



**Ana Sofia da  
Costa Martins**

**O *stress* do retículo na remodelação  
do perfil lipídico do macrófago**



Ana Sofia da  
Costa Martins

## O stress do retículo na remodelação do perfil lipídico do macrófago

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor Bruno Miguel Rodrigues das Neves, Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Agradecimentos à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), à União Europeia, QREN, FEDER, COMPETE, pelo financiamento da Unidade de Investigação de Química Orgânica (QOPNA) (projeto PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296)



QOPNA  
Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-Alimentares

UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu Agrícola  
de Desenvolvimento Rural

*Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu namorado pelo apoio incondicional.*

**o júri**

presidente

**Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Professora Doutora Maria Teresa da Cruz Rosete**

Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**Professor Doutor Bruno Miguel Rodrigues das Neves**

Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro  
(Orientador)

## **agradecimentos**

Com este pequeno espcinho aproveito para agradecer a todas as pessoas que de alguma forma ajudaram a tornar este trabalho possível.

Aos meus orientadores, Doutor Bruno Neves e Doutora Rosário Domingues, obrigado por todo o conhecimento transmitido, pela constante disponibilidade e boa disposição, e pela incansável ajuda na realização deste trabalho. Obrigado pela confiança depositada. Obrigado por acreditarem.

Ao grupo de espetrometria de massa, obrigado por me terem recebido tão bem. Um agradecimento especial à Doutora Cristina Barros pela boa disposição constante e contagiante. Às meninas de doutoramento, Tânia, Ana e Rita, obrigado pela constante ajuda e disponibilidade, por todos os conselhos e desabafos.

Aos meus colegas de bancada, obrigado por todos os momentos de desconcentração. À Elisabete, obrigado pela tua pronta disponibilidade em oferecer uma mão, ou simplesmente por ouvires.

Aos meus pais e ao meu irmão, obrigado por estarem sempre ao meu lado e me acompanharem ao longo do meu percurso. Obrigado pelo vosso amor incondicional.

À minha tia, obrigado por seres uma segunda mãe, e estares sempre presente para mim em todos os momentos.

Ao meu namorado, obrigado por seres quem és, por estares sempre ao meu lado com o teu apoio incansável. Obrigado por seres a minha outra metade.

## Palavras-chave

Doença aterosclerótica, fosfolípidos oxidados, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas, macrófagos, metabolismo lipídico, *stress* do retículo endoplasmático

## Resumo

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de mortalidade nos países desenvolvidos. Na sua génese encontra-se frequentemente a aterosclerose, um processo inflamatório crónico de origem multifatorial caracterizado pela acumulação e oxidação de lipoproteínas e recrutamento de macrófagos para o subendotélio arterial. A progressão da patologia encontra-se intimamente ligada à disfunção e morte dos macrófagos após fagocitose de lipoproteínas oxidadas. Embora não totalmente conhecido sabe-se que este processo envolve o desenvolvimento de *stress* do retículo e ativação dos vários ramos da *unfolded protein response* (UPR). Neste contexto definiram-se dois objetivos a serem desenvolvidos no presente trabalho. No primeiro pretendeu-se compreender a influência do *stress* do retículo no metabolismo lipídico de macrófagos e as suas possíveis relações com a progressão da aterosclerose. Para tal foi usada como modelo experimental a linha celular de macrófagos de murganho RAW 264.7 estimulada com os indutores de *stress* Tunicamicina e 7-Cetocolesterol. Através de uma abordagem lipidómica determinou-se o efeito do *stress* do retículo no perfil lipídico do macrófago e através de qPCR foi avaliado o seu efeito num painel de genes envolvidos no metabolismo lipídico. Sucintamente, verificou-se o aumento da percentagem relativa das classes de fosfolípidos PI, LPC, PS, CL e PG, sendo em contrapartida observada uma diminuição de PC, SM e PE, consistente para ambos os estímulos. Ao nível dos ácidos gordos, verificou-se a alteração no rácio de saturados/insaturados, com aumento relativo dos primeiros. A diminuição observada na percentagem de ácidos gordos insaturados, a qual sugere a oxidação dos mesmos, foi corroborada pelo aumento detetado na percentagem de hidroperóxidos lipídicos e pela formação de espécies reativas de oxigénio para ambos os estímulos. A análise do efeito do *stress* do retículo na transcrição de genes envolvidos no metabolismo lipídico mostrou existirem diferenças substanciais no perfil obtido para cada um dos estímulos usados. A segunda parte do trabalho prendeu-se no estudo da capacidade dos fosfolípidos oxidados em induzir *stress* do retículo endoplasmático. Para tal tratou-se as células RAW 264.7 com o fosfolípido 1-palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (PLPC) oxidado em condições de Fenton. No entanto os resultados preliminares alcançados não permitiram inferir conclusões no que respeita à capacidade do fosfolípido PLPC oxidado em ativar os diversos ramos da UPR.

## Keywords

Atherosclerosis, endoplasmic reticulum stress, lipid metabolism, oxidized low-density lipoproteins, oxidized phospholipids, macrophages

## Abstract

Cardiovascular diseases are the main cause of mortality in developed countries. In its origin is often atherosclerosis, a multifactorial inflammatory process characterized by the accumulation and oxidation of lipoproteins and recruitment of macrophages to the endothelium space. The progression of the pathology is intimately linked to dysfunction and death of macrophages after phagocytosis of oxidized lipoproteins. Although not fully disclosed, this process evolves the development of endoplasmic reticulum stress and activation of the diverse branches of the unfolded protein response (UPR). In this context we established two main objectives for the present work. In the first we intended to understand the influence of endoplasmic reticulum stress in the lipid metabolism of macrophages and its possible relations to atherosclerosis progression. For this, murine macrophage cellular line RAW 264.7 stimulated with the stress inducers Tunicamycin and 7-Ketocholesterol was used as experimental model. Through a lipidomic approach it was determined the effect of reticulum stress on macrophage lipid profile and by qPCR it was estimated the effect in a panel of genes related with lipid metabolism. Briefly, it was observed an increase in the relative percentage of PI, LPC PS, CL and PG, phospholipid classes, while PC, SM and PE were decreased, consistent for both stimulus. In fatty acids analysis, we observed an alteration in saturated/unsaturated ratio, being the first only slightly increased. The observed decrease in the percentage of unsaturated fatty acids suggested their oxidation, and this hypothesis was supported by an observed increase of lipid hydroperoxide percentage and reactive oxygen species formation for both stimulus. The analysis of the effect of endoplasmic reticulum *stress* in the transcription of genes related with lipid metabolism showed substantial differences in the profile obtained for each stimulus used. The second part of the work it was based in the study of the ability of oxidized phospholipids to induce stress in endoplasmic reticulum. RAW 264.7 cells were treated with the phospholipid 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PLPC) oxidized under Fenton reaction. Nevertheless the preliminary results do not allowed to conclude about the ability of oxidized PLPC in activating the diverse branches of UPR.





# Índice

<b>Índice</b> .....	<b>xv</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>xix</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>xxiii</b>
<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>xxvii</b>
<b>Lista de esquemas</b> .....	<b>xxix</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Epidemiologia da doença aterosclerótica .....	1
1.2 Histologia da artéria .....	2
1.3 Fisiopatologia da lesão aterosclerótica .....	3
1.3.1 Iniciação do processo aterosclerótico .....	4
1.3.2 Evolução do ateroma .....	5
1.3.3 Complicações da doença aterosclerótica .....	6
1.4 O papel dos macrófagos na placa aterosclerótica .....	7
1.4.1 Recrutamento e consequente diferenciação .....	7
1.4.2 Apoptose e subsequente eferocitose .....	9
1.5 O stress do retículo endoplasmático na aterogénese .....	14
1.5.1 O papel da UPR no stress do retículo endoplasmático .....	14
1.5.2 Ativação da UPR na doença aterosclerótica .....	18
<b>2 Efeito do <i>stress</i> do retículo endoplasmático no perfil lipídico do macrófago ...</b>	<b>21</b>
2.1 Introdução .....	21
2.1.1 O stress do retículo na modelação do metabolismo lipídico .....	21
2.1.2 O papel da UPR na biogénese do retículo endoplasmático .....	23
2.2 Objetivo .....	24
2.3 Metodologia .....	24
2.3.1 Reagentes .....	26
2.3.2 Cultura de células .....	26

2.3.3	Ensaio de viabilidade celular .....	26
2.3.4	Tratamento químico .....	27
2.3.5	Preparação de lisados celulares totais .....	27
2.3.6	Análise de proteínas por Western Blot .....	27
2.3.7	Análise da expressão génica por qPCR .....	28
2.3.8	Ensaio de produção de ROS .....	28
2.3.9	Avaliação da externalização de PS/apoptose .....	29
2.3.10	Extração de lípidos .....	29
2.3.11	Quantificação de fosfolípidos .....	30
2.3.12	Separação de classes de fosfolípidos por TLC .....	31
2.3.13	Quantificação de hidroperóxidos lipídicos por FOX II .....	32
2.3.14	Quantificação de ácidos gordos por GC-MS .....	33
2.3.14	Análise de classes de fosfolípidos por HPLC-MS .....	34
2.3.15	Análise estatística .....	35
2.4	Resultados e discussão .....	35
2.4.1	Atividade metabólica/viabilidade das células RAW 264.7 .....	35
2.4.2	Avaliação da indução de stress do retículo por Western Blot e qPCR .....	36
2.4.3	Avaliação da externalização de PS/indução de apoptose .....	41
2.4.4	Perfil de classes de fosfolípidos por TLC .....	43
2.4.5	Perfil de ácidos gordos por GC-MS .....	50
2.4.6	Avaliação do perfil lipídico por HPLC-MS .....	55
2.4.6.1	Análise do perfil de PC .....	56
2.4.6.2	Análise do perfil de LPC .....	59
2.4.6.3	Análise do perfil de SM .....	61
2.4.6.4	Análise do perfil de PE .....	64
2.4.6.5	Análise do perfil de LPE .....	67
2.4.6.6	Análise do perfil de PS .....	69
2.4.6.7	Análise do perfil de PI .....	72
2.4.6.8	Análise do perfil de PG .....	74
2.4.7	Quantificação de hidroperóxidos lipídicos por FOX II .....	76
2.4.8	Avaliação da formação de ROS .....	78
2.4.9	Análise da expressão de genes implicados no metabolismo lipídico por qPCR . .....	80
2.5	Conclusões e diretrizes futuras .....	84

<b>3 Contribuição dos fosfolípidos oxidados na indução de <i>stress</i> do retículo em macrófagos</b> .....	<b>87</b>
3.1 Introdução .....	87
3.1.1 Os fosfolípidos oxidados e a sua importância biológica .....	87
3.1.2 Envolvimento dos fosfolípidos oxidados na aterogénese .....	90
3.1.3 Contribuição dos fosfolípidos oxidados na ativação da UPR .....	92
3.2 Objetivo .....	93
3.3 Metodologia .....	94
3.3.1 Reagentes .....	96
3.3.2 Oxidação de PLPC em condições de Fenton .....	96
3.3.3 Extração de fosfolípidos .....	96
3.3.4 Quantificação de fosfolípidos .....	97
3.3.5 Cultura de células .....	97
3.3.6 Tratamento químico .....	97
3.3.7 Preparação de lisados celulares totais .....	97
3.3.8 Análise de proteínas por Western Blot .....	97
3.3.9 Análise da expressão génica por qPCR .....	97
3.4 Resultados e discussão .....	97
3.5 Diretrizes futuras .....	101
<b>4 Conclusão</b> .....	<b>103</b>
<b>Anexo 1</b> .....	<b>105</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>107</b>

*(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)*

# Abreviaturas

ATF4	Fator Ativador da Transcrição 4, <i>do inglês Activating Transcription Factor 4</i>
ATF6	Fator Ativador da Transcrição 6, <i>do inglês Activating Transcription Factor 6</i>
CHOP	Proteína Homóloga da C/EBP, <i>do inglês C/EBP Homologous Protein</i>
CL	Cardiolipina, <i>do inglês Cardiolipin</i>
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco, <i>do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
eIF2 $\alpha$	Fator de Iniciação Eucariótico 2 $\alpha$ , <i>do inglês Eukaryotic Initiation Factor 2<math>\alpha</math></i>
ERAD	Degradação Associada ao Retículo Endoplasmático, <i>do inglês Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation</i>
ERSEs	Elementos de Resposta a <i>Stress</i> do Retículo Endoplasmático, <i>do inglês Endoplasmic Reticulum-Stress Response Elements</i>
GRP78/BIP	Proteína de Ligação a Imunoglobulina, <i>do inglês Binding Immunoglobulin Protein</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espetrometria de Massa, <i>do inglês Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade, <i>do inglês High Density Lipoprotein</i>
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espetrometria de Massa, <i>do inglês High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M

IRE1	Enzima Dependente de Inositol 1, <i>do inglês Inositol-Requiring Enzyme 1</i>
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade, <i>do inglês Low Density Lipoprotein</i>
LOX-1	Recetor de oxLDL semelhante à Lectina-1, <i>do inglês Lectin-like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1</i>
LPC	Lisofatidilcolina, <i>do inglês Lysohosphatidylcholine</i>
MTBE	Éter Metil-Terc-Butílico, <i>do inglês Methyl Tert-Butyl Ether</i>
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear $\kappa$ B, <i>do inglês Nuclear Factor <math>\kappa</math>B</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
oxPAPC	1-Palmitoil-2-Araquidonoil- <i>sn</i> -Glicero-3-Fosfocolina Oxidado, <i>do inglês Oxidized 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine</i>
oxPAPE	1-Palmitoil-2-Araquidonoil- <i>sn</i> -Glicero-3-Fosfoetanolamina Oxidado, <i>do inglês Oxidized 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine</i>
oxPLs	Fosfolípidos Oxidados, <i>do inglês Oxidized Phospholipids</i>
PA	Ácido fosfatídico, <i>do inglês Phosphatidic Acid</i>
PAF	Fator Ativador de Plaquetas, <i>do inglês Platelet-Activating Factor</i>
PC	Fosfatidilcolina, <i>do inglês Phosphatidylcholine</i>
PE	Fosfatidiletanolamina, <i>do inglês Phosphatidylethanolamine</i>
PERK	Cinase do Retículo Endoplasmático Semelhante à PKR, <i>do inglês PKR-Like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>
PG	Fosfatidilglicerol, <i>do inglês Phosphatidylglycerol</i>
PI	Fosfatidilinositol, <i>do inglês Phosphatidylinositol</i>
PLPC	1-Palmitoil-2-Linoleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-Fosfocolina, <i>do inglês 1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine</i>

PPAR	Recetor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma, <i>do inglês Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
PPRs	Recetores de Reconhecimento de Padrões, <i>do inglês Pattern Recognition Receptors</i>
PS	Fosfatidilserina, <i>do inglês Phosphatidylserine</i>
PUFAs	Ácidos Gordos Poli-insaturados, <i>do inglês Polyunsaturated Fatty Acids</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio, <i>do inglês Reactive Oxygen Species</i>
SM	Esfingomiéline, <i>do inglês Sphingomyelin</i>
TLC	Cromatografia em Camada Fina, <i>do inglês Thin Layer Chromatography</i>
TLRs	Recetores do Tipo Toll, <i>do inglês Toll-Like Receptors</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral, <i>do inglês Tumor Necrosis Factor</i>
UPR	Resposta a Proteínas Não-Enoveladas, <i>do inglês Unfolded Protein Response</i>
UPREs	Elementos da UPR, <i>do inglês UPR Elements</i>
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular, <i>do inglês Vascular Endothelial Growth Factor</i>
XBP1	Proteína 1 de Ligação à X-Box, <i>do inglês X-Box Binding Protein 1</i>

*(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)*



# Lista de figuras

## Capítulo 1

- Figura 1.1: Distribuição em porcentagem das principais causas de mortalidade a nível mundial no ano 2008. . . . . 2
- Figura 1.2: Composição da artéria. . . . . 3
- Figura 1.3: Composição celular do ateroma na lesão aterosclerótica . . . . . 6
- Figura 1.4: Recrutamento de monócitos para a túnica íntima e, subsequente, formação de células espumosas. . . . . 9
- Figura 1.5: Ocorrência de *stress* do retículo endoplasmático nas células espumosas acumuladas na placa aterosclerótica em progressão, o qual, se prolongado, resulta na sua morte apoptótica . . . . . 12
- Figura 1.6: Morte apoptótica das células espumosas acumuladas na túnica íntima face ao influxo persistente de monócitos a par com o egresso deficiente. Deficiências no processo de eferocitose dos macrófagos apoptóticos resulta na necrose secundária pós-apoptótica dos mesmos. . . . . 13
- Figura 1.7: Resposta a proteínas não-enoveladas desencadeada face à ocorrência de *stress* do retículo e composta por três vias de sinalização iniciadas pelos sensores IRE1, PERK e ATF6, situados na membrana do retículo endoplasmático. . . . . 17

## Capítulo 2

- Figura 2.1: Efeito da tunicamicina e do 7-cetocolesterol na viabilidade celular das células RAW 264.7 estimuladas com concentrações crescentes de estímulo . . . . . 36
- Figura 2.2: Efeito do tempo de exposição (1, 2, 4, 8 ou 24 horas) a tunicamicina (2 µg/mL) e 7-cetocolesterol (20 µg/mL) na indução de *stress* do retículo endoplasmático em células RAW 264.7. Avaliação da expressão das proteínas marcadoras de *stress* do retículo GRP78, ATF4 e CHOP por Western Blot . . . . . 37
- Figura 2.3: Efeito da concentração de tunicamicina (0.25, 0.5, 1 e 2 µg/mL) e de 7-cetocolesterol (5, 10, 15 e 20 µg/mL) na indução de *stress* do retículo endoplasmático. Avaliação da expressão das proteínas marcadoras de *stress* do retículo GRP78, ATF4 e CHOP por Western Blot. . . . . 39

Figura 2.4: Efeito da tunicamicina (0.5 $\mu\text{g/mL}$ ) e do 7-cetocolesterol (15 $\mu\text{g/mL}$ ) na transcrição de genes ligados ao <i>stress</i> do retículo endoplasmático em células RAW 264.7. Avaliação da transcrição dos genes <i>Chop</i> e <i>Grp78</i> por qPCR . . . . .	40
Figura 2.5: Efeito da tunicamicina (0.5 $\mu\text{g/mL}$ ) e do 7-cetocolesterol (15 $\mu\text{g/mL}$ ) na externalização da PS/apoptose das células RAW 264.7. . . . .	42
Figura 2.6: Separação e identificação das classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico total das células RAW 264.7 não tratadas (controlo) e das células estimuladas com tunicamicina (2 $\mu\text{g/mL}$ ) ou 7-cetocolesterol (20 $\mu\text{g/mL}$ ) por TLC. . . . .	44
Figura 2.7: Efeito da tunicamicina (0.5 $\mu\text{g/mL}$ ) e do 7-cetocolesterol (20 $\mu\text{g/mL}$ ) na percentagem relativa das principais classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 . . . . .	45
Figura 2.8: Efeito da concentração de tunicamicina (0.5 ou 2 $\mu\text{g/mL}$ ) e de 7-cetocolesterol (15 ou 20 $\mu\text{g/mL}$ ) na percentagem relativa das principais classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. . . . .	47
Figura 2.9: Efeito do tempo de exposição (8 ou 24 horas) a tunicamicina (0.5 $\mu\text{g/mL}$ ) na percentagem relativa das principais classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. . . . .	48
Figura 2.10: Efeito do tempo de exposição (24 ou 36 horas) e da concentração (5, 15 ou 20 $\mu\text{g/mL}$ ) de 7-cetocolesterol na percentagem relativa das principais classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. . . . .	49
Figura 2.11: Efeito da concentração de tunicamicina (0.5 ou 2 $\mu\text{g/mL}$ ) e de 7-cetocolesterol (15 ou 20 $\mu\text{g/mL}$ ) na percentagem relativa dos principais ácidos gordos presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. . . . .	52
Figura 2.12: Efeito do tempo de exposição (8 ou 24 horas) a tunicamicina (0.5 $\mu\text{g/mL}$ ) na percentagem relativa dos principais ácidos gordos presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. . . . .	53
Figura 2.13: Variação da percentagem relativa de ácidos gordos saturados <i>versus</i> insaturados (mono- e poli-) nas células RAW 264.7 estimuladas com tunicamicina (0.5 $\mu\text{g/mL}$ (24 ou 8 horas) ou 2 $\mu\text{g/mL}$ ) e 7-cetocolesterol (15 $\mu\text{g/mL}$ ou 20 $\mu\text{g/mL}$ ). . . . .	54
Figura 2.14: Cromatograma da análise do extrato lipídico total de células RAW 264.7 não tratadas (controlo) no modo positivo e negativo, com indicação da ordem de eluição das classes de fosfolípidos nos respetivos modos de análise. . . . .	55
Figura 2.15: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões $M + H^+$ da classe PC formados pela análise no modo positivo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo), com representação da estrutura generalizada da classe PC. . . . .	56

Figura 2.16: Efeito da tunicamicina (0.5 µg/mL) e do 7-cetocolesterol (15 µg/mL) na percentagem relativa dos iões M + H <sup>+</sup> da classe PC presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. ....	58
Figura 2.17: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões M + H <sup>+</sup> da classe LPC formados pela análise no modo positivo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo). .	59
Figura 2.18: Efeito da tunicamicina (0.5 µg/mL) e do 7-cetocolesterol (15 µg/mL) na percentagem relativa dos iões M + H <sup>+</sup> da classe LPC presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. ....	60
Figura 2.19: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões M + H <sup>+</sup> da classe SM formados pela análise no modo positivo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo), com estrutura generalizada da classe SM. ....	61
Figura 2.20: Efeito da tunicamicina (0.5 µg/mL) e do 7-cetocolesterol (15 µg/mL) na percentagem relativa dos iões M + H <sup>+</sup> da classe SM presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. ....	63
Figura 2.21: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões M-H <sup>-</sup> da classe PE formados pela análise no modo negativo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo), com estrutura generalizada da classe PE. ....	64
Figura 2.22: Efeito da tunicamicina (0.5 µg/mL) e do 7-cetocolesterol (15 µg/mL) na percentagem relativa dos iões M-H <sup>-</sup> da classe PE presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. ....	66
Figura 2.23: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões M-H <sup>-</sup> da classe LPE formados pela análise no modo negativo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo), com estrutura generalizada da classe LPE. ....	67
Figura 2.24: Efeito da tunicamicina (0.5 µg/mL) e do 7-cetocolesterol (15 µg/mL) na percentagem relativa dos iões M-H <sup>-</sup> da classe LPE presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. ....	68
Figura 2.25: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões M-H <sup>-</sup> da classe PS formados pela análise no modo negativo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo), com estrutura generalizada da classe PS. ....	69
Figura 2.26: Efeito da tunicamicina (0.5 µg/mL) e do 7-cetocolesterol (15 µg/mL) na percentagem relativa dos iões M-H <sup>-</sup> da classe PS presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. ....	71
Figura 2.27: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões M-H <sup>-</sup> da classe PI formados pela análise no modo negativo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo), com estrutura generalizada da classe PI. ....	72

Figura 2.28: Efeito da tunicamicina (0.5 µg/mL) e do 7-cetocolesterol (15 µg/mL) na percentagem relativa dos iões M-H <sup>-</sup> da classe PI presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. ....	73
Figura 2.29: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões M-H <sup>-</sup> da classe PG formados pela análise no modo negativo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo), com estrutura generalizada da classe PG. ....	74
Figura 2.30: Efeito da tunicamicina (0.5 µg/mL) e do 7-cetocolesterol (15 µg/mL) na percentagem relativa dos iões M-H <sup>-</sup> da classe PG presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7. ....	76
Figura 2.31: Efeito da tunicamicina (0.5 µg/mL (24 ou 8 horas) ou 2 µg/mL) e do 7-cetocolesterol (15 µg/mL ou 20 µg/mL) na peroxidação lipídica avaliada pela quantidade de hidroperóxidos lipídicos (µg) por µg de fosfolípido presente no extrato das células RAW 264.7. ....	77
Figura 2.32: Efeito da tunicamicina (0.5 µg/mL) e do 7-cetocolesterol (15 µg/mL) na formação de ROS pelas células RAW 264.7. ....	79
Figura 2.33: Efeito da tunicamicina (0.5 µg/mL) e do 7-cetocolesterol (15 µg/mL) na transcrição de genes envolvidos no metabolismo lipídico, avaliado para dois tempos de exposição diferentes (4 ou 24 horas). ....	81

### Capítulo 3

Figura 3.1: Produtos resultantes da modificação oxidativa dos fosfolípidos. ....	88
Figura 3.2: (a) Estrutura dos produtos resultantes da oxidação de PC e reconhecidos pelo recetor CD36 (oxPC <sub>CD36</sub> ); (b) Conformação predita dos produtos KOdia-PC e 13-HODE-PC, resultantes da modificação oxidativa de PC; (c) Reconhecimento do ácido gordo oxidado na posição <i>sn2</i> , projetado para a fase aquosa, pelos recetores localizados na membrana. . .	91
Figura 3.3: Efeito do fosfolípido PLPC (50 µg/mL), oxidado e não-oxidado, e da tunicamicina (0.5 µg/mL) na indução de stress do retículo endoplasmático nas células RAW 264.7. Avaliação da expressão das proteínas marcadoras de stress do retículo GRP78, ATF4 e CHOP por Western Blot. ....	98
Figura 3.4: Efeito do fosfolípido PLPC (50 µg/mL), oxidado e não-oxidado, e da tunicamicina (0.5 µg/mL) na indução de stress do retículo endoplasmático nas células RAW 264.7. Avaliação da expressão dos genes marcadores de stress do retículo <i>Chop</i> e <i>Grp78</i> por qPCR. ....	100

# Lista de tabelas

## Capítulo 2

Tabela 2.1: Identificação dos íões $M + H^+$ e $M + Na^+$ da classe PC observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas . . . . .	57
Tabela 2.2: Identificação dos íões $M + H^+$ e $M + Na^+$ da classe LPC observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas . . . . .	60
Tabela 2.3: Identificação dos íões $M + H^+$ e $M + Na^+$ da classe SM observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas. . . . .	62
Tabela 2.4: Identificação dos íões $M-H^-$ da classe PE observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas . . . . .	64
Tabela 2.5: Identificação dos íões $M-H^-$ da classe LPE observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas . . . . .	68
Tabela 2.6: Identificação dos íões $M-H^-$ da classe PS observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas . . . . .	70
Tabela 2.7: Identificação dos íões $M-H^-$ da classe PI observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas . . . . .	72
Tabela 2.8: Identificação dos íões $M-H^-$ da classe PG observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas . . . . .	75

## Capítulo 3

Tabela 3.1: Conteúdo em percentagem, relativamente ao total, dos principais fosfolípidos presentes na membrana de diferentes organelos, com ênfase para o retículo endoplasmático . . . . .	88
---	----

## Anexo 1

Tabela 0.1: Perfil de expressão de genes ligados ao metabolismo lipídico de macrófagos RAW 264.7 expostos a tunicamicina (0.5 $\mu\text{g/mL}$ ) ou 7-cetocolesterol (15 $\mu\text{g/mL}$ ) durante dois tempos de exposição (4 e 24 horas) . . . . .	105
---	-----

*(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)*

# Lista de esquemas

## Capítulo 2

Esquema 2.1: Fluxograma do protocolo aplicado para o estudo do efeito do stress do retículo endoplasmático, induzido pelo tratamento com tunicamicina e 7-cetocolesterol, no perfil lipídico do macrófago . . . . . 25

## Capítulo 3

Esquema 3.1: Fluxograma do protocolo aplicado para o estudo da contribuição do fosfolípido 1-palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (PLPC) oxidado na indução de stress do retículo endoplasmático em macrófagos. . . . . 95

*(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)*



# Capítulo 1

## Introdução

Pretende-se neste capítulo introdutório dar a conhecer o estado atual do conhecimento no que respeita à temática da presente tese inserida no âmbito da doença aterosclerótica. Deste modo, é feita uma breve introdução que se inicia com dados epidemiológicos referentes à incidência das doenças cardiovasculares e aos principais fatores de risco que se sabe estarem na sua gênese. Num segundo ponto são abordados os processos fisiopatológicos envolvidos na formação da lesão aterosclerótica, assim como as complicações resultantes da mesma. Posteriormente é analisado em maior detalhe o papel dos macrófagos na aterogénese enquanto principal tipo de célula interveniente no processo aterosclerótico. Por fim, após uma breve descrição do conceito de *stress* do retículo endoplasmático, é abordado o seu envolvimento no processo aterosclerótico.

### 1.1 Epidemiologia da doença aterosclerótica

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de mortalidade nos países desenvolvidos, sendo a doença cardíaca coronária e a doença cerebrovascular as que apresentam, globalmente, o maior número de mortes por ano de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). Segundo a OMS, a doença cardíaca coronária mata mais de 7 milhões de pessoas em cada ano, e a doença cerebrovascular apresenta taxas de mortalidade superiores a 6 milhões (Figura 1.1) [1, 2]. Só em Portugal a taxa de mortalidade devida a doenças cardiovasculares no ano 2011 foi superior a 40 mil pessoas, de acordo com a Direção-Geral da Saúde [3]. A nível mundial, em 2020 prevêem-se taxas de mortalidade anuais superiores a 20 milhões, as quais poderão atingir valores na ordem dos 24 milhões em 2030 [1, 2]. Caso esta tendência atual não seja interrompida ou revertida, prevê-se que o número de mortes devido a doenças cardiovasculares atinja proporções épicas nos próximos anos.

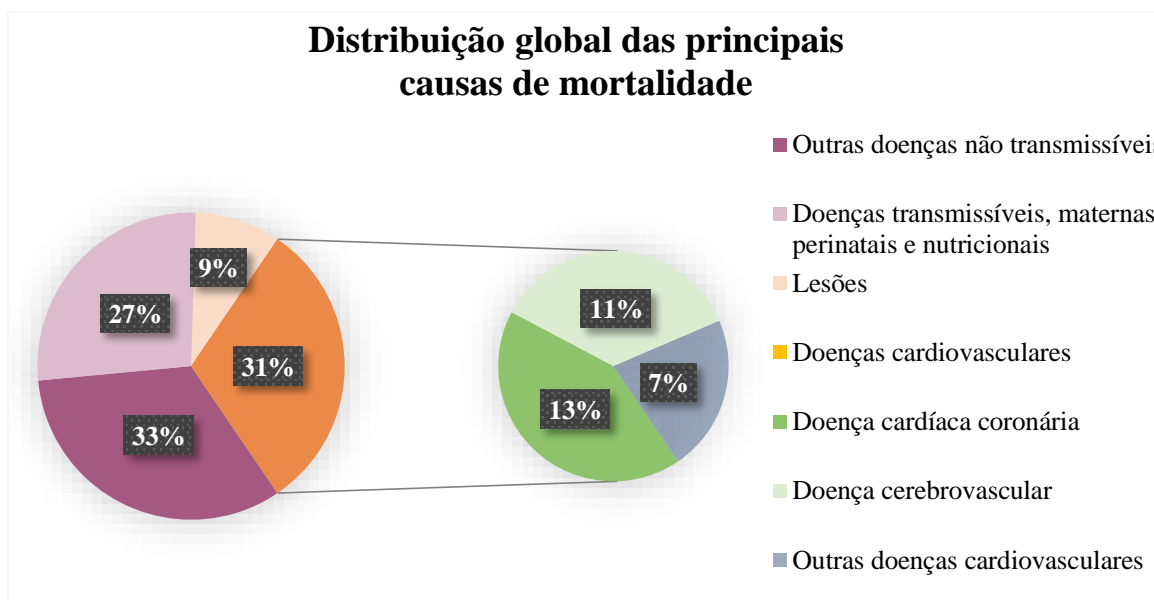


Figura 1.1: Distribuição em percentagem das principais causas de mortalidade a nível mundial no ano 2008, segundo a OMS. As doenças cardiovasculares representam um terço da totalidade de mortes, sendo a doença cardíaca coronária e a doença cerebrovascular as principais responsáveis pela taxa de mortalidade evidenciada. (Dados obtidos em [1])

Na gênese da grande maioria das doenças cardiovasculares encontra-se a doença aterosclerótica, documentada pela primeira vez no século XVI por Leonardo Da Vinci em consequência da observação pós-morte da degeneração do sistema vascular num homem idoso. Da Vinci especificou que “os vasos dos idosos restringem o trânsito do sangue através do espessamento da túnica”, atribuindo este espessamento aos nutrientes presentes no sangue e relacionando a degeneração dos vasos sanguíneos com o processo de envelhecimento. Somente em 1833, Jean Lobstein propôs o termo arteriosclerose para a descrição do espessamento das artérias, o qual foi posteriormente modificado para aterosclerose por Felix Marchand, em 1904, que sugeriu a doença aterosclerótica enquanto responsável pela maioria dos processos obstrutivos nas artérias [4]. Atualmente é reconhecida como uma doença sistémica capaz de afetar todas as artérias do organismo, apesar de se manifestar localmente em determinadas artérias nas quais as lesões são primariamente estabelecidas [5]. Dependendo da localização das artérias afetadas no organismo, a doença aterosclerótica pode culminar em diversos tipos de doenças cardiovasculares. A doença cardíaca coronária e a doença cerebrovascular são as mais predominantes, seguidas da doença arterial periférica, com as artérias coronárias, cerebrais e periféricas a serem, respetivamente, afetadas. A lesão aterosclerótica evolui lentamente ao longo de décadas progredindo frequentemente de forma assintomática ou originando eventualmente sintomas estáveis relacionados com o suprimento do fluxo sanguíneo como a angina de peito e a claudicação intermitente. A progressão da lesão aterosclerótica pode ser contrariada através de mecanismos compensatórios na artéria como a remodelação vascular e a formação de vasos colaterais a fim de manter um fluxo sanguíneo adequado, com possibilidade de regressão. No

entanto, e na maioria dos casos, a presença de lesões ateroscleróticas pode resultar em manifestações clínicas de maior severidade, nomeadamente em enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral ou isquemia crítica do membro inferior [1, 6].

O fator desencadeador da doença aterosclerótica foi alvo de controvérsia até ao início do século XX, período no qual viria a ser reconhecido o papel da dieta rica em colesterol na gênese da aterosclerose. Em 1908, Alexander Ignatowski descreveu a relação existente entre uma dieta rica em colesterol e a aterosclerose (revisto em [7]). Por sua vez, Adolf Windaus, em 1910, caracterizou o colesterol presente nas lesões ateroscleróticas afirmando existir 6 vezes mais colesterol livre e 20 vezes mais colesterol esterificado nas lesões ateroscleróticas em comparação com a parede arterial normal (revisto em [7]). Mas foi em 1913 que Nikolai Anichov demonstrou em definitivo o papel do colesterol enquanto responsável pela doença aterosclerótica através de um estudo no qual modulou a dieta de coelhos a fim de produzir lesões compostas por gorduras nas artérias dos mesmos [8]. Tais observações, em conjunto com a caracterização das partículas de lipoproteínas humanas, permitiram estabelecer a acumulação de lípidos como uma das principais causas da doença aterosclerótica [5]. Na atualidade a aterosclerose é vista como uma doença multifatorial, na qual a idade de início assim como a progressão parecem ser fortemente influenciadas por fatores de risco tanto inatos como adquiridos. Entre os principais fatores de risco identificados encontra-se idade, sexo masculino, história familiar de doença aterosclerótica, tabagismo, diabetes *mellitus*, hipertensão, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, níveis baixos de lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *High Density Lipoprotein*) e níveis elevados de lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *Low Density Lipoprotein*). Estes fatores de risco clássicos são utilizados no cálculo de algoritmos com o intuito de estimar o risco de cada indivíduo de sofrer um evento cardiovascular ou, eventualmente, morrer em consequência do mesmo [9].

A obesidade bem como a dieta e o comportamento alimentar desempenham um papel importante na patogénese da doença aterosclerótica, sendo igualmente importantes enquanto alvos para a intervenção clínica. Apesar de não se tratarem de fatores de risco estatisticamente independentes, a par com álcoolismo, inatividade física e fatores psicossociais representam fatores de estilo de vida associados a uma maior incidência de doenças cardiovasculares. Segundo estudos epidemiológicos, estes fatores afetam a patogénese da doença aterosclerótica e, conseqüentemente, devem ser considerados enquanto alvos para a prevenção [9, 10]. O desenvolvimento económico a par com a urbanização promoveram hábitos de sedentarismo e alimentação deficiente, o que levou a um aumento exponencial das doenças cardiovasculares, chegando mesmo nas últimas décadas a atingirem proporções epidémicas [5].

## 1.2 Histologia da artéria

De forma a compreender a patogénese da doença aterosclerótica torna-se necessário, numa primeira instância, conhecer a estrutura e a biologia da artéria normal assim como os tipos de células dela constituinte. As células endoteliais e as células do músculo liso representam os principais tipos de células constituintes da artéria normal. As primeiras apresentam na sua superfície moléculas envolvidas em mecanismos anticoagulantes bem como pró-coagulantes de forma a manter o balanço trombótico, o que se revela fundamental uma vez que as células endoteliais estabelecem um contacto crucial à superfície com o sangue. Tais mecanismos revelam-se importantes na homeostasia vascular, e, frequentemente tornam-se incorretos no decorrer da patogénese de doenças arteriais como a aterosclerose. Em respeito às células do músculo liso constituem o segundo tipo principal de células da artéria, na qual desempenham funções importantes na homeostasia vascular apesar de se encontrarem igualmente envolvidas na patogénese da doença aterosclerótica. As suas atividades de contração e relaxamento controlam o fluxo sanguíneo no entanto, em artérias ateroscleróticas, a sua contração anormal mostra-se responsável pelo agravamento da perturbação do fluxo sanguíneo [5].

A artéria normal apresenta uma estrutura trilaminar composta por três camadas:

- *Túnica íntima* - camada mais interna (Figura 1.2), caracteriza-se por uma espessura fina no início de vida dos humanos que se torna mais complexa com o envelhecimento. Apresenta uma monocamada de células endoteliais residentes na membrana basal através de variados tipos de colagénio não-fibrilar como colagénio tipo IV, laminina, fibronectina, entre outras moléculas da matriz extracelular. Com o tempo as artérias normais apresentam maior complexidade na sua íntima, a qual apresenta formas fibrilares de colagénio intersticial do tipo I e III assim como células do músculo liso responsáveis pela produção dos constituintes da matriz extracelular na íntima. A túnica íntima apresenta algumas diferenças consoante o facto de se tratar de artérias elásticas ou musculares, sendo a espessura e a quantidade de tecido conectivo subendotelial as mais consideráveis e que tomam maiores proporções nas artérias musculares. A acumulação de lípidos resulta no espessamento da túnica íntima, sendo que certos locais da artéria tendem a desenvolver uma íntima mais espessa em detrimento de outros;

- *Túnica média* – camada média (Figura 1.2), situa-se após a íntima e a lâmina elástica interna e apresenta composição variável consoante o tipo de artéria. Nas artérias elásticas são visíveis camadas bem desenvolvidas de células do músculo liso intercaladas com matriz extracelular rica em elastina. Em oposição, a túnica média das artérias musculares aparenta menor complexidade, na qual as células do músculo liso não se encontram dispostas de forma lamelar entre camadas elásticas mas sim incorporadas na matriz circundante;

- *Túnica adventícia* – camada externa (Figura 1.2), composta por fibrilas de colagénio, fibroblastos e mastócitos. As células constituintes da túnica adventícia apresentam maior

dispersão quando comparadas com as restantes camadas, e encontram-se delimitadas pela lâmina elástica externa.

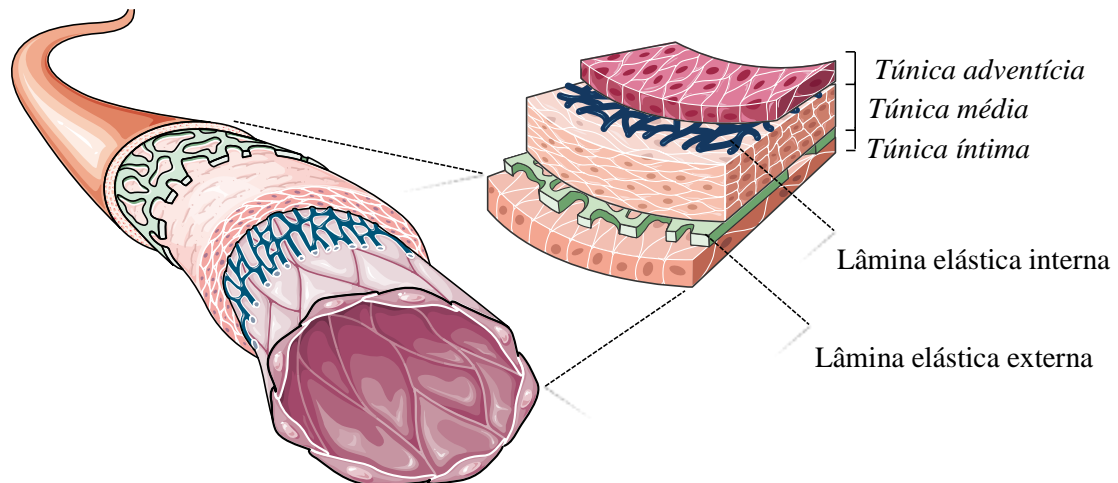


Figura 1.2: Composição da artéria evidenciando uma estrutura trilaminar composta pelas camadas túnica íntima, média e adventícia, da mais interna para a mais externa, as quais encontram-se delimitadas entre si pelas lâminas elásticas interna e externa, respetivamente. (Adaptado de *Medical Servier*)

### 1.3 Fisiopatologia da lesão aterosclerótica

No final do século XVIII duas teorias dominavam a discussão sobre a patogénese da doença aterosclerótica. Carl Von Rokitansky defendia a teoria trombogénica enquanto Rudolf Virchow era um acérrimo defensor da teoria inflamatória. Ao passo que o primeiro considerava as alterações inflamatórias nas paredes das artérias ateroscleróticas de natureza secundária, Virchow defendia o seu papel primário na doença aterosclerótica [11]. Segundo Rokitansky os depósitos observados na camada interna da parede arterial derivavam essencialmente de componentes presentes no sangue, como a fibrina e outros, os quais sofrem degradação e promovem a formação de uma massa. Virchow via a formação do ateroma enquanto consequência de um processo inflamatório, o qual culminava no espessamento da íntima devido à proliferação das células do tecido conjuntivo aí presentes. Posteriormente, o conceito de lesão na íntima de Virchow serviu de base à hipótese da resposta à lesão defendida por Russel Ross, na qual sugeria o despoletar das lesões ateroscleróticas como resultado da lesão endotelial devida a lesão mecânica, toxinas e radicais livres [12]. Contudo, cedo se percebeu que a camada endotelial permanecia intacta durante a maioria dos estádios de progressão da doença aterosclerótica sucedendo apenas algumas modificações, insuficientes para causar denudação endotelial mas capazes de aumentar a permeabilidade do endotélio, particularmente a lipoproteínas aterogénicas. Deste modo, postulou-se a hipótese da retenção de LDL, a qual sugere um papel de iniciação para a partícula de LDL após constatação da sua migração para a íntima através do endotélio onde sofre modificações oxidativas e fica retida. O século XX testemunhou uma evolução notável no que diz respeito ao conhecimento da patogénese da

doença aterosclerótica, sendo atualmente reconhecido o papel de todos esses elementos enquanto participantes na aterogênese [13].

### 1.3.1 Iniciação do processo aterosclerótico

Os passos iniciais do processo aterosclerótico permanecem em debate apesar de observações pós-morte de tecidos humanos em conjunto com resultados de estudos experimentais de aterogênese em modelos animais e de estudos *in vitro* em culturas de células fornecerem uma descrição detalhada da doença aterosclerótica. No início do processo aterosclerótico verifica-se a acumulação de partículas de LDL na túnica íntima em áreas suscetíveis, mas ainda pré-lesionais, da parede arterial. De facto, a retenção subendotelial de lipoproteínas LDL é vista como o processo patogénico central na doença aterosclerótica [14]. A interação da apolipoproteína B de carga positiva, presente nas partículas de LDL, com os proteoglicanos carregados negativamente, constituintes da matriz extracelular da íntima, resulta na retenção das LDL na parede arterial, tornando-as suscetíveis de sofrerem modificação por oxidação, clivagem enzimática e não enzimática, ou agregação. A oxidação dos resíduos de ácidos gordos de fosfolípidos, ésteres de colesterol e triglicérideos das LDL encontra-se na origem de partículas de LDL oxidadas (oxLDL) capazes de desencadear uma resposta inflamatória [15]. Em consequência da oxidação das partículas de LDL é desencadeada, num primeiro ponto, uma resposta por parte do sistema imunitário inato através da ativação das células endoteliais da íntima, o que induz a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas resultando no recrutamento, migração e adesão de monócitos, linfócitos e neutrófilos, para a íntima. A aderência dos leucócitos ao endotélio deve-se à expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais (revisto em [16, 17]).

Os monócitos representam o principal precursor das células intervenientes na imunidade inata. A penetração da camada endotelial, e consequente migração dos monócitos para a íntima, é promovida por quimiocinas, nomeadamente a proteína quimiotática de monócitos-1. Na íntima, devido à influência de estímulos como o fator estimulador de colónias de macrófagos MCSF, os monócitos diferenciam-se em macrófagos e passam a expressar recetores *scavenger* responsáveis pela captação de partículas de oxLDL. Os macrófagos assim modificados tomam a designação de células espumosas em consequência da “aparência espumosa” dada pela acumulação de lípidos quando vista ao microscópio [18]. Os recetores *scavenger* representam recetores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) capazes de reconhecer epítomos específicos da oxidação das LDL. Paralelamente, a família de recetores do tipo *Toll* (TLRs, do inglês *Toll-Like Receptors*) constitui outra classe de PRRs expressa em macrófagos, podendo mediar o reconhecimento de partículas de oxLDL enquanto antígenos e, consequentemente, ativar vias intracelulares como a via do fator nuclear *kB* (NF-*kB*, do inglês *Nuclear Factor Kappa B*) e a via das cinases ativadas por mitogénios MAPK, com

produção de citocinas pró-inflamatórias [15, 16]. Uma vez que as células espumosas apresentam potencial imunogénico, induzem o recrutamento e a ativação de células do sistema imunitário contribuindo para o desenvolvimento das lesões iniciais da doença aterosclerótica como o espessamento assimétrico da íntima. Neste ponto do desenvolvimento da lesão aterosclerótica é possível a regressão, pelo menos em alguma extensão, ou por outro lado a progressão para lesões de maior complexidade [5].

### 1.3.2 Evolução do ateroma

Num estado mais avançado do processo aterosclerótico verifica-se o desencadear da resposta imunitária adquirida através da deteção de anticorpos circulantes dirigidos contra epítomos específicos da oxidação das LDL nas lesões ateroscleróticas [15]. Os macrófagos e as células dendríticas captam as partículas de oxLDL através dos seus recetores *scavenger* não somente com o intuito de degradação como também para o processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T. A ativação de células T nos nódulos linfáticos pelas células dendríticas resulta em células T efetoras, as quais são recrutadas para a placa aterosclerótica. As células T presentes nas placas ateroscleróticas subdividem-se em células Th1 e Th2, pró-aterogénicas, e células Treguladoras, anti-aterogénicas (revisto em [16, 17]). As células B encontram-se igualmente presentes nas lesões ateroscleróticas, nomeadamente no tecido linfoide da túnica adventícia. No caso das células B1 participam na imunidade sistémica através da produção de imunoglobulina M (IgM), ao passo que as células B2 representam as células B convencionais responsáveis pela produção de imunoglobulina G (IgG) após a ativação por antígenos específicos. Têm sido descritos anticorpos IgM e IgG dirigidos contra as oxLDL, com evidências de um papel protetor mas também pró-aterogénico (revisto em [16, 17]).

Nesta fase do processo aterosclerótico verifica-se igualmente o envolvimento das células do músculo liso na aterogénese, as quais migram a partir da túnica média até à íntima, em resposta a citocinas pró-inflamatórias, onde sofrem divisão e produzem matriz extracelular em quantidades excessivas. Consequentemente, o excesso de matriz extracelular resulta na formação da lesão aterosclerótica típica designada de ateroma e que consiste num núcleo de lípidos, incluindo cristais de colesterol, e de células, algumas das quais apoptóticas e/ou necróticas, revestido e separado do lúmen por uma cápsula fibrosa (Figura 1.3). As células do músculo liso presentes na íntima são responsáveis pela formação do tecido fibrótico que compõe a cápsula fibrosa bem como pela síntese da matriz de colagénio que confere resistência à mesma. Por um lado a acumulação de tecido fibrótico contribui para a formação do núcleo necrótico ao suprimir o fornecimento de nutrientes nas camadas mais profundas da parede arterial, contudo previne igualmente o contacto da corrente sanguínea com o conteúdo trombogénico presente nesse núcleo necrótico [5, 19]. O ateroma desenvolve-se na camada mais interna da artéria, a íntima, no entanto, por vezes, verifica-se igualmente a acumulação de células do sistema imunitário,

nomeadamente macrófagos, células dendríticas e linfócitos, na adventícia onde evoluem para estruturas linfoides terciárias (Figura 1.3) (revisto em [16]).

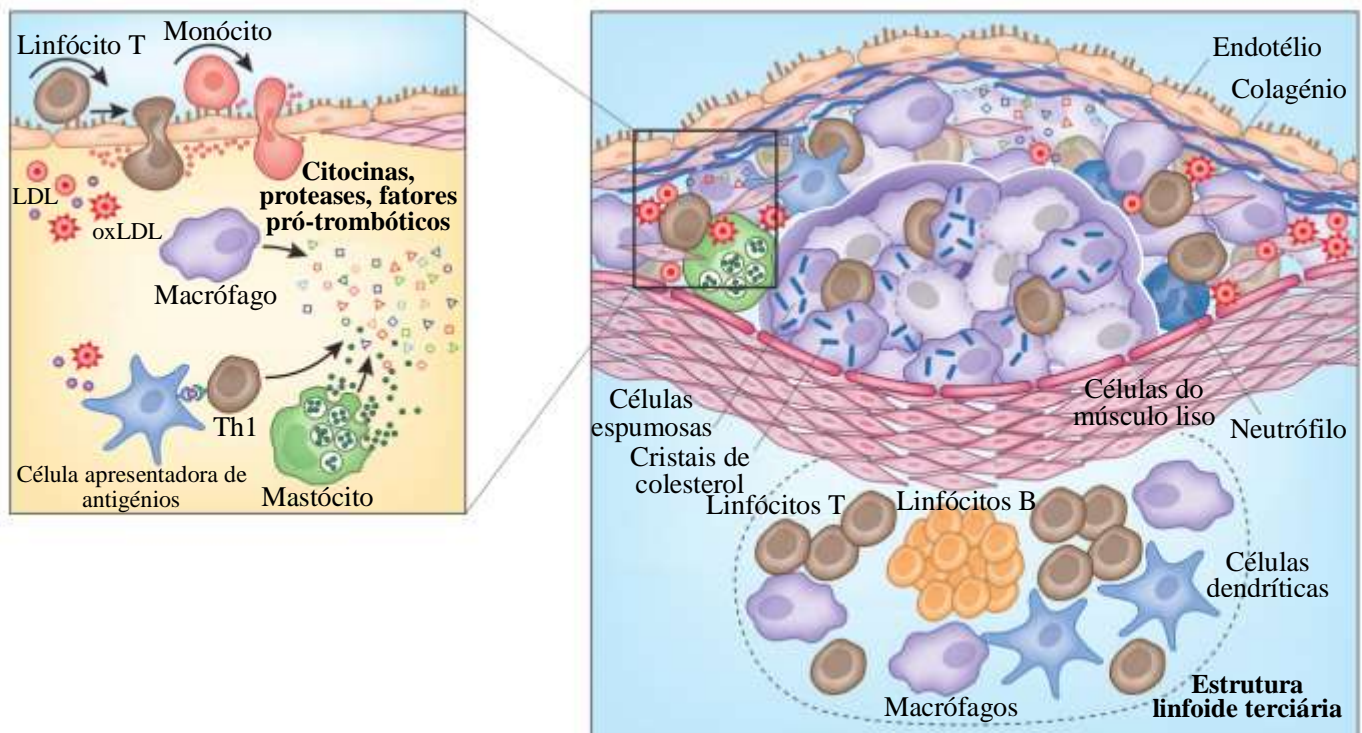


Figura 1.3: O ateroma forma-se na íntima em consequência da retenção subendotelial de partículas de LDL e oxLDL e apresenta um núcleo de lípidos, incluindo cristais de colesterol, e de células da resposta imunitária, vivas e apoptóticas, revestido por uma cápsula fibrosa constituída por tecido fibrótico e uma matriz de colagénio. Na adventícia verifica-se a acumulação de células do sistema imunitário com, consequente, formação de uma estrutura linfóide terciária. (Adaptado de [16])

### 1.3.3 Complicações da doença aterosclerótica

A deposição excessiva de matriz de colagénio na placa aterosclerótica contribui significativamente para o estreitamento do lúmen da parede arterial, o que pode resultar em eventos isquémicos em consequência do suprimento do fluxo sanguíneo. No entanto, a complicação mais gravosa da doença aterosclerótica relaciona-se com o enfraquecimento da matriz devido à secreção de proteases em certas áreas da placa aterosclerótica uma vez que pode culminar na rutura da cápsula fibrosa, num estado já vulnerável, com formação de um trombo e, consequente, ocorrência de eventos trombogénicos [19]. A morte apoptótica das células constituintes da placa aterosclerótica, na sua maioria macrófagos mas também células endoteliais e do músculo liso, aumenta igualmente o risco de rutura. Deste modo, a disrupção da placa deve-se ao decréscimo do número de células do músculo liso viáveis necessárias para a produção de colagénio e estabilização da cápsula fibrosa, assim como ao aumento do número de células apoptóticas ricas em fatores teciduais presentes na lesão aterosclerótica [20]. Num estado



avançado da doença aterosclerótica, o endotélio desempenha um papel crítico ao atuar como uma barreira final de separação entre a placa aterosclerótica e o lúmen da artéria, o que mostra os efeitos nefastos da apoptose em células endoteliais uma vez que culmina na ruptura da placa e torna-as pró-coagulantes com consequente aumento da adesão de plaquetas (revisto em [21]).

O trombo pode ocluir a artéria no local da sua formação ou destacar-se e bloquear o lúmen arterial noutro local distante. A causa mais frequente da sua formação deve-se à exposição do núcleo altamente trombogênico do ateroma à corrente sanguínea por ruptura na placa, uma vez que desencadeia a agregação de plaquetas e a ativação da cascata de coagulação. No entanto, a sua formação pode dever-se igualmente à erosão da camada endotelial, o que expõe a matriz de colagénio subendotelial da íntima à corrente sanguínea, ou mesmo ainda à presença de pequenas regiões de mineralização denominadas de nódulos calcificados que sobressaem a partir da íntima para a corrente sanguínea originando a formação de trombos nesses locais. Nas duas últimas situações a oclusão trombótica ocorre sem que haja ruptura na placa. A calcificação constitui uma característica comum do ateroma nascente, sendo indicativa da presença de placa aterosclerótica, maioritariamente na artéria coronária [5, 19].

## 1.4 O papel dos macrófagos na placa aterosclerótica

### 1.4.1 Recrutamento e consequente diferenciação

As placas ateroscleróticas não se encontram aleatoriamente distribuídas, mas tendem antes a formar-se nos pontos de ramificação e curvatura de artérias de grande e médio calibre nos quais o fluxo laminar sofre distúrbios ou é insuficiente para manter o estado normal do endotélio. Como tal, ocorre a ativação do endotélio, o que aumenta a permeabilidade da camada endotelial a lipoproteínas aterogênicas e a acumulação de proteínas da matriz extracelular. Este processo culmina na retenção de lipoproteínas e no espessamento da íntima, e promove o recrutamento de monócitos em circulação (revisto em [22, 23]). O recrutamento dos monócitos para áreas predispostas das artérias constitui um dos principais eventos patogénicos envolvidos na aterogénese, e requer a integração de três processos distintos, nomeadamente a captura, o rolamento e a transmigração dos monócitos, sendo cada passo regulado por múltiplos fatores moleculares, por vezes sobreponíveis (Figura 1.4) (revisto em [24]).

Em murganhos *ApoE*<sup>-/-</sup> hipercolesterolémicos o número de monócitos em circulação é, aproximadamente, 50% superior ao observado em murganhos *wild-type*. Tal incremento é devido ao aumento da monocitose dominada por monócitos LY6C<sup>hi</sup>, os quais representam a maioria das células recrutadas para as placas ateroscleróticas enquanto percursoros dos macrófagos inflamatórios M1 [25]. A captura e o rolamento dos monócitos na camada endotelial

depende da imobilização de quimiocinas, particularmente CCL5 e CXCL1, nos glicosaminoglicanos das células endoteliais, e da sua interação com os recetores de monócitos CCR5 e CXCR1, respetivamente. As seletinas desempenham igualmente um papel fundamental no recrutamento dos monócitos, nomeadamente a interação entre a P-seletina expressa pelas células endoteliais e o seu ligando PSGL1. Por sua vez, a ligação das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 aos recetores VLA4 e LFA1, respetivamente, dirige a adesão firme dos monócitos à superfície do endotélio (revisto em [26]). A transmigração dos monócitos através do endotélio para a íntima é mediada por quimiocinas, sendo CCL2, CX3C e CCL5 as três principais implicadas na aterogénese a par com os seus respetivos recetores CCR2, CX3CR1 e CCR5 [27]. Mallat e seus colaboradores mostraram que a inibição combinada das três quimiocinas supra citadas reduz em 90% a aterosclerose em murganhos *ApoE*<sup>-/-</sup> [28].

A migração dos monócitos culmina na sua diferenciação em macrófagos, os quais, à semelhança dos seus precursores monocíticos, apresentam heterogeneidade em termos de fenótipo. Nas lesões ateroscleróticas humanas predominam macrófagos de fenótipo M1, de ativação clássica por ligandos de TLRs e pelo interferão- $\gamma$ , e M2, de ativação alternativa pelas interleucinas IL-4 e IL-13. Os macrófagos M1, designados de inflamatórios, encontram-se bastante presentes nas placas ateroscleróticas em progressão e derivam dos precursores monocíticos LY6C<sup>hi</sup>, de rato, correspondentes aos monócitos de fenótipo CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> em humanos. Secretam citocinas pró-inflamatórias como interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *Tumor Necrosis Factor*), produzindo igualmente níveis elevados de óxido nítrico. Adicionalmente, os macrófagos M1 expressam fatores de transcrição pró-inflamatórios, nomeadamente NF- $\kappa$ B, AP-1 e HIF-1, assim como moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II e moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 envolvidas na ativação de células Th1. Por sua vez, os macrófagos anti-inflamatórios de fenótipo M2, derivados de precursores monócitos LY6C<sup>low</sup>, de rato, correspondentes aos monócitos humanos CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, compõem as placas ateroscleróticas em regressão uma vez que secretam citocinas anti-inflamatórias como interleucinas IL-1RA e IL-10, expressam níveis elevados de arginase 1 e secretam colagénio responsável pela promoção da reparação tecidual desempenhando, assim, um papel crítico para a resolução da lesão inflamatória (revisto em [17, 24]). Em lesões ateroscleróticas avançadas, o comprometimento da resolução da inflamação pode resultar do desequilíbrio no rácio entre macrófagos M1 e M2. No entanto são vários os fatores capazes de modificar o balanço a favor da diferenciação em macrófagos M2, nomeadamente o aumento de moléculas secretadas pelas células Th2 (revisto em [29]).

Os macrófagos presentes nas lesões ateroscleróticas caracterizam-se pela captação de lipoproteínas aterogénicas, um dos eventos patogénicos iniciais da aterogénese e que resulta na formação de células espumosas que compõem as estrias gordurosas, numa primeira fase da aterosclerose, e o núcleo do ateroma, mais tardiamente (Figura 1.4) (revisto em [17]). Devido ao aumento do ambiente oxidativo verificado na parede arterial, as LDL sofrem modificações

oxidativas e são reconhecidas por PRRs presentes em células do sistema inato, fundamentalmente macrófagos, os quais reconhecem epítomos específicos da oxidação das LDL. Mecanismos oxidativos mediados por enzimas, como lipoxigenase 12/15 e mieloperoxidase, bem como radicais livres, nomeadamente superóxido, radical hidroxilo e óxido nítrico, são capazes de promover a oxidação das partículas de LDL na íntima arterial [15]. Os recetores *scavenger* desempenham um papel fundamental na aterogénese enquanto PRRs expressos pelos macrófagos devido à sua capacidade para reconhecer e processar as partículas de oxLDL (Figura 1.4) [18]. Numerosos recetores *scavenger* têm sido descritos na formação de células espumosas, nomeadamente SR-A1, MARCO, CD36, SR-B1, SREC1, LOX1 e SR-PSOX [15]. No entanto, estudos *in vitro* mostram os recetores *scavenger* SR-A1 e CD36 enquanto responsáveis por 75-90% da degradação das partículas de LDL modificadas por acetilação ou oxidação [30].

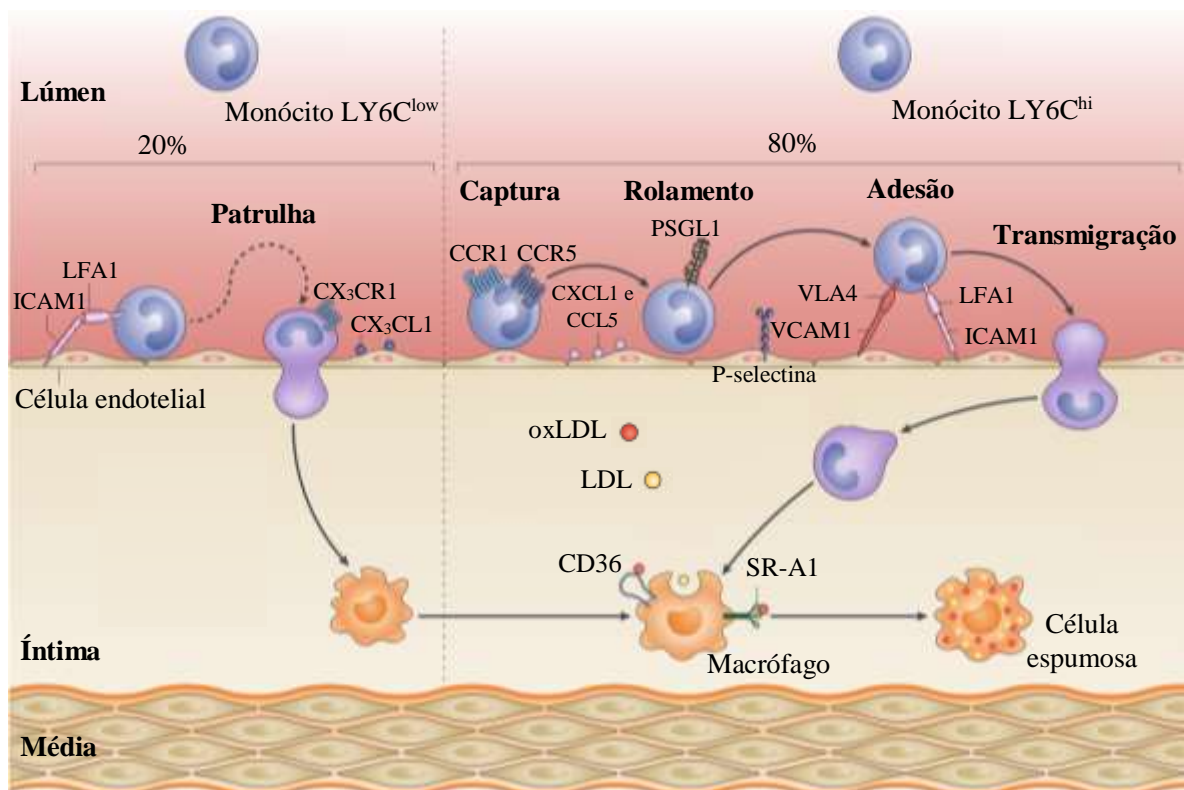


Figura 1.4: Os monócitos LY6C<sup>hi</sup> representam o principal tipo de monócitos em circulação recrutado para a placa aterosclerótica (80%) ao passo que os monócitos LY6C<sup>low</sup> (20%) representam monócitos em patrulha. O recrutamento dos monócitos envolve vários passos, nomeadamente captura, rolamento, adesão e transmigração, nos quais intervêm inúmeros fatores, e culmina na sua diferenciação em macrófagos. A captação de oxLDL pelos recetores scavenger dos macrófagos, e de LDL nativa em menor extensão, resulta na formação de células espumosas características dos vários estádios da placa aterosclerótica. (Adaptado de [24])

### 1.4.2 Apoptose e subsequente eferocitose

Apesar da acumulação dos macrófagos na placa aterosclerótica e a formação das células espumosas serem centrais na fisiopatologia da doença aterosclerótica, alguns estudos têm

mostrado que a retenção dos macrófagos pode ser revertida, com regressão da placa aterosclerótica e resolução da inflamação (Figura 1.5) (revisto em [24]). Para que a resolução do processo inflamatório seja bem-sucedida torna-se necessário que ocorra a inibição do recrutamento de novas células do sistema imunitário assim como a promoção do egresso das células do local da inflamação. Contudo, verifica-se o aumento da acumulação de monócitos durante a formação do ateroma em lesões ateroscleróticas de murganhos *Apoe*<sup>-/-</sup>, sendo essa acumulação proporcional à área da lesão e aumentada com a ocorrência de hipercolesterolemia [31]. Deste modo, a supressão do influxo de células inflamatórias mostra-se deficiente contribuindo para a resolução deficiente da inflamação na lesão aterosclerótica. Os macrófagos anti-inflamatórios M2 predominam nas lesões ateroscleróticas iniciais, no entanto a progressão das placas ateroscleróticas em lesões inflamatórias avançadas e mais complexas resulta no aumento da frequência do fenótipo inflamatório M1. As placas em regressão apresentam igualmente um declínio no número de macrófagos presentes acompanhado de alteração das suas características fenotípicas com enriquecimento em macrófagos de fenótipo M2 [32]. A deleção do fator KLF4 em murganhos *Apoe*<sup>-/-</sup>, capaz de promover a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2 e inibir o fenótipo M1, aumenta a ativação pró-inflamatória dos macrófagos M1 e a formação de células espumosas, além de acelerar a apoptose [33].

O egresso das células inflamatórias, fundamentalmente macrófagos, da placa aterosclerótica sucede-se por transmigração reversa através do endotélio para o lúmen, ou pela migração através da íntima até aos vasos linfáticos na adventícia (Figura 1.5). No entanto, a captura de colesterol pelos macrófagos aumenta a expressão de neutrina 1 e semaforina 3E, enquanto moléculas inibidoras da migração, pelos mesmos [34, 35]. De facto, a deficiência de neutrina 1 em murganhos *Ldlr*<sup>-/-</sup> reduz a progressão da lesão aterosclerótica e aumenta a emigração de macrófagos a partir da mesma [34]. Trogan e seus colaboradores mostraram que o transplante de segmentos da aorta de murganhos *Apoe*<sup>-/-</sup> contendo a placa aterosclerótica em murganhos *wild-type* com níveis baixos de colesterol resulta no decréscimo do tamanho da placa e do número de células espumosas devido à migração de células inflamatórias para os vasos linfáticos adventícios. Mais, a egressão das células inflamatórias mostrou ser fortemente dependente do recetor de quimiocinas CCR7, um fator essencial para a migração, uma vez que se observou um aumento dos respetivos níveis de mRNA e de proteína nas células espumosas isoladas dos murganhos *wild-type*, além que o tratamento *in vivo* com anticorpos dirigidos contra os ligandos do recetor CCR7 resulta na preservação, e não na diminuição, do tamanho da lesão e do número de células espumosas [36].

As partículas de oxLDL têm sido amplamente estudadas enquanto ligandos presentes nas placas ateroscleróticas para os PRRs, e a sua internalização, apesar de poder ser considerada benéfica no início da resposta imunitária, resulta num excesso de macrófagos carregados de lípidos devido à ausência de controlo negativo, o que compromete as funções do sistema imunitário (revisto em [24]). A captação das lipoproteínas pelos macrófagos é procedida pelo

seu transporte para o lisossoma onde os ésteres de colesterol constituintes das mesmas são hidrolisados a colesterol livre e ácidos gordos. O transporte do colesterol livre para o retículo endoplasmático dos macrófagos resulta na sua reesterificação pela enzima acil-coenzima A:colesterol aciltransferase e, subsequente, armazenamento em gotas lipídicas no citosol, o que confere a “aparência espumosa” característica das células espumosas. Deste modo, o colesterol presente nas lipoproteínas aterogênicas internalizadas pelos macrófagos encontra-se, na sua maioria, esterificado, sendo reduzido o conteúdo de colesterol livre nos macrófagos das lesões ateroscleróticas iniciais (revisto em [37]). No entanto, devido à captura excessiva de partículas de oxLDL pelos macrófagos, o metabolismo de colesterol pode ficar sobrecarregado e resultar em processos patogénicos, nomeadamente através do armazenamento de colesterol na forma livre, tóxica para a célula. De facto, a deficiência combinada dos recetores *scavenger* SR-A1 e CD36 reduz a formação de células espumosas e a área da lesão aterosclerótica em murinhos *ApoE*<sup>-/-</sup>. Adicionalmente atenua a inflamação e a apoptose de macrófagos e, conseqüentemente, a progressão para lesões necróticas mais avançadas [38]. O enriquecimento das membranas do retículo endoplasmático com colesterol livre mostra-se responsável pela reesterificação deficiente do colesterol e promove o aumento de colesterol não-esterificado. Deste modo, a desregulação do metabolismo lipídico e, conseqüente, acumulação de colesterol livre contribui para a ocorrência de *stress* do retículo endoplasmático em macrófagos, o qual, se prolongado e combinado com outros estímulos, resulta na morte apoptótica dos mesmos (Figura 1.5) (revisto em [24, 29]).

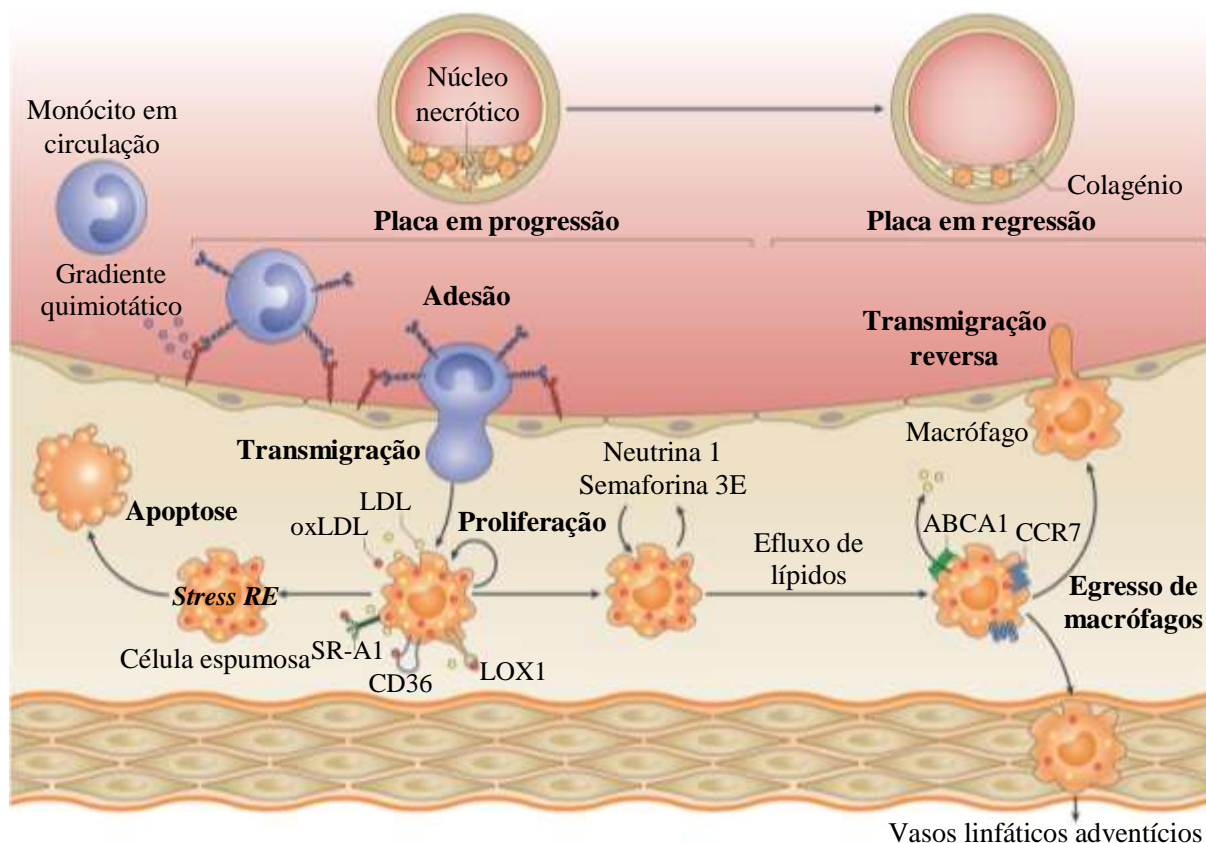


Figura 1.5: O recrutamento persistente de monócitos em circulação em conjunto com a captura excessiva de lipoproteínas aterogênicas, LDL e oxLDL, pelos macrófagos e a desregulação do metabolismo lipídico culmina na retenção de macrófagos em consequência da expressão de fatores de retenção, como neutrina 1 e semaforina 3E, pelas células espumosas. Os macrófagos acumulados na placa em progressão entram em stress do retículo endoplasmático, o qual, se prolongado, resulta na apoptose dos macrófagos. O efluxo de lipídios das células espumosas a par com o egresso dos macrófagos por transmigração reversa ou através dos vasos linfáticos adventícios permite a regressão da placa aterosclerótica. (Adaptado de [24])

A morte de células por apoptose encontra-se presente em diferentes estádios do desenvolvimento de placas ateroscleróticas [20]. É presumível que, pelo menos, alguns dos indutores de apoptose em macrófagos variem consoante o estágio da lesão aterosclerótica, sendo diferentes nas lesões iniciais em comparação com as lesões mais avançadas. Vários fatores pró-apoptóticos em macrófagos têm sido sugeridos com base em modelos de lesões ateroscleróticas, entre os quais se encontram elevadas concentrações de oxLDL, oxisteróis, TNF, proteína pró-apoptótica Bax, ligando Fas, óxido nítrico, hipoxia, acumulação intracelular de colesterol livre não-esterificado, entre outros (revisto em [39]).

Na fase inicial do processo aterogênico, a apoptose ocorre em regiões ricas em macrófagos e resulta numa menor progressão da placa. Sinensky e seus colaboradores mostraram que a redução da atividade apoptótica em macrófagos devido à deficiência na proteína pró-apoptótica Bax estimula a aterosclerose em murganhos *Ldlr<sup>-/-</sup>*, o que suporta a hipótese da apoptose dos

macrófagos suprimir o processo aterosclerótico na sua fase inicial [40]. A explicação pode residir no facto dos macrófagos M2 apoptóticos serem removidos de forma eficiente no estágio inicial da aterosclerose por macrófagos M1 vizinhos, num processo designado de eferocitose. Deste modo, as lesões ateroscleróticas iniciais apresentam poucas células inflamatórias e necróticas pós-apoptóticas assim como maior predominância de mediadores anti-inflamatórios. Haskard e seus colaboradores demonstraram que a deleção do complemento C1q, um mediador da eferocitose, resulta no aumento acentuado de macrófagos apoptóticos na fase inicial da lesão aterosclerótica em murganhos *Ldlr<sup>-/-</sup>* como consequência de uma eferocitose ineficiente [41]. Por outro lado, em estádios avançados da aterosclerose verifica-se um aumento da apoptose associado a necrose da placa em consequência de uma eferocitose deficiente (revisto em [29]). Um estudo comparativo, em humanos, de placas ateroscleróticas avançadas com tecidos controlo, no qual se avaliou a eferocitose *in situ* por quantificação de células apoptóticas livres ou associadas a macrófagos fagocíticos vizinhos, mostrou que a eferocitose é deficiente em estádios avançados da doença aterosclerótica [42]. A eferocitose das células apoptóticas pelos macrófagos vizinhos constitui, deste modo, um passo fundamental na resolução da inflamação, e a sua eficiência requer o metabolismo de colesterol intacto, nomeadamente a esterificação e o efluxo [39, 43]. Caso contrário, a capacidade fagocítica dos macrófagos é comprometida e as células apoptóticas progridem para necrose secundária. Adicionalmente, verifica-se o estreitamento e enfraquecimento, com consequente rutura, da cápsula fibrosa, o que, a par com a necrose secundária, resulta na libertação de componentes celulares, nomeadamente fatores teciduais e lipídicos constituintes do núcleo necrótico e trombogênico característico da placa aterosclerótica instável e vulnerável (Figura 1.6) (revisto em [39])

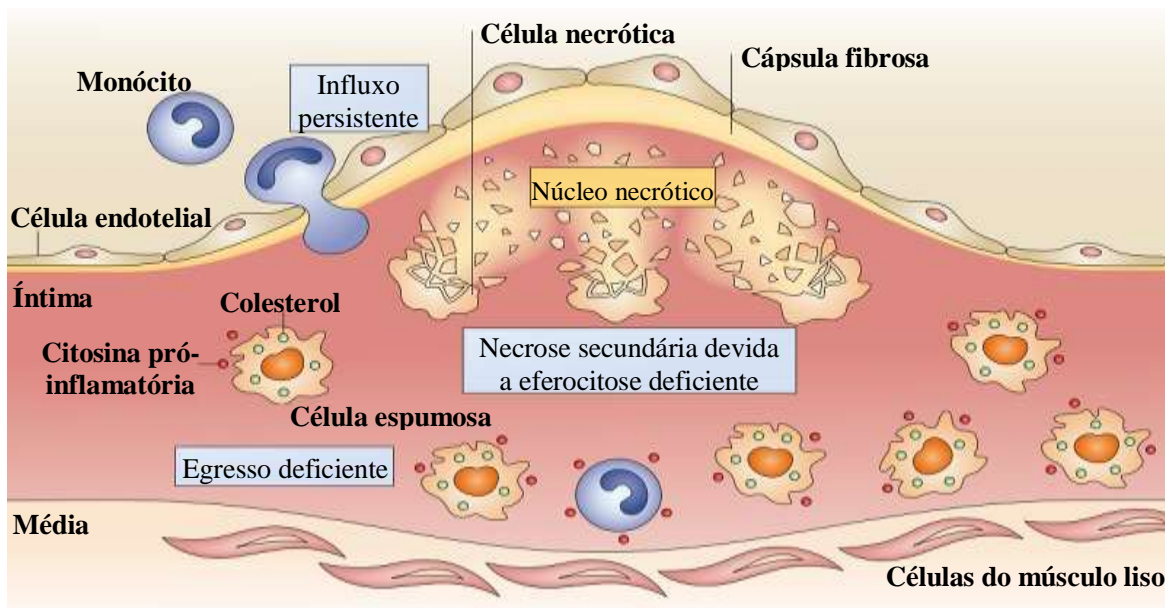


Figura 1.6: O influxo persistente de monócitos a par com o egresso deficiente resulta na acumulação das células espumosas na íntima onde sofrem morte por apoptose. A eferocitose deficiente dos macrófagos apoptóticos



resulta na necrose secundária pós-apoptótica dos mesmos contribuindo para a formação do núcleo necrótico e promovendo a disrupção da placa aterosclerótica. (Adaptado de [29])

## 1.5 O stress do retículo endoplasmático na aterogênese

### 1.5.1 O papel da UPR no stress do retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático encontra-se presente em todas as células eucarióticas nas quais é maioritariamente reconhecido pelo seu papel no enovelamento e na modificação pós-traducional de proteínas recém-sintetizadas. Todos os polipeptídeos destinados à secreção são importados para o lúmen do retículo de modo a adquirir a estrutura terciária adequada assim como as modificações pós-traducionais necessárias, entre as quais se inclui a formação de pontes dissulfureto e a glicosilação. Adicionalmente, o retículo encontra-se igualmente envolvido na síntese dos fosfolípidos que compõem a bicamada lipídica, a qual é expandida no retículo e posteriormente mobilizada para as membranas dos organelos em necessidade. O retículo participa ainda no metabolismo de xenobióticos uma vez que as principais enzimas metabolizadoras, nas quais se inclui a grande família do citocromo P450, tem a sua localização no retículo endoplasmático. Por fim, representa um dos principais reservatórios de cálcio na célula (revisto em [44, 45]). Cerca de um terço das proteínas sintetizadas são transportadas para o lúmen do retículo endoplasmático, através do canal SEC61 localizado na membrana do retículo, onde adquirem uma conformação tridimensional como resultado do enovelamento e de modificações pós-traducionais sendo, posteriormente, transportadas para a superfície da célula ou para vários organelos celulares (revisto em [46]). Somente as proteínas corretamente enoveladas são libertadas do retículo endoplasmático para outros organelos intracelulares ou para a superfície da célula. Assim sendo, as proteínas mal/não-enoveladas são retidas no lúmen do retículo em associação com *chaperones* moleculares ou dirigidas para degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma [47]. O aumento da exigência pelo enovelamento de proteínas ou a ocorrência de estímulos (perturbações no estado *redox* ou na regulação do cálcio, mutação genética, privação de glucose, isquemia, infeção viral, entre outros) resulta na acumulação de proteínas não-enoveladas que, pela sua tendência a agregar, são extremamente citotóxicas. Este processo desencadeia a ocorrência de *stress* do retículo endoplasmático e, conseqüentemente, a ativação da resposta a proteínas não-enoveladas (UPR, do inglês *Unfolded Protein Response*) pelas células eucarióticas. A UPR consiste, assim, numa via de sinalização adaptativa iniciada face à ocorrência de *stress* do retículo a fim de reestabelecer o enovelamento das proteínas e o estado de homeostasia no retículo endoplasmático (revisto em [48]).

Em organismos eucarióticos superiores a UPR é mediada por três proteínas localizadas na membrana do retículo endoplasmático, nomeadamente a enzima dependente de inositol 1 (IRE1,



do inglês *Inositol-Requiring Enzyme 1*), a cinase do retículo endoplasmático semelhante à PERK (PERK, do inglês *PKR-Like Endoplasmic Reticulum Kinase*) e o fator ativador da transcrição 6 (ATF6, do inglês *Activating Transcription Factor 6*), as quais, na ausência de *stress*, se encontram num estado inativo complexadas com a proteína de ligação a imunoglobulina (GRP78/BIP, do inglês *Binding Immunoglobulin Protein*), uma chaperona residente no retículo endoplasmático. Perante a acumulação de proteínas não-enoveladas, a proteína GRP78/BIP é recrutada para se associar a estas dissociando-se, assim, das proteínas supra mencionadas. A ativação dos três sensores de *stress* supra mencionados culmina na transcrição de genes que codificam para enzimas envolvidas em diversos processos metabólicos a fim de contrariar o estado de *stress* a que a célula se encontra exposta.

Em respeito ao ATF6, a dissociação da proteína GRP78/BIP expõe a sequência de localização do Golgi (GLS, do inglês *Golgi-Localization Signal*) presente no domínio luminal da proteína ATF6, o que desencadeia a sua mobilização para o complexo de Golgi onde é sequencialmente clivada pelas proteases S1P e S2P com libertação do domínio citoplasmático (revisto em [46, 48]). A clivagem resulta na libertação do fragmento ATF6<sub>f</sub> que é transportado para o núcleo onde se liga a elementos de resposta ao *stress* do retículo endoplasmático (ERSEs, do inglês *Endoplasmic Reticulum-Stress Response Elements*) e, conseqüentemente, induz a transcrição de vários genes, incluindo GRP78/BIP, proteína 1 de ligação à X-box (XBP1, do inglês *X-Box Binding Protein 1*) e proteína homóloga da C/EBP (CHOP, do inglês *C/EBP Homologous Protein*) [48, 49].

No caso da proteína IRE1, a dissociação da GRP78/BIP induz a sua homodimerização e ativação por auto-fosforilação. Quando fosforilada a IRE1 apresenta atividade de endoribonuclease sendo capaz de excisar um fragmento de 26 pares de bases a partir do mRNA da XBP1 que passa, assim, a designar-se de XBP1<sub>s</sub> (*s* advém do inglês *spliced*). A indução da transcrição do gene XBP1 pode ser mediada pelo ATF6<sub>f</sub>, o que mostra a interação entre as diferentes vias da UPR [49]. A tradução do mRNA origina a proteína XBP1<sub>s</sub> que transloca para o núcleo onde se liga a elementos da UPR (UPREs, do inglês *UPR Elements*) e ativa vários genes cruciais para a função secretória (revisto em [48]). Alguns dos genes transcritos originam produtos envolvidos na síntese de proteínas, na glicosilação e na formação de pontes dissulfureto, a fim de favorecer o enovelamento de proteínas, assim como na degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD, do inglês *Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*), e na biogênese do retículo endoplasmático através do aumento da síntese de lípidos [50]. Um dos genes alvo da XBP1<sub>s</sub> é o *p58<sup>IPK</sup>* capaz de regular negativamente a atividade da PERK evidenciando, uma vez mais, o cruzamento entre as diversas vias. Adicionalmente, a IRE1 fosforilada apresenta atividade de cinase que se evidencia pela ativação da cinase JNK, através das proteínas TRAF-2 e ASK1. A ativação da JNK, por sua vez, promove a adaptação da célula perante a ocorrência de *stress* e a sobrevivência ao induzir autofagia. No entanto, níveis

elevados e continuados de *stress* podem culminar na morte programada da célula através da via da apoptose mediada pela caspase-12 (revisto em [48]).

Em semelhança à proteína IRE1, a PERK é igualmente ativada por auto-fosforilação em consequência da dissociação da GRP78/BIP uma vez que o seu domínio citoplasmático possui atividade de cinase sendo capaz de, quando ativado, iniciar a fosforilação de outras moléculas PERK e promover, assim, a sua oligomerização. A PERK fosforilada é, assim, capaz de fosforilar, e consequentemente inativar, o fator de iniciação eucariótico  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ , do inglês *Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$* ), o que inibe a tradução da maioria das proteínas com subsequente indução do bloqueio do ciclo celular na fase G1 e, portanto, do crescimento, de modo a evitar fontes adicionais de *stress* do retículo endoplasmático [51, 52]. No entanto, devido à presença de ORF, a tradução do mRNA do fator ativador da transcrição 4 (ATF4, do inglês *Activating Transcription Factor 4*) não é suprimida resultando na formação da proteína ATF4 capaz de induzir a transcrição de genes alvo da UPR [53]. Alguns exemplos incluem os genes GADD34, que, por sua vez inibe a via da PERK ao promover a desfosforilação do *p*-eIF2 $\alpha$ , e a CHOP, capaz de induzir a apoptose quando a célula é exposta a níveis de *stress* irreparáveis. Verifica-se, ainda, a indução da transcrição de genes envolvidos no metabolismo de ácidos gordos e na resposta ao *stress* oxidativo (revisto em [48]).

Apesar dos diferentes sensores serem ativados simultaneamente em consequência da dissociação da *chaperone* GRP78/BIP, as vias induzidas pelos mesmos parecem apresentar espaçamentos temporais entre si. De facto, a ocorrência de *stress* manifesta-se primariamente pela ativação da via da PERK, sendo que a fosforilação do fator eIF2 $\alpha$  a par da inibição da síntese de novas proteínas encontram-se completas 30 minutos após a exposição ao estímulo responsável pela ocorrência de *stress* [54]. Numa segunda fase da UPR sucede-se a ativação da via do sensor ATF6 e segue-se novamente a via da PERK na medida em que se verifica a transcrição do ATF4 pelo fator *p*-eIF2 $\alpha$  [55]. Tal acontecimento mostra a existência de um cruzamento temporal entre as diferentes vias da UPR. Numa fase posterior da UPR verifica-se a ativação da via da IRE1, a qual ocorre tardiamente às duas outras vias. A razão de tal atraso deve-se ao facto do substrato direto da IRE1, o mRNA da XBP1, ser expresso em baixos níveis quando as células se encontram no seu estado normal, sem *stress*, e a sua expressão ser dependente do ATF6. Deste modo, a sua expressão ocorre maioritariamente após a ativação e clivagem do ATF6, o que mostra, uma vez mais, a interação entre as diferentes vias da UPR [56].

Em jeito de resumo, a ativação da UPR visa a degradação das proteínas não-enoveladas, através da indução de vias de degradação associada ao retículo endoplasmático, assim como a inibição da síntese de novas proteínas, em consequência da fosforilação da eIF2 $\alpha$  mediada pela PERK, a expansão do retículo endoplasmático, pela indução da síntese de lípidos, e o favorecimento do enovelamento pela XBP1s.

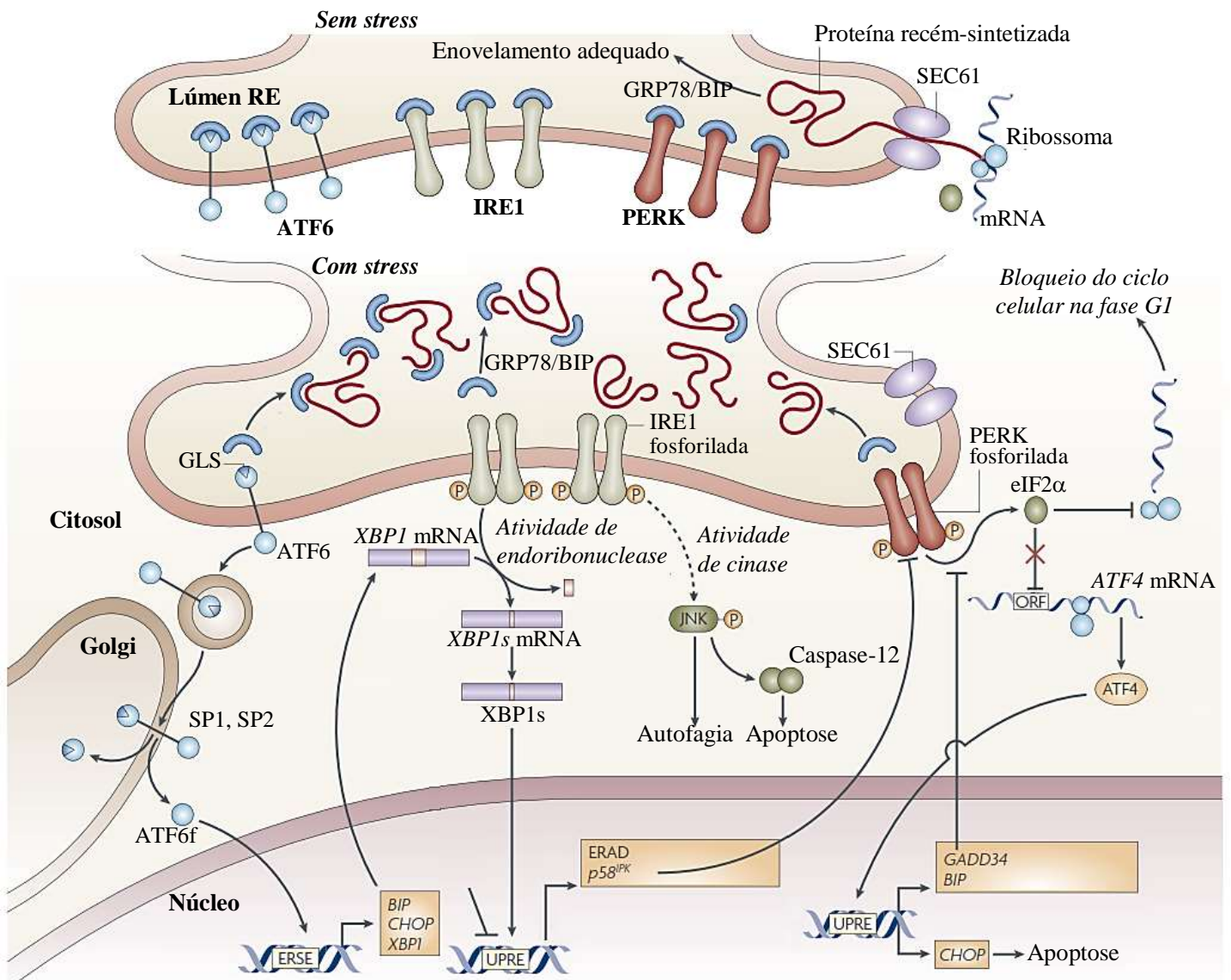


Figura 1.7: Em condições normais, sem stress, as proteínas IRE1, PERK e ATF6, situadas na membrana do retículo endoplasmático, encontram-se num estado inativo por associação com a proteína GRP78/BIP. As proteínas recém-sintetizadas transitam para o lúmen do retículo endoplasmático através do canal SEC61 onde sofrem um enovelamento adequado, no entanto, em condições de stress, a acumulação de proteínas não-enoveladas resulta na sua ligação à proteína GRP78/BIP que, assim, se dissocia das proteínas transmembranares anteriormente referidas. Consequentemente sucede-se a auto-fosforilação das proteínas IRE1 e PERK, assim como a mobilização do ATF6 para o complexo de Golgi com subsequente ativação. A ativação das proteínas ATF6, IRE1 e PERK induz a transcrição de vários genes alvo no núcleo, ainda que de forma diferente para cada uma das vias da UPR. De um modo geral, verifica-se a inibição da síntese de novas proteínas através da inibição temporária da tradução com subsequente indução do bloqueio do ciclo celular na fase G1 e, portanto, do crescimento, assim como o aumento da capacidade secretória da célula e da degradação associada ao retículo endoplasmático. Quando a célula atinge níveis de stress irrecuperáveis verifica-se a transcrição do gene codificante da proteína CHOP capaz de induzir a apoptose da célula. (Adaptado de [48])

## 1.5.2 Ativação da UPR na doença aterosclerótica

O *stress* do retículo endoplasmático verifica-se ao nível da placa aterosclerótica, particularmente em estádios avanços da doença aterosclerótica, como é possível constatar pelo estudo de modelos animais de aterosclerose e, mais importante, através da análise de lesões ateroscleróticas humanas (revisto em [21]). Embora existam evidências da sua contribuição para a apoptose em células do músculo liso e endoteliais, os macrófagos representam o principal tipo de célula afetada pelo *stress* do retículo endoplasmático (revisto em [21]). Em condições normais, sem *stress*, os macrófagos fagocitam partículas de oxLDL e transportam o colesterol constituinte das mesmas para o retículo endoplasmático a fim de sofrer reesterificação e formar gotas lipídicas inertes. Em condições de *stress*, o transporte ineficiente de colesterol livre não-esterificado para o retículo endoplasmático resulta na sua acumulação intracelular, o que representa o passo-chave de sinalização para a indução da apoptose em macrófagos. Uma vez que a quantidade de colesterol presente na membrana do retículo endoplasmático é particularmente baixa, o organelo é bastante sensível ao enriquecimento em colesterol livre, o que acarreta alterações da fluidez normal da membrana e disfunção de proteínas integrais membranares com, conseqüente, ativação da UPR (revisto em [37]). Tabas e seus colaboradores mostraram que a ocorrência de uma mutação heterozigótica na proteína NPC1, envolvida no tráfego de colesterol, inibe o transporte do colesterol derivado das lipoproteínas para o retículo endoplasmático. Este bloqueio impede a ativação da UPR e a indução da apoptose pelo colesterol livre não-esterificado em macrófagos [57]. Adicionalmente, foi demonstrado que em lesões ateroscleróticas avançadas de murganhos *ApoE*<sup>-/-</sup>; *Ncp1*<sup>+/-</sup> esta alteração no tráfego de colesterol resultou num decréscimo acentuado da apoptose em macrófagos e, conseqüentemente, da necrose da placa aterosclerótica [57]. Posto isto, os autores realizaram outro estudo no qual demonstraram que o excesso de colesterol livre nos macrófagos resulta na ativação da UPR por depleção do cálcio armazenado. Caso o transporte de colesterol não-esterificado para o retículo seja inibido, a depleção de cálcio e a ativação da UPR, da caspase-3 e da apoptose são igualmente inibidas. Adicionalmente, esse mesmo estudo mostrou que os macrófagos *Chop*<sup>-/-</sup> se encontravam protegidos da apoptose induzida pelo colesterol [43].

A ativação da UPR verifica-se em todos os estádios de desenvolvimento da lesão aterosclerótica, como mostra o estudo de Austin e seus colaboradores por recurso a seções da aorta de murganhos *ApoE*<sup>-/-</sup> com 9 (lesões iniciais) e 23 (lesões avançadas) semanas de idade [58]. No entanto, apesar de se ter verificado a acumulação de colesterol livre e a ativação da UPR em macrófagos derivados de lesões ateroscleróticas iniciais, não foi evidente a ocorrência de morte apoptótica exceto nas lesões mais avançadas, o que sugere a necessidade pela ativação de mediadores e/ou vias adicionais [58]. De facto, a acumulação intracelular de quantidades elevadas de colesterol livre é considerada um indutor da apoptose de macrófagos exclusivo das lesões ateroscleróticas avançadas, presumivelmente devido a defeitos na esterificação e no efluxo de colesterol. A progressão da lesão aterosclerótica correlaciona-se com o decréscimo no

conteúdo de ésteres de colesterol a par com o aumento no conteúdo de colesterol livre presente nos macrófagos (revisto em [21, 37]). Adicionalmente, denota-se a presença de 7-cetocolesterol, o principal oxisterol resultante da oxidação do colesterol presente nas partículas de oxLDL e frequentemente detetado em níveis elevados na placa aterosclerótica, capaz de, por si só, desencadear a apoptose dos macrófagos através da indução de *stress* do retículo endoplasmático (revisto em [21]). Um crescente número de evidências *in vitro* e *in vivo* sugerem a contribuição significativa do *stress* do retículo endoplasmático para a morte dos macrófagos num estágio avançado da doença aterosclerótica através da ativação de vias da UPR responsáveis pelo aumento da expressão da proteína CHOP [58, 59]. De facto, a expressão de marcadores de *stress* do retículo endoplasmático como a CHOP correlaciona-se com a apoptose dos macrófagos e a vulnerabilidade da placa aterosclerótica [59]. Tabas e seus colaboradores mostraram que a CHOP promove a apoptose dos macrófagos e a progressão do núcleo necrótico em lesões avançadas. Este facto foi demonstrado *in vivo* uma vez que a deficiência na proteína CHOP em murganhos *Apoe<sup>-/-</sup>* e *Ldlr<sup>-/-</sup>* resultou na diminuição da área lesional, da apoptose e da necrose do ateroma [60].

Adicionalmente ao *stress* do retículo endoplasmático, a apoptose desencadeada pelo excesso de colesterol livre em macrófagos pode ser igualmente proporcionada pela via apoptótica dependente da mitocôndria através do decréscimo do potencial da membrana mitocondrial, do aumento da proteína pró-apoptótica Bax ou da libertação de citocromo c [61]. A via apoptótica Fas, independente da mitocôndria, mostra-se igualmente envolvida na indução da apoptose em macrófagos com acumulação intracelular de colesterol livre. Os macrófagos de murganhos com mutações no recetor ou no ligando Fas apresentam resistência substancial à indução da apoptose [62]. Adicionalmente, a indução de morte em macrófagos *wild-type* pelo colesterol livre foi bloqueada pela utilização de um anticorpo dirigido contra o ligando Fas [62].

Apesar dos macrófagos representarem o principal tipo de célula afetada pelo *stress* do retículo endoplasmático, como já mencionado, as células do músculo liso mostram igualmente evidências de apoptose induzida por esse mecanismo (revisto em [21]). De facto, o tratamento de células do músculo liso com indutores de *stress* do retículo endoplasmático como 7-cetocolesterol [63] ou colesterol não-esterificado [64] correlaciona-se com o aumento na expressão da CHOP. Adicionalmente, a ativação da UPR tem sido identificada em células endoteliais tanto *in vitro* como *in vivo* como mostra o estudo de Karabina e seus colaboradores no qual formas modificadas de LDL, nomeadamente por fosforilação, mostraram ser capazes de induzir *stress* do retículo endoplasmático e ativar as vias da IRE1 e da PERK [65].

Em situações mais subtis de *stress* do retículo endoplasmático, além da acumulação excessiva de colesterol derivado das partículas de oxLDL na membrana do retículo [43], é necessário um segundo sinal. Este segundo sinal é, muitas das vezes, mediado por PRRs, nomeadamente pelos TLRs e recetores *scavenger*, levando à apoptose [66]. Entre os ligandos de PRRs capazes de desencadear a apoptose em macrófagos sob *stress* do retículo endoplasmático

encontram-se os fosfolípidos oxidados, componentes das partículas de oxLDL e frequentemente encontrados em lesões ateroscleróticas. De facto, o estudo de Tabas e seus colaboradores, mostra a indução da apoptose em macrófagos em *stress* pelos fosfolípidos oxidados através da ativação da via CD36-TLR2 uma vez que a deleção dos genes *Cd36* ou *Tlr2* em murganhos resulta na indução deficiente da apoptose em macrófagos [66]. A indução de *stress* do retículo endoplasmático pelos fosfolípidos oxidados verifica-se igualmente em células endoteliais. Lusa e seus colaboradores mostraram que o fosfolípido 1-palmitoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina oxidado (oxPAPC, do inglês *oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), componente reativo primário resultante da oxidação das partículas de LDL, ativa a UPR em células endoteliais da aorta humana de uma forma dependente dos fatores de transcrição ATF4 e XBP1 [67]. Assim sendo, é possível que os fosfolípidos oxidados (oxPLs, do inglês *oxidized phospholipids*) constituintes das partículas de oxLDL possam desempenhar um papel na ativação da UPR observada nos macrófagos residentes no ateroma.

Os oxPLs parecem estar igualmente envolvidos na apoptose de macrófagos a nível da placa de ateroma. De facto, o processo apoptótico requer a oxidação de dois fosfolípidos carregados negativamente, a cardiolipina (CL, do inglês *cardiolipin*), na mitocôndria, e a fosfatidilserina (PS, do inglês *phosphatidylserine*), na membrana plasmática. A CL oxidada possui um papel importante no processo iniciador da apoptose através da formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial necessário para a libertação de citocromo c para o citosol. Por sua vez, a oxidação da PS permite a sua externalização e o seu reconhecimento na superfície da célula pelos fagócitos (revisto em [68]). A oxidação destes fosfolípidos traduz-se no decréscimo da sua percentagem relativa assim como na alteração do perfil de fosfolípidos da célula. Curiosamente, existem estudos que mostram que a alteração no perfil de fosfolípidos se encontra associada a diversas situações de *stress* [69]. Posto isto, pondera-se a hipótese do *stress* do retículo endoplasmático poder induzir alterações no perfil lipídico da célula, notavelmente ao nível dos fosfolípidos.

## Capítulo 2

# Efeito do *stress* do retículo endoplasmático no perfil lipídico do macrófago

No presente capítulo abordam-se as possíveis repercussões da ocorrência de *stress* do retículo endoplasmático ao nível do metabolismo lipídico do macrófago. Considerando o estado atual do conhecimento, elucidado com uma breve introdução teórica, propôs-se avaliar os efeitos da indução de *stress* do retículo no perfil lipídico do macrófago numa primeira fase do trabalho. Neste capítulo encontra-se descrita a metodologia empregue assim como os resultados obtidos. Após a interpretação crítica dos mesmos, propõe-se algumas diretrizes futuras com base no compêndio de resultados alcançados.

## 2.1 Introdução

### 2.1.1 O *stress* do retículo na modelação do metabolismo lipídico

O *stress* do retículo endoplasmático e a disrupção do metabolismo lipídico têm sido intimamente ligados a variadas doenças como dislipidémia, esteatose hepática, obesidade, diabetes *mellitus* e doença cardiovascular. Evidências crescentes têm sugerido a importância da UPR na modelação do metabolismo lipídico em diversas células metabolicamente importantes, nomeadamente macrófagos, hepatócitos, adipócitos e células-beta (revisto em [70, 71]) A regulação do metabolismo lipídico face à ocorrência de *stress* do retículo parece envolver os três ramos de sinalização da UPR: PERK, IRE1 $\alpha$  e ATF6 [44, 50, 72-74]. Devido ao papel central do fígado na síntese, oxidação, transporte e excreção de lípidos [75], este tem sido alvo de inúmeros estudos no que respeita à modelação do metabolismo lipídico pela UPR (revisto em [44]), alguns dos quais serão apresentados na presente seção.

A importância da via mediada pela PERK na regulação do metabolismo lipídico foi demonstrada pelo estudo de Ron e seus colaboradores no qual forçaram a expressão da fosfatase GADD34 de modo a promover a desfosforilação e comprometer a sinalização mediada pelo fator

*p*-eIF2 $\alpha$  no fígado de ratos transgênicos [76]. Como resultado verificaram a diminuição da expressão do recetor PPAR $\gamma$  e dos fatores de transcrição C/EBP $\alpha$  e C/EBP $\beta$  nos ratos transgênicos quando suplementados com dieta rica em gorduras, o que se traduziu na redução da lipogénese e da produção de glucose hepática, respetivamente. Tais resultados sugerem a relevância da via PERK-*p*-eIF2 $\alpha$ -ATF4 na tradução de importantes reguladores transcricionais hepáticos e na promoção da lipogénese. Através de uma abordagem semelhante, Kaufman e seus colaboradores mostraram que a inativação do fator eIF2 $\alpha$  resulta na supressão da expressão do fator hepático C/EBP $\alpha$ . Por sua vez Guo e seus colaboradores mostraram o decréscimo da expressão de genes lipogénicos assim como o aumento da  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos em ratos deficientes em ATF4 [77]. Tendo em consideração os estudos supra mencionados é possível inferir da importância da via PERK-*p*-eIF2 $\alpha$  na promoção da lipogénese.

A via de sinalização mediada pelo sensor IRE1 $\alpha$  tem sido igualmente alvo de estudo no que respeita à sua função na regulação do metabolismo lipídico face à ocorrência de *stress* do retículo. Kaufman e seus colaboradores demonstraram a importância deste sensor na prevenção da esteatose hepática induzida pelo *stress* do retículo endoplasmático, uma vez que o tratamento de ratos *Irel1* $\alpha^{\text{Hep}^{\text{f}/-}}$  com tunicamicina resultou em alterações ao nível do metabolismo lipídico, nomeadamente no aumento da expressão dos fatores de transcrição lipogénicos PPAR $\gamma$ , C/EBP $\beta$  e LXR $\alpha$  assim como dos genes codificantes para as enzimas lipogénicas SCD1, DGAT2, DGAT1 e ACC1 [74]. Tais resultados sugerem a importância do IRE1 $\alpha$  na supressão da acumulação hepática de lípidos face à ocorrência de *stress* do retículo. Curiosamente a deleção do fator de transcrição XBP1, ativado pela via da IRE1 $\alpha$ , resultou na redução da transcrição de genes codificantes para enzimas lipogénicas assim como em níveis de triglicéridos e colesterol acentuadamente baixos, o que demonstra a necessidade pelo fator XBP1 para a síntese *de novo* de lípidos [78]. O fator XBP1 mostra-se igualmente responsável pela síntese de fosfolípidos na expansão do retículo face à ocorrência de *stress*, sendo este seu papel explorado em maior detalhe na seção que se segue (Subcapítulo 2.1.2).

O fator ATF6 mostrou ser igualmente importante na regulação do metabolismo lipídico. De facto, a inativação do gene *Atf6* em ratos resultou na formação de gotas lipídicas face à redução da  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos e à atenuação da formação de VLDL e da expressão do fator PPAR $\alpha$ , favorecendo a acumulação de lípidos no fígado e a ocorrência de esteatose hepática. Contudo a acumulação de gotas lipídicas no fígado dos ratos não se deveu à lipogénese *de novo* uma vez que o tratamento com tunicamicina suprime a expressão de genes lipogénicos como *Scd1*, *Dgat2* e *Fasn* [72]. No estudo supra mencionado de Kaufman e seus colaboradores o tratamento de ratos deficientes para um dos componentes da UPR com tunicamicina resultou no aumento dos níveis do fator pró-apoptótico CHOP e no decréscimo da transcrição do gene *C/ebp $\alpha$*  [74]. A regulação negativa do fator C/EBP $\alpha$  pela expressão prolongada do CHOP



mostrou-se responsável pela disrupção do metabolismo lipídico e, conseqüente, ocorrência de esteatose hepática em condições severas de *stress* do retículo [74].

Assim sendo, os três ramos de sinalização componentes da UPR mostram-se capazes de modelar o metabolismo lipídico em resposta à ocorrência de *stress* do retículo, ainda que de forma distinta. A via da IRE1 $\alpha$  mostra-se protetiva no que respeita à lipogénese pelo *stress* do retículo ao passo que o mediador XBP1 promove a transcrição de genes envolvidos na síntese de ácidos gordos e colesterol. De forma semelhante, o fator ATF6 parece impedir a formação de gotas lipídicas face à ocorrência de *stress* do retículo, além de atenuar a lipogénese mediada pelo fator SREBP2. Por sua vez a fosforilação do fator eIF2 $\alpha$  interfere com a atividade transcricional dos fatores C/EBPs, PPAR $\gamma$  e SREBP-1c favorecendo a acumulação de lípidos (revisto em [70]).

## 2.1.2 O papel da UPR na biogénese do retículo endoplasmático

Face ao mencionado nos capítulos precedentes, a ocorrência de *stress* ao nível do retículo endoplasmático induz um programa de resposta adaptativa a fim de manter o estado de homeostasia celular. Na sua fase inicial, de sobrevivência da célula, a UPR promove o correto enovelamento das proteínas através da indução de *chaperones* e da inibição de programas transcricionais e traducionais. No entanto contribui igualmente para a expansão do retículo endoplasmático a fim de atender às elevadas exigências de processamento de proteínas, superiores às suas capacidades. A biogénese do retículo passa pela síntese lipídica, nomeadamente dos componentes lipídicos presentes na membrana, uma vez que o retículo endoplasmático representa o principal local de síntese de fosfolípidos e de produção de membranas celulares (revisto em [79, 80]). De facto, diversas evidências sugerem o papel da UPR na regulação da síntese lipídica e da biogénese da membrana [50, 81]. Surpreendentemente, a expansão da membrana do retículo parece ser conseguida somente através da síntese de fosfolípidos, em detrimento do colesterol, favorecendo a síntese de membranas pobres em esteróis e com rácio colesterol livre:fosfolípido relativamente baixo [50].

O fator XBP1 mostra-se responsável pela síntese de fosfolípidos e, conseqüentemente, pela expansão da membrana em células de mamíferos [50, 81, 82]. O papel do fator XBP1 na síntese de fosfolípidos foi revelado no contexto da diferenciação das células B em células secretoras de anticorpos uma vez que a produção de anticorpos é conseguida no retículo endoplasmático e demanda a expansão do retículo mediada por este fator (revisto em [83]). A fosfatidilcolina (PC, do inglês *Phosphatidylcholine*), sendo o fosfolípido mais abundante constituinte das membranas, vê a sua síntese ser aumentada face à ocorrência de *stress* do retículo e à indução da UPR [50, 82, 84]. O tratamento de células B deficientes em XBP1 com LPS resultou no aumento da síntese de PC, esfingomiélin (SM, do inglês *Sphingomyelin*) e fosfatidilinositol (PI, do inglês *Phosphatidylinositol*), e na expansão do retículo mas em menor extensão comparativamente às células *wild-type* [85]. No estudo de Brewer e seus colaboradores

o aumento da expressão do fator XBP1 em células NIH-3T3 mostrou ser suficiente para induzir a síntese de PC, por aumento da atividade das enzimas CCT e CPT, e desencadear a expansão da membrana do retículo endoplasmático [50]. Tais resultados foram confirmados num estudo posterior dos autores [82].

Apesar do fator XBP1 representar o principal responsável pela expansão do retículo em condições de *stress*, tem sido igualmente sugerida a participação do sensor ATF6 na expansão da membrana do retículo endoplasmático por indução da síntese de PC [84]. Curiosamente a regulação da síntese de fosfolípidos e da expansão do retículo apresenta diferenças entre os dois mediadores da UPR [84]. No entanto, no estudo de Brewer e seus colaboradores mencionado anteriormente, o aumento do fator ATF6 não mostrou ser capaz de induzir a síntese de PC em oposição ao verificado pelos autores para o fator XBP1 [82].

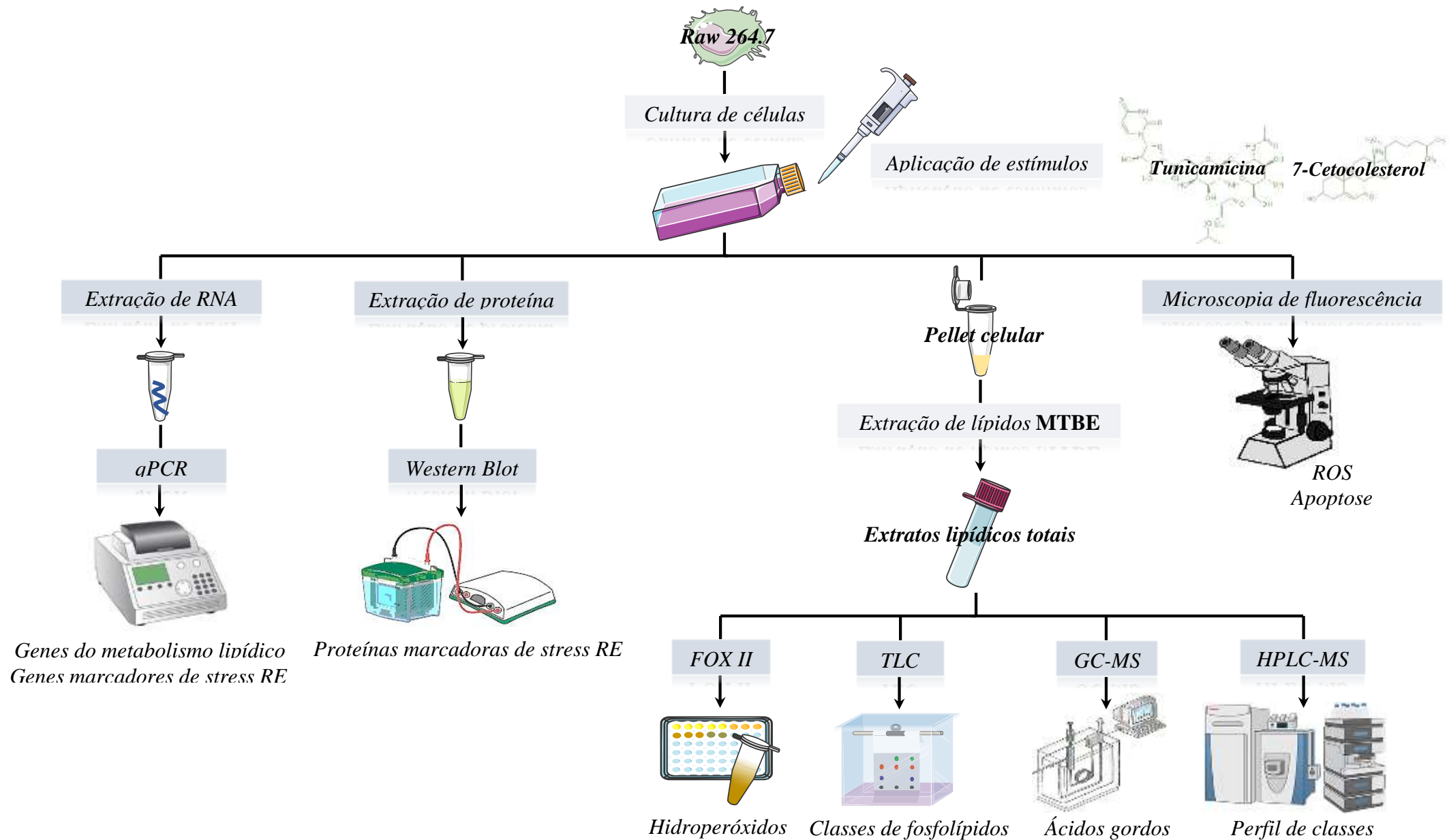
## 2.2 Objetivo

O retículo endoplasmático mostra-se responsável pela síntese, enovelamento e modificação pós-traducional de proteínas recém-sintetizadas. O comprometimento destes processos devido a fatores bioquímicos ou fisiológicos conduz a um estado de *stress*. Uma vez que a preservação do estado de homeostasia é fundamental para a sobrevivência da célula, é desencadeado um programa de adaptação celular denominado de UPR. Várias linhas de evidência têm relacionado o *stress* do retículo endoplasmático a inúmeros processos patológicos, entre os quais à progressão do fenómeno aterosclerótico. No entanto a importância da UPR na modelação do metabolismo lipídico representa um tema ainda pouco explorado. Assim sendo, propõe-se como um dos objetivos do presente trabalho:

*Avaliar os efeitos da indução de stress do retículo no perfil lipídico do macrófago.*

## 2.3 Metodologia

Previamente à descrição dos procedimentos efetuados para o cumprimento do objetivo proposto, apresenta-se um fluxograma geral do protocolo seguido. Desta forma é possível obter uma ideia das diferentes etapas empregues nesta primeira fase do presente trabalho.



Esquema 2.1: Fluxograma do trabalho. As células RAW 264.7 foram estimuladas com os indutores de *stress* do retículo: Tunicamicina e 7-Cetocolesterol. Prepararam-se *pellets* celulares de cada condição e obtiveram-se os respectivos extratos lipídicos totais, os quais foram utilizados para a análise de hidroperóxidos por FOX II, de classes de fosfolípidos por TLC, de ácidos gordos por GC-MS, e do perfil de classes por HPLC-MS. Simultaneamente foi analisada a expressão de marcadores de *stress* do retículo endoplasmático (RE) por Western Blot e qPCR, e recorreu-se à microscopia de fluorescência para a análise da formação ROS e do nível de apoptose.

### 2.3.1 Reagentes

O Meio de cultura Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) foi adquirido na *Sigma Chemical Co* à semelhança da penicilina e da estreptomicina. No caso do soro fetal bovino e do reagente TRizol foram adquiridos na *Invitrogen* ao passo que o corante *Hoechst 33258* foi adquirido na *Molecular Probes*. O kit de detecção de apoptose *FITC-Annexin V 7-AAD* e o anticorpo anti-GRP78 foi adquirido na *Biolegend*, o kit de síntese de cDNA *iScript Select* e a sonda *SYBR Green* provêm da *Bio-Rad*. As membranas de fluoreto de polivinilideno foram adquiridas na *Milipore Corporation*, a solução de armazenamento para RNA na *Ambion*, e os *primers* na *MWG Biotech*. Os *cocktails* de inibidores de protease e fosfatase foram obtidos na Roche, os anticorpos anti-ATF4 e anti-CHOP na *Cell Signaling Technologies* e o anticorpo anti--tubulina na *Santa Cruz*. Os anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina foram adquiridos na *GE Healthcare*, assim como o reagente ECF.

O éter metil-*terc*-butílico foi adquirido na *VWR Chemicals* à semelhança do clorofórmio e do *n*-hexano. No caso do metanol e do etanol absoluto foram adquiridos na *Fisher Chemical* ao passo que a acetona e o acetonitrilo foram adquiridos na *Sigma-aldrich*. Adicionalmente, obteve-se a trietilamina na *Acros Organics*, o ácido perclórico (60%, v/v) na *Panreac*, e o ácido sulfúrico (96%, v/v) na *Farmitalia Carlo Erba*. Os solventes mencionados possuem qualidade indicada para análise em HPLC. O acetato de amónio, o hidroxitolueno butilado, a primulina e o peróxido de hidrogénio foram adquiridos na *Sigma-aldrich*, o sulfato de ferro na *Merck*, o laranja de xilenol na *Fluka*, o ácido bórico na *BDH Chemicals*, o cloreto de sódio na *Absolve*, o hidróxido de potássio na *EKA Chemicals*, o ácido ascórbico na *Fagron*, o molibdato de amónio na *Panreac*, e o dihidrogenofosfato de sódio dihidratado na *Riedel-deHaën*. Os padrões de fosfolípidos foram adquiridos na *Avanti Polar Lipids*.

### 2.3.2 Cultura de células

A linha celular de macrófagos de murganho RAW 264.7 (número ATCC: TIB-71) foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino não-ativado, penicilina 100 U/mL, e estreptomicina, e mantida em incubadora a 37°C numa atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.3.3 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células foi monitorizada por recurso ao ensaio de redução de resazurina. Abreviadamente, plaquearam-se  $0.5 \times 10^6$  células/poço numa microplaca de 96 poços tendo posteriormente sido expostas a diferentes concentrações de Tunicamicina (de 0.25 µg/mL a 2

$\mu\text{g/mL}$ ) e 7-Cetocolesterol (de 5  $\mu\text{g/mL}$  a 20  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 horas. Posteriormente, nas três horas anteriores ao término da exposição, adicionou-se solução de resaruzina a cada poço para uma concentração final de 50  $\mu\text{M}$ . Por fim foi lida a absorvância a 570 nm e 600 nm com o auxílio de um leitor de microplacas (*Thermo Scientific Multiskan Go*).

### 2.3.4 Tratamento químico

As células RAW 264.7 foram plaqueadas numa densidade de  $2 \times 10^6$ /poço em microplacas de 6 poços para a preparação de lisados celulares totais assim como para a extração de RNA. Para a obtenção dos *pellets* celulares para a extração lipídica cultivaram-se as células RAW 264.7 em frascos de cultura T75. Após a estabilização das células durante a noite o meio de cultura foi substituído na totalidade. Posteriormente adicionou-se Tunicamicina e 7-Cetocolesterol, ficando as células expostas aos estímulos durante 1, 2, 4, 8 ou 24 horas.

### 2.3.5 Preparação de lisados celulares totais

Para obtenção de lisados celulares totais as células foram lavadas com 1 mL de PBS gelado, seguindo-se a obtenção de *pellet* por centrifugação durante 5 minutos a 370g. O *pellet* foi ressuspenso em tampão de lise RIPA (Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), Nonidet P-40 1% (v/v), NaCl 150 mM, desoxicolato de sódio 0.5% (m/v), SDS 0.1% (m/v), EDTA 2mM e DTT 1mM) suplementado com *cocktails* de inibidores de protease e fosfatase. Em seguida procedeu-se à remoção do núcleo e dos detritos celulares insolúveis por centrifugação a 4°C durante 10 minutos a 12,000 g. Por fim recolheram-se os extratos pós-nucleares, os quais foram utilizados como lisados celulares totais.

### 2.3.6 Análise de proteínas por Western Blot

A análise da expressão das proteínas ATF4, GRP78 e CHOP foi efetuada por recurso à técnica de Western Blot. Sucintamente, 30  $\mu\text{g}$  de proteína foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% (v/v) e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno. Posteriormente as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% (m/v) em tampão salino Tris contendo Tween-20 0.1% (v/v) (TBS-T), durante 1 hora à temperatura ambiente. De seguida incubaram-se as membranas durante a noite a 4°C com anticorpos primários dirigidos contra ATF4, GRP78 e CHOP, diluídos na proporção 1:1000 com leite desnatado 1% (m/v) em TBS-T. As membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com anticorpos anti-coelho ou anti-rato conjugados com fosfatase alcalina, diluídos na proporção de 1:20,000 com leite desnatado 1% (m/v) em TBS-T. A deteção dos complexos imunes foi conseguida por exposição das membranas ao reagente ECF durante 5

minutos, seguido pela detecção de fluorescência azul no sistema de imagem *Typhoon* (GE Healthcare). Os sinais gerados foram analisados por recurso ao *software Total Lab 2009* (*TotalLab Ltd*). De forma a demonstrar o carregamento de igual quantidade de proteína entre as diversas condições removeram-se os anticorpos previamente utilizados e as membranas foram incubadas com anticorpo anti- $\beta$ -tubulina. Seguiu-se a incubação com anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina e a visualização por quimiofluorescência como descrito anteriormente.

### 2.3.7 Análise da expressão génica por qPCR

Após o tratamento das células com os estímulos em estudo pelos tempos indicados, seguiu-se o isolamento do RNA total com o reagente TRIzol de acordo com as instruções do fabricante. A determinação da concentração de RNA e a averiguação de possíveis contaminações foi efetuada por monitorização da absorvância a 260 nm com auxílio de um espectrofotómetro *NanoDrop* (*ThermoScientific*), e as amostras foram armazenadas em solução de armazenamento para RNA a  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior uso. Previamente à análise por PCR quantitativo em tempo real (qPCR), 1  $\mu\text{g}$  de RNA foi retrotranscrito por recurso ao *kit* de síntese de cDNA *iScript Select*. Seguidamente efetuou-se as reações de PCR utilizando a sonda *SYBR Green* e recorrendo ao sistema de detecção *CFX Connect* (*Bio-Rad*). Após a amplificação recorreu-se ao *software CFX Connect System* de modo a determinar o valor limiar (*threshold*) para cada gene em análise e normalizou-se os resultados usando o gene *Hprt1* como gene de referência, o qual foi determinado experimentalmente por recurso ao *software Genex* (*MultiD Analyss AB*) como o mais estável para as condições de tratamento utilizadas. A comparação final dos rácios de transcrição entre amostras foi calculada pelo método de quantificação relativa corrigido para a eficiência de *primers* específicos. As sequências dos *primers* foram delineadas através do *software Beacon Designer v7.7* (*Premier Biosoft International*) e exaustivamente testados.

### 2.3.8 Ensaio de produção de ROS

Para a visualização da formação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) induzida pelos estímulos em estudo Tunicamicina e 7-Cetocolesterol plaquearam-se células RAW 264.7 numa densidade de  $0.5 \times 10^5$ /poço em câmaras  $\mu$ -slide de 8 poços (*IBIDI GmbH*), deixando-se estabilizar durante a noite. Posteriormente as células foram estimuladas com Tunicamicina (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou 7-Cetocolesterol (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após o tempo de exposição indicado as células foram lavadas com PBS, tendo este passo sido realizado por duas vezes, e finalmente tratadas com os reagentes *CellROX Green* 5  $\mu\text{M}$  e *Hoechst 33258* 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em meio DMEM completo durante 30 minutos. Seguiu-se um novo passo de lavagem com PBS previamente à análise por microscopia de fluorescência (*Nikon Corporation*) com

ampliação de 630X. A captação das imagens foi efetuada com o auxílio de uma câmara digital de alta definição *DS-Fi2*, e a sua análise por recurso ao *software NIS-Elements Imaging (Nikon Corporation)*.

### 2.3.9 Avaliação da externalização de PS/apoptose

A monitorização da externalização de PS após o tratamento com Tunicamicina ou 7-Cetocolesterol foi conseguida por recurso a microscopia de fluorescência utilizando um *kit* de deteção de apoptose *FITC-Annexin V* e *7-AAD*. Sucintamente plaquearam-se  $0.5 \times 10^5$  células em cada poço de uma câmara  *$\mu$ -slide* de 8 poços (*IBIDI GmbH*), e permitiu-se a sua estabilização durante a noite. Posteriormente as células foram tratadas com Tunicamicina (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) ou 7-Cetocolesterol (15  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 horas, ou com estaurosporina 1  $\mu\text{M}$  durante 4 horas de forma a obter um controlo positivo para a indução de apoptose. De seguida, as células foram lavadas com PBS estéril e incubadas durante 20 minutos em meio de cultura fresco contendo *Hoechst 33258* 1  $\mu\text{g/mL}$ . Terminado o tempo, removeu-se o meio e lavaram-se os poços com PBS, tendo este passo sido realizado em duplicado, seguido de incubação durante 15 minutos no escuro com a solução *FITC-Annexin V* e *7-AAD*. Após três lavagens, as câmaras foram analisadas por microscopia de fluorescência (*Nikon Corporation*) com ampliação de 630X. A captação das imagens foi conseguida com o auxílio de uma câmara digital de alta definição *DS-Fi2*, e a sua análise por recurso ao *software NIS-Elements Imaging (Nikon Corporation)*.

### 2.3.10 Extração de lípidos

O extrato lipídico total do *pellet* celular correspondente a cada condição experimental foi obtido por recurso a um método de extração mais recente e eficaz proposto por Schwudke e seus colaboradores [86], o qual surgiu como adaptação do método mais corrente *Bligh-Dyer* [87]. Neste método de extração utilizou-se como solvente o éter metil-*terc*-butílico (MTBE, do inglês *Methyl Tert-Butyl Ether*) em substituição do usual clorofórmio utilizado no método de *Bligh-Dyer*. Uma vez que o MTBE possui menor densidade comparativamente ao clorofórmio, a fase orgânica contendo os lípidos corresponde à fase superior, em oposição à inferior no que respeita ao outro método de extração mencionado, o que, além de facilitar o processo de recolha da fase orgânica, diminui a possibilidade de extrair compostos não lipídicos, nomeadamente proteínas, e, em consequência, aumenta a rentabilidade da extração. Iniciou-se o processo de extração com a ressuspensão do *pellet* celular contido num *ependorf* em 750  $\mu\text{L}$  de metanol, transferindo-se a suspensão obtida para um tubo e lavando novamente o *ependorf* com mais 750  $\mu\text{L}$  de metanol de forma a completar 1.5 mL de metanol e certificar que todo o *pellet* é transferido para o tubo. Após agitação em vórtex, adicionaram-se 5 mL de MTBE, seguido de nova agitação em vórtex, e incubaram-se as amostras durante 1 hora à temperatura ambiente num agitador de placas (*Bibby*

*Stuart Platform Rocker STR6*). Completado o tempo, adicionaram-se 1.25 mL de água miliQ a cada tubo, as amostras foram agitadas em vórtex e novamente incubadas nas mesmas condições durante 10 minutos. Seguiu-se a centrifugação (*Mixtasel P-Selecta*) dos tubos durante 10 minutos a 1500 rpm a fim de formar duas fases: fase inferior – *aquosa* – e fase superior – *orgânica*, contendo os lípidos. Após a transferência da fase superior para um novo tubo, adicionou-se uma mistura de solventes constituída por MTBE/metanol/água miliQ em proporção 10:3:2.5 (v/v/v) ao tubo inicial contendo a fase aquosa de forma a aumentar ainda mais a rentabilidade do processo de extração e extrair a maior quantidade possível de lípidos. Seguiu-se uma segunda centrifugação (*Mixtasel P-Selecta*) nas mesmas condições da anterior e transferiu-se a nova fase orgânica para o respetivo tubo contendo a fase orgânica obtida na primeira centrifugação, combinando, assim, ambas as fases. Posteriormente secou-se o extrato lipídico total de cada amostra num concentrador a vácuo (*Reagente 5 Químicos e Eletrónica, Centrifuga Univapo 100H, Trampa Refrigerada Unicryo MC-2L-60°C*). Após a evaporação completa do solvente, seguiu-se a redissolução do extrato lipídico de cada tubo em 300 µL de clorofórmio e a transferência do resultado para um *vial*, repetindo esse passo de lavagem por mais 2 vezes num total de 3. Por fim, secou-se, no *vial*, o extrato lipídico total de cada condição experimental na corrente de azoto e armazenou-se a -4°C para posterior análise.

### 2.3.11 Quantificação de fosfolípidos

De forma a determinar a quantidade total de fosfolípidos presente no extrato lipídico total de cada condição experimental assim como comparar a quantidade existente em cada classe de fosfolípido fracionada por cromatografia em camada fina (TLC, do inglês *Thin Layer Chromatography*), efetuou-se um ensaio de quantificação espectrofotométrica de fosfato de acordo com Yamamoto e seus colaboradores, com ligeiras adaptações [88]. A quantificação do extrato lipídico total teve como ponto de partida a amostra seca em azoto após o passo de extração lipídica, e iniciou-se com a redissolução da mesma em 300 µL de clorofórmio seguida de agitação em vórtex. Seguiu-se a transferência de 10 µL de cada amostra para tubos de vidro, os quais foram previamente submetidos a lavagem em água acidificada com ácido nítrico a 5% durante, pelo menos, 12 horas, a fim de eliminar vestígios de quantificações precedentes, tendo este passo sido realizado em duplicado. Posteriormente, secou-se cada tubo na corrente de azoto de modo a evaporar completamente o clorofórmio adicionado. Para a quantificação das classes de fosfolípidos previamente separadas por TLC, os *spots* obtidos após a separação cromatográfica foram raspados da placa de sílica para tubos de vidro. Em ambos os casos, seguiu-se a adição de 650 µL de ácido perclórico (60%, v/v), procedida pela incubação dos tubos durante 1 hora a 200°C num bloco de aquecimento (*Stuart Block Heater SBH200D*), e posterior arrefecimento. Simultaneamente foram preparadas soluções padrão com concentração variável entre 0.1 e 2 µg de fósforo, para o cálculo da reta de calibração, a partir de uma solução padrão



de dihidrogenofosfato de sódio dihidratado com 100 µg/mL de fósforo, além do branco. No caso dos padrões o passo de adição de ácido perclórico não foi procedido por incubação no bloco de aquecimento. Em seguida adicionaram-se 3.3 mL de água miliQ, 500 µL de molibdato de sódio (2.5%, m/v) e 500 µL de ácido ascórbico (10%, m/v), aos tubos das amostras bem como aos dos padrões, com agitação em vórtex após cada adição. De notar que as soluções referidas foram preparadas no momento, utilizando água miliQ para o efeito. Seguidamente incubou-se os tubos durante 5 minutos a 100°C num banho de água (*Precistern P-Selecta*), deixando-se arrefecer após terminado. No caso da quantificação das classes de fosfolípidos separadas por TLC torna-se um necessário um passo adicional, o qual consiste em transferir 1 mL de solução de cada tubo para um *eppendorf* seguido de centrifugação (*Sigma Laborzentrifugen*) durante 5 minutos a 4000 rpm a fim de separar e depositar a sílica e, deste modo, permitir a quantificação espectrofotométrica do fosfato. Por fim, foram transferidos 200 µL de cada solução para uma microplaca de 96 poços, em duplicado, cuja leitura de absorvância a 800 nm foi efetuada com o auxílio de um leitor de microplacas (*Thermo Scientific Multiskan Go*). A determinação da quantidade de fósforo presente em cada amostra assim como em cada classe de fosfolípido fracionada por cromatografia em camada fina foi calculada por regressão linear através da representação gráfica da absorvância média dos duplicados de cada padrão, no eixo Y, em função da quantidade de fósforo presente em cada padrão, no eixo X. A partir da equação da reta e da leitura de absorvância das amostras foi possível determinar a quantidade de fósforo, sendo necessário multiplicar o resultado por 25 assim como pelo fator de diluição 30 no caso do extrato lipídico total. Em respeito às classes de fosfolípidos, calculou-se a percentagem de cada classe em função da quantidade total de fosfolípido recuperada da placa de TLC.

### 2.3.12 Separação de classes de fosfolípidos por TLC

O fracionamento de diferentes classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico total de cada condição experimental foi efetuado por TLC utilizando, para tal, placas de sílica gel 60 (*Merck*) com zona de concentração de 2,5x20 cm. Num passo prévio à separação, as placas de sílica foram lavadas numa câmara contendo uma solução de clorofórmio/metanol (1:1, v/v), seguida de secagem na *hotte* durante 10-15 minutos. Posteriormente borrifou-se a placa de sílica com uma solução de ácido bórico em etanol (2.3% m/v), tendo-se deixado repousar na *hotte* durante alguns minutos, sendo de seguida colocada a secar numa estufa (*Heraeus*) durante 15 minutos a 100°C. Após o arrefecimento, seguiu-se a aplicação dos extratos lípidos totais. Para tal aplicaram-se 20 µL do extrato lipídico obtido de cada condição experimental, correspondentes a 30 µg de fosfolípidos (solução inicial com concentração de 150 µg de fosfolípido por 100 µl de solução). A aplicação na placa de TLC foi realizada em duplicado para cada amostra. Simultaneamente aplicaram-se 10 µl de vários padrões a fim de identificar as classes de fosfolípidos presentes em cada condição experimental, nomeadamente

lisofosfatidilcolina (LPC, do inglês *Lysophosphatidylcholine*) SM, PC, PI, PS, fosfatidilglicerol (PG, do inglês *Phosphatidylglycerol*), fosfatidiletanolamina (PE, do inglês *Phosphatidylethanolamine*), ácido fosfatídico (PA, do inglês *Phosphatidic Acid*) e CL. Secou-se brevemente os *spots* de aplicação na corrente de azoto e eluiu-se os fosfolípidos aplicados na placa de sílica numa câmara contendo uma mistura de solventes constituída por clorofórmio/etanol/água miliQ/trietilamina em proporção 30:35:7:35 (v/v/v/v). Terminada a eluição deixou-se a placa de sílica repousar na *hotte* de modo a permitir a evaporação completa dos eluentes. Seguiu-se revelação dos *spots* através da pulverização da placa de sílica com uma solução de primulina (50 µg/100 mL), dissolvida numa mistura de acetona/água miliQ (80:20, v/v), e posterior visualização com uma lâmpada de luz ultravioleta (*Lamag*,  $\lambda=254$  nm). Identificadas as principais classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico total de cada condição experimental, por comparação com os *spots* dos padrões de fosfolípidos aplicados na placa de sílica, selecionou-se a área apropriada de cada *spot* para raspagem e posterior quantificação através de um ensaio de quantificação de fosfato.

### 2.3.13 Quantificação de hidroperóxidos lipídicos por FOX II

De modo a avaliar a peroxidação lipídica, indicativa da ocorrência de *stress* oxidativo, procedeu-se à quantificação de hidroperóxidos lipídicos como produtos que se formam em primeira instância durante a oxidação de lípidos. Para tal recorreu-se ao ensaio de FOX (do inglês, *Ferric-Xylenol Orange*), o qual foi descrito pela primeira vez por Gupta [89] e consiste na oxidação de ferro em laranja de xilenol na presença de hidroperóxidos. Como resultado forma-se um complexo colorido – amarelo-acastanhado – com máximo de absorvância a 560 nm. Neste caso aplicou-se o método FOX II, de Wolff e seus colaboradores [90], uma vez que consiste numa ligeira adaptação do método inicial – FOX I – de forma a permitir a medição de hidroperóxidos em fases lipídicas. A quantificação de hidroperóxidos inicia-se com a preparação do reagente de FOX: laranja de xilenol (100 µM), sulfato de ferro (250 µM), hidroxitolueno butilado (4mM) e ácido sulfúrico (25 mM) em metanol (90%, v/v) e água miliQ (10%, v/v). De forma breve, para 100 mL de reagente de FOX pesou-se 9.8 mg de sulfato de ferro e transferiu-se para um copo isolado com papel de alumínio por sensibilidade à luz visível. Dissolveu-se em 139 µL de ácido sulfúrico e 5 mL de água miliQ e procedeu-se à agitação com o auxílio de um agitador magnético. Seguiu-se a pesagem de 88.2 mg de hidroxitolueno butilado e 7.2 mg de laranja de xilenol, os quais foram adicionados à solução existente. Por fim, adicionaram-se 45 mL de metanol, 5 mL de água miliQ e os restantes 45 mL de metanol. Simultaneamente foram preparadas soluções padrão de concentração variável entre 0.0025 e 0.4 mM de peróxido de hidrogénio (30%, m/v), em duplicado, para o cálculo da reta de calibração, a partir de uma solução padrão de peróxido de hidrogénio de concentração 1 mM, as quais foram adicionadas a 950 µL de reagente de FOX. Para a quantificação de hidroperóxidos lipídicos nas diversas

amostras adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  do extrato lipídico obtido de cada condição experimental, correspondentes a 37.5  $\mu\text{g}$  de fosfolípidos (solução inicial com concentração de 150  $\mu\text{g}$  de fosfolípido por 100  $\mu\text{l}$  de solução), a 475  $\mu\text{L}$  de reagente de FOX, tendo esse passo sido realizado em duplicado para cada amostra. Após incubação das amostras e dos padrões no escuro durante 30 minutos, foram transferidos 200  $\mu\text{L}$  de cada solução para uma microplaca de 96 poços, em duplicado, cuja leitura de absorvância a 560 nm foi efetuada com o auxílio de um leitor de microplacas (*Thermo Scientific Multiskan GO*). A determinação da quantidade de hidroperóxidos presente em cada amostra foi calculada por regressão linear através da representação gráfica da absorvância média dos duplicados de cada padrão, no eixo Y, em função da respetiva concentração, no eixo X. A partir da equação da reta e da leitura de absorvância das amostras foi possível determinar a concentração de hidroperóxidos em cada condição experimental, a qual pode ser convertida em  $\mu\text{g}$  de hidroperóxido por  $\mu\text{g}$  de fosfolípido dividindo o resultado por 1000 e multiplicado o resultante por 34000 antes de dividir pela quantidade total de fosfolípido utilizada (37.5  $\mu\text{g}$ ).

### 2.3.14 Quantificação de ácidos gordos por GC-MS

A análise de ácidos gordos constituintes do extrato lipídico total de cada condição experimental foi conseguida por recurso a cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Para tal tornou-se necessário derivatizar a amostra, nomeadamente através da transmetilação de ácidos gordos a fim de tornar os mesmos voláteis e permitir, assim, a sua análise por GC-MS. O processo de transmetilação seguiu as linhas gerais da metodologia proposta pela União Internacional da Química Aplicada (IUPAC) [91]. De forma breve, baseia-se na adição de hidróxido de potássio em metanol com o intuito de formar ésteres metílicos de ácidos gordos [91]. Para tal transferiram-se 20  $\mu\text{L}$  do extrato lipídico obtido de cada condição experimental, correspondentes a 30  $\mu\text{g}$  de fosfolípidos (solução inicial com concentração de 150  $\mu\text{g}$  de fosfolípido por 100  $\mu\text{l}$  de solução), para um tubo previamente lavado com *n*-hexano, em duplicado, secando-se, em seguida, na corrente de azoto de modo a evaporar completamente o clorofórmio adicionado aquando a ressuspensão da amostra. Seguiu-se a adição de 1 mL de *n*-hexano a cada tubo e prosseguiu-se com a adição de 200  $\mu\text{L}$  de hidróxido de potássio (2 M) em metanol e, posterior, agitação vigorosa em vórtex durante 2 minutos. Em seguida, adicionaram-se 2 mL de solução saturada de cloreto de sódio com agitação em vórtex durante 1 minuto. Seguiu-se a centrifugação (*Mixtasel P-Selecta*) dos tubos durante 5 minutos a 2000 rpm a fim de formar duas fases: fase inferior – *aquosa* – e fase superior – *orgânica*. Prosseguiu-se com a transferência da fase superior para um *ependorf* previamente lavado com metanol, secando-se, em seguida, na corrente de azoto de modo a permitir a evaporação completa do solvente. Por fim, ressuspendeu-se cada amostra em 60  $\mu\text{l}$  de *n*-hexano, tendo-se injetado somente 2  $\mu\text{l}$  da solução resultante no

cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies 6890N Network) acoplado a um espectrómetro de massa (5973 Network Mass Selective Detector). O cromatógrafo gasoso encontra-se equipado com uma coluna capilar DB-1 de 30 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro interno, e 0.1  $\mu\text{m}$  de espessura (J&W Scientific). A injeção das amostras decorreu em modo *splitless*, de forma a permitir a análise da amostra na sua totalidade, com um tempo de *splitless* de 6 minutos e o injetor a operar à temperatura de 220°C. O programa de temperaturas utilizado corresponde ao seguinte: temperatura inicial de 40°C, na qual se mantém durante 0.5 minutos, seguida de aumento a uma taxa de 20°C/minuto até atingir a temperatura de 220°C, seguida novamente de aumento à taxa de 0.5°C/minuto até à temperatura de 240°C, e, por fim, aumento de 5°C/minuto até aos 250°C. O gás hélio foi utilizado para o transporte da amostra a uma taxa de fluxo de 0.2 mL/min com a coluna à pressão de 12.95 psi. Acoplado ao cromatógrafo gasoso encontra-se um espectrómetro de massa equipado com uma fonte de impacto eletrónico a qual opera a 70 eV. Os espectros foram adquiridos em modo *full scan* na gama valores de  $m/z$  40-500 em ciclos de 1s. A identificação do perfil em ácidos gordos para cada condição experimental em estudo foi efetuado por comparação dos espectros de massa obtidos com os da biblioteca de espectros de massa Wiley275, tendo-se prosseguido com a integração dos picos do cromatograma a fim de determinar a percentagem de cada ácido gordo em função da área total dos picos.

### 2.3.14 Análise de classes de fosfolípidos por HPLC-MS

De modo a analisar o perfil lipídico dos macrófagos em termos de classes de fosfolípidos e respetivos ácidos gordos, e identificar as diferenças existentes quando expostos aos estímulos em estudo – *Tunicamicina* e *7-Cetocolesterol*, recorreu-se à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS, do inglês *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*). Num primeiro passo as classes de fosfolípidos foram fracionadas por recurso ao sistema de HPLC (*Water Alliance 2690*), utilizando duas fases móveis: o eluente A composto por 10% (v/v) de água, 55% (v/v) de acetonitrilo, 35% (v/v) de metanol e acetato de amónio (10 mM), e o eluente B constituído por 60% (v/v) de acetonitrilo, 40% (v/v) de metanol e acetato de amónio (10 mM). Para tal, utilizaram-se 16.6  $\mu\text{L}$  do extrato lipídico total de cada condição experimental, correspondentes a 25  $\mu\text{g}$  de fosfolípidos (solução inicial com diluição de 150  $\mu\text{g}$  de fosfolípido por 100  $\mu\text{l}$  de solução), o qual foi seco na corrente de azoto e ressuspendido em 90  $\mu\text{L}$  de eluente B para filtração. Em seguida, introduziram-se 10  $\mu\text{L}$  da mistura no *loop* dos quais 5  $\mu\text{L}$  entraram numa coluna de fase normal HILIC (*Ascentis Si*), de 15 mm de comprimento, 1.0 mm de diâmetro interno, e 3  $\mu\text{m}$  de espessura, e os restantes 5  $\mu\text{L}$  foram rejeitados. O gradiente de solvente utilizado corresponde ao seguinte: gradiente inicial de 0% de eluente A, mantendo-se assim por 10 minutos, seguido de um aumento linear até aos 100% de A durante 10 minutos, no qual se manteve durante 35 minutos, até retornar às condições iniciais, o que foi conseguido em 5 minutos. O caudal através da coluna manteve-se

em 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  com o auxílio de um *split* posicionado previamente à coluna. Seguiu-se a análise das classes de fosfolípidos no espectrómetro de massa (*ThermoFinnigan*) contendo uma fonte de iões *electrospray* e um analisador de *trapa de iões* nos modos positivo e negativo. A fonte *electrospray* operou a uma voltagem de 4.7 kV no modo negativo, ao passo que no modo positivo a voltagem definida foi de 5 kV. A temperatura do capilar manteve-se em 275°C e o fluxo de gás em 25 unidades. Para a aquisição dos espectros MS/MS definiu-se a largura de isolamento de 0.5 Da e o tempo de ativação de 30 ms. O espectro de massa *full scan* foi adquirido com um tempo de ionização máximo de 50 ms ao passo que para os espectros de MS/MS esse tempo foi estabelecido para 200 ms. A energia de colisão requerida para a fragmentação dos iões e aquisição dos espectros de MS/MS variou entre 26 para o modo negativo e 30 para o modo positivo (unidades arbitrárias). A análise dos espectros adquiridos a fim de identificar o perfil em classes de fosfolípidos e respetivos ácidos gordos de cada condição experimental foi efetuada por recurso ao programa de análise de dados *Xcalibur v2.0*.

### 2.3.15 Análise estatística

Os resultados experimentais apresentam-se em termos de média  $\pm$  desvio padrão. A significância estatística das diferenças existentes entre as condições experimentais em estudo foram determinadas por recurso ao teste *T-Student* com o auxílio do programa *GraphPad Prism v5.0*. Considerou-se o *valor-P*  $<0.05$  enquanto indicador de significância estatística.

## 2.4 Resultados e discussão

### 2.4.1 Atividade metabólica/viabilidade das células RAW 264.7

O tratamento de células com os indutores de *stress* do retículo endoplasmático, tunicamicina e 7-cetocolesterol, apresenta repercussões ao nível da viabilidade e proliferação celular. De forma a estimar o efeito citotóxico de ambos os estímulos na linha celular de macrófagos de murganho RAW 264.7 trataram-se as células com concentrações crescentes de cada um dos indutores de *stress* e monitorizou-se a atividade metabólica por recurso ao ensaio de redução de resazurina (Figura 2.1). Sucintamente as células viáveis com o metabolismo ativo são capazes de reduzir a resazurina em resorufina, um produto fluorescente, em oposição às células não-viáveis [92]. Desta forma, através da análise da atividade metabólica, é possível obter um reflexo da viabilidade das células tratadas.

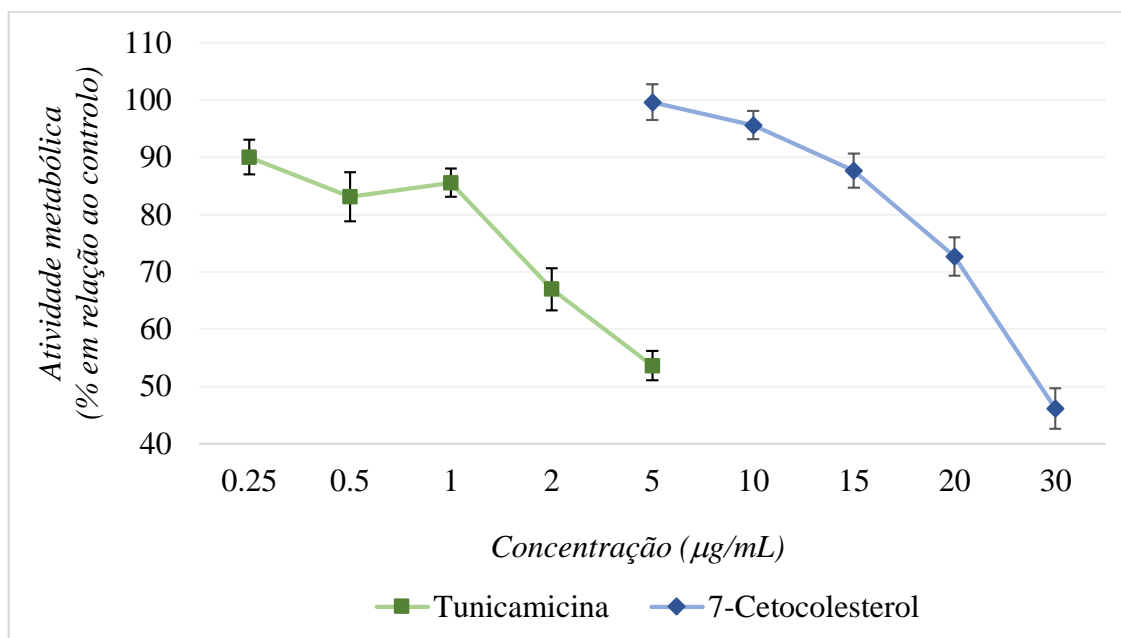


Figura 2.1: Efeito da tunicamicina e do 7-cetocolesterol na viabilidade celular. Atividade metabólica das células RAW 264.7 estimuladas com concentrações crescentes dos indutores de *stress* do retículo endoplasmático tunicamicina (na figura, linha assinalada a cor verde) e 7-cetocolesterol (na figura, linha assinalada a cor azul). A viabilidade encontra-se representada em termos de percentagem relativamente às células não tratadas (controlo), considerado 100%. Os resultados encontram-se representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3).

A indução de *stress* do retículo endoplasmático nas células RAW 264.7 interfere consideravelmente com a sua viabilidade como é possível constatar pela análise da atividade metabólica supra representada. De facto as células RAW 264.7 mostraram ser bastante suscetíveis ao tratamento com os indutores de *stress* em estudo, principalmente para a tunicamicina. Ao passo que o tratamento com 7-cetocolesterol induz um decréscimo linear na atividade metabólica das células, a tunicamicina mostrou ter um efeito mais severo mesmo para concentrações mais baixas. Tais resultados devem ser interpretados com reserva dado que podem não refletir necessariamente a morte das células mas um bloqueio do ciclo celular. O *stress* do retículo e especificamente a ativação do ramo PERK-*p*-eIF2 $\alpha$ -ATF4 encontra-se bem documentada como uma via com profundas consequências nos mecanismos de proliferação celular [51, 52].

## 2.4.2 Avaliação da indução de *stress* do retículo por Western Blot e qPCR

A análise do efeito do *stress* do retículo no perfil lipídico das células RAW 264.7 requer a prévia confirmação da indução do referido *stress* pelos indutores em estudo. Como tal avaliou-

se a expressão de proteínas marcadoras de *stress* do retículo por recurso à técnica de Western Blot. Sucintamente trataram-se as células com tunicamicina (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou 7-cetocolesterol (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante diversos períodos de tempo (1, 2, 4, 8 e 24 horas), obtiveram-se os lisados celulares totais e avaliou-se a expressão das proteínas GRP78, ATF4 e CHOP (Figura 2.2).

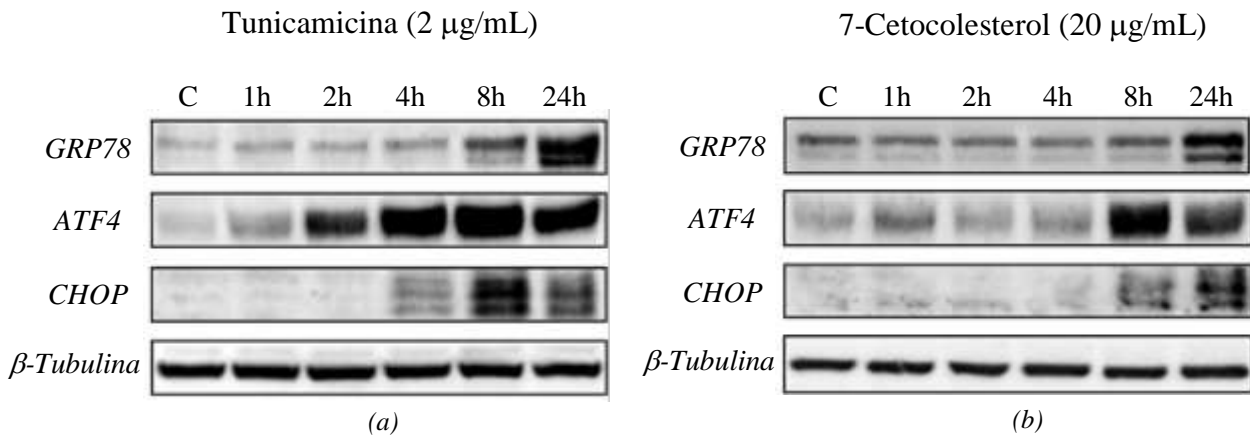


Figura 2.2: Efeito do tempo de exposição a tunicamicina e 7-cetocolesterol na indução de stress do retículo endoplasmático. As células RAW 264.7 foram mantidas sem tratamento (nas subfiguras, C) ou estimuladas com tunicamicina na concentração 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (subfigura a) ou 7-cetocolesterol na concentração 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (subfigura b) durante diversos tempos de estimulação: 1, 2, 4, 8 ou 24 horas. Após a separação de 30  $\mu\text{g}$  de proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% (v/v), avaliou-se a expressão das proteínas marcadoras de *stress* do retículo GRP78, ATF4 e CHOP nas condições experimentais em estudo por Western Blot. Os resultados são representativos de três experiências independentes (N=3). Para garantir o igual carregamento de proteínas, os anticorpos iniciais foram removidos e a membrana foi novamente incubada com anticorpo anti- $\beta$ -Tubulina.

O tratamento das células RAW 264.7 com tunicamicina na concentração 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou 7-cetocolesterol na concentração 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  resultou na indução de níveis substanciais de *stress* do retículo de uma forma temporalmente distinta como é possível constatar pela análise da expressão das proteínas supra representadas. A indução destas proteínas ocorre mais precocemente nas células tratadas com tunicamicina em comparação ao 7-cetocolesterol. Este comportamento pode ser explicado pelo facto da tunicamicina se tratar de um indutor farmacológico direto ao passo que o 7-cetocolesterol representa um estímulo mais fisiológico, afetando a homeostasia do retículo de forma indireta. Tais resultados mostram-se concordantes com estudos anteriores levados a cabo em modelo celular semelhante. Kissebah e seus colaboradores mostraram que o tratamento de células RAW 264.7 com tunicamicina na concentração 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  resultou no aumento da expressão das proteínas CHOP e GRP78 após 4 horas de exposição [93]. Por sua vez, no recente estudo de Frank e seus colaboradores o tratamento desta linha celular com tunicamicina (2.5  $\mu\text{M}$ ) resultou na indução da fosforilação da proteína eIF2 $\alpha$ , o que se correlaciona com os resultados obtidos neste trabalho uma vez que a sua ativação resulta no aumento da expressão do fator ATF4 [92]. Curiosamente, nesse estudo

foi possível observar o aumento da expressão do fator  $p$ -eIF2 $\alpha$  logo após 1 hora de exposição das células ao estímulo. Os autores observaram ainda o aumento da expressão das proteínas CHOP e GRP78 o qual foi visível às 4 horas de exposição e aumentou progressivamente em função do tempo, corroborando uma vez mais os resultados obtidos no presente trabalho [92]. Para além dos estudos supra referidos, são inúmeras evidências em modelo celular semelhante e onde se obtiveram resultados similares [94-97]. Relativamente ao tratamento com 7-cetocolesterol, apesar de este não ser tão utilizado como a tunicamicina, sabe-se ser um dos estímulos fisiológicos envolvidos na indução de *stress* do retículo caracteristicamente observado nas placas ateroscleróticas [63, 98, 99]. Ogier-Denis e seus colaboradores mostraram que tratamento de células do músculo liso com 7-cetocolesterol na concentração 40  $\mu$ g/mL durante 24 horas resultou na indução das proteínas GRP78 e CHOP [63]. Por sua vez, o tratamento de células THP-1 e de células do músculo liso da artéria coronária com 7-cetocolesterol (80 mM) mostrou induzir exacerbadamente a expressão de GRP78 e CHOP [59]. Apesar de ser conhecido o efeito citotóxico dos oxisteróis em macrófagos, dos quais se destaca o 7-cetocolesterol, este composto tem sido mais utilizado para a indução de *stress* do retículo em outros modelos celulares [63, 100]. Não obstante, no presente trabalho as células RAW 264.7 mostraram ser bastante suscetíveis ao tratamento com 7-cetocolesterol, sendo observado o aumento das proteínas supra mencionadas em tempos de exposição mais curtos.

De forma interessante observou-se que os níveis da proteína CHOP aumentam visivelmente após 4 horas de tratamento das células com tunicamicina e ao fim de 8 horas de exposição ao 7-cetocolesterol. Uma vez que esta proteína se encontra maioritariamente associada à vertente pró-apoptótica da UPR (revisto em [101, 102]), o aumento da sua expressão em tempos de exposição curtos pode significar um nível irrecuperável de *stress* por parte das células tratadas. Assim sendo mostrou-se relevante a avaliação da expressão destas proteínas após o tratamento das células com diferentes concentrações de cada estímulo durante 24 horas de forma a determinar a mínima concentração que fosse capaz de originar um nível de *stress* efetivo (Figura 2.3).



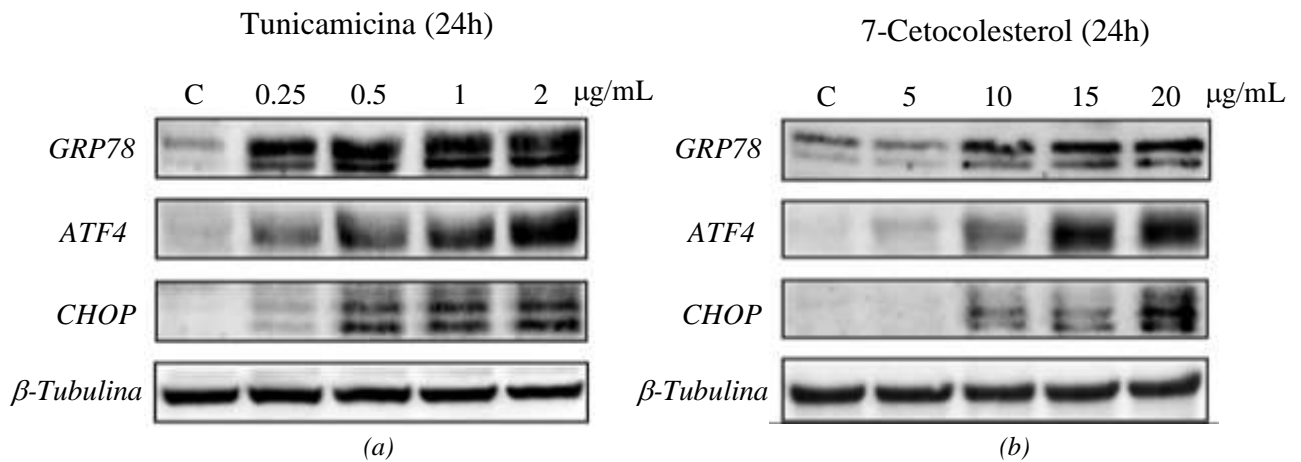
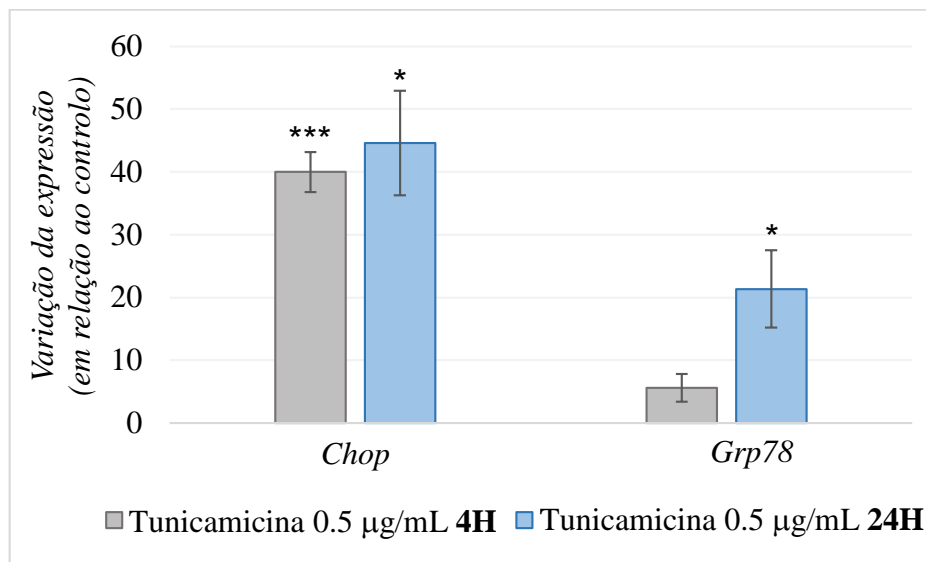


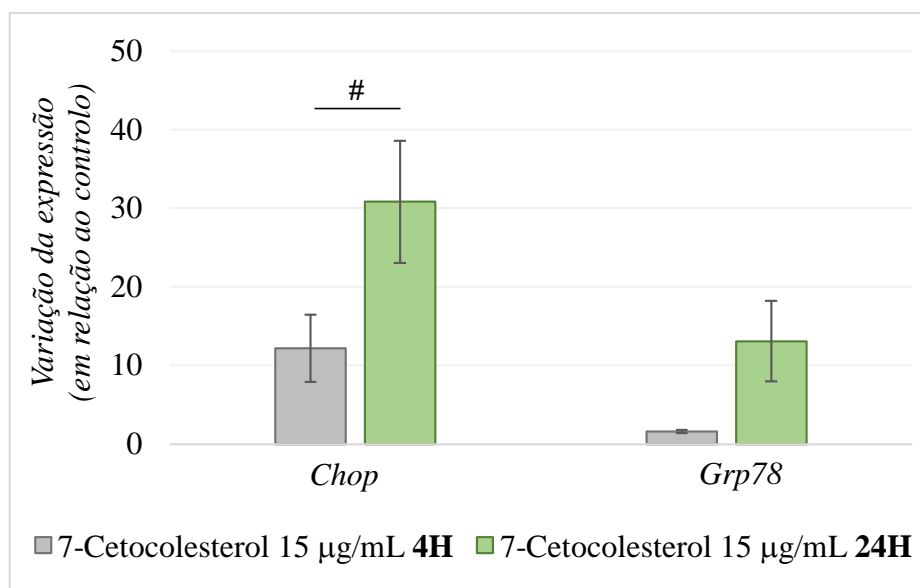
Figura 2.3: Efeito da concentração de tunicamicina e 7-cetocolesterol na indução de stress do retículo endoplasmático. As células RAW 264.7 foram mantidas sem tratamento (*nas subfiguras*, C) ou estimuladas com diferentes concentrações de tunicamicina (*na subfigura (a)*: 0.25, 0.5, 1 e 2 µg/mL) ou 7-cetocolesterol (*na subfigura (b)*: 5, 10, 15 e 20 µg/mL) durante 24 horas. Após a separação de 30 µg de proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% (v/v), avaliou-se a expressão das proteínas marcadoras de stress do retículo GRP78, ATF4 e CHOP nas condições experimentais em estudo por Western Blot. Os resultados são representativos de três experiências independentes (N=3). Para garantir o igual carregamento de proteínas, os anticorpos iniciais foram removidos e a membrana foi novamente incubada com anticorpo anti-β-Tubulina.

Como é possível constatar pela figura supra representada, a expressão destes marcadores de stress do retículo mostra ser dependente da concentração de estímulo utilizada, como evidenciado em estudos anteriores [93, 103, 104]. Uma vez mais a tunicamicina confirma ser um potente indutor de stress do retículo mesmo em concentrações mínimas. No entanto, o 7-cetocolesterol mostrou ser igualmente capaz de induzir níveis significativos de stress o que contraria os resultados reportados na literatura onde é sugerido ser necessário um segundo sinal para que tal suceda [105]. Curiosamente o tratamento das células mesmo com as concentrações mais baixas de cada estímulo parece resultar igualmente em níveis consideráveis de expressão da proteína CHOP, o que, embora não expectável, se encontra de acordo com resultados reportados por outros grupos de investigação [104, 106]. Atendendo aos resultados obtidos foram selecionadas as concentrações de 0.5 µg/mL de tunicamicina e 15 µg/mL de 7-cetocolesterol para os estudos subsequentes.

De modo a suportar e complementar os resultados da avaliação da indução de stress do retículo analisou-se igualmente a transcrição de genes por qPCR. Sucintamente trataram-se as células RAW 264.7 com tunicamicina (0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol (15 µg/mL) durante 4 ou 24 horas, obteve-se o respetivo RNA e analisou-se a expressão dos genes *Chop* e *Grp78* por qPCR (Figura 2.4).



(a)



(b)

Figura 2.4: Efeito da tunicamicina e do 7-cetocolesterol na transcrição de genes ligados ao stress do retículo endoplasmático. As células RAW 264.7 foram estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL (na subfigura (a), Tunicamicina 0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol na concentração 15 µg/mL (na subfigura (b), 7-cetocolesterol 15 µg/mL). Após a extração do RNA ao fim de 4 e 24 horas de exposição, avaliou-se a transcrição dos genes *Chop* e *Grp78* nas condições experimentais em estudo por qPCR. Os resultados encontram-se representados em termos de média ± desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3) em função do controle considerado 1 (unidades arbitrárias), e foram normalizados utilizando o gene *Hprt-1* como gene de referência. \* p < 0.05 versus controle, \*\*\* p < 0.005 versus controle, # p < 0.05 4H versus 24H

Corroborando os resultados obtidos a nível da proteína, verificou-se a indução significativa da transcrição dos genes *Chop* e *Grp78* induzida pelo tratamento das células com

os indutores de *stress* do retículo em estudo. Com exceção do gene *Chop* para as células tratadas com 7-cetocolesterol na concentração 15 µg/mL, a transcrição mostrou ser bastante dependente do tempo de exposição, aumentando progressivamente ao longo do tempo. A indução do gene *Grp78* verifica-se predominantemente para tempos de exposição superiores (24 horas) sendo observado somente um modesto aumento em tempos mais curtos (4 horas). Tais resultados encontram-se de acordo com o esperado uma vez que a transcrição desta *chaperone* é mediada pela via do sensor ATF6, o segundo ramo da UPR a ser ativado posteriormente ao da PERK [107].

### 2.4.3 Avaliação da externalização de PS/indução de apoptose

A indução de *stress* do retículo endoplasmático, se prolongado no tempo, pode resultar na indução de morte celular por apoptose como mencionado nos capítulos anteriores. Assim sendo, no contexto do presente trabalho, mostrou ser de grande interesse a avaliação do nível de apoptose nas células RAW 264.7 para as concentrações de estímulos definidas na seção precedente. Para tal avaliou-se, por microscopia de fluorescência, a externalização de fosfatidilserina (PS). Esta classe de fosfolípidos é ativamente mantida no folheto interno da membrana celular e apenas sofre translocação para o folheto externo após a indução de apoptose servindo, assim, de sinal para a fagocitose da célula apoptótica [68]. A monitorização da externalização da PS após o tratamento das células com tunicamicina (0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol (15 µg/mL) foi efetuada por recurso a um *kit* comercial *FITC-Annexin V* e *7-AAD* (Figura 2.5). Explicando o princípio da técnica a Anexina V liga-se à PS quando esta é externalizada durante o processo apoptótico. No entanto não permite diferenciar entre células necróticas e apoptóticas. Deste modo recorre-se a uma segunda marcação com 7-amino-actinomicina (7-AAD) uma vez que as células apoptóticas em estágio inicial são capazes de excluir este composto mas a perda da integridade membranar nas células em apoptose tardia/necrose permite a sua passagem até ao núcleo onde se liga ao DNA [108].

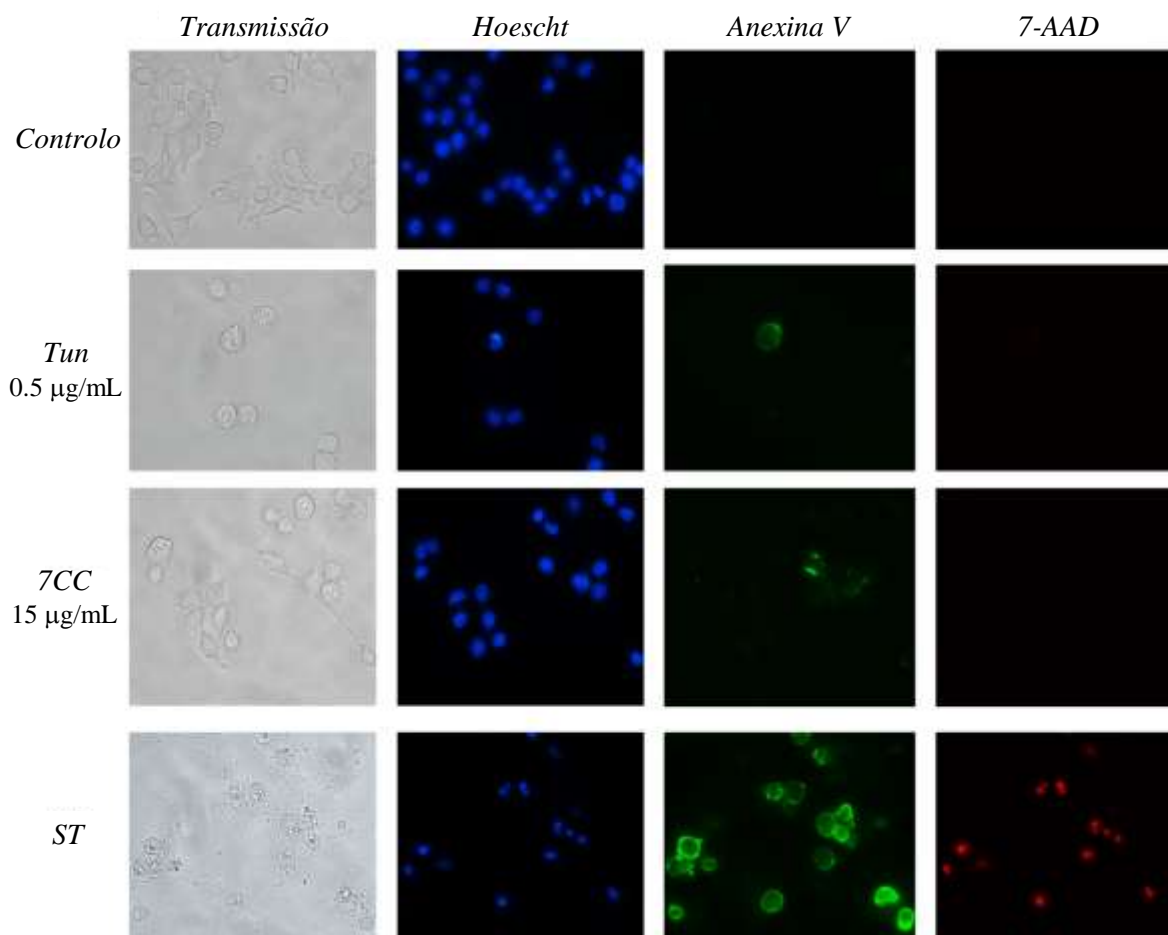


Figura 2.5: Efeito da tunicamicina e do 7-cetocolesterol na externalização da PS. As células RAW 264.7 foram mantidas sem tratamento (*na figura*, Controlo) ou estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL (*na figura*, Tun 0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol na concentração 15 µg/mL (*na figura*, 7CC 15 µg/mL) durante 24 horas. O estágio da apoptose foi determinado por microscopia de fluorescência com as sondas *Hoescht* 33258, *Anexina V* e *7-AAD*. As células intactas aparecem com o núcleo marcado a cor azul, as células apoptóticas em estágio inicial com as membranas a cor verde (externalização da PS) e as células apoptóticas em estágio final (necróticas) com o núcleo marcado a cor vermelha. O tratamento das células com estaurosporina serve de controlo positivo da apoptose (*na figura*, ST).

Como é possível constatar pela observação da figura supra representada, o tratamento das células RAW 264.7 com as concentrações em estudo dos indutores de *stress* do retículo tunicamicina (0.5 µg/mL) e 7-cetocolesterol (15 µg/mL) não parece induzir níveis significativos de apoptose ou mesmo necrose. De facto para as células tratadas com ambos os estímulos a marcação de apoptose e necrose mostrou ser praticamente inexistente e semelhante à das células não tratadas (controlo). Em contrapartida, o tratamento das células com o indutor de apoptose estaurosporina por tempos tão curtos como 4 horas mostrou induzir extensamente a externalização da PS e o comprometimento da integridade membranas. Tais resultados vão de encontro ao esperado uma vez que as concentrações utilizadas resultaram em taxas de viabilidade celular de 80-90%, como demonstrado anteriormente (Subcapítulo 2.4.1, Figura 2.1).

Adicionalmente permitem confirmar que as concentrações mais baixas utilizadas não induzem um nível de apoptose significativo apesar do aumento de expressão do fator pró-apoptótico CHOP observado anteriormente por Western Blot para estas concentrações (Subcapítulo 2.4.2, Figura 2.3). Este fator é de importante relevo uma vez que se pretende no presente estudo avaliar as alterações no perfil lipídico decorrentes da alteração homeostática do retículo endoplasmático e não uma consequência indireta de possível morte celular que esteja a ser induzida. Kaneko e seus colaboradores verificaram que em células CD14<sup>+</sup> tratadas com tunicamicina na concentração 5 µg/mL (concentração 10 vezes superior à praticada neste trabalho), a ocorrência de apoptose rondou apenas 30% [109], o que parece confirmar o efeito pouco nefasto da tunicamicina ao nível da morte apoptótica da célula. Curiosamente, em outro estudo, o tratamento da linha celular de macrófagos J774A.1 com 7-cetocolesterol na concentração 15 µg/mL durante 24 horas resultou em valores de percentagem de células apoptóticas semelhantes, na ordem dos 37%, os quais mostraram ser resultado da diminuição da proliferação celular e concomitante apoptose celular [110]. Dos possíveis análogos oxidados do colesterol o 7-cetocolesterol parece ser o que apresenta maior capacidade de indução de *stress* do retículo para uma menor indução de apoptose [111].

#### 2.4.4 Perfil de classes de fosfolípidos por TLC

A variação do perfil em classes de fosfolípidos das células em *stress* do retículo endoplasmático foi conseguida após a separação das classes por TLC. De forma sucinta, fracionaram-se os extratos lipídicos totais das células RAW 264.7 não tratadas (controlo) e das células estimuladas com tunicamicina ou 7-cetocolesterol por TLC e identificaram-se as classes de fosfolípidos presentes em cada condição experimental por comparação com padrões puros aplicados simultaneamente na placa de TLC. Deste modo foi possível separar e identificar oito classes de fosfolípidos, nomeadamente: lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomiéline (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE) e cardiolipina (CL) (Figura 2.6).

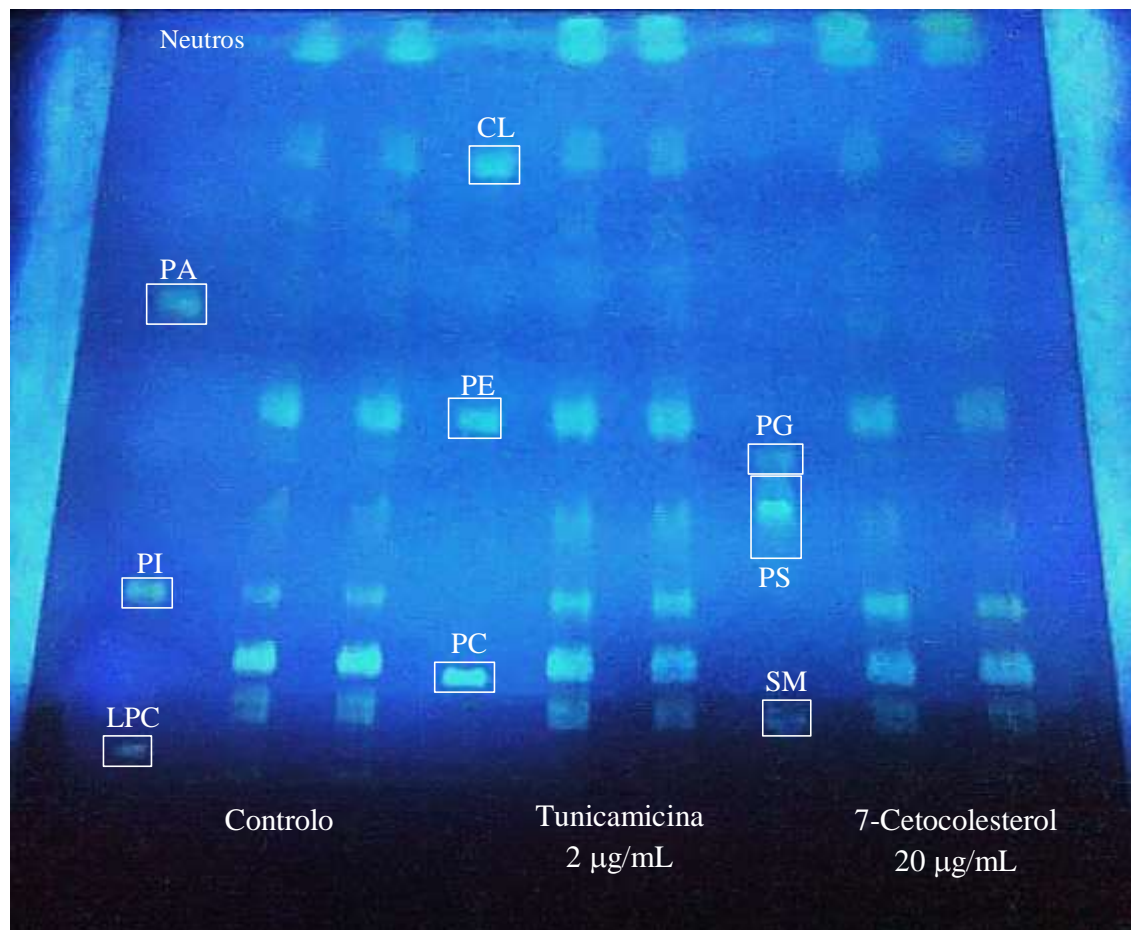


Figura 2.6: Separação das classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico total das células RAW 264.7 não tratadas (*na figura*, Controlo) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 2 µg/mL (*na figura*, Tunicamicina 2 µg/mL) ou 7-cetocolesterol na concentração 20 µg/mL (*na figura*, 7-Cetocolesterol 20 µg/mL) por TLC. Identificação das classes de fosfolípidos separadas em cada condição experimental por comparação com padrões puros aplicados na placa paralelamente às amostras.

A separação das principais classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico total das células foi procedida pela quantificação do conteúdo fosfolipídico presente em cada *spot* de TLC identificado. Por recurso ao ensaio de quantificação espectrofotométrica de fosfato tornou-se possível determinar a percentagem relativa de cada classe de fosfolípido presente nas diferentes condições experimentais em estudo (Figura 2.7). Curiosamente não se verificou a presença de PA nos extratos lipídicos das células (não) tratadas analisados por TLC, apesar da sua importância como precursor das restantes classes de fosfolípidos e enquanto molécula de sinalização representa um dos fosfolípidos menos abundantes nas membranas biológicas [112].

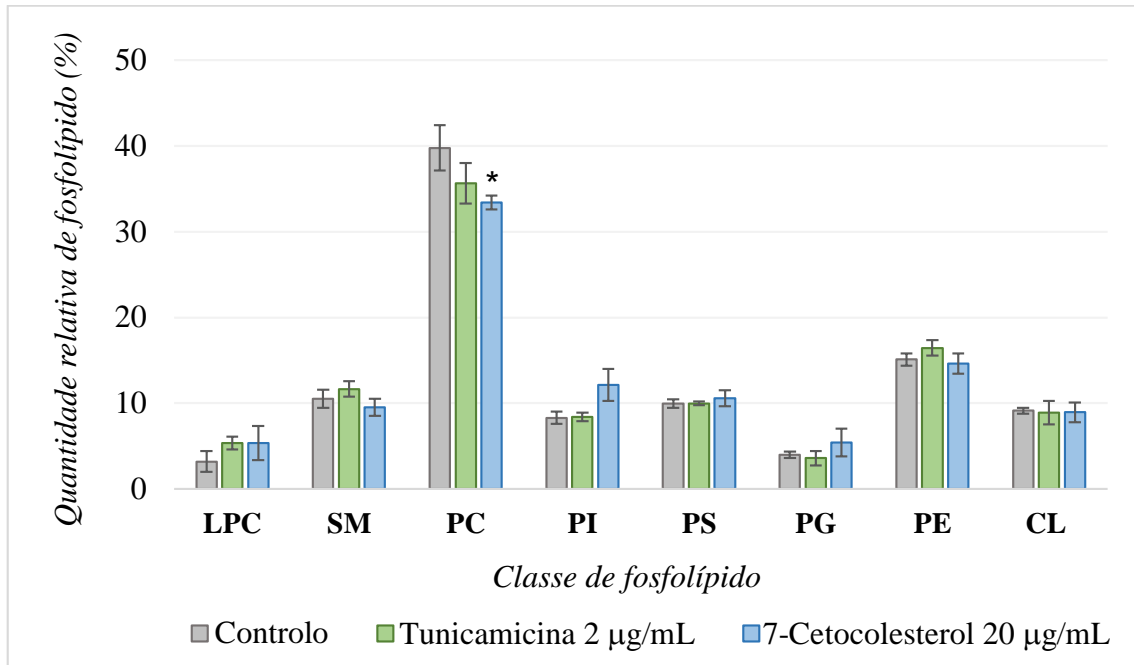
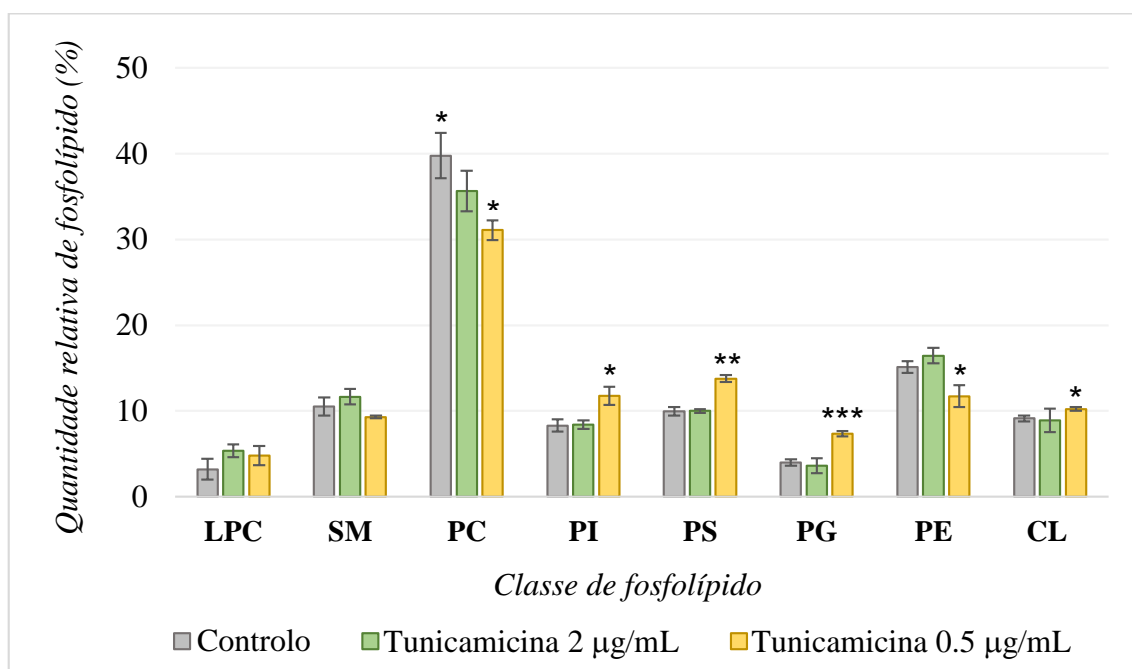


Figura 2.7: Efeito do stress do retículo no perfil de classes de fosfolípidos. Percentagem relativa das principais classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (*na figura*, Controlo) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 2 µg/mL (*na figura*, Tunicamicina 2 µg/mL) ou 7-cetocolesterol na concentração 20 µg/mL (*na figura*, 7-Cetocolesterol 20 µg/mL). As classes de fosfolípidos representadas foram separadas por TLC e a quantidade relativa de cada classe foi determinada por quantificação espectral de fosfato. Os resultados encontram-se representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \*  $p < 0.05$  versus controlo

Numa primeira fase analisou-se o perfil de classes de fosfolípidos das células RAW 264.7 tratadas com as concentrações mais elevadas de ambos estímulos em estudo. Pela análise do gráfico supra representado a classe de fosfolípido mais abundante nas diversas condições experimentais em estudo mostrou ser a PC. No entanto, em comparação com o controlo, verifica-se uma diminuição na sua percentagem relativa nas células tratadas com tunicamicina, a qual é ainda mais acentuada nas células estimuladas com 7-cetocolesterol. Curiosamente a diminuição da percentagem de PC é concomitante com o aumento da percentagem de LPC, o que parece sugerir a conversão da primeira na última. Uma vez que a PC representa a classe de fosfolípido mais abundante das membranas, constituindo, em média, mais de 50% do total de fosfolípidos [113, 114], esperava-se um aumento da sua percentagem nas células em *stress* do retículo endoplasmático devido à expansão da membrana do retículo por síntese lipídica no decorrer da UPR [50, 81, 115]. Walter e seus colaboradores mostraram a expansão do retículo endoplasmático face à indução de *stress* pelo tratamento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com tunicamicina [115]. No estudo mencionado a expansão da membrana do retículo mostrou ser dependente do complexo *Ino2/4*, o qual se mostra responsável pela regulação transcricional de diversas enzimas envolvidas na síntese de fosfolípidos em leveduras [115]. Nas células de

mamíferos a indução da síntese de PC durante a biogénese do retículo é devida ao fator XPB1s, como abordado anteriormente na seção 2.1.2 da introdução do presente capítulo [50, 82].

Considerando que a interrupção da síntese de PC constitui uma característica comum da apoptose [116-118], ponderou-se se a diminuição da sua percentagem relativa poderia estar relacionada com a apoptose nas células em *stress* do retículo. De facto, são vários os estudos que mostram a apoptose das células em consequência da inibição da síntese de PC [119, 120], a qual parece ser conseguida por indução do fator pró-apoptótico CHOP [121, 122]. Ao analisar os dados de viabilidade celular (Subcapítulo 2.4.1, Figura 2.1) constata-se que a concentração utilizada de cada um dos indutores de *stress* do retículo em estudo origina taxas de viabilidade na ordem de 70%, o que se pode significar níveis de mortalidade acentuados uma vez que o valor desejável se situa próximo de 90% de viabilidade. Deste modo propôs-se analisar o perfil de classes de fosfolípidos de células tratadas com concentrações mais baixas de cada estímulo, nomeadamente 0.5  $\mu\text{g/mL}$  para a tunicamicina (Subfigura 2.8a) e 15  $\mu\text{g/mL}$  no que se refere ao 7-cetocolesterol (Subfigura 2.8b), para as quais se demonstrou anteriormente não haver indução substancial de apoptose (Subcapítulo 2.4.3, Figura 2.5).



(a)



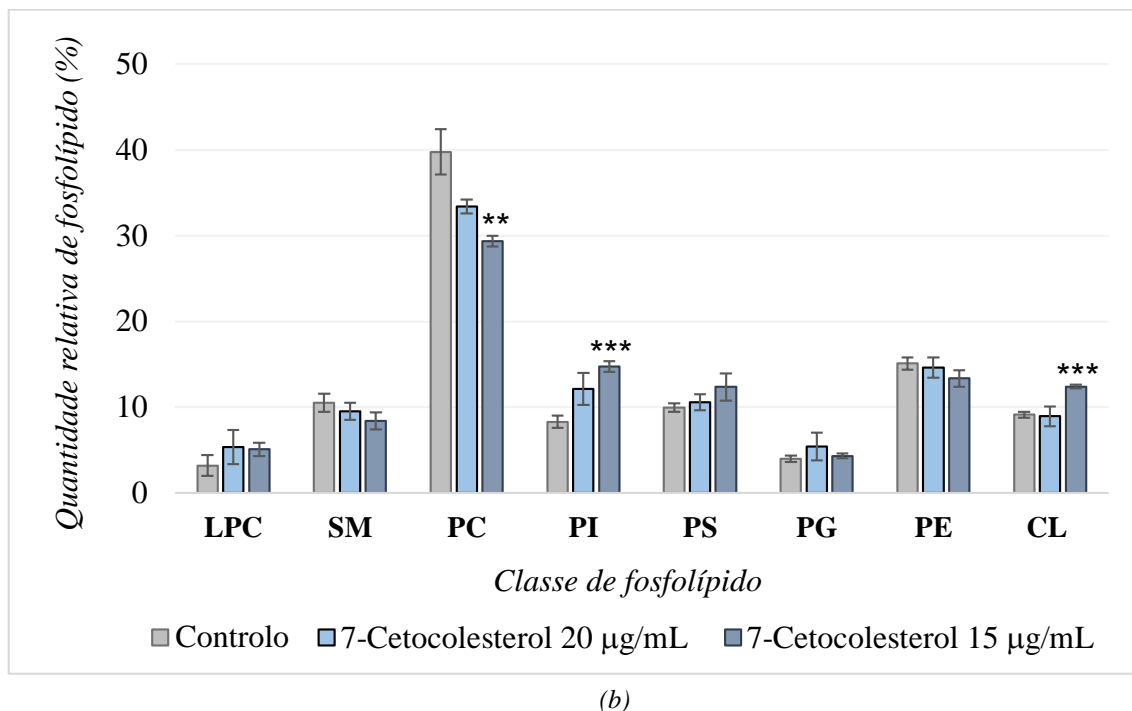


Figura 2.8: Efeito do stress do retículo no perfil de classes de fosfolípidos. Percentagem relativa das principais classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (nas subfiguras (a) e (b), Controlo) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 2 µg/mL (na subfigura (a), Tunicamicina 2 µg/mL) ou 0.5 µg/mL (na subfigura a, Tunicamicina 0.5 µg/mL), e 7-cetocolesterol na concentração 20 µg/mL (na subfigura (b), 7-Cetocolesterol 20 µg/mL) ou 15 µg/mL (na subfigura (b), 7-Cetocolesterol 15 µg/mL). As classes de fosfolípidos representadas foram separadas por TLC e a quantidade relativa de cada classe foi determinada por quantificação espectrofotométrica de fosfato. Os resultados encontram-se representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \*  $p < 0.05$  versus controlo, \*\*  $p < 0.01$  versus controlo, \*\*\*  $p < 0.005$  versus controlo

Pela análise dos gráficos supra representados é possível constatar que, de modo geral, o perfil de classes de fosfolípidos parece ser idêntico para as células tratadas com as duas concentrações de cada estímulo em estudo, sendo a variação na percentagem relativa de cada classe em relação ao controlo ainda mais acentuada para concentrações de estímulo mais baixas. No entanto, mesmo para uma concentração de estímulo mais baixa, continua a verificar-se a diminuição da percentagem relativa de PC. Curiosamente essa diminuição é tão mais acentuada quanto mais baixa for a concentração de estímulo, o que parece, assim, contrariar a hipótese anteriormente formulada de concentrações elevadas do mesmo resultarem em níveis elevados de apoptose, e consequentemente, na diminuição da percentagem relativa de PC.

Posteriormente, colocou-se a hipótese de, mesmo com gamas de concentração baixas, o tempo de exposição das células ao indutor de *stress* do retículo ser demasiado elevado. Assim sendo poderia haver um aumento da percentagem relativa de PC nas primeiras horas de tratamento que estaria a ser ocultado pela indução de níveis acentuados de *stress* do retículo em

consequência da exposição prolongada. Deste modo optou-se por tratar novamente as células com a concentração mais baixa de tunicamicina em estudo (0.5 µg/mL) mas deixá-las expostas ao estímulo durante somente 8 horas, em oposição às usuais 24 horas, e ao fim desse tempo substituir o meio por novo e deixar durante as restantes 16 horas para perfazer o total de 24 horas e obter o perfil de classes de fosfolípidos (Figura 2.9).

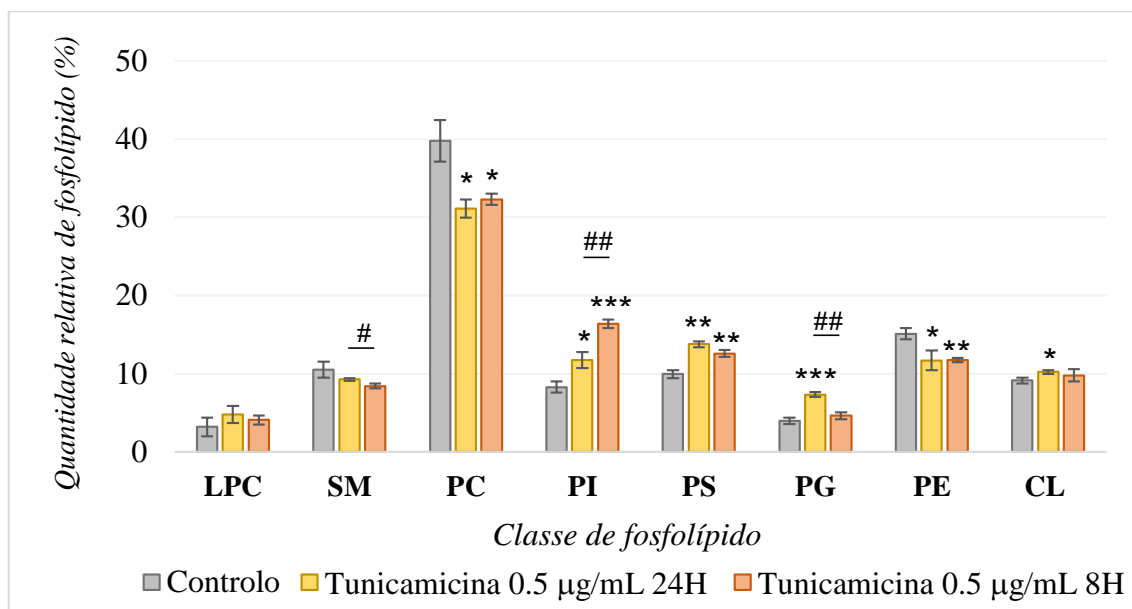


Figura 2.9: Efeito do stress do retículo no perfil de classes de fosfolípidos. Percentagem relativa das principais classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (*na figura*, Controlo) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL durante 24 horas (*na figura*, Tunicamicina 0.5 µg/mL 24H) ou 8 horas (*na figura*, Tunicamicina 0.5 µg/mL 8H). As classes de fosfolípidos representadas foram separadas por TLC e a quantidade relativa de cada classe foi determinada por quantificação espectral de fosfato. Os resultados encontram-se representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \*  $p < 0.05$  versus controlo, \*\*  $p < 0.01$  versus controlo, \*\*\*  $p < 0.005$  versus controlo, #  $p < 0.05$  8H versus 24H, ##  $p < 0.01$  8H versus 24H

Como é possível constatar pela observação do gráfico supra representado o perfil de classes de fosfolípidos das células em *stress* do retículo é bastante semelhante para os dois tempos de exposição à tunicamicina (24 e 8 horas). De facto a variação na percentagem relativa de cada classe em relação ao controlo é semelhante, com ênfase para a PC, com somente ligeiras diferenças para as classes SM, PI e PG. Estes dados sugerem que as adaptações no metabolismo lipídico decorrentes da ocorrência de *stress* do retículo endoplasmático, nomeadamente ao nível das classes de fosfolípidos, ocorrem nas primeiras horas de exposição das células ao indutor de *stress* e mantêm-se ao longo do tempo de exposição ao estímulo.

De acordo com a literatura existente a regulação do metabolismo lipídico parece depender da fonte e severidade do *stress* do retículo [70, 72]. Assim sendo ponderou-se a hipótese de concentrações elevadas de estímulo induzirem níveis de *stress* do retículo severos e agudos com

morte das células e diminuição da percentagem de PC, e de concentrações mais baixas resultarem em níveis de *stress* mais suaves e crónicos com aumento da percentagem relativa de PC durante a expansão do retículo. Numa última tentativa trataram-se as células com 7-cetocolesterol na concentração 5  $\mu\text{g/mL}$  durante 36 horas, de forma a simular a ocorrência de níveis de *stress* do retículo crónicos pelo tratamento com a concentração mínima capaz de induzir *stress* sem morte celular, e obteve-se o perfil de classes de fosfolípidos (Figura 2.10).

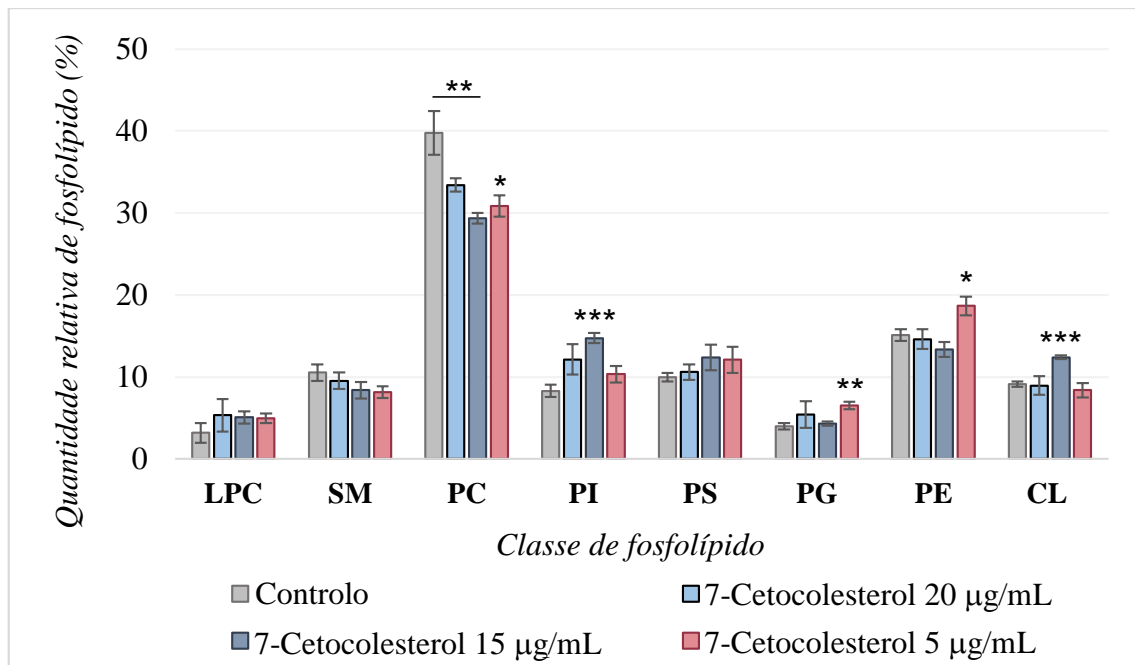


Figura 2.10: Efeito do stress do retículo no perfil de classes de fosfolípidos. Percentagem relativa das principais classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (*na figura*, Controlo) e das células estimuladas com 7-cetocolesterol na concentração 20  $\mu\text{g/mL}$  (*na figura*, 7-Cetocolesterol 20  $\mu\text{g/mL}$ ), 15  $\mu\text{g/mL}$  (*na figura*, 7-Cetocolesterol 15  $\mu\text{g/mL}$ ) ou 5  $\mu\text{g/mL}$  (*na figura*, 7-Cetocolesterol 5  $\mu\text{g/mL}$ ). As classes de fosfolípidos representadas foram separadas por TLC e a quantidade relativa de cada classe foi determinada por quantificação espectral de fosfato. Os resultados encontram-se representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \*  $p < 0.05$  versus controlo, \*\*  $p < 0.01$  versus controlo, \*\*\*  $p < 0.005$  versus controlo

A indução de *stress* do retículo por períodos mais longos (36 horas) a uma concentração mínima (5  $\mu\text{g/mL}$ ) do indutor de *stress* 7-cetocolesterol resultou num perfil de classes de fosfolípidos semelhante ao obtido para as outras concentrações em estudo. Como é possível constatar pela análise do gráfico representado na figura 2.10 continua a verificar-se a diminuição da percentagem relativa de PC e para valores semelhantes aos obtidos nas outras condições experimentais em estudo. Assim, mesmo na presença de níveis de *stress* moderados mas por tempos mais longos, continua a verificar-se a diminuição da percentagem de PC. Hipoteticamente a indução de *stress* do retículo endoplasmático e, conseqüente, ativação da UPR deveria resultar na expansão do retículo de forma a lidar melhor com a elevada exigência pelo

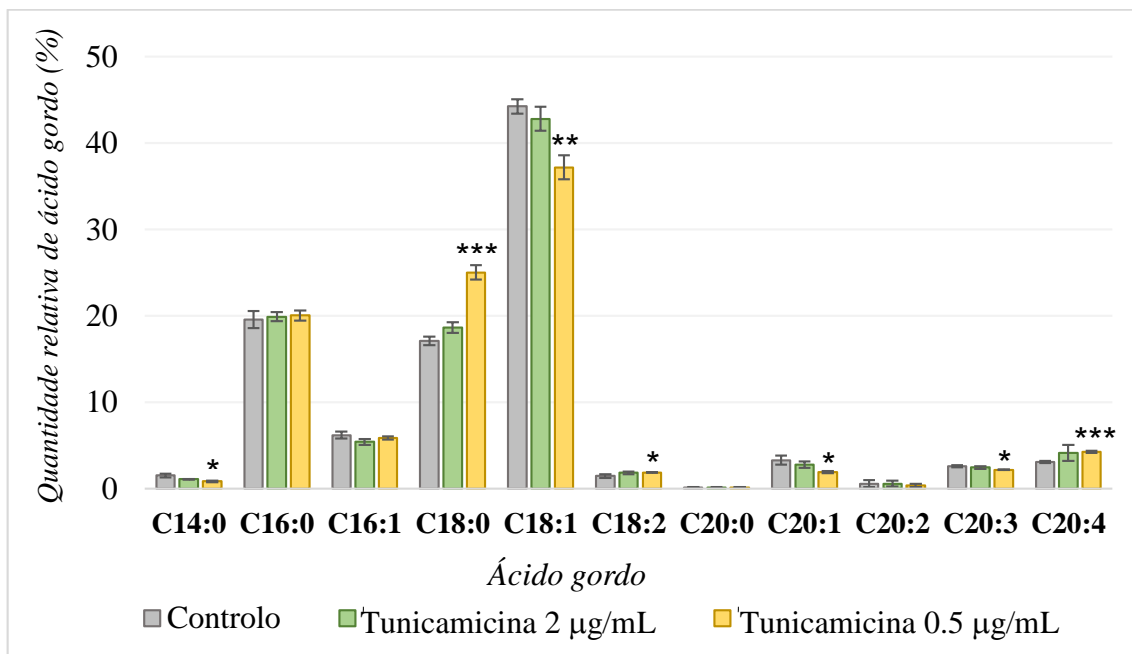
correto enovelamento das proteínas recém-sintetizadas. Desta forma a expansão do retículo deveria passar pelo aumento da síntese dos fosfolípidos que compõem a sua membrana, principalmente da PC [50, 115]. No entanto verifica-se continuamente a diminuição da percentagem relativa desta classe mesmo quando o tratamento das células com concentrações mínimas de estímulo. Curiosamente verifica-se um aumento da percentagem relativa das classes PS e CL nas células em *stress*, nomeadamente nas células tratadas com a concentração mais baixa de ambos os estímulos. Uma vez que estes dois fosfolípidos se encontram envolvidos na apoptose onde parecem sofrer oxidação, e sua consequente diminuição [68, 123], caso a indução de *stress* do retículo resultasse em níveis de morte apoptótica significativos seria então espectável a diminuição da sua percentagem. Assim, estes resultados parecem confirmar os resultados obtidos no estudo da marcação da apoptose por externalização de PS (Subcapítulo 2.4.3; Figura 2.5) nos quais a apoptose e a necrose mostraram ser praticamente inexistentes nas células em *stress* do retículo.

Apesar de se observar continuamente a diminuição da percentagem relativa de PC para as diversas concentrações e tempos de exposição aos estímulos em estudo, não implica necessariamente que não ocorra o aumento da sua síntese nas células em *stress* do retículo. O facto do tratamento das células RAW 264.7 com tunicamicina ou 7-cetocolesterol apresentar repercussões ao nível da sua atividade metabólica/viabilidade (Subcapítulo 2.4.1, Figura 2.1) pode, em parte, explicar os resultados obtidos. Uma vez que o número de células viáveis é menor mesmo que suceda um incremento na síntese de PC no conjunto a sua percentagem pode ser inferior à obtida para as células não tratadas (controlo). O intrigante no presente trabalho é o facto das células tratadas com menor concentração de cada estímulo apresentarem valores de percentagem de PC ainda menores, ou seja uma maior variação em comparação com o controlo, o que nos poderia levar a questionar novamente a hipótese supra formulada. Todavia o que parece estar a ocorrer é a remodelação do metabolismo lipídico de forma distinta consoante o nível de *stress* do retículo induzido, até porque a indução de níveis de *stress* mais moderados pelo tratamento com concentrações mais baixas parece suscitar alterações mais acentuadas no perfil de fosfolípidos (Figura 2.8). Não obstante, é ainda prudente ter em consideração o facto da percentagem de fosfolípidos se encontrar expressa em relação à totalidade das classes, o que significa que pode ocorrer o aumento da síntese de PC mas em menor extensão comparativamente às restantes classes de fosfolípidos. De modo geral, e em sùmula, verifica-se o aumento relativo das classes de fosfolípidos PI, LPC, PS, CL e PG e em contrapartida uma diminuição de PC, PE e SM nas células em *stress* do retículo.

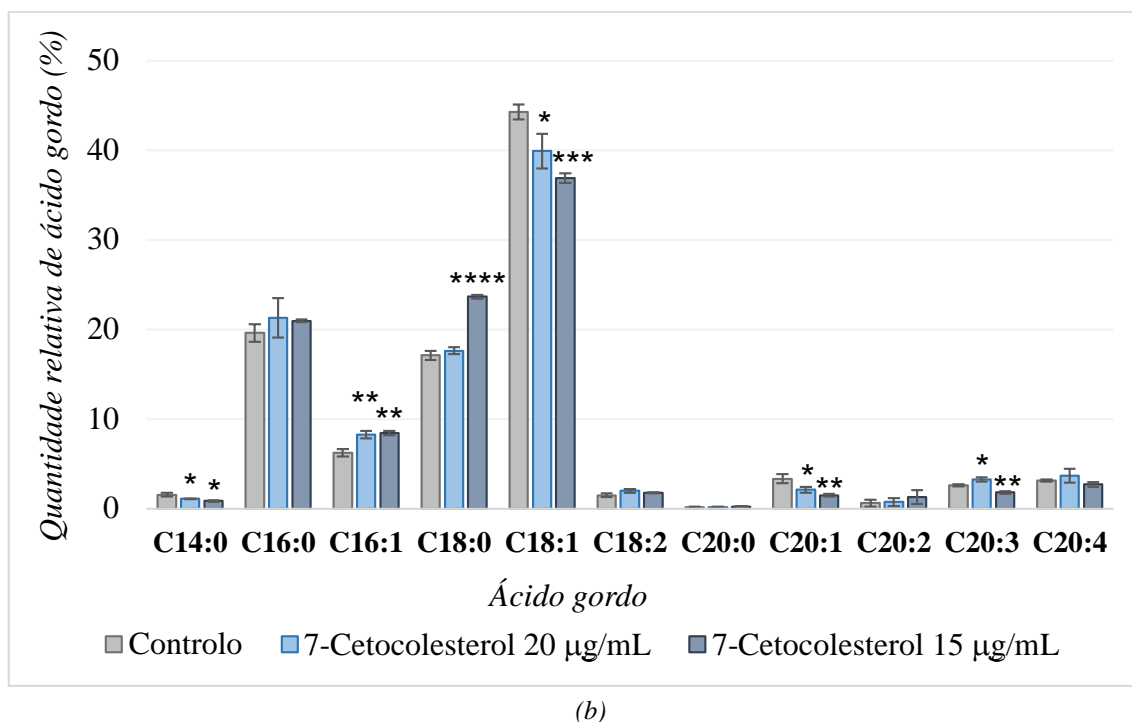
### 2.4.5 Perfil de ácidos gordos por GC-MS

Tendo em conta os resultados obtidos para as classes de fosfolípidos questionou-se quais os efeitos da indução de *stress* do retículo endoplasmático ao nível do perfil de ácidos gordos. O

perfil em ácidos gordos das células em *stress* do retículo endoplasmático foi analisado por recurso à técnica de GC-MS. Sucintamente trataram-se as células RAW 264.7 com diferentes concentrações de cada um dos estímulos em estudo, nomeadamente tunicamicina (2 e 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 7-cetocolesterol (15 e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A análise do cromatograma de GC-MS e dos espetros de massa respetivos permitiu a identificação dos principais ácidos gordos presentes no extrato lipídico total das várias condições, nomeadamente: ácido tetradecanóico (C14:0); ácido hexadecanóico saturado (C16:0) e monoinsaturado (C16:1); ácido octadecanóico saturado (C18:0), monoinsaturado (C18:1) e di-insaturado (C18:2); ácido eicosanóico saturado (C20:0), monoinsaturado (C20:1) e poli-insaturado (C20:2, C20:3 e C20:4). A integração dos picos dos cromatogramas permitiu determinar a percentagem relativa de cada ácido gordo identificado nas condições experimentais em estudo e, deste modo, verificar o efeito da indução de *stress* do retículo endoplasmático no perfil de ácidos gordos das células tratadas com tunicamicina (Subfigura 2.11a) ou 7-cetocolesterol (Subfigura 2.11b).



(a)



(b)

Figura 2.11: Efeito do stress do retículo no perfil de ácidos gordos. Percentagem relativa dos principais ácidos gordos presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (nas subfiguras (a) e (b), Controlo) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 2 µg/mL (na subfigura (a), Tunicamicina 2 µg/mL) ou 0.5 µg/mL (na subfigura (a), Tunicamicina 0.5 µg/mL), e 7-cetocolesterol na concentração 20 µg/mL (na subfigura (b), 7-Cetocolesterol 20 µg/mL) ou 15 µg/mL (na subfigura (b), 7-Cetocolesterol 15 µg/mL). O perfil de ácidos gordos foi obtido pela análise do cromatograma e dos espectros de massa resultantes do estudo das amostras por GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \*  $p < 0.05$  versus controlo, \*\*  $p < 0.01$  versus controlo, \*\*\*  $p < 0.005$  versus controlo, \*\*\*\*  $p < 0.001$  versus controlo

Pela análise da figura 2.11 é possível constatar as semelhanças existentes na variação do perfil de ácidos gordos das células estimuladas com os dois indutores de *stress* do retículo em estudo: tunicamicina e 7-cetocolesterol. De forma semelhante ao obtido anteriormente para as classes de fosfolípidos, a variação na percentagem relativa de cada ácido gordo em relação ao controlo é ainda mais acentuada para concentrações de estímulo mais baixas, principalmente no que respeita aos ácidos gordos C18:0 e C18:1. Para as diferentes condições experimentais em estudo, os ácidos gordos C16:0, C18:0 e C18:1 representam aproximadamente 80% da percentagem total de ácidos gordos observados. De modo geral o perfil de ácidos gordos encontra-se de acordo com o esperado considerando a análise lipidómica de ácidos gordos essenciais de macrófagos RAW 264.7 desenvolvida por Dennis e seus colaboradores [124].

Uma vez mais, na presença de níveis de *stress* mais baixos parece haver uma maior resposta em termos de adaptação do metabolismo lipídico face à ocorrência de *stress* em oposição ao verificado quando se utiliza concentrações elevadas de estímulo. Na tentativa de

perceber se as alterações observadas no perfil de ácidos gordos da célula em *stress* do retículo ocorrem no início do tratamento e se mantêm inalteráveis ao longo da exposição ao estímulo realizou-se a mesma análise para as células expostas a tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL durante somente 8 horas (Figura 2.12).

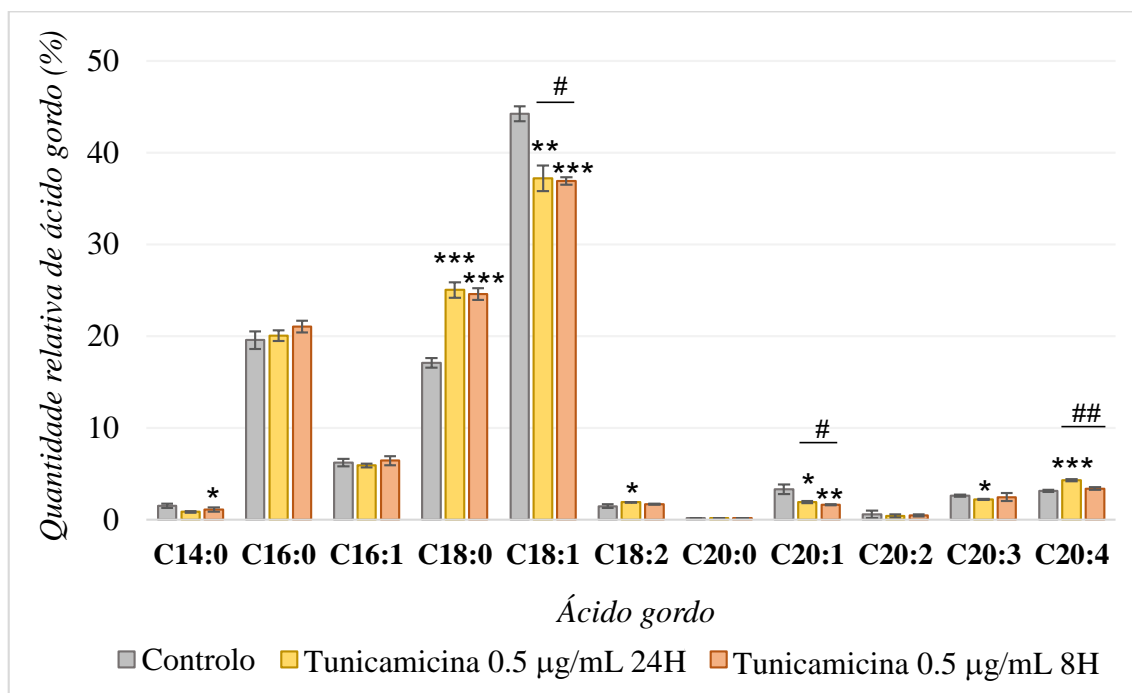


Figura 2.12: Efeito do stress do retículo no perfil de ácidos gordos. Percentagem relativa dos principais ácidos gordos presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (na figura, Controlo) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL durante 24 horas (na figura, Tunicamicina 0.5 µg/mL 24H) ou 8 horas (na figura, Tunicamicina 0.5 µg/mL 8H). O perfil de ácidos gordos foi obtido pela análise do cromatograma e dos espectros de massa resultantes do estudo das amostras por GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de média ± desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \* p < 0.05 versus controlo, \*\* p < 0.01 versus controlo, \*\*\* p < 0.005 versus controlo, # p < 0.05 8H versus 24H, ## p < 0.01 8H versus 24H

Como é possível constatar pela análise da figura 2.12 o tempo de exposição ao indutor de *stress* do retículo não parece influenciar o perfil lipídico das células no que respeita aos ácidos gordos uma vez que se obteve um perfil idêntico para as células tratadas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL durante 8 ou 24 horas. Em termos de perfil de resposta esta foi em tudo semelhante à anteriormente observada para as classes de fosfolípidos.

De modo geral, para as diversas concentrações de ambos os estímulos em estudo, parece haver um aumento na percentagem relativa de ácidos gordos saturados e, conseqüente, diminuição da percentagem relativa de ácidos gordos insaturados nas células em *stress* do retículo. Para uma melhor visualização segue-se a representação gráfica da variação na

percentagem relativa de ácidos gordos saturados *versus* mono- e poli-insaturados nas células (não) tratadas (Figura 2.13).

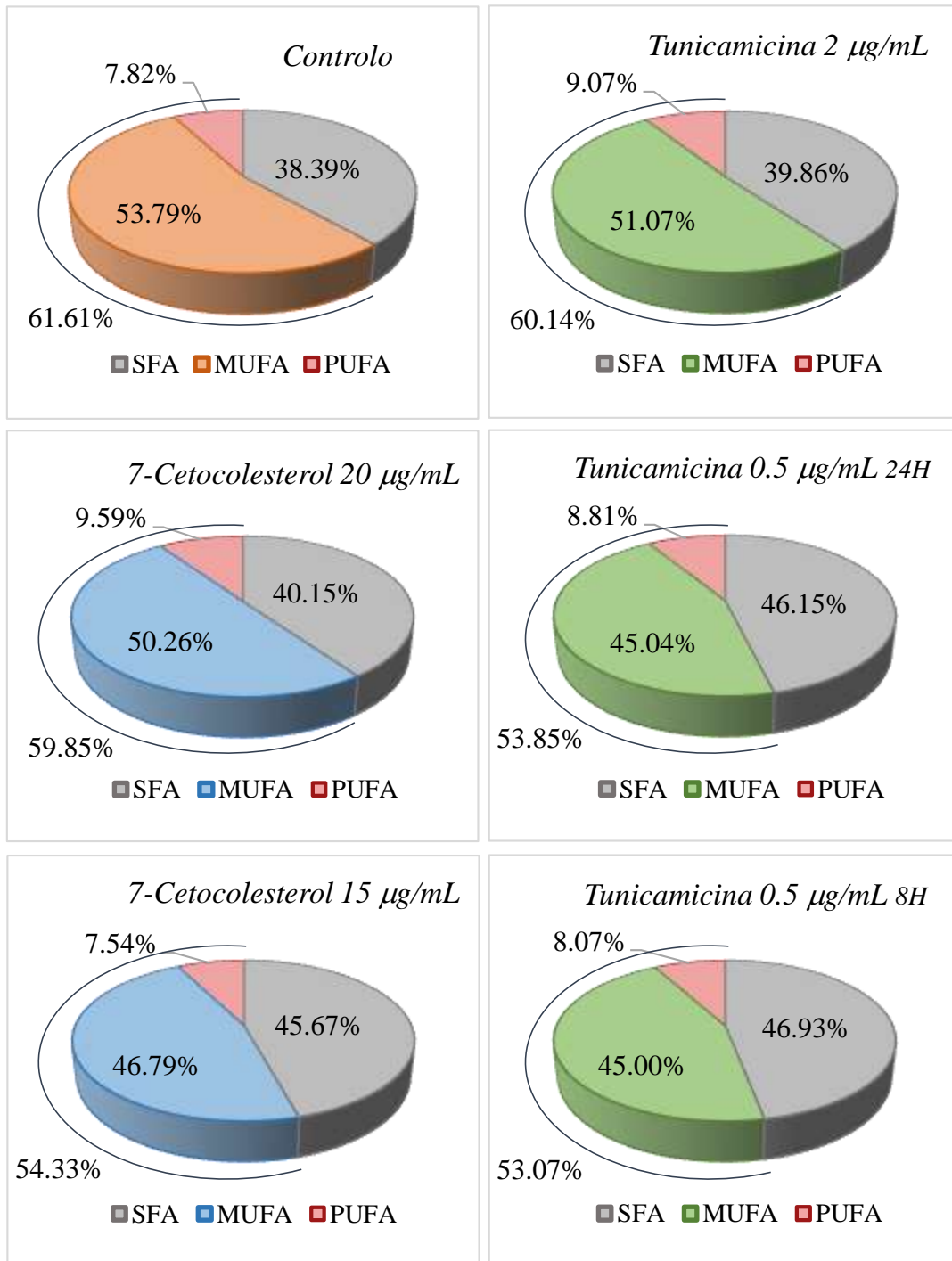


Figura 2.13: Efeito do stress do retículo no perfil de ácidos gordos. Variação da percentagem relativa de ácidos gordos saturados (*nas figuras*, SFA) *versus* insaturados, estes últimos discriminados em mono- (*nas figuras*, MUFA) e poli-insaturados (*nas figuras*, PUFA), nas células RAW 264.7 não tratadas (*na figura*, Controlo) ou estimuladas com diversas concentrações e tempos de exposição de tunicamicina (*nas figuras*, Tunicamicina 2 µg/mL, Tunicamicina 0.5 µg/mL 24H e Tunicamicina 0.5 µg/mL 8H) e 7-cetocolesterol (*nas figuras*, 7-



Cetocolesterol 20  $\mu\text{g/mL}$  e 7-Cetocolesterol 15  $\mu\text{g/mL}$ ). Os resultados expressam a média de três amostras biológicas independentes (N=3).

A indução de *stress* do retículo endoplasmático parece resultar num aumento da percentagem relativa de ácidos gordos saturados e consequente diminuição da percentagem de insaturados. Em concordância com os resultados anteriores, essas variações são tanto maiores quanto menor a concentração dos estímulos em estudo. De modo geral a percentagem de ácidos gordos poli-insaturados parece aumentar face à ocorrência de *stress* do retículo o que pode sugerir o favorecimento da poli-insaturação dos ácidos gordos nessas condições.

## 2.4.6 Avaliação do perfil lipídico por HPLC-MS

Para uma abordagem mais completa sobre o efeito do *stress* do retículo endoplasmático no perfil lipídico do macrófago recorreu-se a uma abordagem lipidómica baseada na análise de HPLC-MS, a qual permite simultaneamente o fracionamento de diversas classes de fosfolípidos por HPLC e a análise MS e MS/MS de cada uma das classes separadas. A análise dos extratos lipídicos totais das células (não) tratadas por HPLC-MS e MS/MS foi efetuada no modo positivo para a análise das classes de fosfolípidos PC, LPC e SM (Subfigura 2.14a), assim como no modo negativo para as classes PE, LPE, PS, PG e PI (Subfigura 2.14b). Deste modo tornou-se possível a identificação e quantificação das espécies moleculares constituintes de cada classe de fosfolípidos nas diversas condições experimentais em estudo: células não tratadas (controlo) e células estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5  $\mu\text{g/mL}$  ou 7-cetocolesterol na concentração 15  $\mu\text{g/mL}$ . A concentração utilizada de cada estímulo foi definida tendo em conta os resultados de TLC e GC-MS reportados. Uma vez que o efeito da ocorrência de *stress* do retículo ao nível das classes de fosfolípidos e dos ácidos gordos mostrou ser mais proeminente nas células tratadas com menor concentração de cada estímulo, optou-se por analisar por HPLC-MS os extratos lipídicos totais das condições supra mencionadas.

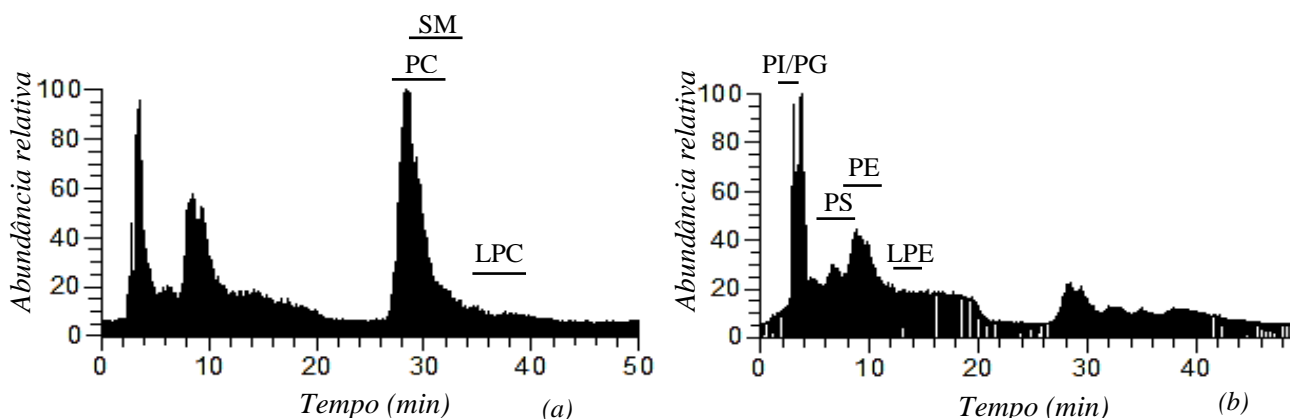


Figura 2.14: Cromatograma da análise do extrato lipídico total de células RAW 264.7 não tratadas no modo positivo (subfigura a) e negativo (subfigura b). Uma vez que o cromatograma apresenta um perfil similar para

as diversas condições experimentais em estudo, é mostrado somente o de uma réplica biológica do controlo para o efeito. A ordem de eluição das classes de fosfolípidos nos respetivos modos de análise, positivo e negativo, encontra-se igualmente representada nas *subfiguras a e b*.

Segue-se a análise detalhada de cada uma das classes de fosfolípidos por recurso aos espetros de MS e MS/MS obtidos, a qual é iniciada pelas classes analisadas no modo positivo (PC, LPC e SM) e procedida pelas classes analisadas no modo negativo (PE, LPE, PS, PI e PG).

### 2.4.6.1 Análise do perfil de PC

A classe de fosfolípido PC representa a classe mais abundante das membranas biológicas, e mostrou ser a principal classe presente nos extratos lipídicos totais analisados por HPLC-MS como é possível constatar pelo gráfico supra representado. A PC ioniza preferencialmente no modo positivo formando iões  $[M + H]^+$  e  $[M + Na]^+$ . O espetro de MS obtido para esta classe encontra-se representado na figura que se segue (Figura 2.15).

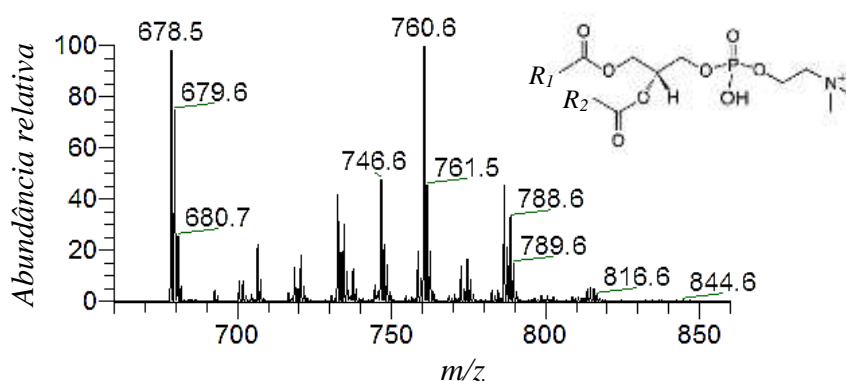


Figura 2.15: Espetro HPLC – MS evidenciando os iões  $[M + H]^+$  da classe PC formados pela análise no modo positivo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo). O espetro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião, em relação ao mais abundante considerado 100%, em função do respetivo valor de  $m/z$ . O ião de  $m/z$  678.5 corresponde ao padrão PC(14:0/14:0) adicionado previamente à amostra. Estrutura generalizada da classe PC (na figura: canto superior direito).

As espécies moleculares, pertencentes à classe PC, mais abundantes foram identificadas, e analisadas quanto ao número de carbonos e insaturações e às possíveis combinações de ácidos gordos (Tabela 2.1). A análise dos espetros de MS/MS permitiu ainda a identificação de espécies diacil assim como alquenil, com estas últimas a corresponder à substituição do grupo  $O = C - CH_2$  pelos grupos  $HC = CH$  (*plasménil*, *O*) ou  $H_2C - CH_2$  (*plasmánil*, *P*).

Tabela 2.1: Identificação dos iões  $[M + H]^+$  e  $[M + Na]^+$  da classe PC observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas, com base no valor de  $m/z$  e na interpretação do respetivo espectro MS/MS para determinação da sua composição em ácidos gordos. C: número total de carbonos nas cadeias de ácidos gordos; N: número de ligações duplas nas cadeias de ácidos gordos.

	Espécies diacil				Espécies alquenil					
	$m/z$ $[M+H]^+$	$m/z$ $[M+Na]^+$	C:N	Ácidos gordos	$m/z$ $[M+H]^+$	$m/z$ $[M+Na]^+$	C:N	Ácidos gordos		
<b>PC</b>	704.5		30:1	14:0/16:1	724.4	746.6	34:1	<i>O</i> -16:0/18:1		
				14:1/16:1					<i>O</i> -16:1/18:0	
	706.5		30:0	14:0/16:0				34:0	<i>P</i> -16:0/18:0	
	732.6		32:1	14:0/18:1	768.4	790.6	36:4	<i>O</i> -16:2/20:2		
				14:1/18:0	792.6	814.6	38:6	<i>O</i> -18:0/20:6		
				16:0/16:1	818.7	840.5	40:7	<i>O</i> -18:1/22:6		
	758.6		34:2	16:0/18:2	826.5	848.4	40:3	<i>O</i> -18:1/22:2		
				16:1/18:1			40:2	<i>P</i> -18:0/22:2		
	760.6		782.4	34:1	14:0/20:1	832.6		40:0	<i>P</i> -18:2/22:0	
			16:0/18:1		16:0/18:0				<i>O</i> -18:0/22:0	
	762.6	784.4	34:0	16:0/18:0	848.6	870.4	38:0	<i>O</i> -16:0/22:0		
	784.5	806.5	36:3	18:0/18:3	852.7	874.5	42:4	<i>O</i> -18:0/20:0		
	786.6	806.6	36:2	16:0/20:2						<i>O</i> -20:0/22:4
				16:1/20:1						<i>O</i> -20:2/22:2
				18:0/18:2			<i>O</i> -20:4/22:0			
	788.6	810.6	36:1	18:1/18:1						
				16:0/20:1						
				16:1/20:0						
	790.6	812.6	36:0	18:0/18:0						
	810.6	832.6	38:4	16:0/22:4						
				18:1/20:3						
	812.6	834.5	38:3	16:1/22:2						
				18:0/20:3						
				18:1/20:2						
	814.6	836.3	38:2	18:2/20:1						
				18:0/20:2						
	816.6	838.6	38:1	18:1/20:1						
				16:1/22:0						
838.6	860.5	40:4	18:0/20:1							
			18:0/22:4							
840.5		40:3	20:1/20:3							
			18:1/22:2							
842.6	864.3	40:2	18:0/22:2							

				20:0/20:2	
	852.7	874.5	42:11	20:5/22:6	
				20:6/22:5	

Após a identificação das diversas espécies moleculares pertencentes à classe PC procedeu-se à quantificação relativa dos iões  $[M + H]^+$  tendo em conta a área do seu pico no cromatograma e a área somada de todas as espécies. O cálculo da percentagem relativa foi efetuado para as diversas condições experimentais em análise a fim de averiguar o efeito do stress do retículo na abundância relativa de cada espécie molecular (Figura 2.16).

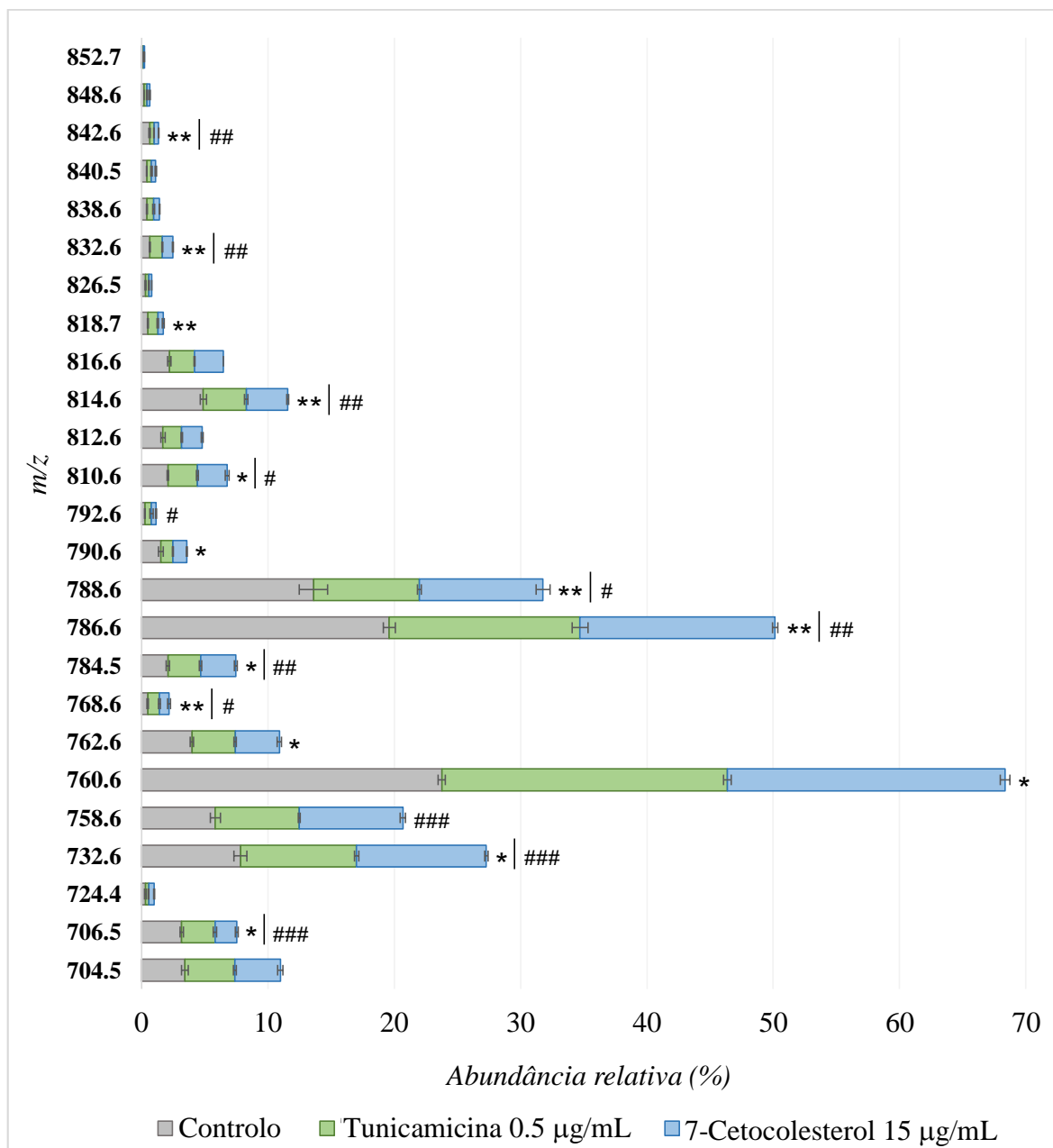


Figura 2.16: Efeito do stress do retículo no perfil de PC. Percentagem relativa dos iões  $[M + H]^+$  da classe PC presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (na figura, Controlo) e das células estimuladas

com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL (na figura, Tunicamicina 0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol na concentração 15 µg/mL (na figura, 7-Cetocolesterol 15 µg/mL). Após a identificação determinou-se a percentagem relativa de cada espécie para as condições experimentais em estudo. Os resultados encontram-se representados em termos de média ± desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \* p < 0.05 tunicamicina versus controlo, \*\* p < 0.01 tunicamicina versus controlo, # p < 0.05 7-cetocolesterol versus controlo, ## p < 0.01 7-cetocolesterol versus controlo, ### p < 0.005 7-cetocolesterol versus controlo

Como é possível constatar pelo gráfico supra representado, as espécies moleculares da classe PC apresentam diferente abundância relativa entre si, sendo os iões de  $m/z$  732.6, 760.6, 786.6 e 788.6 os mais abundantes nas condições experimentais em estudo. Curiosamente ao comparar a diferença na abundância relativa destas espécies entre as células não tratadas e as células estimuladas com tunicamicina ou 7-cetocolesterol é possível constatar que a percentagem relativa de cada espécie é bastante semelhante nas diferentes condições. Deste modo parece que a ocorrência de *stress* do retículo não resulta em alterações acentuadas no perfil de espécies PC. Tais resultados já eram esperados devido ao importante papel estrutural da classe PC. Atendendo aos resultados obtidos por TLC podemos concluir que apesar da diminuição global das PC esta não se traduz numa alteração do perfil das suas espécies moleculares. Por fim podemos ainda constatar que as espécies contendo ácidos gordos com menor número de carbonos e de insaturações parecem ser mais abundantes nas células (não) tratadas em comparação com os iões correspondentes a ácidos gordos de maior número de carbonos.

#### 2.4.6.2 Análise do perfil de LPC

A LPC mostrou ser umas das classes de fosfolípidos menos abundantes para as diversas condições experimentais em estudo. Segue-se a representação gráfica de um dos espectros de MS obtidos para esta classe, a qual ioniza preferencialmente na forma de iões  $[M + H]^+$  (Figura 2.17).

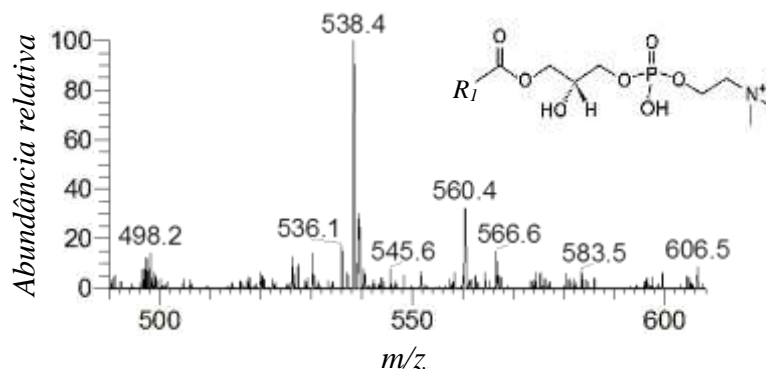


Figura 2.17: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões  $[M + H]^+$  da classe LPC formados pela análise no modo positivo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo). O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião, em relação ao mais abundante considerado 100%, em função do

respetivo valor de  $m/z$ . O íon de  $m/z$  538.4 corresponde ao padrão LPC(19:0) adicionado previamente à amostra. Estrutura generalizada da classe LPC (na figura: canto superior direito).

As espécies monoacil mais abundantes foram identificadas, e analisadas quanto ao número de carbonos e insaturações e ao ácido gordo constituinte (Tabela 2.2). Seguidamente determinou-se a percentagem relativa de cada um dos íões  $[M + H]^+$  identificados (Figura 2.18).

Tabela 2.2: Identificação dos íões  $[M + H]^+$  e  $[M + Na]^+$  da classe LPC observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas, com base no valor de  $m/z$  e na interpretação do respetivo espectro MS/MS para determinação da sua composição em ácidos gordos. C: número total de carbonos nas cadeias de ácidos gordos; N: número de ligações duplas nas cadeias de ácidos gordos.

LPC	Espécies acil			Espécies alquenil		
	$m/z$ $[M+H]^+$	$m/z$ $[M+Na]^+$	Ácido gordo	$m/z$ $[M+H]^+$	$m/z$ $[M+Na]^+$	Ácido gordo
	494.4	516.4	16:1	516.4	538.4	O-20:0
496.4	518.4	16:0				
518.4	540.4	18:3				
522.4	544.4	18:1				
524.2	546.4	18:0				

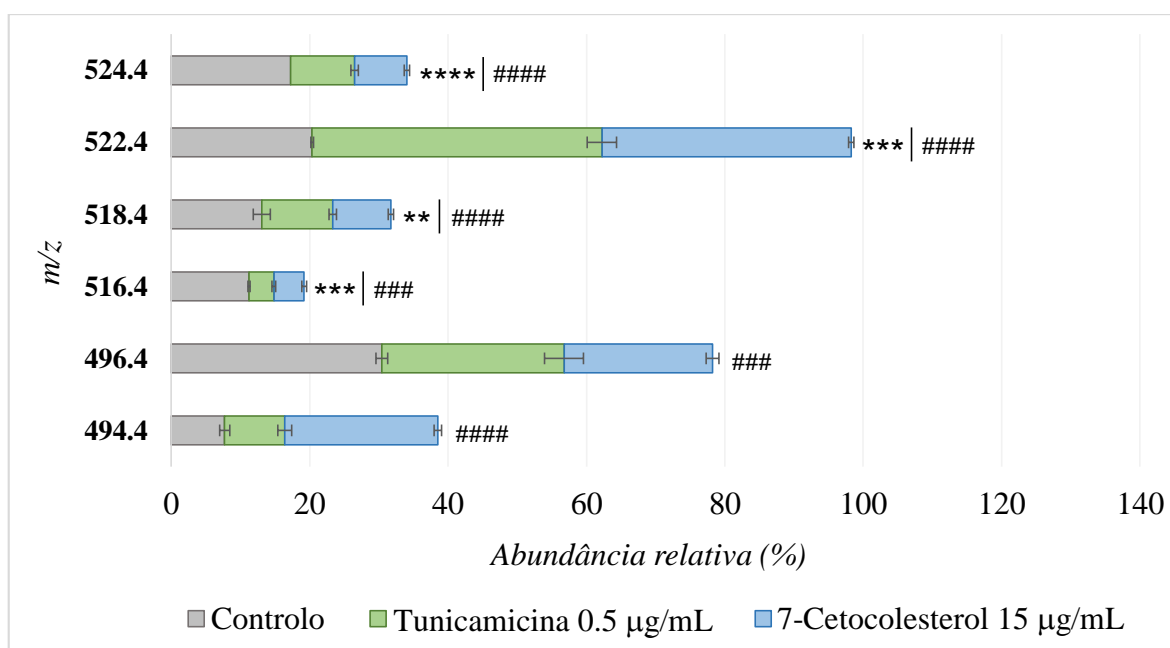


Figura 2.18: Efeito do stress do retículo no perfil de LPC. Percentagem relativa dos íões  $[M + H]^+$  da classe LPC presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (na figura, Controlo) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5  $\mu\text{g/mL}$  (na figura, Tunicamicina 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) ou 7-cetocolesterol na concentração 15  $\mu\text{g/mL}$  (na figura, 7-Cetocolesterol 15  $\mu\text{g/mL}$ ). Após a identificação determinou-se a percentagem relativa de cada espécie para as condições experimentais em estudo. Os resultados encontram-se representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de três amostras biológicas

independentes (N=3). \*\*  $p < 0.01$  tunicamicina *versus* controlo, \*\*\*  $p < 0.005$  tunicamicina *versus* controlo, \*\*\*\*  $p < 0.001$  tunicamicina *versus* controlo, #  $p < 0.05$  7-cetocolesterol *versus* controlo, ###  $p < 0.005$  7-cetocolesterol *versus* controlo, ####  $p < 0.001$  7-cetocolesterol *versus* controlo

À semelhança do observado anteriormente para a classe PC, apesar da diferença visível na abundância relativa entre espécies moleculares representadas, a percentagem de cada espécie é bastante semelhante nas diferentes condições em análise. Os iões de  $m/z$  494.4, 496.4 e 522.4 mostraram ser os mais abundantes nas células (não) tratadas. Curiosamente parece haver um aumento na abundância relativa do ião de  $m/z$  496.4, constituído pelo ácido gordo saturado C16.0, e a diminuição da percentagem relativa do ião de  $m/z$  494.4, composto pelo ácido gordo insaturado C16.1, nas células tratadas, o que suporta, assim, o perfil de ácidos gordos obtido por GC-MS (Subcapítulo 2.4.3) no qual se observou um aumento na percentagem relativa do ácido gordo saturado C16:0 face à ocorrência de *stress* do retículo. O aumento da percentagem de espécies LPC nas células em *stress* do retículo é bastante curioso uma vez que os lisofosfolípidos se encontram envolvidos em diversas desordens inflamatórias, nomeadamente na aterosclerose [125], em resposta à ativação celular induzida por estímulos [126].

### 2.4.6.3 Análise do perfil de SM

A classe de fosfolípido SM, a par da PC, apresenta um importante papel estrutural e de sinalização, e mostrou ser a segunda classe mais abundante presente nos extratos lipídicos totais analisados por HPLC-MS. A sua análise no modo positivo originou os iões  $[M + H]^+$  representados na figura que se segue (Figura 2.19).

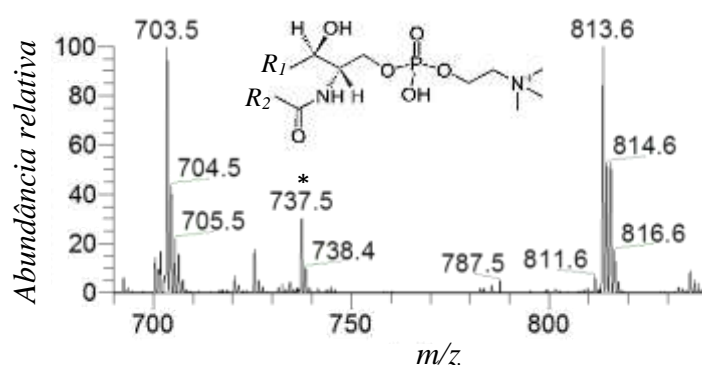


Figura 2.19: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões  $[M + H]^+$  da classe SM formados pela análise no modo positivo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo). O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião, em relação ao mais abundante considerado 100%, em função do respetivo valor de  $m/z$ . O ião de  $m/z$  737.5 (assinalado com \*) corresponde ao solvente. Estrutura generalizada da classe SM (na figura: parte superior).

As espécies SM mais abundantes foram identificadas, e analisadas quanto ao número de carbonos e insaturações, e às possíveis combinações de ácido gordo e base esfingóide (Tabela

2.3). Posteriormente determinou-se a percentagem relativa de cada um dos iões  $[M + H]^+$  identificados (Figura 2.20).

Tabela 2.3: Identificação dos iões  $[M + H]^+$  e  $[M + Na]^+$  da classe SM observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas, com base no valor de  $m/z$  e na interpretação do respetivo espectro MS/MS para determinação da sua composição em ácidos gordos. C: número total de carbonos nas cadeias de ácidos gordos; N: número de ligações duplas nas cadeias de ácidos gordos.

	$m/z$ $[M+H]^+$	$m/z$ $[M+Na]^+$	C:N	Base esfingóide	Ácido gordo	
<b>SM</b>	703.5		34:1	<i>d</i> 18:1	16:0	
	705.5		34:0	<i>d</i> 18:0	16:0	
	753.4		38:4	<i>d</i> 18:1	20:3	
	755.6		38:3	<i>d</i> 16:0	22:3	
	757.6		38:2		<i>d</i> 18:1	20:1
					<i>d</i> 18:2	20:0
	759.4		38:1		<i>d</i> 16:0	22:1
					<i>d</i> 16:1	22:0
	761.6		38:0		<i>d</i> 16:0	22:0
					<i>d</i> 18:0	20:0
	783.4	40:3		<i>d</i> 18:0	22:3	
				<i>d</i> 18:1	22:2	
	813.5	835.6	42:2	<i>d</i> 18:1	24:1	
				<i>d</i> 18:2	24:0	
815.6		42:1	<i>d</i> 18:1	24:0		
817.4		42:0	<i>d</i> 18:0	24:0		



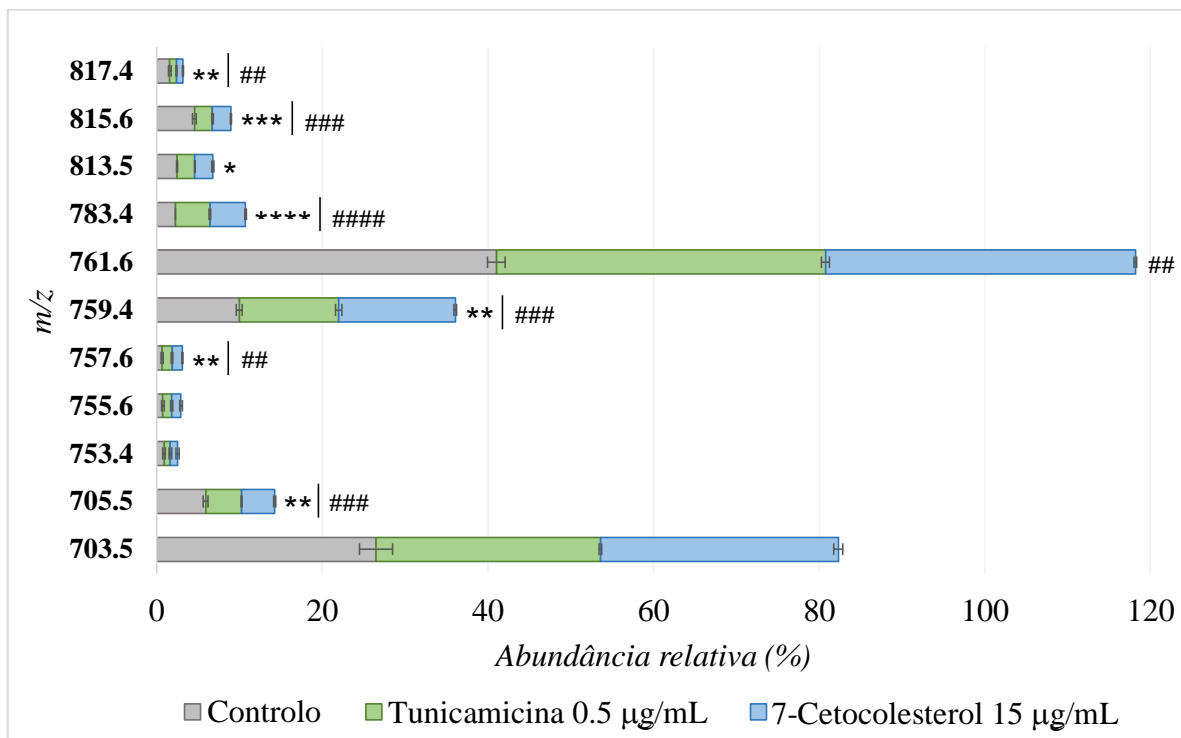


Figura 2.20: Efeito do stress do retículo no perfil de SM. Percentagem relativa dos iões  $[M + H]^+$  da classe SM presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (na figura, Controlo) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL (na figura, Tunicamicina 0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol na concentração 15 µg/mL (na figura, 7-Cetocolesterol 15 µg/mL). Após a identificação determinou-se a percentagem relativa de cada espécie para as condições experimentais em estudo. Os resultados encontram-se representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \*  $p < 0.05$  tunicamicina versus controlo, \*\*  $p < 0.01$  tunicamicina versus controlo, \*\*\*  $p < 0.005$  tunicamicina versus controlo, \*\*\*\*  $p < 0.001$  tunicamicina versus controlo, ##  $p < 0.01$  7-cetocolesterol versus controlo, ###  $p < 0.005$  7-cetocolesterol versus controlo, ####  $p < 0.001$  7-cetocolesterol versus controlo

À semelhança do observado para as classes anteriores, parece haver diferenças significativas na abundância relativa de cada espécie, sendo os iões de  $m/z$  703.5 e 761.6 os mais abundantes nas diversas condições. Uma vez mais a percentagem de cada espécie mostra-se bastante semelhante nas diferentes condições em análise. Curiosamente o ião de  $m/z$  761.6 mostrou ser constituído somente por ácidos gordos saturados, como é possível confirmar pela tabela 2.3, o que torna bastante interessante o facto de ser a espécie SM mais abundante nas diferentes condições em estudo.

### 2.4.6.4 Análise do perfil de PE

A classe de fosfolípido PE é das mais abundantes em membranas biológicas, A PE ioniza preferencialmente no modo negativo formando iões  $[M - H]^-$ , os quais se encontram representados na figura que se segue (Figura 2.21).

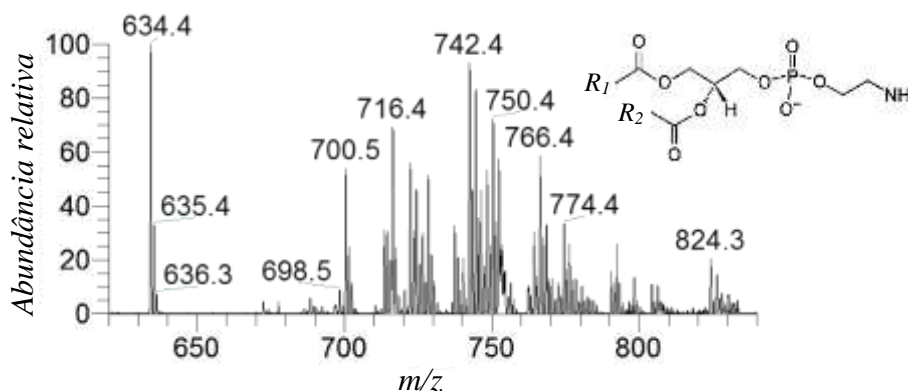


Figura 2.21: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões  $[M - H]^-$  da classe PE formados pela análise no modo negativo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo). O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião, em relação ao mais abundante considerado 100%, em função do respetivo valor de  $m/z$ . O ião de  $m/z$  634.4 corresponde ao padrão PE(14:0/14:0) adicionado previamente à amostra. Estrutura generalizada da classe PE (na figura: canto superior direito).

As espécies moleculares, pertencentes à classe PE, mais abundantes foram identificadas, e analisadas quanto ao número de carbonos e insaturações e às possíveis combinações de ácidos gordos (Tabela 2.4). À semelhança do obtido previamente para a classe PC, foi possível a identificação de espécies alquenil assim como espécies diacil. As espécies identificadas foram posteriormente quantificadas em termos de percentagem relativa em relação ao somatório de todas as espécies PE (Figura 2.22).

Tabela 2.4: Identificação dos iões  $[M - H]^-$  da classe PE observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas, com base no valor de  $m/z$  e na interpretação do respetivo espectro MS/MS para determinação da sua composição em ácidos gordos. C: número total de carbonos nas cadeias de ácidos gordos; N: número de ligações duplas nas cadeias de ácidos gordos.

	Espécies diacil			Espécies alquenil		
	$m/z$ $[M-H]^-$	C:N	Ácidos gordos	$m/z$ $[M-H]^-$	C:N	Ácidos gordos
<b>PE</b>	688.4	32:1	14:0/18:1	700.3	34:1	<i>P</i> -14:0/20:1
			16:0/16:1			<i>P</i> -16:0/18:1
	714.5	34:2	16:0/18:2			<i>P</i> -18:0/16:1
			16:1/18:1	<i>O</i> -14:0/22:5		
	716.3	34:1	14:0/20:1	722.4	36:5	<i>O</i> -16:1/20:4
			16:0/18:1			<i>O</i> -18:2/18:3
			18:0/16:1	724.4	36:4	<i>O</i> -14:1/22:3

	718.3	34:0	16:0/18:0			O-16:0/20:4		
	740.4	36:3	14:0/22:3			O-16:1/20:3		
			16:0/20:3			O-18:3/18:1		
			16:1/20:2			O-18:2/18:2		
			18:1/18:2			O-14:1/22:2		
	742.4	36:2	14:0/22:2	726.5	36:3	O-16:0/20:3		
			14:1/22:1					O-16:1/20:2
			16:0/20:2					O-18:0/18:3
			16:1/20:1			O-18:1/18:2		
			18:0/18:2			O-16:0/20:2		
	744.4	36:1	18:1/18:1	728.5	36:2	O-16:1/20:1		
			16:0/20:1					O-18:0/18:2
			18:0/18:1					O-18:1/18:1
	746.4	36:0	18:0/18:0	746.4	38:7	O-16:1/22:6		
	762.2	38:6	16:0/22:6				O-18:2/20:5	
			18:1/20:5				P-18:1/20:5	
			18:2/20:4		38:6	P-18:2/20:4		
	764.3	38:6	16:0/22:5	748.4	38:6	O-16:0/22:6		
			16:1/22:4					O-16:1/22:5
			18:1/20:4					O-18:1/20:5
			18:2/20:3					O-18:2/20:4
	766.4	38:4	16:0/22:4		38:5	P-18:1/20:4		
			16:1/22:3			O-16:0/22:5		
			18:0/20:4			O-16:1/22:4		
			18:1/20:3			O-18:1/20:4		
			18:2/20:2			P-18:0/20:4		
	768.4	38:3	16:0/22:3		38:4	P-18:1/20:3		
			16:1/22:2			P-18:2/20:2		
			18:0/20:3			O-16:0/22:4		
			18:1/20:2			O-18:0/20:4		
	792.4	40:5	18:2/20:1		38:4	O-18:1/20:3		
			18:0/22:5			O-18:2/20:2		
			18:1/22:4			P-18:2/20:1		
			18:2/22:3			P-16:0/22:3		
			20:0/20:5			P-18:0/20:3		
			20:1/20:4			P-18:1/20:2		
			20:2/20:3			O-18:0/22:6		
	794.3	40:4	18:1/22:3	774.4	40:6	O-18:1/22:5		
			20:0/20:4			40:5	P-18:0/22:5	
			20:1/20:3				O-18:0/22:3	
			20:2/20:2				O-18:1/22:2	
	826.3	44:2	18:0/24:2	782.3	40:3	O-18:2/22:1		
			18:1/24:1					40:2

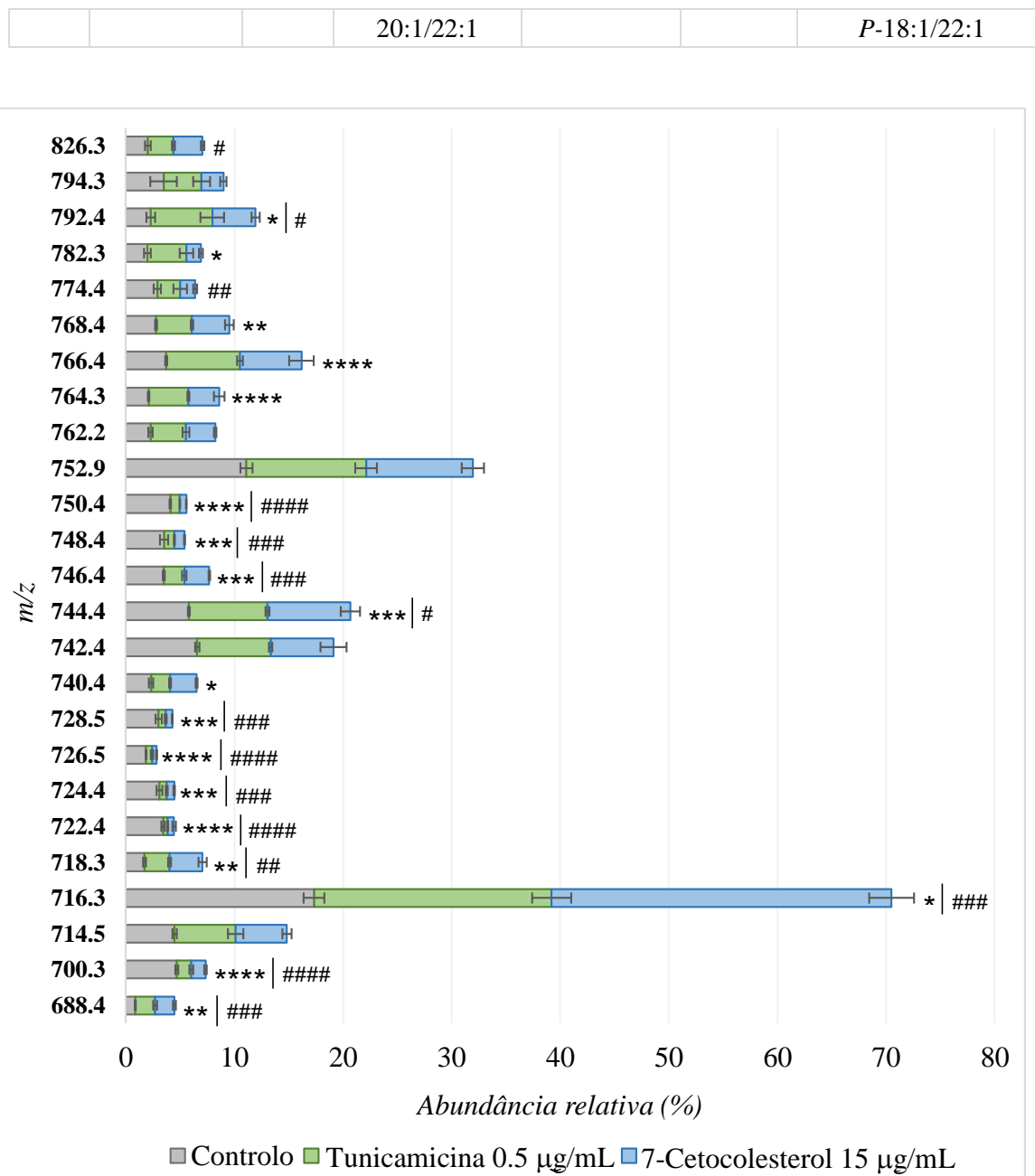


Figura 2.22: Efeito do stress do retículo no perfil de PE. Percentagem relativa dos íões  $[M - H]^-$  da classe PE presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (na figura, Controle) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL (na figura, Tunicamicina 0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol na concentração 15 µg/mL (na figura, 7-Cetocolesterol 15 µg/mL). Após a identificação determinou-se a percentagem relativa de cada espécie para as condições experimentais em estudo. Os resultados encontram-se representados em termos de média ± desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \*  $p < 0.05$  tunicamicina versus controle, \*\*  $p < 0.01$  tunicamicina versus controle, \*\*\*  $p < 0.005$  tunicamicina versus controle, \*\*\*\*  $p < 0.001$  tunicamicina versus controle, #  $p < 0.05$  7-cetocolesterol versus controle, ##  $p < 0.01$  7-cetocolesterol versus controle, ###  $p < 0.005$  7-cetocolesterol versus controle, ####  $p < 0.001$  7-cetocolesterol versus controle

Para a classe PE já parecem existir diferenças mais acentuadas na abundância relativa nos iões identificados nas diferentes condições em estudo, nomeadamente no ião de maior abundância,  $m/z$  716.3, cuja abundância parece aumentar significativamente nas células em *stress* do retículo, principalmente em resultado do tratamento com 7-cetocolesterol. Curiosamente as espécies constituídas por ácidos gordos de menor número de carbonos e de insaturações aparentam ser mais abundantes nas células não tratadas (controlo) ao passo que as espécies compostas por ácidos gordos de cadeia longa encontram-se aumentadas nas células em *stress* do retículo. Tais resultados parecem sugerir o favorecimento da elongação e da poli-insaturação dos ácidos gordos das espécies PE face à ocorrência de *stress* do retículo.

#### 2.4.6.5 Análise do perfil de LPE

A classe de fosfolípido LPE mostrou ser das classes menos abundantes nos extratos lipídicos totais. De facto a identificação das espécies moleculares constituintes desta classe só foi possível nas células tratadas devido à sua escassa abundância nas células não tratadas (controlo). A LPE ioniza preferencialmente no modo negativo formando os iões  $[M - H]^-$  representados na figura que se segue (Figura 2.23).

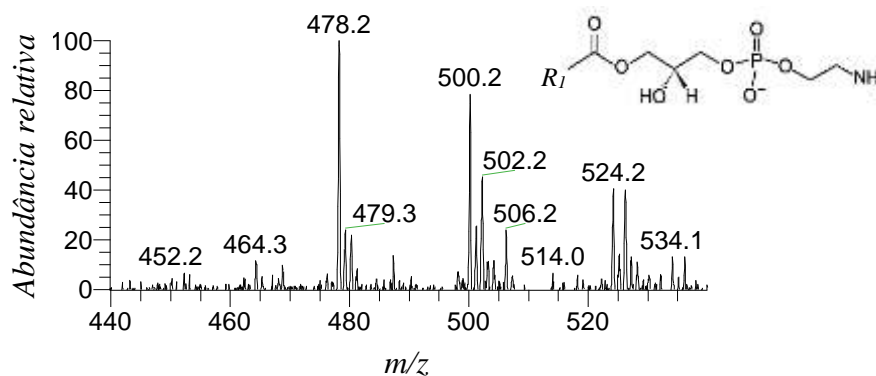


Figura 2.23: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões  $[M - H]^-$  da classe LPE formados pela análise no modo negativo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo). O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião, em relação ao mais abundante considerado 100%, em função do respetivo valor de  $m/z$ . Estrutura generalizada da classe LPE (na figura: canto superior direito).

As espécies LPE foram identificadas e analisadas quanto ao número de carbonos e insaturações e ao ácido gordo constituinte (Tabela 2.5). Como etapa seguinte determinou-se a percentagem relativa de cada uma das espécies identificadas (Figura 2.24).

Tabela 2.5: Identificação dos iões  $[M - H]^-$  da classe LPE observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas, com base no valor de  $m/z$  e na interpretação do respetivo espectro MS/MS para determinação da sua composição em ácidos gordos. C: número total de carbonos nas cadeias de ácidos gordos; N: número de ligações duplas nas cadeias de ácidos gordos.

	$m/z [M-H]^+$	Ácido gordo
<b>LPE</b>	450.2	16:1
	478.3	18:1
	498.2	20:5
	500.2	20:4
	502.2	20:3
	524.2	22:6
	526.2	22:5
	528.2	22:4

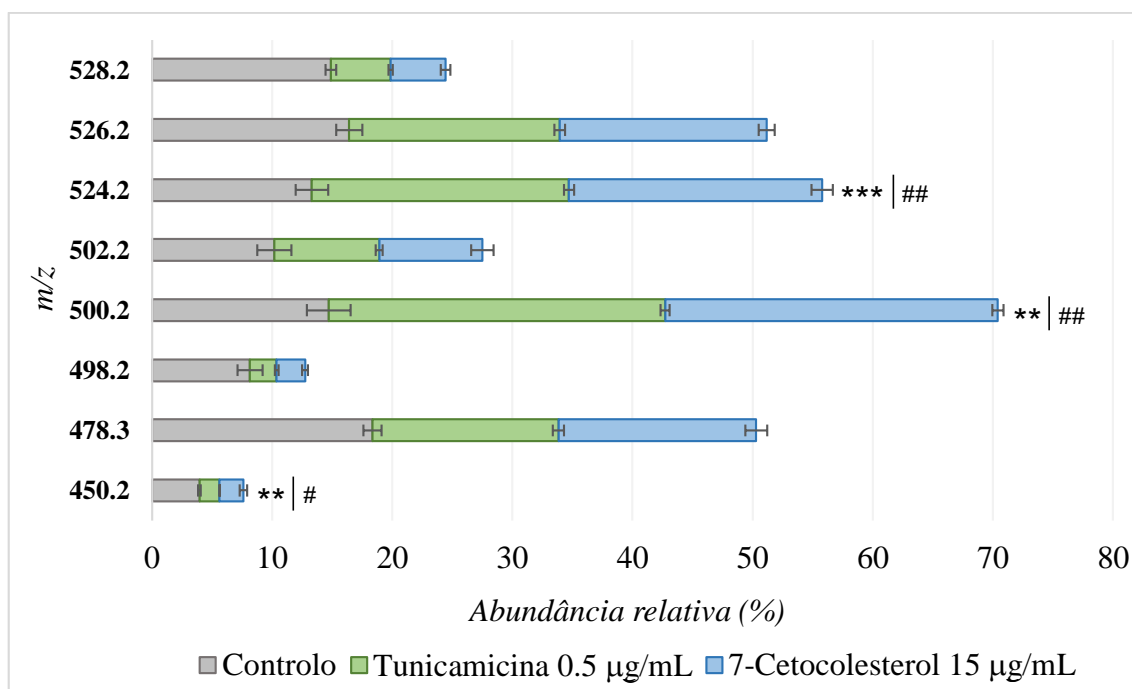


Figura 2.24: Efeito do stress do retículo no perfil de LPE. Percentagem relativa dos iões  $[M - H]^-$  da classe LPE presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (na figura, Controlo) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL (na figura, Tunicamicina 0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol na concentração 15 µg/mL (na figura, 7-Cetocolesterol 15 µg/mL). Após a identificação determinou-se a percentagem relativa de cada espécie para as condições experimentais em estudo. Os resultados encontram-se representados em termos de média ± desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \*\*  $p < 0.01$  tunicamicina versus controlo, \*\*\*  $p < 0.005$  tunicamicina versus controlo, #  $p < 0.05$  7-cetocolesterol versus controlo, ##  $p < 0.01$  7-cetocolesterol versus controlo

Ao contrário do observado para as classes anteriores, para a LPE parecem existir diferenças significativas na percentagem relativa das espécies nas diferentes condições em estudo. De facto parece existir uma diminuição generalizada da abundância de cada espécie nas células em *stress* do retículo em comparação com as células não tratadas (controlo). Curiosamente os iões de  $m/z$  450.2 e 478.3 constituídos pelos ácidos gordos C16:1 e C18:1, respetivamente, apresentam uma menor abundância nas células tratadas, o que parece suportar a diminuição da percentagem de ácidos gordos insaturados notada anteriormente no subcapítulo 2.4.3. O aumento significativo das espécies LPE, a par do aumento anteriormente observado para a classe LPC, nas células em *stress* do retículo parece evidenciar uma vez mais a importância dos lisofosfolípidos em situações de *stress*, possivelmente por associação a processos inflamatórios ou remodelação na síntese de fosfolípidos.

#### 2.4.6.6 Análise do perfil de PS

A classe de fosfolípido PS representa um componente essencial da membrana de uma grande variedade de organismos onde apresenta importantes funções regulatórias. A sua análise no modo negativo originou iões  $[M - H]^-$ , os quais se encontram representados na figura que se segue (Figura 2.25).

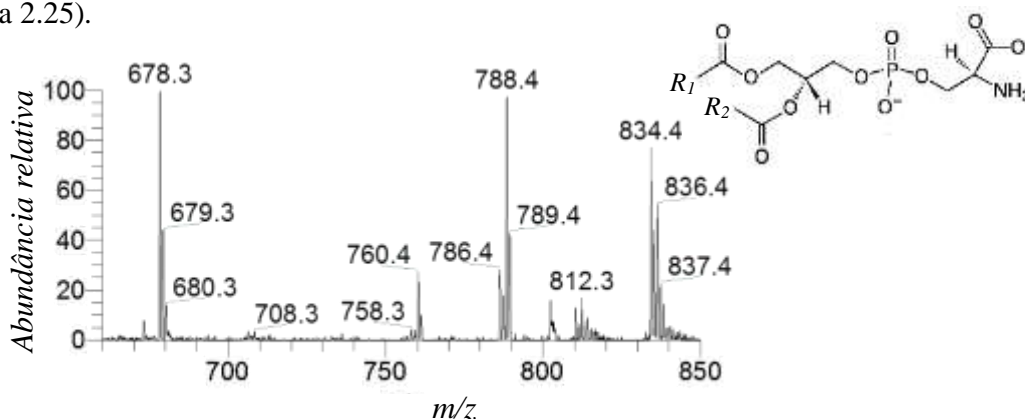


Figura 2.25: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões  $[M - H]^-$  da classe PS formados pela análise no modo negativo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo). O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião, em relação ao mais abundante considerado 100%, em função do respetivo valor de  $m/z$ . O ião de  $m/z$  678.3 corresponde ao padrão PS(14:0/14:0). Estrutura generalizada da classe PS (na figura: canto superior direito).

A identificação das espécies diacil da classe PS mais abundantes (Tabela 2.6) foi procedida pela determinação da percentagem relativa de cada uma das espécies identificadas (Figura 2.26).

Tabela 2.6: Identificação dos iões  $[M - H]^-$  da classe PS observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas, com base no valor de  $m/z$  e na interpretação do respetivo espectro MS/MS para determinação da sua composição em ácidos gordos. C: número total de carbonos nas cadeias de ácidos gordos; N: número de ligações duplas nas cadeias de ácidos gordos.

	$m/z [M-H]^-$	C:N	Ácidos gordos
<b>PS</b>	760.4	34:1	14:0/20:1
			16:0/18:1
			16:1/18:0
	762.3	34:2	16:0/18:0
	782.4	36:4	16:0/20:4
			16:1/20:3
	786.4	36:2	16:0/20:2
			16:1/20:1
			18:0/18:2
			18:1/18:1
	788.4	36:1	14:0/22:1
			14:1/22:1
			16:0/20:1
			16:1/20:0
			18:0/18:1
	790.4	36:0	16:0/20:0
			18:0/18:0
	810.4	38:4	18:0/20:4
			18:1/20:3
	812.3	38:3	18:0/20:3
			18:1/20:2
			18:2/20:1
	816.4	38:1	16:0/22:1
			16:1/22:0
			18:0/20:1
			18:1/20:0
	832.3	40:7	18:1/22:6
			18:2/22:5
	834.3	40:6	18:0/22:6
	836.4	40:5	18:0/22:5
18:1/22:4			
20:0/20:5			
20:1/20:4			
20:2/20:3			
838.3	40:4	18:0/22:4	
		18:1/22:3	
		20:0/20:4	



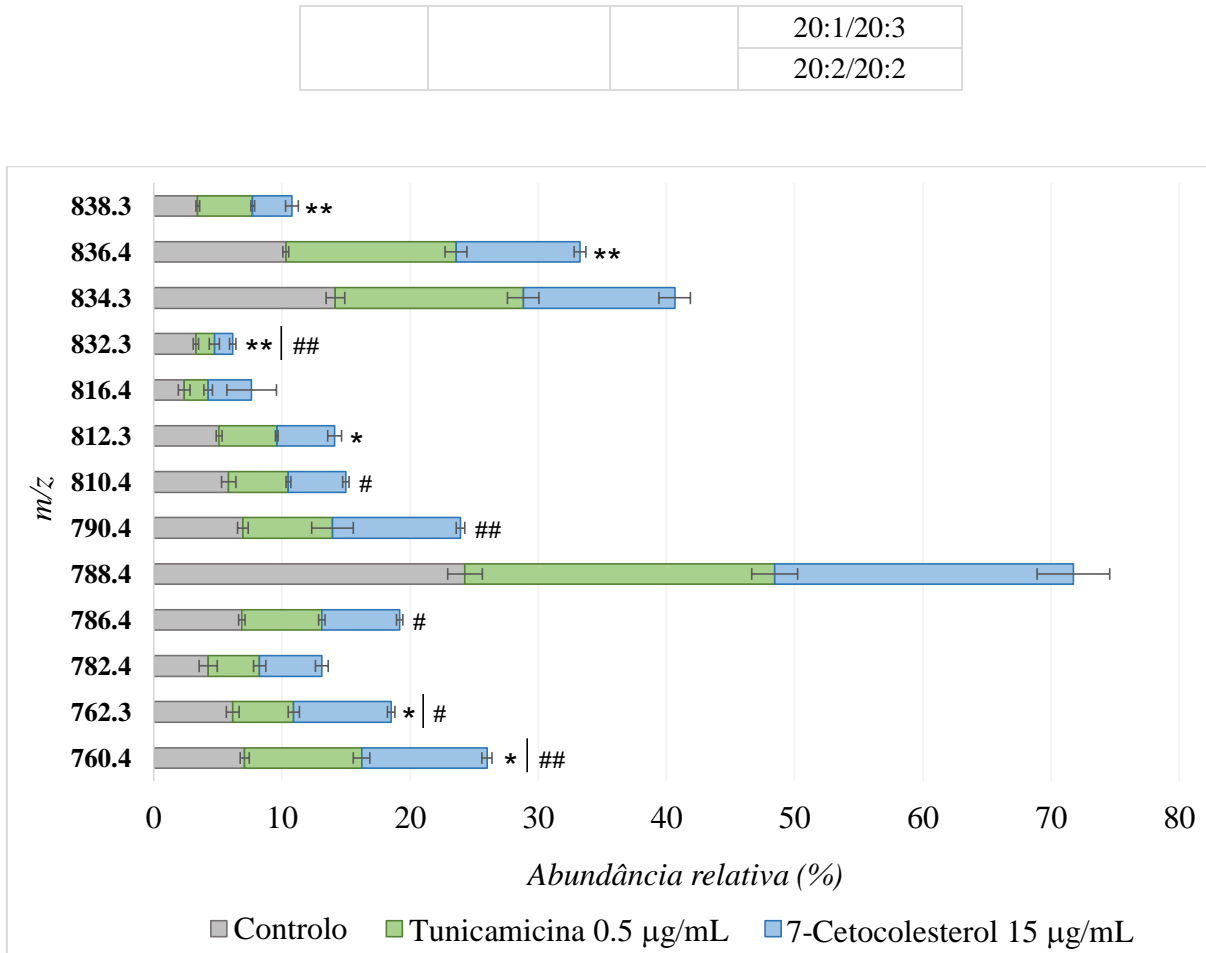


Figura 2.26: Efeito do stress do retículo no perfil de PS. Percentagem relativa dos iões  $[M - H]^-$  da classe PS presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (*na figura*, Controlo) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL (*na figura*, Tunicamicina 0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol na concentração 15 µg/mL (*na figura*, 7-Cetocolesterol 15 µg/mL). Após a identificação determinou-se a percentagem relativa de cada espécie para as condições experimentais em estudo. Os resultados encontram-se representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \*  $p < 0.05$  tunicamicina *versus* controlo, \*\*  $p < 0.01$  tunicamicina *versus* controlo, #  $p < 0.05$  7-cetocolesterol *versus* controlo, ##  $p < 0.01$  7-cetocolesterol *versus* controlo

À semelhança do mencionado anteriormente para outras classes de fosfolípidos, apesar da diferença visível na abundância relativa entre espécies moleculares representadas, a percentagem de cada espécie PS é bastante semelhante nas diferentes condições em análise. Os iões de  $m/z$  788.4, 834.3 e 836.4 mostraram ser os mais abundantes, apesar da aparente diminuição da sua percentagem relativa nas células em *stress* do retículo. Considerando a importância desta classe no processo apoptótico [68, 123], salientada anteriormente no Subcapítulo 2.4.4, o facto da quantidade e espécies de PS ser semelhante nas várias condições reforça os anteriores resultados em que se verificou que os estímulos nas concentrações utilizadas não induzem apoptose.

### 2.4.6.7 Análise do perfil de PI

A classe de fosfolípido PI representa uma das classes menos abundante nas membranas biológicas onde se apresenta como substrato para uma variedade de enzimas envolvidas na sinalização celular. A sua análise no modo negativo originou os iões  $[M - H]^-$  representados na figura que se segue (Figura 2.27).

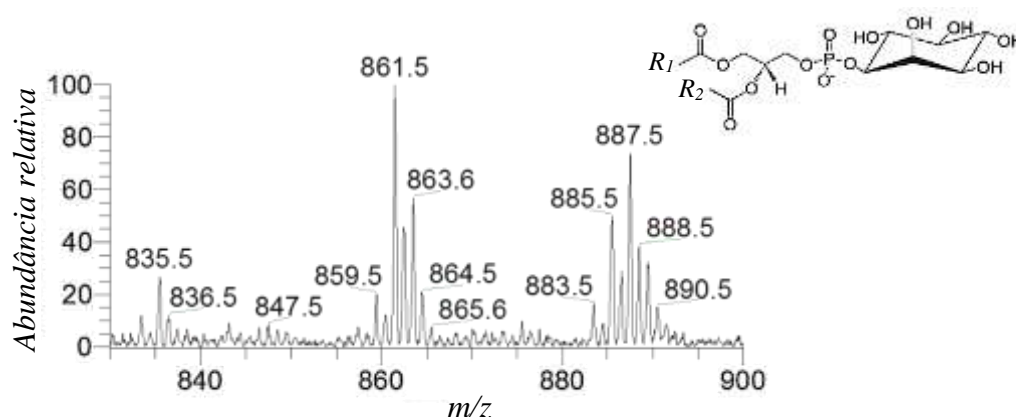


Figura 2.27: Espectro HPLC-MS evidenciando os iões  $[M - H]^-$  da classe PI formados pela análise no modo negativo do extrato lipídico total das células não tratadas (controlo). O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada ião, em relação ao mais abundante considerado 100%, em função do respetivo valor de  $m/z$ . Estrutura generalizada da classe PI (na figura: canto superior direito).

As espécies moleculares, pertencentes à classe PI, mais abundantes foram identificadas, e analisadas quanto ao número de carbonos e insaturações e às possíveis combinações de ácidos gordos (Tabela 2.7). Posteriormente determinou-se a abundância relativa de cada uma das espécies identificadas (Figura 2.28).

Tabela 2.7: Identificação dos iões  $[M - H]^-$  da classe PI observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas, com base no valor de  $m/z$  e na interpretação do respetivo espectro MS/MS para determinação da sua composição em ácidos gordos. C: número total de carbonos nas cadeias de ácidos gordos; N: número de ligações duplas nas cadeias de ácidos gordos.

	$m/z [M-H]^-$	C:N	Ácidos gordos
<b>PI</b>	835.5	34:1	16:0/18:1
			16:1/18:0
	861.5	36:2	16:0/20:2
			16:1/20:1
			18:0/18:2
			18:1/18:1
	863.6	36:1	14:0/22:1
			16:0/20:1
			16:1/20:0

			18:0/18:1
865.5	36:0		18:0/18:0
883.5	38:5		16:0/22:5
			16:1/22:4
			18:0/20:5
			18:1/20:4
			18:2/20:3
885.5	38:4		16:0/22:4
			16:1/22:3
			18:0/20:4
			18:1/20:3
			18:2/20:2
887.5	38:3		16:0/22:3
			18:0/20:3
			18:1/20:2
889.5	38:2		18:2/20:1
			16:0/22:2
			18:0/20:2
			18:1/20:1

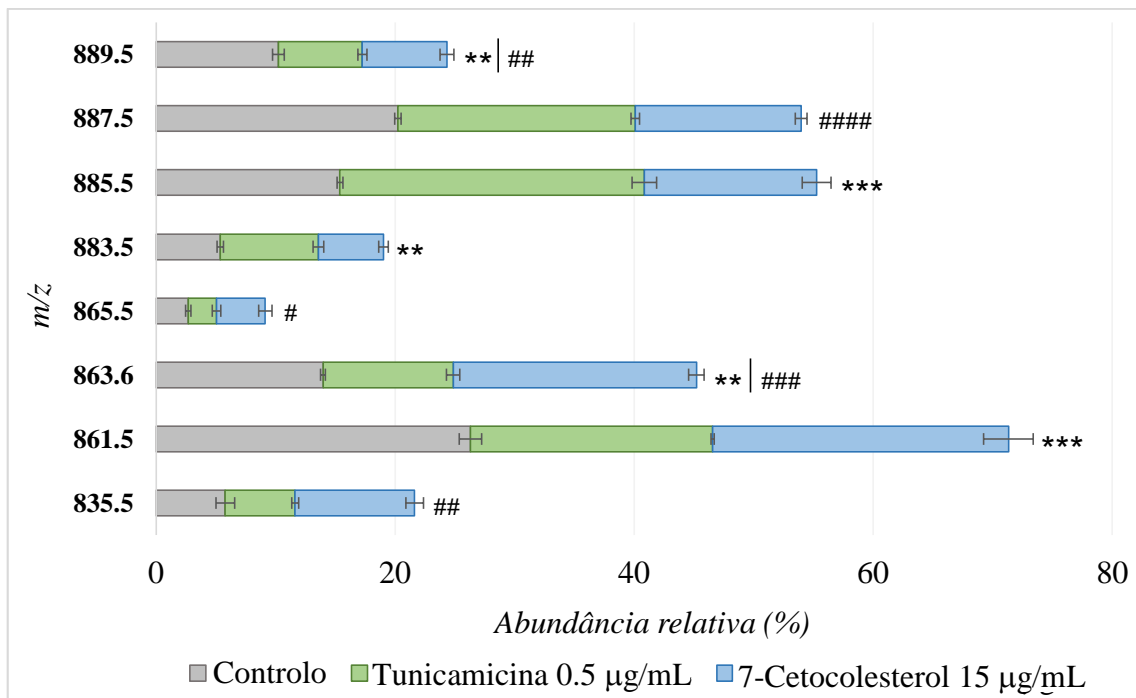


Figura 2.28: Efeito do stress do retículo no perfil de PI. Percentagem relativa dos iões  $[M - H]^-$  da classe PI presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (na figura, Controlo) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL (na figura, Tunicamicina 0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol na concentração 15 µg/mL (na figura, 7-Cetocolesterol 15 µg/mL). Após a identificação determinou-se a percentagem relativa de cada espécie para as condições experimentais em estudo. Os

resultados encontram-se representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \*\*  $p < 0.01$  tunicamicina *versus* controle, \*\*\*  $p < 0.005$  tunicamicina *versus* controle, #  $p < 0.05$  7-cetocolesterol *versus* controle, ##  $p < 0.01$  7-cetocolesterol *versus* controle, ###  $p < 0.005$  7-cetocolesterol *versus* controle, ####  $p < 0.001$  7-cetocolesterol *versus* controle

À semelhança do que foi observado anteriormente para outras classes de fosfolípidos, apesar da diferença visível na abundância relativa entre espécies moleculares representadas, a percentagem de cada espécie é bastante semelhante nas diferentes condições em análise. Os íões de  $m/z$  861.5, 885.5 e 887.5 mostraram ser os mais abundantes, sendo visível, de modo geral, a diminuição da sua abundância relativa nas células em *stress* do retículo. De modo geral parece haver uma diminuição desta classe nas células estimuladas com 7-cetocolesterol. A diminuição observada poderá ser devida à fosforilação das espécies PI em fosfoinosítídeos, os quais representam uma pequena fração dos fosfolípidos presentes na célula onde se mostram responsáveis pela regulação do tráfego de vesículas e do metabolismo e distribuição de lípidos [127]. A desregulação do metabolismo de fosfoinosítídeos encontra-se associado a diversos estados de doença [128, 129]. Curiosamente o estudo de Kang e seus colaboradores mostrou o envolvimento da enzima fosfoinosítídeos-3-quinase, a qual catalisa a síntese de fosfoinositol-3,4,5-trifosfato, na migração de células do músculo liso induzida pelo 7-cetocolesterol no âmbito da aterosclerose [130], o que poderá suportar os resultados obtidos neste trabalho. Por sua vez o estudo de Rodriguez e seus colaboradores mostrou o envolvimento da enzima anteriormente mencionada na inflamação induzida pelo tratamento de células ARPE-19 com 7-cetocolesterol [131].

#### 2.4.6.8 Análise do perfil de PG

A classe de fosfolípido PG representa um dos constituintes menos abundantes das membranas biológicas, onde parece atuar como precursor para a cardiolipina. Segue-se a representação gráfica dos íões  $[M - H]^-$  constituintes desta classe (Figura 2.29).

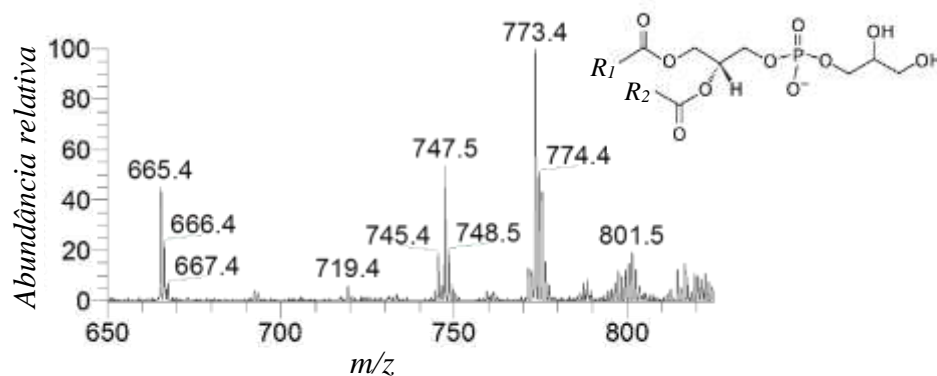


Figura 2.29: Espectro HPLC-MS evidenciando os íões  $[M - H]^-$  da classe PG formados pela análise no modo negativo do extrato lipídico total das células não tratadas (controle). O espectro encontra-se representado em termos de abundância relativa de cada íão, em relação ao mais abundante considerado 100%, em função do

respetivo valor de  $m/z$ . O ião de  $m/z$  665.4 corresponde ao padrão PG(14:0/14:0). Estrutura generalizada da classe PG (na figura: canto superior direito).

As espécies moleculares, pertencentes à classe PG, mais abundantes foram identificadas, e analisadas quanto ao número de carbonos e insaturações e às possíveis combinações de ácidos gordos (Tabela 2.8). Seguidamente determinou-se a abundância relativa de cada uma das espécies identificadas (Figura 2.30).

Tabela 2.8: Identificação dos iões  $[M - H]^-$  da classe PG observados no espectro HPLC-MS das células (não) tratadas, com base no valor de  $m/z$  e na interpretação do respetivo espectro MS/MS para determinação da sua composição em ácidos gordos. C: número total de carbonos nas cadeias de ácidos gordos; N: número de ligações duplas nas cadeias de ácidos gordos.

	$m/z [M-H]^-$	C:N	Ácidos gordos
<b>PG</b>	715.4	32:3	14:1/18:2
			16:1/16:2
	747.4	34:1	14:0/20:1
			16:0/18:1
			16:1/18:0
	773.4	36:2	16:1/20:1
			18:1/18:1
	775.5	36:1	14:0/22:1
			14:1/22:0
			16:0/20:1
			16:1/20:0
	797.4	38:4	18:0/18:1
			16:0/22:4
			16:1/22:3
			18:1/20:3
	799.4	38:3	18:2/20:2
			16:0/22:3
			18:0/20:3
			18:1/20:2
	801.5	38:2	18:2/20:1
16:0/22:2			
16:1/22:1			
18:0/20:2			
819.4	40:7	18:1/20:1	
		18:1/22:6	

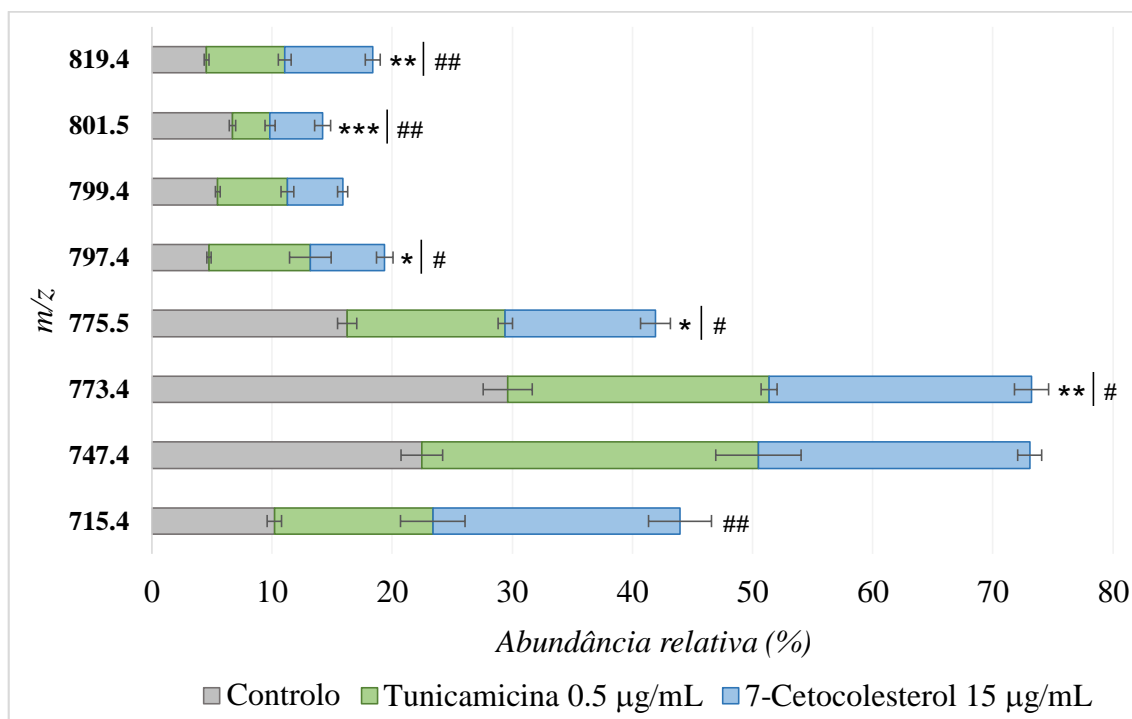


Figura 2.30: Efeito do stress do retículo no perfil de PG. Percentagem relativa dos íons  $[M - H]^-$  da classe PG presentes no extrato lipídico das células RAW 264.7 não tratadas (na figura, Controlo) e das células estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL (na figura, Tunicamicina 0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol na concentração 15 µg/mL (na figura, 7-Cetocolesterol 15 µg/mL). Após a identificação determinou-se a percentagem relativa de cada espécie para as condições experimentais em estudo. Os resultados encontram-se representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \*  $p < 0.05$  tunicamicina versus controlo, \*\*  $p < 0.01$  tunicamicina versus controlo, \*\*\*  $p < 0.005$  tunicamicina versus controlo, #  $p < 0.05$  7-cetocolesterol versus controlo, ##  $p < 0.01$  7-cetocolesterol versus controlo

De modo geral, parece haver diminuição da abundância relativa das diversas espécies de PG identificadas nas células em *stress* do retículo em comparação com as células não tratadas, nomeadamente do ião de  $m/z$  773.4 constituído pelo ácido gordo insaturado C18:1, como seria expectável. Adicionalmente as espécies contendo ácidos gordos com menor número de carbonos e de insaturações parecem ser mais abundantes nas células (não) tratadas em comparação com os íões correspondentes a ácidos gordos de maior número de carbonos.

### 2.4.7 Quantificação de hidroperóxidos lipídicos por FOX II

A diminuição da percentagem relativa de ácidos gordos insaturados obtida pela análise por GC-MS assim como a diminuição generalizada das espécies moleculares contendo ácidos gordos insaturados analisada por HPLC-MS sugerem estar a ocorrer a modificação dos mesmos, nomeadamente por oxidação, nas células em *stress* do retículo. Assim sendo, como etapa seguinte, avaliou-se a formação de hidroperóxidos lipídicos, os primeiros produtos que se

formam em resultado da oxidação dos ácidos gordos insaturados [132]. A monitorização do efeito do *stress* do retículo endoplasmático na formação de hidroperóxidos lipídicos foi conseguido por recurso ao método de FOX II, tendo a análise sido efetuada nos extratos lipídicos totais correspondentes às diversas concentrações e aos diferentes tempos de exposição aos estímulos em estudo. Os resultados foram obtidos em termos de  $\mu\text{g}$  de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) por  $\mu\text{g}$  de fosfolípido (Figura 2.31).

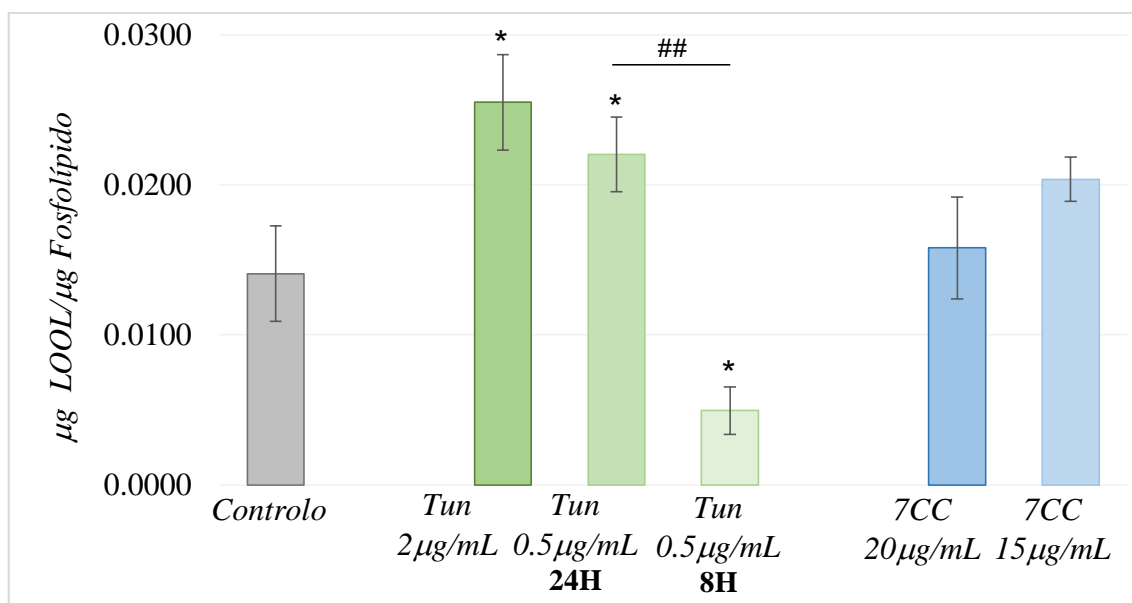


Figura 2.31: Efeito da tunicamicina e do 7-cetocolesterol na peroxidação lipídica. Quantidade de hidroperóxidos lipídicos (LOOH,  $\mu\text{g}$ ) por cada  $\mu\text{g}$  de fosfolípido presente no extrato das células RAW 264.7 (não) tratadas (*na figura*, Controlo). Por recurso ao método de FOX II avaliou-se a formação de hidroperóxidos lipídicos em células não tratadas (*na figura*, Controlo) e estimuladas com tunicamicina na concentração 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (*na figura*, Tun 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , esta última durante 24 horas (*na figura*, Tun 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  24H) ou 8 horas (*na figura*, Tun 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  8H) de exposição, ou expostas a 7-cetocolesterol na concentração 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (*na figura*, 7CC 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (*na figura*, 7CC 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os resultados encontram-se representados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). \*  $p < 0.05$  versus controlo, ##  $p < 0.01$  8H versus 24H

Como é possível constatar pela análise da figura 2.31 a formação de hidroperóxidos lipídicos nas células em *stress* do retículo é bastante dependente do tipo, concentração e tempo de exposição ao estímulo utilizado. Para as células tratadas com tunicamicina, dependendo da concentração e tempo de exposição aplicados, é possível verificar tanto o aumento como a diminuição da quantidade de hidroperóxidos lipídicos formados. Começando pelo efeito da concentração, as células tratadas com tunicamicina na concentração 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresentam uma maior quantidade de hidroperóxidos lipídicos em comparação com as células expostas à concentração inferior de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante o mesmo tempo de 24 horas. Tais resultados encontram-se de acordo com o esperado uma vez que a tunicamicina não é um indutor direto de *stress* oxidativo e o aumento da peroxidação lipídica, em consequência do aumento da formação

de ROS, ocorre numa fase mais tardia, provavelmente na sequência da disfunção mitocondrial (revisto em [45, 133]). Assim sendo a formação de hidroperóxidos parece ser potenciada com concentrações mais elevadas de tunicamicina. Curiosamente, as células tratadas com tunicamicina (0.5 µg/mL) durante somente 8 horas produzem quantidades de hidroperóxidos lipídicos bastante inferiores aos níveis observados para as células não tratadas (controlo). A explicação pode residir no facto da ocorrência de *stress* do retículo moderado, e, conseqüente, ativação da UPR, resultar no aumento da transcrição de genes contendo elementos de resposta antioxidante no seu promotor, os quais parecem favorecer os sistemas antioxidantes da célula e suprimir os processos oxidativos [134-136]. A transcrição destes genes é mediada pelo fator de transcrição *Nrf2*, o qual é ativado durante a UPR por fosforilação dependente da PERK. Diehl e seus colaboradores mostraram que o tratamento de células *Nrf2*<sup>-/-</sup> com tunicamicina resulta na apoptose das mesmas [137]. Estes genes apresentam níveis máximos de expressão nas primeiras horas após a indução de *stress* do retículo com a sua expressão a manter-se a um nível basal nas horas procedentes, o que parece explicar o facto das células tratadas com a concentração inferior de tunicamicina durante somente 8 horas apresentarem níveis bastante baixos de hidroperóxidos lipídicos formados mas o mesmo não se verificar para as células tratadas com a mesma concentração durante 24 horas.

Para as células tratadas com 7-cetocolesterol, a concentração inferior parece potenciar ainda mais a formação de hidroperóxidos lipídicos em comparação com a concentração mais elevada do estímulo. Os hidroperóxidos lipídicos são os primeiros que se formam durante a peroxidação lipídica sendo rapidamente degradados em produtos de oxidação mais avançados [132]. Assim sendo, a menor quantidade de hidroperóxidos lipídicos que parece formar-se aquando do tratamento com concentrações mais elevadas de 7-cetocolesterol pode, na verdade, ser devida à sua conversão em produtos de oxidação mais avançados, e não a uma menor formação. Uma vez que o 7-cetocolesterol consiste num oxisterol capaz de induzir *stress* do retículo ao favorecer a formação de ROS e interferir com a regulação do estado *redox* [138-140], essa parece ser a explicação mais plausível para os resultados obtidos.

## 2.4.8 Avaliação da formação de ROS

Uma vez que a indução de *stress* do retículo endoplasmático nas células RAW 264.7 resultou no aumento da peroxidação lipídica, avaliado pela formação de hidroperóxidos lipídicos, pensou-se ser relevante complementar esses resultados com a avaliação do nível de *stress* oxidativo nas células tratadas. Para tal tratou-se as células com tunicamicina (0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol (15 µg/mL) durante 4, 8 e 24 horas e avaliou-se a formação de ROS por microscopia de fluorescência com a sonda *CellROX Green* (Figura 2.32). De forma sucinta esta sonda não emite fluorescência quando no estado reduzido, no entanto a sua oxidação por radicais peróxidos ou pelo radical hidroxilo resulta na sua ligação ao DNA e na emissão de fluorescência.



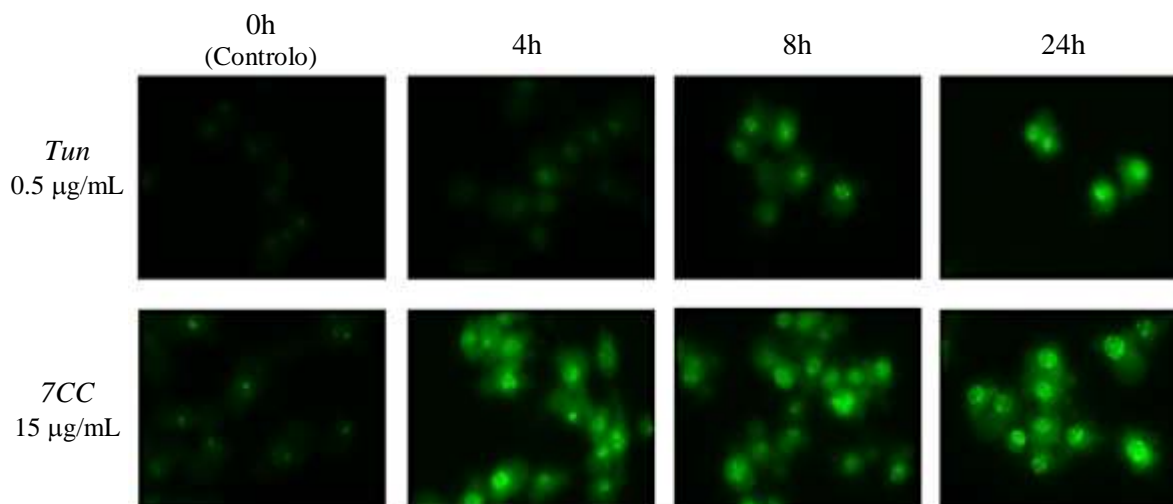


Figura 2.32: Efeito da tunicamicina e do 7-cetocolesterol na formação de ROS. As células RAW 264.7 foram mantidas sem tratamento (*na figura*, 0h (Controlo)) ou estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL (*na figura*, Tun 0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol na concentração 15 µg/mL (*na figura*, 7CC 15 µg/mL) durante 4h, 8h e 24 horas. Os níveis de ROS foram determinados por microscopia de fluorescência com a sonda *CellROX Green*. A presença de ROS resulta na oxidação da sonda com emissão de um sinal fluorescente marcado a cor verde.

O tratamento das células com tunicamicina ou 7-cetocolesterol resulta no aumento substancial da formação de ROS como é possível constatar pela observação da figura 2.32 supra representada. Embora ambos os estímulos induzam *stress* oxidativo parecem fazê-lo com uma cinética diferente. Enquanto o 7-cetocolesterol provoca um rápido aumento de ROS logo nas primeiras horas de exposição (4 horas), o tratamento com tunicamicina resulta na acumulação destas espécies de forma mais lenta e gradual. Tais resultados suportam os da formação de hidroperóxidos lipídicos obtidos anteriormente no presente trabalho (Subcapítulo 2.4.7), e encontram-se de acordo com vários estudos anteriormente publicados. Ranelletti e seus colaboradores mostraram que o tratamento de células THP-1 com concentrações crescentes de 7-cetocolesterol resulta no aumento significativo da formação de ROS [139]. A monitorização da formação de ROS em macrófagos tratados com 7-cetocolesterol por microscopia de fluorescência com o reagente *CellROX Green*, análogo ao efetuado neste trabalho, mostrou igualmente o aumento da formação destas espécies, segundo Tabas e seus colaboradores [141]. Por sua vez, foi igualmente demonstrado que o tratamento de células THP-1 com tunicamicina (5 µg/mL) durante 24 horas resulta no aumento significativo da formação de ROS [97]. Nos últimos anos várias evidências têm demonstrado uma estreita inter-relação entre o *stress* oxidativo, o *stress* do retículo e o desenvolvimento de doenças inflamatórias crónicas, metabólicas e neurodegenerativas (revisto em [45, 133]). Se por um lado a produção exacerbada de ROS pode, direta e/ou indiretamente, afetar a homeostasia do retículo endoplasmático, perturbações no correto enovelamento de proteínas podem provocar alterações no estado *redox* da célula através da indução da produção de ROS mitocondriais (revisto em [45, 133]).

Atendendo à cinética da acumulação de ROS e à indução de marcadores de *stress* do retículo observada para a tunicamicina e o 7-cetocolesterol, é possível especular que para a tunicamicina a rápida e efetiva alteração da homeostasia do retículo origina o extravasamento de  $\text{Ca}^{2+}$ , o qual afeta a função mitocondrial levando a um gradual aumento da produção de ROS. Por outro lado, no caso do 7-cetocolesterol, a rápida indução de *stress* oxidativo observada para tempos de exposição curtos (Figura 2.32) juntamente com uma indução mais tardia dos marcadores de *stress* do retículo (Figura 2.2) parece indicar que neste caso seria a acumulação de ROS a estar, pelo menos parcialmente, na origem da alteração da homeostasia do retículo endoplasmático.

## 2.4.9 Análise da expressão de genes implicados no metabolismo lipídico por PCR

Como demonstrado nos capítulos precedentes o *stress* do retículo endoplasmático parece interferir com o metabolismo lipídico das células. De modo a permitir uma melhor compreensão das alterações observadas ao nível do perfil de classes de fosfolípidos e de ácidos gordos selecionou-se um conjunto de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo lipídico a fim de analisar a variação da sua expressão face à ocorrência de *stress* do retículo. Sucintamente, as células RAW 264.7 foram expostas às concentrações mais baixas dos indutores de *stress* em estudo, as quais se mostrou anteriormente induzir alterações mais exacerbadas no perfil lipídico, durante 4 ou 24 horas, e analisou-se a transcrição de genes selecionados por qPCR (Figura 2.33). Os valores de variação da expressão génica em relação às células não tratadas (controlo) encontram-se igualmente representados na tabela 0.1 do Anexo 1.

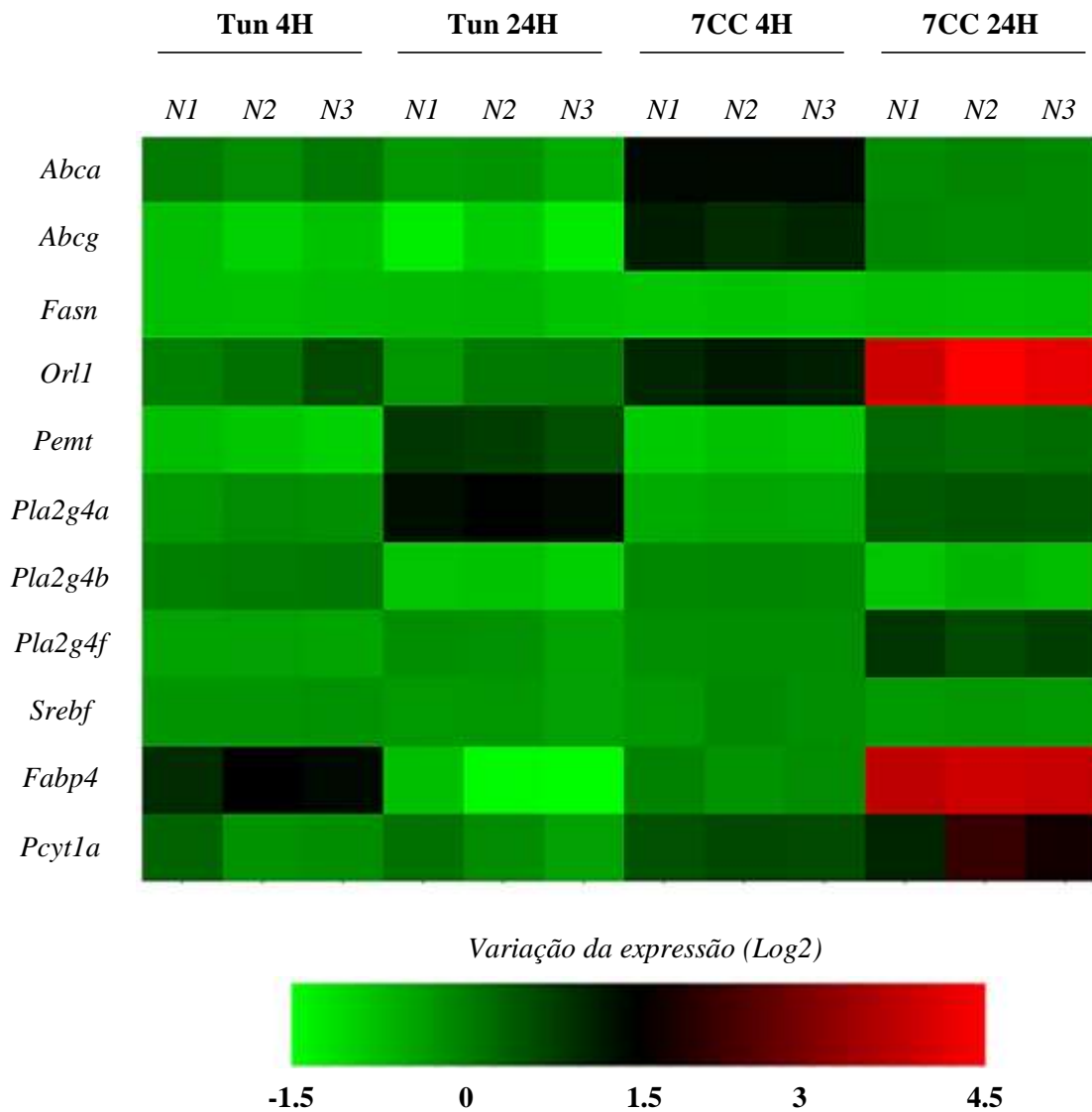


Figura 2.33: Efeito da tunicamicina e do 7-cetocolesterol na transcrição de genes envolvidos no metabolismo lipídico. Representação na forma de Heat Map do perfil de variação da transcrição génica nas células tratadas com tunicamicina na concentração 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 4 (na figura, Tun 4H) e 24 horas (na figura, Tun 24H), ou com 7-cetocolesterol na concentração 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 4 (na figura, 7CC 4H) e 24 horas (na figura, 7CC 24H). A variação da expressão génica encontra-se representada sob a forma do Log2 da variação em relação às células não tratadas (controlo) para três amostras biológicas independentes de cada condição experimental em análise.

De modo a simplificar a visualização dos resultados de variação da expressão génica optou-se pela sua representação na forma de mapa de calor (*Heat Map*) no qual os valores são representados enquanto cores. No entanto os valores de variação da expressão génica em relação às células não tratadas (controlo) encontram-se igualmente representados na tabela 0.1 do Anexo 1. Na figura 2.33 encontram-se representadas de forma independente as três amostras para cada

condição experimental, em oposição à média, de forma a poder ficar patente a variabilidade da resposta biológica entre as diversas réplicas. Como é possível constatar, a variação da expressão é relativamente semelhante entre as réplicas biológicas, exceção feita para o gene *Pcyat1* que nas células tratadas com 7-cetocolesterol (15 µg/mL) durante 24 horas aumenta nas três réplicas biológicas mas em magnitudes distintas.

A variação da expressão génica mostra ser dependente do tempo de exposição das células aos estímulos em estudo, o que pode sugerir a diferente modelação do metabolismo lipídico em estágios distintos da UPR. A variação da expressão génica parece ser igualmente dependente do indutor de *stress* do retículo usado, nomeadamente para os genes *Abca*, *Abcg*, *Or11* e *Fabp4*. Os genes *Abca* e *Abcg* codificam para a família de transportadores ABC, responsáveis pelo efluxo de colesterol nas células. No presente trabalho a indução de *stress* do retículo pelo tratamento das células RAW 264.7 com tunicamicina resultou na diminuição da sua expressão. Tais resultados mostram ser concordantes com estudos prévios nos quais a indução de *stress* do retículo pelo tratamento com tunicamicina resultou em repercussões ao nível do efluxo de colesterol por diminuição da expressão da proteína ABCA1 [94, 142]. Curiosamente para as células tratadas com 7-cetocolesterol a diminuição dos níveis de mRNA dos genes *Abca* e *Abcg* verifica-se somente às 24 horas, observando-se inicialmente um aumento acentuado da sua transcrição para o tempo de exposição de 4 horas. No contexto da doença aterosclerótica, a diminuição da transcrição dos genes *Abca* e *Abcg* sugere a desregulação do metabolismo de colesterol, impedindo o seu efluxo e favorecendo a formação de células espumosas. Por sua vez o aumento de transcrição observado para as células tratadas com 7-cetocolesterol poderá sugerir a tentativa da célula em promover o seu efluxo visto tratar-se de um derivado do colesterol [143]. No entanto, é conhecido o efeito deste oxisterol na supressão do efluxo de colesterol [99, 144], o que pode explicar os resultados obtidos no presente trabalho no que respeita à diminuição da transcrição dos genes *Abca* e *Abcg* para as células tratadas com 7-cetocolesterol durante 24 horas comparativamente às 4 horas de exposição. Assim, apesar de numa primeira fase parecer haver um aumento acentuado da transcrição destes genes, esta tendência é revertida nas horas procedentes. Relativamente ao gene *Srebf*, envolvido no metabolismo de colesterol, vários trabalhos anteriores demonstraram o aumento da sua ativação em resposta ao *stress* do retículo [142, 145, 146]. No entanto, no presente trabalho, é possível observar a diminuição da sua transcrição nas diversas condições experimentais em estudo. De forma semelhante seria igualmente espectável a variação positiva da expressão do gene *Fasn* codificante para a enzima responsável pela síntese de ácidos gordos de cadeia longa. Diehl e seus colaboradores mostraram a relevância do sensor PERK na regulação do metabolismo lipídico uma vez que a sua deleção inibe a expressão da enzima FAS [73]. Por sua vez, o aumento de expressão observado para o gene *Fabp4* nas células estimuladas com 7-cetocolesterol (15 µg/mL) em função do tempo de exposição correlaciona-se com a literatura existente uma vez que a sua expressão parece favorecer a formação de células espumosas e a sua inibição aumenta o efluxo de colesterol e a

expressão do transportador ABCA [147]. Hotasmisligil e seus colaboradores mostraram a atenuação da indução de *stress* do retículo em macrófagos *Fabp4*<sup>-/-</sup> [96], o que suporta de certa forma os resultados obtidos no presente estudo no que respeita ao aumento da transcrição do gene *Fabp4* face à ocorrência de *stress* do retículo. O visível aumento da transcrição do gene *Fabp4* nas células tratadas com 7-cetocolesterol, particularmente para tempos de exposição mais longos (24 horas) encontra-se em conformidade com o reportado na literatura existente [138, 140]. O 7-cetocolesterol, à semelhança de outros oxisteróis, atua como ligando dos recetores LXR, ativando, desta forma, a transcrição de inúmeros genes, entre os quais o gene *Fabp4* [148]. No que respeita ao gene *Olr1*, é possível constatar pela observação da figura 2.33 o aumento da sua transcrição face à ocorrência de *stress* do retículo, particularmente nas células tratadas com 7-cetocolesterol. Visto este gene codificar para o recetor de oxLDL semelhante à lectina 1 (LOX-1, do inglês *Lectin-like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1*), os resultados alcançados mostram-se bastante pertinentes no contexto da doença aterosclerótica uma vez que sugerem o favorecimento da captação de partículas de oxLDL pelos macrófagos em *stress* do retículo. A formação e posterior acumulação de 7-cetocolesterol [63, 90, 99] assim como a expressão do recetor LOX1 ao nível das lesões ateroscleróticas encontram-se bem documentadas na literatura [149, 150]. Deste modo, e atendendo aos resultados obtidos, o 7-cetocolesterol pode, através do aumento da transcrição de LOX1, potenciar a captação de oxLDL pelos macrófagos na íntima levando a um aumento na formação de células espumosas e, por consequência, a um agravamento do processo aterosclerótico.

No presente trabalho avaliou-se igualmente a expressão de genes envolvidos na síntese de fosfolípidos, nomeadamente *Pemt*, *Pcyt1a* e diversas isoformas do gene *Pla2g4*. No caso do gene *Pemt*, codificante para a enzima responsável pela metilação de PE em PC, observou-se o aumento da sua expressão para as células tratadas durante 4 horas com ambos os indutores de *stress*, a qual diminui para tempos de exposição mais prolongados (24 horas). Tais resultados não parecem corroborar os reportados previamente nos quais se demonstrou a diminuição acentuada da percentagem relativa de PC nas células em *stress* do retículo em detrimento da diminuição pouco significativa da percentagem de PE (Subcapítulo 2.4.4). É ainda possível uma interpretação diferente dos resultados obtidos. Uma vez que a alteração da homeostasia do retículo compromete a síntese de PC, numa primeira fase pode dar-se a tentativa de repor essa classe de fosfolípidos por um mecanismo alternativo às expensas da conversão de PE. Contudo, o mecanismo pode não ser suficiente para restabelecer os níveis normais de PC da célula. Curiosamente, para o gene *Pcyt1a* envolvido na síntese de PC o tratamento das células com tunicamicina (0.5 µg/mL) resultou na diminuição da sua expressão, o que parece corroborar a diminuição observada da percentagem de PC nas células em *stress* do retículo (Subcapítulo 2.4.4). No entanto o tratamento com 7-cetocolesterol induziu a expressão do mesmo gene, o que poderá ser devido ao facto de haver uma maior adaptação do metabolismo lipídico por se tratar de um estímulo fisiológico e de menor severidade comparativamente à tunicamicina, ou até

mesmo pelo facto do 7-cetocolesterol ser um ligando de vários fatores de transcrição nucleares. No caso do gene *Pla2g4*, apesar da variação da expressão das isoformas *Pla2g4b* e *Pla2g4f* ter mostrado ser praticamente nula, para a isoforma *Pla2g4a* foi possível observar a sua indução para tempos de exposição mais prolongados (24 horas). Uma vez que o gene *Pla2g4* codifica a família de fosfolipases PLA2, responsável pela hidrólise da cadeia de ácido gordo na posição *sn2* de fosfolípidos, o seu aumento parece suportar os resultados reportados no presente trabalho no qual se demonstrou a diminuição da percentagem relativa de PC e PE com aumento dos respetivos lisofosfolípidos LPC e LPE (Subcapítulos 2.4.4 e 2.4.6).

Os resultados aparentemente contraditórios debatidos no presente subcapítulo no que respeita ao aumento da síntese de PC em consequência da expansão do retículo como descrito na literatura poderão ser devidos ao facto do tempo de exposição das células aos indutores de *stress* do retículo serem insuficientes para a modelação significativa do metabolismo lipídico. Deste modo poderia ser de grande interesse o incremento do tempo de exposição das células diminuindo a concentração dos estímulos usados. Simultaneamente poderia mostrar-se vantajosa a análise da expressão de genes codificantes para enzimas envolvidas na alongação (*elongases*) e insaturação (*desaturases*) de ácidos gordos de forma a corroborar o efeito do *stress* do retículo no perfil de ácidos gordos do macrófago reportado no presente trabalho.

## 2.5 Conclusões e diretrizes futuras

Como um dos objetivos para o presente trabalho propôs-se avaliar os efeitos da indução de *stress* do retículo endoplasmático no perfil lipídico do macrófago. Os resultados alcançados evidenciaram a modelação do metabolismo lipídico pelo *stress* do retículo, sendo as alterações mais notáveis:

- Modelação do perfil de classes de fosfolípidos, com ênfase para a diminuição significativa da classe PC e, concomitante, aumento da classe LPC;
- Modificação do perfil de ácidos gordos com aumento do rácio saturados *versus* insaturados, nomeadamente ao nível dos ácidos gordos C16:0, C16:1, C18:0 e C18:1;
- Alteração das espécies moleculares constituintes das principais classes de fosfolípidos do macrófago no que respeita à sua abundância;
- Indução da peroxidação lipídica, contemplada pelo aumento da formação de hidroperóxidos lipídicos e corroborada pela produção de ROS;
- Variação da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico, nomeadamente ao nível do efluxo de colesterol e da formação de lisofosfolípidos.

De modo geral, a remodelação do perfil lipídico do macrófago mostrou semelhanças entre os dois tipos de estímulos em estudo: tunicamicina (farmacológico) e 7-cetocolesterol (fisiológico), sendo as diferenças mais visíveis ao nível da peroxidação lipídica e da expressão

génica. O 7-cetocolesterol mostrou ser por si só um potente indutor de *stress* do retículo endoplasmático o que poderá ser encarado enquanto uma mais-valia na compreensão dos mecanismos subjacentes à doença aterosclerótica.

Para uma melhor elucidação do papel do *stress* do retículo na remodelação do perfil lipídico propõe-se algumas diretrizes para futuros trabalhos, notavelmente:

- Complementar a análise da variação da expressão génica estendendo a:
  - i. Genes envolvidos na síntese de fosfolípidos, particularmente da PC uma vez que mostrou ser a principal classe afetada pelo *stress* do retículo; apesar do gene *pcy1a* codificante para a enzima CCT $\alpha$  ter já sido analisado no presente trabalho são várias as enzimas envolvidas na síntese de PC;
  - ii. Genes codificantes para *elongases* e *desaturases* envolvidas no metabolismo de ácidos gordos;
  - iii. Genes envolvidos na destoxificação celular e codificantes para sistemas antioxidantes;
  - iv. Genes avaliadores do fenótipo do macrófago (M1/pró-inflamatório ou M2/anti-inflamatório) face à ocorrência de *stress* do retículo endoplasmático;
  - v. Genes codificantes para recetores envolvidos na captação de LDL, com ênfase para o recetor CD36.
- Avaliar o papel das diversas vias de sinalização da UPR na remodelação do metabolismo lipídico do macrófago por recurso a inibidores específicos para cada via;
- Relacionar as alterações observadas ao nível do metabolismo de fosfolípidos com o papel do retículo na síntese dos mesmos, direcionando o estudo para o retículo endoplasmático por fracionamento celular;
- Averiguar a expansão da membrana do retículo em condições de *stress*, possivelmente através de uma análise dirigida para as enzimas envolvidas na síntese de PC;
- Explorar o potencial de outros oxisteróis na indução de *stress* do retículo e na remodelação do perfil lipídico no contexto da doença aterosclerótica.

*(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)*



## Capítulo 3

# Contribuição dos fosfolípidos oxidados na indução de *stress* do retículo em macrófagos

No presente capítulo explorou-se a contribuição dos fosfolípidos oxidados na indução de *stress* do retículo endoplasmático, e subsequente ativação da UPR, em macrófagos no contexto da doença aterosclerótica. Considerando o estado atual do conhecimento, elucidado com uma breve introdução teórica, propôs-se avaliar a capacidade do fosfolípido 1-palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PLPC, do inglês *1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) oxidado na indução de *stress* do retículo em macrófagos. Devido à escassez de tempo os resultados alcançados mostram ser bastante precoces. Não obstante descreve-se neste capítulo a metodologia empregue assim como os resultados preliminares obtidos. Após a interpretação crítica dos mesmos, propõe-se algumas diretrizes para futuras explorações da temática.

### 3.1 Introdução

#### 3.1.1 Os fosfolípidos oxidados e a sua importância biológica

Os fosfolípidos compreendem a principal classe de lípidos mais abundante em todas as membranas biológicas. Em células eucarióticas a distribuição dos fosfolípidos mostra-se heterogênea, com as membranas dos diferentes organelos a apresentarem diferente composição em fosfolípidos assim como diferente distribuição por parte dos mesmos (revisto em [151]). Os fosfolípidos derivam do glicerol, denominando-se de glicerofosfolípidos, ou da esfingosina, tratando-se, assim, de esfingolípidos. Os glicerofosfolípidos representam a classe de fosfolípidos mais abundante nas membranas das células, aproximadamente 70% do conteúdo lipídico total, e caracterizam-se por um esqueleto de glicerol, duas cadeias de ácidos gordos nas posições *sn*1 e *sn*2 e uma cabeça polar constituída por um grupo fosfato e uma molécula polar na posição *sn*3 (revisto em [152]). A PC consiste no principal fosfolípido presente na membrana da maioria dos

organelos, representando aproximadamente 40-50% do conteúdo total de fosfolípidos. A PE representa o segundo mais abundante, entre 20 e 45% do conteúdo total, dependendo do tecido considerado, ao passo que os fosfolípidos menos são abundantes são dados pelos fosfolípidos PI, PS e PA (revisto em [151]). Na Tabela 3.1 que se segue encontra-se resumido o conteúdo em termos de fosfolípidos das membranas de diferentes organelos, com especial ênfase para o retículo endoplasmático.

Tabela 3.1: Conteúdo em percentagem, relativamente ao total, dos principais fosfolípidos presentes na membrana de diferentes organelos, com ênfase para o retículo endoplasmático. (Dados obtidos em [151])

Membrana	Conteúdo de fosfolípidos (%)			
	PC	PE	PI	PS
<b>Retículo Endoplasmático</b>	<b>55</b>	<b>30</b>	<b>15</b>	<b>3-5</b>
Complexo de Golgi	50	15	10	5
Mitocôndria	40-46	30-35	5-10	1
Membrana Plasmática	42	25	3	12

Os oxPLs, apesar da sua importância biológica, exibem baixa abundância nas membranas biológicas. O comprimento e o grau de insaturação dos ácidos gordos tem um efeito importante na fluidez da membrana assim como nos produtos resultantes da modificação oxidativa (revisto em [152]). Apesar de serem reportadas evidências de modificações oxidativas nos grupos da cabeça polar, os ácidos gordos poli-insaturados (PUFAs, do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*) esterificados em fosfolípidos representam o maior alvo para a oxidação (não-) enzimática. A modificação oxidativa dos fosfolípidos origina vários produtos biologicamente ativos, nomeadamente produtos de menor tamanho, resultantes da quebra oxidativa dos ácidos gordos, assim como produtos de oxidação contendo a estrutura completa do fosfolípido nos quais uma das cadeias de ácidos gordos, ou mesmo ambas, se encontram oxidadas. A oxidação não enzimática dos PUFAs, iniciada por espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio (não-) radicalares, segue os mesmos mecanismos independentemente destes se encontrarem presentes em fosfolípidos ou na forma livre. Em contraste a oxidação por enzimas difere significativamente uma vez que os PUFAs livres podem ser oxidados por múltiplas enzimas mas quando esterificados em fosfolípidos somente as enzimas lipoxigenase 12/15 e mieloperoxidase se revelam capazes de os reconhecer como substrato para oxidação na forma de micelas ou organizados em estruturas como membranas celulares ou partículas de lipoproteínas (revisto em [153]).

Os passos iniciais decorrentes da maioria das reações de oxidação, enzimática ou não, resultam na formação de hidroperóxidos lipídicos, passíveis de sofrerem subsequente oxidação e degradação num processo independente de enzimas e originando um vasto número de produtos de oxidação (oxPLs). Fundamentalmente, verifica-se a formação de produtos de oxPLs não-

fragmentados, que incluem os fosfolípidos com grupos funcionais hidroperóxidos, hidróxidos, ceto e epóxi, assim como a formação de isoprostanos, isolevuglandinas, isotromboxanos e isofuranos, por ciclização intramolecular e rearranjo (Figura 3.1). Adicionalmente, verifica-se a formação de produtos de oxPLs fragmentados, saturados e insaturados, devido à ocorrência de fragmentação oxidativa com formação de novos produtos de oxidação com menor peso molecular que o fosfolípido e contendo várias combinações de grupos hidroxilo, carbonilo, e carboxílico ou ainda um terminal furano (Figura 3.1) (revisto em [153, 154]). Vários eventos celulares são passíveis de serem iniciados e modulados pelos produtos resultantes da modificação oxidativa dos fosfolípidos, não somente no contexto do processo aterosclerótico mas igualmente na lesão pulmonar, na esclerose múltipla, na inflamação, entre os demais, onde os oxPLs exercem atividade fisiopatológica (revisto em [153]).

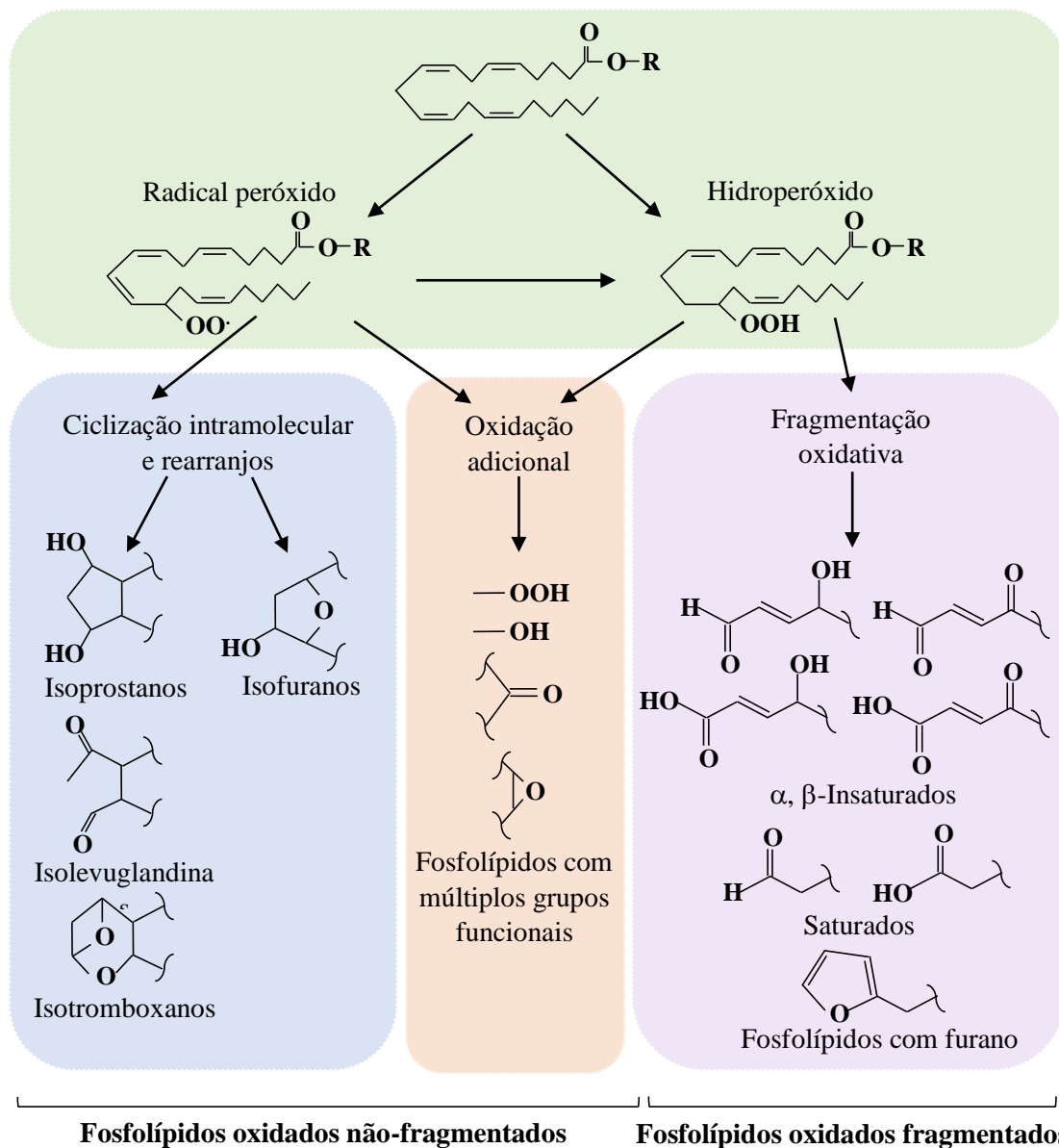


Figura 3.1: A modificação oxidativa dos fosfolípidos resulta, num primeiro passo, na formação de radicais

peróxidos, ou mesmo hidroperóxidos, passíveis de sofrerem subsequente oxidação originando produtos de fosfolípidos oxidados com múltiplos grupos funcionais (hidroperóxidos, hidróxidos, ceto e epóxi). A par com isoprostanos, isolevuglandinas, isotromboxanos e isofuranos, obtidos por ciclização intramolecular e rearranjo, representam os produtos de oxidação não-fragmentados. A fragmentação oxidativa resulta na formação de fosfolípidos oxidados fragmentados, nomeadamente saturados e insaturados contendo várias combinações de grupos hidroxilo e carbonilo, ou ainda um terminal furano. (Adaptado de [153, 154])

### 3.1.2 Envolvimento dos fosfolípidos oxidados na aterogénese

O papel dos oxPLs na aterogénese tem, nos últimos anos, ganho grande relevo. Evidências crescentes mostram a acumulação de mais de 30 produtos de oxidação diferentes em lesões ateroscleróticas (revisto em [155]). De facto, a análise de oxPLs em diferentes estádios da doença aterosclerótica permitiu a identificação de espécies similares nas diferentes fases do processo aterosclerótico, nomeadamente espécies oxidativas de fosfolípidos iniciais como hidroperóxidos e produtos mais avançados que surgem mais tardiamente como os oxPLs fragmentados. Como tal, durante a progressão da doença aterosclerótica, os oxPLs parecem ser continuamente gerados e degradados (revisto em [153, 155]). A evidência do envolvimento dos oxPLs na doença aterosclerótica é suportada por vários estudos, nomeadamente o estudo de Funk e seus colaboradores no qual a ausência da enzima lipoxigenase 12/15, envolvida na formação de oxPLs, diminui significativamente a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, a aterogénese em murganhos *Apoe<sup>-/-</sup>* [156]. De forma concordante, Hazen e seus colaboradores mostraram a ocorrência de níveis elevados de oxPLs no plasma de murganhos *Apoe<sup>-/-</sup>* assim como a ativação de plaquetas em consequência do tratamento com oxPLs [157]. Os oxPLs não se acumulam somente no ateroma como podem estar envolvidos na sua génese através do seu potencial inflamatório, promovendo a interação do endotélio com monócitos e a produção de quimiocinas. Adicionalmente, encontram-se igualmente envolvidos na progressão da doença, ao induzir a formação de células espumosas e a migração e produção de matriz extracelular por parte das células do músculo liso. Finalmente, os oxPLs encontram-se igualmente envolvidos no desenvolvimento de complicações, ao modular a angiogénese, a produção de proteases e a ativação de plaquetas. O envolvimento dos oxPLs na aterogénese verifica-se ao nível de todos os tipos de células envolvidos no processo aterosclerótico, nomeadamente monócitos, células endoteliais, células do músculo liso, linfócitos e plaquetas (revisto em [153]).

A modificação oxidativa dos fosfolípidos resulta na formação de epítomos específicos passíveis de serem reconhecidos pelos anticorpos IgG e IgM. O grupo fosfocolina constituinte da fosfatidilcolina oxidada (oxPC) representa o principal epítomo descrito, importante para o reconhecimento da oxPC, mas não da PC nativa, por anticorpos específicos como o E06, um anticorpo natural IgM derivado de hibridomas de células B obtidas a partir do baço de murganhos ateroscleróticos *Apoe<sup>-/-</sup>* [158]. Adicionalmente ao seu papel enquanto antígenos, os oxPLs servem igualmente de ligandos para recetores *scavenger*. De facto, os recetores *scavenger* expressos em macrófagos são capazes de reconhecer os oxPLs presentes nas partículas de

oxLDL. O recetor mais estudado é o CD36 que medeia o reconhecimento e, subsequente, captação de células apoptóticas e oxLDL e, conseqüente, formação de células espumosas [159]. Para que o reconhecimento dos oxPLs pelo recetor CD36 seja possível torna-se necessária a presença de um grupo acil fragmentado na posição *sn2* incorporando um terminal carbonilo  $\gamma$ -hidroxi(ou oxo)- $\alpha,\beta$ -insaturado, sendo que estas espécies, denominadas de oxPC<sub>CD36</sub> em consequência da elevada afinidade para o recetor CD36, se encontram presentes em grande número nas lesões ateroscleróticas (Figura 3.2b) [159]. Foi demonstrada a interação de, pelo menos, oito oxPC resultantes da clivagem oxidativa de araquidonato ou linoleato com o recetor CD36, da qual resultam a captura de oxLDL pelos macrófagos e a formação de células espumosas [159]. Adicionalmente, em outro estudo, Hazen e seus colaboradores mostraram a interação entre o recetor CD36 e PS oxidadas (oxPS) análogas em termos de estrutura às oxPC<sub>CD36</sub>, as quais se mostraram cruciais no reconhecimento e na captura de células apoptóticas pelos macrófagos [160].

A projeção das cadeias laterais com modificações oxidativas através da bicamada lipídica e das partículas de oxLDL para o exterior permite o seu reconhecimento pelo recetor CD36 expresso em células fagocíticas (Figura 3.2c). De facto, esta configuração das cadeias laterais dos oxPLs na membrana foi predita por Hazen e seus colaboradores num estudo com múltiplos produtos de oxPLs estruturalmente distintos. Neste estudo foi verificada a protrusão para a fase aquosa do ácido gordo oxidado na posição *sn2*, nomeadamente do produto de oxidação KOdia-PC (do inglês, *4-keto-2-octene-dioic acid ester of 2-lysophosphatidylcholine*) (Figura 3.2a), o que favorece o seu reconhecimento pelos recetores (Figura 3.2c) [161]. Em comparação, outros produtos de oxPLs como o 13-HODE-PC (do inglês, *(13S)-hydroxy octadeca-(9Z,11E)-dienoic acid ester of 2-lysophosphatidylcholine*) mostraram a localização da cadeia oxidada *sn2* na membrana (Figura 3.2b) inibindo o seu reconhecimento [161]. A identificação dos fosfolípidos oxPC e oxPS enquanto ligandos para o recetor CD36 sugere a oxidação da cadeia na posição *sn2*, e não do grupo polar da cabeça, enquanto motivo estrutural crucial para o reconhecimento pelo CD36 através dos seus resíduos conservados de lisina 164 e 166 [159-161]. De facto, a estrutura do lípido na posição *sn2* parece ser fundamental para o reconhecimento dos oxPLs ao nível de recetores, sendo que, em geral, diferenças no ácido gordo esterificado na posição *sn1* apresentam efeitos menores. No entanto, o grupo polar da cabeça é passível de mediar a atividade pró-aterogênica dos produtos de oxidação de fosfolípidos uma vez que o anticorpo E06 reconhece oxPLs contendo fosfocolina mas não fosfoserina ou fosfoetanolamina. Mais, verificam-se diferenças no reconhecimento e captura de células apoptóticas entre oxPC e oxPS em macrófagos (revisto em [155]).

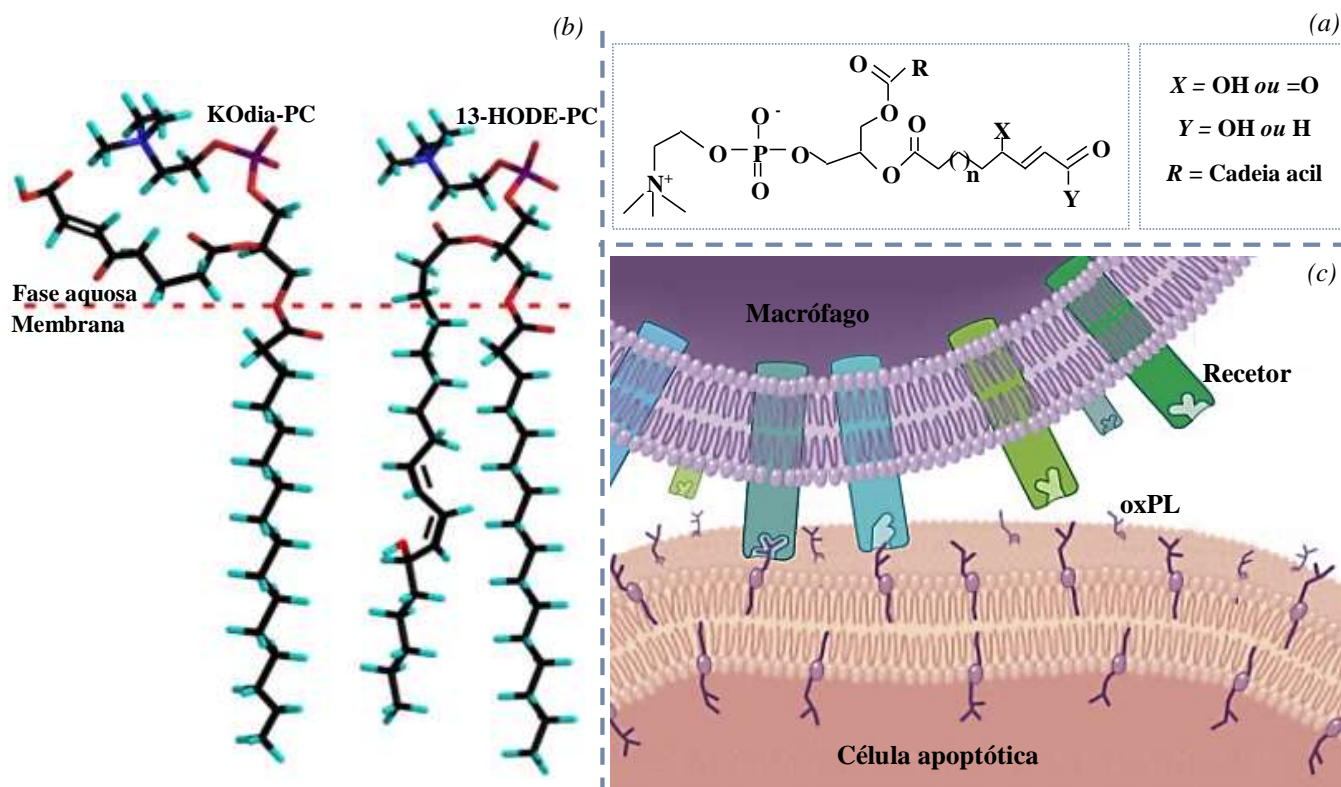


Figura 3.2: (a) Estrutura dos produtos resultantes da oxidação de PC e reconhecidos pelo recetor CD36 (oxPC<sub>CD36</sub>), evidenciando a presença um grupo acil fragmentado na posição *sn2* incorporando um terminal carbonilo  $\gamma$ -hidroxi(ou oxo)- $\alpha,\beta$ -insaturado (Adaptado de [159]). (b) Conformação predita dos produtos KOdia-PC e 13-HODE-PC, resultantes da modificação oxidativa de PC, na membrana. O ácido gordo oxidado na posição *sn2* do produto KOdia-PC encontra-se projetado para a fase aquosa permitindo o seu reconhecimento pelos recetores, como exemplificado em (c). Em contraste, no produto 13-HODE-PC a cadeia oxidada *sn2* permanece na bicamada lipídica constituente da membrana inibindo a sua interação com possíveis recetores. (Adaptado de [161])

A modificação oxidativa dos fosfolípidos resulta igualmente na formação de produtos capazes de estimular vários outros recetores de vias de transdução de sinal tais como o recetor do fator ativador de plaquetas (PAF, do inglês *Platelet-Activating Factor*), o recetor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR, do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), TLR4 e de prostaglandina E2. Por outro lado, os oxPLs mostram-se ainda capazes de manifestar os seus efeitos através de mecanismos independentes do reconhecimento por recetores (revisto em [153]), como é o caso da ativação da UPR explorada em maior detalhe na seção que se segue.

### 3.1.3 Contribuição dos fosfolípidos oxidados na ativação da UPR

Os oxPLs, apesar do número reduzido de estudos na área, têm sido apontados como um dos fatores responsáveis pela ativação da UPR na lesão aterosclerótica (revisto em [153]). De

facto, e como já mencionado anteriormente, Lusis e seus colaboradores demonstraram a ativação das diferentes vias da UPR como consequência do tratamento de células endoteliais da aorta humana com oxPAPC [162]. No mesmo estudo, a marcação da lesão aterosclerótica com anticorpos dirigidos contra a proteína ATF4 mostrou-se positiva nas células endoteliais constituintes do ateroma assim como em áreas da lesão contendo células espumosas. Mais, a marcação com o anticorpo E06 capaz de reconhecer oxPCs mostrou-se positiva em áreas da lesão aterosclerótica contendo depósitos lipídicos e células espumosas, assim como na proximidade da camada endotelial [162]. Simultaneamente, a análise de células endoteliais da aorta humana expostas a oxPAPC mostrou a indução de vários genes, entre os quais genes alvo da UPR [67]. Adicionalmente, a UPR tem sido associada aos oxPLs enquanto responsável pela capacidade dos produtos resultantes da modificação oxidativa dos fosfolípidos em promoverem angiogénese, especificamente na indução do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), pró-angiogénico [163]. A indução do VEGF pelos oxPLs mostrou ser dependente do fator de transcrição ATF4, sendo a oxidação do resíduo na posição *sn2* do fosfolípido necessária para a ativação da UPR [163]. No entanto, os mecanismos responsáveis pela ativação da UPR pelos oxPLs permanecem em debate, o que é confirmado pelos resultados obtidos no estudo supra mencionado ao demonstrar que os recetores PAF, PPAR e TLR4, capazes de reconhecer oxPLs, não mediam os efeitos dos oxPLs na expressão do VEGF [163]. Possivelmente, e em semelhança ao verificado para a acumulação intracelular de colesterol livre em macrófagos, a oxidação dos fosfolípidos origina alterações nas propriedades físicas da membrana do retículo endoplasmático uma vez que os produtos resultantes diferem dos seus precursores em termos de estrutura e polaridade. De facto, a oxidação dos fosfolípidos insaturados presentes na membrana aumenta a rigidez da mesma com reorientação das cadeias modificadas oxidativamente para a fase aquosa [161]. Tal evento pode interferir com a estrutura e a função de proteínas associadas à membrana, nomeadamente as proteínas localizadas na membrana do retículo endoplasmático. Adicionalmente, a ativação da UPR pelos oxPLs é passível de ser induzida pela associação dos oxPLs à proteína GRP78/BIP, com subsequente dissociação das proteínas envolvidas na UPR, uma vez que evidências mostram a associação da proteína referida ao produto de peroxidação 4-hidroxinoneal assim como ao fosfolípido 1-palmitoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina oxidado (oxPAPE do inglês, *oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*) (revisto em [153]).

## 3.2 Objetivo

O processo aterosclerótico, apesar de extensamente explorado, permanece ainda em debate. Um dos aspetos centrais na fisiopatologia da doença aterosclerótica prende-se na captura excessiva partículas de oxLDL pelos macrófagos, a qual se sabe desencadear a ocorrência de *stress* do retículo endoplasmático nessas células. Apesar do reconhecido papel da acumulação

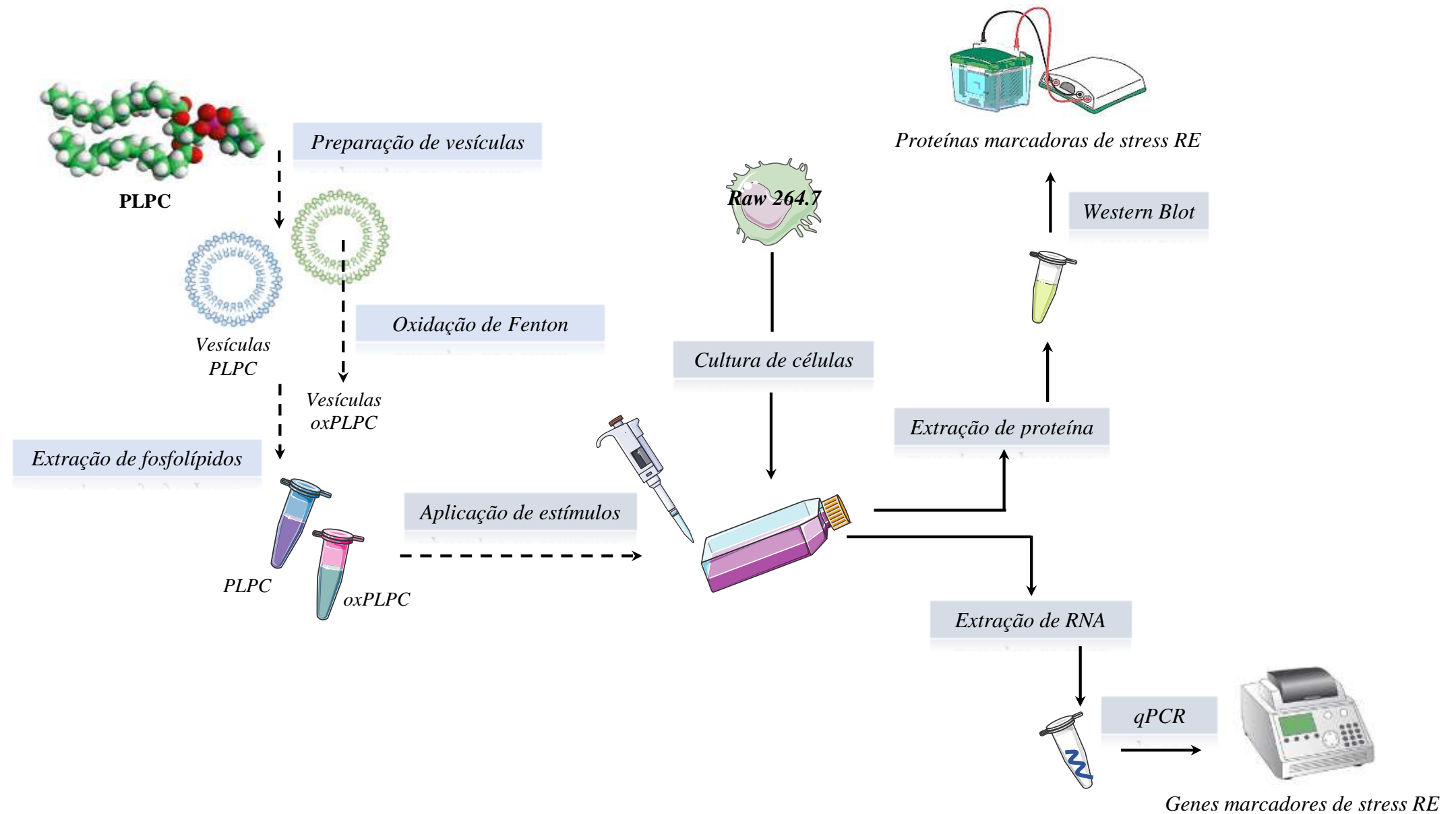
de colesterol não-esterificado, mais recentemente pondera-se a importância dos fosfolípidos oxidados na indução de *stress* do retículo endoplasmático ao nível do macrófago. Deste modo, propõe-se como objetivo para a segunda parte do trabalho:

*Avaliar a contribuição de fosfolípidos oxidados para a indução de stress do retículo endoplasmático em macrófagos*

### **3.3 Metodologia**

À semelhança do efetuado para a primeira parte do trabalho, apresenta-se um fluxograma geral do protocolo seguido o cumprimento deste segundo objetivo proposto. A partir do fluxograma evidenciado é possível obter uma ideia das diferentes etapas empregues nesta segunda fase do presente trabalho.





Esquema 3.1: Fluxograma do trabalho. Preparou-se vesículas do fosfolípido 1-palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (PLPC) e oxidou-se algumas delas pela ação do radical hidroxilo produzido em condições de reação de Fenton. Após a extração dos fosfolípidos oxidados (oxPLPC) e não-oxidados (PLPC), foram aplicados nas células RAW 264.7. Seguiu-se a análise da expressão de marcadores de *stress* do retículo endoplasmático (RE) por Western Blot e qPCR.

### 3.3.1 Reagentes

O fosfolípido PLPC (PC 16:0/18:2) foi adquirido na *Avanti Polar Lipids*, o cloreto de ferro (II) na *Sigma-aldrich*, e o bicarbonato de amónio na *Riedel-deHaën*. Os restantes reagentes indicados nesta secção são comuns aos descritos na secção 2.3 Metodologia do Capítulo 2.

### 3.3.2 Oxidação de PLPC em condições de Fenton

A oxidação do fosfolípido PLPC requer a preparação de vesículas do mesmo num primeiro passo. Para tal adicionou-se 223 µL de tampão de bicarbonato de amónio 5mM (pH 7.4) a 500 µg de fosfolípido seco. Posteriormente agitou-se em vórtex durante 10 minutos, colocou-se num sonicador durante 15 minutos e agitou-se novamente com o auxílio do vórtex durante 5 minutos. Seguiu-se o tratamento oxidativo em condições de Fenton com a adição de 50 µL de solução de peróxido de hidrogénio (50 mM) e 2 µL de solução de cloreto de ferro (40 µM). Para a preparação da solução de peróxido de hidrogénio adicionou-se 5.2 mL de peróxido de hidrogénio (30%, m/v) a 94.8 µL de água miliQ. Para a solução de cloreto de ferro pesou-se 1 mg de cloreto de ferro, adicionou-se 1 mL e colocou-se no sonicador durante 15 minutos. A mistura de PLPC foi incubada com agitação a 37°C, no escuro, durante 72 horas. Simultaneamente preparou-se vesículas de PLPC não-oxidadas por adição de 250 µL de tampão de bicarbonato de amónio 5mM (pH 7.4) a 500 µg de fosfolípido seco, as quais sofreram o mesmo tratamento excetuando os passos de oxidação em condições de Fenton e de incubação.

### 3.3.3 Extração de fosfolípidos

Para a extração do fosfolípido oxidado – oxPLPC – e não-oxidado –PLPC – das vesículas lipossomais recorreu-se ao método de extração de *Bligh-Dyer*. Considerando a proporção de clorofórmio/metanol/água miliQ de 8:4:3 (v/v/v) adicionou-se 666,(6) µL de clorofórmio e 333,(3) µL de metanol aos 250 µL de solução de lipossomas de fosfolípido (250 µL de tampão bicarbonato de amónio no caso do PLPC; 223 µL de tampão bicarbonato de amónio + 25 µL de peróxido de hidrogénio + 2 µL de cloreto de ferro para o oxPLPC). Seguiu-se a centrifugação (*Sigma Laborzentrifugen*) durante 5 minutos a 4000 rpm a fim de formar duas fases: fase superior – *aquosa* – e fase inferior – *orgânica*, contendo os fosfolípidos. Após a transferência da fase inferior para um *vial* secou-se os fosfolípidos na corrente de azoto e armazenou-se a -4°C para posterior análise.

### 3.3.4 Quantificação de fosfolípidos

Efetuada de acordo com o procedimento descrito na seção 2.3.11 do Capítulo 2.

### 3.3.5 Cultura de células

Efetuada de acordo com o procedimento descrito na seção 2.3.1 do Capítulo 2.

### 3.3.6 Tratamento químico

As células RAW 264.7 foram plaqueadas numa densidade de  $2 \times 10^6$ /poço em microplacas de 6 poços para a preparação de lisados celulares totais assim como para a extração de RNA. Após a estabilização das células durante a noite o meio de cultura foi substituído na totalidade. Posteriormente adicionou-se PLPC (50  $\mu\text{g/mL}$ ), oxPLPC (50  $\mu\text{g/mL}$ ) e tunicamicina (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) e expôs-se as células aos estímulos durante 24 horas. A preparação dos estímulos foi conseguida por ressuspensão do fosfolípidos secos em PBS, seguida de agitação em vórtex e de sonicação durante 10 minutos.

### 3.3.7 Preparação de lisados celulares totais

Efetuada de acordo com o procedimento descrito na seção 2.3.15 do Capítulo 2.

### 3.3.8 Análise de proteínas por Western Blot

Efetuada de acordo com o procedimento descrito na seção 2.3.6 do Capítulo 2.

### 3.3.9 Análise da expressão génica por qPCR

Efetuada de acordo com o procedimento descrito na seção 2.3.7 do Capítulo 2.

## 3.4 Resultados e discussão

Numa segunda parte do presente trabalho pretendeu-se avaliar a contribuição de fosfolípidos oxidados na indução de *stress* do retículo endoplasmático em macrófagos. Apesar

de não ter sido possível desenvolver amplamente este segundo objetivo apresenta-se nesta seção os resultados preliminares alcançados.

No contexto da doença aterosclerótica a captação excessiva de oxLDL pelos macrófagos interfere com a esterificação do colesterol contido nas lipoproteínas e favorece a ocorrência de *stress* do retículo endoplasmático (revisto em [21, 164]). Contudo, evidências crescentes parecem sugerir igualmente a contribuição dos fosfolípidos oxidados constituintes das oxLDL na ativação da UPR (revisto em [153, 155]). Na tentativa de simular o processo *in vivo* elegeu-se o principal fosfolípido presente nas LDL. A análise fosfolipidômica das lipoproteínas plasmáticas efetuada por Rezaee e seus colaboradores determinou a PC como a principal classe presente nas LDL [165]. Por HPLC-MS revelaram o íão  $m/z$  758.4 correspondente à espécie PC com os ácidos gordos C16:0 e C18:2 (PLPC) como o mais abundante nas lipoproteínas mencionadas [165]. Apesar dos escassos estudos incidentes na área sugerirem o oxPAPC como o principal fosfolípido oxidado presente nas lesões ateroscleróticas, sugerem igualmente a acumulação de oxPLPC [159, 166]. Uma vez que o papel aterogênico do oxPAPC tem sido maior alvo de foco [67, 159, 162, 163, 166] e o estudo supra mencionado demonstrou a maior abundância de PLPC em comparação com PAPC nas LDL, então selecionou-se o fosfolípido PLPC para o presente trabalho. Sucintamente preparou-se vesículas de PLPC e procedeu-se à oxidação em condições de Fenton. Após a extração dos fosfolípidos oxidados (oxPLPC) e não-oxidados (PLPC) estimulou-se as células RAW 264.7 com ambos os estímulos na concentração 50  $\mu\text{g/mL}$  durante 24 horas. Simultaneamente recorreu-se à tunicamicina, enquanto conhecido e potente indutor de *stress* do retículo, tendo o tratamento das células com tunicamicina na concentração 0.5  $\mu\text{g/mL}$  servido de controlo positivo. Os respetivos lisados celulares totais foram utilizados para a análise das proteínas marcadoras de *stress* do retículo GRP78, ATF4 e CHOP por Western Blot (Figura 3.3).

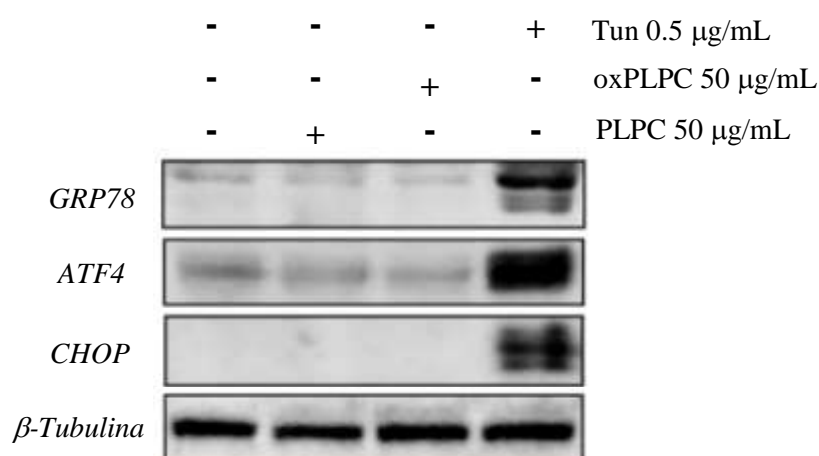


Figura 3.3: Avaliação do efeito do fosfolípido PLPC oxidado na indução de stress do retículo endoplasmático. As células RAW 264.7 foram estimuladas com PLPC não-oxidado na concentração 50  $\mu\text{g/mL}$  (na figura, PLPC 50  $\mu\text{g/mL}$ ), PLPC oxidado na concentração 50  $\mu\text{g/mL}$  (na figura, oxPLPC 50  $\mu\text{g/mL}$ ), ou tunicamicina na

concentração 0.5 µg/mL (*na figura*, Tun 0.5 µg/mL) durante 24 horas. Após a separação de 30 µg de proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% (v/v), avaliou-se a expressão das proteínas marcadoras de *stress* do retículo GRP78, ATF4 e CHOP nas condições experimentais em estudo por Western Blot. Os resultados são representativos de uma experiência. Para garantir o carregamento equivalente de proteínas entre amostras, os anticorpos foram removidos e a membrana foi novamente incubada com anticorpo anti-β-Tubulina.

Como é possível constatar pela figura supra representada, o tratamento das células RAW 264.7 com o fosfolípido oxidado (oxPLPC) não induziu a expressão das proteínas marcadoras de *stress* do retículo, contrariamente ao esperado. No caso do fosfolípido não oxidado (PLPC) tais resultados eram expectáveis uma vez que se sabe ser necessária a presença de um grupo oxidado no resíduo *sn2* (descrito pormenorizadamente no Subcapítulo 3.1) decorrente da oxidação dos fosfolípidos [159, 166-168]. No estudo de Lusi e seus colaboradores o tratamento de células HAEC com oxPAPC, na concentração 40 µg/mL, resultou na indução acentuada da quimiocina pró-inflamatória IL-8 ao contrário do sucedido para as células tratadas com a mesma concentração de PAPC, o que mostra a importância da oxidação na atividade biológica do fosfolípido [162]. Em concordância, Bochkov e seus colaboradores mostraram igualmente a importância da presença do resíduo *sn2* oxidado na indução da UPR e do fator VEGF em células HUVEC [163]. No entanto, esperava-se o aumento das proteínas representadas face à indução de *stress* do retículo pelo oxPLPC. De facto, Lusi e seus colaboradores mostraram a indução de diversas vias da UPR face ao tratamento de células HAEC com oxPAPC na concentração praticada neste trabalho (50 µg/mL) [162].

De modo a confirmar e complementar os resultados obtidos por Western Blot, analisou-se igualmente a transcrição de genes marcadores de *stress* do retículo por qPCR. Sucintamente tratou-se as células RAW 264.7 com PLPC e oxPLPC na concentração 50 µg/mL durante 24 horas, obteve-se o respetivo RNA e analisou-se a transcrição dos genes *Chop* e *Grp78* por qPCR (Figura 3.4). De forma semelhante ao mencionado anteriormente para a análise de proteínas, as células foram estimuladas com tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL enquanto controlo positivo.

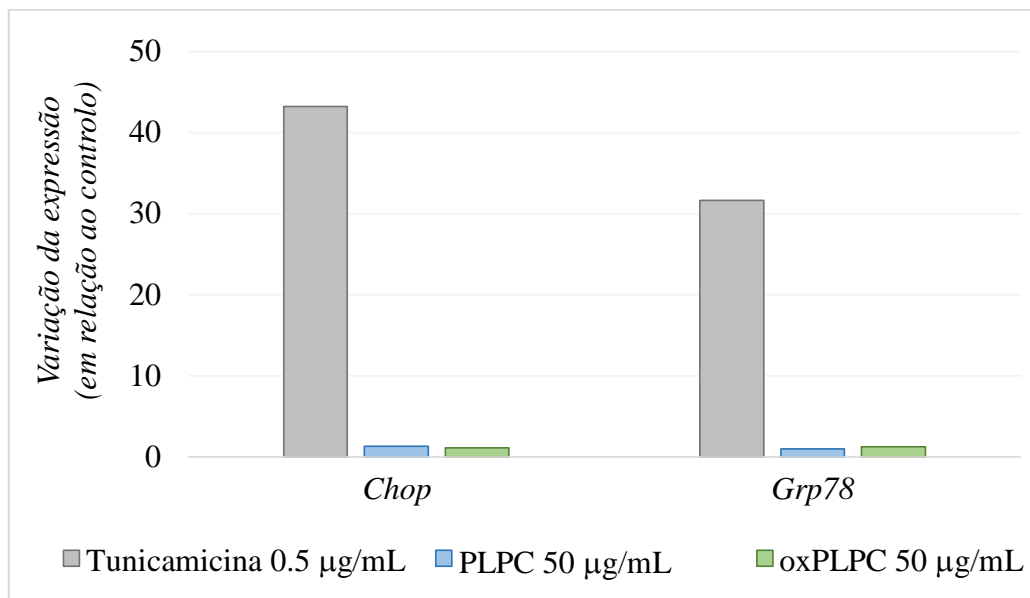


Figura 3.4: Avaliação do efeito do fosfolípido PLPC oxidado na indução de stress do retículo endoplasmático. As células RAW 264.7 foram estimuladas com PLPC não-oxidado na concentração 50 µg/mL (na figura, PLPC 50 µg/mL), PLPC oxidado na concentração 50 µg/mL (na figura, oxPLPC 50 µg/mL), ou tunicamicina na concentração 0.5 µg/mL (na figura, Tunicamicina 0.5 µg/mL) durante 24 horas. Após a extração do RNA avaliou-se a expressão dos genes *Chop* e *Grp78* nas condições experimentais em estudo por qPCR. Os resultados são representativos de uma experiência e encontram-se representados em função do controle considerado 1 (unidades arbitrárias), e foram normalizados utilizando o gene *Hprt-1* como gene de referência.

A análise da expressão dos genes *Chop* e *Grp78* mostrou uma vez mais a incapacidade dos fosfolípidos PLPC e oxPLPC em induzir *stress* do retículo endoplasmático, confirmando os resultados previamente reportados. Uma vez que o tratamento com ambos os fosfolípidos resultou em valores de variação de expressão semelhantes, ponderou-se a possibilidade da concentração de PLPC puder ser significativamente inferior ao necessário. Comparando com o estudo de Bochkov e seus colaboradores, a concentração de estímulo praticada neste trabalho corresponde a metade do valor aplicado pelos autores [163]. No seu estudo os autores demonstraram o efeito da concentração na indução dos fatores ATF3 e VEGF, tendo utilizado concentrações de oxPAPC de 130 µM, correspondentes a 100 µg/mL, o dobro do valor usado no presente trabalho. Para a concentração de oxPLPC aplicada neste trabalho, 50 µg/mL, os autores não verificaram a indução dos fatores anteriormente mencionados. Contudo no estudo de Liss e seus colaboradores a concentração de 50 µg/mL mostrou ser suficiente para a indução significativa da expressão de diversos genes envolvidos na UPR [67]. Curiosamente, em ambos os estudos mencionados, o tempo de exposição das células ao estímulo foi de 4 horas, bastante inferior ao praticado neste trabalho (24 horas), o que pode ser um fator decisivo na indução da UPR pelo oxPLPC. Adicionalmente questionou-se o tipo de produtos formados durante a oxidação do fosfolípido PLPC uma vez que estudos existentes sugeriram a estrutura e os grupos funcionais dos produtos oxidados como fatores determinantes da sua atividade biológica [159,

166-168]. No presente trabalho incubou-se o fosfolípido PLPC para oxidação em condições de Fenton durante 72 horas (3 dias) de forma a obter percentagens de oxidação de 80% em semelhança ao reportado em alguns estudos na área. No entanto nesses estudos a oxidação dos fosfolípidos tem sido conseguida por exposição ao ar [67, 162, 163, 169]. Como tal a oxidação em condições de Fenton realizada neste trabalho pode igualmente refletir-se no tipo de produtos oxidados formados, o que poderá implicar a necessidade de utilização de diferentes procedimentos de oxidação.

### 3.5 Diretrizes futuras

Como segundo objetivo propôs-se avaliar a contribuição de fosfolípidos oxidados para a indução de *stress* do retículo endoplasmático. Tendo em conta os resultados preliminares alcançados no presente trabalho não é possível aferir conclusões a partir dos mesmos. Assim, propõe-se somente algumas diretrizes para futuros trabalhos.

Considerando os resultados debatidos no subcapítulo precedente propõe-se como etapa seguinte o tratamento das células RAW 264.7 com maior concentração de oxPLPC durante tempos de exposição mais curtos. A utilização de diferentes procedimentos e tempos de oxidação assim como a monitorização dos produtos oxidados formados por HPLC-MS são igualmente sugeridas. Explorado o efeito deste fosfolípido oxidado na ativação da UPR em macrófagos propõe-se a extensão do tema ao estudo de outros fosfolípidos oxidados, nomeadamente ao PLPE (1-palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilserina) uma vez que representa um dos principais fosfolípidos constituintes das LDL e tem-se mostrado um escasso alvo de estudo no contexto da doença aterosclerótica.

*(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)*



# Capítulo 4

## Conclusão

Com o presente trabalho foi possível demonstrar a remodelação do perfil lipídico do macrófago face à ocorrência de *stress* do retículo endoplasmático. Sendo este um tema pouco explorado na atualidade os resultados alcançados poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos subjacentes à UPR em mamíferos e oferecer um ponto de partida para futuros estudos no contexto da doença aterosclerótica. Apesar da escassez de resultados respeitantes à segunda fase do trabalho, com base na revisão de literatura efetuada é plausível antever um importante papel dos fosfolípidos oxidados na indução de *stress* do retículo endoplasmático.

*(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)*

# Anexo 1

Tabela 0.1: Perfil de expressão de genes ligados ao metabolismo lipídico de macrófagos RAW 264.7 expostos a tunicamicina (0.5 µg/mL) ou 7-cetocolesterol (15 µg/mL) durante dois tempos de exposição (4 e 24 horas). Os valores encontram-se representados em termos de variação da expressão em relação às células não tratadas (controle).

	<b>Tun 4H</b>			<b>Tun 24H</b>			<b>7CC 4H</b>			<b>7CC 24H</b>		
	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N3</i>
<i>Abca</i>	1.00	0.88	1.03	0.80	0.82	0.69	2.59	2.56	2.57	0.89	0.94	0.91
<i>Abcg</i>	0.59	0.50	0.56	0.40	0.52	0.41	2.18	1.90	2.04	0.93	0.89	0.91
<i>Fasn</i>	0.58	0.57	0.60	0.61	0.62	0.56	0.55	0.56	0.55	0.59	0.57	0.58
<i>Or11</i>	0.98	1.10	1.50	0.80	1.02	1.03	1.98	2.26	2.12	14.20	21.14	17.67
<i>Pemt</i>	0.59	0.54	0.50	1.77	1.64	1.44	0.53	0.57	0.55	1.17	1.10	1.14
<i>Pla2g4a</i>	0.80	0.87	0.85	2.44	2.67	2.50	0.69	0.72	0.70	1.34	1.38	1.36
<i>Pla2g4b</i>	0.97	1.00	1.03	0.56	0.56	0.51	0.92	0.92	0.92	0.55	0.63	0.59
<i>Pla2g4f</i>	0.73	0.73	0.72	0.86	0.84	0.72	0.85	0.87	0.86	1.80	1.49	1.64
<i>Srebf</i>	0.82	0.81	0.84	0.79	0.79	0.74	0.80	0.91	0.86	0.79	0.80	0.79
<i>Fabp4</i>	1.94	2.72	2.49	0.58	0.36	0.35	0.96	0.81	0.88	12.58	14.35	13.47
<i>Pcyt1a</i>	1.22	0.82	0.87	1.08	0.88	0.74	1.40	1.53	1.47	2.03	4.20	3.11

*(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)*

# Bibliografia

1. *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. 2011, Geneva: World Health Organization.
2. Mackay, J and Mensah, G, *The Atlas of Heart Disease and Stroke*. 2004, Geneva: World Health Organization.
3. *Portugal – Doenças Cérebro-Cardiovasculares em números – 2013*. Lisboa: Direção-Geral da Saúde.
4. Keele, KD, *Leonard da Vinci's views on arteriosclerosis* Medical History, 1973. **17**(3): p. 304-308.
5. Bonow, RO, Mann, DL, Zipes, DP, and Libby, P, *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 9th ed. 2011, Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
6. Mello e Silva, A, *Aterosclerose: doença sistémica com manifestações focais. Territórios e manifestações clínicas*, in *Revista Fatores de Risco* 2007, Sociedade Portuguesa de Cardiologia: Lisboa. p. 40-45.
7. Konstantinov, I, Mejevoi, N, and Anichkov, N, *Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis*. Texas Heart Institute Journal 2006. **33**(4): p. 417-423.
8. *Classics in arteriosclerosis research: On experimental cholesterol steatosis and its significance in the origin of some pathological processes by N. Anitschkow and S. Chalataw, translated by Mary Z. Pelias, 1913*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1983. **3**(2): p. 178-182.
9. von Eckardstein, A, *Risk Factors for Atherosclerotic Vascular Disease*, in *Atherosclerosis: Diet and Drugs (Handbook of Experimental Pharmacology)*, A. von Eckardstein, Editor. 2005, Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany. p. 71-114.
10. Kromhout, D, Menotti, A, Kesteloot, H, and Sans, S, *Prevention of coronary heart disease by diet and lifestyle: evidence From Prospective Cross-Cultural, and Intervention Studies*. Journal of the American Heart Association 2002. **105**(7): p. 893-898.
11. Slijkhuis, W, Mali, W, and Appelman, Y, *A historical perspective towards a non-invasive treatment for patients with atherosclerosis*. Netherlands Heart Journal, 2009. **17**(4): p. 140-144.
12. Ross, R, *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s* Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-809.
13. Mayeri, C, Lukasser, M, Sedivy, R, Niederegger, H, Seiler, R, and Wick, G, *Atherosclerosis research from past to present - on the track of two pathologists with opposing views, Carl Von Rokitansky and Rudolf Virchow*. Virchows Archiv, 2006. **449**(1): p. 96-103.
14. Tabas, I, Williams, KJ, and Boren, J, *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis - Update and therapeutic implications*. Circulation, 2007. **116**(16): p. 1832-1844.
15. Miller, YI, Choi, SH, Wiesner, P, Fang, LH, Harkewicz, R, Hartvigsen, K, Boullier, A, Gonen, A, Diehl, CJ, Que, XC, Montano, E, Shaw, PX, Tsimikas, S, Binder, CJ, and Witztum, JL, *Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by*

- pattern recognition receptors of innate immunity*. Circulation Research, 2011. **108**(2): p. 235-248.
16. Hansson, GK and Hermansson, A, *The immune system in atherosclerosis*. Nature Immunology, 2011. **12**(3): p. 204-212.
  17. Wollard, KJ, *Immunological aspects of atherosclerosis*. Clinical Science, 2013. **125**(5): p. 221-235.
  18. Moore, KJ and Freeman, MW, *Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2006. **26**(8): p. 1702-1711.
  19. Cullen, P, Rauterberg, J, and Lorkowski, S, *The Pathogenesis of Atherosclerosis*, in *Atherosclerosis: Diet and Drugs (Handbook of Experimental Pharmacology)*, A. von Eckardstein, Editor. 2005, Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany. p. 3-70.
  20. Kockx, MM, De Meyer, GR, Muhring, J, Jacob, W, Bult, H, and Herman, AG, *Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques*. Circulation, 1998. **97**(23): p. 2307-2315.
  21. Scull, CM and Tabas, I, *Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2011. **31**(12): p. 2792-2797.
  22. Ross, R, *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. American Heart Journal, 1999. **138**(5): p. S419-S420.
  23. Glass, CK and Witztum, JL, *Atherosclerosis: The road ahead*. Cell, 2001. **104**(4): p. 503-516.
  24. Moore, KJ, Sheedy, FJ, and Fisher, EA, *Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance*. Nature Reviews Immunology, 2013. **13**(10): p. 709-721.
  25. Swirski, FK, Libby, P, Aikawa, E, Alcaide, P, Luscinskas, FW, Weissleder, R, and Pittet, MJ, *Ly-6C(hi) monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata*. Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(1): p. 195-205.
  26. Ley, K, Laudanna, C, Cybulsky, MI, and Nourshargh, S, *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(9): p. 678-689.
  27. Tacke, F, Alvarez, D, Kaplan, TJ, Jakubzick, C, Spanbroek, R, Llodra, J, Garin, A, Liu, JH, Mack, M, van Rooijen, N, Lira, SA, Habenicht, AJ, and Randolph, GJ, *Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques*. Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(1): p. 185-194.
  28. Combadiere, C, Potteaux, S, Rodero, M, Simon, T, Pezard, A, Esposito, B, Merval, R, Proudfoot, A, Tedgui, A, and Mallat, Z, *Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice*. Circulation, 2008. **117**(13): p. 1649-1657.
  29. Tabas, I, *Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis*. Nature Reviews Immunology, 2010. **10**(1): p. 36-46.
  30. Kunjathoor, VV, Febbraio, M, Podrez, EA, Moore, KJ, Andersson, L, Koehn, S, Rhee, JS, Silverstein, R, Hoff, HF, and Freeman, MW, *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*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(51): p. 49982-49988.
  31. Swirski, FK, Pittet, MJ, Kircher, MF, Aikawa, E, Jaffer, FA, Libby, P, and Weissleder, R, *Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(27): p. 10340-10345.
  32. Khallou-Laschet, J, Varthaman, A, Fornasa, G, Compain, C, Gaston, AT, Clement, M, Dussiot, M, Levillain, O, Graff-Dubois, S, Nicoletti, A, and Caligiuri, G, *Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis*. Plos One, 2010. **5**(1).

33. Sharma, N, Lu, Y, Zhou, GJ, Liao, XD, Kapil, P, Anand, P, Mahabeleshwar, GH, Stamler, JS, and Jain, MK, *Myeloid kruppel-like factor 4 deficiency augments atherogenesis in Apoe<sup>-/-</sup> mice*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2012. **32**(12): p. 2836-2838.
34. van Gils, JM, Derby, MC, Fernandes, LR, Ramkhelawon, B, Ray, TD, Rayner, KJ, Parathath, S, Distel, E, Feig, JL, Alvarez-Leite, JI, Rayner, AJ, McDonald, TO, O'Brien, KD, Stuart, LM, Fisher, EA, Lacy-Hulbert, A, and Moore, KJ, *The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques*. *Nature Immunology*, 2012. **13**(2): p. 136-143.
35. Wanschel, A, Seibert, T, Hewing, B, Ramkhelawon, B, Ray, TD, van Gils, JM, Rayner, KJ, Feig, JE, O'Brien, ER, Fisher, EA, and Moore, KJ, *Neuroimmune guidance cue semaphorin 3E is expressed in atherosclerotic plaques and regulates macrophage retention*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2013. **33**(5): p. 886-893.
36. Trogan, E, Feig, JE, Dogan, S, Rothblat, GH, Angeli, V, Tacke, F, Randolph, GJ, and Fisher, EA, *Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in Apoe-deficient mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(10): p. 3781-3786.
37. Maxfield, FR and Tabas, I, *Role of cholesterol and lipid organization in disease*. *Nature*, 2005. **438**(7068): p. 612-621.
38. Manning-Tobin, JJ, Moore, KJ, Seimon, TA, Bell, SA, Sharuk, M, Alvarez-Leite, JI, de Winther, MP, Tabas, I, and Freeman, MW, *Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2009. **29**(1): p. 19-26.
39. Tabas, I, *Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis - The importance of lesion stage and phagocytic efficiency*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2005. **25**(11): p. 2255-2264.
40. Liu, J, Thewke, DP, Su, YR, Linton, MF, Fazio, S, and Sinensky, MS, *Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2005. **25**(1): p. 174-179.
41. Bhatia, VK, Yun, S, Leung, V, Grimsditch, DC, Benson, GM, Botto, MB, Boyle, JJ, and Haskard, DO, *Complement C1q reduces early atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice*. *The American Journal of Pathology*, 2007. **170**(1): p. 416-426.
42. Schrijvers, DM, De Meyer, GR, Kockx, MM, Herman, AG, and Martinet, W, *Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2005. **25**(6): p. 1256-1261.
43. Feng, B, Yao, PM, Li, Y, Devlin, CM, Zhang, D, Harding, HP, Sweeney, M, Rong, JX, Kuriakose, G, Fisher, EA, Marks, AR, Ron, D, and Tabas, I, *The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages*. *Nature Cell Biology*, 2003. **5**(9): p. 781-792.
44. Lee, AH and Glimcher, LH, *Intersection of the unfolded protein response and hepatic lipid metabolism*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009. **66**(17): p. 2835-2850.
45. Malhotra, JD and Kaufman, RJ, *Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword?* *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007. **9**(12): p. 2277-2293.
46. Zhang, KZ and Kaufman, RJ, *From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 455-462.
47. Meusser, B, Hirsch, C, Jarosch, E, and Sommer, T, *ERAD: the long road to destruction*. *Nature Cell Biology*, 2005. **7**(8): p. 766-772.
48. Todd, DJ, Lee, AH, and Glimcher, LH, *The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity*. *Nature Reviews Immunology*, 2008. **8**(9): p. 663-674.

49. Yoshida, H, Matsui, T, Yamamoto, A, Okada, T, and Mori, K, *XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor*. Cell, 2001. **107**(7): p. 881-891.
50. Sriburi, R, Jackowski, S, Mori, K, and Brewer, JW, *XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum*. The Journal of Cell Biology, 2004. **167**(1): p. 35-41.
51. Brewer, JW, Hendershot, LM, Sherr, CJ, and Diehl, JA, *Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(15): p. 8505-8510.
52. Brewer, JW and Diehl, JA, *PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(23): p. 12625-12630.
53. Lu, PD, Harding, HP, and Ron, D, *Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response*. The Journal of Cell Biology, 2004. **167**(1): p. 27-33.
54. Novoa, I, Zhang, YH, Zeng, HQ, Jungreis, R, Harding, HP, and Ron, D, *Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression*. Embo Journal, 2003. **22**(5): p. 1180-1187.
55. Okada, T, Yoshida, H, Akazawa, R, Negishi, M, and Mori, K, *Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response*. Biochemical Journal, 2002. **366**: p. 585-594.
56. Lee, K, Tirasophon, W, Shen, XH, Michalak, M, Prywes, R, Okada, T, Yoshida, H, Mori, K, and Kaufman, RJ, *IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response*. Genes & Development, 2002. **16**(4): p. 452-466.
57. Feng, B, Zhang, D, Kuriakose, G, Devlin, CM, Kockx, M, and Tabas, I, *Niemann-Pick C heterozygosity confers resistance to lesional necrosis and macrophage apoptosis in murine atherosclerosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(18): p. 10423-10428.
58. Zhou, J, Lhotak, S, Hilditch, BA, and Austin, RC, *Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2005. **111**(14): p. 1814-1821.
59. Myoishi, M, Hao, H, Minamino, T, Watanabe, K, Nishihira, K, Hatakeyama, K, Asada, Y, Okada, KI, Ishibashi-Ueda, H, Gabbiani, G, Bochaton-Piallat, ML, Mochizuki, N, and Kitakaze, M, *Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome*. Circulation, 2007. **116**(11): p. 1226-1233.
60. Thorp, E, Li, G, Seimon, TA, Kuriakose, G, Ron, D, and Tabas, I, *Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe<sup>-/-</sup> and Ldlr<sup>-/-</sup> mice lacking CHOP*. Cell Metabolism, 2009. **9**(5): p. 474-481.
61. Yao, PM and Tabas, I, *Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(45): p. 42468-42476.
62. Yao, PM and Tabas, I, *Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the Fas pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(31): p. 23807-23813.
63. Pedruzzi, E, Guichard, C, Ollivier, W, Driss, F, Fay, M, Prunet, C, Marie, JC, Pouzet, C, Samadi, M, Elbim, C, O'Dowd, Y, Bens, M, Vandewalle, A, Gougerot-Pocidallo, MA, Lizard, G, and Ogier-Denis, E, *NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells*. Molecular and Cellular Biology, 2004. **24**(24): p. 10703-10717.



64. Kedi, X, Ming, Y, Yongping, W, Yi, Y, and Xiaoxiang, Z, *Free cholesterol overloading induced smooth muscle cells death and activated both ER- and mitochondrial-dependent death pathway*. *Atherosclerosis*, 2009. **207**(1): p. 123-130.
65. Gora, S, Maouche, S, Atout, R, Wanherdrick, K, Lambeau, G, Cambien, F, Ninio, E, and Karabina, SA, *Phospholipolyzed LDL induces an inflammatory response in endothelial cells through endoplasmic reticulum stress signaling*. *Faseb Journal*, 2010. **24**(9): p. 3284-3297.
66. Seimon, TA, Nadolski, MJ, Liao, XH, Magallon, J, Nguyen, M, Feric, NT, Koschinsky, ML, Harkewicz, R, Witztum, JL, Tsimikas, S, Golenbock, D, Moore, KJ, and Tabas, I, *Atherogenic Lipids and Lipoproteins Trigger CD36-TLR2-Dependent Apoptosis in Macrophages Undergoing Endoplasmic Reticulum Stress*. *Cell Metabolism*, 2010. **12**(5): p. 467-482.
67. Gargalovic, PS, Gharavi, NM, Clark, MJ, Pagnon, J, Yang, WP, He, AQ, Truong, A, Baruch-Oren, T, Berliner, JA, Kirchgessner, TG, and Lusis, AJ, *The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2006. **26**(11): p. 2490-2496.
68. Kagan, VE, Borisenko, GG, Tyurina, YY, Tyurin, VA, Jiang, J, Potapovich, AI, Kini, V, Amoscato, AA, and Fujii, Y, *Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2004. **37**(12): p. 1963-1985.
69. Samhan-Arias, AK, Ji, J, Demidova, OM, Sparvero, LJ, Feng, W, Tyurin, V, Tyurina, YY, Epperly, MW, Shvedova, AA, Greenberger, JS, Bayir, H, Kagan, VE, and Amoscato, AA, *Oxidized phospholipids as biomarkers of tissue and cell damage with a focus on cardiolipin*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012. **1818**(10): p. 2413-2423.
70. Basseri, S and Austin, RC, *Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential*. *Biochemistry Research International*, 2012. **2012**: p. 13.
71. Zha, BS and Zhou, H, *ER stress and lipid metabolism in adipocytes*. *Biochemistry Research International*, 2012. **2012**: p. 9.
72. Rutkowski, DT, Wu, J, Back, SH, Callaghan, MU, Ferris, SP, Iqbal, J, Clark, R, Miao, HZ, Hassler, JR, Fornek, J, Katze, MG, Hussain, MM, Song, B, Swathirajan, J, Wang, JY, Yau, GDY, and Kaufman, RJ, *UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators*. *Developmental Cell*, 2008. **15**(6): p. 829-840.
73. Bobrovnikova-Marjon, E, Hatzivassiliou, G, Grigoriadou, C, Romero, M, Cavener, DR, Thompson, CB, and Diehl, JA, *PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. **105**(42): p. 16314-16319.
74. Zhang, KZ, Wang, SY, Malhotra, J, Hassler, JR, Back, SH, Wang, GH, Chang, L, Xu, WB, Miao, HZ, Leonardi, R, Chen, YE, Jackowski, S, and Kaufman, RJ, *The unfolded protein response transducer IRE1 alpha prevents ER stress-induced hepatic steatosis*. *Embo Journal*, 2011. **30**(7): p. 1357-1375.
75. Nguyen, P, Leray, V, Diez, M, Serisier, S, Le Bloc'h, J, Siliart, B, and Dumon, H, *Liver lipid metabolism*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2008. **92**(3): p. 272-283.
76. Oyadomari, S, Harding, HP, Zhang, YH, Oyadomari, M, and Ron, D, *Dephosphorylation of translation initiation factor 2 alpha enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice*. *Cell Metabolism*, 2008. **7**(6): p. 520-532.
77. Wang, CX, Huang, ZY, Du, Y, Cheng, Y, Chen, SH, and Guo, FF, *ATF4 regulates lipid metabolism and thermogenesis*. *Cell Research*, 2010. **20**(2): p. 174-184.
78. Lee, AH, Scapa, EF, Cohen, DE, and Glimcher, LH, *Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1*. *Science*, 2008. **320**(5882): p. 1492-1496.
79. Ron, D and Walter, P, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007. **8**(7): p. 519-529.

80. Chapman, R, Sidrauski, C, and Walter, P, *Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1998. **14**: p. 459-485.
81. Shaffer, AL, Shapiro-Shelef, M, Iwakoshi, NN, Lee, AH, Qian, SB, Zhao, H, Yu, X, Yang, LM, Tan, BK, Rosenwald, A, Hurt, EM, Petroulakis, E, Sonenberg, N, Yewdell, JW, Calame, K, Glimcher, LH, and Staudt, LM, *XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation*. Immunity, 2004. **21**(1): p. 81-93.
82. Sriburi, R, Bommasiamy, H, Buldak, GL, Robbins, GR, Frank, M, Jackowski, S, and Brewer, JW, *Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1 (S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(10): p. 7024-7034.
83. Brewer, JW and Jackowski, S, *UPR-mediated membrane biogenesis in B cells*. Biochemistry Research International, 2012. **2012**: p. 7.
84. Bommasiamy, H, Back, SH, Fagone, P, Lee, K, Meshinchi, S, Vink, E, Sriburi, R, Frank, M, Jackowski, S, Kaufman, RJ, and Brewer, JW, *ATF6 alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum*. Journal of Cell Science, 2009. **122**(10): p. 1626-1636.
85. McGehee, AM, Dougan, SK, Klemm, EJ, Shui, GH, Park, B, Kim, YM, Watson, N, Wenk, MR, Ploegh, HL, and Hu, CCA, *XBP-1-deficient plasmablasts show normal protein folding but altered glycosylation and lipid synthesis*. Journal of Immunology, 2009. **183**(6): p. 3690-3699.
86. Matyash, V, Liebisch, G, Kurzchalia, TV, Shevchenko, A, and Schwudke, D, *Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics*. Journal of Lipid Research, 2008. **49**(5): p. 1137-1146.
87. Bligh, EG and Dyer, WJ, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959. **37**(8): p. 911-917.
88. Rouser, G, Fkeischer, S, and Yamamoto, A, *Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots*. Lipids, 1970. **5**(5): p. 494-6.
89. Gupta, BL, *Microdetermination techniques for H2O2 in irradiated solutions*. Microchemical Journal, 1973. **18**(4): p. 363-374.
90. Jiang, ZY, Woollard, ACS, and Wolff, SP, *Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe2+ in the presence of xylenol orange - Comparison with the TBA assay and an iodometric method*. Lipids, 1991. **26**(10): p. 853-856.
91. Dieffenbacher, A and Pocklington, WD, *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives: 1st Supplement to the 7th Edition*. 1992.
92. Schurmann, C, Goren, I, Linke, A, Pfeilschifter, J, and Frank, S, *Deregulated unfolded protein response in chronic wounds of diabetic ob/ob mice: A potential connection to inflammatory and angiogenic disorders in diabetes-impaired wound healing*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014. **446**(1): p. 195-200.
93. Kim, KH, Gao, Y, Walder, K, Collier, GR, Skelton, J, and Kissebah, AH, *SEPS1 protects RAW264.7 cells from pharmacological ER stress agent-induced apoptosis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **354**(1): p. 127-132.
94. Castilho, G, Okuda, LS, Pinto, RS, Iborra, RT, Nakandakare, ER, Santos, CX, Laurindo, FR, and Passarelli, M, *ER stress is associated with reduced ABCA-1 protein levels in macrophages treated with advanced glycosylated albumin - Reversal by a chemical chaperone*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012. **44**(7): p. 1078-1086.
95. Yao, ST, Miao, C, Tian, H, Sang, H, Yang, NN, Jiao, P, Han, JJ, Zong, CL, and Qin, SC, *Endoplasmic reticulum stress promotes macrophage-derived foam cell formation by up-*

- regulating cluster of differentiation 36 (CD36) expression*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(7): p. 4032-4042.
96. Erbay, E, Babaev, VR, Mayers, JR, Makowski, L, Charles, KN, Snitow, ME, Fazio, S, Wiest, MM, Watkins, SM, Linton, MF, and Hotamisligil, GS, *Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis* Nature Medicine, 2010. **16**(2): p. 237-237.
97. Lenin, R, Maria, MS, Agrawal, M, Balasubramanyam, J, Mohan, V, and Balasubramanyam, M, *Amelioration of glucolipotoxicity-induced endoplasmic reticulum stress by a "chemical chaperone" in human THP-1 monocytes*. Experimental Diabetes Research, 2012. **2012**: p. 10.
98. Rong, JX, Shen, LJ, Chang, YH, Richters, A, Hodis, HN, and Sevanian, A, *Cholesterol oxidation products induce vascular foam cell lesion formation in hypercholesterolemic New Zealand White rabbits*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 1999. **19**(9): p. 2179-2188.
99. Gelissen, IC, Brown, AJ, Mander, EL, Kritharides, L, Dean, RT, and Jessup, W, *Sterol efflux is impaired from macrophage foam cells selectively enriched with 7-ketocholesterol*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(30): p. 17852-17860.
100. Sanson, M, Auge, N, Vindis, C, Muller, C, Bando, Y, Thiers, JC, Marachet, MA, Zarkovic, K, Sawa, Y, Salvayre, R, and Negre-Salvayre, A, *Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells prevention by oxygen-regulated protein 150 expression*. Circulation Research, 2009. **104**(3): p. 328-336.
101. Kim, I, Xu, WJ, and Reed, JC, *Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities*. Nature Reviews Drug Discovery, 2008. **7**(12): p. 1013-1030.
102. Xu, CY, Bailly-Maitre, B, and Reed, JC, *Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(10): p. 2656-2664.
103. Deldicque, L, Bertrand, L, Patton, A, Francaux, M, and Baar, K, *ER Stress induces anabolic resistance in muscle cells through PKB-induced blockade of mTORC1*. Plos One, 2011. **6**(6).
104. Burton, GJ, Yung, HW, Cindrova-Davies, T, and Charnock-Jones, DS, *Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia*. Placenta, 2009. **30**: p. S43-S48.
105. Tabas, I, *The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis*. Circulation Research, 2010. **107**(7): p. 839-850.
106. Woo, CW, Kutzler, L, Kimball, SR, and Tabas, I, *Toll-like receptor activation suppresses ER stress factor CHOP and translation inhibition through activation of eIF2B*. Nature Cell Biology, 2012. **14**(2): p. 192-200.
107. Rutkowski, DT and Kaufman, RJ, *A trip to the ER: coping with stress*. Trends in Cell Biology, 2004. **14**(1): p. 20-28.
108. Zimmermann, M and Meyer, N, *Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes*. Methods in Molecular Biology, 2011. **740**: p. 57-63.
109. Komura, T, Sakai, Y, Honda, M, Takamura, T, Matsushima, K, and Kaneko, S, *CD14(+) monocytes are vulnerable and functionally impaired under endoplasmic reticulum stress in patients with type 2 diabetes*. Diabetes, 2010. **59**(3): p. 634-643.
110. Huang, ZY, Liu, QP, Li, WZ, Wang, RJ, Wang, D, Zhang, YB, Zhang, F, Chi, Y, Liu, Z, Matsuura, E, Liu, ZB, and Zhang, QM, *7-Ketocholesterol induces cell apoptosis by activation of nuclear factor kappa B in mouse macrophages*. Acta Medica Okayama, 2010. **64**(2): p. 85-93.
111. Johnson, BH, Russell, MJ, Krylov, AS, Medh, RD, Ayala-Torres, S, Regner, JL, and Thompson, EB, *Structure-apoptotic potency evaluations of novel sterols using human leukemic cells*. Lipids, 2000. **35**(3): p. 305-315.
112. Wang, XM, Devalah, SP, Zhang, WH, and Welti, R, *Signaling functions of phosphatidic acid*. Progress in Lipid Research, 2006. **45**(3): p. 250-278.

113. Fagone, P and Jackowski, S, *Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function*. Journal of Lipid Research, 2009. **50**: p. S311-S316.
114. van Meer, G and de Kroon, AI, *Lipid map of the mammalian cell*. Journal of Cell Science, 2011. **124**(1): p. 5-8.
115. Schuck, S, Prinz, WA, Thorn, KS, Voss, C, and Walter, P, *Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response*. Journal of Cell Biology, 2009. **187**(4): p. 525-536.
116. Cui, Z and Houweling, M, *Phosphatidylcholine and cell death*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2002. **1585**(2-3): p. 87-96.
117. Ridgway, ND, *The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2013. **48**(1): p. 20-38.
118. Zhang, D, Tang, W, Yao, PM, Xie, B, Jackowski, S, and Tabas, IA, *Molecular genetic proof that the induction of CTP : Phosphocholine cytidyltransferase (CT) in macrophages (M phi S) by free cholesterol loading is a survival response*. Circulation, 2000. **102**(18): p. 19-19.
119. Anthony, ML, Zhao, M, and Brindle, KM, *Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis following induction of apoptosis in HL-60 cells*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(28): p. 19686-19692.
120. Cui, Z, Houweling, M, Chen, MH, Record, M, Chap, H, Vance, DE, and Terce, F, *A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(25): p. 14668-14671.
121. van der Sanden, MH, Houweling, M, van Golde, LM, and Vaandrager, AB, *Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153)*. The Biochemical journal, 2003. **369**(3): p. 643-50.
122. van der Sanden, MH, Meems, H, Houweling, M, Helms, JB, and Vaandrager, AB, *Induction of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein/growth arrest and DNA damage-inducible protein 153 expression during inhibition of phosphatidylcholine synthesis is mediated via activation of a C/EBP-activating transcription factor-responsive element*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(50): p. 52007-52015.
123. Kagan, VE, Fabisiak, JP, Shvedova, AA, Tyurina, YY, Tyurin, VA, Schor, NF, and Kawai, K, *Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis*. Febs Letters, 2000. **477**(1-2): p. 1-7.
124. Quehenberger, O, Armando, A, Dumlao, D, Stephens, DL, and Dennis, EA, *Lipidomics analysis of essential fatty acids in macrophages*. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2008. **79**(3-5): p. 123-129.
125. Schmitz, G and Ruebsaamen, K, *Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine*. Atherosclerosis, 2010. **208**(1): p. 10-18.
126. Sevastou, I, Kaffe, E, Mouratis, MA, and Aidinis, V, *Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2013. **1831**(1): p. 42-60.
127. Balla, T, Szentpetery, Z, and Kim, YJ, *Phosphoinositide signaling: New tools and insights*. Physiology, 2009. **24**(4): p. 231-244.
128. Pendaries, C, Tronchere, H, Plantavid, M, and Payrastre, B, *Phosphoinositide signaling disorders in human diseases*. Febs Letters, 2003. **546**(1): p. 25-31.
129. Liu, Y and Bankaitis, VA, *Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease*. Progress in Lipid Research, 2010. **49**(3): p. 201-217.
130. Liao, PL, Cheng, YW, Li, CH, Wang, YT, and Kang, JJ, *7-Ketocholesterol and cholesterol-5 alpha,6 alpha-epoxide induce smooth muscle cell migration and proliferation through the epidermal growth factor receptor/phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways*. Toxicology Letters, 2010. **197**(2): p. 88-96.

131. Larrayoz, IM, Huang, JD, Lee, JW, Pascual, I, and Rodriguez, IR, *7-Ketocholesterol-Induced Inflammation: Involvement of Multiple Kinase Signaling Pathways via NF kappa B but Independently of Reactive Oxygen Species Formation*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2010. **51**(10): p. 4942-4955.
132. Girotti, AW, *Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems*. Journal of Lipid Research, 1998. **39**(8): p. 1529-1542.
133. Bhandary, B, Marahatta, A, Kim, HR, and Chae, HJ, *An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(1): p. 434-456.
134. Wasserman, WW and Fahl, WE, *Functional antioxidant responsive elements*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(10): p. 5361-5366.
135. Cullinan, SB and Diehl, JA, *PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(19): p. 20108-20117.
136. Nguyen, T, Nioi, P, and Pickett, CB, *The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(20): p. 13291-13295.
137. Cullinan, SB, Zhang, D, Hannink, M, Arvisais, E, Kaufman, RJ, and Diehl, JA, *Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(20): p. 7198-7209.
138. Lemaire-Ewing, S, Prunet, C, Montange, T, Vejux, A, Berthier, A, Bessede, G, Corcos, L, Gambert, P, Neel, D, and Lizard, G, *Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols*. Cell Biology and Toxicology, 2005. **21**(2): p. 97-114.
139. Palozza, P, Simone, R, Catalano, A, Boninsegna, A, Bohm, V, Frohlich, K, Mele, MC, Monego, G, and Ranelletti, FO, *Lycopene prevents 7-ketocholesterol-induced oxidative stress, cell cycle arrest and apoptosis in human macrophages*. Journal of Nutritional Biochemistry, 2010. **21**(1): p. 34-46.
140. Vejux, A, Malvitte, L, and Lizard, G, *Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2008. **41**(7): p. 545-556.
141. Liao, XH, Sluimer, JC, Wang, Y, Subramanian, M, Brown, K, Pattison, JS, Robbins, J, Martinez, J, and Tabas, I, *Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis*. Cell Metabolism, 2012. **15**(4): p. 545-553.
142. Rohrl, C, Eigner, K, Winter, K, Korbilius, M, Obrowsky, S, Kratky, D, Kovacs, WJ, and Stangl, H, *Endoplasmic reticulum stress impairs cholesterol efflux and synthesis in hepatic cells*. Journal of Lipid Research, 2014. **55**(1): p. 94-103.
143. Iborra, RT, Machado-Lima, A, Castilho, G, Nunes, VS, Abdalla, DSP, Nakandakare, ER, and Passarelli, M, *Advanced glycation in macrophages induces intracellular accumulation of 7-ketocholesterol and total sterols by decreasing the expression of ABCA-1 and ABCG-1*. Lipids in Health and Disease, 2011. **10**.
144. Gaus, K, Dean, RT, Kritharides, L, and Jessup, W, *Inhibition of cholesterol efflux by 7-ketocholesterol: Comparison between cells, plasma membrane vesicles, and liposomes as cholesterol donors*. Biochemistry, 2001. **40**(43): p. 13002-13014.
145. Colgan, SM, Tang, D, Werstuck, GH, and Austin, RC, *Endoplasmic reticulum stress causes the activation of sterol regulatory element binding protein-2*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**(10): p. 1843-1851.
146. Hotamisligil, GS, *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell, 2010. **140**(6): p. 900-917.

147. Hu, WQ, Zhou, XY, Jiang, MX, Duan, YJ, Chen, YL, Li, XJ, Yin, ZN, He, GW, Yao, Z, Zhu, Y, Hajjar, DP, and Han, JH, *Statins synergize dexamethasone-induced adipocyte fatty acid binding protein expression in macrophages*. *Atherosclerosis*, 2012. **222**(2): p. 434-443.
148. Liu, QY, Quinet, E, and Nambi, P, *Adipocyte fatty acid-binding protein (aP2), a newly identified LXR target gene, is induced by LXR agonists in human THP-1 cells*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2007. **302**(1-2): p. 203-213.
149. Kataoka, H, Kume, N, Miyamoto, S, Minami, M, Moriwaki, H, Murase, T, Sawamura, T, Masaki, T, Hashimoto, N, and Kita, T, *Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions*. *Circulation*, 1999. **99**(24): p. 3110-3117.
150. Mehta, JL, Chen, JW, Hermonat, PL, Romeo, F, and Novelli, G, *Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): A critical player in the development of atherosclerosis and related disorders*. *Cardiovascular Research*, 2006. **69**(1): p. 36-45.
151. Leventis, PA and Grinstein, S, *The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes*. *Annual Review of Biophysics*, Vol 39, 2010. **39**: p. 407-427.
152. Chaurio, RA, Janko, C, Munoz, LE, Frey, B, Herrmann, M, and Gaipf, US, *Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation*. *Molecules*, 2009. **14**(12): p. 4892-4914.
153. Bochkov, VN, Oskolkova, OV, Birukov, KG, Levonen, AL, Binder, CJ, and Stockl, J, *Generation and biological activities of oxidized phospholipids*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010. **12**(8): p. 1009-1059.
154. Fruhwirth, GO, Loidl, A, and Hermetter, A, *Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007. **1772**(7): p. 718-736.
155. Lee, S, Birukov, KG, Romanoski, CE, Springstead, JR, Lusic, AJ, and Berliner, JA, *Role of Phospholipid Oxidation Products in Atherosclerosis*. *Circulation Research*, 2012. **111**(6): p. 778-799.
156. Cyrus, T, Pratico, D, Zhao, L, Witztum, JL, Rader, DJ, Rokach, J, FitzGerald, GA, and Funk, CD, *Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 2001. **103**(18): p. 2277-2282.
157. Podrez, EA, Byzova, TV, Febbraio, M, Salomon, RG, Ma, Y, Valiyaveetil, M, Poliakov, E, Sun, M, Finton, PJ, Curtis, BR, Chen, J, Zhang, R, Silverstein, RL, and Hazen, SL, *Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype*. *Nature Medicine*, 2007. **13**(9): p. 1086-1095.
158. Horkko, S, Bird, DA, Miller, E, Itabe, H, Leitinger, N, Subbanagounder, G, Berliner, JA, Friedman, P, Dennis, EA, Curtiss, LK, Palinski, W, and Witztum, JL, *Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins*. *Journal of Clinical Investigation*, 1999. **103**(1): p. 117-128.
159. Podrez, EA, Poliakov, E, Shen, ZZ, Zhang, RL, Deng, YJ, Sun, MJ, Finton, PJ, Shan, L, Febbraio, M, Hajjar, DP, Silverstein, RL, Hoff, HF, Salomon, RG, and Hazen, SL, *A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(41): p. 38517-38523.
160. Greenberg, ME, Sun, MJ, Zhang, RL, Febbraio, M, Silverstein, R, and Hazen, SL, *Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells*. *Journal of Experimental Medicine*, 2006. **203**(12): p. 2613-2625.
161. Greenberg, ME, Li, XM, Gugiu, BG, Gu, XD, Qin, J, Salomon, RG, and Hazen, SL, *The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(4): p. 2385-2396.
162. Gargalovic, PS, Imura, M, Zhang, B, Gharavi, NM, Clark, MJ, Pagnon, J, Yang, WP, He, AQ, Truong, A, Patel, S, Nelson, SF, Horvath, S, Berliner, JA, Kirchgessner, TG, and Lusic, AJ,

- Identification of inflammatory gene modules based on variations of human endothelial cell responses to oxidized lipids.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(34): p. 12741-12746.
163. Oskolkova, OV, Afonyushkin, T, Leitner, A, von Schlieffen, E, Gargalovic, PS, Lusis, AJ, Binder, BR, and Bochkov, VN, *ATF4-dependent transcription is a key mechanism in VEGF up-regulation by oxidized phospholipids: critical role of oxidized sn-2 residues in activation of unfolded protein response.* Blood, 2008. **112**(2): p. 330-339.
164. Tabas, I, *Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress.* Antioxidants & Redox Signaling, 2009. **11**(9): p. 2333-2339.
165. Dashti, M, Kulik, W, Hoek, F, Veerman, EC, Peppelenbosch, MP, and Rezaee, F, *A Phospholipidomic Analysis of All Defined Human Plasma Lipoproteins.* Scientific Reports, 2011. **1**.
166. Podrez, EA, Poliakov, E, Shen, ZZ, Zhang, RL, Deng, YJ, Sun, MJ, Finton, PJ, Shan, L, Gugiu, B, Fox, PL, Hoff, HF, Salomon, RG, and Hazen, SL, *Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(41): p. 38503-38516.
167. Subbanagounder, G, Leitinger, N, Schwenke, DC, Wong, JW, Lee, H, Rizza, C, Watson, AD, Faull, KF, Fogelman, AM, and Berliner, JA, *Determinants of bioactivity of oxidized phospholipids - Specific oxidized fatty acyl groups at the sn-2 position.* Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2000. **20**(10): p. 2248-2254.
168. Hoff, HF, O'Neil, J, Wu, ZP, Hoppe, G, and Salomon, RL, *Phospholipid hydroxyalkenals - Biological and chemical properties of specific oxidized lipids present in atherosclerotic lesions.* Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2003. **23**(2): p. 275-282.
169. Watson, AD, Leitinger, N, Navab, M, Faull, KF, Horkko, S, Witztum, JL, Palinski, W, Schwenke, D, Salomon, RG, Sha, W, Subbanagounder, G, Fogelman, AM, and Berliner, JA, *Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(21): p. 13597-13607.

