

JULIANA ASCENÇÃO DE SOUZA

**Heterogeneidade e mecanismos moleculares da
atividade anti-apoptótica das subfrações de HDL
em células endoteliais humanas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo e à *Maison des
Écoles Doctorales* da *Université Pierre & Marie
Curie – Paris VI* para obtenção dos títulos de
dupla nacionalidade de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Cardiologia

Orientadores:

Prof. Dr. Carlos Vicente Serrano Jr.

Dr. Anatol Kontush

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Juliana Ascensão de

Heterogeneidade e mecanismos moleculares da atividade anti-apoptótica das subfrações de HDL em células endoteliais humanas / Juliana Ascensão de Souza. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Carlos Vicente Serrano Júnior.

Co-orientador: Anatol Kontush.

Descritores: 1.Dislipidemias 2.Síndrome X metabólica 3.Lipoproteínas do colesterol HDL 4.Apolipoproteína A-I 5.Esfingosina 6.Apoptose 7.Células endoteliais

USP/FM/SBD-069/07

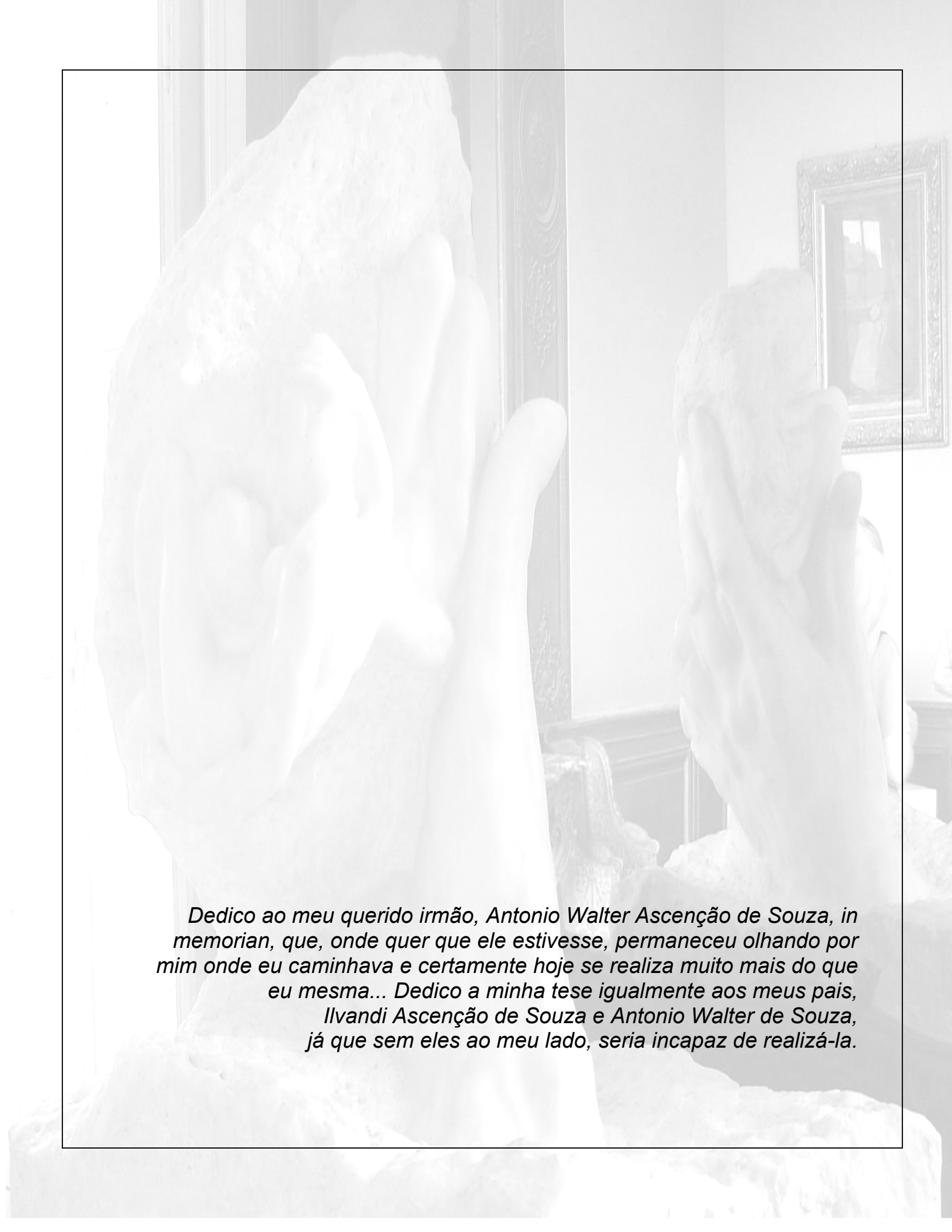
A verdadeira origem da descoberta consiste não em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.

Marcel Proust; (1871-1922)

Transformai as vossas vidas pela renovação das vossas mentes.

Romanos 12:12

Dedicatória



Dedico ao meu querido irmão, Antonio Walter Ascensão de Souza, in memoriam, que, onde quer que ele estivesse, permaneceu olhando por mim onde eu caminhava e certamente hoje se realiza muito mais do que eu mesma... Dedico a minha tese igualmente aos meus pais, Ilvandi Ascensão de Souza e Antonio Walter de Souza, já que sem eles ao meu lado, seria incapaz de realizá-la.

Agradecimientos



Agradeço aos meus pais, sempre presentes e lutando ao máximo para que estes e outros momentos de imensa felicidade acontecessem. Esta história começou com todas as alegrias e dificuldades após os nascimentos de meus irmãos e meu, percorrendo os árduos caminhos da nossa criação, ultrapassando perdas irreparáveis, apenas suportáveis, até o momento de poder compartilhar os louros da realização de um filho. Este momento é de vocês... Que construíram e recebem agora os raios dourados da vitória!



Agradeço a toda a minha família, e aqui represento com esta foto todos que torceram e vibraram com cada vitória; todos aqueles que sofreram cada dor da qual fui acometida; todos os que tentaram, de alguma forma, anular a saudade que nos preenche quando estamos longe; e aqueles que, por não poderem estar presentes, elevaram o pensamento em oração pelo nosso bem estar.

Agradeço aos meus queridos familiares, in memoriam, simplesmente por terem existido e cumprido suas missões.

Se eu nomeio aqui todos meus queridos amigos, seria capaz de ser injusta com alguém, mas permitam-me aqui oferecer um especialíssimo obrigada à Claudine Simões Carrilho, por ser a irmã que meu irmão me deixou!

Agradeço ao Professor Dr. Carlos Vicente Serrano Jr. por ter confiado no meu potencial e aceito, quando eu ainda estava no primeiro ano de Residência Médica em São Paulo, meu pedido para trabalhar com ele em suas pesquisas... Foi com quem pude vislumbrar a possibilidade de realizar o sonho de ser pesquisadora em cardiologia em nosso país. Aprendi não somente sobre pesquisa, mas também sobre assistência aos pacientes, e pude dividir com ele a simpatia de todos aqueles que ele cuidava... Agradeço por ter me apresentado ao mundo, no sentido mais completo da palavra, pois sem seu empenho e dedicação à minha formação não teria saído do Brasil e conhecido os mais belos patrimônios do Homem. Obrigada Dr. Carlos por ter deixado nascer esta amizade que, espero, será eterna.

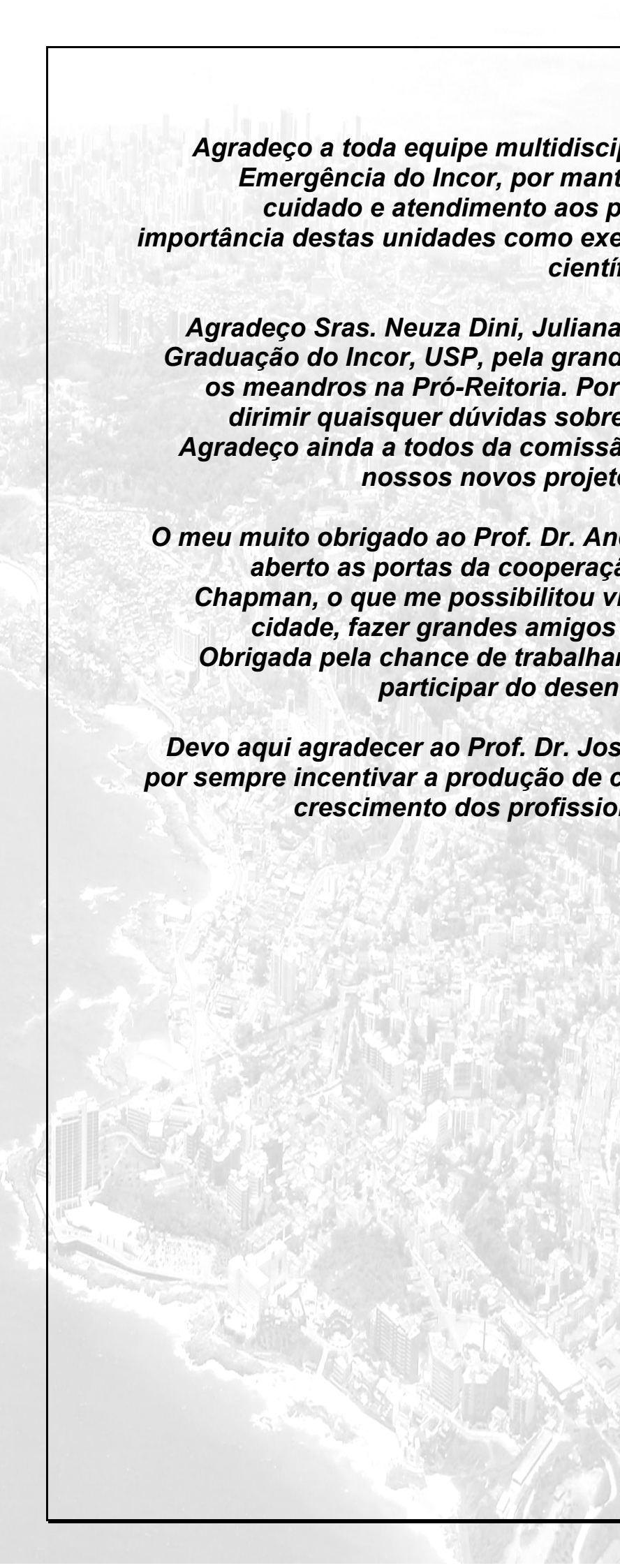
Agradeço ao Professor Dr. José Carlos Nicolau por ser um exemplo de dedicação ao trabalho, de ética em pesquisa e de ensino da Cardiologia. Por todas as oportunidades a mim conferidas, pela confiança depositada como médica assistente da Unidade de Clínica de Coronariopatia Aguda.

Agradeço aos Médicos Assistentes da UCCA, Professor Dr. Roberto Kalil Filho, Dr. Roberto Rocha Giraldez e Dr. Luciano Moreira Baracioli, pelo convívio e possibilidade de dividir um trabalho por muitos almejado. Com vocês aprendi os aspectos mais difíceis da prática do tratamento das síndromes coronárias agudas.

Gostaria de agradecer a todos os plantonistas, pós-graduandos e estagiários da UCCA, por estarem sempre presentes quando mais precisamos.

Agradeço à minha amiga Maria Auxiliadora Ferraz, pelos momentos mais agradáveis no trabalho e fora dele. Por todas as conversas, discussões e conselhos... Por ser uma pessoa experiente e espirituosa, que tem a palavra certa na hora certa. Por mostrar que podemos fazer maravilhosos amigos no trabalho e mantê-los fora dele. Por ter cuidado dos meus em minha ausência e pela honra de tê-la como diretora da nossa corporação particular.

Agradeço às meninas da UCCA, que sempre vão morar no meu coração, Helenice, Claudinha e Alexandra, pela dedicação e alegria diárias. Pelos cafés, capuchinos e bolachinhas, além da presteza em nos ajudar na assistência aos pacientes.

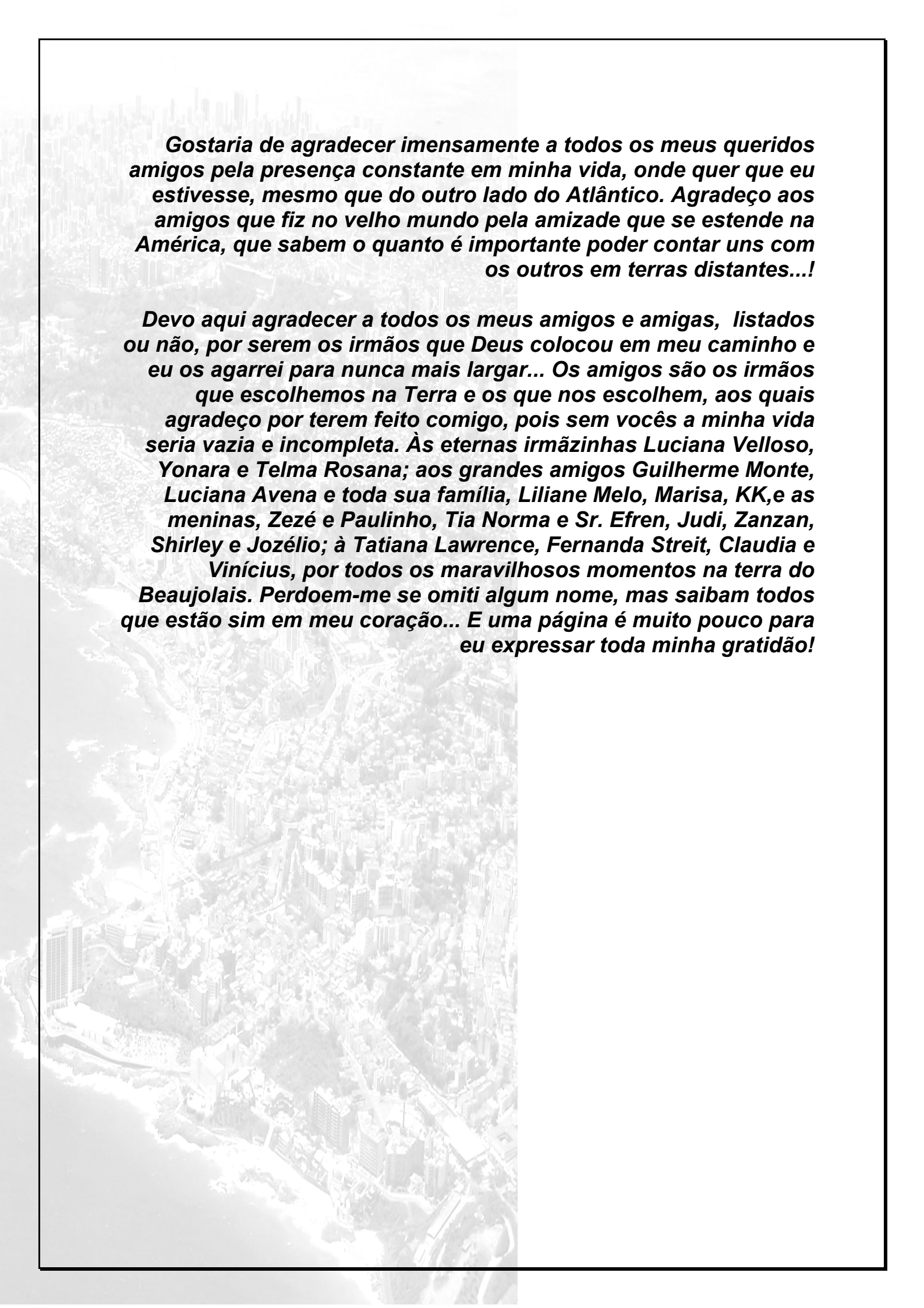


Agradeço a toda equipe multidisciplinar da UCCA e Unidade de Emergência do Incor, por manter a ordem e a excelência no cuidado e atendimento aos pacientes, além de entender a importância destas unidades como executoras do desenvolvimento científico da cardiologia brasileira.

Agradeço Sras. Neuza Dini, Juliana e Eva, da Secretaria de Pós-Graduação do Incor, USP, pela grande ajuda para percorrer todos os meandros na Pró-Reitoria. Por estarem sempre dispostas a dirimir quaisquer dúvidas sobre as regras do doutoramento. Agradeço ainda a todos da comissão científica que tornam reais nossos novos projetos de investigação científica.

O meu muito obrigado ao Prof. Dr. Andrei Carvalho Sposito por ter aberto as portas da cooperação com o laboratório do Prof. Chapman, o que me possibilitou viver e trabalhar em uma linda cidade, fazer grandes amigos e crescer profissionalmente. Obrigada pela chance de trabalhar em seu grupo no Incor DF e participar do desenvolvimento desta Instituição.

Devo aqui agradecer ao Prof. Dr. José Antonio Franchini Ramires por sempre incentivar a produção de conhecimento e possibilitar o crescimento dos profissionais do Instituto do Coração.

An aerial photograph of a coastal city, likely Rio de Janeiro, showing a dense urban area with many buildings and a prominent coastline with a large bay. The image is faded and serves as a background for the text.

Gostaria de agradecer imensamente a todos os meus queridos amigos pela presença constante em minha vida, onde quer que eu estivesse, mesmo que do outro lado do Atlântico. Agradeço aos amigos que fiz no velho mundo pela amizade que se estende na América, que sabem o quanto é importante poder contar uns com os outros em terras distantes...!

Devo aqui agradecer a todos os meus amigos e amigas, listados ou não, por serem os irmãos que Deus colocou em meu caminho e eu os agarrei para nunca mais largar... Os amigos são os irmãos que escolhemos na Terra e os que nos escolhem, aos quais agradeço por terem feito comigo, pois sem vocês a minha vida seria vazia e incompleta. Às eternas irmãzinhas Luciana Velloso, Yonara e Telma Rosana; aos grandes amigos Guilherme Monte, Luciana Avena e toda sua família, Liliane Melo, Marisa, KK, e as meninas, Zezé e Paulinho, Tia Norma e Sr. Efren, Judi, Zanzan, Shirley e Jozélio; à Tatiana Lawrence, Fernanda Streit, Claudia e Vinícius, por todos os maravilhosos momentos na terra do Beaujolais. Perdoem-me se omiti algum nome, mas saibam todos que estão sim em meu coração... E uma página é muito pouco para eu expressar toda minha gratidão!



I would like to thank you, Dr. M. John Chapman, for having been a father in France, for having accept me in your Laboratory INSERM 551 Unit and for having allowed me to learn how to lead, direct and think as a real scientist leader !

Доктора Анатолия Контуша (Dr. Anatol Kontush), Исследователя в полном смысле слова, работающего с дисциплиной, восторженно и терпеливо, За мудрость, никогда Вами не считаему достаточной, поскольку Вы не удовлетворяетесь приобретёнными знаниями, За рациональность исследователя и чувствительность писателя.

Mlle. Sandrine Chantepie pour avoir été mon amie en France, pour partager avec moi les manips victorieuses ou pas; pour avoir partagée les nouvelles du labo, de sa vie et de ma vie... pour avoir été correct et douce; pour avoir rigolé de mon français et pour avoir corrigé les mots que je pensais être français... Enfin, merci pour tout et pour avoir été toujours à mes côtés !...

Mes collègues Hala Husen, Boris Hansel, Fabio Soeiro et Florence, pour avoir partagé les bons moments de travail et de discussion sur les mystères de la science.

Je voudrais remercier le Professeur M. J. Chambaz et Mme Esther Croce, de l'École de Doctorat de L'Université Pierre et Marie Curie - Paris VI – et Mme Sandrine le Moigne et Mme. Sandrine le Moigne de la Service des Relations Internationales Université Pierre et Marie Curie, pour l'aide pendant mon séjour en France.



Je vous remercie, Prof. Anne Nègre-Salvayre et Prof. Robert Salvayre, pour m'avoir appris les techniques d'analyse de biologie cellulaire et d'apoptose; mais surtout pour la gentillesse avec laquelle vous et vous collègues du Laboratoire INSERM U. 466, m'aviez reçus à Toulouse, en France, très connue comme la ville rose.

Normalização:

Esta tese está de acordo com:

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

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

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

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	
Lista de figuras	
Lista de tabelas e quadros	
Resumo	
Summary	
Résumé	
1 INTRODUÇÃO	1
A Fisiopatologia da doença aterosclerótica	4
B Apoptose na doença aterosclerótica	6
C Atividades anti-aterogênicas da HDL	10
C.1 Atividade anti-apoptótica da HDL	10
D Heterogeneidade das sHDL	12
D.1 Heterogeneidade físico-química	13
D.1.1 Composição em apolipoproteína	13
D.1.2 Densidade e tamanho da partícula	14
D.2 Heterogeneidade funcional das sHDL	15
E Fatores associados à perda da atividade anti-aterogênica da HDL	16
2 HIPÓTESES DO ESTUDO	19
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
A Reagentes e produtos químicos	24
B População do estudo	25
B.1 Indivíduos normolipidêmicos	25
B.2 Pacientes com SMet	26
C Amostras sanguíneas	27
D Isolamento da LDL	28
E Oxidação da LDL	29
F Isolamento das sHDL	30
F.1 Método de obtenção do gradiente de densidade	30
F.2 Ultracentrifugação	32
F.3 Recuperação das diferentes subfrações de lipoproteína	32
F.4 Diálise das subfrações HDL isoladas	33
G Análise química dos lipídeos das lipoproteínas	34
H Atividade antioxidante das sHDL	34
I Cultura de células endoteliais	37
J Análise da atividade protetora das sHDL contra toxicidade mitocondrial induzida pela LDLox	37
K Análise da heterogeneidade da atividade protetora das sHDL contra apoptose induzida pela LDLox	38
K.1 Caracterização de apoptose através da microscopia de fluorescência	38

K.2 Caracterização da apoptose pela citometria de fluxo com marcagem com anexina V	39
K.3 Determinação da inibição pelas sHDL da cascata intracelular de indução da apoptose	40
K.3.1 Determinação do citocromo c (cyt c), fator indutor de apoptose (AIF) citosólicos e da degradação de Bid	40
K.3.2 Determinação da atividade da caspase-3	41
K.3.3 Determinação de fragmentação do ADN	41
L Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)	42
M Estudo do mecanismo envolvido na heterogeneidade da atividade anti-apoptótica das sHDL	43
M.1 Caracterização do conteúdo de E1F nas sHDL	43
M.2 Caracterização da atividade anti-apoptótica da E1F	44
M.2.1 Atividade anti-apoptótica da E1F utilizando albumina como carreadora	44
M.2.2 Atividade anti-apoptótica da E1F utilizando sHDL como carreadoras	44
M.3 Receptor scavenger-BI e a atividade protetora das sHDL contra a toxicidade mitocondrial induzida pela LDLox	46
N Análise Estatística	46
5 RESULTADOS	47
A Caracterização da composição química das sHDL	48
B Atividade protetora das sHDL contra a toxicidade mitocondrial induzida pela LDLox	51
C Atividade protetora das sHDL contra a apoptose induzida pela LDLox	56
D Subtrações pequenas e densas da HDL são potentes inibidoras da ativação da cascata intracelular de apoptose induzida pela LDLox em células endoteliais humanas	59
D.1 Liberação intracitoplasmática do cit c e do AIF	59
D.2 Degradação de Bid	60
D.3 Ativação da cascata caspase	60
D4 Fragmentação do ADN	61
E Efeito inibitório das sHDL na geração de ROS induzida pela LDLox	64
F Mecanismos moleculares envolvidos na heterogeneidade da atividade anti-apoptótica das sHDL	66
F.1 Conteúdo de E1F nas sHDL	66
F.2 Atividade anti-apoptótica da E1F	67
F.2.1 Atividade anti-apoptótica da E1F em concentrações fisiológicas carreada pela albumina	67
F.2.2 Atividade anti-apoptótica da E1F em concentrações fisiológicas utilizando-se sHDL como carreadoras	67
F.3 Papel do receptor scavenger SR-BI	73

G Atividade anti-apoptótica e antioxidante intracelular das sHDL isoladas de pacientes com SMet	75
G.1 Características clínicas da população do estudo	75
G.2 Composição química e atividade antioxidante das sHDL de pacientes com SMet comparados aos controles normolipidêmicos	76
G.3 Atividades antioxidante das sHDL3b e HDL3c de pacientes com SMet comparados aos controles normolipidêmicos	78
G.4 Atividade anti-apoptótica das subfrações pequenas e densas HDL3em pacientes com SMet comparados a indivíduos normolipidêmicos	82
G.5 Atividade antioxidante iuntracelular das subfrações pequenas e densas HDL3 em pacientes com SMet comparados a indivíduos normolipidêmicos	85
6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÕES	98
8 ANEXO	101
9 REFERÊNCIAS	103

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

A	absorbância
ΔA	diferença de absorbância
AAPH	2,2'-azobis-(2-amidinopropano/hidroclorido)
Ac-DEVD-AMC	substrato fluorescente da enzima caspase-3
ADN	ácido desoxirribonucléico
ApoB-100	apolipoproteínaB-100
ApoA-I	apolipoproteínaA-I
ApoA-II	apolipoproteínaA-II
ATP III	Painel de tratamento de adultos III
Bcl-2	proto-oncogene do linfoma de linfócitos B
CT	colesterol total
CL	colesterol livre
Cu^{+2}	cobre
DAC	doença arterial coronária
DCV	doença cardiovascular
DHL	lactato desidrogenase
DM	diabetes mellitus
DM tipo 2	diabetes mellitus tipo 2
E1F	Esfingosina 1-Fosfato
EC	éster de colesterol
eNOS	óxido nítrico sintase
Fas	receptor ativador de morte celular por apoptose
H ₂ DCFDA	diacetato 2',7'-diclorofluoresceína
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDL-C	lipoproteína de alta densidade-colesterol
HDLr	HDL reconstituído
sHDL	subfrações de HDL
HMEC-1	célula endotelial microvascular humana-1

HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
IM	infarto do miocárdio
IP	iodeto de propidium
K ₃ EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
KBr	Brometo de potássio
LCAT	lecitil-acil colesterol transferase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	lipoproteína de baixa densidade-colesterol
LDLox	LDL oxidado
Lp AI	lipoproteínaA-I
Lp A-I:A-II	lipoproteína A-I:A-II
MCP-1	molécula quimiotóxica de monócitos
MTT	brometo 3-(4,5-dimetil-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
<i>NCEP</i>	Programa Nacional de Educação sobre Colesterol
NO	óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PON	paroxonase
PT	proteína total
REM	mobilidade eletroforética relativa
SYTO-13	corante nuclear verde fluorescente
SMet	Síndrome Metabólica
SR-BI	receptor <i>scavenger</i> -B tipo I
TBARS	substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas
TG	triglicérides
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TRC	transporte reverso do colesterol
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
<i>g</i>	gravidade
g	grama
mg	miligrama
μ g	micrograma

L	litro
dl	decilitro
ml	mililitro
μ l	microlitro
nm	nanômetro
M	molar
mM	milimolar
μ M	micromolar
%	porcentagem

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1.1 - Efeitos anti-aterogênicos da HDL	5
Figura 1.2 - Mecanismos de indução da apoptose pela LDLox na patogênese da aterosclerose	9
Figura 1.3 - Caracterização das partículas de HDL segundo seu conteúdo em apolipoproteína, densidade e tamanho	12

MÉTODOS

Figura 4.1 - Curva de oxidação do LDL em presença de APPH	36
---	----

RESULTADOS

Figura 5.1 - Efeito inibitório das sHDL da toxicidade mitocondrial induzida pela LDLox	54
Figura 5.2 - Efeito protetor das sHDL contra a toxicidade mitocondrial (MTT) induzida pela LDLox com base na mesma concentração de proteína (A), mesma massa molecular (B) e mesmo número de partículas (C)	55
Figura 5.3 - Atividade anti-apoptótica das sHDL isoladas de indivíduos normolipidêmicos	57
Figura 5.4 - Atividade anti-apoptótica das sHDL isoladas de voluntários normolipidêmicos (n=5) determinada pela marcação com anexina V	58
Figura 5.5 - Efeito inibitório das subtrações HDL2b e HDL 3c na liberação de cit c (A) e AIF (B) e na degradação de Bid (C) no citoplasma de células endoteliais induzidas pela LDLox	62
Figura 5.6 - Efeito inibitório das sHDL na geração de ROS induzida pela LDLox	63
Figura 5.7 - Inibição pelas sHDL da geração de ROS induzida pelo LDLox	65
Figura 5.8 - Conteúdo em E1F das sHDL (n=5; A) e correlação entre o conteúdo em E1F e a atividade protetora das sHDL contra a apoptose (B) e a geração de ROS (C) induzidas pela LDLox	69
Figura 5.9 - Atividade anti-apoptótica da E1F em concentrações fisiológicas utilizando-se albumina como carreador	70
Figura 5.10 - Conteúdo em E1F (A), atividade anti-apoptótica (B) e correlação com conteúdo de E1F e atividade anti-apoptótica (C) das sHDL enriquecidas com E1F	71-72

Figura 5.11 - Efeito da inibição do receptor SR-BI na atividade protetora da subfração HDL2c	74
Figura 5.12 - Conteúdo em apoA-I das sHDL em pacientes com SMet	81
Figura 5.13 - Atividade anti-apoptótica das sHDL isoladas de pacientes com SMet (n=5) comparada a de indivíduos normolipidêmicos (n=5)	84
Figura 5.14 - Atividade antioxidante intracelular das sHDL em pacientes com SMet (n=10) comparada a de indivíduos normolipidêmicos (n=5)	6
Figura 5.15 - Correlação entre a inibição da geração de ROS (% proteção) e a atividade anti-apoptótica (anexina V; % proteção) das sHDL isoladas de todos os indivíduos estudados	87
DISCUSSÃO	
Figura 6.1 - Mecanismos envolvidos na atividade anti-apoptótica das subfrações pequenas e densas HDL3	96
Figura 6.2 - Mecanismo de disfunção das subfrações pequenas e densas HDL3 na SMet	97

LISTA DE TABELAS E QUADROS

MÉTODOS

Quadro 4.1 - Ajuste da densidade do soro	31
--	----

RESULTADOS

Tabela 5.1 - Massa total e respectiva composição química das sHDL isoladas de indivíduos normolipidêmicos (n=7)	50
Quadro 5.1 - Cálculo do número de partículas de HDL tomando-se por base a quantidade massa total e quantidade de proteína	51
Tabela 5.2 - Caracterização clínica da população do estudo	79
Tabela 5.3 - Concentração plasmática e composição química das sHDL conforme população estudada	80
Tabela 5.4 - Atividade antioxidante das subfrações HDL3b e 3c na população estudada	82

Resumo

Souza JA. *Heterogeneidade e mecanismos moleculares da atividade anti-apoptótica das subfrações da lipoproteína de alta densidade (HDL) em células endoteliais humanas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo e Paris VI: Universidade Pierre et Marie Currie; 2007. 117 p.

Introdução: A lipoproteína de baixa densidade (LDL) e suas formas oxidadas (LDLox) possuem múltiplas propriedades aterogênicas, atuando na deposição de colesterol, indução e manutenção da inflamação, disfunção endotelial, surgimento de células espumosas na parede arterial e conseqüente formação da placa de ateroma. Adicionalmente, LDLox induz apoptose de células endoteliais humanas (HMEC). A lipoproteína de alta densidade (HDL) possui inúmeras atividades anti-aterogênicas, incluindo ações antioxidante, anti-inflamatória e anti-trombótica. A HDL é capaz de proteger as HMEC contra apoptose. As subfrações de HDL (sHDL) são heterogêneas em sua composição físico-química e atividades biológicas. A atividade antioxidante das sHDL aumenta com a densidade (HDL2b<HDL2a<HDL3a<HDL3b <HDL3c) e está deficiente em pacientes com SMet. Contudo, a heterogeneidade da atividade anti-apoptótica das sHDL é ainda desconhecida. **Objetivos:** (i) avaliar a heterogeneidade da atividade protetora das sHDL de indivíduos normolipidêmicos (n=7) e de pacientes com SMet (n=16) contra apoptose de HMEC induzida por LDLox; (ii) definir os mecanismos moleculares envolvidos nesta atividade. **Métodos:** Através de ultracentrifugação por gradiente de densidade, isolamos cinco diferentes sHDL. HMEC foram incubadas com LDLox (200 µg apoB/ml) na presença ou não das sHDL (5-100 µg proteína/ml). Os marcadores de toxicidade (MTT) e de apoptose celular (microscopia de fluorescência, marcagem com anexina V, cit c, AIF, degradação Bid, atividade caspase-3 e fragmentação do ADN) foram analisados. **Resultados:** Todas sHDL protegeram as HMEC contra a toxicidade e apoptose induzidas pela LDLox. Com mesma concentração de proteína, as subfrações HDL3c (60% proteção - MTT - e >100% - anexina V) e 3b (43% e 67%, respectivamente) de indivíduos normolipidêmicos apresentaram atividade anti-apoptótica mais potente do que as subfrações HDL2a (29% e 28%; p<0,01 vs. HDL3c, respectivamente) e 2b (25% e 62%; p<0,001 vs. HDL3c, respectivamente). Todas sHDL reduziram geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida pela LDLox, sendo a HDL3c (54%) mais potente do que HDL2b (21%; p<0.05 vs. HDL3c). Houve correlação positiva entre as atividades anti-apoptótica e antioxidante intracelular com conteúdo de apoA-I e esfingosina 1-fosfato (E1F) das sHDL, sendo HDL3b e 3c ricas em E1F. A atividade anti-apoptótica da E1F e das sHDL parece depender da interação com as células endoteliais via apoA-I e seu receptor SR-BI. Finalmente, as HDL3c (n=5) isoladas de pacientes com SMet possuem conteúdo significativamente menor de apoA-I e reduzida atividade anti-apoptótica (60%, p<0,01), quando comparada aos controles normolipidêmicos (n=5). Houve tendência à diminuição da proteção contra a geração de ROS (SMet, n=10). **Conclusão:** As subfrações HDL3c protegem de forma potente as células endoteliais humanas contra toxicidade e apoptose induzidas pela LDLox, assim como contra geração de ROS. Esta atividade anti-apoptótica está reduzida na SMet.

Descritores: aterosclerose, dislipidemia, síndrome metabólica, LDL oxidado, subfrações de HDL, apolipoproteína A-I, apoptose, endotélio

Summary

Souza JA. *Heterogeneity and molecular mechanisms of anti-apoptotic activity of high-density lipoprotein (HDL) subfractions on endothelial cells*. Doctoral Fellowship in Science and Cardiology from São Paulo University and Pierre & Marie Curie University - Paris VI University. 2007. 117 p.

Background: Low density lipoprotein (LDL) and its oxidized forms (oxLDL) have several atherogenic properties, including cholesterol deposition, inflammation, endothelial dysfunction and foam cell formation on the arterial wall, leading to atherosclerotic plaque development. In addition, oxLDL induces human endothelial cell apoptosis (HMEC). High-density lipoprotein (HDL) has number of anti-atherogenic activities, as antioxidative, anti-inflammatory and anti-thrombotic actions. HDL displays anti-apoptotic activity and is able to protect endothelial cells against oxLDL-induced apoptosis. HDL subfractions (sHDL) are highly heterogeneous in their physical and chemical composition and biological functions. Antioxidative activity of HDL subfractions increases with increment in density, HDL2b<HDL2a<HDL3a<HDL3b <HDL3c. Important, HDL subfractions from subjects with metabolic syndrome (MetS), display a significantly lower antioxidative activity as compared to healthy controls. However, the heterogeneity of their anti-apoptotic activity was not demonstrated. **Objectives:** (i) to evaluate the heterogeneity of anti-apoptotic activity of sHDL from normolipidemic controls (n=7) and MetS patients (n=16) towards oxLDL-induced apoptosis of HMEC; (ii) to define molecular mechanisms involved in this anti-apoptotic action. **Methods:** Five major sHDL were fractionated by density gradient ultracentrifugation. HMEC were incubated with mildly oxLDL (200 µg apoB/ml) in the presence or absence of each sHDL (5-100 µg protein/ml). Markers of cellular toxicity (MTT) and apoptosis (fluorescent nucleic acid staining, annexin V binding, cytochrome c, AIF and Bid, caspase-3 activity and DNA fragmentation) were observed. **Results:** All HDL subfractions isolated from normolipidemic subjects protected HMEC against oxLDL-induced toxicity and apoptosis. At equal protein concentrations, HDL3c (60% protection in the MTT test; >100% in annexin V binding) and 3b subfractions (43% and 67%, respectively) were more potent against oxLDL-induced toxicity and apoptosis as compared to HDL2a (29% and 28%; p<0.01 vs. HDL3c, respectively) and 2b subfractions (25% and 62%; p<0.001 vs. HDL3c, respectively). All HDL subfractions attenuated of reactive oxygen species (ROS) generation in HMEC induced by oxLDL. Again, HDL3c (54% inhibition) were more potent as compared to HDL2b (21%; p<0.05 vs. HDL3c). The anti-apoptotic and intracellular antioxidative activities of HDL3 were positively correlated with apoA-I and sphingosine 1-phosphate (S1P) content of sHDL and, possibly, depend on their cellular interaction through apoA-I and its SR-BI receptor. The sHDL3c isolated from MetS patients (n=5) possess reduced content of apoA-I and less potent anti-apoptotic activity (-60%, p<0.01) than controls (n=5). **Conclusion:** Normolipidemic small dense HDL3 provide potent protection of human endothelial cells from oxLDL-induced apoptosis; this anti-apoptotic activity is reduced in the MetS.

Keywords: dislipidemia, metabolic syndrome, oxidised LDL, HDL subfractions, apolipoproteinA-I, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and endothelial cell.

Résumé

Souza JA. Hétérogénéité et mécanismes moléculaires de l'activité anti-apoptotique des sous fractions HDL sur les cellules endothéliales. Thèse de Doctorat em Sciences & Cardiologie de l'Université de São Paulo e de l'Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. 2007. 117 p.

Introduction: Les lipoprotéines de basse densité (LDL) et leurs formes oxydées (oxLDL) possèdent de nombreuses propriétés athérogènes. En effet, ces lipoprotéines sont capables d'induire le dépôt de cholestérol, l'inflammation, la dysfonction des cellules endothéliales et la formation des cellules spumeuses dans la paroi artérielle, permettant ainsi le développement de la plaque d'athérome. De plus, les LDLox induisent l'apoptose des cellules endothéliales (HMEC). A contrario, les lipoprotéines de haute densité (HDL) montrent de multiples activités anti-athérogènes : anti-oxydatives, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et anti-apoptotique. Elles sont capables de protéger les cellules endothéliales de l'apoptose induite par les LDLox. Les sous fractions d'HDL (sHDL) sont très hétérogènes autant dans leur composition physico-chimique que dans leurs fonctions biologiques. L'activité anti-oxydative des sous fractions HDL augmente avec leur densité, HDL2b<HDL2a<HDL3a<HDL3b<HDL3c. En addition, les sHDL de patients présentant un syndrome métabolique (SMet) montrent une diminution significative de leur activité anti-oxydative en comparaison à celles de sujets normolipidémiques. Cependant, l'hétérogénéité de leur activité anti-apoptotique reste à démontrer.

Objectifs: (i) Evaluer l'hétérogénéité de l'activité anti-apoptotique des sous fractions d'HDL de sujets normolipidémiques (n=7) et de sujets SMet (n=16), contre l'apoptose de cellules HMEC induite par des LDLox ; (ii) Définir les mécanismes moléculaires impliqués dans cette activité anti-apoptotique. **Méthodes:** Cinq sHDL sont obtenues par ultracentrifugation en gradient de densité. Les HMEC sont incubées avec des LDLox (200µg apoB/ml) en présence ou non chacune des sHDL (5-100µg protéine/ml). Les marqueurs de toxicité cellulaire et d'apoptose sont mesurés. **Résultats:** Toutes les sHDL des sujets normolipidémiques protègent les cellules HMEC de la toxicité et de l'apoptose induites par les LDLox. A même concentration protéique, les sHDL3c (60% de protection dans le test MTT, >100% de protection dans le test annexin V binding) et 3b (43% et 67%, respectivement) sont plus protectrices que les HDL2a (29% et 28% ; p<0.01 vs. HDL3c, respectivement) et 2b (25%, 62%, p<0.001 vs. HDL3c, respectivement). Toutes les sHDL diminuent la formation d'espèces réactives d'oxygène (ROS) dans les HMEC induite par les LDLox ; de même, la sHDL3c (54% d'inhibition) est plus active que la sHDL2b (21% ; p<0.05 vs. HDL3c). L'activité anti-apoptotique et l'activité anti-oxydative intracellulaire sont positivement corrélées au contenu en apoA-I et en sphingosine 1-phosphate (S1P) des sHDL et pourraient dépendre de l'interaction entre l'apo A-I des HDL et le récepteur SR-B1 à la membrane des cellules. Les sHDL3c isolées de sujets présentant un SMet (n=5) ont un taux diminué en apo A-I et présentent une diminution d'activité anti-apoptotique (-60%, p<0.01) par rapport aux sujets normolipidémiques (n=5). **Conclusion:** Les sHDL3, petites et denses, de sujets normolipidémiques montrent une protection efficace contre l'apoptose des HMEC induite par les LDLox ; cette activité est diminuée chez les sujets avec SMet.

Mots clés : dyslipidémie, syndrome métabolique, LDL oxydées, sous fractions d'HDL, apolipoprotéine A-I, sphingosine 1-phosphate, apoptose, cellule endothéliale.

1 Introdução

A importância deste estudo sobre a fisiopatologia da doença aterosclerótica se justifica por esta ser a principal causa de óbito não traumática no mundo¹. Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) têm relatado aproximadamente 7,2 milhões de mortes causadas por doença arterial coronária (DAC; 13% de todas as mortes) no mundo. Além disso, doença cardiovascular (DCV) está associada a importante morbidade nos adultos jovens.

Variações nas taxas de mortalidade por tipo de doença ocorrem entre diferentes populações, devido à presença de diferentes fatores de risco para DCV. No Brasil, a DCV é a principal causa de morte desde a década de 60, principalmente nas cidades das regiões Sul e Sudeste².

A aterosclerose envolve inúmeras formas de apresentação clínica, por acometer vasos arteriais de médios e grandes calibres dos vários órgãos. As artérias coronárias são sítios freqüentes de instalação da aterosclerose, caracterizada por placas de ateroma ricas em lipídios, células inflamatórias e colágeno, com ou sem trombos em seu interior. Essas placas podem levar a obstrução total ou parcial do vaso, causando alteração do fluxo sanguíneo miocárdico¹.

A doença aterosclerótica possui como fatores de risco hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo, obesidade visceral e dislipidemias aterogênicas, caracterizadas por elevados níveis plasmáticos de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e/ou triglicérides (TG), e reduzidos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL-C). A adoção do estilo de vida ocidental, incluindo dietas altamente calóricas e vida sedentária, tem sido responsável pelo aumento na incidência mundial de síndrome metabólica (SMet) e diabetes melito tipo 2 (DM tipo 2)³.

Embora a causa precisa da aterosclerose ainda não esteja estabelecida, a principal hipótese é de que a aterosclerose envolve múltiplos mecanismos fisiopatológicos, especialmente a entrada e retenção de lipoproteína e suas formas oxidadas (LDL e LDL oxidado) na parede do vaso. Este evento leva à lesão e disfunção endotelial, estimulando o desencadeamento de respostas inflamatória e imunológica prolongadas, o que parece exercer papel fundamental na progressão da doença aterosclerótica, assim como sua instabilização^{4,5}. A presença de elevados níveis plasmáticos de LDL-C (>160 mg/dl) é considerada como principal fator de risco para aterosclerose prematura^{1,6-10}.

A. FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA ATEROSCLERÓTICA

A hipótese atual que tenta explicar o passo inicial da aterogênese é a da disfunção endotelial⁵. Possíveis causas de distúrbio na função do endotélio, que eventualmente participam na aterogênese, são a elevação dos níveis plasmáticos de LDL-C e a produção de LDL oxidado (LDLox)¹¹, presença de radicais livres produzidos por cigarro, HAS¹² e diabetes, e infecção por *Chlamydia pneumoniae*¹³.

A LDL exerce seu papel no desenvolvimento da aterosclerose, com a deposição de colesterol (CT) na parede arterial, levando à formação da placa aterosclerótica (Figura 1.1). Este processo está intimamente associado à indução do estresse oxidativo das células da parede arterial, incluindo células endoteliais, musculares lisas e macrófagos¹⁴⁻¹⁶. A LDL, após difusão para a íntima arterial, torna-se oxidado, sendo capaz de induzir ativação das células da parede arterial. Assim, a LDLox induz: (i) ativação das células endoteliais, com conseqüente expressão de moléculas de adesão em sua superfície; (ii) recrutamento e adesão dos monócitos, e sua diferenciação em macrófagos na íntima arterial; (iii) formação das células espumosas¹⁷; (iv) apoptose de células endoteliais^{18,19}.

Entre os fatores que influenciam criticamente o processo de aterogênese, a presença de baixos níveis de HDL-C é largamente reconhecido^{1,20}. Os principais mecanismos responsáveis pelos efeitos

cardioprotetores da HDL são: (i) realizar o transporte reverso de CT a partir da parede arterial^{21,22}; (ii) proteger a LDL contra o estresse oxidativo²³⁻²⁸; (iii) possuir ações anti-inflamatórias^{29,30}; (iv) e atividade anti-trombótica³¹⁻³³ (Figura 1.1).

Recentes estudos demonstraram que a HDL também é capaz de proteger as células da parede arterial, sobretudo as células endoteliais, contra a apoptose induzida pela LDLox^{34,35}. Contudo, a contribuição exata dos mecanismos na atividade anti-aterogênica da HDL ainda necessitam melhor elucidação.

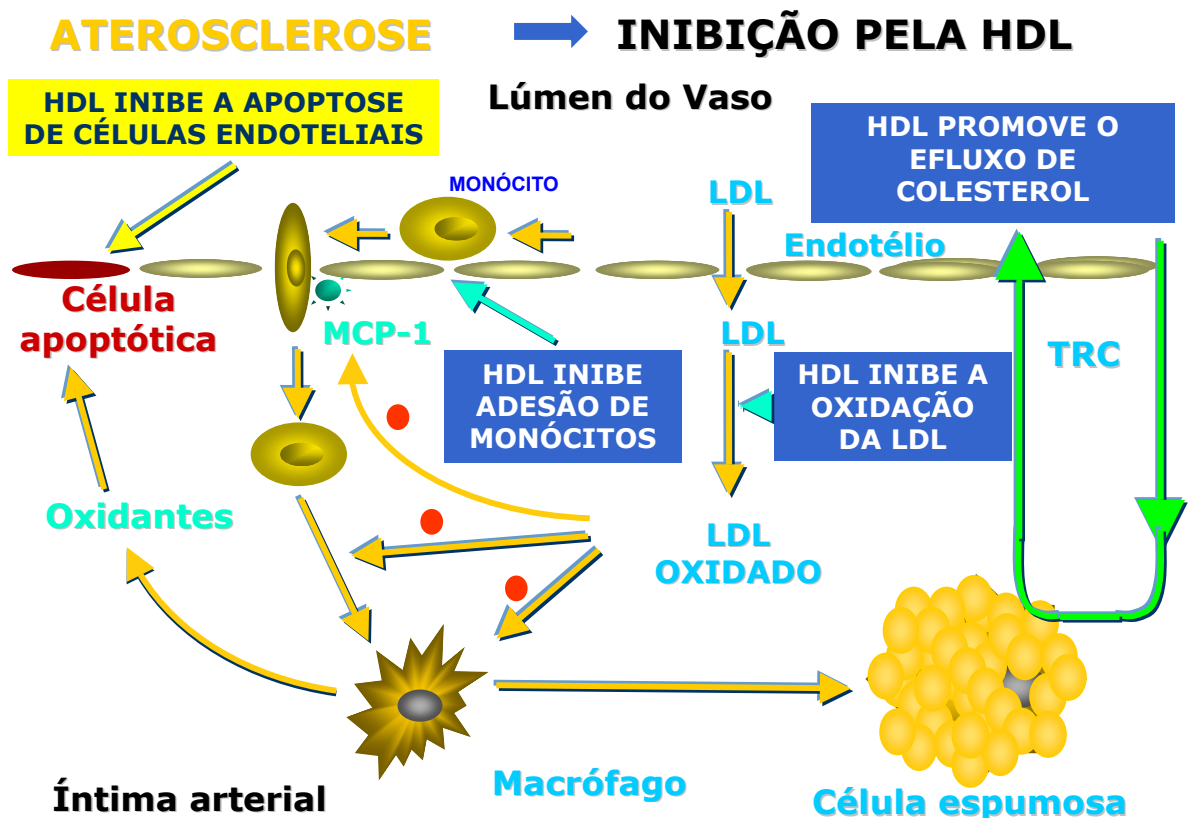


Figura 1.1 – Efeitos anti-aterogênicos da HDL^{17,34}
 HDL, lipoproteína de alta densidade, MCP-1, proteína quimiotática de monócitos; TRC, transporte reverso de colesterol.
 Por *Barter PJ*¹⁷ modificado.

B. APOPTOSE NA DOENÇA ATEROSCLERÓTICA

Conhecida como morte celular programada ou “suicídio” celular, a apoptose deve ser considerada como um mecanismo de controle da proliferação celular. O desequilíbrio no desencadeamento da apoptose está implicado no desenvolvimento de várias patologias. Mais recentemente, estudos vêm demonstrando que a morte celular apoptótica tem papel importante em DCV, como aterosclerose, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca^{36,37}.

A apoptose é caracterizada morfológicamente por condensação da cromatina, com deslocamento para a periferia da célula (imagem de meia-lua), com posterior alteração do cito-esqueleto e membrana celular, fragmentação do ácido desoxirribonucléico (ADN), condensação citoplasmática e formação de corpos apoptóticos.

As células apoptóticas podem ser identificadas: (i) morfológicamente, através da microscopia comum ou de fluorescência, com utilização de marcadores fluorescentes de viabilidade celular, como Syto13 e iodeto de propídio (IP); (ii) funcionalmente, através do brometo 3-(4,5-dimetil-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), o qual mede a atividade da desidrogenase mitocondrial, e, conseqüentemente, a atividade da mitocôndria³⁸. (iii) através da marcagem com anexina V, que se liga à fosfatidilserina presente especificamente na superfície de células apoptóticas.

A apoptose tem papel essencial nas alterações da parede vascular. É largamente detectada em lesões ateroscleróticas de vasos coronários nativos, de enxertos de veias de safena, assim como em lesões de re-estenose³⁷. A apoptose ocorre tanto em macrófagos, presentes na placa aterosclerótica, quanto em células musculares lisas e células endoteliais. Uma das principais implicações clínicas da apoptose na doença aterosclerótica é a desestabilização da placa. A perda de células endoteliais e musculares lisas da capa fibrótica, associada à proteólise da matriz extracelular, leva à erosão e/ou ruptura da placa, com conseqüente trombose³⁷.

Estudos demonstram que a LDLox é capaz de induzir a apoptose de células endoteliais¹⁸. Kontush e colaboradores¹⁹ mostraram que a subfração LDL3, moderadamente oxidada, apresenta importante efeito citotóxico, em comparação à subfração LDL5. Sugere-se que a LDLox induz apoptose de célula endotelial a partir de duas vias dependentes de cálcio: (i) a via de degradação do ADN e cromatina, dependente da cascata caspase mediada pela calpaina, degradação do Bid, liberação do citocromo c (cit c) para o citoplasma com ativação da caspase-3; (ii) a via de degradação do ADN independente das caspases, mediada pela liberação do fator indutor de apoptose (AIF)³⁹.

Como demonstrado sumariamente na figura 1.2, a LDLox, em contato com a célula endotelial, induz por um lado a entrada de cálcio no citoplasma e na mitocôndria, e por outro induz a geração intracelular de espécies

reativas de oxigênio (ROS). O aumento da quantidade de cálcio no interior da célula induz a ativação das calpainas, com degradação do Bid em tBid, o qual penetra na mitocôndria, levando à sua disfunção. Em adição, a presença de cálcio e a geração de ROS pela mitocôndria também está associada à disfunção mitocondrial, com aumento da permeabilidade de sua membrana e liberação para o citoplasma de fatores pró-apoptóticos, como cit c e AIF³⁹. O cit c atua ativando a cascata das enzimas caspases, com ativação final da caspase-3. Assim, a caspase-3 e/ou o AIF penetram no núcleo celular e induzem a degradação da cromatina, fragmentação do ADN, do cito-esqueleto, levando, ao final, à morte celular por apoptose³⁹.

Ao contrário da LDLox, a HDL e a apolipoproteínaA-I (apoA-I) protegem as células endoteliais contra apoptose³⁴. Contudo, ainda permanecem indeterminados os mecanismos envolvidos na atividade anti-apoptótica da HDL, quais vias celulares estão envolvidas e se há diferença deste efeito entre as subfrações de HDL (sHDL).

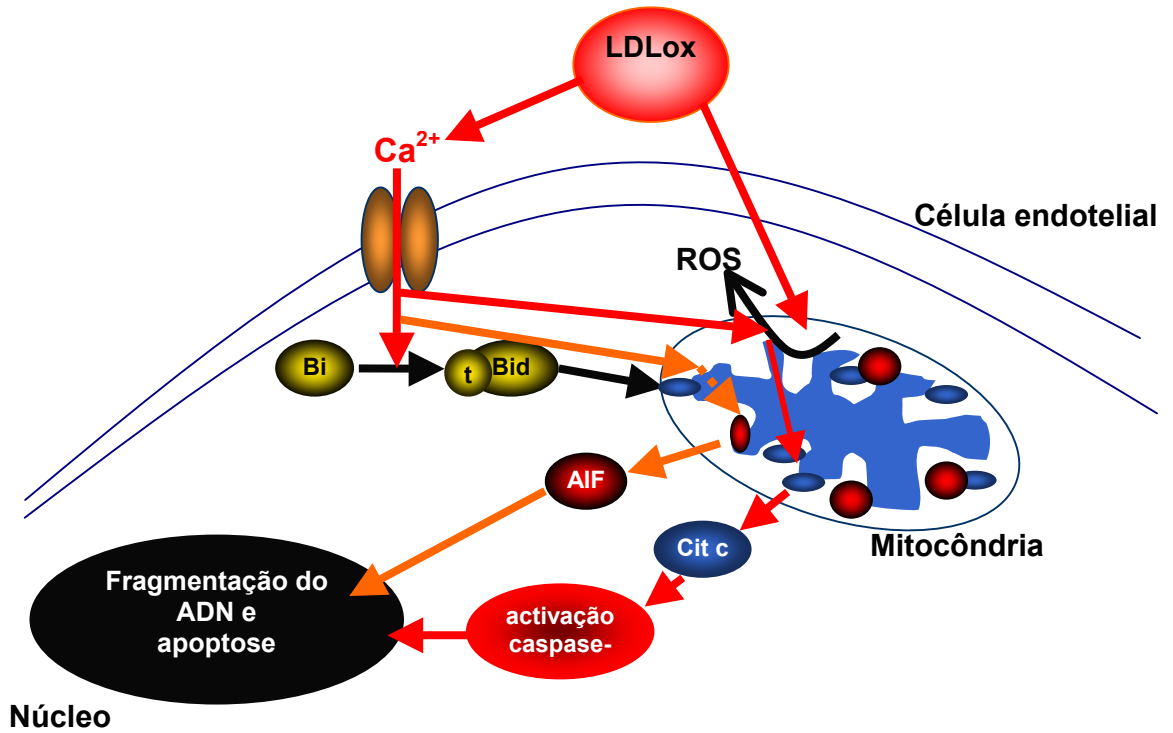


Figura 1.2 – Mecanismos de indução da apoptose pela LDLox na patogênese da aterosclerose³⁹.
 LDLox, lipoproteína de baixa densidade na forma oxidada; Ca²⁺, cálcio iônico; Bid, molécula protetora contra apoptose; tBid, Bid degradado; Cit c, citocromo c; ADN, ácido desoxirribonucléico, AIF, fator indutor de apoptose; ROS, espécies reativas de oxigênio. Por Vindis C et al³⁹ modificado.

C. ATIVIDADES ANTI-ATEROGÊNICAS DA HDL

Os principais mecanismos responsáveis pelos efeitos cardioprotetores da HDL estão bem estabelecidos e são: transporte reverso do CT, sua capacidade de proteger a LDL-C contra o estresse oxidativo, anti-inflamatório (Figura 1.1) e efeito anti-trombótico²¹⁻³³. Mais recentemente foi demonstrado o efeito anti-apoptótico da HDL^{34,35}, sobre o qual nosso estudo detém especial atenção.

C.1 ATIVIDADE ANTI-APOPTÓTICA DA HDL

A HDL é potente inibidor da apoptose de células endoteliais induzida por LDLox (Figura 1.1)³⁴ e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)⁴⁰. Suc e colaboradores³⁴ avaliaram a atividade anti-apoptótica da HDL em concentrações fisiológicas em células endoteliais estimuladas com LDLox. A HDL total possui maior atividade anti-apoptótica, quando comparada à apoA-I e apoA-II isoladamente, sugerindo que outros componentes das partículas HDL sejam responsáveis pela sua ação protetora⁴¹.

A atividade anti-apoptótica da HDL permanece mesmo que haja pré-incubação e sua remoção do meio de cultura antes da adição da LDLox, indicando que não é necessário o contato da HDL com LDLox para sua

ação, assim como a HDL não impede a captação celular da LDLox. Este efeito é paralelo ao fato de que a HDL é capaz de reduzir a formação de ROS, sugerindo que sua ação anti-apoptótica esteja relacionada à sua ação antioxidante intracelular³⁴.

Sugano e cols⁴⁰ demonstraram que HDL e HDL recombinante (HDLr) são capazes de inibir apoptose de células endoteliais induzida por TNF- α . Neste estudo, a pré-incubação com HDL não interferiu na expressão celular de Fas e Bcl-2 receptores e transmissores da sinalização intracelular, envolvidos no desencadeamento da apoptose.

HDL possui lisoesfingolipídios bioativos, incluindo a esfingosina 1-fosfato (E1F)^{41,42}, um potente agente anti-apoptótico que pode estar em parte associado ao efeito da HDL por estimular o aumento da produção de óxido nítrico (NO)^{43,44}. Outro mecanismo sugerido por Li e colaboradores⁴⁵ seria atuação da HDL no receptor *scavenger*-BI (SR-BI), o qual participaria de uma via ligante independente na indução de apoptose de células endoteliais, suprimida pela HDL e pela expressão celular de NO sintase endotelial (eNOS), com maior produção de NO.

Entretanto, o mecanismo exato pelo qual a HDL protege células endoteliais contra a apoptose induzida pela supressão de soro no meio de cultura, pela LDLox ou por citocinas como o TNF- α , ainda não está completamente esclarecido.

D. HETEROGENEIDADE DAS sHDL

As sHDL são altamente heterogêneas, tanto do ponto de vista de suas características físico-químicas, como em suas atividades biológicas. Quando fracionada por gradiente de densidade por ultracentrifugação, a HDL é separada em cinco subfrações: HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b, HDL3c (respectivamente da menor para a maior densidade)^{46,47}. Outros métodos de separação, como por eletroforese em gel de duas dimensões, permitem a identificação de mais de dez subespécies, predominantemente α -HDL, pré- α -HDL and pré- β -HDL⁴⁸. A HDL também pode ser separada de acordo com sua composição em apolipoproteína (Figura 1.3)⁴⁹.

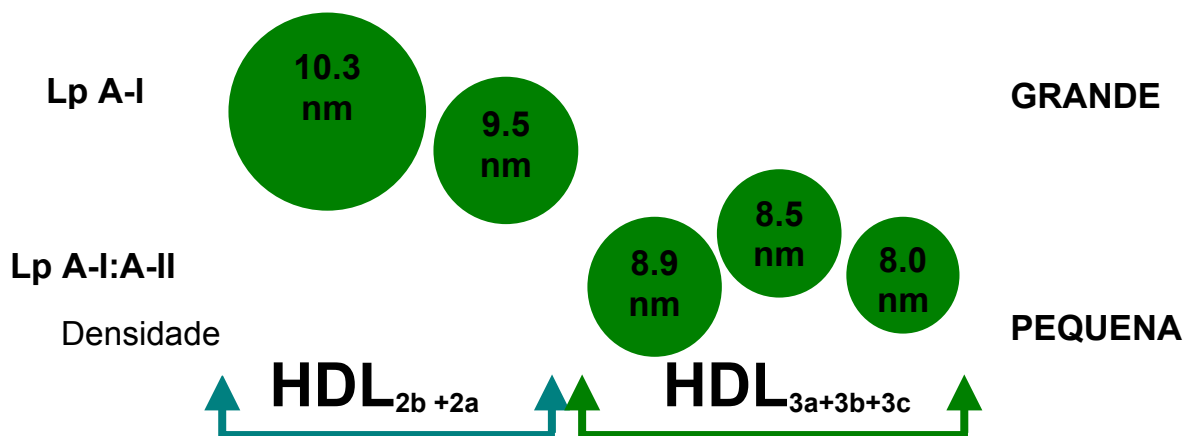


Figura 1.3 – Caracterização das partículas de HDL segundo seu conteúdo em apolipoproteína, densidade e tamanho⁴⁶⁻⁴⁹.
Lp A-I, lipoproteína A-I; Lp A-I:A-II; lipoproteína A-I:A-II.

D.1 HETEROGENEIDADE FÍSICO-QUÍMICA

Assim, podemos diferenciar as sHDL a partir de duas características principais:

1. Composição em apolipoproteína;
2. Tamanho / densidade.

D.1.1 Composição em apolipoproteína

As duas principais apolipoproteínas que compõem a HDL são: apoA-I e apoA-II. Estas duas moléculas estão relacionadas à heterogeneidade da HDL e determinam características biológicas intrínsecas a cada tipo de partícula de HDL. As sHDL segregam-se em duas categorias principais: (i) aquelas que contêm apoA-I como sua principal apolipoproteína, chamadas LpA-I; (ii) aquelas que contêm as duas apolipoproteínas, denominadas LpA-I:A-II. A partícula de HDL LpA-I:A-II representa 2/3 do total. Elas diferem fundamentalmente em seu metabolismo e, especialmente, em suas habilidades em inibir aterosclerose^{49,50}.

D.1.2 Densidade e tamanho da partícula

As sHDL são heterogêneas em relação a sua densidade e tamanho. Como todas as lipoproteínas, o HDL consiste de um núcleo lipídico hidrofóbico de éster de colesterol (EC) e TG, assim como contém fosfolípidios (FL) e apolipoproteínas na superfície da partícula. Fatores que determinam sua composição lipídica, também diferenciam seu tamanho e densidade^{46,47}, podendo-se separar a HDL em subfrações, conforme segue abaixo:

1. HDL2b e HDL2a – Subfrações com maior tamanho e menor densidade;
2. HDL3a, HDL3b e HDL3c – Subfrações com menor tamanho e maior densidade.

As partículas pré- β HDL agem como aceptores de CT excedente das células, através de transporte enzimático, sendo o CT esterificado pela lecitina colesterol acil-transferase (LCAT), transformando-se em HDL3. A aquisição adicional de CT e TG resulta em aumento da partícula de HDL e redução de sua densidade, com conseqüente formação da HDL2²².

D.2 HETEROGENEIDADE FUNCIONAL DAS sHDL

Em recente estudo, Kontush e colaboradores²⁸ demonstraram que a atividade antioxidante das sHDL aumenta com incremento da sua densidade (HDL2b<HDL2a<HDL3a<HDL3b<HDL3c). A potente atividade protetora da partícula pequena e densa deve-se ao sinergismo na inativação de lipídios oxidados por mecanismos enzimáticos, como paroxonase (PON), fator ativador de plaquetas acetil-hidrolase (PAF-AH) e LCAT⁵¹⁻⁵³, e não enzimáticos⁵⁴⁻⁵⁷, refletindo propriedades físico-químicas intrínsecas. As sHDL são heterogêneas em sua atividade antioxidante possivelmente por distribuição não uniforme das apolipoproteínas e enzimas que possuem propriedades antioxidantes^{28,57}.

Pacientes com DAC possuem predominantemente subfrações menos densas de HDL circulantes⁵⁸, sugerindo assim a hipótese de que subfrações menores e mais densas de HDL podem estar associadas com maior proteção de DAC. Enfim, não é somente o aumento ou a redução da concentração da HDL que determina predisposição de doença cardiovascular aterosclerótica, mas também a concentração das subclasses de HDL, a mobilização celular de lipídios e a cinética do metabolismo da HDL⁵⁹.

A heterogeneidade da atividade anti-inflamatória das sHDL permanece pouco caracterizada. Tem sido relatado que as subfrações

HDL3 são superiores às HDL2 na capacidade de inibir a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais²⁹, um achado consistente com a potente atividade antioxidante da HDL3^{28,57}.

A possível heterogeneidade das demais atividades anti-aterogênicas das sHDL permanece ainda não elucidada, especialmente quanto a sua atividade anti-apoptótica.

E. FATORES ASSOCIADOS À PERDA DA ATIVIDADE ANTI-ATEROGÊNICA DA HDL

É complexa a relação entre níveis de HDL-C e aterosclerose. Dosagens dos níveis séricos basais da HDL-C são apenas dados estáticos e podem não refletir completamente a eficiência desta lipoproteína, em sua atuação nos fluxos do CT entre os tecidos e no transporte reverso de CT, assim como na degradação e neutralização das moléculas de lipídios oxidados.

O tipo de sHDL e os mecanismos pelos quais seus níveis séricos são alterados podem significativamente influenciar sua função biológica e efeitos protetores, confirmando a heterogeneidade estrutural e funcional desta lipoproteína⁵⁷⁻⁵⁹.

Modificações quantitativas e qualitativas das sHDL no plasma podem influenciar no efluxo de CT. Estas modificações podem levar à maior formação de lipoproteína rica em CT ou acúmulo de fosfolipídios oxidados e CT na parede vascular, propiciando assim a lesão endotelial^{60,61}.

A HDL seria fator anti-inflamatório em estado normal (*funcionante*) e pró-inflamatório durante a fase aguda da DAC⁶². Navab e colaboradores^{23,24} demonstraram em estudos com pacientes com DAC documentada por coronariografia, não diabéticos e normolipêmicos, que a enzima PON1 tem atividade significativamente menor que nos indivíduos normais. A HDL não só faliu em inibir a LDLox, como também aumenta sua oxidação e sua atividade biológica pró-inflamatória. Estes dados sugerem que pacientes com DAC e nível sérico de CT normal têm HDL *não funcionante* e pró-inflamatório.

A presença de atividade antioxidante deficiente está intimamente relacionada à hipertrigliceridemia⁶³, hiperinsulinemia e resistência à insulina⁶⁴, como demonstrado em pacientes com SMet⁶⁴ e DM tipo 2⁶⁵. Estes dados sugerem que alterações do metabolismo lipídico e da glicose predisõem às anormalidades na atividade antioxidante das subfrações pequenas e densas de HDL^{66,67}, por influenciar a atividade da apoA-I e das enzimas antioxidantes associadas à HDL.

A realização de mais estudos é necessária para melhor elucidação do papel da HDL na fisiopatogenia da aterosclerose, para que haja possibilidade de atuação terapêutica eficaz no tratamento das dislipidemias

e da DAC. Talvez não só reduzindo os níveis de LDL-C ou aumentando os de HDL-C, mas também determinando o possível defeito na sua composição visando a melhoria da função anti-aterogênica da HDL⁶⁸⁻⁷².

2 Hipótese do estudo

Algumas questões ainda devem ser elucidadas para que haja maior entendimento a cerca do papel da HDL na prevenção da aterosclerose.

Todos estes dados descritos acima, em conjunto, indicam que: (i) as subfrações pequenas e densas HDL3, principalmente o HDL3c, mostram potente capacidade de proteger o LDL contra oxidação; (ii) esta atividade antioxidante das subfrações HDL3 é reduzida na presença de dislipidemias aterogênicas; e, (iii) LDLox é capaz de induzir apoptose de células endoteliais, ao contrário da HDL que possui atividade anti-apoptótica importante.

Nossas hipóteses de trabalho são: (i) as sHDL inibem apoptose de células endoteliais induzida pela LDLox; (ii) a atividade anti-apoptótica das sHDL é heterogênea, e especialmente a subfração pequena e densa HDL3c apresenta potente atividade protetora; (iii) os mecanismos envolvidos na atividade anti-apoptótica das sHDL estão associados por um lado à sua composição química e, por outro, à sua interação aos ligantes celulares, como o receptor SR-BI; e, (iv) esta atividade anti-apoptótica está possivelmente reduzida na presença de dislipidemias aterogênicas como a SMet.

3 Objetivos

OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a heterogeneidade da atividade contra a toxicidade mitocondrial e a apoptose induzidas pela LDLox das sHDL isoladas de indivíduos normolipidêmicos, primariamente das subfrações pequenas e densas HDL3b e HDL3c.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- a) Definir os mecanismos intracelulares envolvidos na atividade anti-apoptótica das sHDL nas células endoteliais;
- b) Definir os mecanismos moleculares, dos componentes das sHDL e do seu receptor SR-BI, envolvidos na atividade anti-apoptótica das sHDL nas células endoteliais;
- c) Avaliar o efeito anti-apoptótico das sHDL isoladas de pacientes com SMet.

3 Materiais e Métodos

A. REAGENTES E PRODUTOS QUÍMICOS

Os meios de cultura MCDB 131 e RPMI 1640, soro bovino fetal, L-glutamina, penicilina e estreptomicina foram fornecidas pela *Life Technologies (Cergy Pontoise, França)*. Os kits para detecção das apoA-I, apoA-II, apoB-100 foram obtidos da *Diasys France (Bouffemont, França)*. Os kits para detecção enzimática da lactato desidrogenase (LDH) eram da *Thermo Electron Corporation (Konelab System Reagents, Cergy Pontoise, França)*. O brometo 3-(4,5-dimetil-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), o corante verde fluorescente (SYTO-13) e o diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (H₂DCFDA) foram obtidos da *Molecular Probes (Cergy Pontoise, França)*. Substrato fluorescente da enzima caspase-3 (Ac-DEVD-AMC) e anticorpos anti-AIF foram comprados da *Bachem (Weil am Rhein, Alemanha)*. O anticorpo anti-citocromo c (anti-cit c) foi da *BD Biosciences/Pharmingen (Le Pont de Claix, França)* e o anticorpo monoclonal anti-Bid, da *R&D Systems (Lille, França)*. O anticorpo anti-SR-BI foi cedido pelo grupo de Barbaras (Martinez, Georgeaud et al. 2000). O kit anexina V / iodeto de propidium (IP) de citometria de fluxo, para a análise de apoptose, foi comprado da *Beckman Coulter, Inc (Roissy, França)*. Kits espectrofotométricos para a

determinação do CT, CL e FL eram da *Wako Chemicals/Diasys* França (*Bouffemont*, França); para a determinação de TG eram da *Biomerieux* (*Craponne*, França) e para a determinação de proteínas foram comprados da *Per-Bio Science France* (*Bezons*, França). Todos os outros reagentes foram obtidos da *Sigma* (*St. Quentin Fallavier*, França).

B. POPULAÇÃO DO ESTUDO

B.1 INDIVÍDUOS NORMOLIPIDÊMICOS

Cinco voluntários saudáveis do sexo masculino, normolipidêmicos, foram recrutados no ambulatório do Serviço de Endocrinologia do Hospital *La Pitié Salpêtrière*, Paris, França. Todos os doadores apresentavam níveis plasmáticos dentro da variação normal do CT, LDL-C, HDL-C e TG, de acordo com o *NCEP/ATP III*^{73,74}.

B.2 PACIENTES COM SMET

Dezesseis pacientes do sexo masculino com SMet foram recrutados no ambulatório do Serviço de Endocrinologia do Hospital *La Pitié Salpêtrière*, Paris, França. A SMet foi definida de acordo com as diretrizes do *NCEP – ATP III*^{73,74}, como a presença de pelo menos três das seguintes características: 1) hipertrigliceridemia (TG \geq 150 mg/dl); 2) reduzidos níveis séricos de HDL-C (menor ou igual a 40 mg/dl para homens); 3) hiperglicemia (glicose sérica em jejum \geq 110 mg/dl); 4) HAS [pressão arterial sistólica (PAS) \geq 130 mmHg e/ou diastólica (PAD) \geq 90 mmHg]; 5) obesidade abdominal (circunferência da abdominal \geq 102 cm nos homens).

Todos os indivíduos recrutados para o estudo tinham menos de 70 anos, não fumavam, eram abstêmios ou consumidores leves de álcool (<25 g/dl). A pressão arterial e o estado físico foram avaliados durante um completo exame clínico.

Resistência insulínica foi estimada como o índice do modelo de avaliação da homeostase (HOMA) da resistência insulínica (glicose sangüínea em jejum x insulina/22.5) e com a razão entre a insulina plasmática e a glicose⁷⁸. O nível plasmático de insulina foi determinado através do teste ELISA (valores normais menores que 20 μ UI/ml).

O nível de inflamação sistêmica foi avaliado através da dosagem plasmática da proteína C-reativa ultra-sensível (PCRus) pelo método de

imunoensaio turbidimétrico de aglutinação do látex. Foram excluídos indivíduos com nível de PCRus maior que 5 mg/l.

Nenhum dos pacientes com SMet ou sujeitos controles apresentavam doença renal, hepática, gastrointestinal, pulmonar, endócrina, ou oncológica; ou estavam recebendo suplementos vitamínicos antioxidantes, drogas anti-diabéticas, ou drogas que conhecidamente afetam o metabolismo das lipoproteínas, por pelo menos 6 semanas antes do início do estudo. Finalmente, nenhum dos sujeitos estava submetido à dieta especial. Todos os indivíduos do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I). O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê Ética de Revisão da Instituição.

C. AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Foi coletado sangue venoso periférico em tubos estéreis a vácuo (*vacutainers*), contendo ou não ácido etileno-diamino-tetra-acético (K_3EDTA ; concentração final; 1,0 mg/dl), após 12 horas de jejum. Após da coleta de sangue, o plasma e o soro foram imediatamente separados por centrifugação a 4°C. Sacarose (concentração final; 0,6%) foi misturada às amostras como um crioprotetor⁷⁹ de lipoproteínas. Posteriormente, as amostras foram congeladas a -80°C até sua utilização.

D. ISOLAMENTO DA LDL

A LDL foi isolada da amostra de plasma proveniente de indivíduos normolipidêmicos obtida no Centro de Transfusão Sangüínea do Hospital *La Pitié Salpêtrière*, através da técnica de ultracentrifugação seqüencial⁴⁶, como segue: gentamicina (0,1 mg/ml) e EDTA (0,5M) foram adicionados ao plasma, o qual foi centrifugado a 36.000 g, por 16 horas, a 15°C. Na primeira etapa de ultracentrifugação, quilomícrons e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) foram removidos (2,5 ml a partir do volume total de 20 ml). O volume restante foi medido e brometo de potássio (KBr) foi adicionado para equilibrar a densidade da amostra em 1,024-1,050 g/ml. A segunda etapa de ultracentrifugação foi feita a 36.000 g, por 48 horas, a 15°C, a fim de isolar LDL. Por fim, 5 ml de LDL (a partir do volume final de 15 ml) foram obtidos na densidade de 1,024-1,050 g/ml. Diálise com solução tampão com salina e fosfato (PBS), com pH 7,4 foi realizada para remoção do KBr e do EDTA. Os conteúdos de apoB-100, apoAI e apoAII na LDL foram determinados por imunoturbidimetria (Konelab 20, Thermo Electron, Cergy Pontoise, França). Não houve contaminação do LDL por partículas que continham apoA-I e apoA-II.

E. OXIDAÇÃO DA LDL

A modificação oxidativa da LDL foi feita *in vitro*, na presença de íons de cobre (Cu^{2+}), na concentração de LDL de 2 g apoB-100/l, em presença de 5 $\mu\text{mol/l}$ de Cu^{2+} . A mistura de LDL com (Cu^{2+}) foi irradiada por 2 horas como um fino filme (5 mm) em um bequer de vidro aberto, posicionado a 10 cm sob a fonte de luz ultravioleta (UV-C, HNS 30W OFR Osram UV-C tubo, λ_{max} 254 nm, 0.5 mW/cm^2)¹⁸. O nível de oxidação da LDL foi avaliado através do monitoramento da formação de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS), de acordo com o método de Yagi⁸⁰, pela mobilidade eletroforética relativa (REM) através da eletroforese em gel de agarose (*Hydragel*[®]; *Sebia, Les Molineaux, França*) e pelo aumento da absorbância à 234 nm (ΔA 234 nm), o que corresponde ao acúmulo de hidroperóxido de lipídio como estrutura característica dos dienos conjugados. A LDL foi oxidado a uma escala de ΔA 234 nm = 0,050-0,500, referente à concentração de dienos conjugados de 1,6-16,9 μM . Após a irradiação, alíquotas de LDLox foram esterilizadas utilizando-se membranas com poros de 0,2 μm . LDLox (200 μg apoB-100/mL) foi adicionada às células endoteliais conforme descrito para cada experimento.

F. ISOLAMENTO DAS sHDL

As partículas de HDL foram fracionadas a partir do soro de indivíduos normolipidêmicos e pacientes dislipidêmicos através de ultracentrifugação por gradiente de densidade (ultracentrifugação isopícnica) à 40.000 *g*, por 48 horas, à 15°C, como descrito previamente⁴⁶. As sHDL foram isoladas do soro para preservação da PON-1, por ser conhecido o efeito do EDTA como inibidor desta enzima. Durante a centrifugação, as lipoproteínas, cujas densidades variam entre 1,019 e 1,063 g/ml para as subfrações de LDL e 1,063 e 1,21 g/ml para as de HDL, são submetidas aos efeitos da força de centrifugação e à força de flotação. As lipoproteínas se deslocam por gradiente até que cheguem ao ponto respectivo de suas densidades. Portanto, o objetivo desta ultracentrifugação é obter o equilíbrio isopícnico das lipoproteínas dentro de um gradiente de densidade.

F.1 MÉTODO DE OBTENÇÃO DO GRADIENTE DE DENSIDADE

Após a descongelação das amostras, foi preparado o gradiente de densidade, com quatro soluções de densidade previamente reservadas. As densidades das quatro soluções são: 1,006 g/ml; 1,019 g/ml; 1,063 g/ml; 1,21 g/ml e 1,24 g/ml. São soluções obtidas com KBr sem adição de EDTA,

conforme descrito a seguir. O gradiente foi preparado depositando-se em tubo *Beckman Ultraclear* (Roissy, França) seguindo a seguinte ordem para cada soro analisado: 2 ml da solução 1,24 g/ml são depositados em primeiro lugar; seguindo de deposição lenta de 3 ml de soro cuja a densidade é ajustada a 1,21 g/ml com KBr (0,93 g de KBr em 3 ml de soro congelado com sacarose, conforme a fórmula demonstrada no Quadro 4.1).

Quadro 4.1 – Ajuste da densidade do soro

$m = V \frac{d_2 - d_1}{1 - V d_2}$	<p>m= massa do sal utilizado V= volume da solução d1 e d2= densidades iniciais e finais da solução</p>
-------------------------------------	--

Ao final, as outras soluções com densidades de: 1,063 (2ml); 1,019 (2,5ml) e 1,006 g/ml (2,5ml) foram depositadas respectivamente com a ajuda de uma bomba de infusão lenta (Minipuls II).

A preparação das soluções de diferentes densidades foi realizada a partir de 2 soluções:

Solução A: com densidade de 1,006 g/ml feita com uso de cloreto de sódio (NaCl) 8,76 g; 625 µL de gentamicina (80 mg/ml) ajustando-se o pH 7,4.

Solução B: com densidade de 1,357 g/ml feita com NaCl 153 g; KBr 354 g; gentamicina 625 µL (80 mg/ml), ajustando-se para o pH 7,4.

Aplicando-se as fórmulas $[d_X (V_A+V_B) = (V_A \cdot d_A) + (V_B \cdot d_B)]$ e $V_B = [(V_A \times d_A) - (V_A \times d_X)] / (d_X - d_B)$; onde: d_X representa a densidade da solução desejada; escolhe-se um volume (V_A) da solução A, e calcula-se o volume (V_B) da solução B a ser utilizado para obter-se a densidade d_X . Foram verificadas todas as densidades no densitômetro.

F.2 ULTRACENTRIFUGAÇÃO

Os tubos foram depositados nos suportes dos rotores móveis SW41 Beckman da ultracentrífuga (França). A ultracentrifugação é iniciada à 40.000 g, durante 48 horas, à 15°C.

F.3 RECUPERAÇÃO DAS DIFERENTES SUBFRAÇÕES DE LIPOPROTEÍNA

A lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e a VLDL correspondem aos 800 µl iniciais e são os primeiros a serem coletados do tubo. As subfrações subjacentes foram em seguida coletadas com pipeta em

volumes exatos de 800 μ l para a LDL, correspondendo às subfrações: LDL1, LDL2, LDL3, LDL4, LDL5. Posteriormente, coletou-se 1.200 μ l que correspondem à subfração HDL2b. As subfrações HDL2a, HDL3a e HDL3b correspondiam aos volumes 800 μ l recuperados sucessivamente. Finalmente, para evitar a contaminação por proteínas na última e mais densa subfração HDL3c, foram coletados 500 μ l no lugar dos 800 μ l habituais.

F.4 DIÁLISE DAS SUBFRAÇÕES HDL ISOLADAS

Antes de analisar as subfrações do ponto de vista bioquímico e utilizá-las nos experimentos de oxidação *in vitro* ou com as células, foi necessário eliminar o KBr e EDTA através de diálise em solução de PBS (pH 7,2) durante 48h, à 4°C, sob agitação. Trocou-se o banho de diálise a cada 08 horas para um máximo de duas trocas. Após a diálise, as sHDL foram recuperadas e conservadas à 4°C por no máximo 15 dias.

Em suma, as cinco sHDL foram isoladas: as grandes e menos densas, HDL2b (d=1,063 – 1,090 g/ml) e HDL2a (d=1,090 – 1,120 g/ml), e as pequenas e densas, HDL3a (d=1,120 – 1,150 g/ml), HDL3b (d=1,150 – 1,180 g/ml) e HDL3c (d=1,180 – 1,210 g/ml). KBr foi retirado da solução de HDL através de repetidos banhos de diálise contra PBS, com pH 7,2, à 4°C. As lipoproteínas foram armazenadas à 4°C e usadas dentro de 15 dias.

G. ANÁLISE QUÍMICA DOS LIPÍDIOS DAS LIPOPROTEÍNAS

Os conteúdos de proteína total (PT), CT, CL, FL e TG das sHDL foram determinados utilizando-se testes enzimáticos comercialmente disponíveis. Os valores de EC foram calculados através da razão da diferença entre o CT e CL por 1,67⁴⁶. ApoA-I e apoA-II foram dosadas utilizando-se imunonefelometria^{28,81}.

H. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS sHDL

Com a finalidade de avaliar *in vitro* o efeito protetor das sHDL contra a peroxidação lipídica da LDL, foi realizada a oxidação da LDL isolada de um mesmo indivíduo normolipidêmico controle de referência (LDL referência) isolado ou em presença das sHDL3b ou 3c.

A atividade antioxidante específica de uma subfração corresponde a sua capacidade intrínseca de proteger a LDL contra oxidação. Os produtos de oxidação formados foram analisados de forma quantitativa. LDL proveniente do indivíduo controle foi preparado sob as mesmas condições que as sHDL. A oxidação da LDL foi induzida por 2,2'-azobis-(2-amidinopropano/hidroclorido) (AAPH; 1mM), que produz uma forma de oxidação metal-independente²⁸. Este composto é um azo-iniciador hidrofílico

que à temperatura de 37°C é decomposto em dois radicais livres capazes de iniciar a peroxidação lipídica. A oxidação da LDL foi feita tomando-se por base o valor de CT.

A LDL foi incubada com AAPH em presença ou não das sHDL, em uma solução com volume final de 500 µl, completada com PBS Chelex *qsp*. As preparações foram incubadas à 37°C e a formação dos dienos conjugados (lipídios hidropoxidados) foi medida no espectrofotômetro durante 16 horas (cinética: 1 medida / 10 min), à absorvância de 234 nm (A_{234nm})²⁸.

O tempo de oxidação da LDL foi caracterizado como um acúmulo de dienos conjugados, medida como incremento na absorvância à 234nm²⁸. A curva (Figura 4.1) da cinética revelou três estágios consecutivos: o atraso (*lag phase*), a propagação (*propagation phase*) e a estabilização (*plateau*).

- A fase de latência (1; *lag phase*) corresponde ao período de consumo das defesas antioxidantes lipofílicas das lipoproteínas, havendo pouca oxidação nesta fase.
- A fase de propagação (2; *propagation phase*) reação em cadeia de início da peroxidação dos lipídios, sendo a fase de principal atuação antioxidante da HDL.
- A fase de decomposição dos hidroperóxidos (3; fase de estabilização ou *plateau*) caracterizada por uma diminuição da absorvância à 234nm.

Deste modo, a curva ficou semelhante à seqüência de três linhas retas, automaticamente calculadas, utilizando-se a regressão linear por partes. Dois estágios característicos do tempo, o atraso e a propagação foram determinados para cada curva de absorbância, o que correspondeu às intersecções das linhas. Foram calculadas, ainda, a taxa média de oxidação em cada estágio (inclinação das linhas correspondentes), assim como a quantidade de dienos formados no final do estágio de propagação (quantidade máxima de dienos). Para as incubações com AAPH, foram necessárias correções para a sua absorbância.

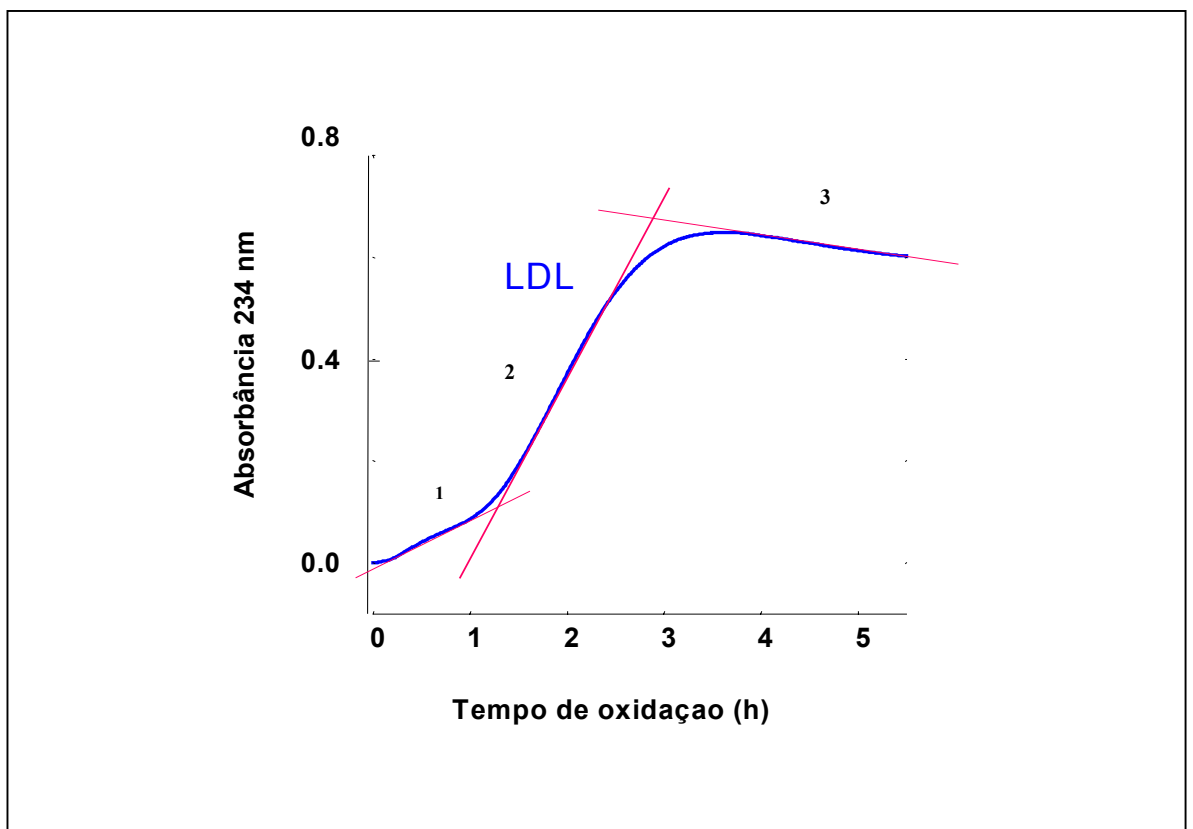


Figura 4.1 – Curva de oxidação do LDL em presença de AAPH²⁸

I. CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Células endoteliais microvasculares humanas-1 (HMEC-1) foram cultivadas em meio MCDB131 com suplemento de 10% de soro fetal bovino, 2,0 mM de glutamina, 80 U/ml de penicilina e 80 µg/ml estreptomicina. As células foram utilizadas entre a 4^a e a 12^a passagem. A uma confluência de 100%, as HMEC-1 foram colocadas em placas de cultura de 12, 24 ou 96 poços, com densidade de 10.000 à 40.000 células/ml, a depender do tipo de experimento. Após 24 ou 48 horas, as células eram incubadas com sHDL (5 a 100 µg proteínas/ml) em meio RPMI livre de soro fetal bovino, durante 24 horas e, posteriormente, incubadas com LDLox durante 1 a 24 horas (200µg apoB-100/ml), como descrito para cada experimento.

J. ANÁLISE DA ATIVIDADE PROTETORA DAS sHDL CONTRA TOXICIDADE MITOCONDRIAL INDUZIDA PELA LDLox

A toxicidade mitocondrial foi avaliada pelo método de MTT³⁸, o qual mede a atividade da desidrogenase mitocondrial, e conseqüentemente, a atividade da mitocôndria. As HMEC-1 (40.000 células/poço) foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços e incubadas na ausência ou presença de sHDL (5 a 100 µg de proteínas/ml, ou 10 a 100 µg de massa total/ml, ou

0,25 à 0,50 μM) por 24 horas. Posteriormente, foi adicionada LDLox ($\Delta A_{234\text{nm}}=0,050-0,080$; concentração de dienos conjugados de 1,6-2,7 μM) e as células foram incubadas por mais 18 à 24 horas. A proteção fornecida pelas sHDL contra a toxicidade mitocondrial induzida por LDLox foi determinada. Os dados estão apresentados como a porcentagem do controle e por vezes como porcentagem de proteção contra a apoptose induzida por LDLox. A proteção está expressa relativamente à diferença entre incubações na ausência (controle) e na presença de LDLox.

K. ANÁLISE DA HETEROGENEIDADE DA ATIVIDADE PROTETORA DAS sHDL CONTRA APOPTOSE INDUZIDA PELA LDLox

K.1 CARACTERIZAÇÃO DE APOPTOSE ATAVÉS DA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As HMEC-1 (20.000 – 30.000 células/poço) foram cultivadas em placa de cultura de 12 poços, na ausência ou na presença de sHDL e LDLox como descrito anteriormente. A distinção morfológica entre apoptose e necrose celular foi realizada utilizando-se microscópio de fluorescência invertida (*Fluovert FU, Leitz, Oberkochen, Alemanha*) e dois corantes fluorescentes vitais - SYTO-13 (um corante que penetra o núcleo da célula viva que produz cor verde; 0,6 μM) e iodeto de propidium (um corante que não é capaz de

penetrar o núcleo da célula viva; de cor laranja; 15 μ M). Células vivas com núcleos normais apresentaram cromatina solta em cor verde; células com núcleos em apoptose apresentaram cromatina em cor verde condensada e/ou cromatina fragmentada; enquanto as células em necrose pós-apoptótica possuíam núcleos com características morfológicas apoptóticas semelhantes, corados em laranja pelo iodeto de propidium. E por fim, células em necrose apresentaram núcleos em cor laranja com a cromatina solta⁸².

K.2 CARACTERIZAÇÃO DA APOPTOSE PELA CITOMETRIA DE FLUXO COM MARCAGEM COM ANEXINA V

As HMEC-1 foram incubadas com as sHDL (25 μ g de proteína/ml) e LDLox, como descrito anteriormente. A apoptose foi quantificada utilizando-se o *kit* anexina V- FITC/IP (*Beckman Coulter Inc, Roissy, França*), de acordo com as instruções do fabricante. De forma sumária, as células e os meios de cultura foram coletados e lavados duas vezes com PBS à 4°C, tripsinizados durante 15 min à 37° e coletadas em meio de RPMI contendo 10% soro fetal de bovino. Após centrifugação à 500 g, as células foram lavadas e nova centrifugação foi realizada. As células foram coradas por anexina V- FITC / PI por 15 minutos, à 4°C, no escuro. O nível de apoptose primária foi determinado pela análise da citometria de fluxo à excitação e emissão de comprimento de onda entre 492 e 520 nm, respectivamente, para anexina V-FITC; e à 550 e 680 nm respectivamente para IP (Citômetro

de Fluxo, *Beckman Coulter, Inc, Roissy, França*). Controles não corados foram utilizados para analisar a autofluorescência das células incubadas com LDLox. O nível da apoptose primária foi calculado após correção para a autofluorescência de cada amostra. Os dados estão apresentados como a porcentagem do controle e por vezes como porcentagem de proteção contra a apoptose induzida por LDLox. A proteção está expressa relativamente à diferença entre incubações na ausência (controle) e na presença de LDLox.

K.3 DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO PELAS sHDL DA CASCATA INTRACELULAR DE INDUÇÃO DA APOPTOSE

K.3.1 Determinação do citocromo c (cit c), fator indutor de apoptose (AIF) citosólicos e da degradação de Bid

As HMEC-1 foram cultivadas em placas de cultura (100 x 20 mm) e incubadas na ausência ou na presença de sHDL2b ou HDL3c (25 µg de proteína/ml), por 24 horas; posteriormente incubadas com LDLox, como descrito previamente. As células foram lavadas em PBS, centrifugadas e ressuspensas em 100 µl de tampão contendo 20 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 1 mM de sódio EDTA, 250 mM sacarose, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 20 µg/ml leupeptina, 1 mM orthovanadato e 5 µg/ml digitonina. A solução de células foi homogeneizada e, posteriormente, incubada em gelo por 45 min e centrifugadas (15.000 rpm, 10 min à 4°C). O sobrenadante (citosol sem mitocôndria) foi utilizado para a dosagem da proteína e *western blot* de

proteínas citosólicas foi realizado com anticorpos monoclonais anti-cit c, anti-AIF e anti-Bid⁸³. Os dados foram corrigidos para a actina e demonstrados como valores médios da intensidade das bandas de *blot*.

K.3.2 Determinação da atividade da caspase-3

As células HMEC-1 foram cultivadas em placas de cultura (60 x 15 mm) e incubadas com as sHDL (25 µg de proteína/ml) e LDLox, como descrito previamente. As células foram lavadas duas vezes em PBS e centrifugadas (1.500 rpm, 6 min). Subsequentemente, foram lisadas por 2 horas à 4°C em tampão de 200 µl de Tris/EDTA (5 mM, pH 7,5), contendo 0,5% IGEPAL (pH 7,5) e centrifugadas (10 min, 15.000 rpm, 4°C). A atividade caspase foi determinada no sobrenadante (100 µl) em 1 ml de tampão de Hepes (50 mM, pH 7,4), contendo 10% de sacarose, 10 mM DTT, 0,1% CHAPS e 10 µM de Ac-DEVD-AMC (substrato fluorescente da caspase-3). Após 30 min de incubação à 37°C no escuro, a atividade caspase-3 foi medida fluorimetricamente (excitação e emissão com comprimento de onda de 380 e 430 nm, respectivamente).

K.3.3 Determinação de Fragmentação do ADN

As células endoteliais foram cultivadas em placas de cultura (60 x 15 mm) e incubadas com sHDL (25 µg de proteína/ml) e LDLox. Fragmentos de cromatina foram determinados (McConkey et al., 1989)⁸⁴. As células

foram colocadas por 20 min em 0,5 ml do tampão de lise (5 g/l Triton X-100, 20 mmol/l EDTA e 5 mmol/l, Tris pH 8,0), foram ultracentrifugadas por 15 min à 23.000 *g* para separar o concentrado de cromatina dos produtos da fragmentação do ADN. O concentrado nuclear (re-suspenso em tampão de 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0), contendo 1 mM de EDTA) e o sobrenadante foram analisados para conteúdo de ADN pelo marcador fluorescente DAPI.

L. DETERMINAÇÃO DA GERAÇÃO DE ROS

As células HMEC-1 (40.000 célula/ml; 250µl/poço) foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços, durante 24 horas, e incubadas na ausência ou na presença de sHDL (5 à 100 µg proteína/ml), por 24 horas. As células foram lavadas uma vez com PBS, marcadas com substrato fluorescente H₂DCFDA por 30 minutos, à 37°C; foram, então, lavadas com PBS e incubadas com LDLox ($\Delta A_{234nm} = 0,300-0,500$; concentração de dienos conjugados de 10,1-16,9 µM), por 1 hora. Geração de ROS intracelular foi medida fluorimetricamente (excitação e emissão com comprimento de onda de 485 e 530 nm, respectivamente). Os dados estão apresentados como a porcentagem do controle e por vezes como porcentagem de proteção contra a geração de ROS induzida pela LDLox. A proteção está expressa relativamente à diferença entre incubações na ausência (controle) e na presença de LDLox.

M. ESTUDO DO MECANISMO ENVOLVIDO NA HETEROGENEIDADE DA ATIVIDADE ANTI-APOPTÓTICA DAS sHDL

Para elucidação do mecanismo molecular envolvido na atividade anti-apoptótica das subfrações HDL, a E1F e sua atividade anti-apoptótica foi quantificada nas sHDL. Além disso, o papel do receptor *scavenger* SR-BI na atividade anti-apoptótica das sHDL foi avaliada.

M.1 CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO DE E1F NAS sHDL

A sHDL foram isoladas de cinco sujeitos normolipidêmicos. O conteúdo de E1F em cada subfração foi determinado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)⁸⁵.

M.2 CARACTERIZAÇÃO ATIVIDADE ANTI-APOPTÓTICA DA E1F

M.2.1 Atividade anti-apoptótica da E1F utilizando albumina como carreadora

As células HMEC-1 (20.000 ou 30.000 células/poço) foram cultivadas em placas de cultura de 12 poços e incubadas por 4 horas na ausência ou na presença de E1F e seu análogo inativo, dihidro-E1F, como controle negativo, em concentrações fisiológicas (1 a 1.000 nM), no meio de RPMI 1634 com 0.4% de soro albumina bovina (BSA). Posteriormente, LDLox ($\Delta A_{234nm}=0,050-0,080$; concentração de dienos conjugados de 1,6-2,7 μM) foi adicionado, e as células foram incubadas por mais 18 à 24 horas. Foi realizada citometria de fluxo com anexina V para quantificação da apoptose induzida pela LDLox.

M.2.2 Atividade anti-apoptótica da E1F utilizando sHDL como carreadoras

Plasma do mesmo doador foi incubado em paralelo na ausência e presença de E1F. sHDL foram isoladas utilizando-se ultracentrifugação por gradiente de densidade, tanto das amostras de HDL enriquecidas com E1F, como das amostras de HDL controle. Níveis de E1F em sHDL foram medidos por HPLC. Células HMEC-1 (20.000 ou 30.000 células/poço) foram cultivadas em placas de cultura de 12 poços e incubadas com sHDL

enriquecidas com E1F e sHDL de controle (25µg proteína/ml) em meio RPMI 1634, sem soro, por 24 horas. Subseqüentemente, LDLox foi adicionado como descrito previamente. Foi realizada citometria de fluxo com anexina V para determinação da apoptose. Os dados estão apresentados como a razão entre o número de células marcadas pela anexina V-FITC em amostras incubadas com sHDL ricas em E1F e amostras incubadas com sHDL controle.

M.3 RECEPTOR SCAVENGER-BI E A ATIVIDADE PROTETORA DAS sHDL CONTRA A TOXICIDADE MITOCONDRIAL INDUZIDA PELA LDLox

As células HMEC-1 (40,000 célula/poço) foram cultivadas placa de cultura de 24 poços e incubadas na ausência ou na presença de anticorpos anti-SR-BI⁸⁶, por 1 hora, à 37°C. A concentração dos anticorpos era de 2µg/ml, a qual causa a inibição de mais de 85% captação da HDL pelas células (50 µg/ml, 18h de incubação). Portanto, esta concentração bloqueia quase completamente o receptor e é eficiente para reverter os efeitos anti-inflamatórios e citoprotetores da HDL. Posteriormente, as células foram incubadas por 24 horas na ausência ou na presença de HDL total e da subfrações HDL3c (25 µg de proteína/ml), isoladas de três sujeitos normolipidêmicos. O LDLox foi adicionado. A habilidade dos anticorpos anti-

SR-BI em influenciar na atividade protetora da subfração HDL3c contra a toxicidade mitocondrial foi determinada com teste MTT.

N. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise estatística e sua apresentação foram feitas utilizando-se o *Excel* e *Statistic Logicals* (Microsoft Office e Statistic logicals). Todos os dados com distribuição normal foram apresentados na forma média \pm desvio padrão ou média \pm erro padrão. Todas as comparações entre valores das médias foram feitas utilizando-se o teste *t* de student. Coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para a avaliação entre as diferentes variáveis. Os resultados foram considerados como estatisticamente significante quando $p < 0,05$.

5 Resultados

A. CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS sHDL

As sHDL são conhecidamente heterogêneas quanto à composição química, massa molecular, tamanho e densidade²⁸. Após separação por ultracentrifugação por gradiente de densidade isolamos as cinco subfrações de HDL (2b, 2a, 3a, 3b e 3c) com densidade crescente da sHDL2b para a 3c. Tendo por base a sua massa total, a concentração das sHDL, quando isoladas de indivíduos normolipidêmicos, diminui conforme a seguinte ordem: HDL2a≤HDL3a<HDL2b<HDL3b<HDL3c (Tabela 5.1).

A redução na densidade das partículas de HDL nos indivíduos normolipidêmicos está associada à correspondente diminuição da composição em lipídios e aumento do conteúdo protéico. A menor e mais densa subfração, HDL3c, possui 41,2% e 58,2% do conteúdo de sua massa total em lipídios e proteínas, respectivamente, enquanto a maior e menos densa subfração, HDL2b, possui 69,2% e 30,8%. Mais especificamente, ocorre com o aumento da densidade das sHDL uma redução não proporcional dos componentes lipídicos do núcleo destas lipoproteínas. Os

triglicérides (TG) diminuem de forma mais importante da subfração HDL2b para a HDL3c, quando comparado aos EC (Tabela 5.1).

Em concordância com a literatura²⁸, a composição em apolipoproteína das sHDL foi heterogênea. O conteúdo em apoA-I reduz com o tamanho das sHDL, de 4,3 mol/mol de HDL na HDL2b para 2,9 mol/mol de HDL na HDL3c. Em contrapartida, a apoA-II predomina nas subfrações HDL2a e 3a. Consequentemente, a razão molar entre apoA-I e apoA-II é maior nas sHDL2b e 3c (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Massa total e respectiva composição química das sHDL isoladas de indivíduos normolipidêmicos (n=7)

	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Massa total (mg/dl)	60,1±7,7***	74,6±4,3***	74,0±8,7***	32,8±4,7***	18,9±1,8
CT (mt%)[‡]	22,3±2,5***	18,5±2,2***	16,8±1,7**	15,3±2,0*	12,9±2,0
CL (mt%)[‡]	6,7±0,6***	4,3±0,4***	3,4±0,3***	2,5±0,2**	1,9±0,4
FL (mt%)[‡]	32,1±2,9***	32,9±1,6***	30,3±1,7***	25,7±1,5***	19,8±2,5
TG (mt%)[‡]	4,3±0,9***	2,7±0,4**	2,4±0,3*	2,1±0,3	1,7±0,6
PT (mt%)[‡]	30,8±1,7***	36,4±3,3***	41,5±3,7***	48,2±3,8**	58,2±4,8
EC (mt%)[‡]	26,1±3,5***	23,6±3,1*	22,4±2,7*	21,4±3,1	18,4±3,4
EC / TG	6,3±1,2**	8,8±1,6	9,4±1,6	10,1±1,6	11,8±3,8
Apolipoproteína					
apoA-I (mg/dl)	16,7±5,3**	28,3±3,8***	33,7±3,1***	16,4±3,0***	9,6±1,5
apoA-I (mol/mol HDL)	4,3±0,6***	3,9±0,3***	3,6±0,5**	3,2±0,3	2,9±0,3
apoA-I (mg/mg PT)	0,04±0,01**	0,07±0,01***	0,08±0,01***	0,04±0,01***	0,02±0,003
apoA-II (mol/mol HDL)	0,9±0,4	1,3±0,2***	1,5±0,2***	1,0±0,1**	0,6±0,1
apoA-I/apoA-II	5,7±3,4	2,8±0,6*	2,4±0,2**	3,5±0,5	4,9±1,1

média ± DP; [‡]mt%, porcentagem na massa total. *p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001 vs. HDL3c. sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; CT, colesterol total; FL, fosfolipídios; TG, triglicerídeos; PT, proteínas; apoA-I, apolipoproteínaA-I; apoA-II, apolipoproteínaA-II.

B. ATIVIDADE PROTETORA DAS sHDL CONTRA A TOXICIDADE MITOCONDRIAL INDUZIDA PELA LDLox

Inicialmente, realizamos a análise quantitativa da disfunção mitocondrial com o teste MTT. A figura 5.1 mostra que todas as sHDL protegem de forma significativa as células endoteliais humana contra a toxicidade induzida pela LDLox ($p < 0,01$), havendo incremento na inibição da toxicidade com o aumento da densidade das partículas de HDL.

Utilizando a mesma concentração em proteína (25 $\mu\text{g/ml}$), a subfração pequena e densa HDL3c foi significativamente mais potente em proteger as células endoteliais contra a toxicidade da LDLox ($p < 0,05$), quando comparada às demais subfrações, como HDL3b, HDL3a ($p < 0,05$), HDL2a e HDL2b ($p < 0,05$).

Em adição, a atividade protetora das sHDL demonstrou um padrão dose-dependente quando utilizadas concentrações crescentes (10, 25 e 50 μg de proteína/ml; dado não mostrado).

Para melhor compreensão da atividade protetora das sHDL, foram realizados experimentos (MTT) com sHDL em mesma concentração de proteína, mesma massa total e mesmo número de partículas, e todos os resultados foram re-calculados (Quadro 5.1) para uma mesma quantidade em proteína, massa total e número de partículas (Figura 5.2A-C). Para todos

os diferentes experimentos, a subfração HDL3c foi mais potente contra a toxicidade da LDLox e a subfração HDL2b, a menos potente.

Quadro 5.1 – Cálculo do número de partículas de HDL tomando-se por base a quantidade massa total e quantidade de proteína

$\text{n. part} = \text{mt/MM}$	$\text{n. part} = \text{número de partículas (nmol/ml)}$ $\text{mt} = \text{massa total } (\mu\text{g/ml})$ $\text{MM} = \text{massa molecular } (\mu\text{g/nmol})$
$\text{n. part} = \frac{[\text{PT} \times \text{PT (mt\%)}]}{100} \times \text{MM}$	$\text{n. part} = \text{número de partículas (nmol/ml)}$ $\text{PT} = \text{proteína } (\mu\text{g/ml})$ $\text{PT (mt\%)} = \% \text{ proteína na massa total}$ $\text{MM} = \text{massa molecular } (\mu\text{g/nmol})$

Quando analisados os dados para baixas concentrações de proteína (<25 $\mu\text{g/ml}$) a inibição da toxicidade da LDLox nas células endoteliais foi maior para HDL3c, seguindo a seguinte ordem: HDL3c>HDL3b>HDL3a>HDL2a≈HDL2b. Para altas concentrações de proteína (> 50 $\mu\text{g/ml}$), após a suturação do efeito contra a toxicidade da LDLox, a ordem de inibição foi: HDL3c>HDL3a≈HDL2a>HDL3b> HDL2b (Figura 5.2A).

Em baixas concentrações de massa total das partículas HDL (<200 $\mu\text{g/ml}$), a inibição da toxicidade da LDLox foi maior para HDL3c, seguido de: HDL3b>HDL3a>HDL2a≈HDL2b; enquanto que para altas concentrações em massa total (> 200 $\mu\text{g/ml}$), após a suturação do efeito contra a toxicidade da

LDLox, a ordem de inibição foi: HDL3c>HDL3a>HDL3b>HDL2a>HDL2b (Figura 5.2B).

Por fim, os resultados para baixos valores em número de partículas de HDL (<0,4 μ M) a inibição da toxicidade da LDLox foi maior para HDL3c, seguido de HDL3b>HDL3a>HDL2a>HDL2b. Em presença de maiores quantidades de partículas (<0,4 μ M), a ordem de inibição foi: HDL3c>HDL2a>HDL3a>HDL3a>HDL2b (Figura 5.2C).

Estes achados mostram que em indivíduos normolipidêmicos, ao compararmos partícula por partícula de HDL, a subfração HDL3c é a mais potente em proteger HMEC da toxicidade mitocondrial induzida pela LDLox, enquanto que a HDL2b mostrou-se menos potente, independentemente da concentração na qual as sHDL são expressas.

Toxicidade mitocondrial,
% controle

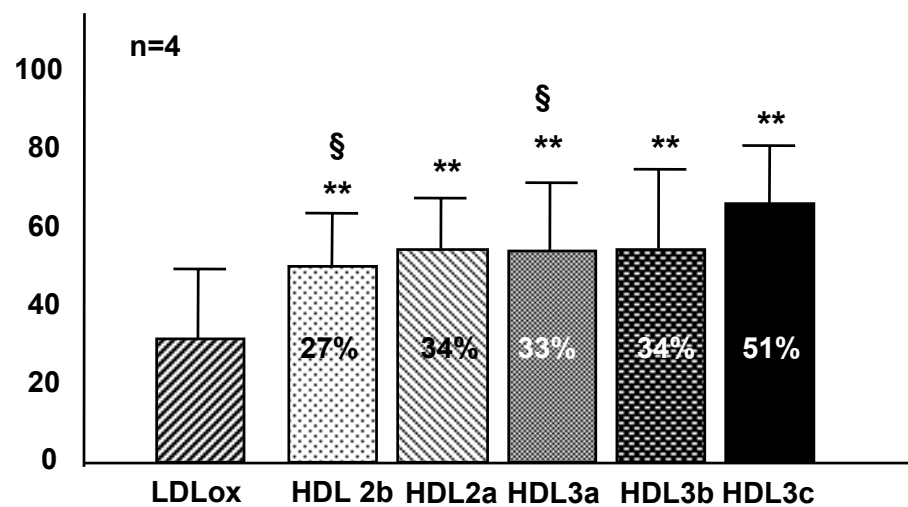


Figura 5.1 – Efeito inibitório das sHDL da toxicidade mitocondrial induzida pela LDLox

A toxicidade mitocondrial foi medida em células HMEC-1 incubadas na ausência ou presença de sHDL (25 µg de proteína/ml) isoladas de indivíduos normolipidêmicos (n=4) e LDLox (200µg apoB-100/ml). Os dados estão apresentados como média ± EP da % controle (considerado 100% de atividade MTT na ausência de LDLox e sHDL) e % proteção (valores nas caixas); ** p< 0,01 vs. oxLDL; § p<0,05 vs. HDL3c. sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em forma oxidada; HMEC-1, células endoteliais microvasculares humanas; MTT, teste de toxicidade mitocondrial.

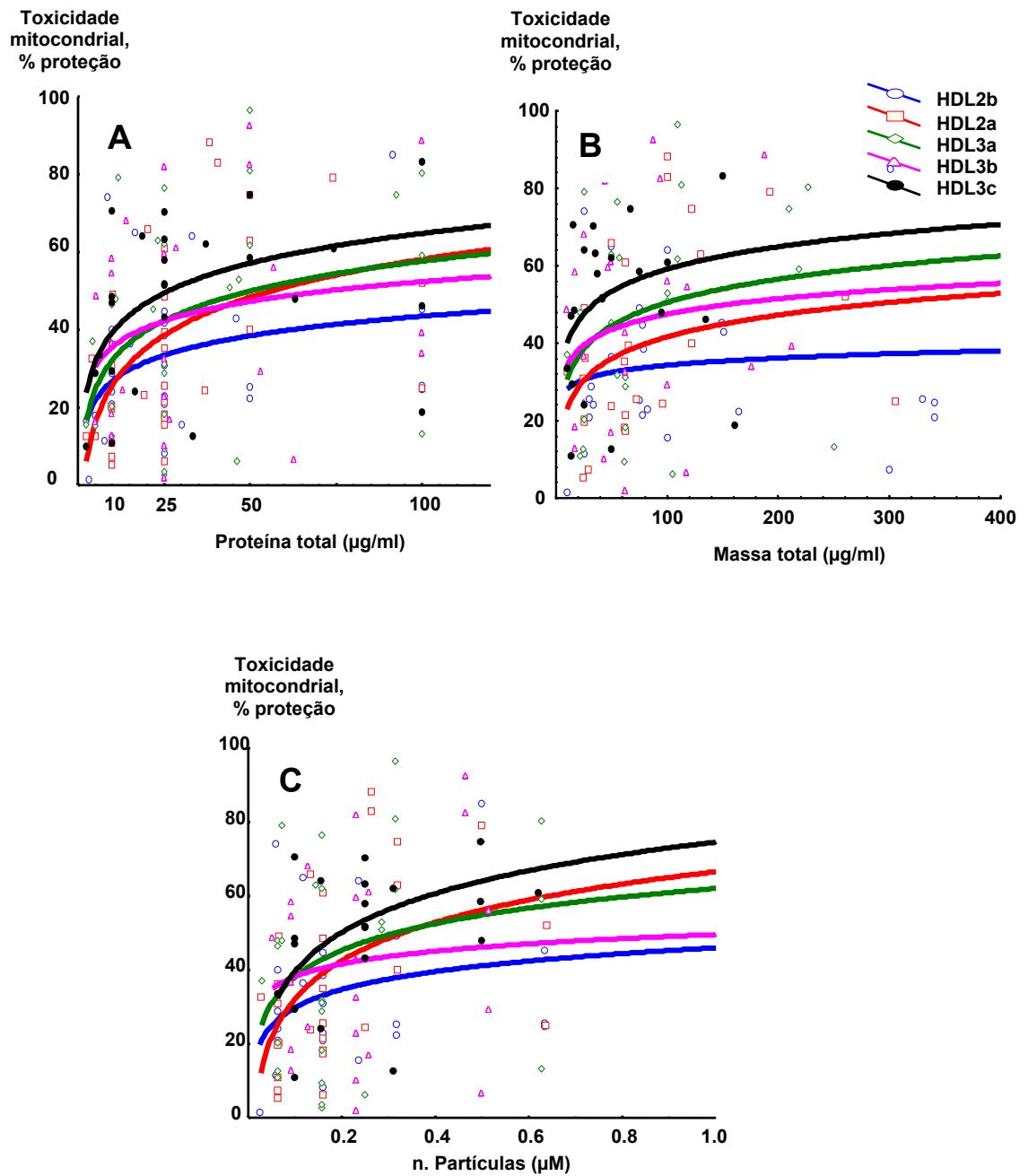


Figura 5.2 – Efeito protetor das sHDL contra a toxicidade mitocondrial (MTT) induzida pela LDLox com base na mesma concentração de proteína (A), mesma massa molecular (B) e mesmo número de partículas (C). Todos os valores referentes à proteção das sHDL isoladas de voluntários normolipidêmicos (n=5) contra a toxicidade mitocondrial induzida pela LDLox estão apresentados e curvas exponenciais foram determinadas para cada sHDL. sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em forma oxidada; MTT, teste de toxicidade mitocondrial.

C. ATIVIDADE PROTETORA DAS sHDL CONTRA A APOPTOSE INDUZIDA PELA LDLox

Os resultados descritos para a toxicidade mitocondrial foram confirmados pela avaliação qualitativa e quantitativa da indução de apoptose induzida pela LDLox. A análise através de microscopia de fluorescência demonstrou que todas as sHDL foram capazes de proteger as células endoteliais humanas contra a apoptose induzida pela LDLox (Figura 5.3).

A figura 5.4 mostra a análise quantitativa da apoptose primária (marcagem com anexina V por citometria de fluxo). Todas as sHDL inibiram a apoptose induzida pela LDLox. Com igual concentração em proteína (25 µg/ml), a subfração HDL3c foi significativamente mais potente em proteger as células endoteliais contra a apoptose induzida pela LDLox ($p < 0,001$), quando comparada às subfrações HDL3b ($p < 0,05$), HDL3a ($p < 0,01$), HDL2a ($p < 0,01$) e HDL2b ($p < 0,01$).

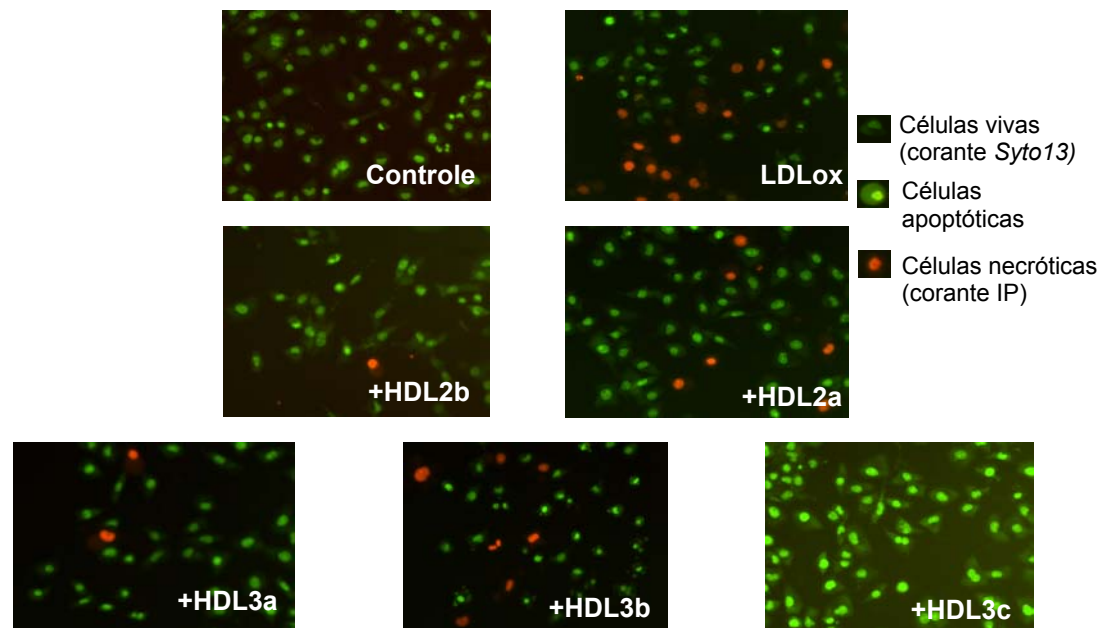


Figura 5.3 – Atividade anti-apoptótica das sHDL isoladas de indivíduos normolipidêmicos

HMEC-1 foram pré-incubadas na ausência ou presença de sHDL (100 µg de proteína/ml) e incubadas com LDLox, conforme figura 5.1. Realizada microscopia de fluorescência com corantes fluorescentes (SYTO-13 e IP). A viabilidade celular está apresentada conforme descrito (legenda); n=3 experimentos independentes. sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em forma oxidada; HMEC-1, células endoteliais microvasculares humanas; SYTO-13, corante fluorescente verde; IP, iodeto de propidium.

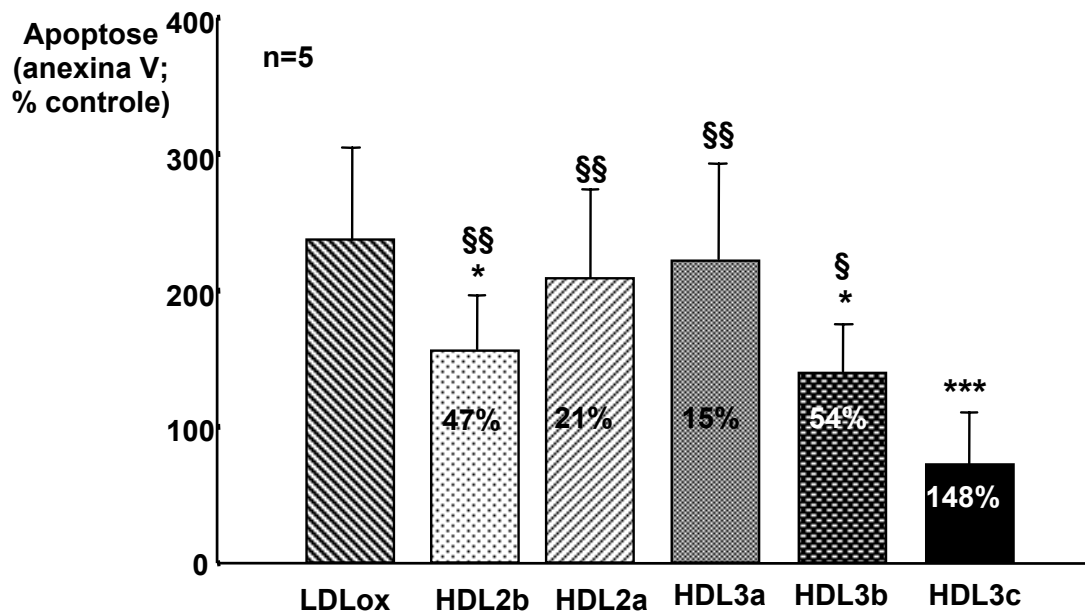


Figura 5.4 – Atividade anti-apoptótica das sHDL isoladas de voluntários normolipidêmicos (n=5) determinada pela marcação com anexina V

HMEC-1 foram incubadas conforme figura 1; os dados são apresentados como média \pm EP da % de controle (considerado 100% de marcação com anexina V na ausência de LDLox e sHDL) e % de proteção (valores nas caixas); * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs. LDLox; § $p < 0,05$ e §§ $p < 0,01$ vs. HDL3c. sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em forma oxidada.

D. SUBFRAÇÕES PEQUENAS E DENSAS DA HDL SÃO POTENTES INIBIDORAS DA ATIVAÇÃO DA CASCATA INTRACELULAR DE APOPTOSE INDUZIDA PELA LDLox EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS

D.1 LIBERAÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DO cit c E DO AIF

As células endoteliais incubadas com LDLox apresentam liberação de cit c e AIF a partir da mitocôndria no citoplasma, fato que desencadeia eventos intracelulares que culminam com apoptose. Através da análise por *western blot*, avaliamos a capacidade das sHDL em inibir a liberação de cit c e AIF no citoplasma celular a partir da mitocôndria. As sHDL 2b e 3c foram capazes de inibir a liberação de cit c (Figura 5.5A) e AIF (Figura 5.5B) induzida pela LDLox. Tendo como base a mesma concentração em proteína (25 µg/ml), a subfração pequena e densa HDL3c foi mais potente do que a subfração HDL2b em proteger a liberação de cit c e AIF induzida pela LDLox.

D.2 DEGRADAÇÃO DE Bid

As células endoteliais cultivadas na presença de LDLox apresentam degradação de Bid em tBid, o qual induz disfunção mitocondrial e estimula a liberação fatores pró-apoptóticos da mitocôndria para o citoplasma, como o cit c. Através da análise por *western blot*, avaliamos a capacidade das sHDL em inibir a degradação de Bid. As sHDL 2b e 3c foram capazes de inibir a degradação de Bid em tBid (Figura 5.5C) e, tendo como base a mesma concentração em proteína (25 µg/ml), a subfração pequena e densa HDL3c foi mais potente do que a subfração HDL2b em inibir a degradação de Bid induzida pela LDLox.

D.3 ATIVAÇÃO DA CASCATA CASPASE

A LDL moderadamente oxidada induz nas células endoteliais a ativação do sistema enzimático das caspases, que tem como via comum final a ativação da enzima caspase-3¹⁹, responsável por induzir fragmentação do DNA e morte celular. Em nosso estudo, a análise da atividade da enzima caspase-3 demonstrou que todas as subfrações HDL inibiram a ativação desta enzima induzida pela LDLox ($p < 0,05$; Fig 5.6). Tendo como base a mesma concentração em proteína (25µg/ml), a

subfração pequena e densa HDL3c (139%) foi mais potente em inibir a ativação da caspase-3 quando comparada às subfrações HDL2a (104%; $p < 0,01$ vs HDL3c) e 2b (110%; $p < 0,05$ vs HDL3c).

D.4 FRAGMENTAÇÃO DO ADN

A LDLox é capaz de induzir a degradação do ADN e fragmentação da núcleo celular, levando à apoptose^{18,19}. Quantificamos em nosso estudo a fragmentação do ADN através de sonda fluorescente (DAPI), sendo demonstrado que todas as subfrações HDL inibiram a degradação do ADN induzida pela LDLox ($p < 0,05$; Figura 5.6). Com concentração de proteína semelhante (25 μ g/ml), as subfrações pequenas e densas HDL3c (151%; $p < 0,05$ vs LDLox) e 3b (132%; $p < 0,05$ vs LDLox) foram mais potentes na redução da fragmentação do ADN induzida pela LDLox do que as subfrações HDL3a (77%), 2a (74%) e 2b (60%).

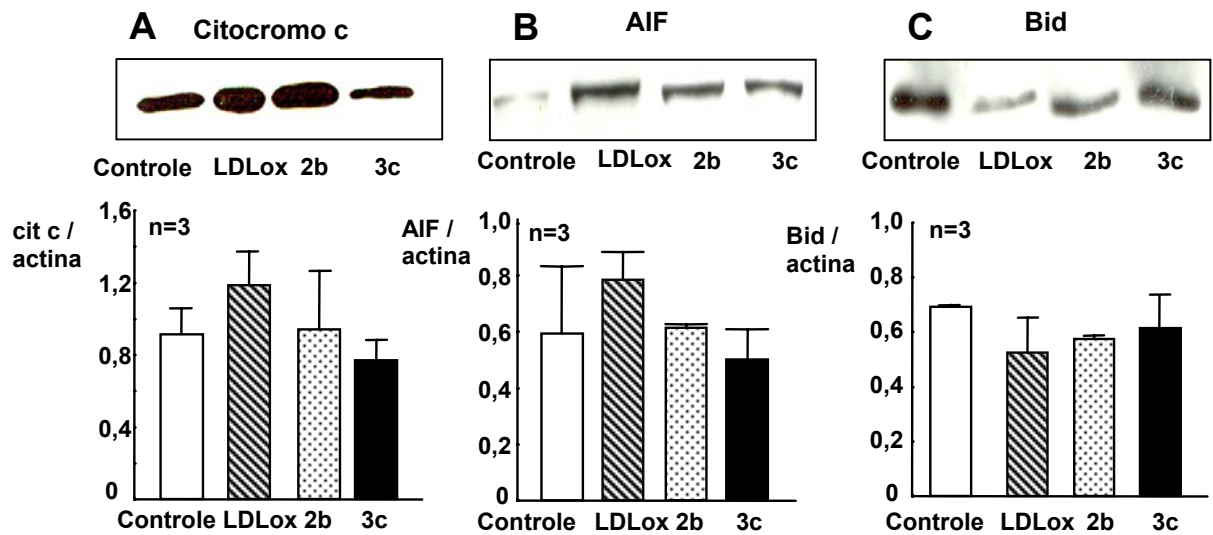


Figura 5.5 – Efeito inibitório das subfrações HDL2b e HDL3c na liberação de cit c (A) e AIF (B) e na degradação de Bid (C) no citoplasma de células endoteliais induzidas pela LDLox

HMEC-1 incubadas com sHDL 2b e 3c e LDLox conforme descrito. *Western Blot* para a identificação de cit c, AIF e Bid intracelulares. Os dados estão apresentados como intensidade média \pm EP das bandas de *blot* (n=3). Os resultados foram corrigidos para actina. HDL, lipoproteína de alta densidade; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em forma oxidada; cit c, citocromo c; AIF, fator indutor de apoptose; Bid, proteína inibidora de apoptose; HMEC-1, células endoteliais microvasculares humanas

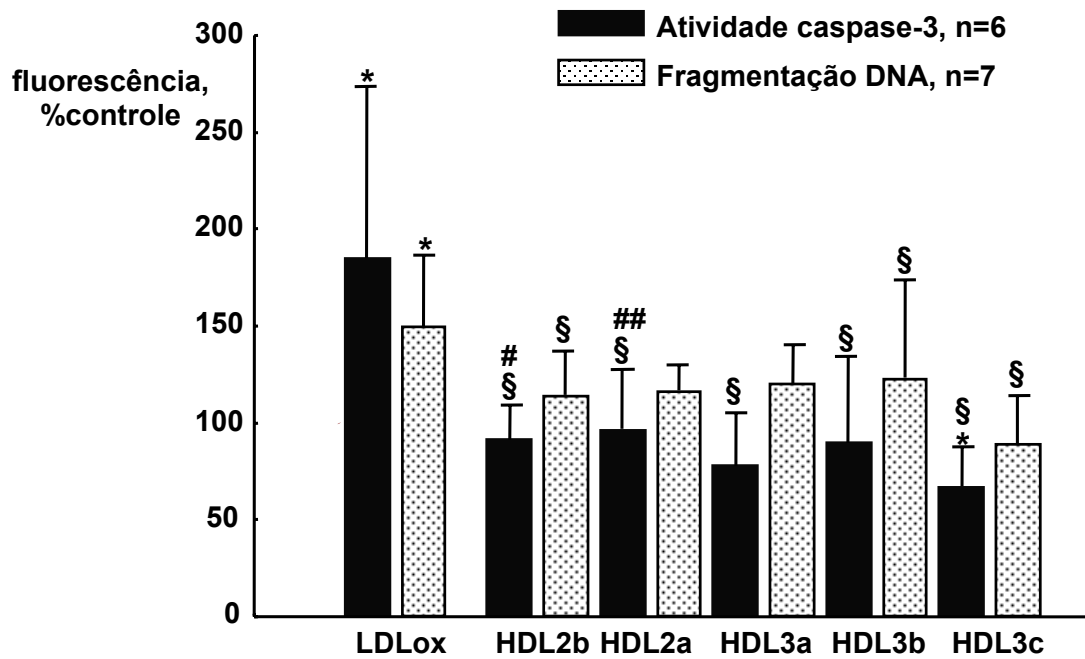


Figura 5.6 – Efeito inibitório das sHDL contra a ativação da caspase-3 (n=6) e a fragmentação do ADN (n=7) induzidas pela LDLox

HMEC-1 incubada com sHDL e LDLox conforme descrito. Os dados são expressos como média ± EP da % do controle (considerado 100% da atividade caspase e fragmentação do ADN na ausência de LDLox e sHDL); * p<0,05 vs. controle; § p<0,05 vs. LDLox; # p<0,05 e ## p<0,01 vs. HDL3c. sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em forma oxidada; ADN, ácido desoxirribonucléico.

E. EFEITO INIBITÓRIO DAS sHDL NA GERAÇÃO DE ROS INDUZIDA PELA LDLox

É sabido que a morte celular induzida pela LDLox tem como uma das vias principais o estímulo à produção de ROS e radicais livres dentro da célula¹⁹. Avaliamos em nosso estudo a capacidade das sHDL em inibirem a geração de ROS e se esta atividade antioxidante intracelular apresenta padrão heterogêneo, como o demonstrado para a atividade anti-apoptótica pelo atual estudo. Todas as sHDL protegeram as células endoteliais contra a geração de ROS induzida pela LDLox (Figura 5.7), havendo incremento na inibição com o aumento da densidade das partículas de HDL. Utilizando-se a mesma concentração em proteína (25µg/ml), a subfração pequena e densa HDL3c (54%; $p < 0,05$ vs. LDLox) foi significativamente mais potente em reduzir a produção de ROS, quando comparada com as demais subfrações. Além disso, a atividade antioxidante intracelular das sHDL demonstrou um padrão dose dependente quando utilizadas concentrações crescentes das subfrações de HDL (10, 25 e 50 µg de proteína/ml; dado não mostrado).

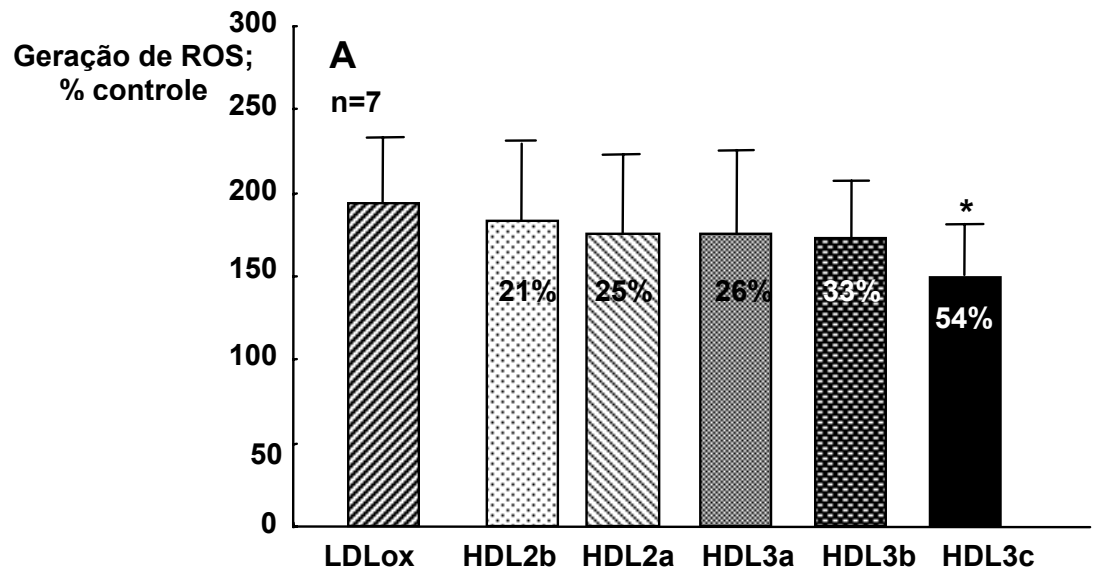


Figura 5.7 – Inibição pelas sHDL da geração de ROS induzida pelo LDLox

HMEC-1 incubadas com sHDL(n=7) e LDLox conforme descrito. Geração de ROS medida com substrato fluorescente H^2DCFDA . Os dados estão apresentados como média \pm EP da % controle (considerado com 100% da geração de ROS na ausência de LDLox e sHDL)[0]; * $p < 0.05$ vs. LDLox. sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em forma oxidada; ROS, espécies reativas de oxigênio; H^2DCFDA , diacetato 2',7'-diclorofluoresceína.

F. MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA HETEROGENEIDADE DA ATIVIDADE ANTI-APOPTÓTICA DAS sHDL

Para elucidação do mecanismo molecular envolvido na atividade anti-apoptótica das subfrações pequenas e densas da HDL, determinamos possíveis substâncias reponsáveis pela capacidade de inibir a morte celular por apoptose. Um dos componentes da HDL possivelmente envolvido nesta atividade, a esfingosina 1-fosfato (E1F), foi quantificada nas sHDL, e sua atividade anti-apoptótica analisada. Além disso, avaliamos o papel do receptor SR-BI nesta atividade protetora das sHDL.

F.1 CONTEÚDO DE E1F NAS sHDL

As sHDL foram isoladas do soro de cinco doadores normolipidêmicos e o conteúdo de E1F foi analisado por HPLC. Os resultados demonstraram que quando comparadas tendo por base mesmo número de partículas, as subfrações pequenas e densas da HDL3b ($p < 0,001$) e HDL3c ($p < 0,01$) são significativamente mais ricas em E1F (Figura 5.8A) do que as subfrações HDL2b e HDL2a.

O conteúdo de E1F correlacionou-se (Pearson, n=25; 5 diferentes sHDL de 5 indivíduos distintos) fortemente com a atividade anti-apoptótica das sHDL, determinada pela marcação com anexina V, com $r=0,564$ e significância de $p=0,01$ (Figura 5.8B), e com a atividade antioxidante intracelular com $r=0,587$ e $p=0,007$ (Figura 5.8C).

F.2 ATIVIDADE ANTI-APOPTÓTICA DA E1F

F.2.1 Atividade anti-apoptótica da E1F em concentrações fisiológicas carregada pela albumina

Para avaliar a atividade anti-apoptótica da E1F em concentrações fisiológicas e carregada pela albumina, células endotéliais humanas foram incubadas com E1F a concentrações finais crescentes 1 à 1000 nM diluída em BSA 0.4%. Usando-se concentrações fisiológicas e albumina como carreadora, E1F não se mostrou eficaz em proteger as células endotéliais contra apoptose induzida pela LDLox (Figura 5.9).

F.2.2 Atividade anti-apoptótica da E1F em concentrações fisiológicas utilizando-se sHDL como carreadoras

Para avaliar a atividade anti-apoptótica da E1F em concentrações fisiológicas, carregada pelas sHDL, células endotéliais humanas foram incubadas com sHDL enriquecidas com E1F (5 μM) ou sHDL controle. O

conteúdo de E1F foi analisado por HPLC (Figura 5.10A), sendo observado maior enriquecimento com E1F das subfrações que continham menores quantidades deste fosfolípido, como as subfrações HDL2b e 2a.

Para todas as subfrações houve incremento na proteção das células endoteliais contra a apoptose induzida pela LDLox (Figura 5.10B), sendo mais importante para as subfrações grandes e menos densas HDL2b, 2a e 3a. A redução do número de células em apoptose correlacionou-se fortemente com o conteúdo de E1F nas sHDL, com $r=-0,3816$ e $p=0,008$ (Pearson, $n=15$; 05 diferentes sHDL em 03 experimentos independentes; figura 5.10C).

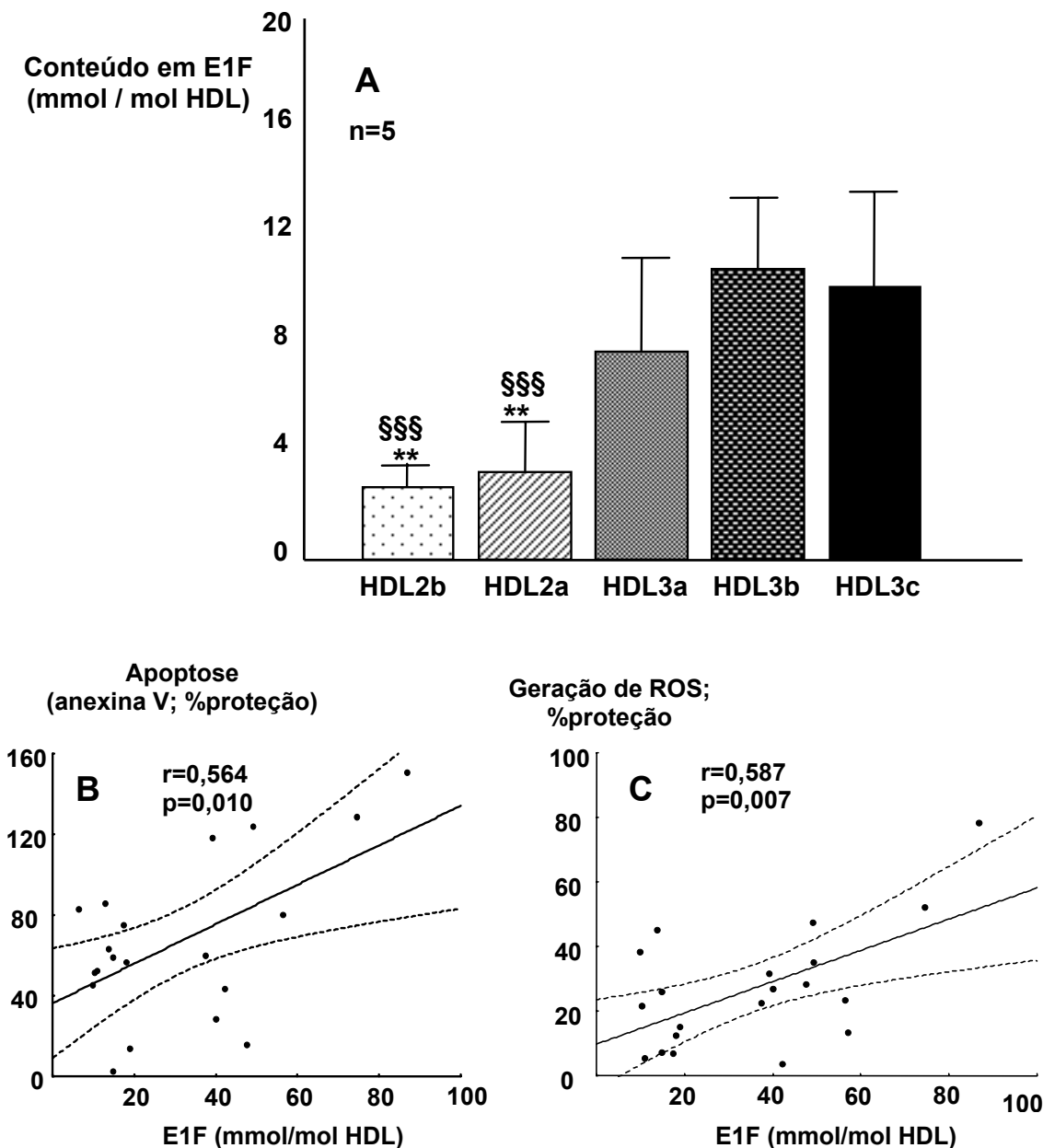


Figura 5.8 – Conteúdo em E1F das sHDL (n=5; A) e correlação entre o conteúdo em E1F e a atividade protetora das sHDL contra a apoptose (B) e a geração de ROS (C) induzidas pela LDLox

Média ± EP do conteúdo de E1F (HPLC; mmol/mol HDL); ** p<0,01 vs. HDL3c; §§§ p<0,01 vs. HDL3b (A). Correlação entre todos os valores de % proteção das sHDL contra a apoptose (B) e a geração de ROS (C). E1F, esfingosina-1-fosfato; sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em sua forma oxidada; ROS, espécies reativas de oxigênio.

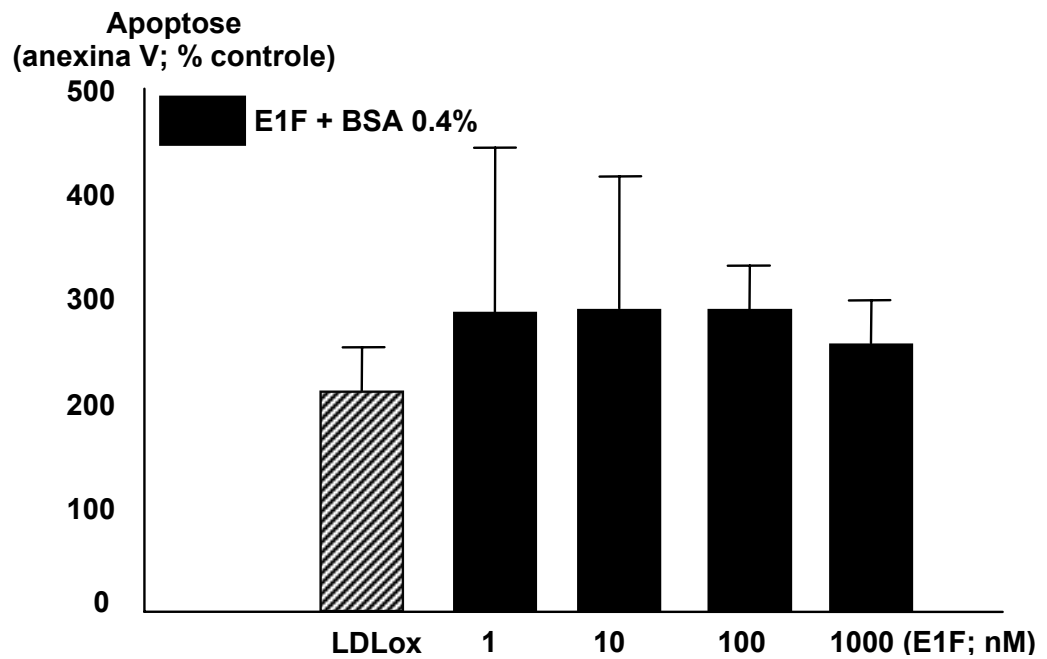


Figura 5.9 – Atividade anti-apoptótica da E1F em concentrações fisiológicas utilizando-se albumina como carreador

A atividade anti-apoptótica da E1F foi determinada por marcagem anexina V. Os dados estão apresentados como média \pm EP da % controle (considerado 100% marcagem anexina V na ausência de LDLox e E1F). E1F, esfingosina-1-fosfato; BSA, albumina; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em forma oxidada.

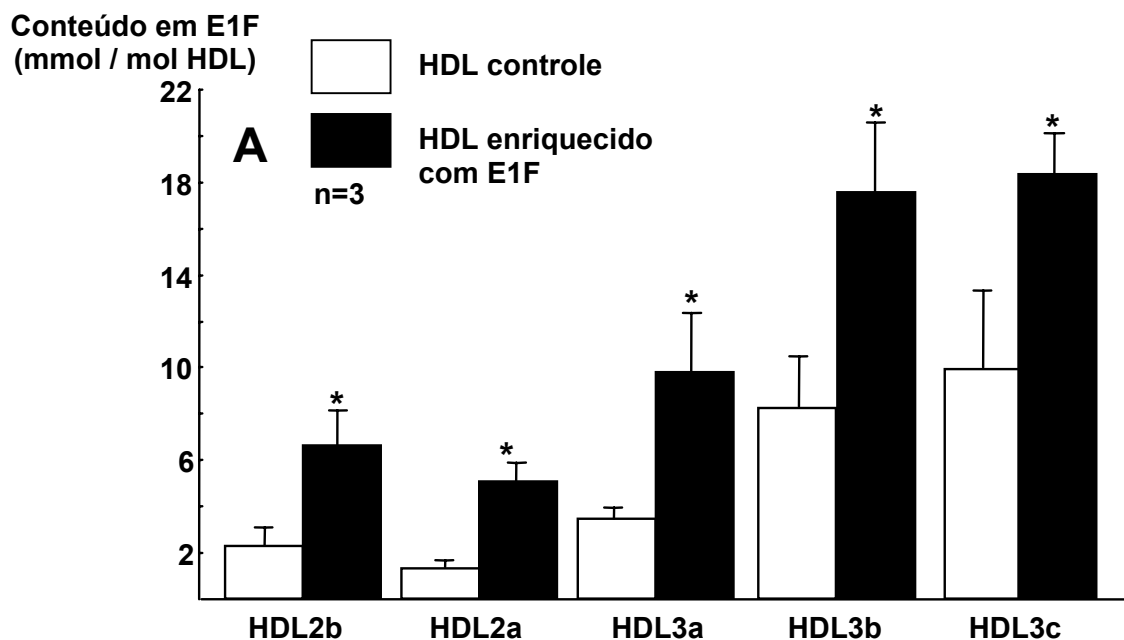


Figura 5.10-A

Figura 5.10 – Conteúdo em E1F (A), atividade anti-apoptótica (B) e correlação com conteúdo de E1F e atividade anti-apoptótica (C) das sHDL enriquecidas com E1F (Figura 5.10- B e C - ver próxima página)

Média \pm EP do conteúdo de E1F (mmol/mol HDL) em cada sHDL enriquecida ou não com E1F; ** $p < 0,01$ vs. HDL3c; §§§ $p < 0,01$ vs. HDL3b (A). Atividade anti-apoptótica avaliada pela marcagem com anexina V (B) e sua correlação com o conteúdo de E1F (C). Os resultados são representativos de 03 experimentos independentes; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. HDL controle. E1F, esfingosina-1-fosfato; sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em forma oxidada.

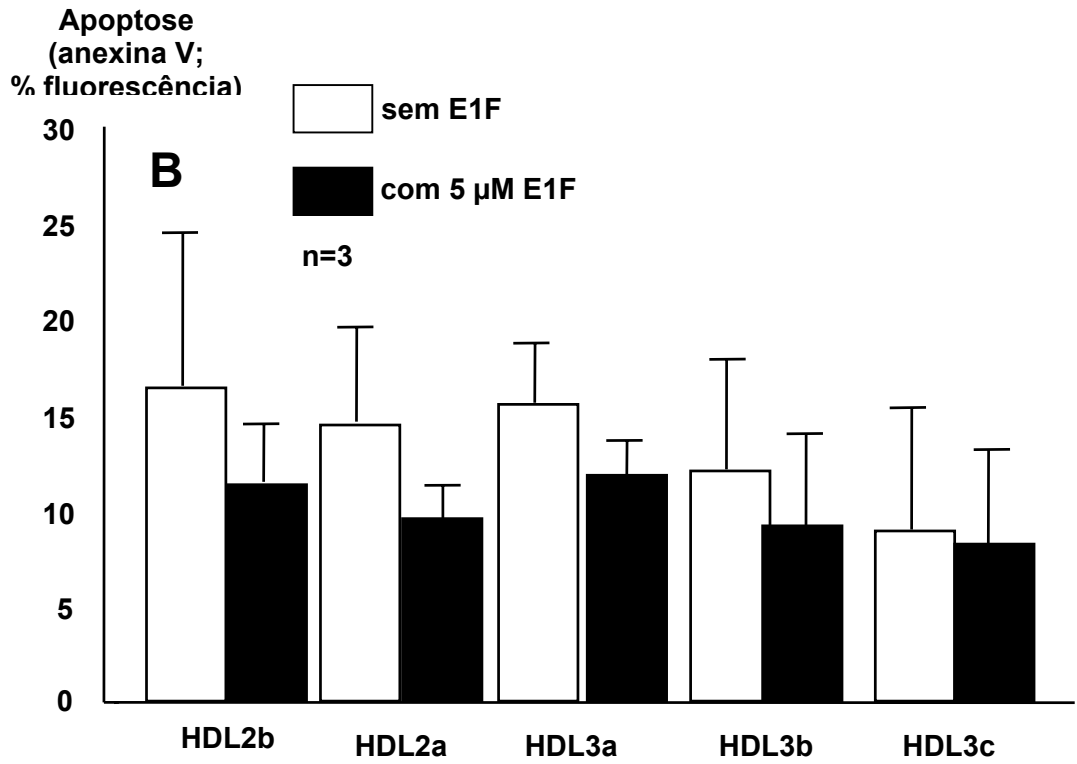


Figura 5.10-B

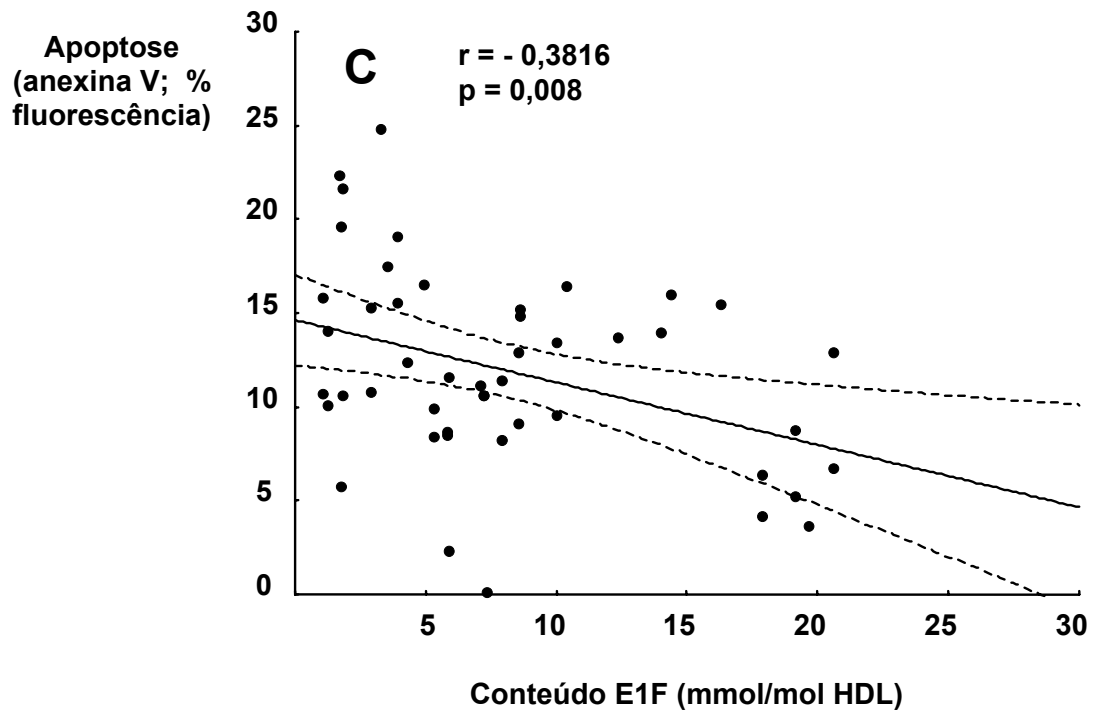


Figura 5.10.C

F.3 PAPEL DO RECEPTOR SCAVENGER SR-BI

Para avaliar uma das principais vias de interação das sHDL com as células endoteliais humanas, o receptor SR-BI, as HMEC foram pré-incubadas com anticorpo anti-SR-BI, seguida de incubação com sHDL3c e HDL total. A toxicidade mitocondrial induzida com LDLox foi avaliada (teste MTT) com o pré-tratamento das células endotélias com anticorpo anti-SR-BI. O anti-SR-BI não influenciou a atividade pró-apoptótica da LDLox, contudo reduziu em aproximadamente 35% e 25% a capacidade de proteção contra toxicidade mitocondrial da subfração HDL3c e da HDL total, respectivamente (Fig 5.11).

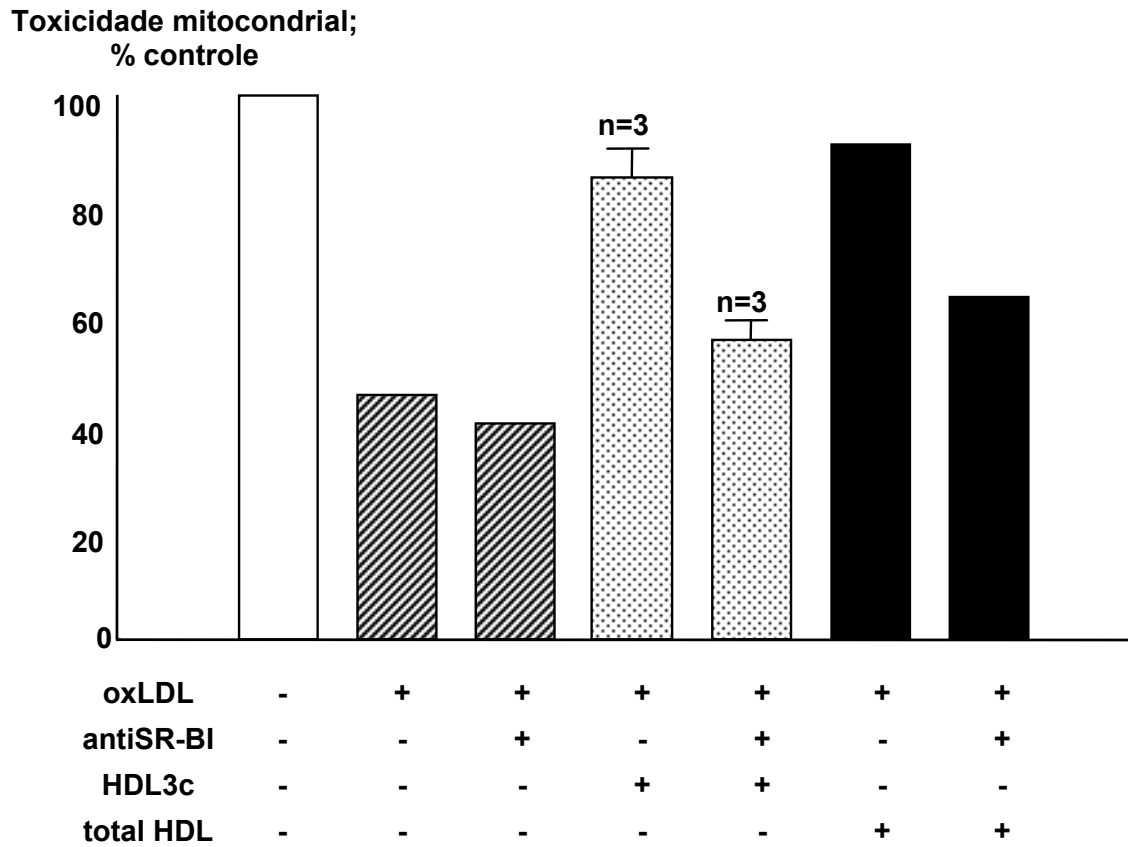


Figura 5.11 – Efeito da inibição do receptor SR-BI na atividade protetora da subfração HDL3c

Média \pm EP da toxicidade mitocondrial induzida pela LDLox (MTT; % do controle, considerado como 100% da atividade mitocondrial na ausência de anti-SR-BI, LDLox, HDL total e sHDL3).

Anti-SR-BI, anticorpo anti SR-BI; sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em forma oxidada.

G. ATIVIDADE ANTI-APOPTÓTICA E ANTIOXIDANTE INTRACELULAR DAS sHDL ISOLADAS DE PACIENTES COM SMet

G.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram selecionados de forma consecutiva e aleatória pacientes com diagnóstico de SMet (n=16). Todos os pacientes recrutados apresentavam os critérios para SMet definidos pela *NCEP/ATPIII*^{73,74} e apresentavam importante grau de resistência à insulina e elevado índice HOMA (3 e 4 vezes, respectivamente, quando comparado aos controles). Nenhum dos indivíduos controles (n=7) apresentavam características clínico-laboratoriais para o diagnóstico de SMet. Os pacientes com SMet apresentavam aumento significativo da circunferência abdominal (+26%, $p < 0,001$ vs. controle), do índice de massa corpórea (IMC; +35%, $p < 0,001$ vs. controle), dos níveis de CT (+25%, $p < 0,05$ vs. controle), TG (+149%, $p < 0,001$ vs. controle) e apoB-100 (+56%, $p < 0,001$ vs. controle); assim como redução significativa dos níveis de HDL-C (-20%, $p < 0,05$ vs. controle; Tabela 5.2).

Ao contrário, não houve diferença entre os dois grupos quanto a idade, pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) e níveis plasmáticos de glicose. Apesar de não haver diferença estatisticamente significante, os pacientes com SMet apresentavam elevados níveis de LDL-C (+28%) e reduzidos de apoA-I (-14%; Tabela 5.2). A razão entre CT total e HDL-C foi

significativamente maior nos pacientes com SMet ($p < 0,001$). Os pacientes com SMet apresentavam atividade inflamatória sistêmica 4 vezes maior que nos controle normolipidêmicos, detectada pela dosagem sérica de PCRus ($p < 0,05$ vs. controle).

G.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS sHDL DE PACIENTES COM SMet COMPARADOS AOS CONTROLES NORMOLIPIDÊMICOS

Confirmando dados da literatura⁶⁶, nossos resultados demonstraram que as subfrações HDL2a e 3a são predominantes quando analisadas em relação a sua concentração molar e em massa total, tanto nos indivíduos controles como nos pacientes com SMet (Tabela 5.3). Nos controles, as concentrações das sHDL seguem a decrescente ordem: HDL2a ≈ HDL3a > HDL2b ≥ HDL3b > HDL3c. Os pacientes com SMet apresentam concentrações significativamente menores de HDL2b, tanto em concentração molar ($p < 0,01$) quanto em massa total ($p < 0,05$). Os níveis circulantes de HDL3c ($p < 0,05$) estão reduzidos em pacientes com SMet (Tabela 5.3).

A composição química das sHDL é heterogênia quando comparados os dois grupos estudados (Tabela 5.3). Com o aumento da densidade e redução do tamanho das sHDL, ocorre progressiva redução do conteúdo percentual da fração lipídica e aumento da quantidade de proteínas, em

ambos os grupos estudados. As sHDL isoladas de pacientes com SMet possuem significativo aumento da quantidade percentual TG e redução significativa do colesterol livre (CL) e ésteres de colesterol (EC), com consequente redução significativa da relação entre a quantidade de EC e TG ($p < 0,001$; Tabela 5.3).

Não há diferença na quantidade de fofolipídios (FL) e proteínas das sHDL dos dois grupos analisados, com uma tendência a aumento na quantidade de proteínas nas sHDL isoladas dos pacientes com SMet. Contudo, as sHDL isoladas de pacientes com SMet apresentam redução significativa do seu conteúdo em apoA-I, quando comparadas ao grupo controle (Figura 5.12). Ao contrário, nenhuma diferença foi encontrada no conteúdo de apoA-II nos dois grupos estudados (dado não mostrado).

Como descrito anteriormente em nosso estudo, o conteúdo de E1F das sHDL aumenta marcadamente com o aumento da densidade. Contudo, quando analisado o conteúdo de E1F nas subfrações HDL2b e 3c isoladas de pacientes com SMet, não foi demonstrada diferença em comparação ao controle (Tabela 5.3).

G.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS sHDL3b E HDL3c DE PACIENTES COM SMet COMPARADOS AOS CONTROLES NORMOLIPIDÊMICOS

Avaliamos a atividade antioxidante das subfrações HDL3b e 3c através da adição à LDL incubada com AAPH (indutor de oxidação). A taxa e a duração da oxidação da LDL na fase de propagação, assim como a quantidade máxima de dienos conjugados produzida, foram determinadas em presença ou não das sHDL. Em concordância com os resultados de Hansel e colaboradores⁶⁶, a atividade antioxidante das subfrações pequenas e densas HDL3b ($p < 0,05$ vs. controle) e HDL3c estão deprimidas nos pacientes com SMet (Tabela 5.4).

A atividade antioxidante das subfrações HDL3b ($r = -0,42$, $p = 0,01$) e HDL3c ($r = -0,35$, $p = 0,04$) correlacionou-se negativamente com o conteúdo de TG e positivamente com a razão molar apoA-I/apoA-II ($r = 0,58$, $p = 0,003$; e $r = 0,62$, $p = 0,001$; respectivamente para HDL3b e HDL3c). Contudo, não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre a capacidade das sHDL inibirem a oxidação da LDL com as respectivas atividades anti-apoptótica e antioxidante intracelular (dado não mostrado).

Tabela 5.2 - Caracterização clínica da população do estudo

	Controles Normolipidêmicos (n=7)	Pacientes Smet (n=16)
Idade (anos)	46 ± 12	53 ± 10
Circunferência abdominal (cm)	85 ± 7	107 ± 12***
IMC (kg/m²)	23 ± 2	31 ± 5 ***
Glicose (mg/dl)	96 ± 4	125 ± 51
HbA1c (%)	5,2 ± 0,1	6,6 ± 1,9
Insulina (µUI/ml)	5,7 ± 1,7	16,2 ± 8,9
HOMA	2,3 ± 0,6	9,2 ± 7,3
PAS (mmHg)	123 ± 10	132 ± 13
PAD (mmHg)	77 ± 9	80 ± 12
CT Total (mg/dl)	191 ± 24	238 ± 50 *
TG (mg/dl)	82 ± 8	204 ± 79 ***
HDL-C (mg/dl)	55 ± 9	44 ± 8 *
LDL-C (mg/dl)	120 ± 23	154 ± 47
VLDL-C (mg/dl)	16 ± 2	39 ± 12 ***
ApoA-I (mg/dl)	159 ± 16	136 ± 23
ApoB-100 (mg/dl)	85 ± 19	133 ± 24 ***
PCRus (mg/l)	0,52 ± 0,3	2,64 ± 2,6*

Média ± DP; *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 vs. controle.

IMC, índice de massa corpórea; HbA1c, hemoglobina glicosilada; HOMA, índice do modelo de avaliação da homeostase da resistência insulínica; PCRus, proteína C-reativa ultra sensível.

Tabela 5.3 – Concentração plasmática e composição química das sHDL conforme população estudada

	Group	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Ct HDL (μ M)	Controles	1,5 \pm 0,4	1,8 \pm 0,1	2,0 \pm 0,5	1,5 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1
	SMet pacientes	0,7 \pm 0,3**	1,6 \pm 0,5	2,0 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1*
MT (mg/dl)	Controles	60,1 \pm 7,7	74,6 \pm 4,3	74,0 \pm 8,7	32,8 \pm 4,7	18,9 \pm 1,8
	SMet pacientes	43,0 \pm 17,0*	65,3 \pm 16,0	69,3 \pm 11,0	30,1 \pm 5,7	17,3 \pm 2,6
CT (mt %)	Controles	22,3 \pm 2,5	18,5 \pm 2,2	16,8 \pm 1,7	15,3 \pm 2,0	12,9 \pm 2,0
	SMet pacientes	19,7 \pm 2,9*	14,1 \pm 2,8**	13,4 \pm 2,4**	11,7 \pm 2,0***	10,1 \pm 1,8**
EC (mt %)	Controles	26,1 \pm 3,5	23,6 \pm 3,1	22,4 \pm 2,7	21,4 \pm 3,1	18,4 \pm 3,4
	SMet pacientes	22,1 \pm 5,1	18,2 \pm 4,7*	17,9 \pm 3,9*	16,3 \pm 3,0**	14,7 \pm 3,0*
CL (mt %)	Controles	6,7 \pm 0,6	4,3 \pm 0,4	3,4 \pm 0,3	2,5 \pm 0,2	1,9 \pm 0,4
	SMet pacientes	6,1 \pm 1,3	3,3 \pm 0,5***	2,7 \pm 0,5**	2,0 \pm 0,4**	1,3 \pm 0,6*
FL (mt %)	Controles	32,1 \pm 2,9	32,9 \pm 1,6	30,3 \pm 1,7	25,7 \pm 1,5	19,8 \pm 2,5
	SMet pacientes	28,3 \pm 4,5	33,5 \pm 3,1	29,5 \pm 2,8	24,2 \pm 4,2	17,9 \pm 5,3
TG (mt %)	Controles	4,3 \pm 0,9	2,7 \pm 0,4	2,4 \pm 0,3	2,1 \pm 0,3	1,7 \pm 0,6
	SMet pacientes	10,9 \pm 3,9***	5,5 \pm 2,0**	5,1 \pm 1,7***	4,6 \pm 1,7**	4,7 \pm 2,4***
PT (mt %)	Controles	30,8 \pm 1,7	36,4 \pm 3,3	41,5 \pm 3,7	48,2 \pm 3,8	58,2 \pm 4,8
	SMet pacientes	32,7 \pm 3,7	39,5 \pm 3,8	44,8 \pm 4,5	52,9 \pm 3,2**	61,4 \pm 4,7
EC / TG	Controles	6,3 \pm 1,2	8,8 \pm 1,6	9,4 \pm 1,6	10,1 \pm 1,6	11,8 \pm 3,8
	SMet pacientes	2,3 \pm 1,1***	3,7 \pm 1,7***	3,9 \pm 1,5***	4,3 \pm 2,9***	4,1 \pm 2,3***
MR (KDa)	Controles	460 \pm 20	417 \pm 30	382 \pm 39	222 \pm 30	174 \pm 23
	SMet pacientes	516 \pm 10	376 \pm 29	346 \pm 22	207 \pm 18	175 \pm 17
E1F (mol/mol HDL)	Controles	12,8 \pm 5,3	11,5 \pm 2,3	36,1 \pm 12,1	57,6 \pm 13,3	43,6 \pm 25,5
	SMet pacientes	12,4 \pm 4,7				38,7 \pm 15,7

As sHDL foram isoladas do soro de indivíduos normolipidêmicos (n=7) e de pacientes com SMet (n=16). Foram dosados CT, CL, FL, TG e PT. A concentração plasmática, massa total e éster de CT foram calculados conforme descrito. Média \pm DP da concentração (Ct HDL) e massa total (mt) e das porcentagens de cada componente químico na massa total das sHDL. A relação entre a quantidade de EC e TG está representada. * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001 vs. controle correspondente. sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; SMet, síndrome metabólica; CT, colesterol total; FL, fosfolipídios; TG, triglicerídeos; PT, proteínas; MR, massa relativa; E1F, esfingosina-1-fosfato.

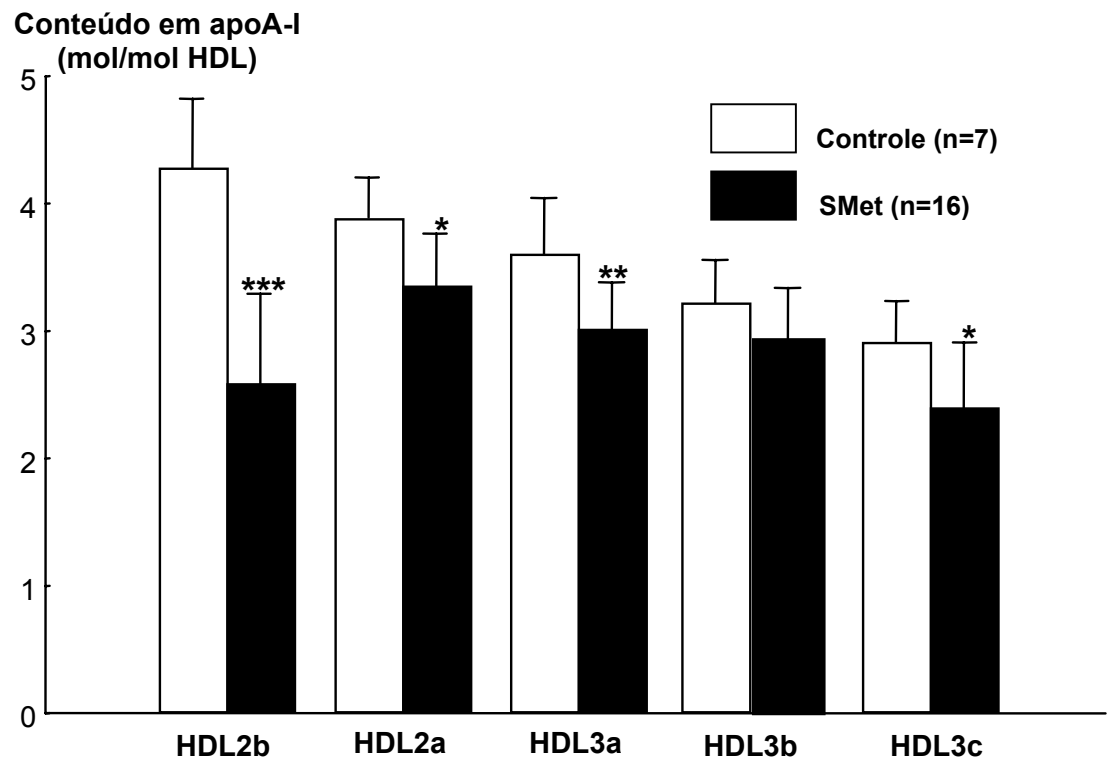


Figura 5.12 – Conteúdo em apoA-I das sHDL em pacientes com SMet

ApoA-I foi dosada nas sHDL de voluntários normolipidêmicos (n=7) e pacientes com SMets (n=16). Média \pm EP do conteúdo em apoA-I (mol/mol HDL); *p<0,05; **p< 0,01 e ***p< 0.001 vs. controle correspondente. ApoA-I, apolipoproteínaA-I; sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; SMet, síndrome metabólica.

Table 5.4 – Atividade antioxidante das subfrações HDL3b e 3c na população estudada

	Controles normolipidêmicos (n=7)		Pacientes SMet (n=16)	
	HDL3b	HDL3c	HDL3b	HDL3c
Taxa de oxidação na fase de propagação, % LDL isolado	73 ± 28	75 ± 33	100 ± 16*	83 ± 16
Duração da oxidação na fase de propagação, % LDL isolado	137 ± 48	139 ± 70	99 ± 21*	112 ± 22
Quantidade máxima de dienos conjugados, % LDL isolado	99 ± 5	96 ± 8	104 ± 7	97 ± 10

Média ± DP da velocidade e duração da oxidação da LDL durante a fase de propagação e da quantidade máxima de dienos conjugados produzida; * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001 vs. controle correspondente. sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; SMet, síndrome metabólica; LDL, lipoproteína de baixa densidade.

G.4 ATIVIDADE ANTI-APOPTÓTICA DAS SUBFRAÇÕES PEQUENAS E DENSAS HDL3 EM PACIENTES COM SMet COMPARADOS A INDIVÍDUOS NORMOLIPIDÊMICOS

A atividade anti-apoptótica das sHDL isoladas indivíduos normolipidêmicos (n=5) e de pacientes com SMet (n=5) foi avaliada. Todas as sHDL isoladas, tanto de indivíduos normolipidêmicos quanto de pacientes com SMet, são capazes de inibir a apoptose induzida pela LDLox (Figura 5.13). As sHDL isoladas dos controles normolipidêmicos demonstraram semelhante padrão de proteção contra a apoptose descrita anteriormente

neste estudo. As subfrações HDL2b (67% de inibição, $p < 0,001$ vs. LDLox), 3b (67%, $p < 0,01$ vs. LDLox) e 3c (120%, $p < 0,001$ vs. LDLox), apresentaram atividade anti-apoptótica mais potente, quando comparadas às subfrações HDL2a (28%) e HDL3a (23%).

Nos pacientes com SMet, as subfrações HDL2b (91%, $p < 0,001$ vs. LDLox), 3b (47%, $p < 0,05$ vs. LDLox) e 3c (85%, $p < 0,001$ vs. LDLox) foram mais potentes em evitar a apoptose de células endoteliais, quando comparadas às subfrações 2a (25%) e 3a (17%). Quando comparadas entre si, as subfrações HDL2b ($p < 0,01$ vs. HDL2a; $p < 0,001$ vs. HDL3a; $p < 0,05$ vs. HDL3b) e 3c ($p < 0,01$ vs. HDL2a; $p < 0,001$ vs. HDL3a; $p < 0,001$ vs. HDL3b) demonstraram significativa capacidade em inibir a apoptose induzida pela LDLox.

A subfração pequena e densa HDL3c (85%) de pacientes com SMet apresentam reduzida capacidade de inibir a apoptose induzida pela LDLox, quando comparada à HDL3c (120%, $p < 0,05$ vs. controle correspondente) isolada dos controles normolipidêmicos. Para as demais subfrações, houve uma tendência à redução da atividade anti-apoptótica, exceto quando analisada a subfração HDL2b, que em pacientes com SMet tende a possuir maior atividade anti-apoptótica, quando comparada ao controle ($p = 0,051$; Figura 5.13).

A atividade anti-apoptótica das sHDL se correlacionou negativa e significativamente com a circunferência abdominal ($r = -0,69$; $p = 0,03$), com níveis de TG plasmáticos ($r = -0,71$; $p = 0,02$) e com a relação CT/HDL ($r = -$

0,66; $p=0,04$; dado não mostrado). Ao contrário, correlaciona-se positiva e significativamente com densidade ($r=0,58$; $p=0,004$), com a razão molar apoA-I/apoA-II ($r=0,62$; $p=0,02$) e com conteúdo de E1F das sHDL ($r=0,56$; $p=0,01$) no grupo controle. Estas correlações são perdidas na presença de SMet.

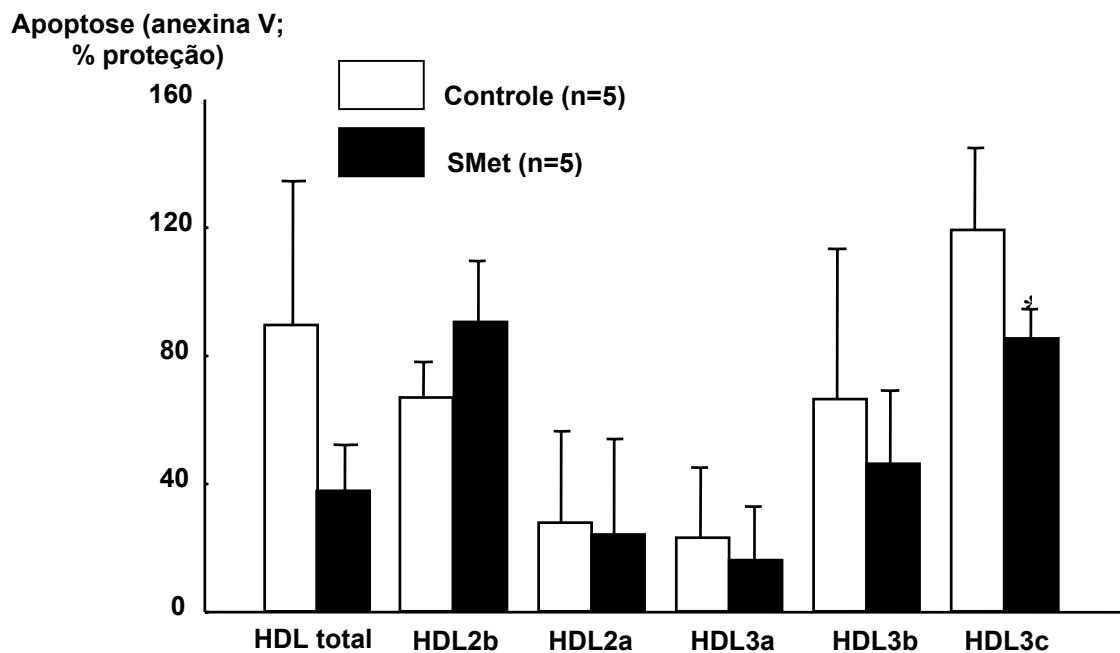


Figura 5.13 – Atividade anti-apoptótica das sHDL isoladas de pacientes com SMet (n=5) comparada a de indivíduos normolipidêmicos (n=5)

As células HMEC-1 foram pré-incubadas sHDL. Foi adicionado LDLox e a apoptose foi quantificada (anexina V). Média \pm EP da % proteção contra a apoptose induzida pela LDLox; * $p < 0.05$ vs. controle correspondente. sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; SMet, síndrome metabólica; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em sua forma oxidada.

G.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE INTRACELULAR DAS SUBFRAÇÕES PEQUENAS E DENSAS HDL3 EM PACIENTES COM SMet COMPARADOS A INDIVÍDUOS NORMOLIPIDÊMICOS

A atividade antioxidante intracelular das sHDL isoladas indivíduos normolipidêmicos (n=5) e de pacientes com SMet (n=10) foi avaliada através da medida de geração de ROS induzida pela LDLox nas células endoteliais humanas. Todas as sHDL isoladas, tanto de indivíduos normolipidêmicos quanto de pacientes com SMet, são capazes de inibir a apoptose induzida pela LDLox (Figura 5.14).

As sHDL isoladas dos controles normolipidêmicos demonstraram semelhante padrão de proteção contra a geração de ROS descrita anteriormente. A subfração HDL3c (50% de inibição, $p < 0,05$ vs. LDLox) apresentou atividade contra a geração de ROS mais potente, quando comparada às subfrações HDL3b (23%), 3a (23%; $p < 0,05$ vs. HDL3c), 2a (26%) e 2b (28%).

Contudo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando comparados os dois grupos estudados, mas a subfração HDL3c isolada de pacientes com SMet tendeu a apresentar reduzida atividade antioxidante intracelular quando comparado ao seu controle normolipidêmico ($p = 0,10$). Nos pacientes com SMet, as sHDL não diferem em seu potencial protetor contra a geração de ROS (HDL2b 37%, HDL2a 41%, HDL3a 33%, HDL3b 33%, HDL3c 35% de inibição; Figura 3.14).

A atividade protetora da HDL3c se correlacionou negativamente com os níveis plasmáticos de CT ($r=-0,53$; $p=0,04$). Além disso, correlacionou-se positivamente com densidade ($r=0,51$; $p=0,012$) e com conteúdo de E1F das sHDL ($r=0,59$; $p=0,007$) no grupo controle, correlações estas perdidas na presença de SMet. Finalmente a atividade antioxidante intracelular das sHDL correlaciona-se fortemente com a atividade anti-apoptótica ($r=0,71$; $p=0,001$; Figura 3.15).

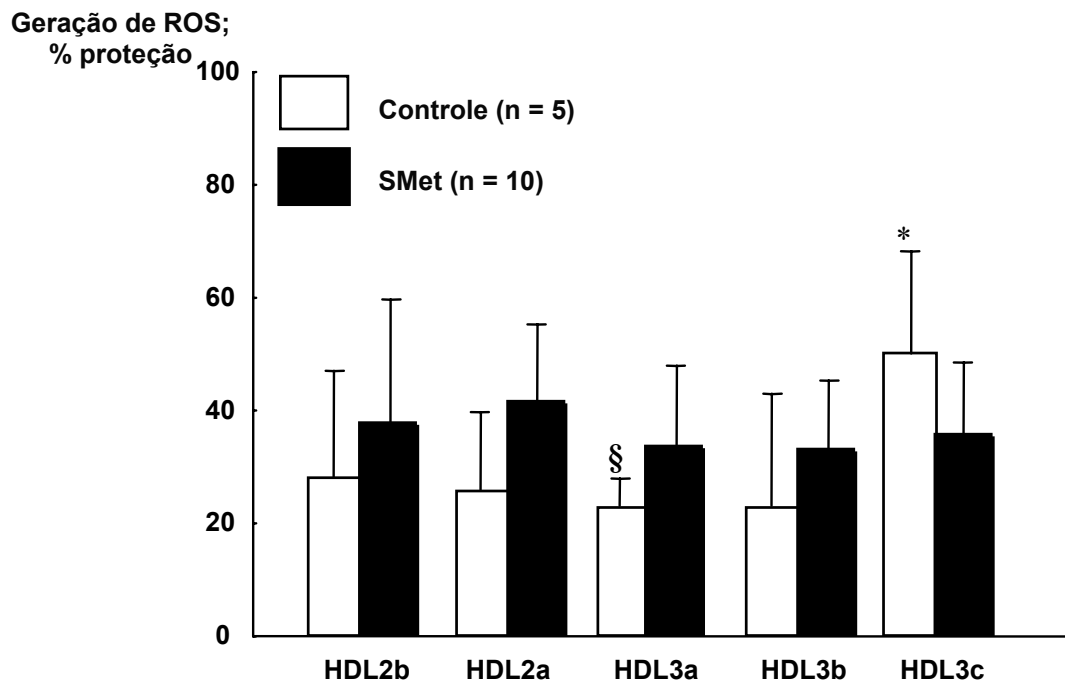


Figura 5.14 – Atividade antioxidante intracelular das sHDL em pacientes com SMet ($n=10$) comparada a de indivíduos normolipidêmicos ($n=5$)

Células HMEC-1 foram pré-incubadas com sHDL. A geração de ROS foi quantificada após marcação com substrato fluorescente, e incubação com LDLox. Média \pm EP da porcentagem de proteção; * $p<0,05$ vs. LDLox; § $p<0,05$ vs. HDL3c controle correspondente. sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; SMet, síndrome metabólica; LDLox, lipoproteína de baixa densidade em sua forma oxidada; ROS, espécies reativas de oxigênio.

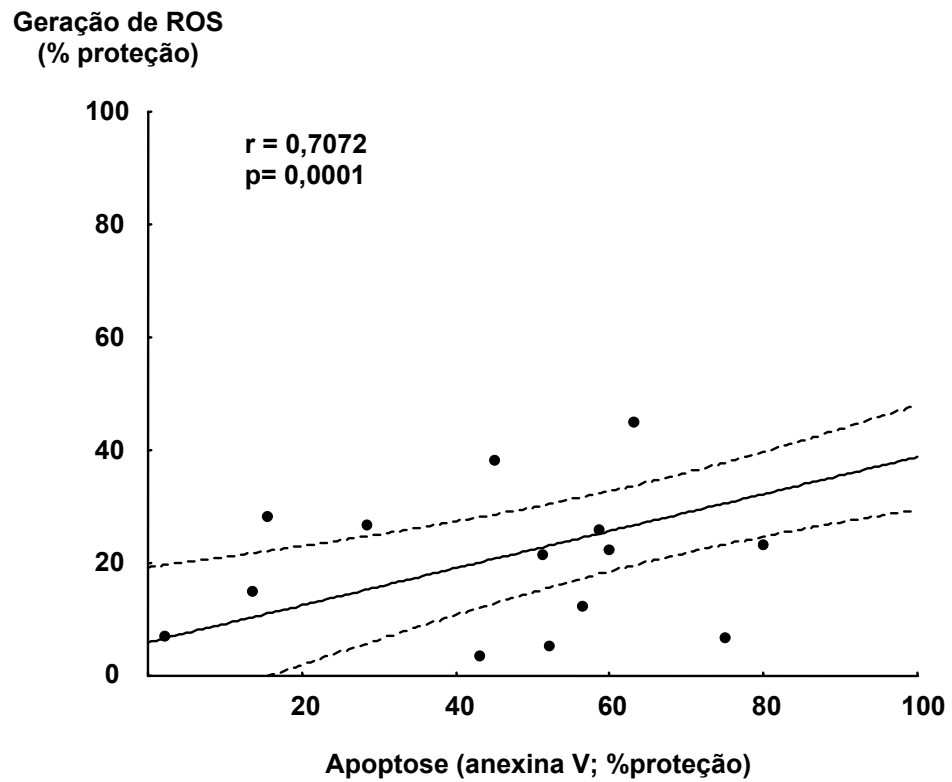


Figura 5.15 – Correlação entre a inibição da geração de ROS (% proteção) e a atividade anti-apoptótica (anexina V; % proteção) das sHDL isoladas de todos os indivíduos estudados.

sHDL, subfrações de lipoproteína de alta densidade; SMet, síndrome metabólica.

6 Discussão

Nosso estudo revelou que todas as sHDL isoladas de indivíduos normolipidêmicos protegem as células endoteliais humanas contra a toxicidade mitocondrial e apoptose induzidas pela LDLox, como demonstrado pelo MTT, pela microscopia de fluorescência (SYTO13/IP), pela marcação com anexina V, pela redução da liberação do cit c e AIF no citoplasma celular e da degradação do Bid, pela inibição da atividade caspase-3 e da fragmentação do ADN.

As subfrações pequenas e densas HDL3 possuem atividade anti-apoptótica mais potente do que as subfrações grandes e menos densas HDL2, mesmo quando utilizadas com mesma concentração de proteína, massa total ou com mesmo número de partículas. O mecanismo de apoptose iniciado pela LDLox possui duas vias de ativação dependentes de cálcio³⁹: (i) caspase dependente, mediada pelo Bid / cit c / caspase-3; (ii) caspase independente, mediada pelo AIF. As sHDL inibem ambas as vias de ativação da cascata de apoptose induzida pela LDLox.

A inibição da ativação da caspase-3 e da fragmentação do ADN por vezes foi maior que 100%, ou seja, houve menos ativação caspase nas células incubadas com sHDL do que no controle. Isto pode ser explicado pelo fato de que as células eram incubadas na ausência de soro no meio de

cultura, tendo já sido demonstrado que o HDL protege as células contra apoptose induzida pela restrição de fatores de crescimento existente no soro adicionado aos meios de cultura^{34,35,45}. Os mecanismos envolvidos na atividade protetora do HDL é motivo de numerosos estudos. Alguns autores inclusive sugerem que a HDL presente no soro seria um dos fatores protetores contra a morte celular⁴⁵.

A E1F, um lipídio bioativo presente na HDL, está 3,5 vezes mais presente na subfração HDL3c, quando comparada com HDL2b, fato este que se correlacionou fortemente com as atividades anti-apoptótica e antioxidante intracelular das sHDL ($p < 0,01$). A origem da associação da HDL com E1F é ainda indeterminada, mas parece estar ligada à ação da esfingosina cinase intracelular. O enriquecimento das subfrações pequenas e densas HDL3 com E1F pode estar associado à potente capacidade dessas partículas em adquirir lipídios polarizados de origem celular^{41,42} (Figura 6.1).

A E1F associada ao HDL tem sido relatada como responsável por inúmeras das atividades anti-aterogênicas da HDL, sobretudo no que diz respeito à sua atividade anti-apoptótica, indução da síntese de NO e estímulo à vasodilatação, atividade anti-inflamatória, entre outros efeitos⁴². Nesta mesma linha de investigação, Kimura e colaboradores⁸⁷ demonstraram que a E1F inibe a apoptose de células endoteliais induzida pela LDLox. Recentemente, estudos com camundongos depletados de E1F

cinase, enzima envolvida no metabolismo da E1F, têm demonstrado letalidade fetal e distúrbios na angiogênese além de apoptose massiva⁸⁸.

Testamos a E1F, em concentrações fisiológicas carregadas por albumina, não se mostrando eficaz na atividade anti-apoptótica. Ao contrário, quando testadas carregadas pelas sHDL, houve melhora importante da atividade anti-apoptótica de todas as sHDL, especialmente daquelas originalmente pobres em E1F (HDL2b e 2a). Portanto, a ação biológica da E1F pressupõe interação das sHDL com a célula. Contrários aos nossos dados, Kimura e colaboradores⁸⁷ demonstraram que a E1F em concentrações similares e associada a albumina é capaz de proteger as células endoteliais contra a toxicidade da LDLox. Uma possível explicação para este fato está no tempo de incubação utilizado. Em nosso estudo, realizamos sempre pré-incubação com o agente protetor (média de tempo entre 40-48h até a análise final), e posteriormente com o LDLox, enquanto no estudo de Kimura, havia co-incubação dos dois fatores (tempo médio de incubação 24 horas). Provavelmente, a E1F possui meia vida menor quando utilizada carregada pela albumina, e a associação com HDL poderia aumentar seu tempo de ação, com consequente melhora na atividade anti-apoptótica da HDL.

Em um segundo momento, decidimos avaliar o papel do principal receptor celular da HDL e apoA-I, o receptor SR-BI, na atividade anti-apoptótica desta lipoproteína. Nossos dados mostraram que a inibição específica do receptor *scavenger* SR-BI reduz de forma importante a

atividade anti-apoptótica da sHDL3c. É possível que, após interação da HDL3c com SR-BI, via apoA-I, a E1F exerça seus efeitos protetores através da interação com seus receptores de membrana e/ou da sua internalização como um componente da HDL. Estes dados reforçam a necessidade de interação celular para que a HDL possa exercer seus efeitos de proteção endotelial e, conseqüentemente, anti-aterogênicos (Figura 6.1).

Todas as sHDL protegem as células endoteliais contra a geração de ROS, sendo as subfrações pequenas e densas HDL3 mais potentes, quando comparadas às subfrações HDL2. A atividade antioxidante intracelular está fortemente correlacionada com a atividade anti-apoptótica das sHDL (Figura 5.15), sugerindo que estes dois efeitos anti-aterogênicos estejam associados. Em contraste, nenhuma correlação foi encontrada entre estas atividades biológicas e a capacidade das subfrações pequenas e densas HDL3 de inibir a oxidação da LDLox. Portanto, a atividade de proteção celular das sHDL não depende da sua atuação como um elemento inibidor da oxidação da LDL. Consistente com este dado é o fato de que não há necessidade de contato direto da HDL ou da apoA-I com a LDLox, durante a incubação com as células³⁴.

Para avaliar a atividade anti-apoptótica das sHDL isoladas de pacientes com dislipidemias aterogênicas, comparamos indivíduos normolipidêmicos com pacientes com SMet. Nosso estudo revelou que em pacientes com SMet, caracterizados por obesidade central, resistência à insulina, dislipidemia aterogênica e inflamação crônica, a sHDL3c possui

significante redução da atividade anti-apoptótica. As sHDL isoladas deste grupo de pacientes protegeram as células endoteliais contra a apoptose induzida pela LDLox, contudo apresentaram tendência a menor atividade anti-apoptótica, quando comparadas ao seu controle correspondente.

Esta deficiência das sHDL está associada à presença de obesidade abdominal e dislipidemia aterogênica, como evidenciou a correlação negativa entre a atividade anti-apoptótica das sHDL com a circunferência abdominal, níveis plasmáticos de TG e a razão TG/HDL-C.

A redução na atividade anti-apoptótica das sHDL isoladas de pacientes com SMet pode estar associada com modificações na sua composição protéica e lipídica. O conteúdo molar de apoA-I, a principal apolipoproteína da HDL está reduzida de forma significativa nas subfrações HDL2b, 2c, 3a e 3c (Figura 5.12). Além disso, o conteúdo relativo de apoA-I, expresso pela relação entre o conteúdo molar de apoA-I e apoA-II, correlacionou-se positivamente com a atividade anti-apoptótica das subfrações nos controles normolipidêmicos, sendo perdida esta correlação nos pacientes com SMet.

A redução de EC e o aumento do conteúdo de TG nas sHDL em pacientes com SMet foi consistente com recentes estudos⁶⁴. Em presença de aumento dos níveis séricos de ácidos graxos, dos TG e VLDL, secundário à obesidade e resistência à insulina, ocorre estímulo à atividade da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), a qual cataliza a troca entre as lipoproteínas, especialmente entre o VLDL e HDL, de TG por EC.

Como resultado final, as sHDL tornam-se ricas em TG e depletadas de EC⁸⁹, fato este responsável pela diminuição da estabilidade conformacional da apoA-I. Mais especificamente, a apoA-I torna-se menos exposta por estar mais internalizada no núcleo lipídico^{90,91}. Com isso, ocorre redução da atividade da apoA-I como aceptora de CT e/ou como ligante dos receptores e proteínas de membrana (Figura 6.2).

Outros mecanismos possíveis, capazes de explicar a deficiência da atividade protetora das sHDL em pacientes com SMet, seriam a presença de elevados estresse oxidativo e atividade inflamatória, presentes neste grupo de pacientes⁶⁴. Nesta última condição patológica, o amilóide A sérico (SAA) pode substituir a apoA-I na HDL, reduzindo com isso atividade cárdio-protetora desta lipoproteína⁹².

O conteúdo de E1F se correlacionou fortemente com as atividades anti-apoptótica e antioxidante intracelulares das sHDL de indivíduos normolipidêmicos. Contudo esta correlação se tornou não significativa em pacientes com SMet, possivelmente por não termos realizado as dosagens deste fosfolípido em todas as sHDL dos pacientes normolipidêmicos (Pearson, n=10). Não houve diferença do conteúdo de E1F entre as sHDL2b e 3c entre os dois grupos estudados. Portanto é possível que a E1F não seja responsável pela deficiência funcional das sHDL em pacientes com dislipidemias aterogênicas, como as presentes na Smet, mas sim poderia haver deficiência na internalização e interação celular deste lipídio bioativo.

Uma das principais limitações do nosso estudo estaria no fato de que estudamos um número reduzido de pacientes (n=16) e controles (n=5). Apesar da possibilidade de comprovarmos deficiência estatisticamente significativa na atividade anti-apoptótica da partícula HDL3c de pacientes com SMet, não houve diferença na atividade antioxidante intracelular desta subfração entre os dois grupos. No entanto, a HDL3c de pacientes com SMet apresentou tendência à redução da sua atividade protetora contra a geração de ROS induzida pela LDLox.

A importância do estudo dos mecanismos envolvidos nas atividades anti-aterogênicas da HDL, especialmente, da heterogeneidade físico-química e funcional das sHDL, justifica-se pela melhor compreensão dos efeitos biológicos de cada um de seus componentes assim como das etapas do metabolismo desta lipoproteína. A possibilidade de intervenção terapêutica e/ou desenvolvimento de partículas de HDL sintéticas, ricas em componentes bioativos e protetores, torna-se evidente objetivo clínico-farmacológico com a ampliação do conhecimento a cerca destes mecanismos⁶⁸⁻⁷².

Contudo, outros modelos de experimentação *in vitro* ou *in vivo* devem ser avaliados. Assim como, outros grupos especiais de populações de alto risco para o desenvolvimento de DAC necessitam ser estudados do ponto de vista da funcionalidade da HDL e suas subfrações. Finalmente, a avaliação da ação de medicamentos que comprovadamente atuam no metabolismo lipídico devem ser testadas quanto à sua atividade na reconstituição dos

efeitos anti-aterogênicos das sHDL, especialmente da sua ação anti-apoptótica.

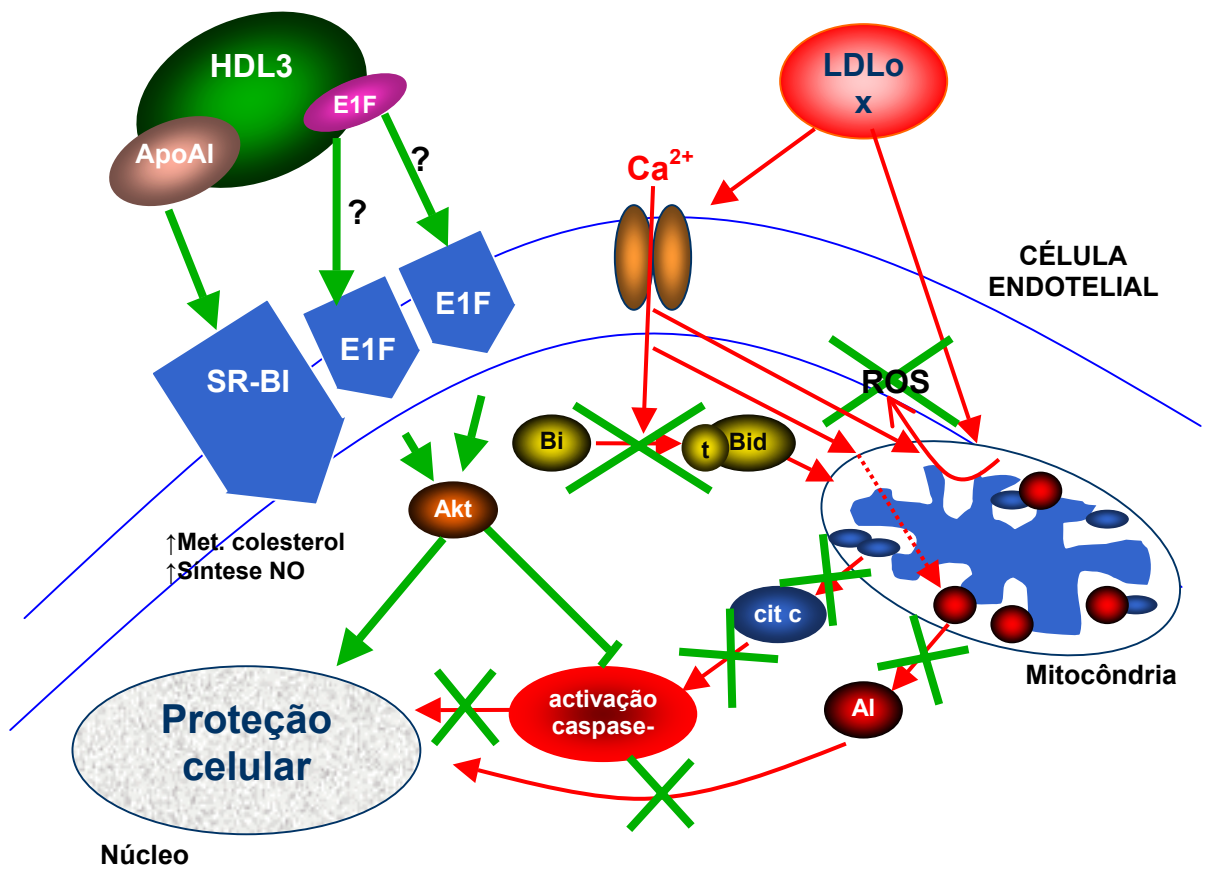


Figura 6.1 – Mecanismos envolvidos na atividade anti-apoptótica das subfrações pequenas e densas HDL3^{41,42,44,45}

SR-BI, receptor *scavenger*-BI; E1F₁, receptor da E1F; E1F₃, receptor da E1F; Ca²⁺, cálcio iônico; Akt, proteína cinase ligada à proteção celular contra apoptose; Bid, molécula protetora contra apoptose; tBid, Bid degradado; ROS, espécies reativas de oxigênio; cit c, citocromo c; AIF, fator indutor de apoptose; ADN, ácido desoxirribonucléico.

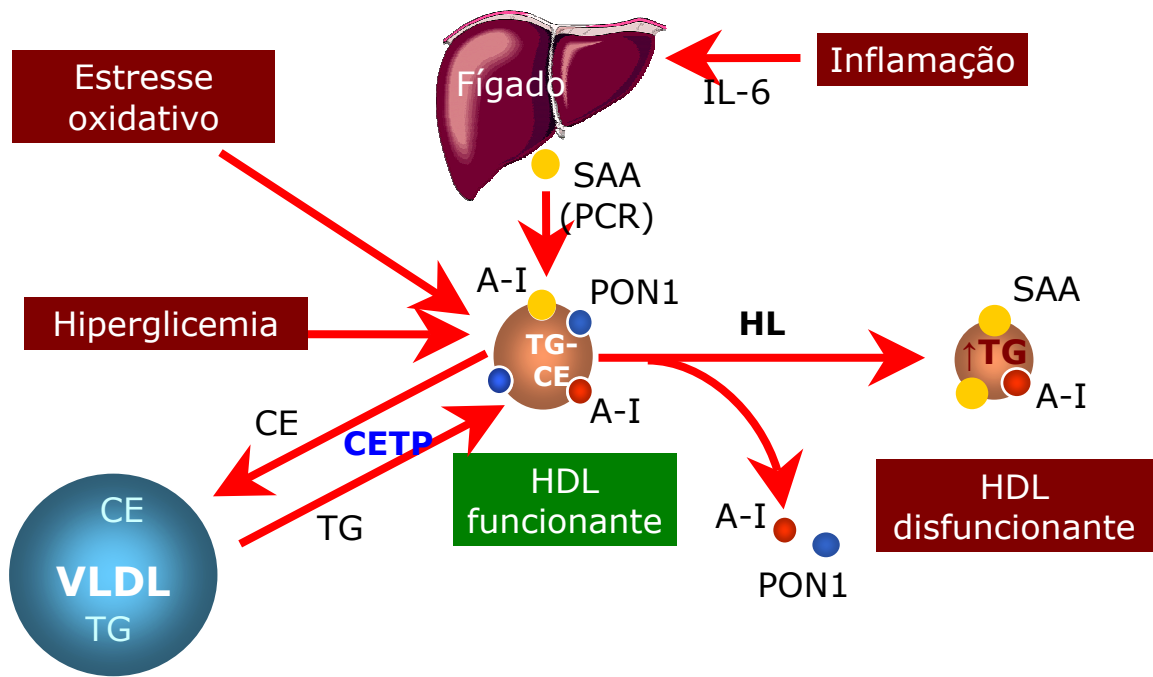


Figura 6.2 – Mecanismo de disfunção das subfrações pequenas e densas HDL3 na SMet⁶⁰

IL-6, interleucina-6; SAA, amilóide A sérico; PCR, proteína C-reativa; A-I, apolipoproteína A-I; PON1, paroxonase-1; LH, lipase hepática. Por Kontush A e Chapman MJ modificado.⁶⁰

7 Conclusões

CONCLUSÃO PRIMÁRIA

As sHDL isoladas de indivíduos normolipidêmicos são heterogêneas quanto a sua atividade contra a toxicidade mitocondrial e a apoptose induzidas pela LDLox. Com mesma concentração em proteína, massa total e número de partículas, as subfrações pequenas e densas HDL3b e 3c são mais potentes em inibir apoptose de células endoteliais induzida pela LDLox quando comparadas às subfrações HDL2b, 2a e 3a;

CONCLUSÕES SECUNDÁRIAS

- a) As sHDL, em especial a sHDL3c, inibem a liberação de cit c e AIF para o citoplasma celular, assim como a degradação de Bid induzidas pela LDLox; como consequência, inibem a ativação da caspase-3 e a degradação do ADN. Estes efeitos são possivelmente mediados pela inibição da geração de ROS induzida pela LDLox;

- b) As subfrações pequenas e densas HDL3b e 3c são ricas em E1F, fato que se correlaciona com a potente atividade anti-apoptótica destas subfrações. A E1F, em concentrações fisiológicas (nanomolar), carregada pela albumina não apresenta atividade anti-apoptótica. Em contrapartida, quando carregada pelas sHDL, a E1F apresenta potente atividade anti-

apoptótica, conferindo às subfrações HDL2b e 2a, enriquecidas com E1F, importante atividade protetora contra a morte celular;

- c) A atividade anti-apoptótica da E1F e, conseqüentemente, das sHDL possivelmente depende da interação da HDL, via apoA-I, com seu receptor SR-BI;

- d) As sHDL isoladas de pacientes com SMet apresentam reduzida atividade anti-apoptótica, possivelmente pela redução significativa do seu conteúdo em apoA-I e/ou pelo aumento do conteúdo de TG, o que pode levar à redução na capacidade de interação das sHDL com as células e conseqüente diminuição da proteção celular conferida por esta importante lipoproteína.

8 Anexo

ANEXO I

Monsieur, Madame,

A l'occasion du bilan de votre dislipidemie, une étude sur le STRESS OXYDANT et fonctions des surfractions des HDL, marqueur de risque cardiovasculaire va être réalisée dans votre sang.

Ce dosage n'étant pas fait en routine, nous avons besoin de votre accord.

Vous serez informé des résultats par le service du professeur Grimaldi, via votre médecin traitant.

Je soussigné(e), Mr (Mme)
avoir été renseigné(e) sur cette analyse par Dr . Boris Hansel et Dr. Estelle Nobécourt, qui a répondu à mes interrogations.

Paris, le

Signature du sujet de l'étude

9 Referências

1. Bierman, EL. Atherosclerosis and Others Forms of Arteriosclerosis. In: Isselbacher, KJ; Braunwald, E; Wilson, JD; Martin, JB; Fauci, AS; Kasper, DL. Harrison's Principle of Internal Medicine. 13th ed., 1994; vol.1:1106-16
2. de Lolio CA, Lotufo PA, Lira AC, Zanetta DM, Massad E. Mortality trends due to myocardial ischemia in capital cities of the metropolitan areas of Brazil, 1979-89. *Arq. Bras Cardiol.* 1995; 64(3):213-6.
3. Kannel WB, Neaton JD, Wentworth D, Thomas HE, Stamler J, Hulley SB, Kjelsberg MO. Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk factors in 325,348 men screened for the MRFIT. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am Heart J.* 1986; 112(4):825-36.
4. Crea F, Biasucci LM, Buffon A, Liuzzo G, Monaco C, Caliguri G, Kol A, Sperti G, Cianflone D, Maseri A. Role of inflammation in the pathogenesis of coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1997; 80(5A):10E-16E.
5. Ross R. Atherosclerosis: An Inflammatory Disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:115-26.
6. Serrano CV Jr, Santos ES, Mangione JA, Scheinberg M, Souza JS, Martinez EE, Ramires JA, Nicolau JC. Enhanced inflammatory response following coronary stent implantation in stable angina patients. *Int J Cardiol.* 2006 Aug 28; [Epub ahead of print].

7. Salgado Filho W, Martinez Filho EE, Horta P, Lemos PA, Migueletto BC, Serrano CV Jr, Ramires JA, Martinez TL. Intracoronary inflammatory markers after percutaneous coronary interventions. *Arq Bras Cardiol.* 2005 Sep;85(3):180-5. Chapman MJ. Atherogenicity of low-density lipoproteins: Mechanisms. In: Barter P J, Rye KA, eds. *Plasma lipids and their role in disease.* Vol. 5. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 1999. pp. 69-84.
9. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA.* 1986; 256(20):2823-8.
10. Genest J Jr, Marcil M, Denis M, Yu L. High density lipoproteins in health and in disease. *J Investig Med.* 1999; 47(1):31-42.
11. Griending KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation.* 1997; 96:3264-5.
12. Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res.* 1995; 18:87-98.
13. Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA, Kuo CC, Cappuccio AL, Lee MJ, Grayston JT. Specificity of detection of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular atheroma: evaluation of the innocent bystander hypothesis. *Am J Pathol.* 1997; 150:1785-90.
14. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28:1815-26.
15. Krauss RM. Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and atherosclerosis risk. *Curr Opin Lipidol.* 1994; 5:339-349.

16. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995; 91:2844-50.
17. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL *Circ Res*. 2004; 95:764-72.
18. Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Pieraggi MT, Arnal JF, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway: prevention by auritricarboxylic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:331-9.
19. Kontush A, Chancharme L, Escargueil-Blanc I, Therond P, Salvayre R, Negre-Salvayre A, Chapman MJ. Mildly oxidized LDL-C particle subspecies are distinct in their capacity to induce apoptosis in endothelial cells: role of lipid hydroperoxides. *FASEB J*. 2003; 17:88-90.
20. Miller GJ, Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet*. 1975; 1(7897):16-9.
21. Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study. *Arch Intern Med*. 1981; 141(9):1128-31.
22. Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 2002; 161(1):1-16.
23. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM.

- Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res.* 2000; 41(9):1495-508.
24. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res.* 2000; 41(9):1481-94.
 25. Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 1990; 1044(2):275-83.
 26. Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(21):10316-20.
 27. Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, Shatilina LV, Kuzmin AA, Plavinsky SL, Terykova NP. Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo. *Atherosclerosis.* 1993; 100(1):13-8.
 28. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(10):1881-8.
 29. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15(11):1987-94.
 30. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, De Palma A, Saresella M, Ferrante P, Taramelli D. Inhibition of VCAM-1 expression in

- endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 238(1):61-5.
31. Naqvi TZ, Shah PK, Ivey PA, Molloy MD, Thomas AM, Panicker S, Ahmed A, Cercek B, Kaul S. Evidence that high-density lipoprotein cholesterol is an independent predictor of acute platelet-dependent thrombus formation. *Am J Cardiol.* 1999; 84(9):1011-7.
 32. Sugatani J, Miwa M, Komiyama Y, Ito S. High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1996; 13(1):73-88.
 33. Blann AD, Dobrotova M, Kubisz, McCollum CN. von Willebrand factor, soluble P-selectin, tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in athROSsclROSSsis. *Thromb Haemost.* 1995; 74(2):626-30.
 34. Suc I, Escargueil-Blanc I, Troly M, Salvayre R, Negre-Salvayre A. HDL-C and apoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL-C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17:2158-66.
 35. Nofer J-R, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von Eckardstein A, Seedorf U, Assmann G. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL-C) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem.* 2001; 276 (37):34480-5.
 36. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* 1998; 82:1111-29.
 37. Kockx MM. Apoptosis in the plaque – Quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:1519-22.

38. Price P, McMillan TJ. Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation. *Cancer Res.* 1990; 50(5):1392-6.
39. Vindis C, Elbaz M, Escargueil-Blanc I, Auge N, Henriquez A, Thiers JC, Negre-Salvayre A, Salvayre R. Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(3):639-45.
40. Sugano M, Tsuchida K, Makino N. High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 272(3):872-6.
41. Nofer JR, Assmann G. Atheroprotective effects of high-density lipoprotein-associated lysosphingolipids. *Trends Cardiovasc Med.* 2005; 15(7):265-71.
42. Zhang B, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Miura S, Noda K, Okajima F, Saku K. Correlation of high density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine 1-phosphate with serum levels of HDL-cholesterol and apolipoproteins. *Atherosclerosis.* 2005; 178(1):199-205.
43. Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schafers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest.* 2004; 113(4):569-81.
44. Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM. Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem.* 2001; 276(14):10627-33.

45. Li XA, Guo L, Dressman JL, Asmis R, Smart EJ. A novel ligand-independent apoptotic pathway induced by scavenger receptor class B, type I and suppressed by endothelial nitric-oxide synthase and high density lipoprotein. *J Biol Chem*. 2005; 280(19):19087-96.
46. Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res*. 1981; 22(2):339-58.
47. Cheung MC, Segrest JP, Albers JJ, Cone JT, Brouillette CG, Chung BH, Kashyap M, Glasscock MA, Anantharamaiah GM. Characterization of high density lipoprotein subspecies: structural studies by single vertical spin ultracentrifugation and immunoaffinity chromatography. *J Lipid Res*. 1987; 28:913-29.
48. Li Z, McNamara JR, Ordovas JM, Schaefer EJ. Analysis of high density lipoproteins by a modified gradient gel electrophoresis method. *J Lipid Res*. 1994; 35:1698-711.
49. Duriez P, Fruchart JC. High-density lipoprotein subclasses and apolipoprotein AI. *Clin Chim Acta*. 1999; 286:97-114.
50. Genest JJ Jr, Bard JM, Fruchart JC, Ordovas JM, Wilson PF, Schaefer EJ. Plasma apolipoprotein A-I, A-II, B, E and C-III containing particles in men with premature coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1991; 90:149-57.
51. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*. 1998; 394(6690):284-7.

52. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulations of lipoperoxides in LDL-C. *FEBS Lett.* 1991; 286:152-4.
53. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 1993; 104(1-2):129-35.
54. Ribas V, Sanchez-Quesada JL, Anton R, Camacho M, Julve J, Escola-Gil JC, Vila L, Ordonez-Llanos J, Blanco-Vaca F. Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res.* 2004; 95(8):789-97.
55. Kunitake ST, Jarvis MR, Hamilton RL, Kane JP. Binding of transition metals by apolipoprotein A-I-containing plasma lipoproteins: inhibition of oxidation of low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(15):6993-7.
56. Davignon J. Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(2):267-9.
57. Bisgaier CL, Sachdev OP, Megna L, Glickman RM. Distribution of apolipoprotein A-IV in human plasma. *J Lipid Res.* 1985; 26(1):11-25.
58. Veja LG, Grundy SM. Hypoalphalipoproteinemia (low high density lipoprotein) as a risk factor for coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7:209-16.
59. Tall AR, Jiang X, Luo Y, Silver D. 1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL-C metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 1999(20):1185-88.

60. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006; 3(3):144-53.
61. Kontush A, de Faria FC, Chantepie S, Chapman MJ. A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. *Atherosclerosis*. 2005; 182(2):277-85.
62. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest*. 1995; 96(6):2758-67.
63. Cabana VG, Lukens JR, Rice KS, Hawkins TJ, Getz GS. HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease. *J Lipid Res*. 1996; 37(12):2662-74.
64. Hansel B, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, Kontush A. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(10):4963-71.
65. Nobecourt E, Jacqueminet S, Hansel B, Chantepie S, Grimaldi A, Chapman MJ, Kontush A. Defective antioxidative activity of small, dense HDL particles in type 2 diabetes: Relationship to elevated oxidative stress and hyperglycemia. *Diabetologia*. 2005; 48(3):529-38.

66. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, Wong H, Peters AL. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia*. 2000; 43(3):312-20.
67. Ferretti G, Bacchetti T, Marchionni C, Caldarelli L, Curatola G. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetol*. 2001; 38(4):163-9.
68. Guerin M, Egger P, Soudant C, Le Goff W, van Tol A, Dupuis R, Chapman MJ. Dose dependent action of atorvastatin in type IIB hyperlipidemia: preferential and progressive reduction of atherogenic apoB-containing lipoprotein subclasses (VLDL-2, IDL, small dense LDL-C) and stimulation of cholesterol efflux. *Atherosclerosis*. 2002; 163:287-96.
69. Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. Ability of reconstituted high density lipoproteins to inhibit cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *J Lipid Res*. 1999; 40(2):345-53.
70. Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J Lipid Res*. 2000; 41(8):1261-7.
71. Correia LC, Sposito AC, Lima JC, Magalhães LP, Passos LC, Rocha MS, D'Oliveira A, Esteves JP. Anti-inflammatory effect of atorvastatin (80 mg) in unstable angina pectoris and non-Q-wave acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2003; 92:298-301.

72. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM, Lauer MA, Sheldon WS, Grines CL, Halpern S, Crowe T, Blankenship JC, Kerensky R. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003; 290(17):2292-300.
73. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001; 285(19):2486-97.
74. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106(25):3143-421.
75. Mansur AP, Serrano CV Jr, Nicolau JC, Cesar LA, Ramires JA. Effect of cholesterol lowering treatment on positive exercise tests in patients with hypercholesterolaemia and normal coronary angiograms. *Heart*. 1999;82(6):689-93.
76. Sposito AC, Caramelli B, Serrano CV Jr, Mansur AP, Ramires JA. Effect of niacin and etofibrate association on subjects with coronary artery disease and serum high-density lipoprotein cholesterol <35 mg/dl. *Am J Cardiol*. 1999;83(1):98-100, A8. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM, Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), National Cholesterol

- Education Program (NCEP). NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes*. 2003;.52(5):1210-4.
78. Bonora E, Formentini G, Calcaterra F, Lombardi S, Marini F, Zenari L, Saggiani F, Poli M, Perbellini S, Raffaelli A, Cacciatori V, Santi L, Targher G, Bonadonna R, Muggeo M. HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects: prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabetes Care*. 2002; 25(7):1135-41.
79. Rumsey SC, Stucchi AF, Nicolosi RJ, Ginsberg HN, Ramakrishnan R, Deckelbaum RJ. Human plasma LDL cryopreserved with saccharose maintains in vivo kinetics indistinguishable from freshly isolated human LDL in cynomolgus monkeys. *J Lipid Res*. 1994; 35(9):1592-8.
80. Yagi, K. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids*. 1987; 45(2-4):337-51.
81. Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman MJ. Antioxidative activity of HDL particle subspecies is impaired in hyperalphalipoproteinemia: relevance of enzymatic and physicochemical properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24(3):526-33.
82. Meilhac O, Escargueil-Blanc I, Thiers JC, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Bcl-2 alters the balance between apoptosis and necrosis, but does not prevent cell death induced by oxidized low density lipoproteins. *FASEB J*. 1999; 13(3):485-94.
83. Napoli C, Quehenberger O, De Nigris F, Abete P, Glass CK, Palinski W. Mildly oxidized low density lipoprotein activates multiple apoptotic

- signaling pathways in human coronary cells. *FASEB J.* 2000; 14(13):1996-2007.
84. McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *Faseb J.* 1989; 3(7):1843-9.
85. Nofer J, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schafers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor E1F3. *J Clin Invest.* 2004; 113(4):569-81.
86. Martinez LO, Georgeaud V, Rolland C, Collet X, Terce F, Perret B, Barbaras R. Characterization of two high-density lipoprotein binding sites on porcine hepatocyte plasma membranes: contribution of scavenger receptor class B type I (SR-BI) to the low-affinity component. *Biochemistry.* 2000; 39(5):1076-82.
87. Kimura T, Sato K, Malchinkhuu E, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Murakami M, Okajima F. High-density lipoprotein stimulated endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(7):1283-8.
88. Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *J Mol Cell Biol.* 2005; 25(24):11113-21.
89. Adeli K, Taghibiglou C, Van Iderstine SC, Lewis GF. Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance. *Trends Cardiovasc Med.* 2001; 11(5):170-6.

90. Frank PG, Marcel YL. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res.* 2000; 41(6):853-72.
91. Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye KA. The conformation of apolipoprotein A-I in high-density lipoproteins is influenced by core lipid composition and particle size: a surface plasmon resonance study. *Biochemistry.* 2000; 39(19):5712-21.
92. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res.* 2004; 45(7):1169-96.