rutura dessa placa, sendo por isso a aterosclerose um processo de resposta inflamatória crónica. [67].

Por outro lado, o enfarte do miocárdio desencadeia uma resposta inflamatória aguda, que ocorre no momento deste. O restaurar da homeostasia, eliminando as causas da inflamação dentro de um curto período de tempo e numa área localizada, e ativação do processo de reparação e cicatrização é o objetivo da fase aguda.

Nessas condições, os macrófagos são fundamentais para o início da resposta inflamatória, particularmente da resposta imune inata, por meio da secreção de radicais livres, proteases, fatores de complemento, e citocinas. Por outro lado, os macrófagos também podem iniciar a resposta imune adaptativa, por meio da apresentação de antígenos às células T e pelo aumento da produção de citocinas como o TNF- α [75].

A ativação das células T pelas OxLDL é dependente dos monócitos e ocorre essencialmente com baixas concentrações das OxLDL, sendo inibida quando estas lipoproteínas atingiram níveis mais elevados [76]. As citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α estão aumentadas em doentes com aterosclerose avançada, admitindo-se que as lisofosfatidilcolinas das OxLDL sejam os principais indutores da sua produção [76].

3.3 Enfarte agudo do miocárdio e perfil lipídico

O perfil das lipoproteínas plasmáticas com elevados níveis de LDL e baixos níveis de HDL constitui um risco cardiovascular[77] [78], presumivelmente porque, predispõe a uma maior concentração de LDL na parede do vaso sanguíneo. Um baixo conteúdo de fosfolípido (PL) e de colesterol não-esterificados torna as pequenas e densas partículas de LDL com maior capacidade de passagem pelas células endoteliais e acumularem-se nas paredes das artérias [79].

Alterações na concentração dos lípidios plasmáticos, incluindo colesterol, são complicações frequentemente observadas em pacientes com EAM, e certamente contribuem para o desenvolvimento de doenças vasculares[80], desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento e progressão da aterosclerose e consequente EAM [67, 81].

3.4 Oxidação de fosfolípidos e doenças vasculares

Além dos fatores de risco tradicionais referidos anteriormente, o stresse oxidativo, em particular as espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido considerado como um dos mais importantes contribuintes para a progressão da aterosclerose e consequentemente para o desenvolvimento de EAM. Uma consequência do stresse oxidativo é o aumento de peroxidação lipídica, o qual ocorre quando o equilíbrio dinâmico entre pró-oxidantes e mecanismo antioxidante é prejudicado [80], tendo vindo a ser sugerido que ocorre um aumento dos níveis de peróxidos lípidos no sangue de pacientes com EAM. Os produtos de oxidação de fosfolípidos são encontrados em alta concentrações em lesões ateroscleróticas humanas [82-85].

Acredita-se que a atividade das ROS na parede vascular pode contribuir com a formação da oxLDL, um importante fator para a patogênese da aterosclerose e por consequência EAM. As oxLDL não irão ser reconhecidas pelo recetor-LDL, mas serão reconhecidas por macrófagos recetor *scavenger*, CD36 [86, 87], sendo fagocitadas por estas células, o que leva á formação das células espumosas (do inglês *foam cells*) e assim se inicia a formação das placas ateroscleróticas.

4 OBJETIVO DO ESTUDO

Apesar de ser reconhecido que as oxLDL estão relacionadas com o EAM, o papel dos PL no desenvolvimento da patologia não está ainda completamente conhecido, bem como a resposta imune de fase aguda, neste momento de dano tecidual. Este facto merece ser explorado, principalmente, no que diz respeito à avaliação e evolução do EAM.

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil lipídico e produção de citocinas em indivíduos que sofreram enfarte agudo do miocárdio (EAM), mas também avaliar a sua evolução.

Neste trabalho foi realizado, foi analisado as possíveis alterações no perfil lipídico em pacientes que sofreram enfarte agudo do miocárdio (M1) e 1 mês após o episódio (M2) e em indivíduos saudáveis (CTR), por cromatografia líquida acoplada a espetometria de massa e avaliar possíveis presenças de espécies lipídicas oxidadas resultantes do processo de enfarte agudo do miocárdio

No estudo imunofenotípica avaliando-se a expressão de CD36 de monócitos e células dendríticas, comparando pacientes controlos saudáveis. Tem se também como objetivo determinar diferenças na exceção de TNF- α e IL-6 em monócitos e células dendríticas nos diferentes grupos.

MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Produtos biológicos

Neste trabalho estudaram-se dois grupos distintos de indivíduos: o grupo EAM, composto pelo momento 1 (M1) (pacientes que sofreram enfarte agudo do miocárdio) e momento 2 (M2) (os mesmos pacientes do grupo do M1 um mês após a ocorrência do enfarte agudo do miocárdio), e o grupo CTR, grupo de controlos.

Para o grupo de indivíduos que sofreram EAM, foram colhidas amostras de sangue periférico de 10 indivíduos adultos que média de idade de 54.80 (+/- 4.31) anos (20% mulheres), em tubos com heparina para o estudo de frequências de células produtoras de citocinas. Foram também colhidas amostras de sangue periférico, em tubos de gel, onde se recolheu o soro e foi congelado a -20°C para posterior extração e análise de lípidos. Estas amostras foram colhidas entre Abril e Junho de 2010 nos Hospitais da Universidade de Coimbra logo após o paciente dar entrada.

No caso do grupo CTR, procuramos dadores “compatíveis” a nível de idade e sexo, assim foram utilizadas 10 amostras de indivíduos aparentemente saudáveis, com idade de 53.50 (+/- 1.60) anos (20% mulheres). Estas amostras foram colhidas no Centro de Sangue e da Transplantação de Coimbra. Neste grupo foram excluídos indivíduos que apresentavam historial de doenças cardiovasculares, historial familiar de doenças cardiovasculares, doenças autoimunes ou que tenham estado doentes recentemente.

Para cada individuo de ambos os grupos, realizou-se o levantamento das fichas clinicas, tendo particular atenção às análises bioquímicas realizadas, onde se registaram os níveis de colesterol, HLD, LDL, triglicerídeos (TAG), proteína C reativa (PCR) e glucose.

Este estudo foi aprovado pelo comité de ética local e todos os participantes deram e assinaram consentimento informado.

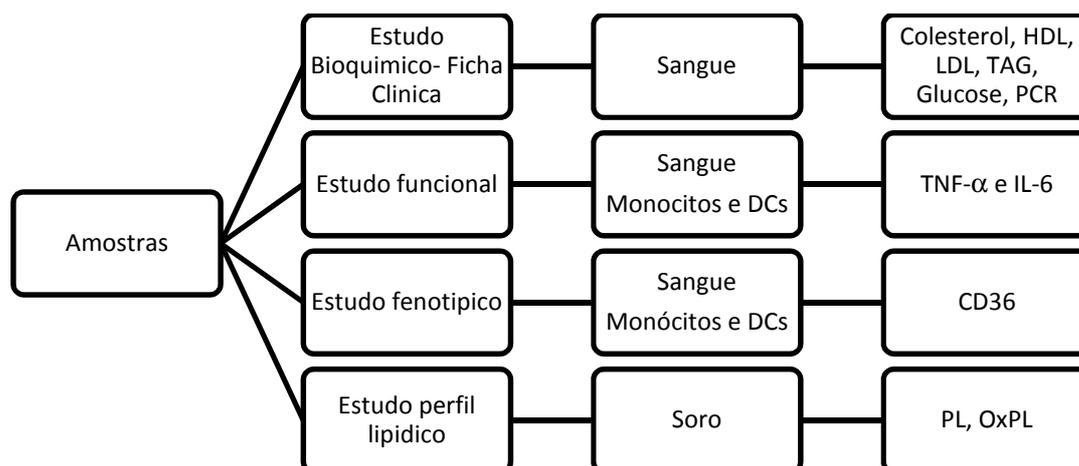


Figura 9. Esquema geral do trabalho. Para cada individuo foram colhidos diferentes tubos, com objetivos de diferentes análises.

5.2 Estudo fenotípico em monócitos e células dendríticas

5.2.1 Avaliação da expressão de CD36 por monócitos e células dendríticas

Adicionou-se 10 μ L de anti-CD36 (clone CLB-IVC7; Sanquin) combinado com 10 μ l anti-HLA-DR (clone L243; BDB, San Jose, USA) e 2,5 μ l de anti-CD33 (clone P67.6; BDB, San Jose, USA). Os anticorpos mencionados acima foram adicionados a 100 μ l de sangue periférico e foram incubadas durante 15 min a temperatura ambiente no escuro. Após este período de incubação, seguiu-se um protocolo lise e lavagem: 2 ml de FACS solução Lysing (BDB, San Jose, CA, EUA), diluída a 1:10 (vol / vol), em água destilada foi adicionada, e depois incubada 10 minutos. As células foram lavadas com 2 mL de PBS e ressuspensas em 0,5 ml de PBS antes da aquisição de citómetro de fluxo.

5.2.2 Aquisição e análise de dados de citometria de fluxo

As amostras foram adquiridas no citómetro de fluxo FACSCalibur (BDB) e foi utilizada a aplicação informática CellQUEST (BDB). A aquisição de dados foi realizada em duas etapas consecutivas. Num primeiro passo, foram adquiridos e armazenados 2×10^4 eventos, correspondendo a todas as células nucleadas presentes na amostra. Numa segunda etapa, apenas foram armazenados eventos contendo anti-HLA-DR⁺, num mínimo de 2×10^5 eventos, com a finalidade de aumentar a sensibilidade, uma vez que a poluição de células dendríticas é pouco representativa. As contagens absolutas das diferentes populações de células foram calculadas usando a citometria de fluxo e o contador hematológico.

5.2.3 Quantificação da Produção de Citocinas

A análise dos resultados obtidos no ponto anterior, foi efetuada no programa Infinicyt (Cytognos, Salamanca, Espanha).

5.2.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas Excel e Statistical Package for Social Sciences (Versão 17.0, SPSS) para o Windows. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para verificar a associação entre as variáveis nos dois grupos (EAM, CTR) e também o teste de Wilcoxon para observar diferenças significativas no grupo de enfartados nos diferentes momentos (M1, M2). O valor de p foi calculado e considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05.

5.3 Estudos funcionais em monócitos e células dendríticas

5.3.1 Avaliação da produção de citocinas *in vitro* por monócitos e células dendríticas

Uma vez que a citometria de fluxo permite o estudo individual de cada célula e assim as diferentes populações, monócitos e subpopulações de células dendríticas foram avaliadas do ponto de vista funcional, nomeadamente quanto à sua capacidade para, uma vez estimulados *in vitro*, produzirem citocinas como o TNF- α , IL-6.

As citocinas produzidas foram mantidas propositadamente dentro das células, através da utilização de um inibidor do transporte de proteínas, a Brefeldina-A. Esta interfere com o transporte vesicular do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, permitindo que as citocinas sintetizadas pelas células se acumulem no seu interior.

No final, as células que produziram citocinas foram detetadas através de anticorpos monoclonais específicos após permeabilização da membrana celular.

5.3.2 Estimulação *in vitro* da produção de citocinas por DCs e monócitos

Um total de 500 ml de sangue periférico de cada amostra foi diluído 1/1 (vol/vol), em meio RPMI-1640 (Gibco; Paisley, Escócia, Reino Unido), suplementado com 2 mM de L-glutamina e incubadas a 37°C em ambiente estéril com uma atmosfera húmida 5% de CO₂ durante 6 horas, na presença de 10 mg/ml de Brefeldina A (Sigma, St. Louis, MO).

5.3.3 Marcação imunofluorescente

Após este período de incubação, as amostras foram aliqüotadas em diferentes tubos de (200 µl/ tubo) com a finalidade de analisar a expressão de cada citocinas em estudo, pelos monócitos e subconjuntos de DCs.

Adicionou-se a cada tubo 10 µl do kit de exclusão de células dendríticas (Mistura de vários anticorpos monoclonais anti-CD14, anti-CD19, anti-CD56 e anti-CD3) (Cytogonos, Salamanca, Espanha) combinado com 10 µl anti-HLA-DR (clone L243; BDB, San Jose, USA) e 2,5 µl de anti-CD33 (clone P67.6; BDB, San Jose, USA). Após a suave mistura no vortex, as células foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Adicionou-se 100 µl do reagente 1 do kit FIX&PERM (Caltag, Hamburg, Germany) para fixar as células e colocou-se a incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente no escuro, seguindo de lavagem com 2 ml de tampão fosfato salino (PBS, Dulbecco 1x, Biochrom AG, Berlim, Alemanha), (5 minutos a 540 x g) e seguidamente descartou-se o sobrenadante. Ao *pellet* adicionou-se 100 µl do reagente do kit FIX&PERM e adicionaram-se as citocinas em estudo: 1,5 µl de anti- fator tumoral de necrose (TNF- α ; clone Mab11; Pharmingen, San Diego, USA) num tubo, e 10 µl de interleucina-6 (IL-6; clone MQ2-6A; Pharmingen, San Diego, USA), no outro tubo (Tabela 1). Os tubos foram incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com 2 ml de PBS (5 minutos a 540xg) e ressuspendeu-se em 0,5 ml de PBS, até que foram analisados num citómetro de fluxo.

Tabela 1: Marcação utilizada nos diferentes tubos para o estudo funcional. Para cada amostra foram preparados dois tubos, um para cada citocina em estudo.

Tubo	FITC	PE	PerCp	APC
Tubo 1	Kit DC (anti-CD3, CD19, CD56, CD14)	anti-TNF- α	Anti-HLA-DR	Anti-CD33
Tubo 2	Kit DC (anti-CD3, CD19, CD56, CD14)	anti-IL-6	Anti-HLA-DR	Anti-CD33

5.3.4 Aquisição e análise de dados de citometria de fluxo

As amostras foram adquiridas no citómetro de fluxo FACSCalibur (BDB) e foi utilizada a aplicação informática CellQUEST (BDB). A aquisição de dados foi realizada em duas etapas consecutivas etapas. Num primeiro passo, foram adquiridos e armazenados 2×10^4 eventos, correspondendo a todas as células nucleadas presentes na amostra. Numa segunda etapa, apenas foram armazenados eventos contendo HLA-DR⁺, n um mínimo de 2×10^5 eventos, com

a finalidade de aumentar a sensibilidade, uma vez que a poluição de células dendríticas é pouco representativa. As contagens absolutas das diferentes populações de células foram calculadas usando a citometria de fluxo e o contador hematológico.

5.3.5 Quantificação da Produção de Citocinas

A análise dos resultados foi efetuada de igual modo ao ponto 5.2.3.

5.3.6 Análise Estatística

Na análise estatística foi realizada de igual modo ao ponto 5.2.4

5.4 Extração de fosfolípidos do soro

Para a extração de fosfolípidos no soro, seguiu-se o método de Folch, com algumas mudanças devido ao facto de o soro apresentar uma grande quantidade de proteínas. A 50 μL de amostras foram adicionadas 150 μL de água ultrapura, seguindo-se a adição de 750 μL de clorofórmio (HPLC grade) e 250 μL de metanol (HPLC grade). Agitou-se no vortex durante 2 minutos. Centrifugamos a 1000 g durante 10 minutos 4°C, obtendo-se um sistema de duas fases: aquosa (superior) e orgânica (inferior). Recuperou-se a fase orgânica (fase inferior), ou seja o extrato lipídico. Finalmente, este extrato foi seco com a corrente de azoto e armazenado a -5°C para posteriores análises.

5.5 Quantificação fosfolípidos do soro usando o método Verde de Malaquite

Com o objetivo de determinar o teor de fosfolípidos de cada amostra, utilizou-se o método de verde de malaquite uma vez que apresenta uma sensibilidade para quantidades inferiores a 1 mg de fosfato. Este método permite a quantificação do complexo verde formado entre a malaquita, molibdato e fosfato, obtido após hidrólise ácida a quente dos fosfolípidos.

Este método inicia-se com a digestão dos fosfolípidos, ficando assim o fosfato livre para formar o complexo. Para isso, são adicionados 200 μL de água destilada e 400 μL de ácido perclórico (70% m/v) a 10 μL de amostra. Colocar-se no banho seco a 190°C durante 30 minutos.

De seguida, numa placa de 96 poços e após os tubos arrefecerem, adicionou-se 17.5 μL das amostras, 157.5 μL de glicerol, 32.5 ml da solução verde malaquite e por fim 17.5 μL de molibdato de amónio e agitou-se. Para traçar a curva de calibração, foram preparados padrões com 0.3 a 1.5 μg de fosfato, que sofrem a mesmo tratamento das amostras. Finalmente,

medimos a absorção das amostras a 630 nm, num leitor de microplacas (Multiscan 90, ThermoScientific). O percentual de cada classe de fosfolípidos foi calculado, relacionando a quantidade de fósforo em cada ponto para a quantidade total de fósforo na amostra, dando assim a abundância relativa de cada classe de fosfolípidos.

A solução *stock* de verde de malaquite é constituída por 17.32 mg de verde malaquite (Sigma, St Louis, MO, USA) 80 mg de PVA (polivinilalcool- Sigma St Louis, MO, USA) e 50 ml de ácido sulfúrico 6mM.

5.6 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de FOX (*Ferous Oxidation- xylene Orange*)

As principais metodologias utilizadas para avaliação da peroxidação lipídica em sistemas biológicos medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo. Neste trabalho, avaliou-se a produção de hidroperóxidos pelo teste de FOX.

5.6.1 Método de FOX (*Ferous Oxidation- xylene Orange*)

A quantificação dos níveis de peróxidos totais das amostras de soros foi realizada a partir do método de FOX. A presença de peróxidos leva à redução do ião Fe^{2+} a Fe^{3+} , o qual reage com o sal laranja de xilenol, originando uma cor característica (laranja/castanho), a qual pode ser medida fotometricamente a 560 nm.

O reagente FOX foi preparado começando pela dissolução de 38 mg de laranja de xilenol e 440 mg de BHT em 450 mL de metanol. O sulfato ferro (49 mg) foi rapidamente dissolvido em 50 mL de 250 mmol/L ácido sulfúrico e adicionou-se à solução de metanol. O reagente FOX definitivo tem a composição de 100 mmol/L de laranja de xilenol, 4 mmol/L BHT, 25 mmol/L de ácido sulfúrico e 250 mmol/L de sulfato de ferro, em metanol (90%, v/v).

A quantificação dos níveis de peróxidos foi realizada a partir da comparação com uma reta padrão, onde se preparou soluções de H_2O_2 com concentrações conhecidas.

5.6.2 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando os testes referidos em 5.2.4.

5.7 Instrumentação em cromatografia líquida e espectrometria de massa

As amostras de soro foram separados num sistema de HPLC (Waters Alliance 2690) equipado com uma pré-coluna *split* (Acurate, LC Packings, USA) e numa coluna Ascentis[®] Si (15 cm × 1 mm de diâmetro, 3 µm) mantidas à temperatura ambiente (22°C). A amostra foi diluída em 90 mL antes de ser injetada. Foi injetado 10 µL, utilizando um fluxo na coluna de 20 µL.min⁻¹.

Os diferentes lípidos foram separados usando uma mistura acetonitrilo-metanol (60:40, v/v, eluente A) e acetonitrilo- metanol-acetato de amónio (55:35:10, v/v, eluente B), seguindo o programa: inicia-se com o eluente A durante 15 minutos, gradiente linear do eluente A para o eluente B durante 5 minutos, mantendo-se com o eluente B durante 35 minutos. A fase móvel retornou ao eluente inicial em 5 minutos, terminando assim no eluente A.

O espectrómetro de massa trapa de iões linear LXQ (ThermoFinnigan, Palo Alto, USA) foi utilizado em modo positivo, com as seguintes condições de *electrospray*: voltagem do *electrospray* de 5 kV; temperatura do capilar de 275°C, o fluxo do gás de 25 unidades. No modo negativo foram utilizadas as mesmas condições alterando apenas: a voltagem do *electrospray* de 4.7kV, e a temperatura do capilar de 275°C. Foram realizados espectros de MS/MS nos iões de interesse, variando a energia de colisão entre 18-30 de unidades arbitrárias. Para o tratamento de resultados foi utilizado o programa de *software* Xcalibur (V2.0).

Foram utilizados fosfolípidos padrões: PE (14:0/14:0), PC (14:0/14:0), PS (14:0/14:0), LPC (19:0) (Sigma- Avanti, EUA).

5.7.1 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando os testes referidos em 5.2.4.

RESULTADOS

6 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

De modo a uma melhor caracterização dos indivíduos em estudo, foi realizado uma avaliação dos parâmetros bioquímicos como a proteína C reativa (PCR), colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), triglicerídeos (TAG) e glucose.

O grupo EAM (M1 e M2) é constituído por 10 indivíduos de ambos os sexos, 8 (80%) homens e 2 (20%) mulheres, com idade média de $54.80 \pm 4,31$ anos. O grupo CTR é formado também por 10 indivíduos, em que 8 (80%) são do sexo masculino e 2 (20%) são do sexo feminino, com idade média de 53.50 ± 1.60 .

Relativamente aos níveis de PCR, o grupo de indivíduos EAM apresentam níveis significativamente mais altos comparando com o grupo CTR. No entanto verificou-se uma diminuição significativa dos níveis de PCR em M2 relativamente ao grupo M1, ou seja, ocorre uma diminuição dos valores de PCR após um mês da ocorrência de enfarte, aproximando-se dos níveis do CTR (tabela 4).

Os níveis lipídicos em ambos os momentos dos enfartados apresentam diferenças entre si e entre o CTR. Verificou-se níveis mais elevados de CT no grupo M1 comparando com o CTR e M2, sendo significativo para este. Ocorreu uma diminuição significativa nos níveis de CT após um mês da ocorrência do enfarte comparando com o grupo CTR (tabela 4).

Não se verificou diferenças nos níveis de LDL e HDL entre os grupos M1 e CTR, no entanto comparando os diferentes momentos, observou-se uma diminuição dos níveis de HDL e LDL, com significado para o último parâmetro, no momento M2 relativamente a M1. No M2 os níveis de HDL e LDL são inferiores aos determinados no CTR. Os níveis de TAG são significativamente mais elevados no CTR comparando com o grupo de enfartados nos diferentes momentos. Verificou-se uma diminuição de TAG em M2 não sendo significativo (tabela 4).

Não se verificaram alterações significativas nos níveis de glucose no M1 e M2. Relativamente ao CTR este parâmetro não foi avaliado, não sendo assim possível realizar comparação entre os diferentes grupos. A diminuição que se registou dos parâmetros de CT, HDL, LDL, TAG e glucose em M2 comparando com M1, pode estar relacionado com possíveis alterações na dieta dos indivíduos e mesmo com a medicação aplicada após o episódio de enfarte.

Tabela 2- Características clínicas e bioquímicas dos indivíduos que sofreram enfarte agudo do miocárdio nos diferentes momentos (M1; EMA2) e grupo controle (CTR)

	M1	M2	CTR
Idade (Anos)	54.80 ± 4.31	54.80 ± 4.31	53.50 ± 1.60
Sexo, % de mulheres	20.00	20.00	20.00
PCR (mg/dL)	1.90 ± 0.75 ^a	0.81 ± 0.14 ^c	0.26 ± 0.05 ^b
CT (mg/dL)	222.33 ± 18.48	131.00 ± 14.51 ^c	207.90 ± 21.03 ^b
HDL (mg/dL)	46.33 ± 5.28	39.40 ± 1.72	46.30 ± 4.36
LDL (mg/dL)	153.33 ± 15.77	85.60 ± 11.66 ^c	159.30 ± 10.12 ^b
TAG (mg/dL)	120.11 ± 11.51 ^a	89.40 ± 16.11	219.30 ± 40.93 ^b
Glucose (mg/dL)	176.80 ± 28.34	143.13 ± 33.28	. ± .

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão. M1- momento em que sofreram enfarte agudo do miocárdio; M2- Um mês após terem sofrido o enfarte; CTR- grupo controle; PCR- Proteína C Reativa; CT- Colesterol Total; HDL- Lipoproteínas de alta densidade; LDL- Lipoproteínas de baixa densidade; TAG- Triglicerídeos. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2).

7 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE FOSFOLÍPIDOS NO SORO

Os lípidos totais do soro do sangue foram extraídos pelo método de Bligh and Dyer depois de uma otimização deste método. Após otimização, foi realizada a quantificação do fosfato, usando um método colorimétrico, o método de verde de malaquite. Este método é importante devido à sua sensibilidade, é o indicado para quantidades inferiores a 1 µg de fosfolípidos. Este método é baseado na formação de um complexo entre fosforo e verde de malaquite, levando a alterações de cor, podendo, assim quantificar-se por absorvância.

Para a realização da quantificação, usou-se sempre a mesma quantidade de soro para todas as amostras, utilizou-se um volume de 10 µL. Verificou-se uma diminuição na quantidade de PL em M1 comparando com CTR, não sendo significativo. Quando se comparou entre CTR e M2, não se verificam alterações. Ao comparar os diferentes momentos, observa-se uma diminuição na quantidade de PL em M1 em relação a M2 (figura 14).

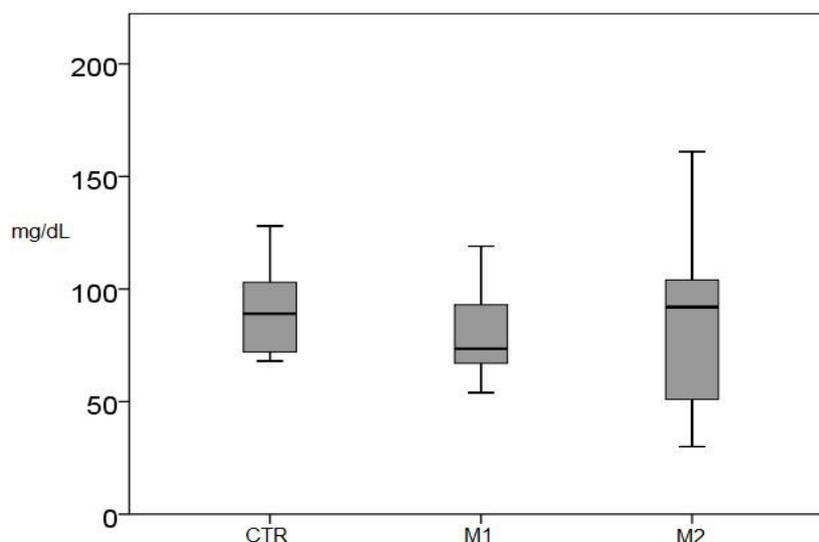


Figura 10. Quantificação de fosfolípidos presentes no soro dos indivíduos dos diferentes grupos em estudo, pelo método verde de malaquite. M1- momento em que sofreram enfarte agudo do miocárdio; M2- Um mês após terem sofrido o enfarte; CTR- grupo controle;

8 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO SORO

As principais metodologias utilizadas para avaliação da peroxidação lipídica em sistemas biológicos medem a formação de produtos originados durante as diferentes fases deste processo. Neste trabalho, avaliou-se a produção de peróxidos lipídicos pelo teste de laranja de xilenol (do inglês *Ferrous Oxidation- xylene Orange*; FOX).

Os hidroperóxidos lipídicos são produtos primários da peroxidação de ácidos gordos insaturados, sendo por isso importante avaliar os níveis de produção, uma vez que a maioria dos métodos avalia os produtos de degradação. O método de FOX, permite quantificar os hidroperóxidos lipídicos em amostras biológicas, uma vez que os hidroperóxidos lipídicos oxidam o ferro II e o ferro III, o qual reage com o laranja de xilenol, produzindo um cromóforo que tem uma absorção máxima em 560nm, sendo um método simples, que não exige equipamentos sofisticados.

Ao avaliar a existência de peroxidação lipídica no soro, não se verificaram alterações significativas nas diferentes condições. Verificou-se apenas um pequeno aumento em M2 comparando com M1 e CTR (figura 15).

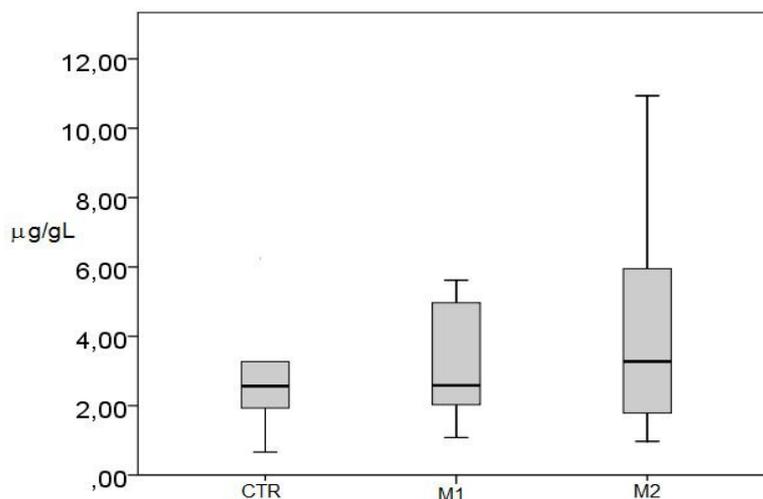


Figura 11. Quantificação da peroxidação lipídica pelo método de FOX no soro de doentes enfartados, um mês após ter ocorrido enfarte e num grupo controlo. M1- momento em que sofreram enfarte agudo do miocárdio; M2- Um mês após terem sofrido o enfarte; CTR- grupo controlo;

9 ANÁLISE DO EXTRATO LIPÍDICO TOTAL POR HPLC E ESI-MS

O extrato lipídico do soro é uma mistura complexa que apresenta lípidos polares e apolares. Neste trabalho, e tendo em atenção à coluna que foi utilizada, os lípidos polares ligam-se fortemente à coluna, mas os lípidos não polares passam diretamente pela coluna, como por exemplo os triglicerídeos (TAG), sendo por isso os primeiros a eluir (Figura 15). Os lípidos polares são eluídos em ordem de crescente polaridade, com solventes de polaridade progressivamente maior. Assim, após os TAG, eluem primeiro as fosfatidiletanolaminas (PE) que eluem primeiro que as lisofosfatidiletanolaminas (LPE), seguidas das fosfatidilcolinas (PC), depois as esfingomielinas (SM) e por fim as lisofosfatidilcolinas (LPC) (figura 16). Estes lípidos e fosfolípidos foram analisados no modo positivo. A LC-MS no modo negativo foi utilizada para analisar as PI, PE, LPE, eluindo por esta ordem.

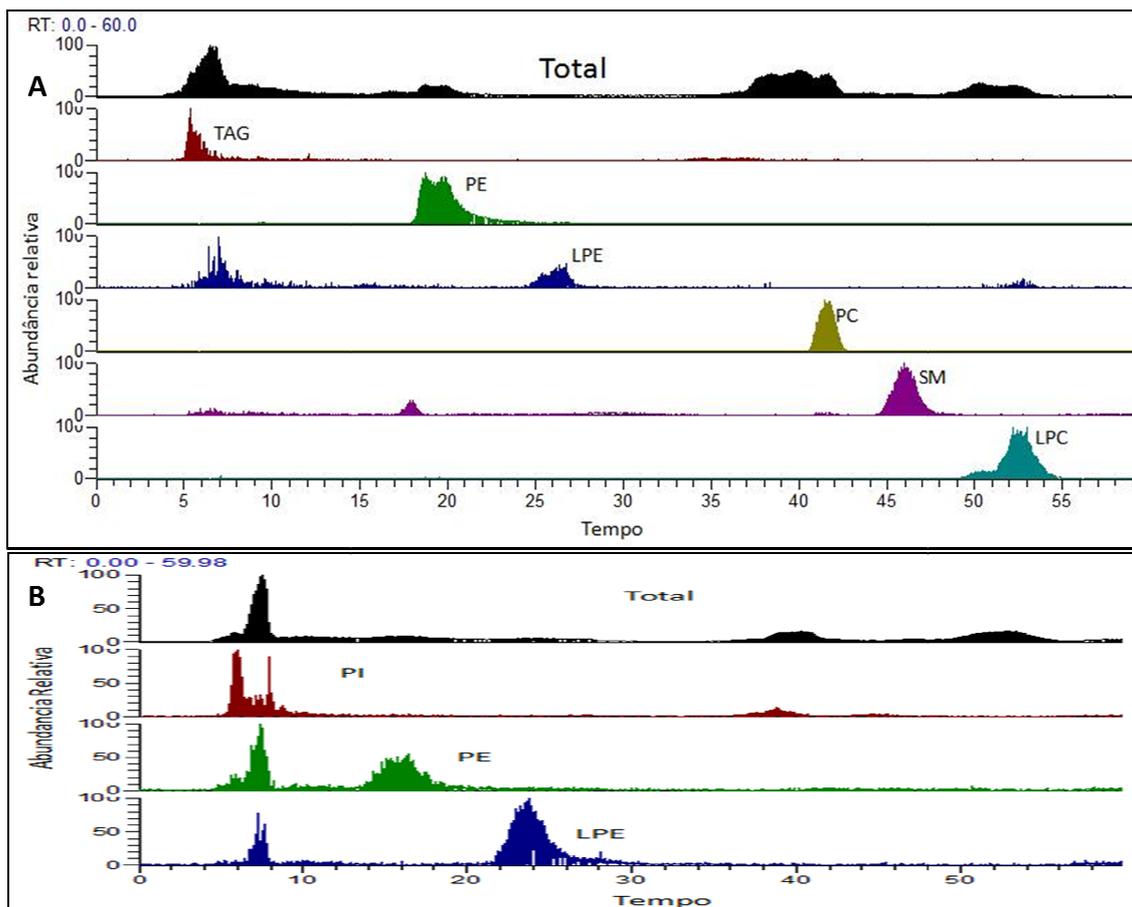


Figura 12. Separação das diferentes classes de lípidos por HPLC. (A) Separação dos TAG, PE, LPE, PC, SM, LPC modo positivo; (B) Separação dos PI, PE, LPE no modo negativo.

A análise por cromatografia líquida (LC), seguida da espectrometria de massa (MS) permite determinar iões com o mesmo valor de m/z mas de diferentes classes (figura 17).

A identificação e caracterização de lípidos neutros e fosfolípidos foi realizada utilizando espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI-MS) quer no modo positivo quer no modo negativo. A identificação de cada fosfolípido foi feita baseada na identificação do seu peso molecular (figura 17) identificados pelos iões $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$, por análise de espectros de ESI-MS) e na análise da fragmentação característica observada em ESI-MS/MS, que permite identificar inequivocamente a classe de cada fosfolípido, bem como a sua composição em ácidos gordos.

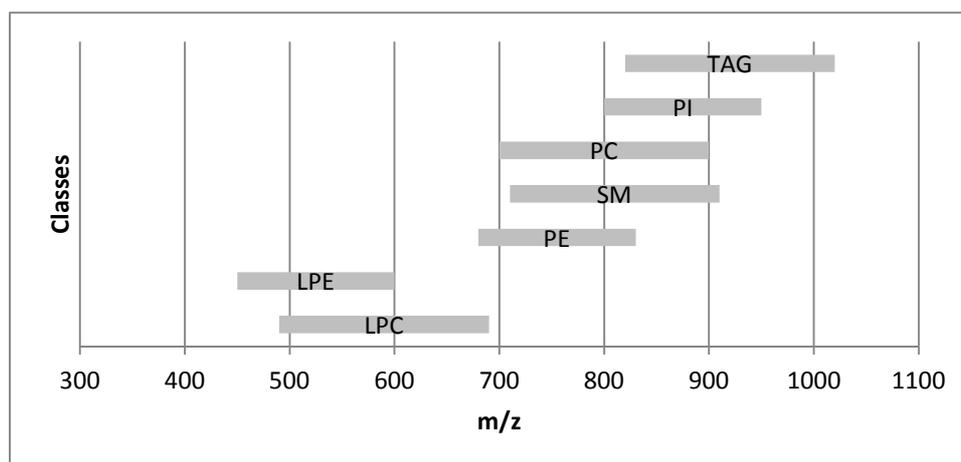


Figura 13. Diferentes classes de lipídios e o intervalo de m/z correspondente a cada uma.

9.1 Análise dos espectros de LC-ESI-MS e ESI-MS/MS no modo positivo

Como já foi referido, a técnica de HPLC permitiu-nos separar as diferentes classes de lipídios e passar diretamente para a espectrometria de massa sem ocorrer perdas de amostras, iniciando assim a análise por ESI-MS e ESI-MS/MS. No modo positivo, analisámos as classes lipídicas dos TAG, das PCs, das LPCs, PEs, LPEs e das SMs. Em seguida apresentamos e discutiremos, separadamente os espectros de cada uma destas classes separadas por HPLC, para o grupo de enfartados, nos diferentes momentos e para o grupo controlo, de forma a observar possíveis alterações no perfil lipídico e possível peroxidação lipídica. Os resultados serão resumidos em tabelas com as espécies mais abundantes para as diferentes classes de fosfolípidos.

De salientar que uma menor ou maior abundância relativa dos iões nos espectros de ESI-MS não refletem diretamente a sua proporção no extrato total, uma vez que são dependentes das propriedades químicas que condicionam a capacidade e ionização de cada grupo químico ligada á cabeça do fosfolípido. Assim, apresenta-se, também, uma avaliação da quantidade total de cada classe e da quantidade das diferentes espécies para cada classe.

Antes de iniciar a avaliação de classe a classe, realizou-se uma análise da quantidade relativa (%) de PC, LPC, e SM na totalidade das classes detetadas no modo positivo. Assim, observou-se que as PC são a classe predominante no soro, seguida das LPC e por fim pelas SM (figura 18).

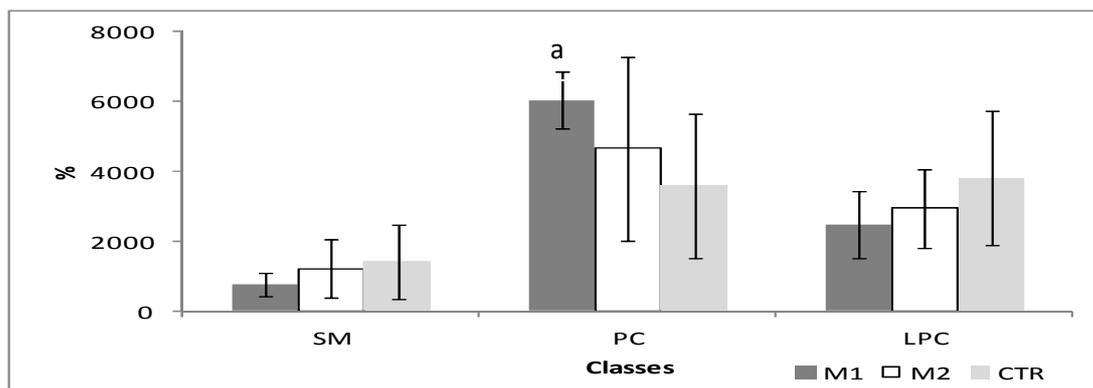


Figura 14. Abundância relativa das SM, PC, e LPC presentes no soro de indivíduos enfartados (M1 e M2) e indivíduos saudáveis (CTR). Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2).

9.1.1 Triglicerídeos

No modo positivo, começou-se por analisar os espectros dos TAG para pesquisar alterações no seu perfil nos diferentes momentos do enfarte e no grupo controle. Os TAG foram identificados pela formação dos iões $[M+NH_4]^+$, uma vez que o eluente continha acetato de amónio. Ao comparar os espectros dos diferentes grupos e diferentes momentos (figura 19) verificamos que o M1 e CTR são muito semelhantes entre si, apresentando uma pequena diminuição do ião m/z 848 no M1 relativamente ao CTR. O espectro que apresenta mais alterações é em M2 comparando tanto do M1 ou CTR. Em M2 verificamos um aumento dos iões m/z 900.6, 902.6, 904.6 e 906.6 comparando com M1 e CTR.

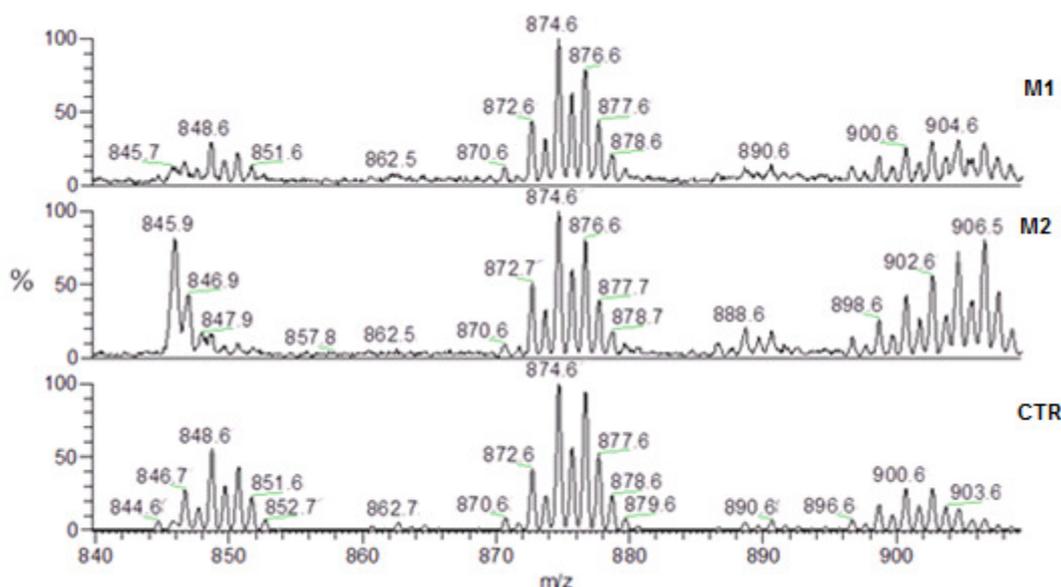


Figura 15. Espectros de LC-ESI-MS de triglicerídeos. Comparação dos diferentes espectros de LC-ESI-MS no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controle (CTR).

Na tabela 5 estão representados os iões mais abundantes encontrados nos diferentes momentos e diferentes grupos em estudo, apresentando o número de carbonos e duplas ligações das cadeias acilo, bem como a estrutura, confirmada pelos espectros MS/MS. No caso do ião m/z 876.6, encontramos duas estruturas possíveis.

Tabela 3- Triglicerídeos mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controlo.

$[M+NH_4]^+$	C:N	Espécies Moleculares
846.6	50:3	16:0/ 16:1/ 18:2
848.6	50:2	16:0/ 16:1/ 18:1
850.6	50:1	16:0/ 16:0/ 18:1
872.6	52:4	16:0/ 18:1/ 18:3
874.6	52:3	16:0/ 18:1/ 18:2
876.6	52:2	16:0/ 18:1/ 18:1 16:0/ 18:0/ 18:2
900.6	54:4	16:0/ 18:2/ 20:2
902.6	54:3	16:0/ 18:1/ 20:2
904.6	54:2	16:0/ 18:2/ 20:0

Na forma de aductos de amoníaco, $[M + NH_4]^+$, a fragmentação dos iões dos TAG resulta na perda de NH_3 , formando um ião protonado $[M+H]^+$, e a perda da cadeia acilo, na forma $[M-RCOO]^+$, originando assim, um ião diacil. Este tipo de fragmentação é característico de todas as espécies moleculares de TAGs.

Esta característica pode ser exemplificada no espectro ESI-MS/MS do TAG de m/z 876.6 (figura 20). O ião m/z 876.6, o que corresponde à presença de 52 carbonos e duas duplas ligações (C 52:2).

O espectro do LC-MS/MS do ião m/z 876.6 (TAG 52:2) mostra dois iões produto, de m/z 603.3 e o m/z 577.6. O ião m/z 603.3 é formado pela perda do grupo acilo correspondente ao ácido

gordo 16:0. Por outro lado, o ião produto m/z 577 forma-se pela perda do grupo acilo 18:1, assim concluímos que a estrutura deste TAG é 16:0/ 18:1/ 18:1.

No entanto, podemos verificar que este TAG pode apresentar outra estrutura, ao observar o espectro MS/MS com mais atenção. Encontramos os iões m/z 575.3, 579.4, 603.3 que indicam a perda dos ácidos gordos 18:0, 18:2 e 16:0, respetivamente. A estrutura proposta, também para este TAG, é 16:0/ 18:0/ 18:2.

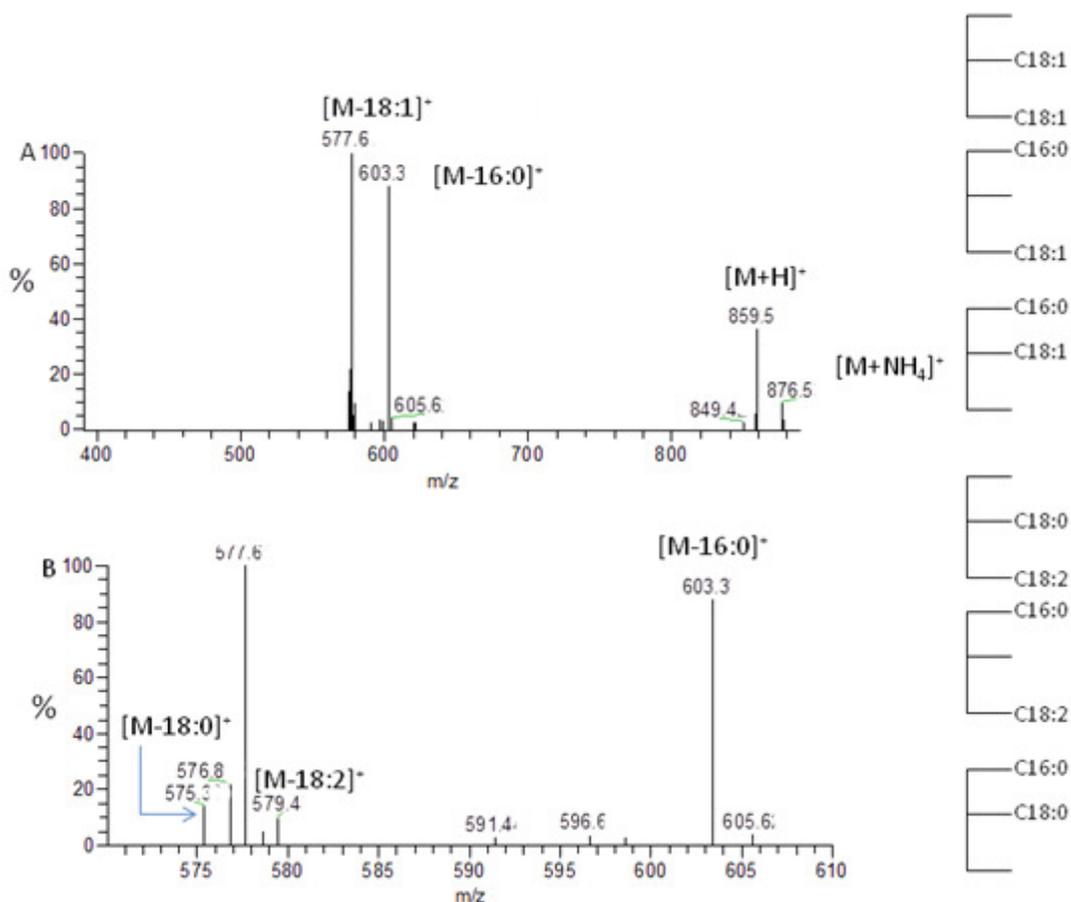


Figura 16. Espectro MS/MS característico de triglicerídeos no modo positivo. (A) Espectro MS/MS dos iões percursores característicos da fragmentação de aductos de amoniaco, para a estrutura 16:0/ 18:1/ 18:1. (B) Espectro MS/MS dos iões percursores característicos da fragmentação de aductos de amoniaco, para a estrutura 16:0/ 18:0/ 18:2.

Ao determinar a estrutura dos TAG, percebemos que os iões m/z 900.6, 902.6 e 904.6, que estão aumentados no M2 em comparação com CTR e M1, são também iões resultantes da peroxidação lipídica dos iões m/z 868.6, 870.6, 872.6, respetivamente. A fragmentação dos TAG oxidados, mais concretamente, resultantes da peroxidação lipídica, caracteriza-se pela perda de água $[M+H-H_2O]^+$ e a perda de peróxido de hidrogénio, $[M+H-H_2O_2]^+$, o que se verificou, confirmando que são produtos de oxidação. Assim, regista-se um aumento da

peroxidação lipídica em M2, o mesmo perfil observado na quantificação de produtos de peroxidação lipídica determinada pelo método de FOX (figura 15).

Depois de se avaliar os diferentes espectros, realizou-se uma avaliação da quantidade e da abundância relativa de cada espécie na quantidade total da respectiva classe. Avaliou-se também a quantidade total da classe em estudo nos diferentes momentos e diferentes grupos.

Ao observar a quantidade dos diferentes iões verificou-se uma diminuição destes em M2, comparando com M1 e CTR. Em M1 verificou-se um aumento dos iões m/z 846.6, e ocorre uma diminuição dos iões m/z 848.6, 850.6, 872.6, 874.6, 900.6 e 904.6 em relação ao CTR (figura 21A).

De uma forma geral, registou-se que as espécies mais abundantes são os iões m/z 846.6, 848.6, 874.6 e 876.6, sendo constituídos pelos ácidos gordos 16:0, 16:1, 18:1 e 18:2. Observou-se um aumento da quantidade relativa dos iões m/z 850.6, 872.6, 900.6, 902.6, 904.6 no M2 em comparação com M1 e CTR (figura 21B). De salientar que os resultados dos iões m/z 900.6, 902.6 e 904.6, sendo também produtos da oxidação lipídica, vão de encontro aos resultados avaliados pelo método de FOX (figura 15). Registou-se um aumento da abundância relativa do ião m/z 846.6 em comparação com o M2 e CTR, pelo contrário, regista-se uma diminuição da quantidade do ião m/z 848.6 em M1 e M2 comparando com o CTR (figura 21B)

Ao analisar a quantidade total dos diferentes iões verificou-se um aumento significativo dos TAG em relação ao M2 e CTR. Observou-se, também uma diminuição significativa em M2 comparando com CTR, não esquecendo que na análise bioquímica realizada, se verificou que o M1 e CTR apresentavam níveis de TAG mais elevados em relação ao M2.

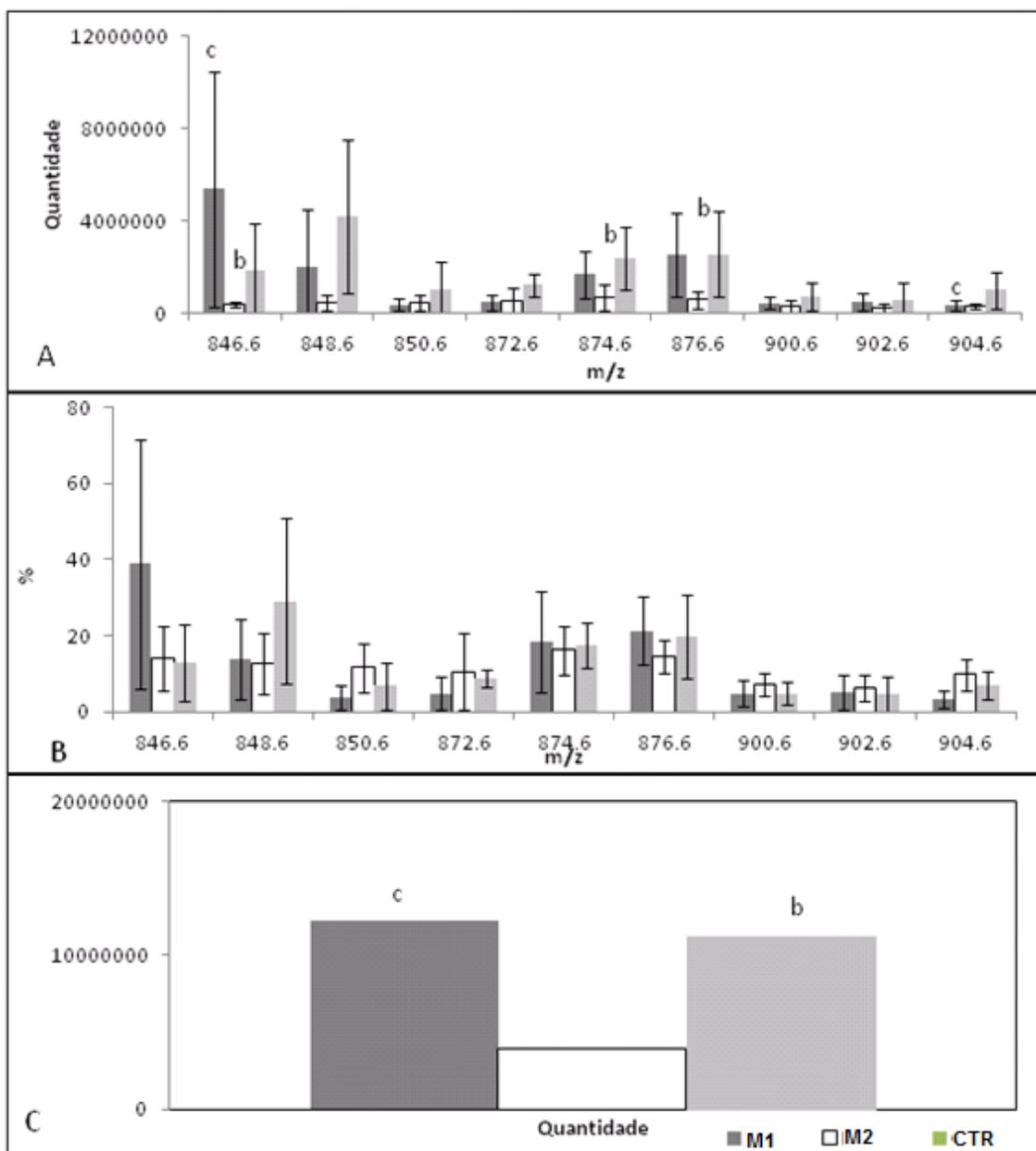


Figura 17. Avaliação da quantidade de triglicerídeos. (A) Quantidade dos diferentes íons da classe triglicerídeos. (B) Quantidade relativa dos diferentes íons; (C)- Quantidade total dos triglicerídeos. M1-momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controlo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c - M1 versus M2).

9.1.2 Fosfatidilcolinas

As PCs são uma das classes lipídicas mais abundantes nas células, encontrando-se predominantemente nas membranas celulares.

A classe das PCs encontra-se dividida entre compostos 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfolina; 1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfolina; 1-O-alk-1-enil-2-acil-snglicero-3-fosfolina (figura 21), na maioria dos tecidos, a subclasse predominante é 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfolina [88].

Neste trabalho identificou-se essencialmente diacilfosfatidilcolinas (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina).

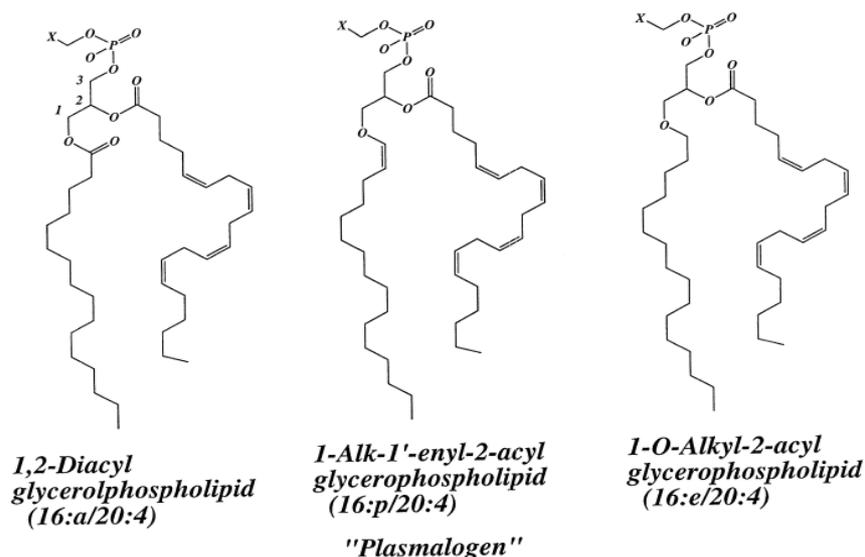


Figura 18. Classes dos glicerosfolipidos, acil, alquil e alquilacil, e respectiva estrutura e representação [89].

Na figura 23 apresentamos a comparação dos espectros de M1, M2 e CTR relativamente á classe das PCs. Assim, ao observar os diferentes espectros, não se verificou alterações significativas entres os diferentes momentos e diferentes grupos.

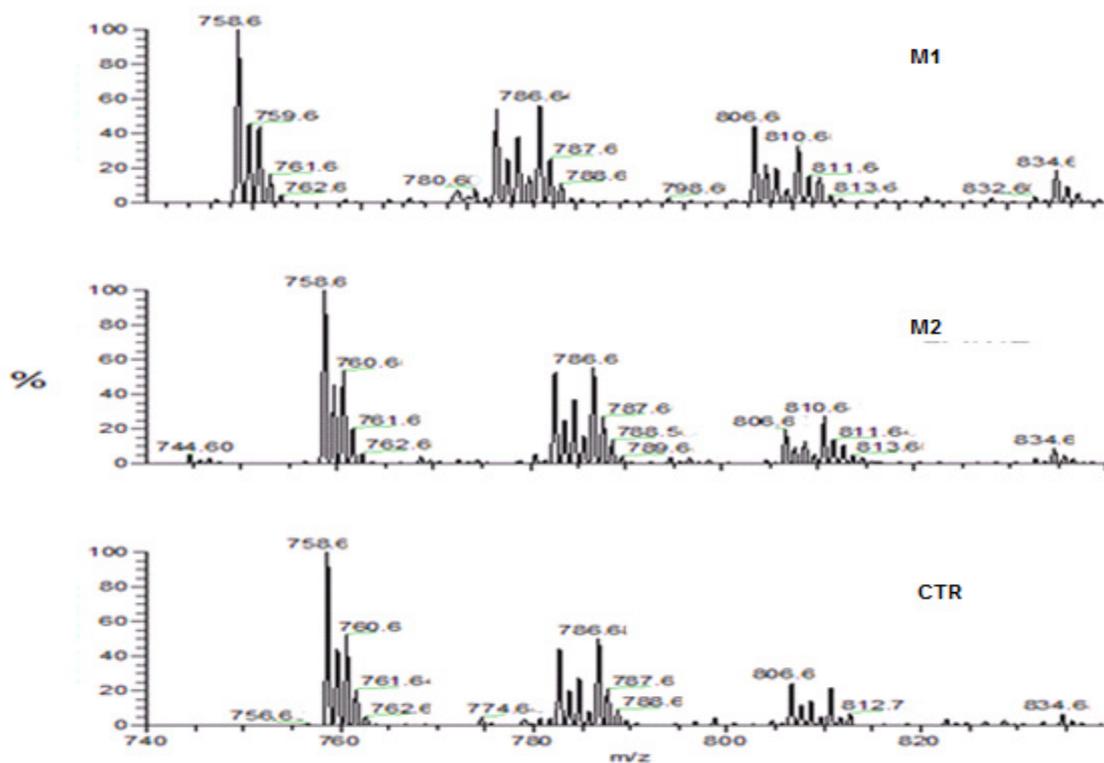


Figura 19. Espectros de LC-ESI-MS de fosfatidilcolinas no momento do enfarte (M1), após um mês deste ocorrido (M2) e grupo controlo (CTR).

Os iões mais abundantes estão apresentados na tabela 6. Para cada ião determinou-se os ácidos gordos que os constituem. Os espectros ESI-MS positivo das PCs são caracterizados pelo ião na forma protonada $[M+H]^+$.

Tabela 4- Fosfatidilcolinas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controlo.

$[M+H]^+$	C:N	Espécies Moleculares
758.6	34:2	16:0/18:2
760.6	34:1	16:0/18:1
782.6	36:4	16:0/20:4
784.6	36:3	16:0/20:3
806.6	38:6	16:0/22:6
810.6	38:4	18:0/20:4
812.6	38:3	18:0/20:3

O espectro de ESI-MS/MS do ião $[M+H]^+$ de uma PC apresenta um ião m/z 184, correspondente á quebra entre o grupo fosfato com grupo colina da cabeça do glicerol, tal como representado na figura 24. Os iões na forma $[M+H]^+$ apresentam a perda do ácido gordo na posição *sn-1* e *sn-2* $[M + H-RCOOH]^+$ [90].

O ião m/z 760.6 corresponde á presença de 34 carbonos e uma dupla ligação (34:1). Os iões fragmento que se formam indicam o tipo de ácidos gordos presentes na molécula. Os iões m/z 478.5 e m/z 504.6 indicam as perdas dos ácidos gordos 18:1 e 16:0, respetivamente.

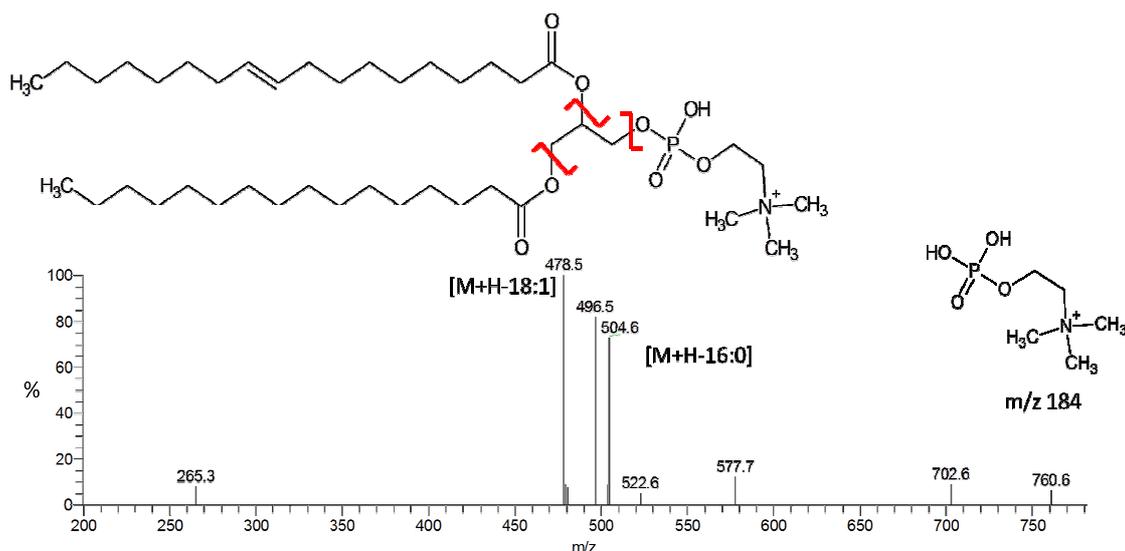


Figura 20. Estrutura da fosfatidilcolina m/z 760.6 (18:1/16:0) e fragmentação e respetivo espectro MS/MS característico de $[M+H]^+$ no modo positivo.

Ao determinar a estrutura das PCs, verificou-se que os iões m/z 758.6, 806.6, e 810.6 que apresentam um ligeiro aumento em M1 e M2 em comparação com CTR, são também iões resultantes da peroxidação lipídica dos iões m/z 726.6, 774.6 e 778.6, respetivamente. A fragmentação das PC oxidadas resultantes da peroxidação lipídica, caracteriza-se pela perda de água $[M+H-H_2O]^+$ e a perda de peróxido de hidrogénio, $[M+H-H_2O_2]^+$, o que se verificou, confirmando que são produtos de oxidação. Assim, regista-se um aumento de produtos de peroxidação lipídica.

Uma vez que não verificamos alterações significativas a nível dos espectros, analisámos a quantidade de cada espécie, para cada momento (M1, M2) e para o grupo CTR. Em relação à quantidade, observou-se que no momento M1, há um aumento de todas as espécies, comparando com o momento M2 e com o grupo CTR. Registou-se um aumento significativo do ião m/z 784.6, 786.6, 812.6 em M1 comparando com o CTR. Registou-se também em aumento significativo, exceto para o ião m/z 782.6 em M1 comparando com M2. Quando se comparou o momento M2 com o CTR, verificou-se que não há muita discrepância entre as quantidades de PC (figura 25A).

Relativamente à quantidade relativa, os iões mais abundantes são m/z de 758.6 e 760.6, sendo constituídos pelos ácidos gordos 16:0, 18:1 e 18:2. Comparando M1 com M2 verificou-se uma diminuição dos iões m/z 758.6, 782.6 e um aumento dos iões m/z 760.6, 784.6, 786.6, 812.6 sendo este aumento significativo para este último. Comparando M2 com CTR, verificou-se um aumento significativo do ião m/z 782.6 em M2 (figura 25B).

Tendo em conta os resultados observados para cada espécie de PC, observamos que a quantidade total das PCs foi mais alta no momento do M1, seguindo-se o momento M2 (figura 25C), estando em concordância com os dados observados na análise bioquímica das LDL.

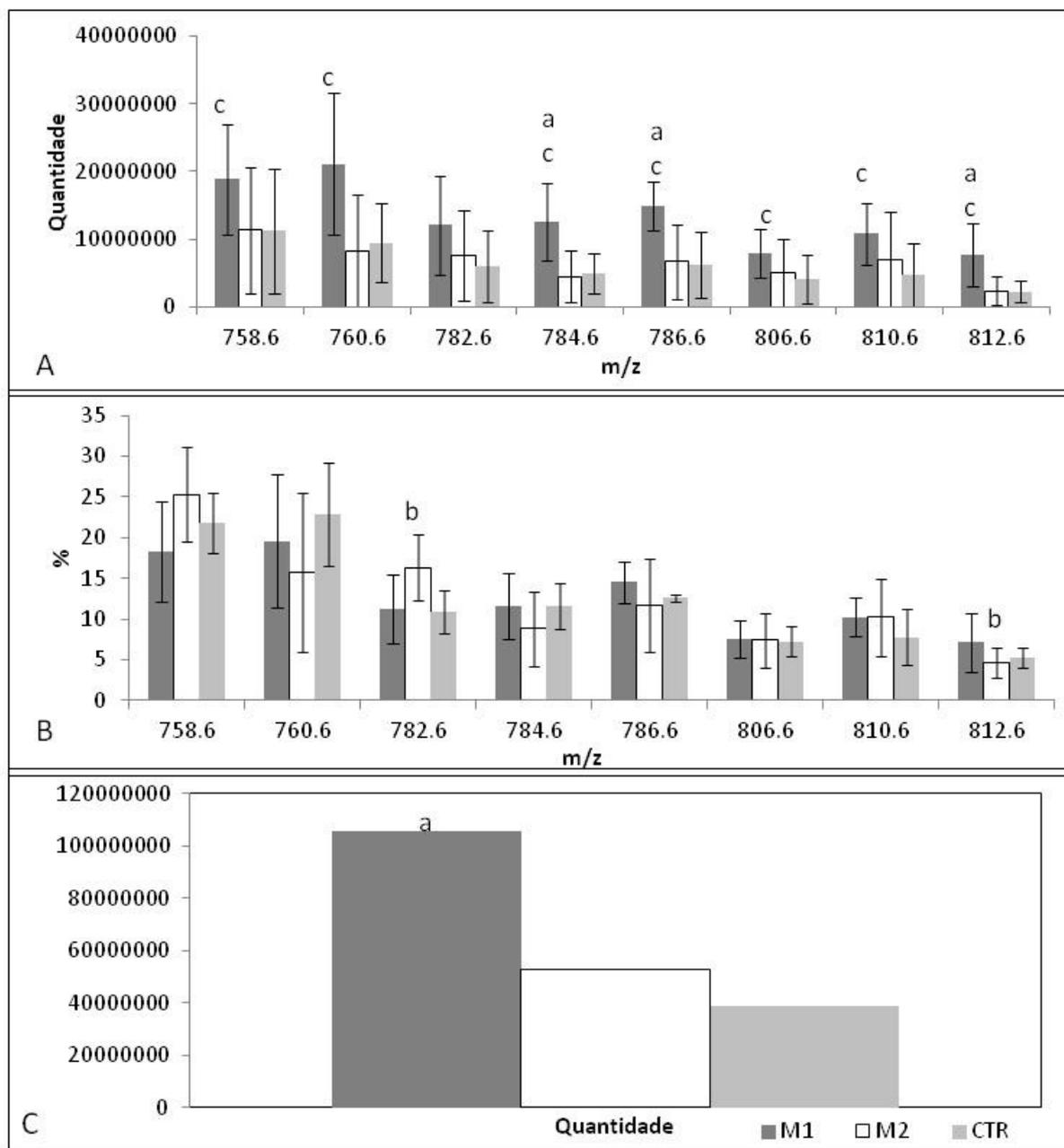


Figura 21. Quantificação da classe fosfatidilcolina. (A) Quantidade dos diferentes iões da classe fosfatidilcolina. (B) Quantidade relativa dos diferentes iões; (C)- Quantidade total das fosfatidilcolina. M1-momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controlo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2).

9.1.3 Lisofosfatidilcolinas

Os lisofosfolípidos estão envolvidos numa grande variedade de processos importantes, incluindo proliferação celular, migração celular, angiogénese, e inflamação. AS LPC são o resultado da oxidação e fragmentação dos resíduos em *sn*-2 de fosfatidilcolina (PC), isto resulta da atividade da fosfolipase-A2.

Ao comparar os espectros nos diferentes grupos e diferentes momentos não se verificam alterações significativas, como se pode observar na figura 26.

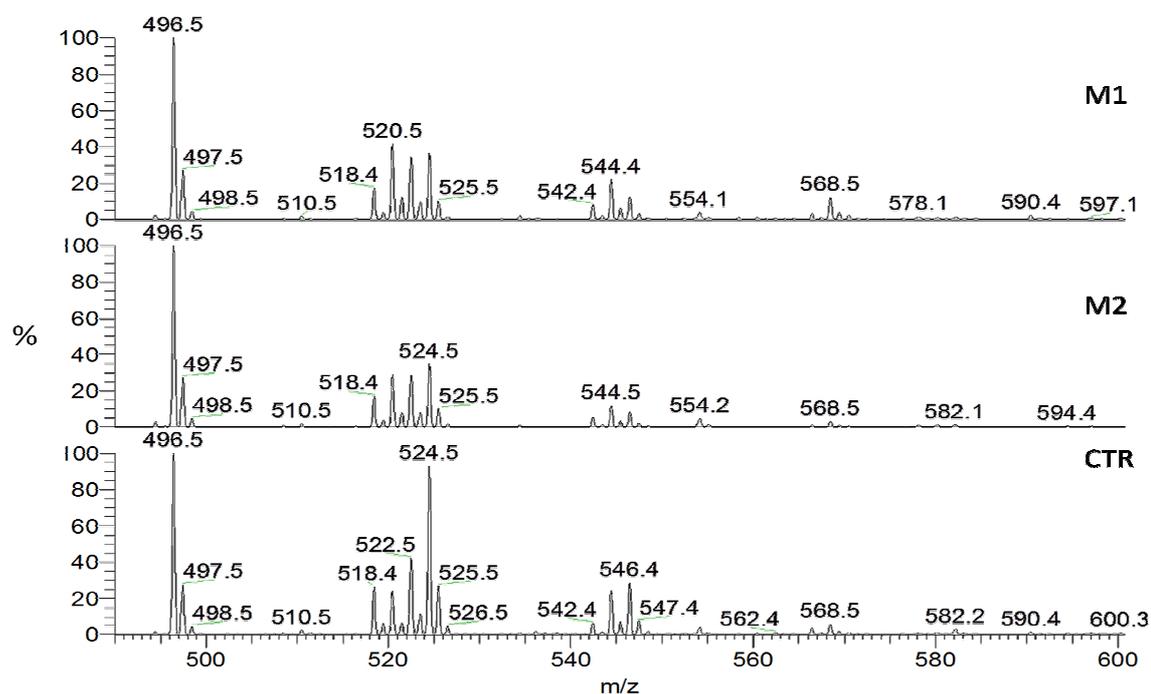


Figura 22. Espectros de LC-ESI-MS de lisofosfatidilcolinas no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controlo (CTR)

Na tabela seguinte encontram-nos os iões na forma protonada mais abundantes da classe das LPC e a respetiva estrutura, encontrados nas condições de estudo.

Tabela 5- Lisofosfatidilcolinas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controlo.

[M+H] ⁺	C:N
496.5	16:0
518.5	18:3
520.5	18:2
522.5	18:1
524.5	18:0
544.4	20:4
546.5	20:3
568.5	22:6

Na fragmentação de LPC MS/MS é comum encontrar-se o ião *m/z* 184, resultado da perda da cabeça de colina, verificou-se perda de água, [M-H₂O] e a perda do ácido gordo [90].

O ião *m/z* 496.5 corresponde à presença de uma cadeia acilo de 16 carbonos, sem ligações duplas. Na figura 26 podemos observar os diferentes iões produto observados no espectro MS/MS do ião *m/z* 496.5. O espectro apresenta o ião 478.5, característico da perda de água, [M-H₂O]⁺, e o ião *m/z* 240.3 que corresponde á perda do ácido gordo 16:0.

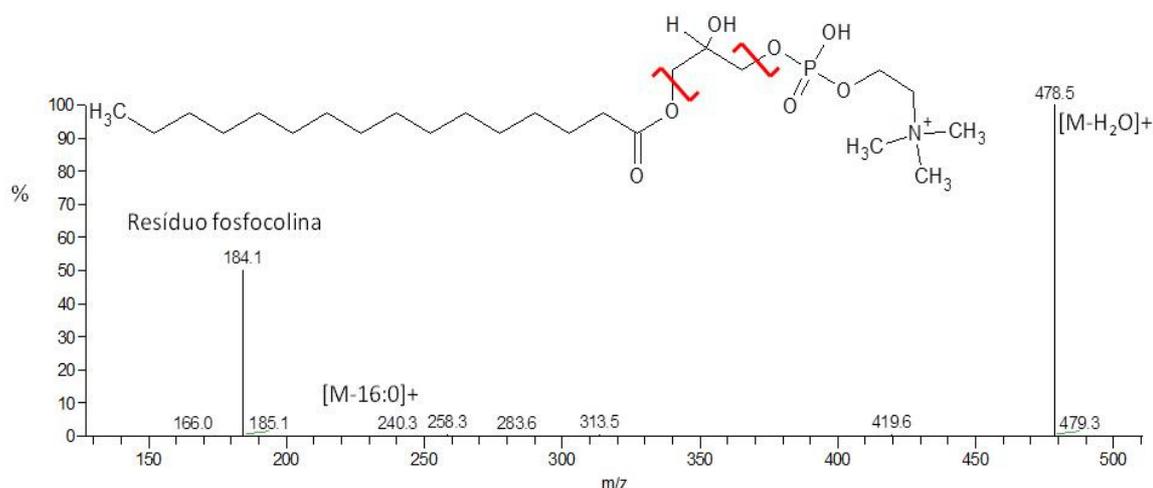


Figura 23. Estrutura da lisofosfatidilcolina *m/z* 496.5 (16:0) e fragmentação e respetivo espectro característico de [M+H]⁺ no modo positivo.

Ao analisar a quantidade de cada espécie de LPC, verificou-se que para os iões m/z 496.5, 518.5, 520.5 e 522.5 os valores em M1 e CTR são muito semelhantes, sendo ligeiramente maior em CTR. Para estas mesmas espécies, verificou-se que a quantidade em M2 é menor comparando com M1 ou CTR, sendo esta diminuição significativa para os iões m/z 524.5, 544.4, 546.4. Para os iões m/z 524.5, 544.4, 568.5 verificou-se uma maior quantidade para M1, seguindo-se o CTR e por fim M2. Relativamente ao ião m/z 546.5, registou-se que esta espécie apresenta uma maior quantidade em CTR, seguindo-se em M1 e por fim M2 (figura 28A).

Relativamente à quantidade relativa, observou-se que o ião m/z 496.5 é o mais abundante em ambos os grupos, sendo constituído pelo ácido gordo 16:0. Verificou-se o ião m/z 496.5 no M2 apresenta uma maior abundância relativa comparando com o M1 e CTR. Para os iões m/z 518.5, 520.5, 522.5 apresentam quantidades relativas muito semelhantes nos diferentes grupos. Registou-se uma maior quantidade relativa dos iões m/z 544.4 e 568.5, sendo significativa para este, em M1 comparando com M2 e CTR. De notar que no caso do ião m/z 546.5 que apresenta uma maior quantidade relativa em CTR comparando com M1 e M2 (figura 28B). Ao analisar a quantidade total das LPC, verificou-se uma quantidade maior em M1, seguindo-se o CTR e o M2 apresenta uma menor quantidade total de LPC (figura 28C).

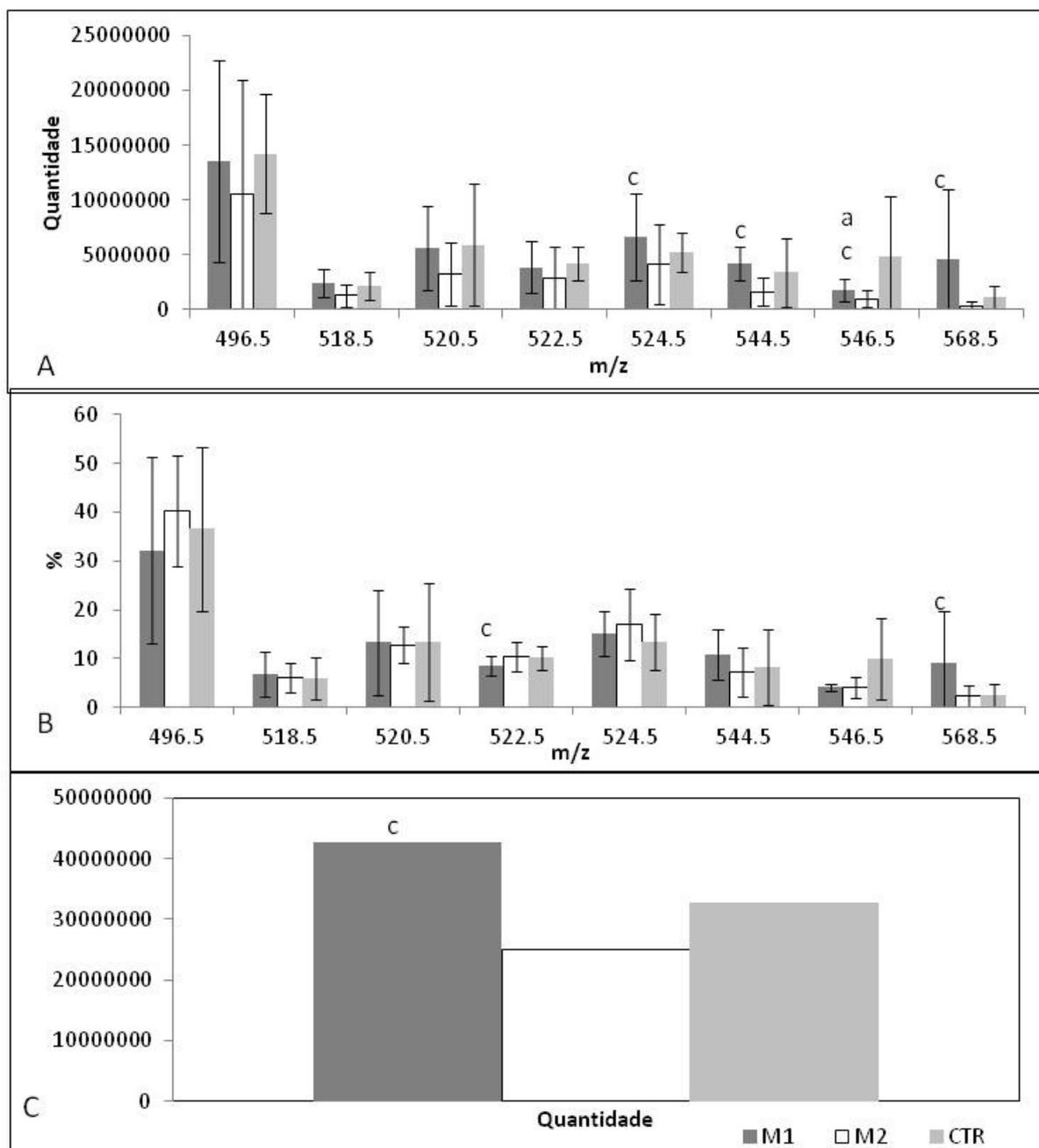


Figura 24. Quantificação da classe de lisofosfatidilcolina. (A) Quantidade dos diferentes íões da classe lisofosfatidilcolina. (B) Quantidade relativa diferentes íões; (C)- Quantidade total das lisofosfatidilcolina. M1- momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2).

9.1.4 Fosfatidiletanolaminas

Tal como a classe das fosfatidilcolinas, também a classe das fosfatidiletanolaminas podem incluir compostos 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; 1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina e 1-O-alk-1-enil-2-acil-snglicero-3-fosfoetanolamina [91, 92].

Nestes espectros conseguiu-se identificar diacilfosfatidiletanolaminas (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) e também alquilacilfosfatidiletanolaminas (1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), como se apresenta na tabela 8.

Ao observar os diferentes espectros (figura 29), verificou-se algumas alterações entre estes. Nota-se uma diminuição do ião m/z 744 em M2 comparando com M1 e CTR, verificou-se um aumento em CTR. Verificou-se um diminuição do ião m/z 740 em M1 M2 comparando com o CTR. Observa-se um aumento do ião m/z 792 em M2 comparando com M1 e CTR.

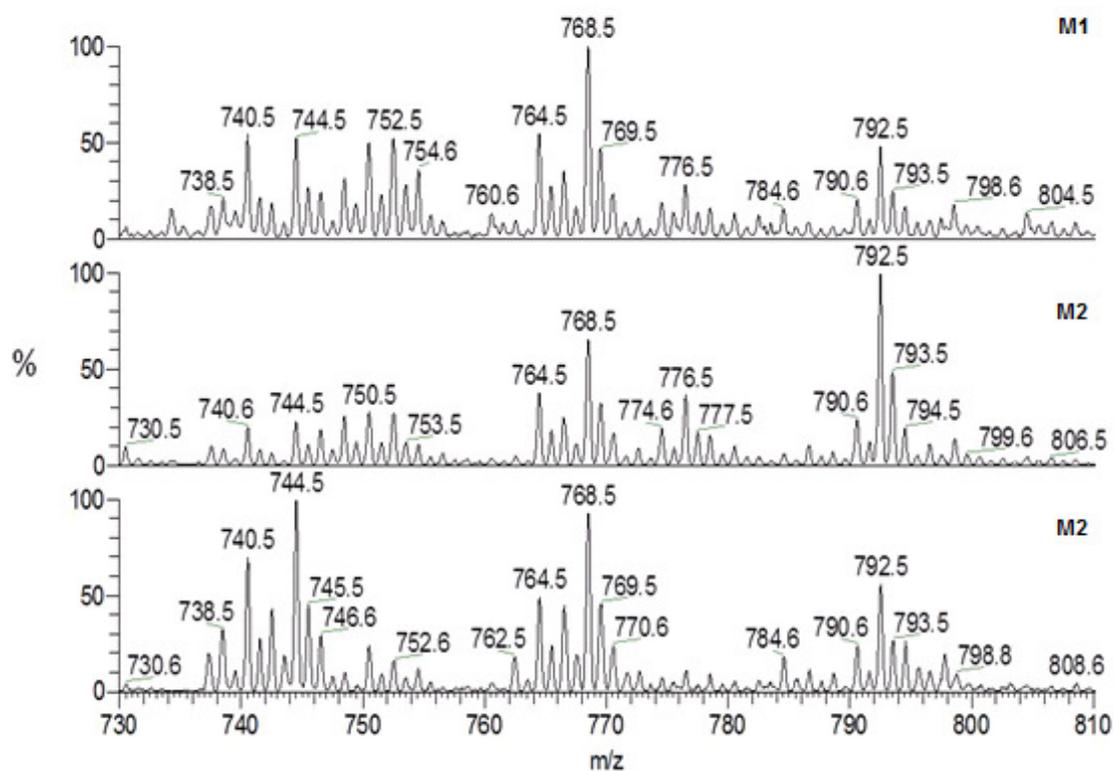


Figura 25. Espectros de LC-ESI-MS de fosfatidiletanolaminas no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controlo (CTR)

Na tabela seguinte apresentamos os valores de m/z , o tipo de ião $[M+H]^+$ e as etanolaminas correspondentes, identificadas nos diferentes momentos e grupos em análise e ainda a que sub-classe das fosfatidiletanolaminas pertencem os iões (acil ou alquilacil) [93, 94].

Embora o espectro ESI/MS positivo são uma fonte eficiente da identificação de estrutural das PEs, os espectros ESI/MS negativos são frequentemente utilizados para a identificação dos ácidos gordos, uma vez que nos ESI/MS positivo observamos os iões resultantes da perda dos ácidos gordos, no modo negativo encontramos os iões fragmentos de cada ácido gordo [95].

Tabela 6- Fosfatidiletanolaminas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controlo.

[M+H] ⁺	C:N	Espécies Moleculares
740.5	36:4	20:4/16:0
744.5	36:2	18:2/18:0 18:1/18:1
750.5	38:5p	18:1p/20:4
754.5	38:3p	18:0p/20:3
752.5	38:4p	18:0p/20:4
764.5	38:6	18:1/20:5
792.5	40:6	22:6/18:0

A fragmentação das PE protonadas, [M+H]⁺ é caracterizada pela perda de 141 Da correspondente à quebra entre o grupo fosfato com o glicerol, tal como representado na figura 29. O ião fragmento [M + H-141]⁺ decompõe-se em iões [M + H-R1COOH]⁺ que é mais comum na posição *sn-1*, em comparação, na posição *sn-2* o ião [M+H-R2C ≡ O]⁺.

Como exemplo de fragmentação típica das PE, apresentamos os espectros do ião de *m/z* 744.5, atribuído à molécula protonada [M+H]⁺ da PE 18:1/18:1 ou 18:0/18:2. Tal como se pode ver no espectro apresentado na figura 30, o ião produto [M+H-141]⁺, *m/z* 603.6, formado por quebra entre o grupo fosfato e o glicerol, e correspondente à perda da cabeça polar, é o ião diagnóstico da presença desta classe de fosfolípidos, este é alias, o ião fragmento mais abundante do espectro de MS/MS das PE protonadas. O ião *m/z* 744.5 decompõe-se em vários iões, uma vez que apresenta mais que uma estrutura. Para a estrutura 18:1/18:1, o ião fragmento *m/z* 462 corresponde à perda do ácido gordo 18:1 na forma de [RCOOH], e o ião 488 corresponde à perda do ácido gordo 18:1 na forma de [R2C = O]. Para o caso da estrutura 18:0/18:2, o ião 481 corresponde à perda de 18:2 na forma de [R2C=O] e o ião *m/z* 460.4 corresponde à perda de 18:0 na forma de [RCOOH].

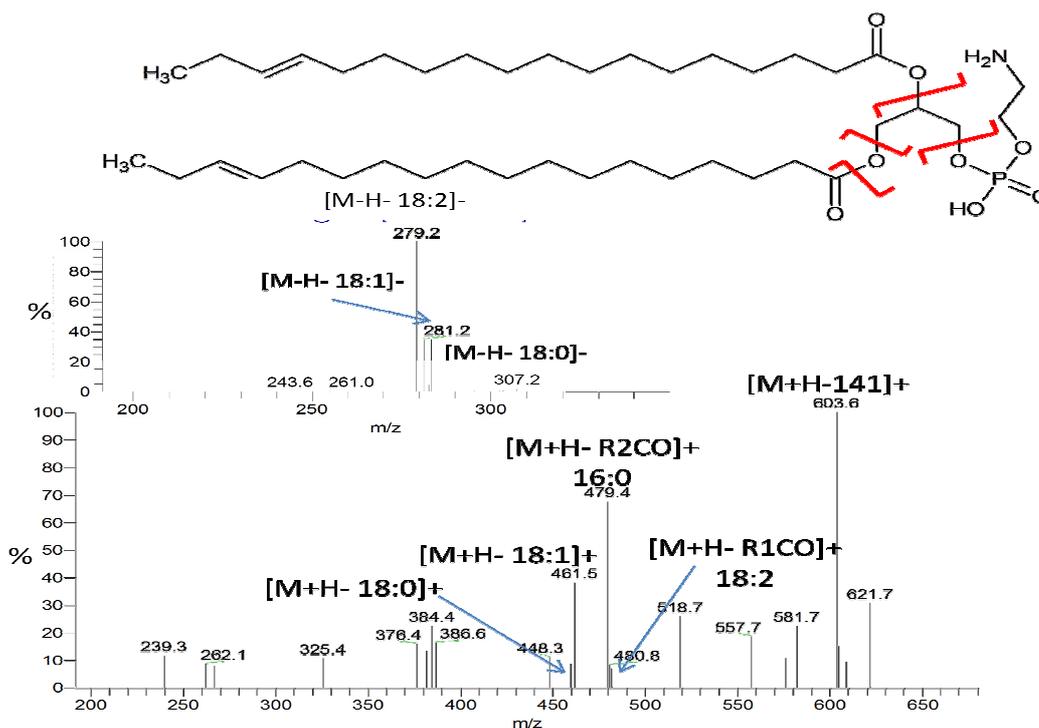


Figura 26. Estrutura da fosfatidiletanolaminas m/z 744.5 (18:0/18:2; 18:1/18:1) e fragmentação e respetivo espectro característico de $[M+H]^+$ no modo positivo e em modo negativo.

No caso dos compostos plasmogéneos e alquililPE, verificou-se igualmente um ião fragmento $[M+H-141]^+$, bem como a perda do ácido gordo na forma acil e a perda do segundo ácido gordo na forma alque, para o caso dos plasmogéneos, e na forma alquil para os alquilil.

A avaliação da quantidade e frequência foi realizada no modo negativo, apenas por um motivo de melhor visualização e determinação das quantidades dos diferentes iões.

9.1.5 Lisofosfatidiletanolaminas

Tal como referimos para as LPC, as LPE tem origem da ação da fosfolipase-A2 sobre as PE. Relativamente aos espetros obtidos pela análise LC-MS, verificou-se um aumento dos iões m/z 524, 526 e 548 em M1 e M2 comparando com o CTR (figura 31).

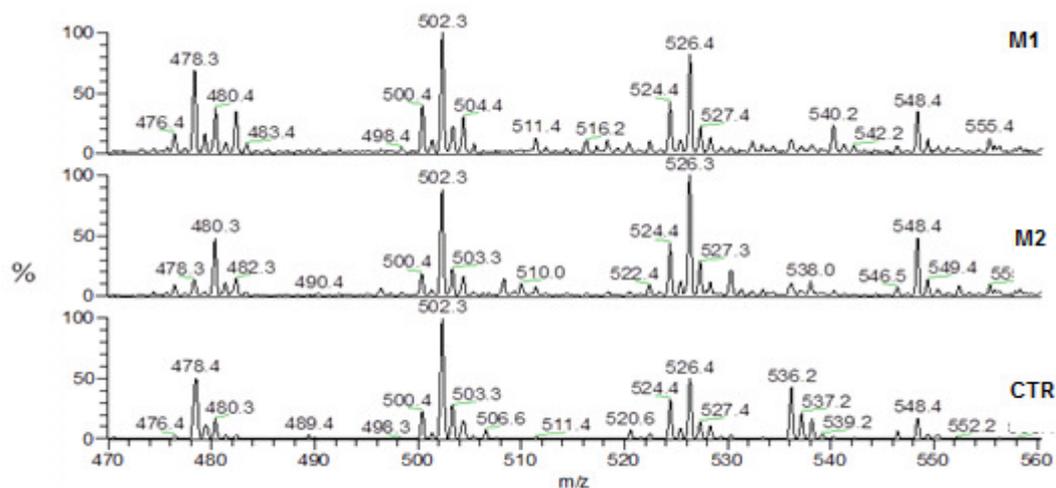


Figura 27. Espectros de LC-ESI-MS de lisofosfatidiletanolaminas no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controle (CTR)

Na tabela seguinte apresentamos os valores de m/z , o tipo de ião $[M+H]^+$ e as LPE correspondentes, identificadas nos diferentes momentos e grupos em análise.

Tabela 7- Lisofosfatidiletanolaminas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controle.

$[M+H]^+$	C:N
478.3	18:2
480.3	18:1
500.4	20:5
502.3	20:4
504.4	20:3
526.4	22:6

Da mesma forma que a LPC, os iões fragmentos resultantes tem origem na perda de água $[M-H_2O]^+$ e da perda da cabeça de fosfatidiletanolamina $[M + H-141]^+$, bem como do ácido gordo correspondente como podemos ver na figura 32.

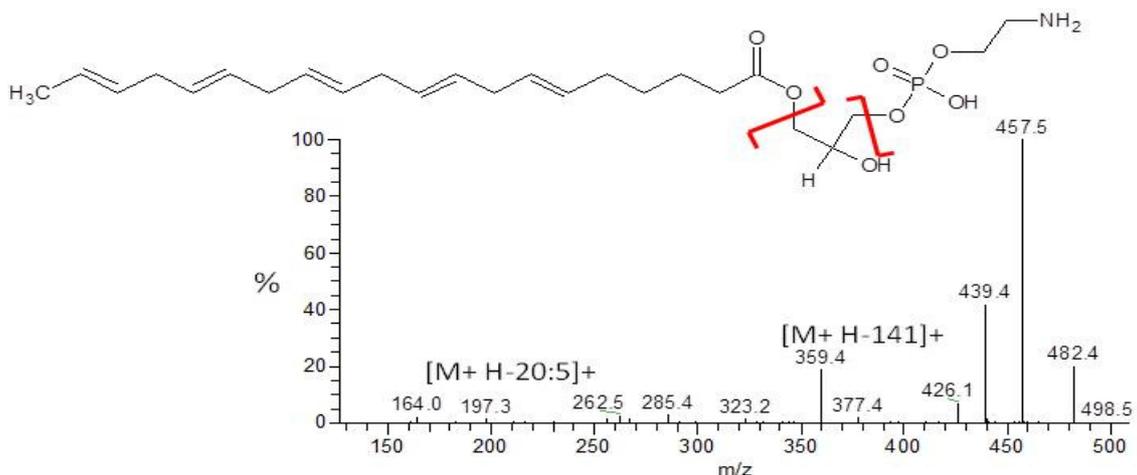


Figura 28. Estrutura da lisofosfatidiletanolamina m/z 500.4 (20:5) e fragmentação e respetivo espectro característico de $[M+H]^+$ no modo positivo e em modo negativo.

A avaliação da quantidade foi realizada no modo negativo, apenas por um motivo de melhor visualização e determinação das quantidades dos diferentes iões.

9.1.6 Esfingomiéline

As esfingomielinas (SM) têm importantes funções na sinalização celular e são constituintes das membranas citoplasmáticas, nomeadamente, fazendo parte integrante dos domínios membranares designados de “Lipid rafts”.

Na figura 33, relativa aos diferentes espectros, verificou-se que não se observa alterações significativas para esta classe.

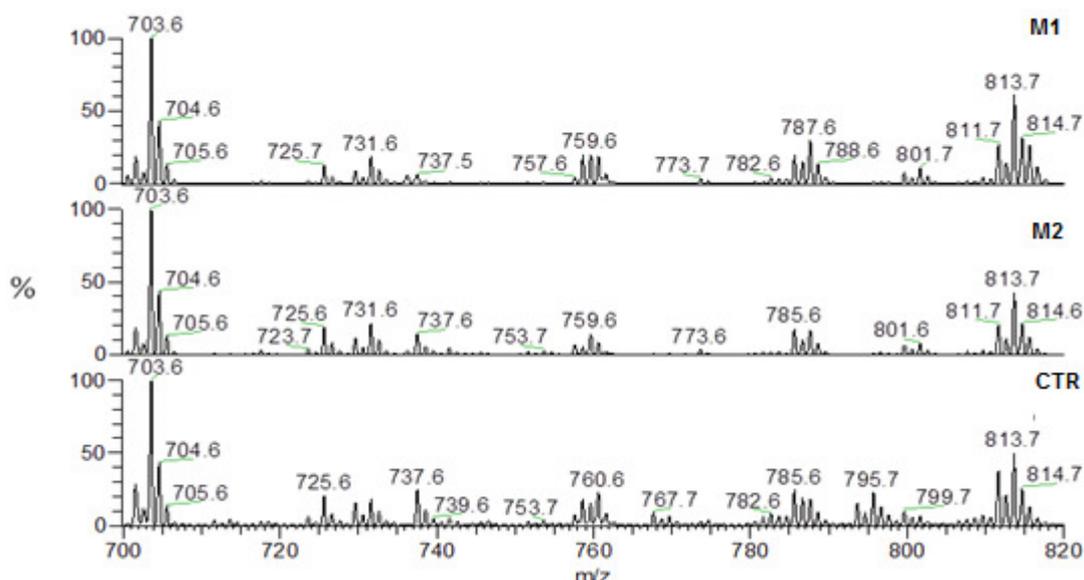


Figura 29. Espectros de LC-ESI-MS de esfingomielinas no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controlo (CTR)

Na Tabela 10 apresentamos os valores de m/z e as SM correspondentes, apresentando as SM através da sua base de cadeia longa (LCB) e do ácido gordo. A LCB mais frequente nas esfingomielinas é a d18:1 que corresponde à esfingosina. Encontramos ainda a LCB d18:0 que corresponde á esfingasina.

Tabela 8- Esfingomielinas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controlo.

[M+H] ⁺	LCB	C:N
703.6	d18:1	16:0
731.6	d18:1	18:0
757.6	d18:1	20:1
811.7	d18:1	24:2
813.7	d18:1	24:1
815.7	d18:1	24:0

A fragmentação das SM é muito semelhante á das PCs, uma vez que, também as SM apresentam o grupo colina na cabeça polar. A diferença mais evidente entre estas duas classes é o facto de os iões da classe das SM apresentaram valor de m/z impar (em consequência de possuírem massa molecular de valor par), ao contrário das PCs cujos iões têm valor par.

Como anteriormente foi referido, não se encontraram alterações significativas na análise dos diferentes espectros, assim, realizou-se uma análise das quantidades dos diferentes iões e a quantidade total desta classe nos diferentes grupos. De uma forma geral, verificou-se uma diminuição no grupo EAM comparando com CTR e que em M2 ocorreu uma diminuição da quantidade em relação a M1. Verificou-se uma diminuição significativa em M2 comparando com M1 para o ião m/z 731.6 (figura 34A)

Observou-se uma maior quantidade relativa dos iões em CTR em comparação com M1 e M2. Verificou-se uma diminuição significativa em M2 comparando com M1 para o ião m/z 811.7 (figura 34B). Relativamente á quantidade total, verificou-se uma menor quantidade em M1 comparando com CTR e o mesmo se verifica em M2 comparando com CTR (figura 34C). Comparando os dois momentos, verificou-se uma diminuição em M2 comparando com M1.

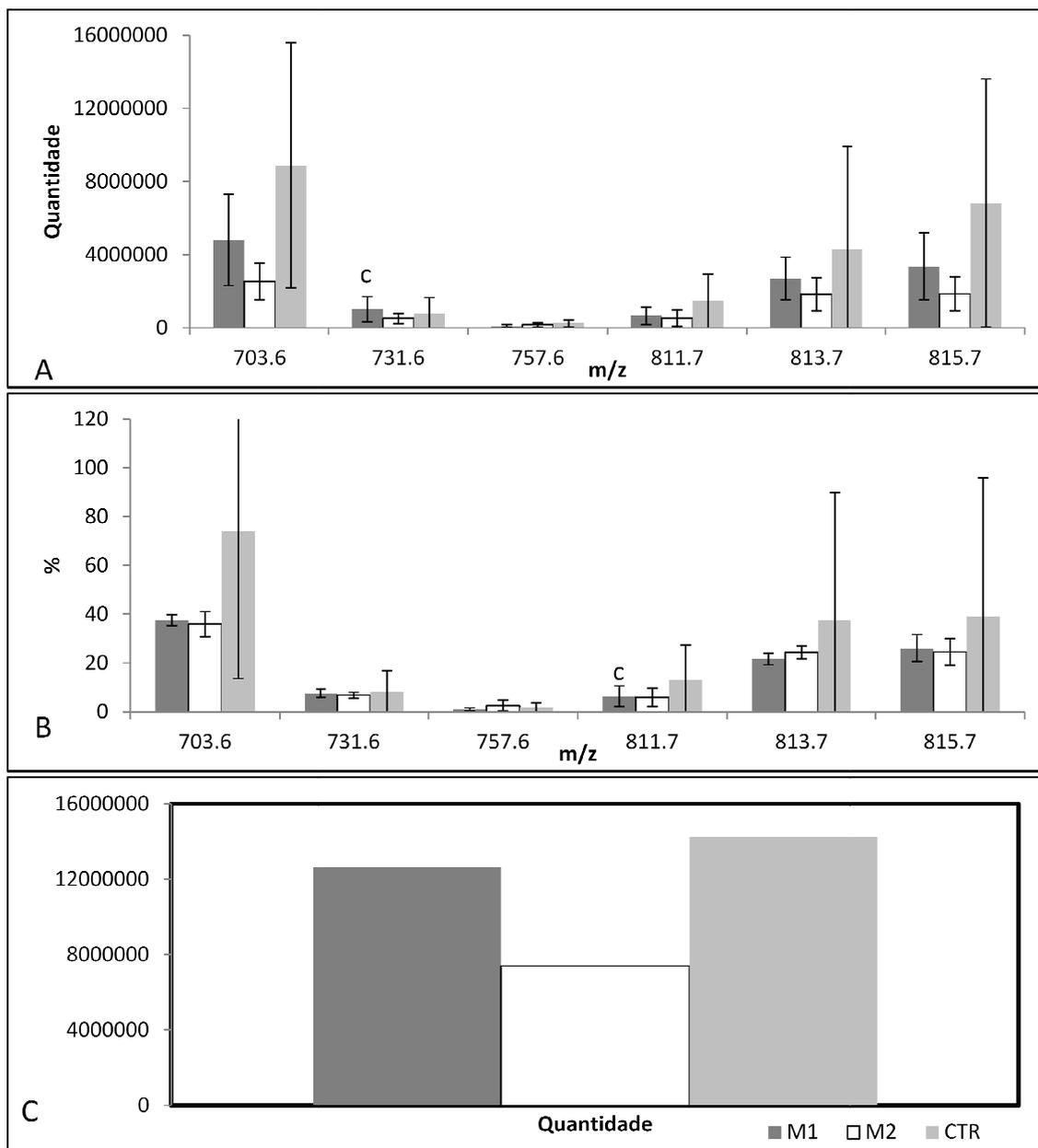


Figura 30. Quantificação da classe esfingomiéline. (A) Quantidade dos diferentes íões da classe esfingomiéline. (B) Abundância relativa dos diferentes íões; (C)- Quantidade total das esfingomiélines. M1-momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2).

9.2 Análise dos espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS no modo negativo

Como já foi referido, existem alguns fosfolípidos que ionizam preferencialmente com formação de íões negativos, nomeadamente formação de íões $[M-H]^-$. Estas classes são as PI e PE, sendo analisados em ESI-MS e ESI-MS/MS no modo negativo. Antes da análise dos espetros, procedeu-se à determinação das abundâncias relativas de cada classe na totalidade das classes

determinadas em modo negativo. Observou-se que as PEs e PIs são as classes mais abundantes. No caso das LPEs estas estão aumentadas em M1 e M2 comparando com o CTR. No entanto. Para as PEs estas apresentam menor abundância relativa em M1 e maior abundância relativa em CTR. As PI são mais abundantes em M1 comparando com M2 e CTR (figura 35).

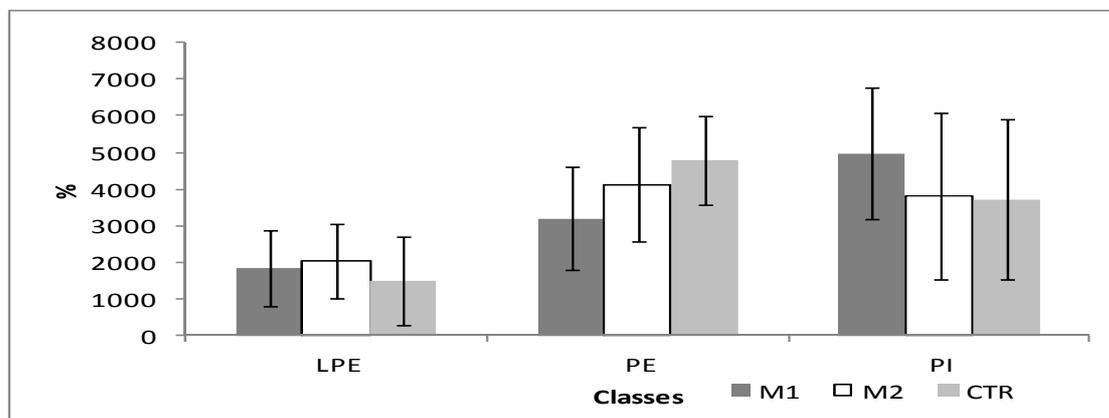


Figura 31. Quantidade relativa das LPE, PE e PI presentes no soro de indivíduos enfartados (M1 e M2) e indivíduos saudáveis (CTR)

Em seguida apresentamos e discutiremos, separadamente os espectros de cada uma destas classes separadas por HPLC, para o grupo de enfartados, nos diferentes momentos e para o grupo controle, de forma a observar possíveis alterações no perfil lipídico. Os resultados serão resumidos em tabelas com as espécies mais abundantes para as diferentes classes de fosfolípidos.

9.2.1 Fosfatidilinositois

Os fosfatidilinositois são caracterizados, para além de serem constituídos por ácidos gordos e grupo fosfato, característico dos fosfolípidos, contem um açúcar, o inositol, ligado ao grupo fosfato.

Na figura 36 apresentamos o perfil das PIs em M1, M2 e CTR. De uma forma geral, não se observou alterações significativas. No entanto para o íão m/z 861.6 verificou-se um aumento em M1 comparando com o M2 e CTR.

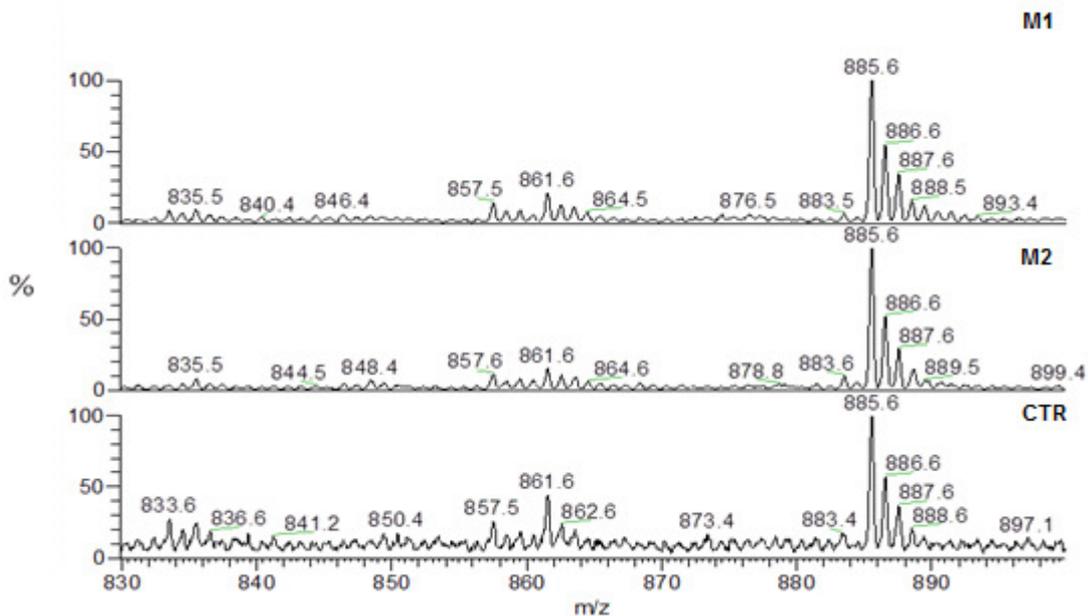


Figura 32. Espectros de LC-ESI-MS de fosfatidilinosítois no momento do enfarte (M1), após um mês deste ter ocorrido (M2) e grupo controle (CTR)

Apresentamos, na tabela 11, os valores de m/z e as fosfatidilinosítois correspondentes, bem como a composição em ácidos gordos [96].

Tabela 9- Fosfatidilinosítois mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controle.

[M-H]-	C:N	Espécies Moleculares
835.5	34:1	16:0/18:1
857.5	36:4	16:0/20:4
863.5	36:1	18:0/18:1
861.6	36:2	18:0/18:2
885.6	38:4	18:0/20:4
887.6	38:3	18:0/20:3

Na figura seguinte apresentamos a fragmentação característica da classe das PI, exemplificado pelo espectro de ESI-MS/MS do ião $[M-H]^-$ da PI 16:0/20:4, m/z 857.5 [21] [91].

A fragmentação das PI têm como pico característico o ião de m/z 241 correspondente ao grupo fosfato e do grupo da cabeça. Geralmente as PI têm perdas de m/z 162 (m/z 695.4), relacionadas com a perda do açúcar (Figura 36). Na figura 36 podemos ainda observar o ião m/z 553.3 e 601.4, que corresponde á perda do ácido gordo 20:4 e 16:0 (Figura 37).

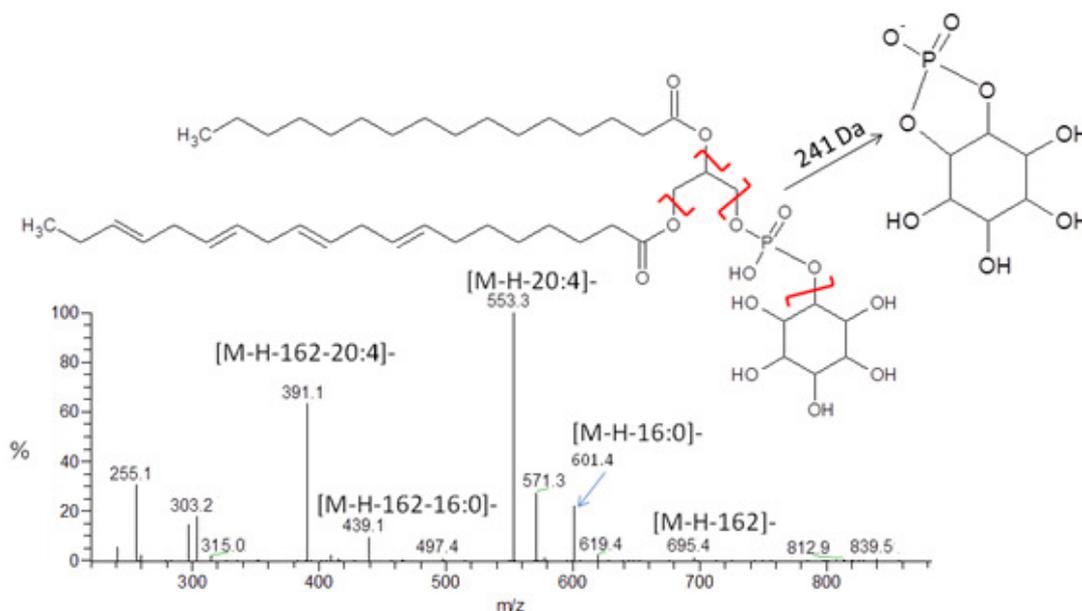


Figura 33. Estrutura da fosfatidilinositois m/z 857.5 (16:0/20:4), fragmentação e respetivo espectro característico de [M-H]- no modo negativo.

Para os diferentes iões das PI, verificou-se que estes apresentam uma maior quantidade para M1 comparando com M2 e CTR, com exceção para os iões m/z 857.5 e 887.6. No caso do ião m/z 857.5, a quantidade nos diferentes momentos e no CTR é muito semelhante entre si. Para o ião m/z 887.6 os valores da quantidade no grupo de enfiados são muito semelhantes, apresentando uma ligeira diminuição em M1 comparando com M2. Registou-se uma maior quantidade nos diferentes iões em M2 comparando com o CTR (figura 38A).

Os iões m/z 885.6 e 887.6 são os mais abundantes em ambos os grupos, apresentando os ácidos gordos 18:0, 20:3 e 20:4. Em M1, os iões m/z 835.5, 857.5, 863.5, 861.6 apresentam uma maior abundância relativa em relação a M2 sendo significativo para o ião m/z 863.5. No entanto, para o ião m/z 887.6, está aumentado em M2 comparando com M1 e CTR. Pelo contrário, o ião 857.5 está aumentado em CTR comparando com M1 e M2 (figura 38B). A nível da quantidade total das PI, verificou-se um aumento da quantidade em M1 comparando com M2 e CTR. Observou-se também um aumento da quantidade em M2 comparando com o CTR (figura 38C).

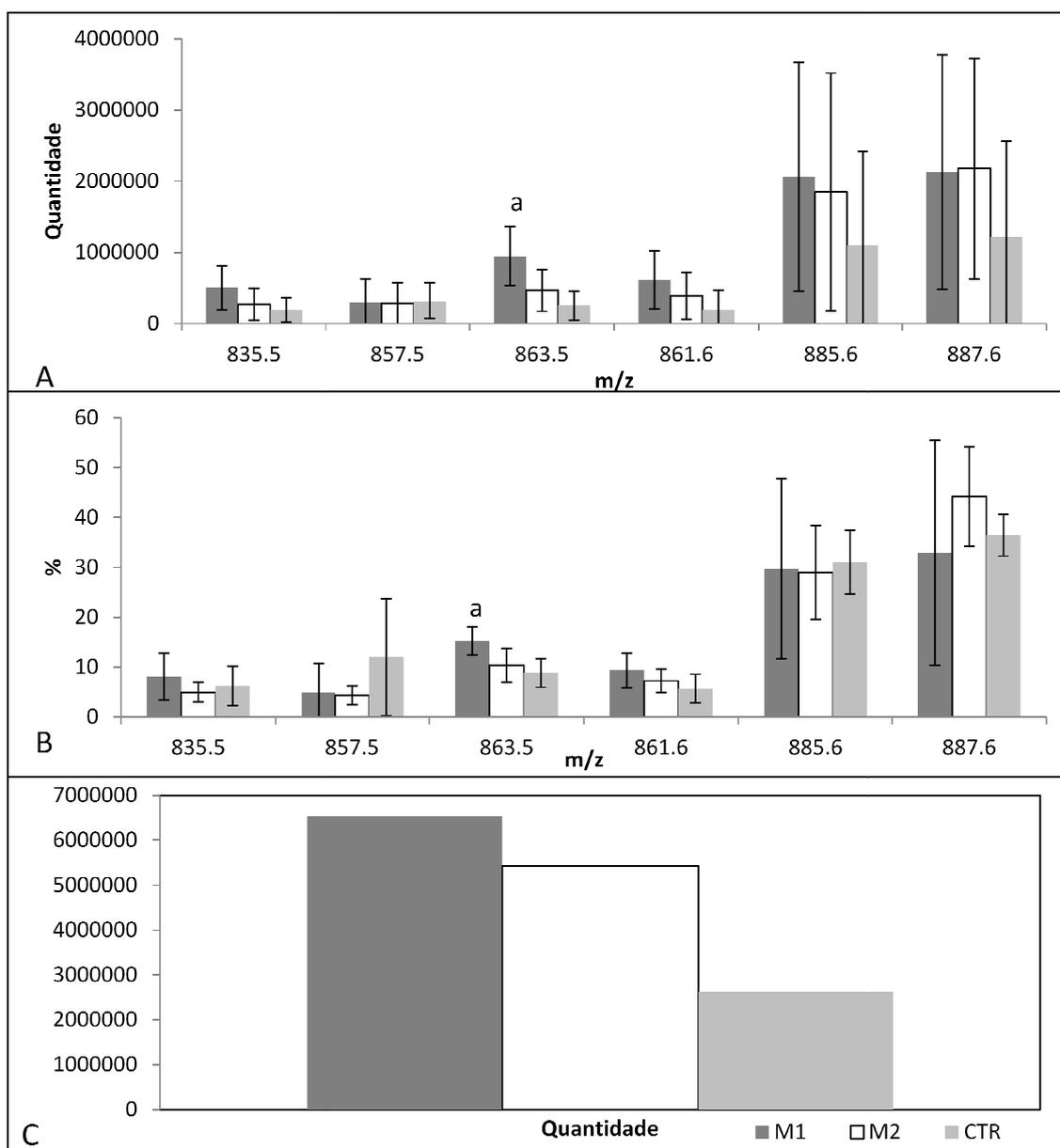


Figura 34. Quantificação da classe fosfatidilinositois. (A) Quantidade dos diferentes iões da classe fosfatidilinositois. (B) Abundância relativa dos diferentes iões; (C)- Quantidade total das fosfatidilinositois. M1- momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2).

9.2.2 Fosfatidiletanolaminas

O modo negativos foi utilizado para a identificação dos ácidos gordos, uma vez que permite encontrar os iões produto de cada ácido grando. Na tabela seguinte apresentamos os valores de m/z , o tipo de ião $[M+H]^+$ e $[M-H]^+$ e as etanolaminas correspondentes.

Tabela 10-Fosfatidiletanolaminas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controlo.

[M-H] ⁻	[M+H] ⁺	C:N
738.5	740.5	36:4
742.5	744.5	36:2
748.5	750.5	38:5p
752.5	754.5	38:3p
750.5	752.5	38:4p
762.5	764.5	38:6
790.5	792.5	40:6

Relativamente á quantidade de cada ião das PEs, registou-se que para o ião m/z 738.5 a quantidade é maior para M1 seguido do M2 e menor em CTR, sendo significativamente maior no grupo EAM comparando com CTR. Para os iões m/z 742.5, 752.5, 790.5 (sendo significativo para este) verificou-se uma diminuição em M1, comparando com M2 e CTR, sendo em M2 menor em relação ao CTR. Para os iões m/z 748.5, 750.5, 762.5, 766.5, 790.5, observa-se uma maior quantidade em M2 comparando com M1 e CTR, sendo maior em M1 relativamente ao CTR (figura 39A).

Relativamente à abundância relativa, verificou-se que o ião 738.5 é o mais abundante no grupo de enfartados. Para os iões m/z 742.5, 752.5 e 790.5, estes apresentam uma diminuição na abundância relativa no grupo de enfartados em comparação com o grupo controlo. Os restantes iões tem uma maior abundância relativa no grupo de enfartados em comparação com o CTR (figura 39B). Em relação quantidade total, verificou-se um aumento em M2 comparando com M1 e CTR. Verificou-se um pequeno aumento em M1 relativamente ao CTR (figura 39C).

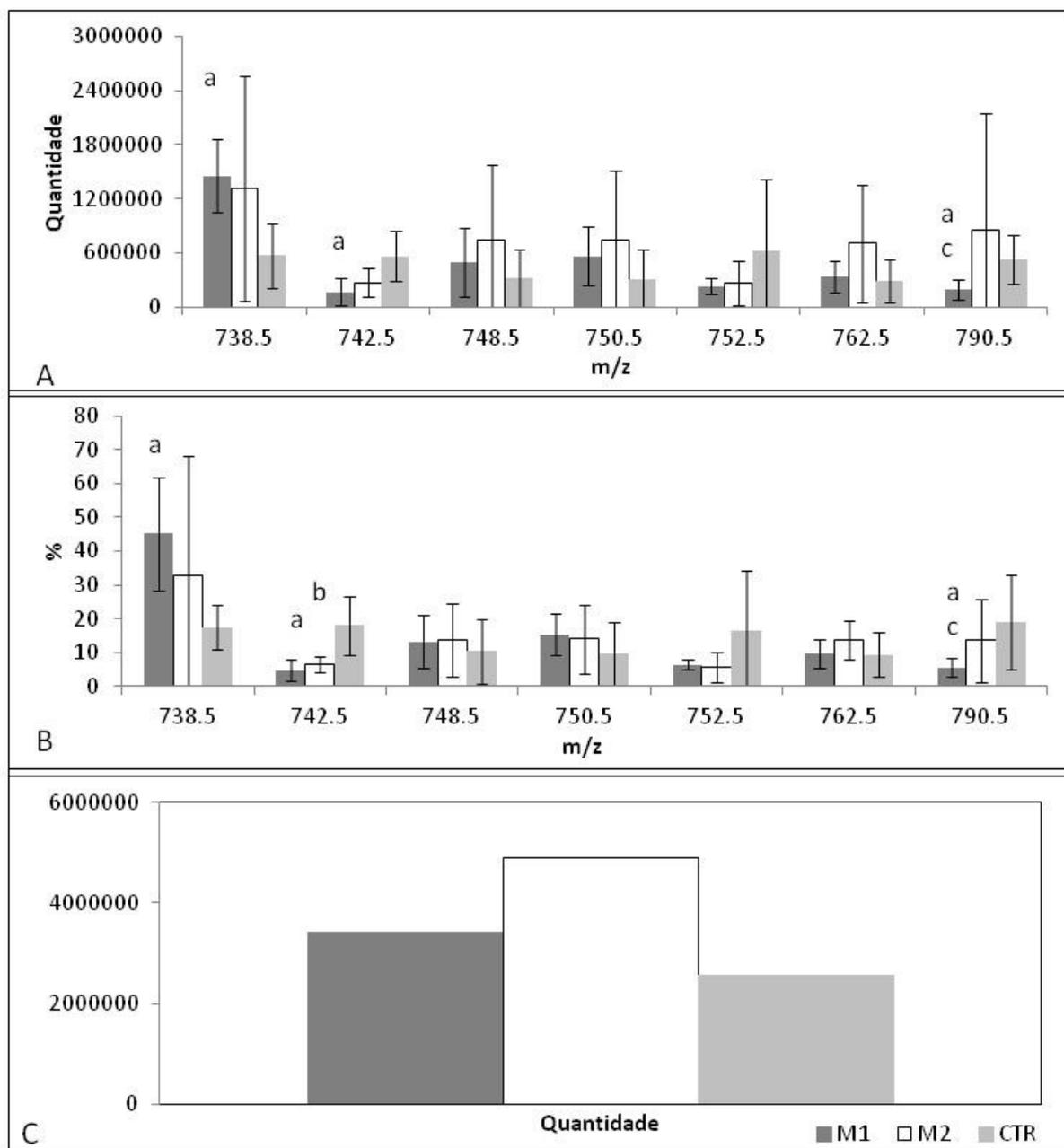


Figura 35. Quantificação da classe fosfatidiletanolamina. (A) Quantidade dos diferentes íões da classe fosfatidiletanolaminas. (B) Abundância relativa dos diferentes íões; (C)- Quantidade total das fosfatidiletanolaminas. M1-momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2).

9.2.3 Lisofosfatidiletanolaminas

Tal como as PEs, para as LPEs procedeu-se ao mesmo esquema de análise. Na tabela seguinte apresentamos os valores de m/z , o tipo de íão $[M+H]^+$ e $[M-H]^-$ e as etanolaminas correspondentes.

Tabela 11- Lisofosfatidiletanolaminas mais abundantes encontradas no momento do enfarte, após um mês do enfarte ter ocorrido, e grupo controlo.

[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	C:N
478.3	476.3	18:1
480.3	478.3	18:0
500.4	498.4	20:5
502.3	500.4	20:3
504.4	502.4	20:2
526.4	524.4	22:5

No caso das LPE, verificou-se uma maior quantidade em M1 comparando com M2 E CTR, exceto para o ião m/z 478.3. Verificou-se um aumento significativo para o ião m/z 476.3 em M1 em comparação com M2. Este ião tem uma maior quantidade em M2 comparando com M1 e CTR (figura 40A).

Os iões m/z 500.4 e 524.4 são predominantes em ambos os grupos, sendo constituídos pelos ácidos gordos 20:3 e 22:5. Na sua maioria, os iões apresentam uma maior abundância relativa em M1 em comparação com M2 e CTR, exceto para o ião m/z 498.4 (figura 40B). A quantidade total das LPE, observou-se uma maior quantidade em M1 comparando com CTR. No entanto quando comparamos M1 e M2, verificamos que em M2 apresenta uma maior quantidade (figura 40C).

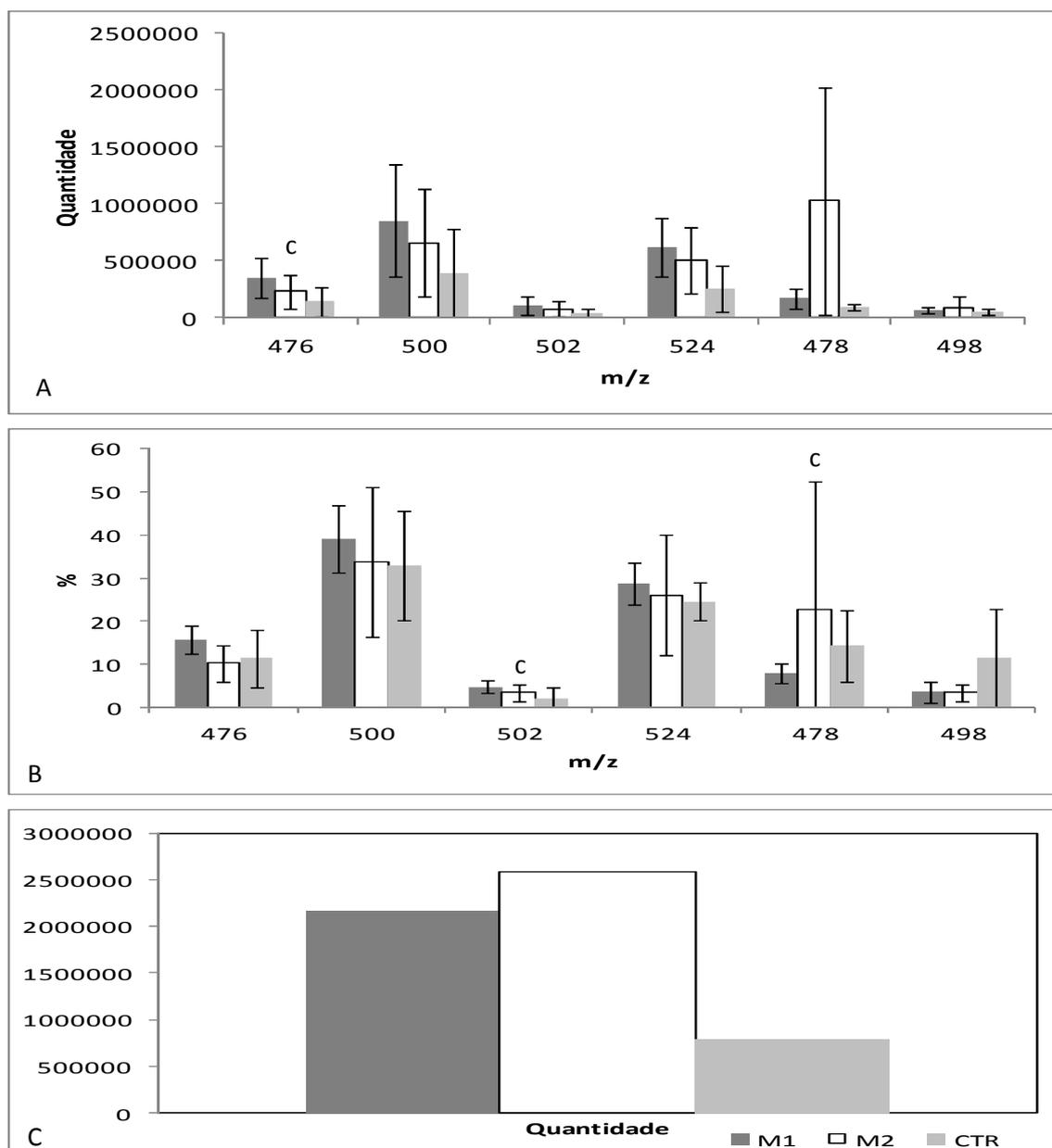


Figura 36. Quantificação da classe lisofosfatidiletanolaminas. (A) Quantidade dos diferentes íões da classe lisofosfatidiletanolaminas. (B) Abundância relativa dos diferentes íões; (C)- Quantidade total das lisofosfatidiletanolaminas. M1-momento do enfarte; M2- após um mês do enfarte ter ocorrido; CTR- grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2).

10 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA IMUNE

Este trabalho inicia-se pela análise da caracterização fenotípica, e caracterização funcional das populações de monócitos e células dendríticas num grupo de indivíduos que sofram enfarte agudo do miocárdio, no momento em que sofreu enfarte (M1), e após um mês deste episódio (M2) e grupo de pessoas saudáveis (CTR). A análise fenotípica baseia-se na expressão do CD36 e a análise funcional consiste na avaliação da produção e expressão das citocinas IL-6 e TNF- α , nas populações de células em estudo.

10.1 Frequência de monócitos e células dendríticas totais e suas subpopulações

Neste estudo avaliou-se a frequência de monócitos e DC, ou seja, determinou-se a porcentagem de cada população em estudo no total das células do sangue e determinou-se também a quantidade de cada população por μL . Avaliou-se também a quantidade de células brancas (WBC) no sangue periférico.

Na tabela 2, WBC é significativamente maior no M1 relativamente ao M2, sendo também mais elevado comparando com o CTR. A frequência e a quantidade de DC no sangue periférico foram significativamente inferiores nos indivíduos enfartados em ambos os momentos comparando com CTR, sendo significativamente inferior no M1 comparando com M2.

Para as subpopulações mDC não se verificou alterações na frequência de células comparando com M1 com o CTR, no entanto verificou-se uma diminuição significativa em M2 comparando com CTR. Relativamente à quantidade, observou-se uma diminuição significativa em M1 relativamente ao momento M2 e ao grupo CTR, registou-se também uma diminuição significativa no M2 comparando com CTR.

Quando se analisou a subpopulação de CDs $\text{CD14}^{-/\text{low}}\text{CD16}^+$, verificou-se uma diminuição da frequência em ambos os momentos, M1 e M2, comparando com o CTR. Comparando os dois momentos entre si do grupo de enfartados, observou-se uma diminuição significativa em M1. Relativamente à quantidade, registou-se uma diminuição significativa em M1 comparando com CTR. O mesmo aconteceu entre os momentos M1 comparando com M2.

No caso dos monócitos, a frequência e a quantidade foram significativamente inferiores no grupo M1 comparando com o CTR. Em relação ao momento M2, verificou-se uma ligeira diminuição da frequência e na quantidade comparando com CTR. Observou-se também, uma diminuição significativa da frequência e quantidade de monócitos em M1 comparando com M2.

Tabela 12 - A análise comparativa de células brancas, monócitos, DCs e subpopulações de DCs (percentagem; número de células / μL de sangue periférico) no M1, M2 e CTR.

	M1	M2	CTR
Cél. Brancas/ μL	13.26 \pm 0.99 ^a	6.91 \pm 0.47 ^c	6.52 \pm 0.47
% de DCs	0.28 \pm 0.06 ^a	0.77 \pm 0.06 ^c	1.17 \pm 0.09 ^b
DCs/ μL	22.20 \pm 4.73 ^a	115.20 \pm 12.13 ^c	187.40 \pm 18.14 ^b
% de mDCs	23.10 \pm 4.09	15.70 \pm 1.71	20.90 \pm 1.91 ^b
mDCs/ μL	4.60 \pm 1.17 ^a	17.70 \pm 2.30 ^c	37.10 \pm 3.30 ^b
% de DC CD14 ^{-/+} CD16 ⁺	62.40 \pm 5.23	75.70 \pm 2.10 ^c	58.70 \pm 4.20 ^b
DC CD14 ^{-/+} CD16 ⁺ / μL	14.60 \pm 3.80 ^a	87.50 \pm 9.42 ^c	111.60 \pm 16.23
% de Monócitos	3.60 \pm 0.38 ^a	5.50 \pm 0.5 ^c	5.85 \pm 0.64
Monócitos/ μL	282.70 \pm 33.67 ^a	837.40 \pm 106.51 ^c	954.10 \pm 144.55

As percentagens apresentadas para as subpopulações de DC foram obtidos no total DCs. Os resultados são expressos em média da percentagem \pm desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c - M1 versus M2).

10.2 Produção de citocinas por monócitos e subpopulações de células dendríticas

Um passo importante na análise por citometria é a correta identificação das populações em estudo. Os monócitos foram selecionados, tendo em consideração que expressam CD33 e HLA-DR na superfície da membrana celular e apresentarem um tamanho (dispersão frontal- FSC) e complexidade (dispersão lateral- SSC) entre os linfócitos e neutrófilos [97].

As DCs foram identificadas pela expressão combinada de CD33 e HLA-DR e na ausência de CD14, CD19, CD56 e CD3 com um tamanho (FSC) e complexidade (SSC) entre aqueles de linfócitos e monócitos (Figura. 1A, B, C). Com base na expressão de CD33 e HLA-DR, é possível identificar três subpopulações de DCs: as mDCs apresentam um fenótipo de CD123^{dim}/CD33⁺/CD16⁻ células, com forte expressão de HLA-DR; as DC CD14^{-/+}CD16⁺ são CD123^{inter}/CD33^{inter}/CD16⁺ com expressão intermédia de HLA-DR; a última subpopulação, as pDCs CD123⁺/CD33^{-dim}/CD16⁻ com expressão intermédia de HLA-DR (figura 10D, E, F, G) [97].

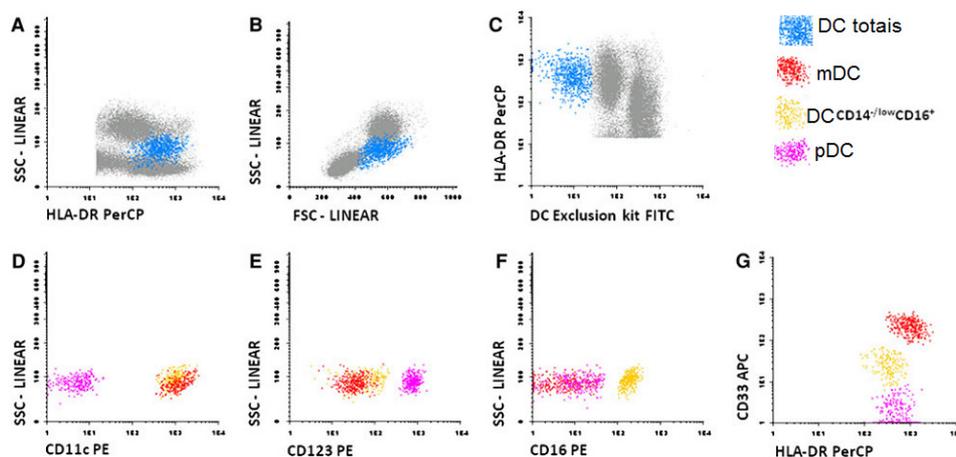


Figura 37. Identificação da população de células dendríticas bem como das subpopulações. (A)-(C) células dendríticas totais. (D)-(G) Identificação das subpopulações.

Após a identificação das diferentes populações de células determinou-se a frequência de produção das citocinas, ou seja, a percentagem de cada população de células a produzir as citocinas em estudo.

Assim, avaliou-se a produção de TNF- α e IL-6 pelos monócitos e subpopulações de DCs. A produção basal de TNF- α pelos monócitos do grupo de EAM (M1 /M2) é maior quando comparando com o CTR, sendo este aumento da frequência significativo. No entanto, verificou-se uma menor frequência da produção da IL-6 pelos monócitos nos indivíduos enfartados comparando com o CTR. Observou-se, também, uma menor frequência de monócitos a produzir TNF- α e IL-6, não sendo significativo (figura 11).

Por outro lado, verificou-se um ligeiro aumento da produção de TNF- α pelas mDCs em M1 quando comparando com o CTR. No caso da IL-6, ocorreu um aumento significativo da produção pelas mDCs em M1 comparando com o CTR. Registou-se uma diminuição significativa da produção das citocinas em estudo no momento M2 relativamente ao CTR e também ao M1 (figura 11).

Relativamente as DC $CD14^{-/low}CD16^{+}$, verificou-se um perfil muito semelhante com as mDCs. Assim, observou-se um aumento da produção de TNF- α e IL-6 em M1, sendo este aumento significativo para a IL-6 comparando com CTR. No momento M2, verificou-se uma diminuição da frequência de produção das citocinas em estudo em comparação com M1 e CTR, sendo significativo para a IL-6, comparando com CTR. Observou-se uma maior frequência de células a produzirem TNF- α e IL-6 no momento M1, no entanto baixaram no momento M2 (figura 11).

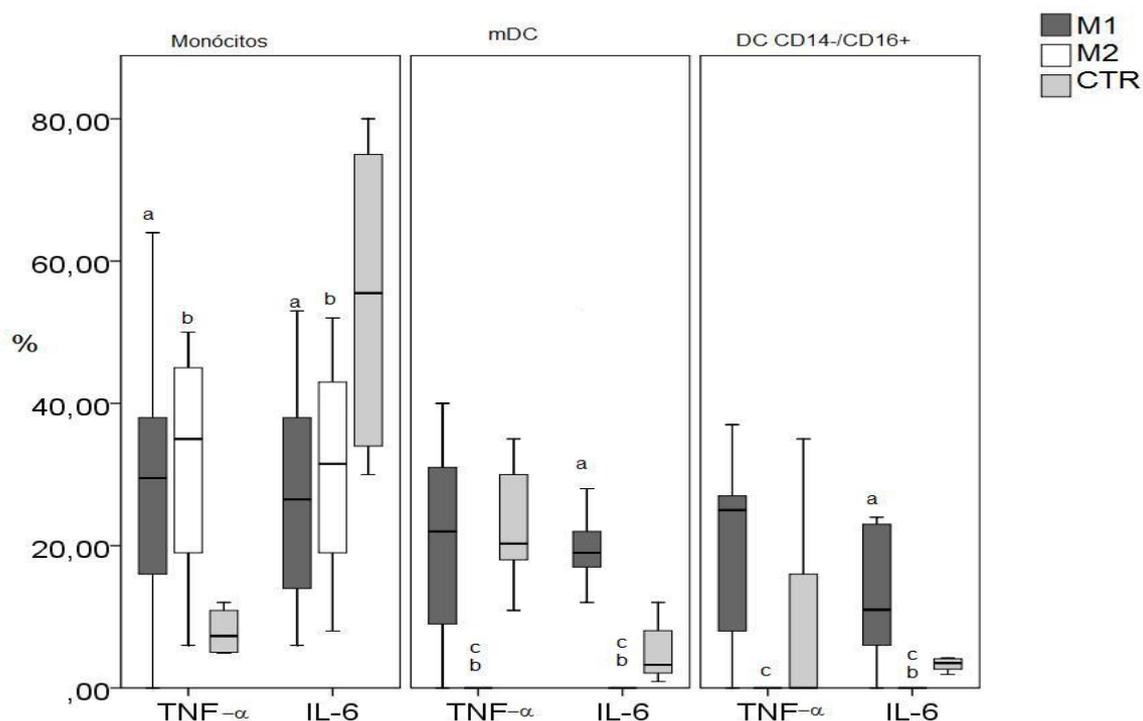


Figura 38. Frequência de monócitos e subpopulações de células detriticas que produzem TNF-α e IL-6 nos diferentes momentos e diferentes grupos. M1- momento em que sofreram enfarte agudo do miocárdio; M2- um mês após terem sofrido o enfarte; CTR- grupo controlo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c - M1 versus M2).

10.3 Quantidade da expressão de citocinas por monócitos e subpopulações de células dendríticas

Para além da frequência, determinou-se a quantidade de citocinas produzidas por cada população de células em estudo (MFI). Quando se analisou a quantidade de citocinas expressas pelas células, observou-se uma diminuição da expressão das citocinas nos monócitos no M1 comparando com CTR. Verificou-se uma diminuição da quantidade de expressão das citocinas em estudo, em especial da IL-6, no momento M2, quando comparado com o CTR (tabela 3).

Relativamente as mDCs, registou-se uma diminuição da quantidade de TNF-α expresso no M1 e M2 relativamente com o CTR. No caso da IL-6, verificou-se um aumento significativo da quantidade de expressão no M1 comparando com o CTR. Verificou-se também um aumento significativo da quantidade no momento do M1 comparando com M2 (tabela 3).

Na subpopulação de DC $CD14^{low}CD16^{+}$, observou-se um aumento da quantidade de expressão das citocinas, significativo para o TNF-α, no M1 relativamente ao CTR. Ocorreu uma diminuição significativa da quantidade de IL-6 em M2 comparando com CTR. O mesmo

aconteceu para o TNF- α , no entanto a diminuição da quantidade não é significativa. Verificou-se uma diminuição significativa da quantidade de citocinas expressas no M2 comparando com M1 (tabela 3).

Tabela 13. Quantidade de expressão de cada citocinas per célula nos diferentes grupos.

		M1	M2	CTR
		MFI	MFI	MFI
Monócito	TNF	72.40 \pm 18.91	55.70 \pm 6.94	194.20 \pm 66.40
	IL-6	38.20 \pm 3.38 ^a	40.30 \pm 4.18	54.17 \pm 5.47 ^b
mDC	TNF	31.80 \pm 8.74	2.90 \pm 2.9 ^c	109.11 \pm 70.61
	IL-6	25.56 \pm 3.03 ^a	.00 \pm 0 ^c	6.13 \pm 4.02
DC CD14/CD16 ⁺	TNF	105.30 \pm 36.38 ^a	3.00 \pm 3 ^c	91.44 \pm 75.37
	IL-6	23.67 \pm 3.62	.00 \pm 0 ^c	11.13 \pm 7.42 ^b

Os resultados são expressos em média da intensidade de fluorescência \pm desvio padrão. MFI- média de intensidade de fluorescência; M1- momento em que sofreram enfarte agudo do miocárdio; M2- Um mês após terem sofrido o enfarte; CTR- grupo controlo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ teste Mann-Whitney U- a -M1 versus CTR; b -M2 versus CTR; teste de Wilcoxon- c -M1 versus M2).

10.4 Avaliação da expressão e frequência de CD36

O CD36 é uma glicoproteína transmembranar expressa nos monócitos/macrófagos, células dendríticas, entre outras. O CD36 reconhece certas moléculas endógenas ou partículas, estas incluem células apoptóticas, os segmentos de fotorreceptores (exteriores) e LDL oxidadas (oxLDL).

Ao analisar a expressão de CD36 pelos monócitos, registou-se um aumento no grupo, EAM com significado estatístico em M1 comparando com o CTR (figura 12). Comparando os dois momentos do grupo EAM, observou-se uma ligeira diminuição da expressão de CD36 no momento M2 comparando com M1 (figura 12).

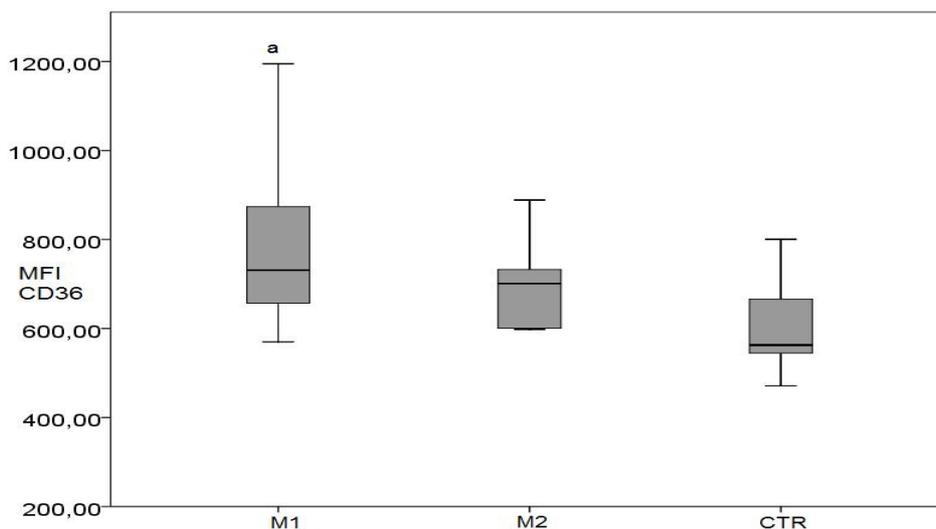


Figura 39. Quantidade de expressão de CD36 pelos monócitos nos diferentes grupos. Os resultados são expressos em média da intensidade de fluorescência. MFI- média de intensidade de fluorescência; Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney U); a -M1 versus CTR.

Não se observou diferenças significativas nos diferentes momentos e diferentes grupos na expressão de CD36 nas subpopulações de células dendríticas. No entanto, verificou-se uma ligeira diminuição na expressão de CD36 na subpopulação DC $CD14^{low}CD16^{+}$ no momento M2 comparando com M1 e CTR (figura 13).

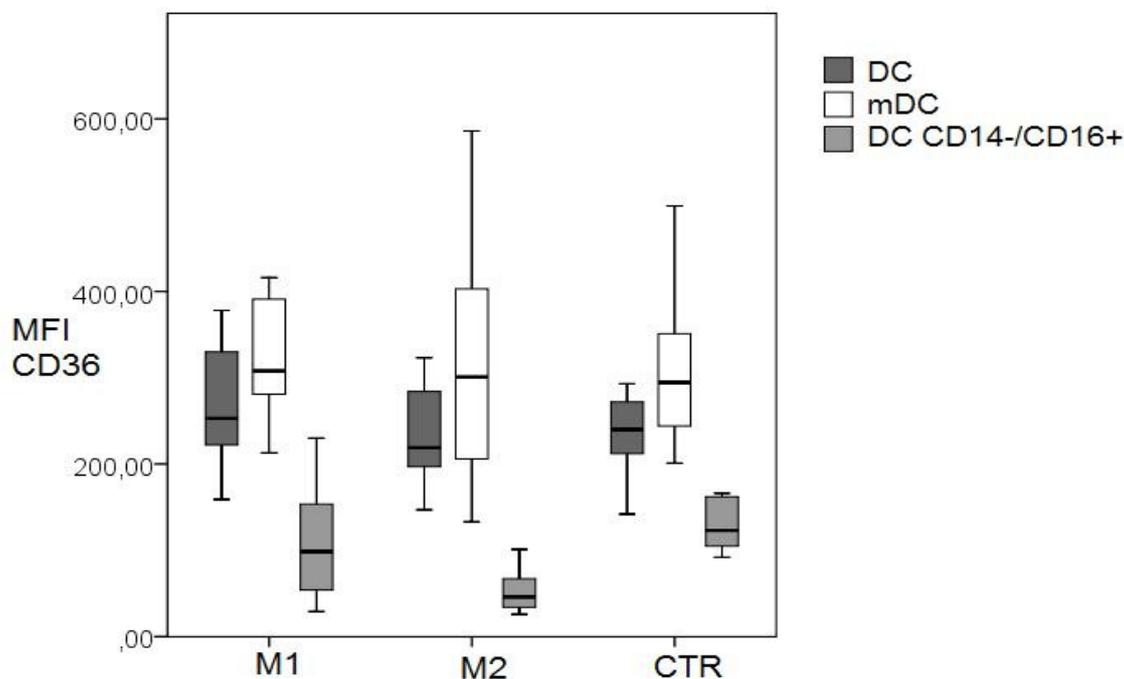


Figura 40. Quantidade de expressão de CD36 pelas subpopulações de DCs nos diferentes grupos. Os resultados são expressos em média da intensidade de fluorescência. MFI- média de intensidade de fluorescência; M1- momento em que sofreram enfarte agudo do miocárdio; M2- Um mês após terem sofrido o enfarte; CTR- grupo controle.

DISCUSSÃO

11 DISCUSSÃO

11.1 Avaliação de parâmetros bioquímicos

Os elevados níveis de LDL e baixos níveis de HDL, elevam os riscos cardiovasculares [77] [78], presumivelmente por predispor a uma maior concentração de LDL na parede do vaso sanguíneo. Baixos níveis de fosfolípidos (PL) e colesterol não-esterificados tornam as pequenas e densas partículas de LDL mais aterogênicas do que as partículas HDL, isto é, apresentam uma maior facilidade em penetrar as camadas internas da artéria. Isto vai de encontro aos resultados obtidos. Constatamos que os indivíduos que sofreram enfarte agudo do miocárdio apresentam níveis elevados de CT, LDL e TAG e baixos níveis de HDL.

Embora esteja bem estabelecido que os níveis de HDL correlacionam-se inversamente com a incidência de doenças cardiovasculares, tem sido cada vez mais enfatizado que os níveis de HDL não refletem necessariamente aspectos qualitativos e funcionais das lipoproteínas, importantes para suas ações antiaterogênicas.

O transporte reverso do colesterol é considerado a principal função anti-aterogênica das HDL. A perda de funções das HDL no transporte reverso do colesterol pode contribuir para a aterosclerose em estados inflamatórios crônicos. Na verdade, a inflamação pode prejudicar a função diretamente HDL no transporte reverso do colesterol. Estudos sugerem que a inflamação aguda altera a composição de HDL, com o aumento do catabolismo das partículas de HDL. Assim, ao analisarmos os nossos resultados, verificamos uma diminuição de HDL em M2 comparando com M1, supostamente relacionado com alterações nos hábitos alimentares ou resultado da inflamação causada pelo EAM (tabela 4).

A aterosclerose é iniciada pela interação das LDL com a parede da artéria. A fagocitose das LDL pelos macrófagos leva à formação das células espumosas, processo central na iniciação e progressão das placas ateroscleróticas [98]. A oxidação de LDL é outra modificação que pode contribuir para o efeito aterogênico da LDL [79], isto não esquecendo que a dieta rica em colesterol e triglicérides é muito importante para o aumento dos níveis de LDL na corrente sanguínea. Também a medicação pode ser considerada como fator justificativo da descida dos níveis de CT, LDL e TAG em EAM comparando com CTR. No entanto, no CTR verificamos que apresentam valores altos de CT, LDL e TAG. Neste caso, não nos é possível concluir se estes indivíduos apresentam algum índice de aterosclerose ou fazem algum controle alimentar/dieta (tabela 4).

A PCR é um biomarcador frequentemente avaliado, visto que é um membro da família das pentraxinas pertencentes à imunidade inata e um marcador de fase aguda. A síntese da PCR é essencialmente hepática, sob influência de citocinas, tais como a IL-6 e o TNF- α .

Nos nossos resultados verificou-se um aumento dos níveis séricos da PCR, podendo este aumento ser justificado pela necrose que ocorre no miocárdio (tabela 4). A necrose do tecido é um estímulo potente de fase aguda, que após enfarte agudo do miocárdio, gera uma grande produção de PCR, a magnitude do qual reflete a extensão da necrose no miocárdio. Além disso, o pico de PCR ocorre cerca de 48 horas após o início do infarto do miocárdio [99]. A PCR é importante na imunidade inata uma vez que quando está ligada a macromoléculas, vai ser reconhecida por C1q e ativa a via clássica do complemento [99]. A PCR liga-se com uma alta afinidade aos resíduos de fosfatidilcolina, ligando-se também a uma grande variedade de ligantes autólogos e extrínsecos. Os ligantes autólogos incluem lipoproteínas modificadas, células danificadas das membranas, células apoptóticas e uma série de diferentes fosfolípidos e compostos relacionados, Por sua vez, os ligantes extrínsecos incluem glicanos, fosfolípidos e outros constituintes de micro-organismos, como por exemplo, componentes capsulares de bactérias.

Sabemos, que os níveis de PCR estabilizam ao fim de três meses, podendo estar relacionado com o tempo necessário para a cicatrização das lesões coronárias [51], isto explica os nossos resultados obtidos. Verificamos que em M2 ocorreu uma diminuição da PCR em relação a M1, no entanto os valores de PCR em M2 são elevados em comparação com o CTR (tabela 4).

11.2 Stress oxidativo e peroxidação lipídica

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (ROS) podem desempenhar um papel importante na patogênese do enfarto do miocárdio. As ROS são capazes de reagir com lípidos insaturados e de iniciar as reações de peroxidação lipídica nas membranas celulares [69]. O aumento do stresse provoca o aumento na peroxidação lipídica, o que pode justificar os nossos resultados com o método de FOX (figura 15). Como sabemos, a peroxidação lipídica causa alterações na homeostase do organismo, uma vez que está envolvida no dano celular e tecidual, bem como em doenças neurológicas. As ROS podem desempenhar um papel importante na patogênese do enfarto do miocárdio [69].

A oxidação dos fosfolípidos pode originar numerosos produtos de oxidação, e é sabido que diferentes espécies oxidadas podem ter diferentes funções nos sistemas biológicos. Dentre estes produtos, os mais estudados são: isoprostanos, hidroperóxidos lipídicos, aldeídos,

fosfolípidos oxidados e produtos produzidos durante os processos bioquímicos de oxidação do colesterol [13]. O método de FOX apenas quantifica os hidroperóxidos lipídicos, apenas um produto resultante da oxidação lipídica.

Nos nossos resultados da quantificação da peroxidação lipídica, verificamos um aumento no grupo EAM, o que era esperado tendo em atenção o que acabou de ser descrito. Verificamos também que em M2 há um valor mais elevado da peroxidação lipídica do que em M1. Tendo em atenção um estudo realizado em que quantificavam um produto específico da peroxidação lipídica, o malondialdeído, verificam que ao final de 4 horas ocorria um aumento da concentração, mas que depois, até as 12 horas esta concentração diminuía. A partir das 12 horas voltava a aumentar a concentração atingindo um pico as 24 horas, mantendo-se depois, uma concentração constante [100]. Assim, a causa da diminuição da concentração em M1 comparando com M2 pode estar relacionada com o momento da colheita do sangue periférico, visto que não há um controlo desde os primeiros sintomas de EAM até ao momento de colheita das amostras.

A moléculas modificadas oxidativamente ativam padrões de reconhecimento de recetores do sistema imune inato, desencadeando respostas inflamatórias. Em apoio a esta hipótese, mostrou-se que deficiência de *Toll-like receptor* (TLR) 2 em ratinhos teve função de proteção em várias doenças inflamatórias não-infecciosas, incluindo a aterosclerose, lesão de reperfusão e diabetes [101]. Os ácidos gordos têm sido implicados como ligandos endógenos que ativam TLR4 e TLR2 uma vez que os fosfolípidos oxidados assemelham-se a ligandos bacterianos que induzem a sinalização dependente de TLR [101]. Outros recetores que têm sido implicados na mediação dos efeitos de fosfolípidos oxidados tais como o recetor de VEGF 2, S1P1, prostaglandina E2, e PAF [101].

11.3 Análise do extrato lipídico por ESI-MS e MS/MS

As mudanças de estilo de vida, sejam elas a nível de alterações de hábitos alimentares ou adoção de um estilo de vida sedentário, contribuem para o desenvolvimento de doenças crónicas. A obesidade, a diabetes mellitus e a hipertensão arterial são alguns dos exemplos mais comuns na esfera do conhecimento da sociedade. As consequências ou as causas para estas doenças crónicas estão muitas vezes relacionadas com alterações lipídicas, hipercoagulabilidade e risco mais elevado de doenças cardiovasculares.

Devido ao grande número de classes de lípidos possíveis de encontrar e à complexidade das diferentes espécies, a análise lipídica de amostras de soro é ainda alvo de grandes obstáculos [5]. Este trabalho centrou-se na identificação de alterações no perfil lipídico no soro de pacientes que sofreram enfarte agudo do miocárdio, comparando com os mesmos pacientes um mês após o episódio de enfarte agudo do miocárdio, e comparando também com um grupo de indivíduos saudáveis. Este estudo poderá contribuir para novas descobertas e um melhor conhecimento desta patologia e da sua evolução, contribuindo para uma melhor prevenção no desenvolvimento de doenças.

Não nos podemos esquecer que a biossíntese de lípidos/ fosfolípidos é uma rede de várias reações ligadas entre si. O ácido fosfatídico está na origem da síntese dos vários fosfolípidos por via de dois mecanismos diferentes. O primeiro envolve a hidrólise do grupo fosfato pela enzima ácido fosfatídico fosfatase, a partir do ácido fosfatídico para produzir diacilglicerol, sendo este último utilizado nas vias de biossíntese subsequentes para a PC e PE. O diacilglicerol também é o precursor para a forma principal de armazenagem de energia, o TAG. O segundo mecanismo, através do qual o ácido fosfatídico é usado para sintetizar os fosfolípidos, como as PI, utiliza o trifosfato de citidina (CTP) como fonte de energia e cria uma molécula de CDP-diacilglicerol. No geral, este mecanismo permite a substituição do grupo de fosfato do ácido fosfatídico por outros grupos fosfato funcionais para formar fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol ou cardioplipina (também conhecido como difosfatidilglicerol) (Figura 41).

Os glicerofosfolípidos (GPL) são absorvidos quase na sua totalidade (> 90%) no intestino. No lúmen, a maior parte deles são hidrolisados em *sn*-2 pela fosfolipase A2, sendo de seguida absorvidos pelos enterócitos (células do intestino delgado) como ácidos gordos livres e lisofosfolípidos. Ambos podem ser reesterificados, ou seja, convertidos em GPLs para entrar na corrente sanguínea e incorporarem-se nas lipoproteínas. No entanto, tem sido assumido que quase 20% dos fosfolípidos intestinais são absorvidos passivamente e sem hidrólise, preferencialmente incorporados diretamente em lipoproteínas de alta densidade (HDL) [102].

Os GPLs, quer de origem vegetal, quer de origem animal, contêm predominantemente um ácido gordo insaturado em *sn*-2, como seja o ácido oleico, o ácido linoleico, o ácido araquidónico (geralmente de origem animais) com ação pro-inflamatório ou o ácido eicosapentaenónico (geralmente de origem marinha) com ação anti-inflamatório. Em *sn*-1, encontra-se um ácido gordo saturado, tais como ácido esteárico ou ácido palmítico [102].

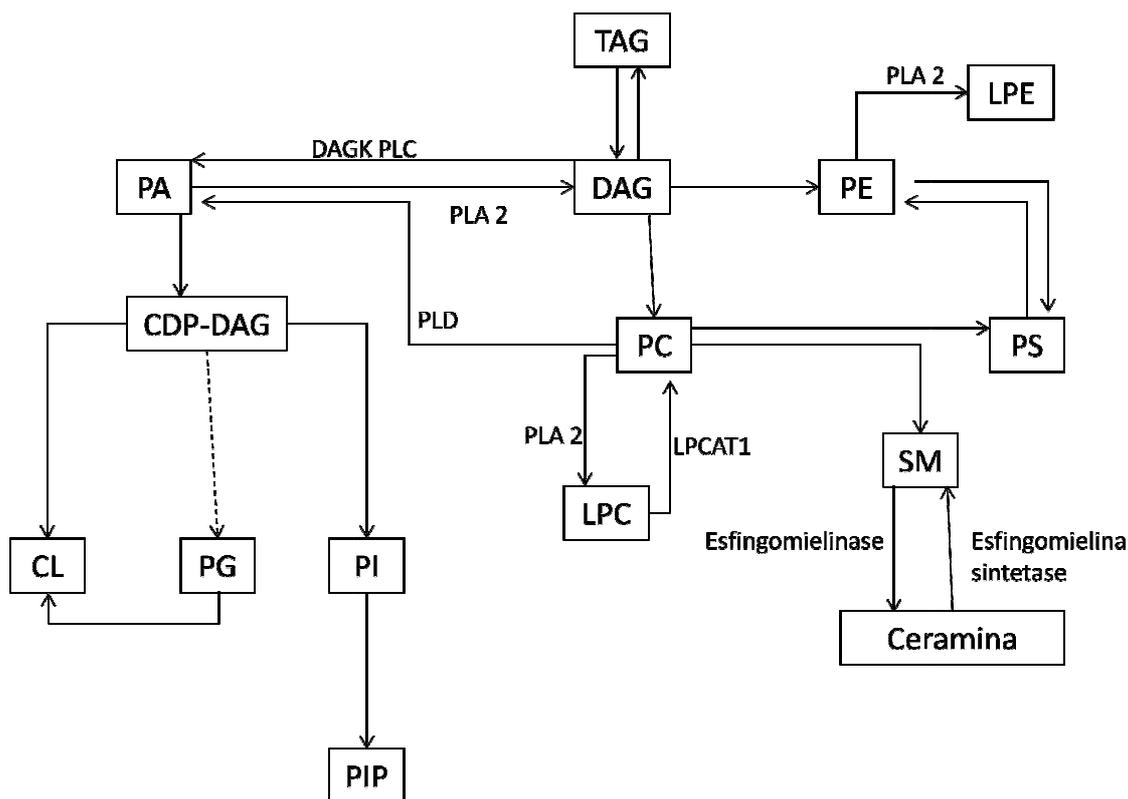


Figura 41. Vias da biossíntese dos fosfolípidos. Mecanismo de que envolve a hidrólise do grupo fosfato pela enzima ácido fosfatídico fosfatase (PAP) e o mecanismo utilizando o trifosfato de citidina (CTP). PA- ácido fosfatídico; TAG- triglicerídeos; DAG- diglicerídeos; PE- fosfatidiletanolamina; LPE- lisofosfatidiletanolamina; PC- fosfatidilcolina; LPC- lisofosfatidilcolina; PS- fosfatidilserina; SM- esfingomielina; PI- fosfatidilinositol; PIP- fosfoinosítidos fosforilados; LPCAT1- lecitina-colesterol aciltransferase.

Os glicerolipídios são os lípidos mais abundantes no plasma, sendo os TAG os mais abundantes. A concentração absoluta de TAGs é dependente da ingestão de alimentos, sendo a síntese e associação de TAG em lipoproteínas o maior mecanismo pelo qual estes lípidos são distribuídos para os tecidos no corpo. Sendo a dieta uma fonte de ácidos gordos que são a base dos TAG, justifica a maior quantidade de TAG determinada por MS e análise bioquímica em M1 e CTR comparando com M2 (tabela 4 e figura 21). Nos nossos resultados, registou-se uma diminuição da quantidade de TAG em M2 comparando com M1 que pode ser o resultado da alteração da dieta destes indivíduos, mas também pode ser resultado do processo inflamatório, uma vez que os TAG por ação da fosfolipase A2 são os precursores do ácido araquidónico (20:4) (tabela 4 e figura 21).

O ácido araquidónico é importante para a síntese de uma grande panóplia de mediadores lipídicos de grande importância na fisiologia e patologia humanas, tais como em processos inflamatórios. Geralmente denominados de eicosanóides de entre os quais se encontram: prostaglandinas, leucotrienos. O ácido araquidónico é um ácido gordo importante, especialmente no coração, uma vez que é o precursor dos eicosanóides, os quais são

moléculas extremamente importantes na inflamação. O aumento em eicosanóides está relacionado com o desenvolvimento de muitas doenças, incluindo as doenças cardiovasculares. Tendo atenção que a inflamação provoca alterações a nível da lipidómica, a diminuição de TAG em M2 comparando com M1 também pode ser devida a os TAG serem convertidos em DAG e serem convertidos em fosfolípidos como as PEs ou PCs. O TAG que apresentam 52 carbonos e sejam polinsaturados são os mais abundantes no plasma humano [5]. Neste trabalho, verificou-se que os TAG com 50 e 52 carbonos são os mais abundantes (tabela 5 e figura 21B).

A maioria esmagadora de glicerofosfolípidos no plasma humano são PCs, como se verifica no nosso estudo. Embora seja especialmente abundante nas HDL, influencia fortemente os níveis de todas as classes de lipoproteínas em circulação em, especialmente, das VLDL. Foi demonstrado que as HDL apresentam uma função de proteger do coração de lesões de isquemia e reperfusão. A proteção é dependente da quantidade de HDL. Um estudo utilizando HDL reconstituídos em que utilizaram os principais componentes, Apo-proteína A-I e fosfatidilcolina, demonstrou que as PCs apresentaram ação protetora no coração, podendo ser este o motivo de em M1 se verificar um aumento da quantidade das PCs em comparação com CTR (figura 18 e figura 25C). Para além disso, o aumento da quantidade das PCs em M1 também pode ser explicada pela diminuição das SM, uma vez que SM são um precursor das PCs (Figura 18).

Os lisofosfolípidos são originados pela ação das fosfolipases nos PL originando não só os lisofosfolípidos mas também ácidos gordos, que geralmente são o precursor do ácido araquidónico. Os lisofosfolípidos são lípidos biologicamente ativos que estão envolvidos numa variedade de processos importantes, incluindo proliferação celular, migração celular, angiogénese, e inflamação [103]. As lisofosfatidilcolina (LPC), que tem origem da ação da fosfolipase A2 sobre as PC, desempenha um papel funcional em várias doenças, incluindo a aterosclerose, diabetes, e cancro [103] e são um componente importante da oxidação das OxLDL.

A hidrólise na posição *sn*-2 dos ácido gordo de fosfatidilcolina, pela fosfolipase A2, resulta em ácidos gordos que pode ser metabolizado em vários eicosanóides pró-inflamatórios, bem como em LPC [104]. As principais espécie de LPC são 16:0, 18:2, 18:1 e 18:0 e as menores espécies de LPC 14:0, 15:0, 16:1, 17:0, 20:4, 20:3, 22:6 e 22:5. No nosso estudo verificou-se que a espécie LPC 16:0 é a mais abundante (figura 28B). Estudos demonstraram um aumento das espécies saturadas 16:0 e 18:0, pode ser um resultado de lecitina-colesterol aciltransferase

(LCAT) ou por ativação da fosfolipase A2, ambos os quais podem hidrolisar fosfatidilcolina na cadeia acil insaturada na posição sn-2 para gerar LPC saturado [103].

A LCAT é uma enzima presente na HDL que participa no transporte do colesterol dos tecidos extra-hepáticos para o fígado, o chamado transporte reverso do colesterol. Dessa forma, a ação da LCAT diminui a quantidade de colesterol no sangue e celular livre. Qualquer disfunção dessa enzima pode provocar riscos à saúde que são consequência dos altos índices de colesterol no organismo.

As LPC são produzidas a partir da hidrólise de fosfatidilcolina oxidada nas LDL pela fosfolipase A2, como já foi referido, e estes compostos são abundante em lesões ateroscleróticas bem como em várias doenças, incluindo lúpus eritematoso sistêmico, o cancro do ovário e sepsia [105], assim as LPCs poderam ser utilizadas como um marcador para a aterosclerose ou outras doenças inflamatórias [105], isso explica o aumento das LPC em M1 comparando com CTR (figura 28C).

As LPC formadas pela fosfolipase A2 promove efeitos inflamatórios, tais como a expressão de moléculas adesão pelas células endoteliais, fatores de crescimento, quimiotaxia e ativação de monócito /macrófagos [103]. O que leva à migração dos monócitos e DC e a uma diminuição da frequência destas células no sangue, como verificamos (tabela 2).

As LPC podem ter papéis opostos na inflamação aguda *versus* crônica [104]. As LPC podem promover a diferenciação de monócitos em células dendríticas maduras, um efeito associado a inibição completa da via PPAR- γ , podendo induzir também a quimiotaxia das células *natural killer T* (NKT) em repouso [104].

Foi demonstrado que o comprimento da cadeia acil de LPC é importante para o efeito estimulante, uma vez que nenhum efeito foi evidente quando a cadeia acil é inferior a 16 carbonos. A saturação é também um fator importante, uma vez que LPC 18:0 alegadamente tem um efeito muito mais poderoso do que 18:1 [106]. É sabido que a presença da LPC 16:1 no sangue está associada com a presença de diabetes [105]. As LPC são um dos marcadores promissores, uma vez que é um metabolito da ação da atividade da fosfolipase A2 por meio da hidrólise da fosfatidilcolinas [105].

Um outro glicerofosfolípido presente nas lipoproteínas é as PEs em particular nas LDL. No plasma humano, as PEs compõem cerca de 5% a 6% do total de fosfolípidos. Uma das diferenças mais proeminentes no perfil lipídico entre o grupo EAM e o grupo CTR é a concentração de PE ser mais elevada em indivíduos com EAM (figura 39). Esta alteração pode

estar relacionada com a resposta imune, uma vez que é sabido que as PEs têm a capacidade de modelar a resposta de monócitos e células dendríticas independente das PE estarem oxidadas [107], esta modelação pode passar pela produção de citocinas por estas células.

Os principais fosfolípidos de VLDLs no plasma são a PC, e SM. No entanto, quando a lipólise (processo pelo qual há a degradação de lipídios em ácidos gordos e glicerol) é bloqueada, os PL mais abundantes das VLDLs recém-formadas são PC e PE.

As PEs, por ação da fosfolipase A2 podem perder um ácido gordo e originar LPE, mas as PEs também podem originar fosfatidilserina, o que poderá explicar a diminuição da quantidade em M1 em comparação com M2. As LPE são encontradas nos tecidos em pequenas quantidades, por esse motivo, são poucos os trabalhos relativos a LPE, limitando assim as informações e conhecimento sobre este lisofosfolípido. É sabido que as fosfolipases A2 apresentam uma maior atividade em condições de stresse, assim, seria esperado obter uma maior quantidade de LPE no grupo EAM em relação a CTR, e foi isso que se verificou. As LPE são formadas por hidrólise de fosfatidiletanolamina pela enzima fosfolipase A2, como parte de um ciclo. O aumento verificado no grupo EAM em comparação com o CTR, pode estar relacionado com o facto de existirem mais quantidade de PE no EAM do que CTR (figura 35).

A fosfolipase A2 cataliza a hidrólise do ácido gordo na posição *sn*-2, libertando ácido araquidónico e iniciando a via metabólica da cascata do ácido araquidónico, importantíssimo no processo inflamatório. O ácido araquidónico é a base para a síntese de eicosanóides, os quais são moléculas extremamente importantes na inflamação, como já foi referido.

Os esfingolípídios desempenham um papel importante na proliferação, sobrevivência e morte celular. No total do conteúdo das SM, esta classe sofreu uma diminuição. A desregulação do metabolismo dos esfingolípídios leva à progressão de varias doenças tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamação crónica e cancro.

Os ácidos gordos das SM variaram em comprimento de cadeia 13-28 átomos de carbono, dos quais mais da metade estão saturados, cerca de 20% são monoinsaturada sendo a SM 24:1 a mais abundante, e existem pequenas quantidades de ácidos gordos com duas ligações duplas, cerca 3%, e com três, menos que 1% [5], como podemos observar nos nossos dados (tabela 10).

Neste trabalho encontrou-se essencialmente a esfingosina 1-fosfato d18: 1 (d indica a presença de dois grupos hidroxilo, seguido por o comprimento da cadeia e do número de

ligações duplas), no entanto, podem-se encontrar também as espécies d16: 1 a d19: 1 mas em menores quantidades [5].

Sabe-se que a esfingomiéline acumula-se nas placas ateroscleróticas e que a principal fonte são as lipoproteínas plasmáticas [98]. Os níveis de SM estão aumentados em indivíduos que têm hiperlipidemia, especialmente em indivíduos com aumento de colesterol [98], no entanto, no nosso trabalho verificamos o contrário. Verificamos que ocorre uma diminuição das SM no grupo EAM em comparação com o grupo CTR. Isto pode estar relacionado com o aumento das PC no grupo EAM, uma vez que SM são um precursor das PC.

Foi demonstrado que os níveis plasmáticos de SM são maiores em casos de doenças cardiovasculares que nos controles [98], no entanto, no nosso trabalho, isso não se verificou, mas esta diminuição pode estar relacionada com o facto das SM serem um precursor das PC (figura 18 e figura 34). Ao contrário do que acontece com outros fosfolípidos no plasma, como as PCs, as SM não são degradadas por enzimas plasmáticas como a lecitina, colesterol aciltransferase, ou por lípases [98].

A esfingomiéline em condições de stresse, podem originar ceramida e esfingosina como produtos ou esfingosina 1-fosfato. A esfingosina pode ser rapidamente fosforilada para esfingosina 1-fosfato pela esfingosinaquinase (SK). Os diferentes produtos resultantes da esfingomiéline podem apresentar diferentes funções, por exemplo as ceramidas e esfingosina geralmente inibem a proliferação e promover a apoptose, enquanto que a esfingosina 1-fosfato estimula o crescimento e inibe a apoptose [108]. Os resultados obtidos num estudo em ratos mostram que o enfarte do miocárdio produz profundas alterações no metabolismo dos esfingolípidos [108]. Está descrito que nas primeiras horas após enfarte ocorre uma diminuição de esfingosina 1-fosfato [108].

As PIs são muito importantes em eventos de sinalização. Estas moléculas podem ser fosforiladas formando as moléculas fosfoinositídeos fosforiladas (PIP), que variam nas suas funções de acordo com a posição da fosforilação no grupo da cabeça inositol. Estas moléculas são extremamente importantes uma vez que são responsáveis por desencadear uma cascata de sinalização, desempenhando um papel importante no metabolismo da célula e eventos apoptóticos. As PI são um grupo de fosfolípidos amplamente distribuídos na natureza e estão envolvidos em eventos de sinalização intracelular. O metabolismo do inositol está envolvido na tradução de sinal de algumas hormonas, neurotransmissores e fatores de crescimento. A classe das PI é o precursor de importantes moléculas de sinalização que modulam o crescimento da célula, a proliferação e morte celular.

Estudos com PI demonstraram um aumento destas em doenças cardiovasculares comparando com o grupo controlo, para algumas espécies, particularmente para 36:4, 38:4, e 40:4 [64]. A diminuição na abundância relativa pode sugerir que a cascata de sinalização, na qual as PI estão envolvidas, pode ser ativada e podem também formar mais moléculas de sinalização, desde que sejam precursores do PIPs, a qual tem um papel importante em doenças e modulação da morte celular.

Nos nossos resultados, verificamos um aumento da frequência das PI em M1 comparando com M2 e CTR (figura 34). A relevância destas observações pode residir no facto da PI, através da ação da fosfolipase A2, é a fonte primária de ácido araquidónico, o qual é necessário para a biossíntese de prostaglandinas e outros eicosanóides que estão envolvidos na ativação de monócitos e macrófagos e associada com a produção de metaloproteinases da matriz, uma característica da instabilidade da placa aterosclerótica [64].

11.4 Avaliação de parâmetros da resposta imune.

11.4.1 Frequência de monócitos e células dendríticas

O enfarte agudo do miocárdio está associado a uma resposta imune, por um lado, a uma resposta imune associada à patologia aterosclerose [74] e por outro lado a uma resposta inflamatória aguda que ocorre no momento do dano tecidual.

A aterosclerose tem início quando o endotélio expressa moléculas quimiotáticas e de adesão, que recrutam leucócitos. Em conjunto com as células endoteliais, promovem, por exemplo, a produção de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias que favorecem a formação da placa aterosclerótica, culminando com a rutura desta mesma placa, desencadeando-se assim o processo do EAM. A perceção do início deste processo, simplifica-se com a compreensão do conceito de aterosclerose. Trata-se pois de uma resposta inflamatória crónica da parede arterial. Como tal, é de esperar o aumento do número de monócitos, isto é, o desencadeamento da monocitose.

O objetivo da reação de fase aguda, da resposta inflamatória, tem como finalidade restaurar, assim que possível, a homeostase. Para tal torna-se necessário neutralizar o desafio subjacente. Este resultado é conseguido através do isolamento e destruição das moléculas prejudiciais e da ativação do processo de reparação. A reação de fase aguda inclui uma vasta gama de alterações locais e distantes do local da inflamação, estimulando alterações neuroendócrinas, hematopoiéticas, metabólicas e/ou hepáticas [109]. Para ser vantajosa, a

reação de fase aguda deve eliminar a causa da inflamação dentro de um curto período de tempo e numa área localizada, este é conseguida através de uma complexa série de eventos caracterizada pelo recrutamento local de leucócitos, em primeiro de neutrófilos, seguida pelos monócitos/macrófagos, ou seja, levando a um aumento da quantidade de leucócitos (WBC), como se reflete no nosso estudo (tabela 2).

O processo desenvolvido na resposta inflamatória é importante para a reabilitação e formação de cicatriz, podendo no entanto, levar a lesões do miocárdio. As lesões de reperfusão do enfarte agudo do miocárdio, ou seja, as alterações funcionais e estruturais que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo sanguíneo após um período de isquemia, exibem uma melhor resposta inflamatória e são associados a uma melhor reparação cardíaca e sobrevivência do paciente [110].

As células necróticas resultantes da lesão provocada no miocárdio desencadeiam uma série de consequências. De entre estas, destacam-se a formação de uma cascata inflamatória purificadora das células mortas e detritos de matriz, e a reparação/restauração dos tecidos danificados, incluindo-se aqui a formação da cicatriz na zona do enfarte. Torna-se imprescindível realçar que uma resposta inflamatória inadequada ou excessiva pode levar a uma desajustada reparação dos tecidos [111]. Deste modo, as células do sangue periférico exibem uma dinâmica importante na migração para o tecido do miocárdio, no controlo da inflamação e na recuperação deste mesmo tecido [111]. Isto explica que durante M1, as populações de monócitos e DCs estejam alterados em quantidade e frequência, quando comparados com o grupo de indivíduos saudáveis (CTR) (tabela 2). Os monócitos/macrófagos dominam o infiltrado celular no miocárdio lesionado que pode explicar a menor frequência no sangue periférico de monócitos [112]. Os monócitos, integrantes do sistema imune inato, são das primeiras células a responder durante a lesão. Acumulam-se rapidamente nos tecidos, de modo a eliminar os tecidos mortos ou lesionados [112]. Com isto, é-nos possível afirmar que os resultados por nós obtidos, estão de acordo com o que era esperado (tabela 2).

Neste estudo, as DCs do sangue periférico apresentam baixa frequência em pacientes que sofreram enfarte agudo do miocárdio (tabela 2). A primeira explicação poderá remeter-nos para o aumento do recrutamento das DCs para as placas ateroscleróticas, por via da ativação de células endoteliais ou devido a ativação por fatores pró-aterogénicas [113].

No que diz respeito particularmente ao subconjunto DC $CD14^{+/+}CD16^{+}$, verificou-se um aumento da frequência no M2 quando comparado com M1, o que indica que estas células são mobilizadas após o enfarte (tabela 2). Vários estudos têm demonstrado uma predominância

de monócitos nos primeiros 4 dias, ao invés da subpopulação de DC $CD14^{/low}CD16^+$ que prevalece a partir do quinto dia [112, 114]. No entanto, não nos podemos esquecer que muitos dos fatores de risco inerentes às doenças cardiovasculares, sejam eles os altos níveis de LDL, oxLDL, radicais livres, PCR ou nicotina, levam a alterações da maturação de DCs [113].

11.4.2 Produção de citocinas por monócitos e células dendríticas

Avaliou-se, por citometria de fluxo, a produção de TNF- α e IL-6 por monócitos e DCs. Esta técnica permite avaliar a produção destas citocinas, exclusivamente produzidas pelas populações de células em estudo, visto que as citocinas podem ter várias origens, nomeadamente no tecido adiposo [35]. Assim, é garantido que os resultados das citocinas são referentes aos monócitos e DCs.

A resposta inflamatória mediada por citocinas, como por exemplo o TNF- α e IL-6, desempenha um papel importante após M1. Os macrófagos produzem citocinas que estimulam a proliferação de fibroblastos, a produção de colagénio, e promovem a monocitose. Os macrófagos sintetizam, juntamente com os monócitos, uma grande variedade de fatores humorais. Incluímos aqui uma vez mais o TNF- α e a IL-6, importantes citocinas incentivadoras para a produção de PCR no fígado [115] [116].

Um dos aspetos da fase aguda que mais interesse desperta é a variação na concentração de proteínas plasmáticas, conhecidas como proteínas de fase aguda. Por proteína de fase aguda entende-se um aumento da concentração no plasma ou diminuição em pelo menos 25% durante os distúrbios inflamatórios [109]. As proteínas de fase aguda incluem IL-6, IL-1 β , TNF- α e interferon- γ . Estes são produzidos por uma grande variedade de células, sendo os macrófagos e monócitos nos locais de inflamação as fontes mais importantes [109], justificando deste modo os resultados obtidos no presente trabalho: maior frequência de produção das citocinas pelos monócitos e DC no grupo EAM comparado com CTR (figura 11).

Os macrófagos são fundamentais para o início da resposta inflamatória, particularmente da resposta imune inata, por meio da secreção de radicais livres, proteases, fatores de complemento e citocinas. Por outro lado, poderão iniciar a resposta imune adaptativa, por via da apresentação de antígenos às células T e pelo aumento da produção de citocinas. A inflamação não está presente apenas na formação do ateroma, contribuindo também de forma decisiva para desencadear as complicações trombóticas agudas [75], como observável nos nossos resultados.

Estudos tem confirmado a associação do TNF- α com a insuficiência cardíaca e com a isquemia e a reperfusão do miocárdio [40]. Numa amostra de 94 indivíduos portadores de doenças cardiovasculares, quando comparados com outra amostra composta por 20 indivíduos saudáveis, verificou-se uma associação positiva entre os níveis de TNF- α e a doença coronária [41]. Outro estudo demonstrou que após 9 meses da ocorrência do EAM, os pacientes com níveis elevados desta citocina, apresentaram um maior risco de recorrência de EAM [42].

O TNF- α interfere diretamente com as vias metabólicas de TAGs e colesterol. Deste modo, o TNF- α aumenta os níveis de TAG plasmático, ampliando a concentração de ácidos gordos (substrato para a síntese de TAG), pela diminuição da depuração de lipoproteínas ricas em VLDL [117]. Por outro lado, o TNF- α aumenta a produção de ácidos gordos a partir do tecido adiposo. No tecido adiposo, estudos *in vitro* têm vindo a demonstrar que o TNF- α estimula a lipólise. Este efeito é mediado principalmente através do recetor I do TNF e envolve a ativação de várias cinases. Vários são os caminhos através dos quais o TNF- α exerce os seus efeitos lipolíticos. Além das modificações que ocorrem no metabolismo do TAG, o TNF- α poderá também interferir nas vias metabólicas de colesterol [117].

Os mecanismos através dos quais o TNF- α tem efeito sobre o metabolismo do colesterol são complexos e acontecem em diferentes níveis, incluindo os hepatócitos e células periféricas, tais como as células endoteliais [117]. Nos primatas, o TNF- α é capaz de levar a uma diminuição das concentrações de HDL. Além disso, a composição de lipoproteínas pode ser alterada dependendo da ação do TNF [117].

Vários estudos têm vindo a demonstrar uma redução dramática na dimensão da área afetada pelo enfarte com a administração de anti-inflamatórios e a inibição da sinalização de citocina. A cascata inflamatória é uma rede complexa de múltiplos mecanismos sobrepostos, que regulam e controlam várias vias pró-inflamatórias. As propriedades das citocinas na rede incluem redundância, pleiotropia (um único gene controla diversas características do fenótipo que muitas vezes não estão relacionadas), a atividade sinérgica e os efeitos antagonistas sobre o outro [118] [111].

A IL-6 desempenha um papel importante na indução da fase aguda sendo também importante na transição entre a inflamação aguda e crónica [109]. A síntese de IL-6 é induzida por outras citocinas, incluindo IL-1 e TNF- α [109]. Durante respostas agudas, a IL-6 irá suprimir o nível de citocinas pro-inflamatórias, sem comprometer o nível de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, a IL-6 estimula a produção do recetor antagonista de IL-1 que é um mediador anti-

inflamatório, assim a IL-6, por conseguinte, podem ter um efeito protetor [109]. A IL-6 opera de modo a controlar a extensão da respostas inflamatórias no tecido. Nas doenças crónicas, tipicamente exemplificado por stresse, como infeções intracelular crónicas e tumores, a IL-6 não serve apenas como um indutor de reações de fase aguda, mas também é importante para provocar respostas imunitárias celulares às células [109]. A IL-6 induz não só as reações de fase aguda, mas também o desenvolvimento de respostas imunológica celular e humoral específica, incluindo a fase final da diferenciação das células B, a produção de imunoglobulina e a ativação das células T [109]. Para além de tudo isto, estudos tem demonstrado que a IL-6 está relacionada com as vias metabólicas dos TAG, níveis elevados de TAG, levam a um aumento da expressão de IL-6 [119], por esse motivo, no nosso trabalho, verificamos um aumento de IL-6 no grupo CTR e este grupo também apresenta níveis elevados de TAG.

A IL-6 ao induzir a resposta de fase aguda constitui uma ponte de ligação entre a inflamação e a doença cardiovascular. Foi demonstrado que indivíduos com síndromes coronários agudos e valores séricos elevados de IL-6, apresentaram um maior risco de complicações coronárias nas primeiras 48 horas [43].

Assim, os resultados obtidos referentes à produção das citocinas TNF- α e IL-6 pelos monócitos e DCs estão de acordo com as alterações esperadas (figura 11)

Relativamente á expressão (MFI) das citocinas em estudo (tabela 3), verificou-se uma diminuição da expressão por monócitos e DC no M1 comparando com CTR. Trabalhos realizados em que avaliaram a capacidade de monócitos, mDC, e CD14^{-/low}CD16⁺ DCs de produzir TNF- α e IL-6, *in vitro*, pela expressão de mRNA dos genes destas citocinas, verificaram níveis significativamente mais baixos da expressão destas citocinas no EAM. A baixa expressão dessas citocinas pelos monócitos e as subpopulações de DC pode ser, em parte, uma consequência do impacto da rede anti-inflamatória e reguladora [111].

Não nos podemos esquecer que diferentes compostos, fosfolípidos induzem diferentes efeitos em diferentes células e daí os resultados dos perfis de produção de citocinas entre monócitos e DCs ser diferentes.

Como já foi referido para a avaliação da peroxidação lipídica, o momento da colheita do sangue periférico, pode não ter sido o mais oportuno, visto que observamos que no momento M2 há um aumento da produção de citocinas pelos monócitos em relação a M1, que pode estar muito relacionado com o “ciclo” da peroxidação lipídica.

11.4.3 Avaliação da expressão de CD36

Ao longo das últimas três décadas, os estudos debruçados sobre o CD36 têm valorizado profundamente as suas multifuncionalidades. Expresso numa ampla variedade de células (células endoteliais, monócitos, macrófagos e células dendríticas) e tecidos [120], este recetor reconhece LDL modificadas como oxidadas, sendo também um transportador de ácidos gordos dos adipócitos. Além disto, desempenha também um papel importante na absorção de células apoptóticas e no reconhecimento de ligantes que desencadeiam uma resposta imune inata, incluindo componentes das paredes celulares das bactérias *gram* positivas [120], onde destruídos através da fagocitose, estes componentes levam à ativação das células.

À exceção de ácidos gordos de cadeia longa, em que poderá haver facilidade na sua transferência através da membrana lipídica, o CD36 aparenta ser um recetor de endocitose para a maioria dos ligantes. No entanto, este processo constitui ainda objeto de reduzido consenso [120].

Nos últimos 5 anos, o CD36 tem vindo a destacar-se em várias áreas: doenças cardiovasculares, biologia do cancro, doença de Alzheimer, acidente vascular cerebral, angiogénese, diabetes, biologia de plaqueta e no metabolismo [120]. Na aterosclerose, o CD36 assume particular relevância, nomeadamente a nível do desenvolvimento da patologia, uma vez que desempenha um importante papel na absorção de lipoproteínas, resultando na formação das células espumosas, iniciando a formação das placas ateroscleróticas [120].

Há evidências crescentes de que o aumento da produção de radicais livres e proteção antioxidante comprometida é relevante para a ativação de placa aterosclerótica [69]. Os monócitos são recrutados através do endotélio pela produção de citocinas ou fatores de crescimento, ativando e diferenciando-se em macrófagos. Este passo é crítico para o desenvolvimento de aterosclerose. A captação de LDL modificada, por exemplo OxLDL, parece contribuir para a acumulação intracelular de lípidos e de transformação dos macrófagos em células espumosas [106]. Os lípidos oxidados ou modificados são endocitados por recetores *scavenger*, como é o caso do CD36, presentes na superfície dos macrófagos, tornando-se em células espumosas. A lesão que se forma é conhecida como estria gordurosa, precursora do ateroma. O mesmo acontece com algumas células do músculo liso que penetram na íntima e que também se transformam em células espumosas [67, 121].

Uma função do par receptor-ligando (CD36-oxLDL) com relevância para a biologia e a patologia de doenças cardiovascular é a inibição da angiogénese, ou seja, formação de novos vasos

sanguíneos. Assim, a angiogénese é a resposta do organismo à isquemia e à lesão vascular, ocorrida devido ao EAM. Foi demonstrado que a oxLDL, que podem ser encontradas em pacientes com a diabetes, aterosclerose e a síndrome metabólica, podem inibir a proliferação celular e a angiogénese, uma vez que regulam a expressão do CD36 via PPAR- γ que pode inibir a angiogénese [120].

A ligação e captação de LDL modificadas pelos monócitos/macrófagos podem ter como objetivo uma resposta homeostática, protegendo o organismo da patologia associada a estas lipoproteínas [120]. No entanto, na sociedade ocidental, esta função é aparentemente inadequada para uma dieta rica em lípidos pesados, resultando deste modo em aterosclerose [120].

O aumento da expressão do CD36 em monócitos/macrófagos resulta não apenas do reconhecimento de OxLDL, mas também como resposta a moléculas de adesão, recetores hormonais e citocinas. Por exemplo, a expressão do CD36 é aumentada em resposta à citocina IL-4, por um oxLDL [120], o que explica os resultados obtidos para os monócitos e DCs, em que estas apresentam uma maior expressão de CD36 em EAM em comparação com o CTR (figura 12 e figura 13).

CONCLUSÃO

12 CONCLUSÃO

A espectrometria de massa com ionização por *electrospray*, demonstrou ser um método de análise muito valioso para a análise do perfil lipídico de indivíduos que sofreram enfarte agudo do miocárdio. Os resultados obtidos permitiram identificar diferenças no perfil lipídico a nível da quantidade das diferentes classes, bem como das diferentes espécies de cada classe, registando-se alterações a nível da quantidade relativa de cada classe no seu total de classes lipídicas. Observou-se um aumento da quantidade relativa de TAG, PC, LPE e PI e uma diminuição de SM, PE e LPC nos enfartados em comparação com o CTR.

Por citometria foi possível determinar que no momento do enfarte ocorre um aumento da expressão do CD36 e da produção de TNF- α comparando com o CTR. Este aumento da produção de citocinas pode estar relacionado com a formação de PL oxidados, que são considerados como agentes pró-inflamatórios.

Os nossos dados contribuíram também para uma monitorização do enfarte agudo do miocárdio, bem como um melhor conhecimento desta patologia, uma vez que os nossos dados demonstram que a EAM induz uma mudança significativa na homeostasia do sistema imune e no perfil de lípidos.

Um melhor conhecimento das patologias contribui para uma resposta terapêutica mais rápida e mais eficiente, contribuindo para o bem-estar dos pacientes.

BIBLIOGRAFIA

13 BIBLIOGRAFIA

1. Zehethofer N, P.D., *Recent developments in tandem mass spectrometry for lipidomic analysis*. Anal Chim Acta, 2008. **627**(1): p. 62-70.
2. Hu, C., et al., *Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(26): p. 2836-46.
3. Wenk, M.R., *Lipidomics: new tools and applications*. Cell, 2010. **143**(6): p. 888-95.
4. Ferreira, M., *LPL gene in Portuguese patients with hypertriglyceridemia*. 2008, Universidade de Aveiro: Aveiro. p. 102.
5. Quehenberger, O., et al., *Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma*. J Lipid Res, 2010. **51**(11): p. 3299-305.
6. Gotto, A.M., Pownall H. J., *Manual of lipid disorders: reducing the risk for coronary heart disease*. 3:21-39, ed. W. Wilkins. 2002.
7. Hein, E.M., et al., *Glycerophospholipid profiling by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry using exact mass measurements and multi-stage mass spectrometric fragmentation experiments in parallel*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2009. **23**(11): p. 1636-46.
8. DeLong, C.J., et al., *Molecular species composition of rat liver phospholipids by ESI-MS/MS: the effect of chromatography*. J Lipid Res, 2001. **42**(12): p. 1959-68.
9. Yin, H., et al., *Identification of intact oxidation products of glycerophospholipids in vitro and in vivo using negative ion electrospray iontrap mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2009. **44**(5): p. 672-80.
10. Reis A, P.P., Evtuguin DV, Neto CP, Domingues P, Ferrer-Correia AJ, Domingues MR., *Electrospray tandem mass spectrometry of underivatized acetylated xylo-oligosaccharides*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. **19**(23): p. 3589-99.
11. Scandalios, J., *Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses*. Braz Journal Medicine Biology Research, 2005. **38**(7): p. 995-1014.
12. Tsimikas, S., *Percutaneous Coronary intervention results in acute increases in oxidized phospholipids and lipoprotein(a)*. Circulation, 2004. **109**(25): p. 3164-70.
13. Chang, Y., H., D.S. Abdalla, and A. Sevanian, *Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein*. Free Radic Biol Med, 1997. **23**(2): p. 202-14.
14. Moriel, P.O., FS. Abdalla, DS., *Oxidized lipoproteins in blood plasma: possible marker of atherosclerosis progression*. IUBMB Life, 1999. **48**(4): p. 413-7.
15. Bochkov, V.N., *Inflammatory profile of oxidized phospholipids*. Thromb Haemost, 2007. **97**(3): p. 348-54.
16. Leitinger, N., *The role of phospholipid oxidation products in inflammatory and autoimmune diseases: evidence from animal models and in humans*. Subcell Biochem, 2008. **49**: p. 325-50.
17. Domingues, M.R., A. Reis, and P. Domingues, *Mass spectrometry analysis of oxidized phospholipids*. Chem Phys Lipids, 2008. **156**(1-2): p. 1-12.
18. Domingues, M.R., et al., *Identification of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-phosphatidylethanolamine modifications under oxidative stress conditions by LC-MS/MS*. Biomed Chromatogr, 2009. **23**(6): p. 588-601.
19. Pulfer, M. and R.C. Murphy, *Electrospray mass spectrometry of phospholipids*. Mass Spectrom Rev, 2003. **22**(5): p. 332-64.
20. March, R.E. and C.J. Stadey, *A tandem mass spectrometric study of saccharides at high mass resolution*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. **19**(6): p. 805-12.

21. Hsu, F.F. and J. Turk, *Characterization of phosphatidylethanolamine as a lithiated adduct by triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray ionization*. J Mass Spectrom, 2000. **35**(5): p. 595-606.
22. Imhof, B.A. and M. Aurrand-Lions, *Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 432-44.
23. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
24. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Phagocytosis of microbes: complexity in action*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 825-52.
25. Wilson de Melo Cruvinel, D.M.J., Júlio Antônio Pereira Araújo, Tânia Tiekao Takao Catelan, and N.P.d.S. Alexandre Wagner Silva de Souza, Luís Eduardo Coelho Andrade, *Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória*. Revista Brasileira Reumatologia, 2010. **50**(4): p. 434-61.
26. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2569-75.
27. Banchereau J, B.F., Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**(767): p. 8-11.
28. Silverstein, R.L. and M. Febbraio, *CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior*. Sci Signal, 2009. **2**(72): p. re3.
29. Miller, I.Y., et al., *Toll-Like Receptor 4–Dependent and –Independent Cytokine Secretion Induced by Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein in Macrophages*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005. **25**: p. 1213-1219
30. Lee, R.T. and P. Libby, *The Unstable Atheroma*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1999. **19**: p. 1859-1867.
31. Feghali, C.A. and T.M. Wright, *Cytokines in acute and chronic inflammation*. Front Biosci, 1997. **2**: p. d12-26.
32. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
33. Ridker, P.M., et al., *C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women*. N Engl J Med, 2000. **342**(12): p. 836-43.
34. Ballam, L.D., et al., *Western blotting is useful in the salivary diagnosis of Helicobacter pylori infection*. J Clin Pathol, 2000. **53**(4): p. 314-7.
35. Pickup, J.C. and M.A. Crook, *Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?* Diabetologia, 1998. **41**(10): p. 1241-8.
36. Pradhan, A.D., et al., *C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus*. JAMA, 2001. **286**(3): p. 327-34.
37. Mann, D.L., *Tumor necrosis factor and viral myocarditis: the fine line between innate and inappropriate immune responses in the heart*. Circulation, 2001. **103**(5): p. 626-9.
38. Bazzoni, F. and B. Beutler, *The tumor necrosis factor ligand and receptor families*. N Engl J Med, 1996. **334**(26): p. 1717-25.
39. Strasser, A., L. O'Connor, and V.M. Dixit, *Apoptosis signaling*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 217-45.
40. Levine, B., et al., *Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure*. N Engl J Med, 1990. **323**(4): p. 236-41.
41. Mizia-Stec, K., et al., *Hyperlipidaemias and serum cytokines in patients with coronary artery disease*. Acta Cardiol, 2003. **58**(1): p. 9-15.
42. Ridker, P.M., et al., *Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction*. Circulation, 2000. **101**(18): p. 2149-53.

43. Biasucci, L.M., et al., *Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events*. *Circulation*, 1999. **99**(16): p. 2079-84.
44. Meier-Ewert, H.K., et al., *Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects*. *Clin Chem*, 2001. **47**(3): p. 426-30.
45. Rifai, N., R.P. Tracy, and P.M. Ridker, *Clinical efficacy of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay*. *Clin Chem*, 1999. **45**(12): p. 2136-41.
46. Macy, E.M., T.E. Hayes, and R.P. Tracy, *Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications*. *Clin Chem*, 1997. **43**(1): p. 52-8.
47. Devaraj, S., P.R. Kumaresan, and I. Jialal, *Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **36**(3): p. 405-10.
48. Pasceri, V., et al., *Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs*. *Circulation*, 2001. **103**(21): p. 2531-4.
49. Biasucci, L.M., et al., *Clinical use of C-reactive protein for the prognostic stratification of patients with ischemic heart disease*. *Ital Heart J*, 2001. **2**(3): p. 164-71.
50. Griselli, M., Hervert, J., Hutchinson, W.L., Taylor, K.M., Sohail, M., Krausz, T., and P. M.B, *C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction*. *J. Exper. Med*, 1999. **190**(12): p. J. Exper. Med.
51. Mehta, J.L. and D.Y. Li, *Identification and Autoregulation of Receptor for OX-LDL in Cultured Human Coronary Artery Endothelial Cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998. **248**(3): p. 511-514.
52. Binder, C.J., et al., *Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between Streptococcus pneumoniae and oxidized LDL*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 736-43.
53. Binder, C.J., et al., *Innate and acquired immunity in atherogenesis*. *Nat Med*, 2002. **8**(11): p. 1218-26.
54. Bochkov, V.N., et al., *Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage*. *Nature*, 2002. **419**(6902): p. 77-81.
55. Miller, Y.I., et al., *Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors*. *Curr Opin Lipidol*, 2003. **14**(5): p. 437-45.
56. Walton, K.A., et al., *Receptors involved in the oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine-mediated synthesis of interleukin-8. A role for Toll-like receptor 4 and a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(32): p. 29661-6.
57. Chang, M.K., et al., *C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(20): p. 13043-8.
58. 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*, 2003. **278**(3): p. 1561-8.
59. Isakson, B.E., et al., *Oxidized phospholipids alter vascular connexin expression, phosphorylation, and heterocellular communication*. *Arterioscler.Thromb. Vasc. Biol.*, 2006. **26**: p. 2216-2221.
60. !!! INVALID CITATION !!!
61. Cvetkovic, J.T., et al., *Increased levels of autoantibodies against copper-oxidized low density lipoprotein, malondialdehyde-modified low density lipoprotein and cardiolipin in patients with rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2002. **41**(9): p. 988-95.
62. Hayem, G., et al., *Anti-oxidized low-density-lipoprotein (OxLDL) antibodies in systemic lupus erythematosus with and without antiphospholipid syndrome*. *Lupus*, 2001. **10**(5): p. 346-51.

63. Tsimikas, S., et al., *Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **353**(1): p. 46-57.
64. Simões C, S.A.C., Domingues P, Laranjeira P, Paiva A, M. Domingues R.M., *PHOSPHATIDYLETHANOLAMINES GLYCATION, OXIDATION AND GLYCOXIDATION: EFFECTS ON MONOCYTE AND DENDRITIC CELL STIMULATION*. Cell Biochemistry and Biophysics, in press.
65. Loureiro, J. and C. Santos, *Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal*. Boletim de Biotecnologia, 2001.
66. Kasap, S., et al., *Serum cardiac markers in patients with acute myocardial infarction: oxidative stress, C-reactive protein and N-terminal probrain natriuretic Peptide*. J Clin Biochem Nutr, 2007. **41**(1): p. 50-7.
67. Segers, P., et al., *Assessment of pressure wave reflection: getting the timing right!* Physiol Meas, 2007. **28**(9): p. 1045-56.
68. World Health Organization. *The Global Burden of Disease 2004*. 2004; Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html.
69. Palanisamy Pasupathi, Y.Y.R., Jawahar Farook, Ganesan Saravanan and and G. Bakthavathsalam, *Oxidative Stress and Cardiac Biomarkers in Patients with Acute Myocardial Infarction*. European Journal of Scientific Research, 2009. **27**: p. 275-285.
70. Buffon, A., et al., *Widespread coronary inflammation in unstable angina*. N Engl J Med, 2002. **347**(1): p. 5-12.
71. Zairis, M.N., et al., *C-reactive protein levels on admission are associated with response to thrombolysis and prognosis after ST-segment elevation acute myocardial infarction*. Am Heart J, 2002. **144**(5): p. 782-9.
72. Organization, W.H. *World Health Statistics 2011*. 2011; Available from: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2011/en/index.html.
73. Tousoulis, D., et al., *Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis*. Heart, 2003. **89**(9): p. 993-7.
74. May, A. and T.J. Wang, *Evaluating the role of biomarkers for cardiovascular risk prediction: focus on CRP, BNP and urinary microalbumin*. Expert Rev Mol Diagn, 2007. **7**(6): p. 793-804.
75. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
76. Frostegård, J., et al., *Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines*. Atherosclerosis, 1999. **145**(1): p. 33-43.
77. Sartipy, P., et al., *Phospholipase A(2) modification of low density lipoproteins forms small high density particles with increased affinity for proteoglycans and glycosaminoglycans*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25913-20.
78. Hakala, J.K., et al., *Lipolytic modification of LDL by phospholipase A2 induces particle aggregation in the absence and fusion in the presence of heparin*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(5): p. 1276-83.
79. Berliner, J.A., et al., *Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions*. J Clin Invest, 1990. **85**(4): p. 1260-6.
80. Bakthavathsalam, P.P.Y.Y.R.J.F.G.S.G., *Oxidative Stress and Cardiac Biomarkers in Patients with Acute Myocardial Infarction*. European Journal of Scientific Research 2009. **27-2**: p. 275-285.
81. Leitinger, N., *Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(11): p. 1063-71.
82. Berliner, J.A., et al., *Evidence for a role of phospholipid oxidation products in atherogenesis*. Trends Cardiovasc Med, 2001. **11**(3-4): p. 142-7.

83. Subbanagounder, G., A.D. Watson, and J.A. Berliner, *Bioactive products of phospholipid oxidation: isolation, identification, measurement and activities*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(12): p. 1751-61.
84. Subbanagounder, G., et al., *Determinants of bioactivity of oxidized phospholipids. Specific oxidized fatty acyl groups at the sn-2 position*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(10): p. 2248-54.
85. Huber, J., et al., *Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(1): p. 101-7.
86. Kunjathoor, V.V., et al., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49982-8.
87. Nicholson, A.C., *Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling*. Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**(1): p. 8-12.
88. Billah, M.M. and J.C. Anthes, *The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis*. Biochem J, 1990. **269**(2): p. 281-91.
89. Murphy, A.D. and N. Lang-Unnasch, *Alternative oxidase inhibitors potentiate the activity of atovaquone against Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(3): p. 651-4.
90. Hsu, F.F. and J. Turk, *Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of glycerophospholipids: mechanisms of fragmentation and structural characterization*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(26): p. 2673-95.
91. Hsu, F.F. and J. Turk, *Differentiation of 1-O-alk-1'-enyl-2-acyl and 1-O-alkyl-2-acyl glycerophospholipids by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization*. J Am Soc Mass Spectrom, 2007. **18**(11): p. 2065-73.
92. Taguchi, R., et al., *Two-dimensional analysis of phospholipids by capillary liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2000. **35**(8): p. 953-66.
93. Simoes, C., et al., *Determination of the fatty acyl profiles of phosphatidylethanolamines by tandem mass spectrometry of sodium adducts*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. **22**(20): p. 3238-44.
94. Kim, H., et al., *Quantitative analysis of phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines in urine of patients with breast cancer by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2009. **393**(6-7): p. 1649-56.
95. Khaselev, N. and R.C. Murphy, *Susceptibility of plasmeryl glycerophosphoethanolamine lipids containing arachidonate to oxidative degradation*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**(3-4): p. 275-84.
96. Quehenberger, O., et al., *Lipidomics analysis of essential fatty acids in macrophages*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2008. **79**(3-5): p. 123-9.
97. Henriques, A., et al., *Functional characterization of peripheral blood dendritic cells and monocytes in systemic lupus erythematosus*. Rheumatol Int, 2012. **32**(4): p. 863-9.
98. Jiang, X.C., et al., *Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(12): p. 2614-8.
99. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1805-12.
100. Sean D. Christie, M.D., Ben Comeau, B.Sc., Tanya Myers, R.T., Damaso Sadi, B.Sc., Mark Purdy, B.Sc.,1 and Ivar Mendez, M.D., *Duration of lipid peroxidation after acute spinal cord injury in rats and the effect of methylprednisolone*. Neurosurg Focus, 2008. **25**(5).
101. Kadl, A., et al., *Oxidized phospholipid-induced inflammation is mediated by Toll-like receptor 2*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(10): p. 1903-9.

102. Kullenberg, D., et al., *Health effects of dietary phospholipids*. *Lipids Health Dis*, 2012. **11**: p. 3.
103. Exadaktylos, A.K., S. Hauselmann, and H. Zimmermann, *Are times getting tougher? A six year survey of urban violence related injuries in a Swiss university hospital*. *Swiss Med Wkly*, 2007. **137**(37-38): p. 525-30.
104. Sevastou, I., et al., *Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1831**(1): p. 42-60.
105. Song, S.H., et al., *Serum lysophosphatidylcholine level is not altered in coronary artery disease*. *Clin Biochem*, 2012. **45**(10-11): p. 793-7.
106. Agneskirchner, J.D., et al., *Effect of high tibial flexion osteotomy on cartilage pressure and joint kinematics: a biomechanical study in human cadaveric knees. Winner of the AGA-DonJoy Award 2004*. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2004. **124**(9): p. 575-84.
107. Simoes, C., P. Domingues, and M.R. Domingues, *Identification of free radicals in oxidized and glycoxidized phosphatidylethanolamines by spin trapping combined with tandem mass spectrometry*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012. **26**(8): p. 931-9.
108. Knapp, M., et al., *Myocardial infarction differentially alters sphingolipid levels in plasma, erythrocytes and platelets of the rat*. *Basic Res Cardiol*, 2012. **107**(6): p. 294.
109. Gabay, C., *Interleukin-6 and chronic inflammation*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8 Suppl 2**: p. S3.
110. Chevez-Barrios, P., *Are we getting closer to prevention and treatment of corneal neovascularization?* *Clin Experiment Ophthalmol*, 2007. **35**(8): p. 689-90.
111. Carvalho, T., et al., *Phenotypic and functional alterations on inflammatory peripheral blood cells after acute myocardial infarction*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2012. **5**(3): p. 309-20.
112. Kowalewski, K., A. Mayo, and S. Journeaux, *How a footballer got hurt without getting hit: isolated peroneal compartment syndrome of a non-traumatic cause*. *Ann R Coll Surg Engl*, 2007. **89**(8): p. W1-2.
113. Blackford, G. and R. Whitehouse, *Getting quality clinical and coded data. How UMHS's CDIP improved clinical coded data and clinical staff relationships*. *J AHIMA*, 2007. **78**(9): p. 100-2; quiz 105-6.
114. Newton, J.P., *GOTYS - getting older, thinking younger*. *Gerodontology*, 2007. **24**(4): p. 187-8.
115. Bodi, V., et al., *Uncontrolled immune response in acute myocardial infarction: unraveling the thread*. *Am Heart J*, 2008. **156**(6): p. 1065-73.
116. Bryden, L., *Getting involved: donating time, money and expertise to global health*. *CMAJ*, 2007. **177**(9): p. 1020-1.
117. Marietti, C., *Chasing the carrot. There is money to be gained through P4P incentives but getting it is no easy task*. *Healthc Inform*, 2007. **24**(11): p. 72.
118. Nah, D.Y. and M.Y. Rhee, *The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction*. *Korean Circ J*, 2009. **39**(10): p. 393-8.
119. Hashizume M., M.M., *IL-6 and lipid metabolism*. *Inflammation and Regeneration*, 2011. **31**(31): p. 325-334.
120. Febbraio, M. and R.L. Silverstein, *CD36: implications in cardiovascular disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. **39**(11): p. 2012-30.
121. Carneiro, P., et al., *E-cadherin dysfunction in gastric cancer--cellular consequences, clinical applications and open questions*. *FEBS Lett*, 2012. **586**(18): p. 2981-9.