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

**MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS
POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA (PPAR) E DOS
RECEPTORES X HEPÁTICOS (LXR) POR LNO₂**

Simone Ferderbar

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Dulcineia S.P. Abdalla

São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013691

Ficha Catalográfica

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

Ferderbar, Simone

F347m Modulação da ativação dos receptores ativados por
proliferadores de peroxissoma (PPAR) e dos receptores X
hepáticos (LXR) por nitrolinoleato (LNO₂) / Simone
Ferderbar. -- São Paulo, 2008.
107p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

1. Bioquímica clínica : Medicina I. T. II. Abdalla,
Dulcineia Saes Parra, orientador.

616.0756 CDD

Simone Ferderbar

**MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS
POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA (PPAR) E DOS
RECEPTORES X HEPÁTICOS (LXR) POR LNO₂**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Dulcineia S.P. Abdalla
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico esta tese aos meus pais com todo carinho e amor

Agradecimentos

À minha orientadora Profa.Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla pela orientação , confiança e oportunidades concedidas

Ao Prof. Lisardo Boscó por me acolher em seu laboratório e por permitir a realização de alguns ensaios deste trabalho em seu laboratório e por contribuir para o meu conhecimento científico.

À Beatriz de las Heras pelas discussões científicas, amizade e incentivo que foram preciosos para o desenvolvimento deste trabalho, além de ser uma grande amiga em todos os momentos e por ter sido uma "madre" quando estive em Madrid.

Às minhas amigas Pillar, Raquel e Elvira do departamento de citometria de fluxo do Centro Nacional de Investigaciones Cardiovascular (CNIC) que me ensinaram os princípios da citometria.

Aos Prof. Paolo Dimascio, Prof. Ricardo Ambrósio Fock, Profa. Primavera Borelli, Profa. Maria Christina Avellar e Profa. Ana Campa por cederem seus laboratórios e equipamentos para alguns experimentos.

À Sayuri Yamamoto pela indispensável ajuda na síntese de nitrolípide, pelas muitas horas de discussão científica e pelo seu incentivo.

Ao Roberto Jun Arai colega e amigo de laboratório, pelas sugestões e ajuda técnico-científica.

Ao Alexandre Rodrigues por me ajudar nos ensaios de EMSA.

À Mirian Moraes, por ter me recebido no laboratório de maneira tão amável e pela ajuda experimental, além de ter se tornado uma grande amiga.

À Daniela de Mattos Grosso uma velha colega de laboratório, mas agora uma grande amiga..... agradeço por me ajudar no desenvolvimento e otimização de condições experimentais de ensaios de fagocitose.

Ao Victor Debbas por me ajudar nos momentos que eu precisei..

À Amanda, Karina e Mariana do Laboratório de Hematologia FCF-USP pelos reagentes concedidos e por estarem sempre dispostas a me ajudar.

Aos colegas e amigos de laboratório, pelas discussões científicas e contribuições em diversos aspectos: Alejandro Pacheco, Carolina Freitas longo, Carolina Marinho, Débora Pacheco, Elaine Augusto, Julio Beltrame Daleprane, Leonardo Zia, Luciana A. Faine, Martina Rudinick, Maria Cristina Garcia, Soraya Kazuma, Tanize Faulin e Vanessa Freitas.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Bioquímica do Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols- Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), por me acolherem, incentivarem, pelas sugestões e ensinamentos científicos: Alfonso Moyano, Jimena Cuenca, Paloma Martin-Sanz, Patrícia e Rafael .

Aos meus amigos da Casa do Brasil Madrid-Espanha pelo carinho, amizade e momentos de descontração.

À CAPES e FAPESP pela concessão da bolsa de estudo e pelo apoio financeiro.

Os meus sinceros agradecimentos a todos que participaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desta tese.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Lista de figuras	
Resumo	
Abstract	
1.0.-INTRODUÇÃO	01
1.1.-Formação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de lipídeos nitrados	01
1.2.-Atividade biológica dos lipídeos nitrados	03
1.3.-Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR)	05
1.3.1-Aterosclerose e PPARs	06
1.3.2-Estrutura e atividade dos PPARs	10
1.3.3-Regulação da atividade dos PPARs por modificações pós- tradução	12
1.4.-Regulação da atividade dos receptores nucleares por $\cdot\text{NO}$	16
1.5.-Ativação de MAPK via $\cdot\text{NO}$	18
1.6.- Receptor X Hepático (LXR)	19
1.6.1- LXR e Aterosclerose	20
2.0.- OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3.0.-Material e Métodos	25
3.1.-Materiais	25
3.2.-Síntese de padrão de nitrolinoleato	29
3.2.1.-Reação do ácido linoleico (18:2) com NO_2BF_4	29
3.2.2.-Isolamento e purificação de nitrolinoleato	29
3.3.-Caracterização química de LNO_2	30
3.3.1.-Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa	30
3.3.1.1.-Produtos derivados do 18:2	30
3.4.-Células	31
3.5.-Amplificação dos plasmídeos vetores pcDNA3	32
3.5.1-Purificação dos plasmídeos pcDNA-H-ras ^{C118S}	32
3.5.2.-Transfecção das células THP-1	33
3.5.3.-Preparação de GST-RBD	34
3.5.4.-Lisado de proteínas totais	35
3.5.5.-Isolamento da Fração Nuclear Erk	35
3.5.6.-Precipitação GST-RBD	36
3.6.-Reações de Western blot para detecção das MAPKs	36
3.6.1.-Western blot para detecção de Ras e Ras-GTP	37

3.6.2.-Western blot para ERK e ERk fosforilada	38
3.6.3.-Western blot para p38 e p38 fosforilada	38
3.7.-Ativação de PPAR por nitrolinoleato	39
3.7.1- Transfecção e Ativação do receptor nuclear LXR	39
3.7.2.-Extração das proteínas nucleares para EMSA	40
3.7.3.-Ensaio de retardamento de bandas-EMSA	41
3.8.0- Análise da expressão gênica de PPAR α , β , γ , CD36 e ciclifilina	44
3.9.0.-imunoprecipitação-fosforilação do receptor nuclear PPAR	45
3.9.1-Análise estatística	46
4.0.-RESULTADOS	47
4.1.-Síntese de padrão de LNO ₂	47
4.1.2.-Reação do ácido linoleico com NO ₂ BF ₄	47
4.1.3.-Isolamento e purificação de LNO ₂	57
4.1.4- Caracterização da liberação de [•] NO pelo nitrolinoleato (LNO ₂ , 60 324 m/z)	60
4.1.5.-Liberação direta de [•] NO a partir do LNO ₂ detectada por quimioluminescência	60
4.1.6- Estimativa das concentrações de [•] NO geradas em células THP-1 após estímulos com LNO ₂ na presença de C-PTIO	61
4.1.7.-Ativação de PPAR por LNO ₂	62
4.1.8.-Ativação dos subtipos PPARs (α , β e γ) por Super-shift.	65
4.1.9.- Ativação do receptor PPAR induzida por LNO ₂ em células THP-1 na presença de C-PTIO	66
4.2.-Cinética de ativação da proteína p21 Ras	67
4.2.1.-Ativação da proteína p21 Ras induzida por LNO ₂ em células THP-1 na presença de C-PTIO	68
4.2.2.- Avaliação da atividade da proteína p21 Ras em células THP-1 transfectadas com plasmídeo p21 Ras ^{C118s} e THP-1 parental	69
4.2.3.- Cinética de ativação da MAP quinase ERK (1/2) citoplasmática	70
4.2.4.- Cinética de ativação da MAP quinase ERK (1/2) citoplasmática induzida por LNO ₂ na células THP-1 parental na presença de C-PTIO	71
4.2.5.-Avaliação da atividade da MAP quinase ERK2 nuclear em células THP-1 transfectadas com plasmídeo p21 Ras ^{C118s} e THP-1 parental	72
4.2.6.-Qual é a relevância da MAP quinase ERK (1/2) no mecanismo de ativação do receptor nuclear PPAR?	73
4.2.7.- Ativação da MAP quinase ERK (1/2) citoplasmática induzida por LNO ₂ na presença de PD098059	73
4.2.8.-Cinética de ativação da MAPK p38 citoplasmática induzida por LNO ₂	76

4.2.9.-Imunoprecipitação de PPAR γ e PPARα	77
4.3.0- Ativação dos receptores nucleares LXR α e β	79
5.0.-Cinética da expressão de RNAm dos subtipos de PPARs	80
5.1.-Expressão de RNAm dos subtipos de PPARs induzida por LNO₂ em células THP-1 na presença de C-PTIO	83
5.1.2.- Expressão de RNAm de CD36 induzida por LNO₂ em células THP-1 na presença de C-PTIO	86
6.0.-Discussão	89
7.0.-Conclusão	95
8.0.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

Lista de abreviaturas

•NO: óxido nítrico

•NO₂: dióxido de nitrogênio

AP-1: proteína ativadora 1

Apo : apolipoproteína

BSA: albumina sérica bovina

cGMP: guanilato monofosfato cíclico

C-PTIO: 2-4-carboxi fenil 4455 tetrametilimidazolina oxil 3 óxido

DNA: ácido desoxiribonucleico

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etileno diaminotetra acético

EGF: fator de crescimento epidérmico

EGTA: ácido etilenoglicoltetra

EMSA: ensaio de retardamento de banda

ERK: quinase regulada por estímulo extracelular

FAS: ácido graxo sintetase

GDP: guanosina difosfato

GTP: guanosina trifosfato

HDL: lipoproteína de alta densidade

HEK: fibroblasto de rim embrionário humano

HMG-CoA redutase : 3:hidroxi:3:metilglutaril coenzima A redutase

HNF: fator nuclear hepático

HNO₂ : ácido nitroso

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

ICAM: molécula de adesão intercelular

iNOS: óxido nítrico sintase indutível

JNK: quinase ativada por estresse

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LNO₂: nitrolípido

LO• : radical alcóxil

LOO• : radical peróxil

LPS: lipopolissacarídeo

LXR: receptor X hepático

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MEK: quinase regulada por estímulo extracelular

MMP-9: metaloproteinase-9

MPO: mieloperoxidase

N₂O₃: trióxido de dinitrogênio

NADPH oxidase: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NaPyr: pirofosfato de sódio

NF-κB: fator nuclear κB

NO₂⁻ : nitrito

NO₂⁺ : cátion nitrônio

NO₂BF₄ : Tetrafluoborato de notrônio

NP-40: etil-fenil-polietileno glicol (detergente não iônico)

ONOO⁻ : peroxinitrito

p21Ras^{C118S}: plasmédeo que contém a cisteína 118 de rãs mutada por serina

p38: proteína quinase p38

PBS: tampão de fosfato de sódio

PCR: reação de polimerase em cadeia

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PGC:1: co:ativador transcricional 1

PKA: proteína quinase A

PMSF: fenil metil sulfonil fluoreto

PPAR: receptor ativador de prolifedor de peroxissoma

PPRE: elemento responsivo dos proliferadores de peroxissoma

Raf: proteína serina quinase

Ras: proteína codificada pelo oncogene do vírus do sarcoma murino de Harvey

RXR: receptor retinóico X

SCD: esterol CoA desnaturase

SDS: dodecil sulfato sódico

SNAP: S:nitroso:N:acetilpenicilamina

SNP: nitropussiato de sódio

SREBP: elemento responsivo ao esterol

TBE: tampão tris-borato EDTA

TBS-T: tampão Tris-base tween

THP-1: células leucêmicas monocíticas humanas

TNF- α : fator α de necrose tumoral

VCAM: molécula de adesão vascular

Lista de símbolos

μL: microlitro

μM : micromol

h : hora

kDa: kilodalton

mL : mililitro

mM : milimol

nM: nanomol

° C : grau Celsius

Lista de figuras

Figura.1. -Esquema representativo da estrutura do PPAR.	11
Figura.2.- Representação da regulação da atividade transcricional dos PPARs via quinases.	15
Figura 3.- Efeitos do LXR no metabolismo do colesterol e na lipogênese	22
Figura 4.-Mecanismo proposto para a ativação do receptor nuclear PPAR em células THP-1 induzida por LNO ₂	23
Figura 5.- Princípio do Ensaio de retardamento de banda (EMSA)	42
Figura 6.- Análise por LC-ESI/MS/MS	48
Figura 7.- Espectro de fragmentação MS/MS do íon de 308 <i>m/z</i>	49
Figura 8.- Espectro de fragmentação MS/MS do íon de 324 <i>m/z</i>	49
Figura 9.- Espectro de fragmentação MS/MS do íon de 344 <i>m/z</i>	50
Figura 10.- Análise por LC-ESI/MS/MS dos produtos da reação do ácido linoleico com NO ₂ BF ₄ em atmosfera de oxigênio.	51
Figura 11.- Análise por LC-ESI/MS/MS dos produtos da reação do ácido linoleico com NO ₂ BF ₄ em atmosfera de nitrogênio.	52
Figura 12-Monitoramento da formação dos produtos derivados da nitração do linoleato em relação ao tempo de síntese	53
Figura.13.- Monitoramento da formação dos produtos derivados da nitração do linoleato após a extração	54
Figura 14. Síntese do nitrolinoleato realizada com diferentes concentrações de substrato: 1.60 mmol e 0.16 mmol	55
Figura 15. - Monitoramento dos produtos da nitração do linoleato utilizando-se acetonitrila e clorofórmio	56
Figura 16.- Monitoramento dos produtos da nitração do linoleato utilizando-se acetonitrila	56
Figura 17: Monitoramento da eluição do ácido linoléico (279 <i>m/z</i>)	58
Figura 18: Monitoramento da eluição dos produtos 324 e 344 <i>m/z</i>	58
Figura 19: Monitoramento da eluição do produto 308 <i>m/z</i>	59
Figura 20.- Espectro de fragmentação MS/MS do íon 324 <i>m/z</i>	59
Figura.21.- Efeitos do ascorbato (10mM) e do C-PTIO (1mM) na liberação de [•] NO, após incubação por 15 min. com LNO ₂ (10 μM)	60
Figura 22.- Cinética da liberação de [•] NO	61
Figura.23 A/B. Ativação do PPAR em resposta ao LNO ₂	63
Figura 24. Ativação do PPAR em resposta ao ácido linoleico (LA) e nitrolinoleato (LNO ₂).	64
Figura 25.- Ativação dos subtipos de PPAR (α,β e γ) analisada por EMSA super-shift, após estímulo por 1h com LNO ₂ (0,01μM).	65
Figura.26.-Ativação do PPAR por LNO ₂ (0,01μM) na presença ou ausência de C-PTIO	66
Figura 27: Cinética de ativação da proteína p21 Ras	67

Figura 28:Efeito do C-PTIO na ativação da proteína p21 Ras	68
Figura 29. Cinética de ativação da proteína p21 Ras nas células THP-1 parental e p21 Ras ^{C118s} .	69
Figura 30: Cinética de ativação da MAP quinase ERK (1/2) citoplasmática.	70
Figura 31: Cinética de ativação da MAP quinase ERK (1/2) citoplasmática na presença de C-PTIO	71
Figura 32.- Ativação da MAP quinase ERK2 nuclear.	72
Figura 33.- Inibição da ativação da MAP quinase ERK (1/2) citoplasmática.	74
Figura.34. Ativação do PPAR por LNO ₂ na presença ou ausência de PD098059	75
Figura 35: Ativação de p38 induzida por LNO ₂	76
Figura.36. Imunoprecipitação de PPAR γ em células THP-1.	77
Figura.37.-Imunoprecipitação de PPAR α em células THP-1	78
Figura 38 A/B.- Ativação das isoformas α e β do receptor nuclear LXR	79
Figura.39. Expressão de RNAm de PPAR α em resposta ao LNO ₂	80
Figura 40.- Expressão de RNAm de PPAR β em resposta ao LNO ₂ .	81
Figura.41.-Expressão de RNAm de PPAR γ em resposta ao LNO ₂	82
Figura.42.- Expressão de RNAm e análise densitométrica dos produtos de PCR para PPAR α em células THP-1.	84
Figura.43.-Expressão de RNAm e análise densitométrica dos produtos de PCR para PPAR β em células THP-1	85
Figura.44.- Expressão de RNAm e análise densitométrica dos produtos de PCR para PPAR γ em células THP-1	86
Figura.45.-Expressão de RNAm e análise densitométrica dos produtos de PCR para CD36 em células THP-1	88
Figura.46-Mecanismo proposto para a ativação do receptor nuclear PPAR em células THP-1 induzida por LNO ₂	94

Resumo

A atividade dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) e receptor X hepático (LXR) são regulados por ácidos graxos. Entretanto, o papel do LNO₂, um produto endógeno da nitratação do ácido linoléico por espécies reativas derivadas de óxido nítrico ($\cdot$ NO), na via de sinalização que regula a ativação destes receptores ainda não está elucidada. Assim, considerando a propriedade do LNO₂ como doador de NO, nós investigamos a participação da via de sinalização p21Ras/Raf/ERK na ativação de PPAR e LXR por LNO₂.

Os resultados obtidos demonstraram que LNO₂, na concentração de 0.01μM, foi um potente ativador de PPAR quando comparado ao ligante natural ácido linoléico, o qual apresentou ativação equivalente do PPAR na concentração de 10μM. O LNO₂, contudo não teve efeito na ativação de LXR. LNO₂ foi um potente ativador de p21Ras quando comparado ao ácido linoléico. A ativação de Ras ocorreu após 5 minutos de incubação com LNO₂ em células parentais. Entretanto, em células transfectadas com p21Ras^{C118S}, o LNO₂ não foi capaz de ativar Ras. A ativação de Ras e PPAR foi dependente da liberação de NO a partir de LNO₂, o que foi evidenciado na presença de C-PTIO, um seqüestrador de NO. LNO₂ ativou ERK, mas não demonstrou efeito relevante na ativação de p38 MAP kinase. A utilização de um inibidor específico de MEK, PD09895, inibiu a ativação de ERK induzida por LNO₂, sugerindo que existe uma conexão entre ERK e a ativação de PPAR. Nós concluímos que a ativação do receptor nuclear PPAR por LNO₂ é dependente de NO e da via de sinalização p21Ras/Raf/ERK, a qual é capaz de ativar os subtipos α, β e γ do PPAR, modulando, desse modo, a expressão de genes responsivos a este fator de transcrição.

Palavra-chave: nitrolinoleato, óxido nítrico, p21Ras e PPAR

Abstract

Fatty acids bind to and regulate the activity of peroxisome proliferator-activated (PPAR) and liver X receptors (LXR). However, the role of LNO₂, an endogenous product of the nitration of linoleic acid by nitric oxide (NO)-derived reactive species, on signalling pathways regulating these nuclear receptors is poorly understood. Thus, considering the properties of LNO₂ as NO donor, we investigated the role of p21Ras-MAP kinases signaling pathway in the activation of PPARs and LXR by LNO₂.

LNO₂ at physiologically relevant concentrations (0.01 μM) activates PPAR. By contrast, linoleic acid, a natural ligand for PPAR, only activated the receptor at much higher concentrations (10 μM). However, it did not affect LXR activation. LNO₂ is a more potent activator of p21 Ras than linoleic acid at the same conditions. Ras activation occurred within the first 5 minutes after LNO₂ addition to parental cells. However, in p21Ras^{C118S} transfected cells, were unable to detect activation of Ras. Ras and PPAR activation depends on NO released from LNO₂ as evidenced by the inhibitory effect of C-PTIO, a NO scavenger. LNO₂ activated ERK but displayed no effects relevant on p38 MAP kinase. In addition, the use of specific inhibitors to MEK, PD09895, blocked PPAR activation and ERK phosphorylation by LNO₂, suggesting a connection between ERK and the activation of PPAR. We conclude that LNO₂ induced THP-1 cells activating Ras by S-nitrosation and recruiting the MAP kinase ERK, a downstream element of this signalling cascade and activated PPAR (α, β and γ).

Keywords: nitrolinoleate, nitric oxide, p21Ras and PPAR

1.0.-INTRODUÇÃO

1.1.-Formação *in vitro* e *in vivo* de lipídeos nitrados.

Diversos estudos têm demonstrado que o $\cdot\text{NO}$, ou espécies derivadas, reage com lipídeos e lipoproteínas *in vitro* e *in vivo*. (Lima et al. 2003; Lima et al. 2002; Rubbo et al. 1996; O'Donnell et al. 2001). Os lipídeos nitrados são formados quando os ácidos graxos insaturados são expostos a $\cdot\text{NO}/\cdot\text{NO}_2$ e ONOO^- , tanto *in vitro* quanto *in vivo*. (Eiserich et al. 1998; O'Donnell et al. 1999; O'Donnell & Freeman 2001). A formação de lipídeos nitrados foi descrita inicialmente em estudos utilizando poluentes atmosféricos, que demonstraram os produtos da reação de óxidos de nitrogênio com ácidos graxos insaturados (Pryor et al. 1981; Pryor, Lightsey & Church, 1982). Esses lipídeos nitrados podem ser formados por uma reação direta do $\cdot\text{NO}_2$ com lipídeos não oxidados, em pH fisiológico, ou por reação com o ácido nitroso (HNO_2) formado a partir da acidificação do nitrito em meio contendo lipídeos oxidados.

A geração de espécies lipídicas nitradas por meio da reação com peroxinitrito pode ocorrer por mecanismos dependentes do dióxido de nitrogênio ($\cdot\text{NO}_2$) e/ou do cátion nitrônio (NO_2^+). A nitração do metil linoleato e linoleato por $\cdot\text{NO}_2$ ocorre através da abstração inicial de um átomo de hidrogênio da dupla ligação, por um oxidante, formando um radical alquil, que em seguida em baixa tensão de oxigênio, combina-se com o $\cdot\text{NO}_2$, formando um nitroalquil ou nitrolipídeo (Marieq & Szent, 1996). Contudo, um alquilnitrito (RONO) também pode ser formado pela reação do $\cdot\text{NO}$ com $\text{LO}\cdot$ (Eiserich et al. 1998). Tem sido observado que o ONOO^- se

difunde através da membrana e lipoproteínas promovendo a nitração dos ácidos graxos insaturados. (Denicola et al. 1998; O'Donnell et al. 1999).

O principal subproduto formado a partir do $\bullet\text{NO}$ no organismo é o nitrito (NO_2^-), que é instável em pH fisiológico e, em condições ácidas, gera ácido nitroso (HNO_2) que pode originar diversas espécies nitrantes e nitrosantes (N_2O_3 , $\bullet\text{NO}$, $\bullet\text{NO}_2$) e mediar a nitração dos ácidos graxos insaturados e hidroperóxidos lipídicos (Lim et al. 2002). As reações destas espécies com hidroperóxidos do ácido linoleico (18:2) resultam na formação de espécies com íons de relação massa/carga igual a 340, sugerindo diversas estruturas possíveis como LOONO , LONO_2 , L(O)NO_2 (Lima et al. 2003; Lima et al. 2002; O'Donnell et al. 1999) ou um produto nitrohidroxilado LNO_2OH (Lima et al. 2002; Napolitano et al. 2002). Outra via que contribui para a nitração/nitrosação são as peroxidases, como as mieloperoxidases (MPO), que podem oxidar NO_2^- à $\bullet\text{NO}_2$, uma espécie capaz de catalisar a nitração de biomoléculas (Baldus et al. 2001; Eiserich et al. 2002).

Atualmente existem várias evidências da formação endógena destes lipídeos nitrados, em especial, durante a reação inflamatória, situação na qual há aumento da produção destas espécies reativas. A partir daí, diversos modelos experimentais demonstraram a formação de lipídeos nitrados ou nitrosilados em meios compatíveis com condições fisiológicas.

A formação dos lipídeos nitrados tem sido demonstrada em uma variedade de sistemas *in vitro*, incluindo ácidos graxos insaturados, lipossomas, LDL oxidada por cobre, células endoteliais e macrófagos (Hayashi et al. 1995; Rubbo & Freeman 1996; Rubbo et al. 1995; Yates et al. 1992). Esta formação pode ser primariamente em consequência de reações do $\bullet\text{NO}$ e suas espécies derivadas com radicais lipídicos ($\text{L}^\bullet$, $\text{LO}^\bullet$,

LOO[•]), que ocorrem com alta velocidade de reação (10^9 a 10^{11} mol/L⁻¹.s⁻¹), limitada apenas por difusão, levando à formação de produtos nitrados com estruturas características de LNO₂, LONO, LONO₂, L(O)NO₂ e LNO₂OH.

In vivo, os lipídeos nitrados têm sido encontrados no músculo cardíaco bovino (Balazy et al. 2001), plasma e lipoproteínas de humanos (Lima et al. 2002). e no plasma de animais submetidos à isquemia/reperfusão hepática (Lim et al. 2002). Os lipídeos nitrados encontrados apresentavam propriedades cromatográficas e relação massa/carga idênticas às descritas para araquidonato e linoleato nitrados (Balazy et al. 2001; Lima et al. 2003; Lima et al. 2002).

1.2.-Atividade biológica dos lipídeos nitrados.

In vivo, a nitração, nitrosação e/ou oxidação de biomoléculas como aminoácidos, lipídeos e DNA ocorre em uma variedade de doenças inflamatórias, incluindo a aterosclerose, rejeição de órgãos e inflamação crônica (Eiserich et al. 1998). Essa nitração tem sido apontada como responsável por importantes consequências para os sistemas biológicos como: alteração da integridade e morte celular, estimulação/inibição de vias de sinalização e formação de novas espécies bioativas (Lim et al. 2002).

Desde a descoberta dos lipídeos nitrados pouco se avançou a respeito do seu metabolismo e efeitos biológicos *in vivo*. Balazy et al. 2001 observaram a presença de um derivado nitro-hidroxilado do ácido araquidônico, em tecido cardíaco bovino. Esse produto, derivado da reação do ácido araquidônico com peroxinitrito, libera [•]NO e causa relaxamento em anéis aórticos de ratos.

Napolitano et al. (2000) testaram a atividade citotóxica de derivados nitrados do ácido linoleico, na linhagem celular HaCat (queratinócitos humanos), não detectando efeito tóxico. Posteriormente, demonstrou-se que lipídeos nitrados, incluindo o nitrolinoleato, colesteril linoleato e nitrohidroxilinoato possuem ação vasodilatadora, em anéis aórticos de ratos, dependente da guanilato ciclase solúvel (Lima et al, 2003).

O nitrolinoleato também é capaz de inibir as atividades plaquetária e inflamatória, a geração de ânion superóxido (via inibição da NADPH oxidase), a desgranulação e a expressão de integrinas nos neutrófilos (Coles et al. 2002). Estes dados indicam que o nitrolinoleato inibe a ativação dos leucócitos e sugerem um novo mecanismo pelo qual o $\bullet\text{NO}$, derivado de biomoléculas nitradas, poderia minimizar a resposta inflamatória.

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) tratada com espécies oxidantes e nitrantes/nitrosantes, formadas durante a oxidação do NO_2^- pela enzima mieloperoxidase, resulta na formação de uma partícula de LDL que é reconhecida pelo receptor scavenger CD36 de macrófagos (Graham et al. 1993; Podrez et al. 2000). A captação por macrófagos desta LDL tratada com espécies nitrantes/nitrosantes promove o acúmulo intracelular de ésteres de colesterol e a formação de células espumosas (Panassenko et al. 1997; Podrez et al. 1999), o que sugere a participação dos lipídeos nitrados na modulação da aterogênese.

Todos estes estudos revelam um novo mecanismo pelos quais os lipídeos nitrados poderiam modular a ativação celular, a resposta inflamatória, o vasorelaxamento dependente do endotélio e também como a presença de um grupo funcional nitro pode alterar a bioatividade dos lipídeos.

1.3.-Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR).

Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) são receptores nucleares presentes em vários órgãos e tipos celulares. Caracterizam-se por sua habilidade em se ligar a seqüências específicas de DNA e regular a expressão gênica, quando são ativados por ligantes de origem fisiológica (ácidos graxos e eicosanóides) ou fármacos (hipolipemiantes, antiinflamatórios e sensibilizadores de resposta à insulina). Os PPARs estão subdivididos em PPAR- α , PPAR- γ e PPAR- β . Os PPAR- α e PPAR- γ são as duas categorias principais destes receptores. Ambos estão envolvidos no metabolismo lipídico, homeostasia da glicose, proliferação e diferenciação celular e apoptose (Desvergne et al. 1999), assim como na resposta inflamatória, modulando o recrutamento e adesão de monócitos nas lesões ateroscleróticas (Duez et al. 2001).

1.3.1-Aterosclerose e PPARs

A aterosclerose é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo de lipídeos e tecido conjuntivo fibroso nas artérias, acompanhada por uma resposta inflamatória local (Lusis 2000). Os PPARs interferem no processo inicial da aterogênese, que consiste no recrutamento e quimiotaxia de leucócitos para a lesão aterosclerótica. PPARs modulam a produção de quimiocinas, a expressão de receptores para quimiocinas, assim como moléculas de adesão em células endoteliais, células T e monócitos. Estudos têm sugerido que, em macrófagos, a ativação de PPAR- α (mas não γ e β) pode induzir o efluxo de colesterol (Chawla et al. 2001; Chinetti et al. 2001; Oliver et al. 2001). Sabe-se que o ABCA-1, um membro da família de transportadores ABC, está envolvido no controle do efluxo de colesterol, mediado por Apo A1, em macrófagos. A regulação do ABCA-1 pode promover o *clearance* de colesterol e inibir a progressão da placa de ateroma (Puddu et al. 2003). Em humanos, o PPAR- α induz a transcrição dos genes das Apo AI e II, via ativação do elemento responsivo dos proliferadores de peroxissoma (PPRE), o que contribui para explicar o aumento de HDL-colesterol no tratamento com fibrato, um ativador sintético do PPAR- α (Vu-Dac et al. 1995). Os fibratos também induzem o aumento da expressão da enzima lipase lipoprotéica no fígado, levando ao aumento da pré-beta HDL (Schoonjans et al. 1996). O tratamento com fenofibrato de macacos Rhesus espontaneamente obesos, que apresentavam concentrações elevadas de triglicérides e baixas concentrações de HDL-colesterol, diminuiu em 55% e 27%, respectivamente, as concentrações de triglicérides e LDL-colesterol e aumentou em 35% o HDL-colesterol (Winegar et al. 2001). Além disso,

houve diminuição de 40% na concentração de insulina, sugerindo uma melhora na sensibilidade à insulina. Finalmente, outro importante efeito pleiotrópico dos fibratos é a indução da atividade antiinflamatória por interferir negativamente na ativação de NF-kB via ativação de PPAR- α (Delerive et al. 1999a). O PPAR- α pode induzir a expressão do I κ B, o principal inibidor do NF κ -B em células musculares lisas e hepatócitos (Delerive et al. 1999a). O PPAR- α pode regular vias de ativação do NF-kB e AP-1 e, conseqüentemente, modular genes envolvidos na resposta inflamatória vascular (Delerive et al. 1999a). De fato, em pacientes com hiperlipidemia moderada tratados com fibrato observou-se diminuição das concentrações plasmáticas de interleucina-6, fator α de necrose tumoral (TNF- α), interferon γ , fibrinogênio e proteína C reativa (Madej et al. 1998; Staels et al. 1998). Adicionalmente, em pacientes diabéticos tratados com rosiglitazona observou-se diminuição das concentrações plasmáticas de metaloproteinase-9 e proteína C reativa (Haffner et al. 2002). Outros ligantes de PPAR- α podem inibir a expressão de VCAM-1 induzida por citocinas (Marx et al. 1999; Pasceri et al. 2000), a expressão de endotelina-1 induzida por trombina (Delerive et al. 1999b) e a expressão de ICAM-1 induzida por TNF- α . Estes dados revelam que a ativação do PPAR- α exerce uma atividade antiinflamatória *in vivo*.

O papel do PPAR- γ no controle da inflamação ainda é muito controverso. O efeito antiinflamatório do PPAR- γ consiste na inibição da ativação de macrófagos e na produção de citocinas pró-inflamatórias (Goetze et al. 1999; Jiang et al. 1998; Pasceri et al. 2000; Ricote et al. 1998). Entretanto, Thieringer et al. (2000) demonstraram que compostos capazes de

ativar o PPAR- γ em monócitos/ macrófagos não inibiram a produção de citocinas *in vitro* e *in vivo* em um modelo de inflamação aguda.

No entanto, a ativação do PPAR- γ por fármacos, como as tiazolidinedionas e glitazonas, modulou o desenvolvimento da aterosclerose em vários modelos experimentais (Glass 2001; Jackson et al. 1999; Rosen et al. 2000), por normalizar as condições metabólicas associadas à aterosclerose, como a resistência à insulina, além de promover efeitos diretos nas células da parede vascular e inibir a formação de estrias gordurosas. A supressão do gene do PPAR- γ , em ratos, resultou na diminuição da expressão dos transportadores ABCA-1, ABCG-1 e apo E, e na redução do efluxo de colesterol dos macrófagos (Akiyama et al. 2002). Adicionalmente, alguns ativadores de PPAR- γ podem regular a expressão da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), em macrófagos THP-1, o que é importante considerando-se que o aumento da expressão dos genes envolvidos na biosíntese do colesterol promove aumento intracelular de colesterol (LIDA KT, 2002). Em modelo animal os ativadores de PPAR- γ (glitazonas) induzem a atividade da lipase em adipócitos (Way et al. 2001) e diminuem as concentrações plasmáticas de triglicérides, embora a diminuição dos triglicérides em humanos, via agonistas do PPAR- γ , ainda seja controversa (Barbier et al. 2002).

Tontonoz et al.(1998) observaram que a ativação do PPAR- γ promove uma indução transcricional do receptor scavenger CD36 de monócitos/macrófagos, seguido do aumento da captação de LDL e formação de células espumosas. Isto sugere que a ativação do PPAR- γ pode promover o desenvolvimento da aterosclerose, ao invés de inibi - lá. Entretanto, o aumento de CD36 pode ser subjugado pelo efeito anti-aterogênico sobre o

metabolismo da glicose e lipoproteínas, além da redução na inflamação (Willson et al. 2001; Patel et al. 2002). O efeito antiinflamatório mediado pelo PPAR- γ tem sido demonstrado pela inibição da expressão da óxido nítrico sintase indutível (iNOS) com a conseqüente diminuição da produção de $\cdot\text{NO}$ em macrófagos, devido a modulação das via de sinalização de AP-1 e NF-kB (Lepore 2002), a inibição da expressão de VCAM-1 e ICAM-1 em células endoteliais ativadas e monócitos/macrófagos na placa aterosclerótica (Pasceri et al. 2000), e menor produção de TNF- α e interleucinas 1- β e 6 (Jiang et al. 1998; Ricote et al. 1998).

Finalmente, outro efeito da ativação de ambos PPAR α e γ , que poderia contribuir para o seu efeito ateroprotetor e antiinflamatório é o aumento da expressão da enzima superóxido dismutase dependente de Cu^{2+} e Zn^{2+} e a diminuição da expressão de enzimas que geram ânion superóxido, por exemplo a NADPH oxidase em células endoteliais (Inoue et al. 2001). Assim os PPARs poderiam modular a formação de radicais livres nas células endoteliais, possibilitando uma menor formação de LDL oxidada.

1.3.2.-Estrutura e atividade dos PPARs.

Os PPARs são compostos por 5 diferentes domínios: domínio A/B (região amino-terminal), domínio C (ligação ao DNA - DBD), domínio D (região de dobradiça), domínio E (interação com o ligante - LDB) e domínio F (função desconhecida) (Blanquart et al. 2003) (Fig.1).

O domínio (A/B) amino-terminal é extremamente variável entre os membros da superfamília dos receptores nucleares, tanto no tamanho quanto na sequência de aminoácidos, e exibe uma função de ativação transcricional que opera independente do ligante, denominada função de ativação 1 (AF-1).

O DBD é o domínio melhor conservado entre todos os receptores nucleares e tem como função principal a ligação ao DNA. Este domínio situa-se na porção central dos receptores e é composto por dois segmentos estruturais conhecidos como *zinc fingers* e contém nove cisteínas, que são conservadas através da superfamília de receptores nucleares (Aranda et al. 2001). Este domínio controla a expressão gênica através de ligações específicas às sequências de DNA, chamadas de elemento responsivo ao proliferador de peroxissoma (PPRE), depois da heterodimerização com o receptor nuclear RXR (Kliewer et al. 1992). Os PPREs contêm repetições diretas de sequências AGGTCA separadas por 1 ou 2 nucleotídeos, respectivamente, chamados de repetição direta 1 e 2 (DR1 e DR2).

No domínio D existe uma pequena região que conecta o DBD ao LBD, que é conhecida como dobradiça (*hinge*), permitindo a rotação do DBD em relação ao LBD.

O domínio LDB localiza-se na região carboxi-terminal e possui várias funções, como o reconhecimento do ligante e a homo e heterodimerização do receptor. Além dessas funções, o LBD contém uma superfície que é fundamental para a ativação transcricional, que se forma com a ligação ao receptor. Após a ligação a essa região, denominada função de ativação 2 (AF-2), ocorre interação com os co-ativadores, que permitirão a formação do complexo protéico envolvido na ativação da transcrição (Blanquart et al. 2003).

Figura 1. Esquema representativo da estrutura do PPAR. O domínio A/B contém a função de ativação 1, que é independente da presença do ligante, o domínio C faz a ligação ao DNA, o domínio D contém a dobradiça e o domínio E que reconhece o ligante e contém a função de ativação 2 que é independente da presença do ligante e é necessária para a heterodimerização com RXR. O domínio F ainda não tem função estabelecida (Blanquart et al., 2003).

1.3.3.-Regulação da atividade dos PPARs por modificações pós-tradução.

Vários estudos têm demonstrado que a atividade transcricional dos PPARs é regulada por mecanismos pós-tradução, incluindo a fosforilação. A fosforilação dos receptores nucleares é o principal determinante para a sua atividade transcricional, como demonstrado para os receptores de estrógeno, progesterona e o receptor retinóico X (RXR). Similarmente, o PPAR α é uma fosfoproteína e sua atividade é modulada pela fosforilação (Shalev et al. 1996).

Estudos têm demonstrado que ligantes dos PPARs α e γ , ativam as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Rokos et al. 1997; Mounho et al. 1999; Lennon et al. 2002; Teruel et al. 2003). Experimentos *in vitro* e *in vivo* têm revelado que os PPAR α e γ podem ser fosforilados por MAPK específicas (α) ou pelos três tipos (γ) de MAPK (ERK, p38 e JNK), levando à modulação da atividade transcricional (Barger et al. 2001; Camp et al. 1999; Hu et al. 1996; Juge-Aubry et al. 1999). As mudanças transcricionais induzidas por agonistas dos PPARs α e γ podem ser dissociadas em duas vias: independente do PPAR (via MAPK) ou dependente de PPAR (via ligante) (Baek et al. 2003), sugerindo que apenas as MAPK podem mediar alguns dos efeitos celulares dos ligantes dos PPARs. Tem sido demonstrado que o PPAR- α é fosforilado nos resíduos serina 12 e 21, em resposta à insulina, por uma via dependente de MAPK, induzindo o aumento da atividade AF-1 do PPAR- α , que opera na ausência do ligante. Um estudo realizado em miócitos cardíacos de ratos demonstrou

que a p38, uma MAPK ativada em condições de estresse (isquemia e hipóxia), fosforila as serinas da AF-1 do PPAR- α e conseqüentemente aumenta a atividade transcricional deste receptor nuclear por aumentar a interação com o co-ativador transcricional PGC-1 (Barger et al. 2001).

O PPAR- α é também alvo de outras quinases. Em ratos o PPAR- α é fosforilado por proteína quinase A (PKA) e este processo além de aumentar a atividade transcricional, estabelece a ligação do receptor nuclear com o DNA (Lazennec et al. 2000). Além disso, experimentos de fosforilação *in vitro* demonstraram que o DBD é fortemente fosforilado por PKA, comparados aos domínios A/B e o LBD. Recentemente, foi demonstrado que a cerivastatina, um inibidor da HMG-CoA redutase, aumenta a atividade transcricional do PPAR- α por inibir a formação do pirofosfato de geranilgeranil (Martin et al. 2001). A geranilação das proteínas G é necessária para a translocação destas proteínas para a membrana e posterior ativação. Por inibir a ativação da proteína G Rho A, a cerivastatina estimula a atividade transcricional do PPAR- α por reduzir sua fosforilação (Martin et al. 2001). Todos estes estudos demonstram que o PPAR α é um importante alvo de diferentes vias de fosforilação e sugere que a atividade do PPAR α é modulada por uma variedade de sinais extracelulares que estão ligados a diferentes processos fisiológicos.

O PPAR γ é também uma fosfoproteína, como foi demonstrado por Zhang et al. 1996. Neste estudo, verificou-se que o tratamento com insulina aumentou a atividade transcricional do PPAR γ , independentemente do ligante. Além disso, os autores demonstraram que o PPAR γ é fosforilado via MAPK, *in vivo*. Em contraste, tem sido demonstrado que a fosforilação do PPAR γ de ratos, via ativação de MAPK, induz a inibição de sua atividade

transcricional (Hu et al. 1996). Este efeito ocorre via fosforilação da serina 112 do PPAR γ , como confirmado por Adams et al., 1997 que verificaram que a serina 84 do PPAR γ 1 humano é fosforilada por MAPK ERK2 e JNK. A mutação desta serina aumentou a atividade transcricional AF-1 do PPAR γ . Camp et al. 1999 demonstraram que o PPAR γ 1 de rato é também regulado por fosforilação via MAPK no sítio onde está localizada a serina 82. Estes autores também verificaram que JNK, uma MAPK, fosforila PPAR γ 2 e diminui sua atividade transcricional dependente do ligante. O efeito da fosforilação da serina 112, via MAPK, no sítio que promove a atividade transcricional do PPAR γ foi explicado por uma modificação na comunicação interdomínios, reduzindo a afinidade de ligação (Shao et al. 1998). Em linhagem de adipócitos demonstrou-se que o crescimento celular e a diferenciação dos adipócitos foi dependente da fosforilação do PPAR γ (Blanquart et al. 2003). Esta fosforilação foi controlada por fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Camp et al. 1997). Em macrófagos, há uma via similar de regulação do PPAR γ . Han et al. (2000) demonstraram que os fatores transformadores de crescimento β 1 e β 2 (TGF β 1/2) podem inibir a ligação do PPAR γ , em macrófagos, o que induz a expressão do receptor scavenger CD36 via ativação de MAPK. Portanto a fosforilação por MAPK influencia a atividade do PPAR α e PPAR γ , diferencialmente, considerando-se que a fosforilação via MAPK ativa PPAR α e inibe PPAR γ (Fig.2).

Figura 2. Representação da regulação da atividade transcritorial dos PPARs via quinases. A fosforilação via MAPK aumenta a atividade do PPAR α e diminui a atividade do PPAR γ . Contudo a PKA induz um aumento da atividade dos dois subtipos de PPAR. P: fosforilação via quinases (Blanquart et al., 2003).

1.4.-Regulação da atividade dos receptores nucleares por $\cdot\text{NO}$.

A atividade de diversos fatores de transcrição é regulada por mecanismos dependentes da transdução de sinais, desde a regulação do transporte ao núcleo até as modificações que modulam a ligação ao DNA, ou interação com outras proteínas, resultando na ativação de genes. O $\cdot\text{NO}$ exerce um efeito modulador em proteínas alvo, por gerar derivado S-nitroso, a partir, de modificações de grupos tióis específicos de proteínas, ou, por reagir com proteínas que contêm metais. O $\cdot\text{NO}$ se liga às proteínas (ex.: albumina plasmática) ou a peptídeos (glutathiona) para prolongar sua atividade, formando um reservatório circulante de $\cdot\text{NO}$. Lima et al., 2003 verificaram que os lipídeos nitrados (nitrolinoleato, colesteril nitrolenoleato e nitrohidroxilinoaleato) liberam $\cdot\text{NO}$ e causam relaxamento independente do endotélio, indicando que os lipídeos nitrados poderiam atuar como uma fonte endógena de $\cdot\text{NO}$.

O $\cdot\text{NO}$ tem sido considerado como um mediador importante nas vias de sinalização celular. Uma das vias pela qual o $\cdot\text{NO}$ pode modular seus efeitos biológicos é a S-nitrosação de resíduos de cisteína, em especial, nos fatores de transcrição. Von Knethen et al. 2002 estudaram a ativação do PPAR γ pelo $\cdot\text{NO}$, em monócitos e macrófagos, utilizando dois doadores sintéticos de $\cdot\text{NO}$, S-nitrosoglutathiona e esperminaNONOato, além do $\cdot\text{NO}$ sintetizado endogenamente pela indução da óxido nítrico sintase indutível (iNOS). Verificaram que o $\cdot\text{NO}$ ativou o PPAR γ e minimizou o *burst oxidativo* em macrófagos, por regular a expressão gênica da p47, um importante componente do complexo enzimático da NADPH oxidase e, consequentemente, inibiu a formação do ânion superóxido. Estes dados

indicam que a propriedade antiinflamatória do $\cdot\text{NO}$ estaria relacionada à sua capacidade de modular a regulação gênica via ativação do PPAR γ .

Marino et al. (2001) observaram que o $\cdot\text{NO}$ inibiu a expressão gênica do 17β -estradiol, sugerindo que os resíduos de cisteína do domínio DBD α (domínio responsável pelo reconhecimento de seqüências específicas e ativação de genes) do receptor de estrógeno humano são os alvos prováveis de nitrosação pelo $\cdot\text{NO}$.

Hara et al. (2002) demonstraram que o $\cdot\text{NO}$ inibe a atividade de ligação ao DNA do fator nuclear hepático (HNF4), principal fator de transcrição e regulador da expressão gênica do CYP2D6. Estes autores sugerem que o $\cdot\text{NO}$ promove a nitrosação de resíduos de cisteína no domínio do HNF4, responsável pela ligação ao DNA. Adicionalmente, Hara et al. (2000) demonstraram que a indução da expressão gênica da CYP3A4 pela 1,25-dihidroxitamina D_3 , em células Caco-2, é inibida pelo $\cdot\text{NO}$.

O $\cdot\text{NO}$ inibe a ligação do NF-kB ao DNA, *in vivo* e *in vitro* (Marshall et al. 2001). O resíduo de cisteína 62 do domínio de ligação ao DNA da subunidade p50 do NF-kB é especificamente S-nitrosado, diminuindo em quatro vezes a atividade de ligação ao DNA. Brendeford et al. (1998) verificaram que o $\cdot\text{NO}$ rompe uma ligação específica do fator de transcrição c-Myb ao DNA e que uma cisteína redox-sensível é requerida para a modulação via $\cdot\text{NO}$. Similarmente, Matthews et al. (1996) estabeleceram que a inibição da ligação da subunidade p50 do NF-kB ao DNA por um composto doador de $\cdot\text{NO}$ envolvia um resíduo de cisteína redox-sensível, e que esta inibição poderia ser revertida pelo agente redutor ditioneitol, que promove desnitrosação.

Recentemente, Freeman & Schopfer (2004) revelaram que o nitrolinoleato (LNO₂), possível fonte endógena de [•]NO, está envolvido na regulação da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória via ativação de PPAR(α , β e γ).

1.5.-Ativação de MAPK via [•]NO.

Pelo fato das MAPKs serem importantes para a atividade dos PPARs, torna-se importante entender a modulação das MAPKs pelo [•]NO. As MAPK são proteínas serina/treonina quinases reguladas por estímulo extracelular, incluindo fatores de crescimento, mitógenos e estresse extracelular. Os principais grupos de MAPKs são: (i) quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1 e ERK2); (ii) quinases ativadas por fatores de crescimento via Ras/Raf/MEK; (iii) quinases ativadas por estresse (JNK/SAPK) e (iv) p38 MAPK.

Monteiro et al. (2000) demonstraram em fibroblastos de camundongo HER14, incubados com os doadores de [•]NO nitroprussiato de sódio (SNP) e S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), na ausência ou presença de EGF, um aumento da fosforilação em tirosina. Posteriormente, utilizando células endoteliais de aorta de coelho, mostraram que a fosforilação e a conseqüente ativação das ERK1 e 2 estava vinculada à ativação de RAS pelos doadores de [•]NO (Rocha Oliveira et al. 2003).

Estudos pioneiros de Lander et al. (1993), descreveram um novo mecanismo de sinalização pelo [•]NO, independente de guanilato monofosfato

cíclico (cGMP), através da ativação de proteínas G (que se ligam à guanosina). Estudos *in vitro*, utilizando Ras (proteína G monomérica) recombinante, revelaram que o $\cdot\text{NO}$ promove uma alteração conformacional da proteína, associada a um estímulo na liberação de GDP e conseqüente associação com GTP, demonstrando que Ras pode ser ativado através de interação com $\cdot\text{NO}$ (Lander et al. 1995). Esta interação resulta na S-nitrosação do resíduo de cisteína 118 da Ras, levando à ativação de uma cascata de proteínas quinases, incluindo a JNK, p38 MAPK e ERK 1/2. Adicionalmente, Deora et al.(2000) demonstraram a fosforilação de ELK1 (um dos substratos nucleares da ERK) após estimulação da via de sinalização de RAS por $\cdot\text{NO}$ em linfócitos T.

1.6.- Receptor X Hepático (LXR)

O LXR é outro membro da família de receptores nucleares, responsável pela regulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico (Barish et al. 2004). Existem duas isoformas de LXR: α e β . O LXR α é altamente expresso no tecido adiposo, intestino, fígado e macrófagos, enquanto que o LXR β é expresso em todos os tecidos examinados (Tecido adiposo, adrenal, colón, olhos, intestino, rim, ovário, placenta, pulmão, baço, pele, útero e testículo) (Repa et al. 2000b). Similarmente aos outros receptores nucleares, o LXR contém o domínio DBD (liga-se ao DNA) e o domínio LBD (interage com o ligante). O LXR heterodimeriza com o RXR (receptor X de retinóides) e liga-se a um elemento responsivo específico (LXRE), que contém seqüências repetidas AGGTCA separadas por 4 nucleotídeos,

chamadas de repetição direta 4 (DR4) (Joseph et al. 2003b; Tontonoz et al. 2003). Os ativadores endógenos destes receptores são formas específicas de colesterol oxidado (oxisteróis), como o 24(S)-hidroxicolesterol e 22(R)-hidroxicolesterol, ou por certos intermediários da via de biossíntese do colesterol como o 24(S),25-epoxicoolesterol (Fu et al. 2001; Janowski et al. 1996; Lehmann et al. 1997). Em macrófagos, estes oxisteróis podem ser derivados da LDL oxidada internalizada ou gerado intracelularmente através da modificação do colesterol (Fu et al. 2001; Laffitte et al. 2002). A enzima 27-hidroxilase (CYP27) é capaz de modificar a molécula de colesterol e transformá-lo em um ativador natural para LXR. Outro ativador dos LXRs são os ácidos graxos insaturados. Tobin et al. (2002) demonstraram que os ácidos graxos insaturados regulam positivamente o LXR- α , mas não o LXR- β em hepatócitos.

1.6.1- LXR e Aterosclerose

Estudos recentes têm demonstrado que o LXR exerce importante efeito ateroprotetor em macrófagos (Barish & Evans 2004). A ativação de LXR em macrófagos induz a expressão de vários genes envolvidos no metabolismo lipídico e no transporte reverso do colesterol, incluindo ABCA-1, ABCG-1 e Apo E (Repa & Mangelsdorf 2000b). Além disso, o LXR pode modular diretamente a inflamação. Macrófagos tratados com agonista de LXR preveniu a ativação de vários sinais inflamatórios induzidos por lipopolissacarídeo (LPS), incluindo a metaloproteinase-9 (MMP-9), iNOS e a ciclooxygenase-2 (Joseph et al. 2003a). Alguns destes

efeitos são dependentes de LXR e envolvem a repressão da via de sinalização do NF- κ B. Notavelmente, este efeito antiinflamatório difere entre os estudos *in vivo* e *in vitro*, porque o tratamento com agonista de LXR inibiu a expressão de MMP-9 mas não inibiu a expressão de iNOS nas lesões ateroscleróticas de ratos Apoe-null (Barish & Evans 2004). A administração crônica de um agonista sintético de LXR (GW3965) reduziu a aterosclerose em ratos LDL^{-/-} e Apo E^{-/-} (Joseph et al. 2002b). Por outro lado, a diminuição da expressão de LXR na medula óssea aumentou a formação da lesão neste mesmo modelo (Tangirala et al. 2002). Joseph et al. (2003a) demonstraram que agonistas de LXR podem reduzir a aterosclerose não apenas por promover o efluxo de colesterol, mas também por limitar a produção de mediadores inflamatórios na parede arterial.

No fígado, o LXR contribui para a regulação do gene da 7ceto-hidroxiase, enzima limitante para a conversão do colesterol a ácido biliar (Peet et al. 1998). No intestino, o LXR aumenta a expressão dos transportadores ABCA1 e ABCG1, que estão envolvidos na absorção de colesterol intestinal (Costet et al. 2000; Repa et al. 2000a; Repa & Mangelsdorf 2000b; Venkateswaran et al. 2000). O LXR também participa do remodelamento das lipoproteínas por influenciar a expressão de várias enzimas que atuam nas lipoproteínas, incluindo lipase lipoprotéica e as proteínas de transferência de ésteres de colesterol e de fosfolípidios (Cao et al. 2002; Laffitte et al., 2003; Luo et al., 2000; Mak et al. 2002). Adicionalmente, o LXR está envolvido na regulação do metabolismo dos triglicérides (Repa & Mangelsdorf 2000b; Schultz et al. 2000) e tem sido demonstrado que um ativador sintético de LXR aumenta a expressão de genes que participam da lipogênese, como a proteína 1C do elemento

responsivo ao esterol (SREBP-1c), ácido graxo sintetase (FAS), esterol CoA desaturase 1 (SCD-1) e lipase lipoprotéica (Joseph et al. 2002a; Zhang et al. 2001) (Fig.3).

Figura 3- Efeitos do LXR no metabolismo do colesterol e na lipogênese (Joseph & Tontonoz, 2003).

Sabendo que LNO_2 é uma molécula doadora de NO e que a proteína p21Ras pode ser ativada por NO através do mecanismo de nitrosação. Nós investigamos a hipótese de que o LNO_2 libera NO e induz a S-nitrosação da cisteína 118 da proteína p21Ras, tornando-a ativa. p21Ras uma vez ativada ativaria a cascata de sinalização Raf/MEK/ERK1/2 e consequentemente ativaria o receptor nuclear PPAR (fig.4).

Figura.4.-Mecanismo proposto para a ativação do receptor nuclear PPAR em células THP-1 induzida por LNO_2 : A proteína p21Ras, após ser nitrosada na cisteína 118, ativa a MAP quinase ERK 1/2, ERK 2 se transloca para o núcleo, fosforila os resíduos de serina da porção AF-1 do receptor ativando-o e consequentemente controlando a expressão gênica de genes alvo.

2.0.- OBJETIVOS.

2.1 Objetivo geral.

Investigar a participação das vias de sinalização constituídas pela proteína G de baixo peso molecular p21Ras e pelas MAPK ERK1/2 e p38, na ativação dos fatores de transcrição PPAR e LXR, mediada por nitrolinoleato.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a participação da proteína Ras e das MAPK quinases ERK 1/2 e p38 na ativação dos PPARs mediada por nitrolinoleato na linhagem monocítica humana THP-1.
- Avaliar a participação da proteína Ras e das MAPK quinases ERK 1/2 e p38 na ativação do LXR, mediada por nitrolinoleato monocítica humana THP-1.

3.0.-Material e Métodos.

3.1.-Materiais.

Para a realização dos experimentos foram utilizados os reagentes de mais alto grau de pureza, comercialmente disponíveis. O padrão de ácido linoleico foi adquirido da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). O tetrafluoroborato de nitrônio foi obtido da Aldrich (Milwaukee, WI). Todos os demais reagentes e solventes foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). A água deionizada utilizada nos experimentos foi tratada previamente por um sistema Milli-Q, Millipore® (Belford, TA).

Linhagem THP-1

A linhagem THP-1 constituída de células leucêmicas monocíticas humanas e as células HEK 293 (Fibroblasto de rim embrionário humano) foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection).

Plasmídeos

P21Ras^{C118S} gentilmente doados pelo professor Harry Lander da Universidade Cornell de Nova York e os plasmídeos de LXR α/β pelo professor Lisardo Boscá da Universidad Complutense de Madrid.

Anticorpos

Anti pan-Ras monoclonal

Anti-ERK 1/2 total

Anti-ERK 1/2 fosforilada

Anti-p38 total

Anti-p38 fosforilada

Anti-IgG de camundongo e anti-IgG de Coelho conjugados com peroxidase

Anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase

Anti-PPAR α

Anti-PPAR β

Anti-PPAR γ

Drogas e antibióticos

Ampicilina

Estreptomicina

Geneticina

Isopropilgalactosídeo (IPTG)

Meio de cultura

RPMI 1640

Meio LB-0,1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 0,1% NaOH 1N

Meio LB em placa-0,1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 0,1% NaOH 1N, 1,5% agar, pH 7.0

Meio SOB-2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,05% NaCl, 1%KCl 250mM, 0,5% MgCl₂ 1M, pH 7.0

Meio SOC-SOB adicionado `a glicose 1M

Soro fetal bovino (SFB)-inativado a 55°C durante 1 hora

Meio 2YT-1,6% triptona, 1% extrato de levedura, 0,5%NaCl

Soluções

Solução de congelamento-50%FBS, 10% DMSO, 40%RPMI

PBS - NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ anidro 8mM e KH₂PO₄ 1,5mM (pH 7,4)

Tampão Hipotônico- Hepes 10mM pH 7,9, KCl 10mM, EDTA 0,1 mM e EGTA 0,1mM

Tampão de extrato nuclear- Hepes 20mM pH7,9, NaCl 0,4M, EDTA 1mM e EGTA 1mM

TBE (10X) – 450mM Tris-borato, 10mM EDTA, pH8,0

Tampão de Amostra de SDS-PAGE (4X) - Tris.Cl 100mM, ditionitrotol 200mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20%

Tampão de Transferência para Proteína - glicina 39mM, Tris base 48mM, SDS 0,037%, metanol 20%

TBS-T - 150 mM NaCl, 50 mM Tris.HCl, 0,1% Tween-20, pH 7,5

Tampão RIPA – 50mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 0,25% deoxicolato de sódio, 1% NP-40, 1mM EDTA

Tampão Hepes – 50mM Hepes pH 7,5; 150mM Nacl, 10% glicerol; 1,2% Triton X-100; 1,5mM; 1,5mM MgCl₂, 1mM EGTA

Tampão de corrida para SDS-PAGE - 25mM Tris-base, 250mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3

Corante Ponceau - 0,1% Ponceau, 10% ácido acético glacial

Reagente de Bradford - Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate

Enzimas

Superscript – Invitrogen

Taq DNA Polimerase – Invitrogen

Inibidores de Fosfatase ou Protease

Ortovanadato de sódio ativado – solução estoque 200mM em água bidestilada

Aprotinina – solução estoque 1mg/ml em 0,01M HEPES pH 7,0

Leupeptina – solução estoque 1mg/ml em etanol absoluto

PMSF – solução estoque 1mg/ml em isopropanol

NaF – solução estoque 500mM

NaPyr – solução estoque 100mM

KITS

ECL Western blotting (Amersham Pharmacia) - Western blot

.....

3.2.-Síntese de padrão de nitrolinoleato

3.2.1.-Reação do ácido linoleico (18:2) com NO_2BF_4

A nitração do 18:2 foi realizada segundo método descrito por Napolitano et al. (2000), com algumas adaptações. Tetrafluoroborato de nitrônio (3mg) foi adicionado ao 18:2 (0,16 mmol) em 2mL de clorofórmio, deixando-se em agitação durante 1 hora, a 25°C, em tubos vedados sob atmosfera de nitrogênio. A reação foi subsequentemente bloqueada pela adição de 2 mL de tampão PBS, pH 7.4 e em seguida extraída com 5 mL de éter dietílico, onde a fase orgânica foi separada e evaporada sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi ressuspendido em 500 μL de isopropanol/metanol (1:1 v/v) para a realização das análises de detecção e caracterização química.

3.2.2.-Isolamento e purificação de nitrolinoleato

O isolamento e purificação de LNO_2 foi realizado por cromatografia em coluna ou por cromatografia em camada delgada. Os produtos da síntese da reação do 18:2 com NO_2BF_4 foram isolados por TLC utilizando uma placa de sílica gel 60H (Merck KgaA, Darmstadt, Germany). O resíduo lipídico foi aplicado na placa e em seguida separado utilizando hexano:éter dietílico: ácido fórmico (50:50:2, v/v/v) como fase móvel. Após a separação, as bandas foram raspadas e extraídas com 4 mL de éter dietílico e levadas a resíduo até a realização das análises.

3.3.-Caracterização química de LNO₂

3.3.1.-Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

A detecção do ácido linoléico nitrado foi realizada por cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massa sequencial ou em *tandem* com sistema de ionização da amostra por electrospray (LC-ESI/MS/MS). Os experimentos foram realizados em um espectrômetro triplo quadrupolo Quattro II (Micromass, Manchester, UK) acoplado a um HPLC Shimatzu LC-10AD Class VP no Laboratório de Lesões em Biomoléculas do Instituto de Química, em colaboração com o Prof. Dr. Paolo Di Mascio.

3.3.1.1.-Produtos derivados do 18:2

Os produtos derivados do 18:2 foram separados por HPLC em fase reversa numa coluna 20 x 4 mm, MercuryMS (Phenomenex, Torrance, CA), com fluxo de 0,2 mL/min, usando como fase móvel um gradiente de 0-50% de isopropanol em um intervalo de 15 minutos sob uma solução de metanol/H₂O 75:25 (v/v). O eluente da coluna foi totalmente direcionado para o espectrômetro, produzindo um ionspray entre as fases, onde os íons negativos foram separados e detectados. O 18:2 e seus derivados oxidados e nitrados foram analisados no modo negativo (detecção dos íons negativos) com potenciais de 3,5 kV no capilar de ESI e uma voltagem no cone de 20V, observados como ânion molecular [M-H]⁻. Nesta análise foram utilizados os seguintes modos: varredura total do scan (*full scan*) de m/z 40 a 350, SIR

para íons de m/z 324 e 279, íons filho para m/z 324 e multiple reaction monitoring (MRM) selecionando os íons de m/z 324 e 46 no primeiro (Q_1) e terceiro (Q_3) quadrupolos, respectivamente, para o produto nitrado. No sistema ESI/MS/MS foi utilizado uma pressão de argônio no segundo quadrupolo (Q_2) igual a $5,4 \times 10^{-4}$ mbar e uma energia de colisão de 20eV.

3.4.-Células

A linhagem THP-1 constituída de células leucêmicas monocíticas humanas (American Type Culture Collection) foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS), acrescido de penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL). As células THP-1 foram transfectadas com plasmídeos pcDNA-H-ras^{C118s} e mantidas nas mesmas condições acrescidas de 300ug/mL de geneticina (G418). As culturas celulares foram mantidas em estufa à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A troca do meio foi realizada a cada dois dias. Estoques de células THP-1 foram mantidos em solução de congelamento e armazenados em nitrogênio líquido. Os experimentos de sinalização com as MAPKs foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro da UNIFESP.

As Células HEK293 (fibroblasto de rim embrionário humano) foram cultivadas em meio de cultivo DMEM; suplementado com penicilina (100U/ml), 100 µg/ml de sulfato de gentamicina e soro fetal bovino descompensado (10%). Essas células foram mantidas a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂.

3.5.-Amplificação dos plasmídeos vetores pcDNA3

Alíquotas de 0.5 µL do plasmídeo pcDNA-H-ras^{C118S} foram incubadas separadamente com 10 µL de *Escherichia coli* e submetidas a 4°C por 20 minutos, 42°C por 45 minutos e 4°C por 5 minutos. Após as sucessivas incubações adicionou-se 90 µL de meio SOC e incubou-se sob agitação a 37°C por 1 hora. As bactérias foram então plaqueadas em agarose contendo ampicilina a 37°C durante toda noite.

Uma colônia foi isolada e incubada em 500mL de meio LB contendo ampicilina sob agitação a 1.000rpm durante toda noite.

3.5.1-Purificação dos plasmídeos pcDNA-H-ras^{C118S}

A purificação dos plasmídeos foi realizada em sistema Concert (Gibco). O meio de cultura contendo *Escherichia coli* foi centrifugado a 6.000 rpm a temperatura ambiente por 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 10mL de tampão de lise (Concert), homogeneizado por inversão e centrifugado a 15.000 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos. O sobrenadante foi aplicado à coluna de purificação (Concert) previamente lavada com 30mL de tampão de equilíbrio. Após o escoamento do sobrenadante pela coluna, a mesma foi lavada com 60mL de tampão de lavagem (Concert) e em seguida o DNA foi eluído com 15mL de tampão de eluição (Concert). O eluato foi recolhido, acrescido de 10,5mL de isopropanol, homogeneizado e centrifugado a 15.000 rpm, 4°C por 30 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 1mL de tampão TE. A seguir foi determinado o grau de pureza do DNA através

da relação da absorbância determinada nos comprimentos de onda 280/260nm.

O plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição Bstx e BamHI para confirmação da estrutura. A análise das digestões foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo 10µg/mL de brometo de etídeo submetido a uma corrente de 90mA por 60 minutos. A visualização das bandas foi feita em trans-iluminador de luz ultravioleta.

3.5.2.-Transfecção das células THP-1

A seleção das células THP-1 foi realizada plaqueando-se 10^5 células/mL/poço e adicionou-se concentrações crescentes de geneticina de 0.1 mg/mL a 0.5mg/mL. A troca de meio e adição de antibiótico foi realizada a cada 3 dias e a viabilidade celular avaliada por Azul de tripan 1%. Colônias resistentes foram isoladas depois de 20 dias de tratamento com geneticina e foram propagadas na presença deste antibiótico.

Para a transfecção, 10^6 células foram previamente lavadas em 2mL de meio RPMI na ausência de soro e geneticina, centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos a 4°C e ressuspendidas em 700µL de RPMI. As células foram plaqueadas e transfectadas utilizando-se o método da lipofectina (Gibco), de acordo com as normas do fabricante. Uma alíquota de 4µg do DNA foi incubada a 25µL de RPMI sem soro e antibiótico e 4µL do reagente PLUS. Separadamente, 4µL de lipofectina foram diluídos em 25µL de RPMI sem soro e antibiótico. As preparações foram incubadas a 37°C durante 15 minutos, em seguida, misturadas e incubadas nas mesmas condições para a obtenção do complexo DNA-lipofetina. O complexo foi então adicionado às células e incubado em atmosfera 5% de CO₂ à 37°C durante 24 horas.

Decorrido este período, o meio utilizado para transfecção foi substituído por meio suplementado com 10% SFB acrescido de geneticina na concentração de 300µg/mL. A análise da atividade de Ras foi realizada utilizando-se proteína de fusão GST-RBD.

3.5.3.-Preparação de GST-RBD

Uma alíquota de 1,5mL de bactérias BL21 contendo o plasmídeo pGEX-2T-RBD foi inoculada em 35mL de meio 2YT contendo 100µg/mL de ampicilina sob agitação a 37°C, durante toda a noite. Após este período volumes iguais da cultura foram distribuídos a 1.500mL de meio de cultura 2YT contendo 100µg/mL de ampicilina sob agitação de 1.000rpm a 37°C até atingir densidade óptica de 0.7 em comprimento de onda 600nm. Neste ponto adicionou-se 1mM IPTG e incubou-se por mais duas horas. A suspensão de bactérias foi centrifugada a 6.000rpm por 30 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em 30mL de tampão de lise e sonificado em gelo por 10 ciclos a 50watts. A seguir a suspensão foi centrifugada a 13.000rpm a 4°C por 30 minutos e ao sobrenadante foi adicionado 10% de glicerol. Um volume de 750µL de micropartículas (‘beads’ de glutathiona-sepharose) foi adicionado a 15mL do sobrenadante e incubados sob agitação em orbital a 4°C durante toda a noite.

A seguir as ‘beads’ foram centrifugadas a 3.000rpm, 4°C por 3 minutos e lavados 3 vezes com 5mL de PBS. Os sedimentos foram então ressuspensionados em 6mL de tampão de lavagem e armazenados a -80°C.

3.5.4.-Lisado de proteínas totais

10^6 células/mL foram plaqueadas em placas de 12 poços e tratadas com LNO₂ por 1h em atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C. Após o período de incubação as células foram lavadas duas vezes em PBS e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos a 4°C por 1 hora. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de tampão de lise e incubou-se por 15 min. Em gelo. Após este período as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C por 10 minutos.

O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, M.M., 1976).

3.5.5.-Isolamento da Fração Nuclear Erk

A fração nuclear foi extraída de 4×10^6 células cultivadas em placas de 6 poços. As células foram inicialmente submetidas à extração da fração citoplasmática com tampão contendo 10mM de Tris pH 7.4, 10mM de NaCl, 3mM de MgCl₂, 0.5% de NP-40, 0.5mM de PMSF, 50mM de NaF, 1mM de NaVO₃, 10 µg/mL de leupeptina e 10 µg/mL de aprotinina. O lisado citoplasmático e o nuclear intacto foram submetidos à separação por centrifugação em gradiente de sacarose 1M em tampão contendo 10mM de Tris pH7.4, 10mM de NaCl, 3mM de MgCl₂, 0.5% de NP-40, 0.5mM de PMSF, 50mM de NaF, 1mM de NaVO₃, 10µg/mL de leupeptina e 10µg/mL de aprotinina por 10 minutos a 4°C/1600g. A fração nuclear sedimentada foi ressuspendida em tampão de extração contendo 200mM de NaCl, 10mM de Hepes pH 7.9, 1.5 mM de MgCl₂, 0.1mM de EDTA, 5% de glicerol, 0.5mM de PMSF, 50mM de NaF, 1mM de NaVO₃, 10 µg/ml de leupeptina e 10µg/mL de aprotinina. O extrato nuclear foi obtido após a agitação da

fração nuclear por 30 minutos a 4°C com posterior centrifugação a 13.000g. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford.

3.5.6.-Precipitação GST-RBD

Uma alíquota de 250µg de proteínas totais foram incubadas com 30µL de proteína de fusão imobilizada (micropartículas de sefarose conjugadas a proteína RBD) sob agitação em orbital a 4°C por 1 hora. Após incubação, as amostras foram lavadas em 500µL de tampão Ripa e centrifugadas à 10.000rpm durante 2 minutos por 3 vezes. As amostras foram incubadas com tampão de amostra 4 vezes e submetidas a 100°C por 5 minutos. Em seguida foram aplicadas ao gel de poliacrilamida 15%.

3.6.-Reações de Western blot para detecção das MAPKs

As reações de Western blot foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida em diferentes concentrações de acordo com a proteína a ser estudada. O lisado de proteínas foi submetido à eletroforese em tampão de corrida a 250V e 8mA durante toda noite. A transferência foi realizada em membrana de nitrocelulose aplicando-se uma corrente de 200mA por 2 horas em cuba de transferência (BioRad). A confirmação da transferência foi realizada incubando-se a membrana com solução de Ponceau S. em seguida, a membrana foi lavada com TBS-0.1%Tween por 3 vezes de 15 minutos, bloqueada e posteriormente incubada com o anticorpo anti- ERK ou p38 overnight. A revelação foi realizada através da metodologia de quimioluminescência utilizando-se o luminol como substrato e a enzima

peroxidase (ECL). A leitura das bandas do auto-radiograma foi realizada em densitometria e registrada em unidades arbitrárias densitométricas (UAD).

Após a revelação da expressão das proteínas totais (ERK e p38) os anticorpos primários e secundários foram retirados da membrana com solução de tris-HCL, SDS e mercaptoetanol (solução de “Stripping”). A membrana foi incubada durante 30 minutos a 56°C, e depois submetida a 3 lavagens em TBS-0.1%Tween, sob agitação, à temperatura ambiente e rebloqueada com TBS-0.1%, Tween 5% e leite durante 2 horas. Após lavagem da mesma por 3 vezes em TBS-0.1%Tween foi adicionado o anticorpo contra a proteína no estado fosforilado.

3.6.1.-Western blot para detecção de Ras e Ras-GTP

As reações de Western blot para Ras e Ras-GTP foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida 15% transferidos para a membrana de nitrocelulose. O bloqueio foi realizado em TBS-0.1%Tween 5% BSA por 2 horas sob agitação à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 15 minutos o anticorpo primário anti-Ras (1:1000) diluído em TBS-0.1%Tween-5%BSA foi adicionado à membrana e posteriormente a membrana foi incubada durante toda a noite, sob agitação a 4°C. Após a incubação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes por 15 minutos, à temperatura ambiente e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em cabra (1:2000) diluído em TBS-0.1%Tween foi adicionado à membrana e incubado durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 1 vez por 15 minutos e 2 vezes por 5 minutos à temperatura ambiente com TBS-0.1%Tween e revelada.

3.6.2.-Western blot para ERK e ERK fosforilada

As reações de Western Blot para ERK e ERK fosforilada foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida 12% transferidos para membranas de nitrocelulose. O bloqueio foi realizado com TBS-0.1%Tween-5%leite por 2 horas, sob agitação, à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 15 minutos o anticorpo primário anti-ERK (1:2000) ou anti-ERK fosforilada (1:2000, diluídos em TBS-0.1%Tween-5% BSA) foram adicionados à membrana e incubado durante toda a noite, sob agitação, a 4°C. Após a incubação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes por 15 minutos, à temperatura ambiente, e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em suíno (1:3000) diluído em TBS-0.1%Tween-5%leite foi adicionado à membrana e incubado novamente durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 1 vez por 15 minutos e 2 vezes por 5 minutos à temperatura ambiente com TBS-0.1%Tween e revelada.

3.6.3.-Western blot para p38 e p38 fosforilada

As reações de Western blot para p38 e p38 fosforilada foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida 12% transferidos para a membrana de nitrocelulose. O bloqueio foi realizado em TBS-0.1%Tween-5%leite por 2 horas sob agitação à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 15 minutos, os anticorpo primários anti-p38 (1:1000) ou anti-p38-fosforilada (1:1000), diluídos em TBS-0.1%Tween-5% BSA, foram adicionados à membrana, que foi incubada durante toda a noite, sob agitação, a 4°C. Após a incubação, a membrana foi novamente lavada 3

vezes de 15 minutos à temperatura ambiente e o anticorpo secundário anti-IgG de cabra produzido em coelho (1:2000), diluído em TBS-0.1%Tween-5%leite, foi adicionado à membrana, incubando-se a seguir durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 4 vezes por 15 minutos à temperatura ambiente com TBS-0.1%Tween e revelada.

3.7.-Ativação de PPAR por nitrolinoleato

Foi avaliada pelo ensaio de retardamento de banda (electrophoretic mobility gel shift assay-EMSA), em colaboração com a Profa. Dr. Maria Christina Avellar INFAR-UNIFESP. Oligonucleotídeos contendo a sequência de bases específicas para a ligação do PPAR (5'AGCTACCAGGACAAAGGTCACGT-3') foram marcados com P³². Os extratos nucleares foram incubados com este oligonucleotídeo e o complexo DNA-proteína foi separado em gel de poliacrilamida. Os níveis dos complexos DNA-proteína formados foram visualizados por autoradiografia.

3.7.1- Transfecção e Ativação do receptor nuclear LXR

Células HEK 293 foram escolhidas por apresentar níveis basais muito reduzidos da expressão endógena de receptores nucleares, tornando-se um sistema celular ideal para a análise da ativação de receptores nucleares por transfecção.

As células HEK 293 foram transfectadas com os plasmídeos de cada um dos receptores analisados (LXR α , LXR β) e seus correspondentes

elementos resposta (LXRE). Todos os sistemas celulares foram simultaneamente transfectados com o plasmídeo que codifica RXR α , com a finalidade de evitar que a ausência de expressão do mesmo pudesse atuar como fator limitante para a ativação do receptor nuclear LXR. Este receptor forma heterodímero com RXR e se une ao elemento resposta presente no DNA. Os plasmídeos que codificam para o elemento resposta dos dímeros LXR/RXR, contém luciferase como reporter. Assim, a ativação dos receptores nucleares induz a união destes dímeros aos seus correspondentes sítios de união estimulados, em consequência da expressão do gene de luciferase.

1x 10⁵ células por poço foram plaqueadas em uma placa de 48 poços por 24h e posteriormente o meio de cultivo foi trocado para 2% soro e realizada a transfecção dos plasmídeos de interesse (LXR α , LXR β , RXR α , LXREluc, PCMX y GFP) na concentração de 500ng/poço de cada plasmídeo, GFP foi utilizado como controle de transfecção. O reagente JetPI foi utilizado para a transfecção como descrito pelo fabricante.

As células foram tratadas com 1 μ M T1317 e 1-100 μ M de LNO₂ por 24h. Para leitura da luciferase usamos luciferase report kit (Promega).

3.7.2.-Extração das proteínas nucleares para EMSA

As células controle ou exposta ao LNO₂ foram coletadas e lavadas 2x com PBS gelado. As proteínas nucleares foram extraídas em duas etapas (Schreiber et al., 1989). Na primeira, após centrifugação (1.100rpm por 5 minutos) o sedimento de células foi ressuspendido em 0,4mL de tampão A (Hepes 10mM; MgCl₂ 1,5mM; KCl 10mM; DTT (ditiotretol) 0,5 mM; PMSF 0,2 mM; NP 40 0,5%), homogenizados por agitação e incubados por

5 minutos em gelo. Após esta etapa, a suspensão foi rapidamente centrifugada para a precipitação dos núcleos. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em 60µL de tampão C (Hepes 20mM; MgCl₂ 1,5mM; DTT 0,5mM; PMSF 0,2mM; EDTA 0,2mM; NaCl 420mM; glicerol 25%) e incubado durante 20 minutos em gelo. Após este intervalo, as amostras foram centrifugadas (14.000rpm por 1 minuto) e a quantidade de proteína total determinada pelo método de Bradford. Alíquotas do sobrenadante foram armazenadas a -80°C até serem analisadas.

3.7.3.-Ensaio de retardamento de bandas-EMSA

O ensaio de retardamento de banda permite avaliar a ligação de um fator de transcrição a sua seqüência específica de DNA. Após a exposição das células ao LNO₂, a fração celular onde se localiza a forma ativa do fator de transcrição é isolada. A fração celular é incubada com oligonucleotídeos marcados radioativamente. Esses oligonucleotídeos de DNA carregam a seqüência de ligação ao fator de transcrição presente no promotor dos genes-alvo (Fig.5).

Figura 5- Princípio do Ensaio de retardamento de banda (EMSA).

Todo o material foi separado em gel de poliacrilamida 6%. Os oligonucleotídeos radioativos livres migram mais rapidamente em direção à porção inferior do gel e os oligonucleotídeos que foram ligados pelo fator de transcrição presentes na amostra têm sua migração retardada, permanecendo na porção superior do gel. A exposição de uma película radiosensível ao gel gera uma radiografia que permite a visualização do retardamento do complexo oligonucleotídeo/PPAR. A intensidade das bandas radiografadas representa a quantidade do receptor nuclear que foi ativada.

Após a exposição ao LNO_2 , as células THP-1 foram coletadas e os extratos nucleares separados como mencionado anteriormente. Oligonucleotídeos foram radioativamente marcados com $[\gamma \text{ } ^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mmol em 10mCi por mL) usando-se T4 polinucleotídeo quinase

(Invitrogen). A reação de fosforilação deu-se a 37°C durante 30 minutos em um volume total de 5µL. Posteriormente foi adicionado o eluato da coluna G25, aplicada novamente na coluna, centrifugado 2 min. 3000 rpm à 4°C e em seguida foi determinada a radioatividade. Na etapa seguinte 4 ug de extrato nuclear foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente, em tampão de ligação (glicerol 4%; MgCl₂ 0,3mM; EDTA 1mM; DTT 1mM; NaCl 100mM; Tris-HCl 10mM, pH 7,5; 2 ug/uL de poly(dI-dC) com 1µL de oligonucleotídeo PPAR marcado com ³²P. Para o supershift, que distingue os subtipos de PPAR, específicos anticorpos foram adicionados (2ug) e incubados por 15 min e posteriormente o oligonucleotídeo marcado radioativamente por mais 30 minutos.

As frações protéicas do extrato nuclear foram separadas em gel de poliacrilamida (6%). Os oligonucleotídeos que foram ligados pelo PPAR apresentaram-se como bandas retardadas durante a eletroforese em comparação aos oligonucleotídeos livres. Desta forma, com este método foi possível avaliar o grau de ativação dos receptores nucleares PPAR após a exposição ao LNO₂. A sequência do oligonucleotídeo utilizados neste experimento esta descrito nos itens 3.7.

3.8.0.- Análise da expressão gênica de PPAR α , β , γ , CD36 e ciclofilina.

RNA total foi extraído a partir de 5×10^6 células em 1ml de reagente TRIZOL de acordo com as instruções do produtor. Os cDNAs foram sintetizados em reações de 20 μ l contendo 2 μ g de RNA, 4 μ l de 5X tampão, 1 μ l dNTP (10mM), 1 μ l de oligo dT primer , 0,5 μ l RNAsin e 1 μ l SuperScript a 50 °C por 2h e posteriormente 95 °C por 5 minutos.

Os primers utilizados foram:

PPAR α sense 5'GACGAATGCCAAGATCTGAGAAAGC3' ,

PPAR α antisense 5'CGTCTCCTTTGATGTGCTGTCAGC3';

PPAR β sense 5'AACTGCAGATGGGCTGTGAC 3' ,

PPAR β antisense 5'GTCTCGATGTCGTGGATCAC3';

PPAR γ sense 5'ATTGTTGGCAGTGGCTCAGG3' ,

PPAR γ antisense 5'GAGCCCAAGTTTGAGTTTG 3';

CD36 sense 5'AGATGCAGCCTCATTTCAC3' ,

CD36 antisense 5'GCCTTGGATGGAAGAACAAA3'

Ciclofilina sense 5'ATGGTCAACCCCACCGTGT3' ,

Ciclofilina antisense 5'TCTGCTGTCTTTGGCACCTTGTC3'.

A temperatura de anelamento foi de 62°C com 34 ciclos. Os produtos de PCR foram detectados em gel de agarose 2% com brometo de etídeo. Os géis foram digitalizados e a análise densitométrica foi realizada através de Software Scion. A quantificação da expressão foi representada pela razão entre a densidade do gene-alvo e a densidade de ciclofilina correspondente.

3.9.0- Imunoprecipitação- fosforilação do receptor nuclear PPAR

O estado de fosforilação do receptor nuclear PPAR e sua associação com as proteínas ERK1 e ERK2 foi medida por estudos de imunoprecipitação/Western Blot. Após o carenciamento as células foram tratadas com 0,01 μ M de LNO₂ e LA por 1h e lisadas em tampão (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1% Triton X-100, 137 mM NaCl, EDTA, EGTA, 10 mM fluoreto de sódio, 2 mM pirofosfato de sódio, 1mM Na₃VO₄, 10 μ g/ml de aprotinina, 10 μ g/ml de leupeptina e 50 mM β -glicerofosfato). O lisado (1 μ g/1 μ l) foi incubado com 4 μ g de PPAR α , β e γ policlonal (Santa Cruz Biotechnology) overnight a 4°C, sob agitação orbital. Os imunocomplexos foram capturados incubando-se com 100 μ l de proteína A 50%, incubando-se por mais 2 horas a 4°C. Os beads de agarose foram coletados por centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. Em cada centrifugação os beads eram lavados com PBS mais 2mM de ortovanadato. Este processo foi repetido três vezes. Após as lavagens os beads foram ressuspensos em 60 μ l de tampão de amostra 2X, fervido por 5 minutos e sujeito a SDS-PAGE 10%. Depois da transferência para membrana de PVDF em cuba semi-seca a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti fosfo-serina 1:500 (Sigma) para determinar o estado de fosforilação do receptor nuclear PPAR. Paralelamente foi feito um western blot anti-PPAR α , β e γ total.

3.9.1.-Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o test t student para comparação dos dados. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0.05$. Foi utilizado o software GraphPad Prism 4

4.0.-RESULTADOS

4.1.-Síntese de padrão de LNO₂

4.1.2.-Reação do ácido linoleico com NO₂BF₄

A nitração do 18:2 foi realizada segundo método descrito no item 3.2.1. Por este método obtivemos um baixo rendimento da formação de LNO₂ (324 *m/z*), além da formação de 344 e 308 *m/z*. O produto 308 *m/z* apresentava-se como produto majoritário da reação (Fig.6). Nesta análise foram utilizados os seguintes modos: varredura total do scan (*full scan*) de *m/z* 40 a 350, monitoramento de íons selecionados (SIM) para íons de *m/z* 308, 324 e 279, além de íons filhos para *m/z* 308, 324 e 344 (Fig 7-9).

A

B

Figura 6.- Análise por LC-ESI/MS/MS : A- Espectro do ácido linoleico e B.- Espectro dos produtos da reação do ácido linoleico com NO_2BF_4 .

Figura 7.- Espectro de fragmentação MS/MS do íon de 308 m/z . Este produto apresentou como fragmento principal um íon 42 m/z .

Figura 8.- Espectro de fragmentação MS/MS do íon de 324 m/z . Este produto apresentou como fragmento principal um íon 46 m/z , referente ao grupo nitro.

Figura 9.- Espectro de fragmentação MS/MS do íon de 344 m/z . Este produto apresentou como fragmento principal um íon 46 m/z . Um íon 324 m/z (LNO_2), 297 m/z e um outro 277 m/z , relativo à perda do grupo nitro.

Diante dos resultados obtidos resolvemos investigar se a atmosfera de oxigênio e/ou nitrogênio poderia influenciar na formação de 324 m/z . Foi realizado o monitoramento da formação dos produtos da reação de síntese em atmosfera de oxigênio e nitrogênio em 5 minutos, 60 minutos e pós-extração. Verificamos que a atmosfera de oxigênio não favoreceu a formação de 324 m/z e pós-extração houve um decaimento de 324 m/z na síntese realizada em atmosfera de nitrogênio (Fig.10 e 11).

Figura 10.- Análise por LC-ESI/MS/MS dos produtos da reação do ácido linoleico com NO_2BF_4 em atmosfera de oxigênio. A- Após 5 minutos de síntese; B- Após 60 minutos de síntese e C- pós-extração.

Figura 11.- Análise por LC-ESI/MS/MS dos produtos da reação do ácido linoleico com NO_2BF_4 em atmosfera de nitrogênio. A- após 5 minutos de síntese; B após 60 minutos de síntese e C- após extração.

Qual é a influência do tempo de reação de síntese na formação de LNO_2 ?

Monitoramos a formação destes produtos em diferentes tempos de reação de síntese: 5, 30 e 60 minutos. Observamos que no tempo de 5 minutos de reação havia uma maior formação de 324 e 344 m/z , como também um decaimento de ambos com relação ao tempo de síntese (30 e 60 minutos). O 279 m/z , referente ao substrato, ácido linoleico, diminuiu em relação ao tempo de reação, como era esperado. Entretanto, o composto 308 m/z aumentou linearmente em relação ao tempo de reação de síntese (Fig.12). Após extração com éter houve aumento de 308 e 324 m/z e diminuição de 344 m/z , este fato se deve talvez a um problema de solubilidade destes compostos (Fig.13).

Figura 12-Monitoramento da formação dos produtos derivados da nitração do linoleato em relação ao tempo de síntese.

Figura.13.- Monitoramento da formação dos produtos derivados da nitração do linoleato após-a extração.

A oferta de substrato poderia influenciar na formação de 308, 324 e 344 m/z ?

Para respondermos a esta questão, utilizamos 0.16mmol e 1.60 mmol de ácido linoleico para a síntese. Verificamos que a concentração de 1.60 mmol favoreceu apenas a formação de 308 m/z . Embora na concentração de 0.16 mmol o consumo de substrato tenha sido menor, obtivemos um baixo rendimento de 324 quando comparado aos produtos 308 e 344 m/z (Fig.14).

Figura 14. -Síntese do nitrolinoleato realizada com diferentes concentrações de substrato: 1.60 mmol e 0.16 mmol.

O baixo rendimento de 324 m/z está relacionado com a solubilidade do NO_2BF_4 ?

Nós utilizamos acetonitrila, pois o NO_2BF_4 apresenta alta solubilidade (Ciaccio & Marcus, 1961). Na reação de síntese utilizando acetonitrila houve baixo rendimento de 324 m/z comparado com a reação de síntese utilizando clorofórmio (Fig 15). Na reação de síntese utilizando acetonitrila, obtivemos como produtos majoritários 383 e 428 m/z (Fig. 16).

Figura 15. –Monitoramento dos produtos da nitração do linoleato utilizando-se acetonitrila e clorofórmio.

Figura 16.-Monitoramento dos produtos da nitração do linoleato utilizando-se acetonitrila.

Portanto, pode-se concluir que o protocolo inicial da reação de síntese de LNO₂ utilizando clorofórmio como solvente é o mais adequado, entretanto, o tempo de reação de síntese deve ser de 5 minutos, para se obter um maior rendimento do produto 324 *m/z*.

4.1.3.-Isolamento e purificação de LNO₂

Os produtos derivados da reação do 18:2 com NO₂BF₄ foram isolados por cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária 2 g de sílica (400-200 mesh). A coluna foi equilibrada com 20mL de hexano. O resíduo lipídico foi ressuspenso em 500 µL de éter dietílico, aplicado na coluna e em seguida separado utilizando um gradiente de hexano:éter dietílico (95:5) , hexano:éter dietílico (50:50) e metanol 100% como fase móvel. Para cada gradiente foram coletadas frações e posteriormente analisadas por LC/ESI/MS, com o intuito de monitorar a eluição dos compostos de interesse. Com estes gradientes nós conseguimos purificar o 279 *m/z*, o 308 *m/z* e obtivemos uma mistura de 324 e 344 *m/z* (Fig. 17-19).

Figura 17: Monitoramento da eluição de 279 m/z (ácido linoleico).

Figura 18: Monitoramento da eluição dos produtos 324 e 344 m/z .

Figura 19: Monitoramento da eluição do produto 308 m/z .

Posteriormente, padronizou-se um método mais eficaz para a separação da mistura de 324 e 344 m/z por HPLC. O resíduo lipídico foi ressuspendido em 1mL de acetonitrila, aplicado em uma coluna C18 de fase reversa 250 x 10 mm e em seguida separado utilizando um gradiente de H₂O e acetonitrila (60-100%) como fase móvel. Os picos foram monitorados por UV, coletados e analisadas por LC/ESI/MS (Fig.20).

Figura 20.- Espectro de fragmentação MS/MS do íon de 324 m/z .

4.1.4- Caracterização da liberação de $\cdot\text{NO}$ pelo nitrolinoleato (LNO_2 , 324 m/z)

4.1.5.- Liberação direta de $\cdot\text{NO}$ a partir do LNO_2 detectada por quimioluminescência

O nitrolinoleato liberou $\cdot\text{NO}$ na presença de ascorbato, quando monitorado 15 minutos após a síntese. Esta liberação foi inibida na presença de C-PTIO. Observou-se também liberação espontânea de $\cdot\text{NO}$ quando o LNO_2 foi mantido apenas em tampão PBS pH 7.4 (Fig.21).

Fig.21.- Efeitos do ascorbato (10mM) e do C-PTIO (1mM) na liberação de $\cdot\text{NO}$, após incubação por 15 min. com LNO_2 (10 μM). Os dados representam a média de triplicatas de um experimento.

4.1.6- Estimativa das concentrações de $\cdot\text{NO}$ geradas em células THP-1 após estímulos com LNO_2 na presença de C-PTIO.

As concentrações de $\cdot\text{NO}$ geradas durante o estímulo com LNO_2 foram estimadas utilizando-se o “NO Analyzer (Model 280) da Siever’s” que através de quimiluminescência, determina as concentrações de nitrato no sobrenadante das culturas (Fig.22.).

Figura 22.- Cinética da liberação de $\cdot\text{NO}$ (analisado como nitrato): Nitrato foi determinado no sobrenadante da cultura das células THP1 estimuladas com 0.01 μM LNO_2 na presença e ausência de C-PTIO (100 μM). Os dados foram normalizados pelo grupo controle. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Representativo de 3 experimentos independentes.

4.1.7.-Ativação de PPAR por LNO₂

Avaliou-se a ativação do PPAR por EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*). Células THP-1 foram estimuladas em diversas concentrações de LNO₂ (0,01-10μM). Como mostrado na figura 23A, o nitrolinoleato estimulou a ligação do PPAR ao oligonucleotídeo marcado radioativamente, representando a sequência consenso do elemento responsivo ao PPAR. A ativação máxima do PPAR ocorreu na concentração de 0,01μM. Concentrações mais altas do estímulo resultaram em menor ativação do PPAR (Fig 23B). O grupo controle (células incubadas sem LNO₂) apresentou ativação mínima ou ausente. Isto poderia ser explicado pelo fato de que resíduos de cisteína do domínio DBD são alvo de S-nitrosação induzida por NO, o que induz a diminuição da sua atividade transcricional.

Fig.23 A/B.-Ativação do PPAR em resposta ao LNO₂. A ativação do PPAR foi avaliada por EMSA como descrito em Material e Métodos. A, células THP-1 foram estimuladas em concentrações crescentes de LNO₂ (0.01-10µM) por 1h. B, Densitometria da ativação do PPAR em resposta ao LNO₂. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado aos demais grupos. A densitometria do gel foi realizada com o software Scion.

Para elucidar a especificidade de ativação do PPAR, estimulamos as células THP-1 com ácido linoleico, ligante natural dos PPAR α e β , nas mesmas condições de estímulo com LNO₂ citadas anteriormente. Observou-se que o LNO₂ na concentração de 0,01 µM promoveu ativação equivalente à do LA na concentração 10 µM (Fig. 24). Estes resultados sugerem que a ativação do PPAR pelo LNO₂, em uma concentração 1000x inferior à do ácido linoléico, poderia ocorrer por um novo mecanismo via liberação de óxido nítrico a partir do LNO₂.

Fig 24.-Ativação do PPAR em resposta ao ácido linoleico (LA) e nitrolinoleato (LNO₂) . A ativação do PPAR foi avaliada por EMSA como descrito em Material e Métodos. Células THP-1 foram estimuladas em diferentes concentrações (0.01-10μM) por 1h. Resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. *p<0,05 comparando grupo 0,01μM LNO₂ aos grupos 0,01 e 1μM de LA. Representativo de 3 experimetos. A densitometri do gel foi realizada com o software Scion.

4.1.8.-Ativação dos subtipos PPARs (α , β e γ) por Super-shift.

A ativação dos subtipos α , β e γ de PPAR foi avaliada por EMSA-Super Shift, utilizando-se anticorpos específicos para cada subtipo. Após estímulo por 1h com LNO₂ (0,01 μ M), demonstrou-se que os subtipos de PPAR foram ativados com diferentes intensidades (Fig. 25).

Figura 25.- Ativação dos subtipos PPAR (α , β e γ) analisada por EMSA-Super-shift, após estímulo por 1h com LNO₂ (0,01 μ M). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. A densitometri do gel foi realizada com o software Scion.

4.1.9.- Ativação do receptor PPAR induzida por LNO₂ em células THP-1 na presença de C-PTIO.

Considerando-se que o LNO₂ ativou o receptor nuclear PPAR, investigamos se este mecanismo de ativação era mediado via liberação de óxido nítrico do LNO₂. Neste ensaio foi avaliado se a utilização do C-PTIO, como sequestrador de [•]NO, poderia influenciar na ativação do receptor nuclear PPAR. As células THP-1 foram pré-incubadas com 100μM de C-PTIO 1h antes do estímulo com LNO₂ (0,01μM). Observamos que nestas condições houve inibição total da ativação do receptor nuclear, o que sugere a participação da molécula de [•]NO na ativação do PPAR pelo LNO₂ (Fig.26).

LNO ₂ (0.01μM)	-	+	+	-
C-Ptio (100 μM)	-	-	+	+

Figura.26.-Ativação do PPAR por LNO₂ (0,01μM) na presença ou ausência de C-PTIO : A ativação foi avaliada por EMSA como descrito em Material e Métodos. As células THP-1 foram pré-incubadas com 100μM de C-PTIO 1h antes do estímulo com LNO₂ (0,01μM) por 1h. Gel representativo de 3 experimentos independentes.

4.2.-Cinética de ativação da proteína p21 Ras

A ativação da proteína p21 Ras por LNO₂ e o ácido linoleico (LA) foi avaliada utilizando-se o domínio da proteína Raf, a qual se liga a Ras no estado ativo. Este domínio foi expresso como uma proteína de fusão com glutathiona S-transferase, a proteína resultante foi pré-conjugada com “beads” de glutathiona-sefarose. A ativação da p21Ras foi observada após 5 minutos de incubação com LNO₂ (0,01 µM) e manteve-se até 15 minutos, enquanto que após estímulo com LA não houve alteração. O LNO₂ induziu aumento significativo da ativação de Ras comparado ao LA nos tempos indicados na Fig. 27.

Figura 27: Cinética de ativação da proteína p21Ras: Células THP-1 foram tratadas com LNO₂ (0.01µM) e LA (0.01µM). Após os tempos indicados, a ativação de Ras-GTP e Ras total foi determinada por western blot. Resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs LA 5'; **p<0.05 vs LA 15'; ***p<0.05 vs LA 30' e #p<0.05 vs LA 60'. A densitometria do gel foi realizada com o software Scion.

4.2.1.- Ativação da proteína p21Ras induzida por LNO₂ em células THP-1 na presença de C-PTIO.

Para elucidar se o efeito da ativação da proteína p21Ras foi em decorrência da liberação de [•]NO a partir da molécula de LNO₂ fizemos um ensaio complementar utilizando C-PTIO. As células foram pré-incubadas com uma concentração de 100 µM de C-PTIO 1h antes do estímulo (Fig.28). Observou-se que o C-PTIO inibiu significativamente a ativação da proteína p21Ras após estímulo com LNO₂ (0.01µM), após 5 minutos de incubação.

Figura 28: Efeito do C-PTIO na ativação da proteína p21 Ras: Células THP-1 foram pré-incubadas com 100µM de C-PTIO e posteriormente tratadas com LNO₂ (0.01µM) por 5 minutos. A ativação de Ras-GTP e Ras total foi determinada por Western blot. Resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes.*p<0.05 vs C-PTIO+LNO₂. Foi utilizado o software Scion para densitometria do gel.

4.2.2.- Avaliação da atividade da proteína p21 Ras em células THP-1 transfectadas com plasmídeo p21 Ras^{C118s} e THP-1 parental

Neste ensaio observamos ausência de resposta à incubação com LNO₂ nas células THP-1 que apresentavam a cisteína 118 substituída por serina e resposta positiva nas células THP-1 parentais. LNO₂ apresentou aumento significativo nas células THP-1 parentais em todos os tempos indicados quando comparado com as células p21 Ras^{C118s} (Fig.29).

Figura 29.- Cinética de ativação da proteína p21 Ras nas células THP-1 parentais e p21 Ras^{C118S}. Células THP-1 e C118S foram tratadas com LNO₂ (0, 01μM) nos tempos indicados e a ativação de Ras-GTP e Ras total foi determinada por western blot. Resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs 5'C118S; **p<0.05 vs 15' C118S; ***p<0.05 vs 30'C118S e #p<0.05 vs 60'C118S. Ensaio representativo de 3 experimentos similares. Foi utilizado o software Scion para densitometria do gel.

4.2.3.- Cinética de ativação da MAP quinase ERK (1/2) citoplasmática

A cinética de ativação da MAP quinase ERK (1/2) foi avaliada em lisado de células THP-1 cultivadas com 0, 01 μ M de LNO₂ e 0, 01 μ M de LA em diferentes períodos de incubação. A ativação de ERK (1/2) teve início após 5 minutos de estímulo por LNO₂. Quando comparamos o efeito do LNO₂ e do LA na ativação da ERK (1/2), observamos que o LNO₂ apresentou aumento significativo nos tempos 5 e 15 minutos. A ativação induzida pelo LA não variou significativamente em função do tempo de incubação (Fig. 30).

Figura 30: Cinética de ativação da MAP quinase ERK (1/2) citoplasmática: Células THP-1 foram tratadas com LNO₂ (0. 01 μ M) e LA (0. 01 μ M) nos tempos indicados e a seguir a ativação de ERK (1/2) e ERK 1/2 total foram determinadas por Western blot. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes.*p<0.05 vs LA 5' e **p<0.05 vs LA 15'. Utilizou-se o software Scion para densitometria do gel.

4.2.4.- Cinética de ativação da MAP quinase ERK (1/2) citoplasmática induzida por LNO₂ na célula THP-1 parental na presença de C-PTIO.

As células THP-1 parentais foram pré-incubadas com 100μM de C-PTIO por 1h e posteriormente tratadas com LNO₂ (0.01μM) no intervalo de tempo entre zero e 15 minutos. Em seguida, avaliou-se a fosforilação de ERK (1/2). Observamos que o C-PTIO inibiu significativamente a ativação de ERK no tempo de 5 minutos de incubação (Fig.31).

Figura 31: Cinética de ativação da MAP quinase ERK (1/2) citoplasmática na presença de C-PTIO. Células THP-1 foram pré-incubadas com 100μM de C-PTIO por 1h e posteriormente tratadas com LNO₂ (0.01μM) nos intervalos de tempo indicados. A ERK (1/2) fosforilada e total foram determinadas por Western blot. Resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes.*p<0.05 vs C-PTIO+ LNO₂. Foi utilizado o software Scion para densitometria do gel.

4.2.5.- Avaliação da atividade da MAP quinase ERK 2 nuclear em células THP-1 transfectadas com plasmídeo p21 Ras^{C118s} e THP-1 parental

Após o resultado obtido na diferença de ativação da proteína p21 Ras, investigamos se a ativação da ERK2 nuclear também estaria alterada nas células mutadas na cisteína 118 da Ras. Observamos aumento significativo nas células parenterais e menor ativação da ERK2 nuclear nas células transfectadas com plasmídeo C118S, demonstrando que a ausência da cisteína responsiva ao $\cdot\text{NO}$, promove menor ativação neste mecanismo (Fig.32).

Figura 32.- Ativação da MAP quinase ERK2 nuclear: Células THP-1 parentais e C118S foram tratadas com LNO₂ (0, 01μM) por 1h. A ERK2 fosforilada e total foram determinadas por Western blot. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes,. *p<0.05 vs C118s. Foi utilizado o software Scion para densitometria do gel.

4.2.6.-Qual a relevância da MAP quinase ERK (1/2) no mecanismo de ativação do receptor nuclear PPAR?

4.2.7.- Ativação da MAP quinase ERK (1/2) citoplasmática induzida por LNO₂ na presença de PD098059.

Para confirmar se existia uma dependência da via MAPK-ERK no processo de ativação do receptor nuclear PPAR utilizamos PD098059, um inibidor específico de MEK, a MAP quinase de ERK. As células THP-1 foram pré-incubadas com PD098059 (50µM) durante 30 minutos e em seguida estimuladas com LNO₂ (0.01µM). A presença do inibidor de MEK promoveu a ausência da ativação de ERK induzida por LNO₂ em relação às células estimuladas com LNO₂ (Fig.33). Nas mesmas condições avaliou-se a ativação do receptor nuclear PPAR e também não se observou sua ativação (Fig.34), demonstrando que a participação da cascata de sinalização MAPK ERK1/2 é relevante neste mecanismo.

Figura 33.- Inibição da ativação da MAP quinase ERK (1/2) citoplasmática: Células THP-1 foram pré-tratadas com 50μM de PD098059 por 30 minutos e posteriormente estimuladas com LNO₂ (0.01μM) 1 h. Resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs LNO₂ + PD98059. Utilizou-se o software Scion para densitometria do gel.

Figura.34.-Ativação do PPAR por LNO₂ na presença ou ausência de PD098059 : As células THP-1 foram pré-incubadas com 50 μM de PD098059 30 min. antes do estímulo com 0,01 μM de LNO₂ por um período 1h. A ativação do PPAR foi avaliada por EMSA como descrito em Material e Métodos. Gel representativo de 3 experimentos independentes. Foi utilizado o software Scion para densitometria do gel.

4.2.8.-Cinética de ativação da MAPK p38 citoplasmática induzida por LNO₂

Já foi observado que a MAPK p38 esta envolvida na ativação de ppar em outros tipos celulares, entretanto, as células THP-1 que foram tratadas por 1h com concentrações crescentes de LNO₂, (0,0001-1 μ M) não apresentaram aumento estatisticamente significativo na ativação de p38. Na concentração de 1 μ M o LNO₂ apresentou diminuição significativa comprada às demais concentrações. Estes dados sugerem que o mecanismo proposto não é dependente de p38 (fig. 35).

Figura 35: Ativação de p38 induzida por LNO₂. Células THP-1 foram estimuladas em concentrações crescentes (0.001-1 μ M) de LNO₂ por 1h. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs demais grupos. Foi utilizado o software Scion para densitometria do gel.

4.2.9.-Imunoprecipitação de PPAR γ e PPAR α

Para avaliar a fosforilação do receptor nuclear PPAR e sua associação com as proteínas ERK1 e ERK2 realizou-se o ensaio de imunoprecipitação do receptor seguido de western blot anti-fosfoserina (como descrito em material e métodos). Observamos que o LA aumentou significativamente a fosforilação dos resíduos de serina do PPAR γ comparado ao LNO₂ e ao controle (fig.36). Por outro lado, o LNO₂ apresentou aumento significativo da fosforilação de PPAR α comparado ao LA (fig.37.). Estes dados sugerem que a ERK ativada por LNO₂ transloca-se para o núcleo e fosforila diferencialmente os resíduos de serina dos PPARs α e γ .

Fig.36.- Imunoprecipitação de PPAR γ em células THP-1. Após estímulo com LNO₂ e LA (0.01μM) por 1h realizou-se a imunoprecipitação do PPAR como descrito em material e métodos. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs LNO₂. Utilizou-se o software Scion para densitometria do gel.

Fig.37.- Imunoprecipitação de PPAR α em células THP-1. Após estímulo com LNO₂ e LA (0.01μM) por 1h realizou-se a imunoprecipitação do PPAR como descrito em material e métodos. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs LA. Utilizou-se o software Scion para densitometria do gel.

4.3.0- Ativação dos receptores nucleares LXR α e β

Para avaliar a ativação dos receptores nucleares LXR, as células foram estimuladas durante 24h com distintas concentrações de LNO₂ (1-50 μ M) e com ligante farmacológico T1317 (1 μ M). Como controle negativo da transfecção utilizamos um vetor vazio pCMX, os vetores dos elementos de união e o vetor que codifica para RXR α . Pode-se observar na figura 35 que o LNO₂ não atua como um ligante potente das isoformas LXR α e LXR β quando comparamos com o ligante sintético T1317. Não houve resposta das células transfectadas com o plasmídeo controle (Fig.38 A/B).

Figura 38 A/B.- Ativação das isoformas α e β do receptor nuclear LXR. As células HEK 293 foram transfectadas e estimuladas com T1317 1 μ M (agonista do LXR) e 1-50 μ M de LNO₂, por 24h. A ativação foi avaliada pela atividade de luciferase como descrito em Material e Métodos. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes.* $p < 0,05$ comparado aos demais grupos.

5.0.- Cinética da expressão de RNAm dos subtipos de PPARs

Para avaliar se o LNO_2 poderia ativar a expressão dos subtipos de PPAR, inicialmente analisou-se a cinética de expressão do RNAm dos PPAR α , β e γ em células THP-1. A cinética de expressão após estímulo com LNO_2 ($0.01\mu\text{M}$) demonstrou aumento máximo da expressão de RNAm de todos os subtipos no tempo de 1h, o que está compatível com os ensaios de EMSA de ativação do receptor nuclear. Estes resultados, porém, não nos permite afirmar se esta ocorrendo aumento da expressão de RNAm ou sua estabilização.(Fig.39-41).

Figura.39.-Expressão de RNAm de PPAR α em resposta ao LNO_2 . A expressão de RNAm foi analisada por RT-PCR e normalizado pela expressão da ciclofilina. Células THP-1 foram estimuladas com $0.01\mu\text{M}$ de LNO_2 pelo tempo indicado. Dados expressos como media $\pm$ desvio padrão.de 3 experimentos representativos.

Figura 40.- Expressão de RNAm de PPAR β em resposta ao LNO₂. A expressão de RNAm foi analisada por RT-PCR e normalizada pela expressão da ciclofilina. Células THP-1 foram estimuladas com 0.01 μ M de LNO₂ pelo tempo indicado. Dados expressos como media $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes.

Figura.41.- Expressão de RNAm de PPAR γ em resposta ao LNO₂. A expressão de RNAm foi analisada por RT-PCR e normalizada pela expressão da ciclofilina. Células THP-1 foram estimuladas com 0.01 μ M de LNO₂ pelos tempos indicados. Dados são expressos como media $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes.

5.1.- Expressão de RNAm dos subtipos de PPARs induzida por LNO₂ em células THP-1 na presença de C-PTIO.

A expressão do RNAm do PPAR α e PPAR β das células tratadas com LNO₂ e LA (0.01 μ M) aumentou significativamente comparada as células controle e tratada com etanol. Nas células tratadas com LNO₂ + C-PTIO houve diminuição significativa em comparação com as células tratadas com LNO₂ (Fig. 42 e 43). Em contraste, a expressão do RNAm para PPAR γ foi similar entre as células tratadas com etanol, C-PTIO, LNO₂ e LNO₂ + C-PTIO. Houve aumento significativo nas células tratadas com LA comparada as células tratadas com C-PTIO, LNO₂, LNO₂ + C-PTIO ($p < 0.05$) (Figura 44).

Figura.42.- Expressão de RNAm e análise densitométrica dos produtos de PCR para PPAR α em células THP-1. A expressão de RNAm foi analisada por RT-PCR e normalizado pela expressão da ciclofilina. Dados são expressos como media $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ vs controle; ** $p < 0.05$ vs LNO₂; *** $p < 0.05$ vs controle.

Figura.43.-Expressão de RNAm e análise densitométrica dos produtos de PCR para PPAR β em células THP-1. A expressão de RNAm foi analisada por RT-PCR e normalizado pela expressão da ciclofilina. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ vs C-PTIO+ LNO₂ ; ** $p < 0.05$ vs C-PTIO+ LNO₂ ; *** $p < 0.05$ vs C-PTIO+ LNO₂.

Figura.44.- Expressão de RNAm e análise densitométrica dos produtos de PCR para PPAR γ em células THP-1. A expressão de RNAm foi analisada por RT-PCR e normalizado pela expressão da ciclofilina. Dados expressos como media $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ vs LA; ** $p < 0.05$ vs LA; *** $p < 0.05$ vs LA.

5.1.2.-Expressão de RNAm de CD36 induzida por LNO₂ em células THP-1 na presença de C-PTIO.

CD36 é um receptor scavenger responsável pela captação de LDL modificada e, conseqüente, formação de células espumosas. Sabendo-se que sua ativação é dependente de PPAR γ , investigamos a expressão de RNAm de CD36 induzida por LNO₂.

Na figura 45 verifica-se que as células tratadas com LNO₂ e LA tiveram níveis aumentados de RNAm para CD36 comparadas às células tratadas com etanol, C-PTIO e C-PTIO + LNO₂. Entretanto, observou-se um aumento significativo de LNO₂ em relação àquelas tratadas com LA.

Figura.45.-Expressão de RNAm e análise densitométrica dos produtos de PCR para CD36 em células THP-1. A expressão de RNAm foi analisada por RT-PCR e normalizado pela expressão da ciclofilina.. Dados expressos como media $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes.+ $p < 0.05$ vs C-PTIO; * $p < 0.05$ vs LNO₂; \$ $p < 0.05$ vs C-PTIO+ LNO₂; # $p < 0.05$ vs LA.

6.0.-Discussão

O receptor nuclear PPAR pode ser ativado pelas vias dependente (domínio E), ou, via independente de ligante (domínio A/B). A fosforilação do domínio A/B pelas MAP quinases em diferentes resíduos de serina pode resultar na modulação da atividade do receptor nuclear PPAR através da via independente de ligante (Desvergne et al., 1999; Barger et al., 2000 e Shalev et al., 1996).

Ligantes de PPAR α e γ têm sido demonstrados como ativadores de membros da família de MAPKs em diferentes tipos celulares. (Gardner et al. 2005). Rokos et al. 1997 demonstraram que agonistas do PPAR α (Wy 14643 e fibrato) induzem a fosforilação da proteína quinase quinase ativada por mitógenos (MEK ou MKK) e a fosforilação de ERK em células hepáticas de rato. Cosulich et al. 2000 demonstraram que nafenopine ativa tanto ERK como p38 em hepatócitos primários de ratos. A inibição na cascata de sinalização de MAPKs nestes modelos inibiu a expressão gênica e a síntese de DNA, sugerindo que as MAPKs representam um papel importante no efeito hepatoproliferativo por ligantes de PPAR α . Igualmente, a rosiglitazona, um agonista de PPAR γ , aumentou a expressão da proteína desacopladora 1 em adipócitos fetais de rato via p38 (Teruel et al. 2003)

Kim et al. 2002 e Baek et al. 2003 demonstraram que a troglitazona apresenta efeito antiproliferativo em células cancerígenas derivadas do cólon e que este efeito foi dependente de ERK. Em outro estudo demonstrou-se que a troglitazona induzia a hepatotoxicidade em uma linhagem de células humanas via JNK (Bae et al. 2003). Todos estes estudos revelam a

capacidade de ligantes de PPARs ativarem MAPKs e claramente demonstram o importante papel das MAPKs no efeito biológico destes ligantes.

Por outro lado o $\cdot\text{NO}$ também pode ser um potencial ativador de MAPK e PPAR. O $\cdot\text{NO}$ tem sido considerado um mediador importante nas vias de sinalização celular por ser capaz de promover a S-nitrosação de resíduos de cisteína, em especial, nos fatores de transcrição (Von Kneten et al. 2002; Marino et al. 2001; Hara et al. 2002; Marshall et al. 2001; Matthews et al. 1996).

Diversos estudos têm demonstrado um potencial “cross-talk” entre a MAP quinase ERK e PPAR. Juge-Aubry et al., 1999 observaram que a atividade transcripcional do PPAR α aumentou devido à fosforilação das serinas S12 e S21 via ERK (1/2), após estímulo com insulina. Estudos utilizando inibidores de MAPK têm revelado que algumas das alterações transcripcionais induzidas por agonistas de PPAR podem ser dissociadas entre distintas vias, dependentes de PPAR e MAPK. Isto sugere que a ativação de PPAR dependente de ligante não pode ser responsabilizada pela fosforilação simultânea das MAPKs. Evidências também sugerem que a ativação de PPAR e MAPK por agonistas de PPARs são eventos distintos. Por exemplo, a ciglitazona ativa ERK, p38 e JNK em astrócitos, contudo, a roziglitazona, um ligante de PPAR γ estruturalmente similar, não induz a fosforilação destas quinases neste modelo (Lennon et al. 2002). Em nosso estudo quisemos demonstrar que embora o ácido linoleico seja um ligante natural dos PPARs, a alteração da sua estrutura química com a adição de um grupo NO_2 (LNO_2), poderia de induzir a ativação dos PPARs pela via

dependente de MAPKs citoplasmáticas/nuclear e não apenas pelo domínio de ligação dependente de ligante.

Nossos resultados revelam que o LNO₂ é capaz de liberar óxido nítrico tanto *in vitro* na presença ou ausência de células (Fig.21 e 22), sugerindo que o LNO₂ poderia atuar como um reservatório de óxido nítrico e portanto mediar as vias de sinalização via óxido nítrico. Observamos que LNO₂ na concentração de 0.01μM, foi um potente ativador de PPAR, comparado ao ligante natural ácido linoleico que apresentou ativação equivalente do PPAR na concentração de 10μM (Fig 23 A/B e 24). Nesta mesma concentração LNO₂ foi capaz de ativar os três subtipos de PPAR (α, β e γ) com intensidades diferentes (Fig.25). Em contraste com os nossos resultados, Schopfer et al. 2005 verificaram ativação máxima dos três subtipos de PPARs (α,β e γ) na concentração de 1μM em células CV-1 (fibroblastos). Tal discrepância poderia ser explicada pelo fato do efeito da ativação depender do tipo celular em estudo, assim como dos resíduos de serina modificados nos receptores PPAR durante o processo de ativação. No estudo de Schopfer et al. (2005) foi demonstrado que o LNO₂ ativa o PPAR e os seus efeitos biológicos finais na diferenciação de adipócitos, entretanto, nossa hipótese é que LNO₂ ativa estes receptores nucleares a partir da liberação de óxido nítrico, seguida de nitrosação de Ras, fosforilação de RAF/MEK/ERK1/2 citoplasmática e nuclear e a conseqüente ativação do PPAR.

Para elucidar o envolvimento do •NO, liberado a partir da molécula de LNO₂ na ativação do receptor nuclear PPAR, utilizamos C-PTIO, um sequestrador de •NO. Observamos que a ativação do receptor nuclear foi completamente inibida pelo C-PTIO (Fig 26).

A próxima etapa foi elucidar se a S-nitrosação do resíduo de cisteína 118 da proteína p21 Ras é o evento inicializador da via de sinalização e ativação de PPAR. A ativação de p21 Ras por LNO₂ e ácido linoléico (LA) foi avaliada utilizando-se o domínio da proteína Raf que se liga à Ras no estado ativo. Este domínio foi expresso como uma proteína de fusão com glutathione S-transferase (Rooij; Bos et al., 1997) e a proteína resultante foi pré-conjugada com “beads” de glutathione-sefarose. A ativação de p21 Ras foi observada após 5 minutos de incubação com LNO₂ (0,01μM), enquanto que o LA (0,01μM) não teve efeito nesta escala de tempo (Fig. 27). Quando repetimos o mesmo ensaio na presença de C-PTIO, observamos que houve uma inibição na ativação da proteína p21 Ras no intervalo de tempo de 5 minutos (Fig.28.). Nos ensaios com as células transfectadas com plasmídeo p21 Ras^{C118S} após estímulo com LNO₂ (0,01μM) observamos ausência de resposta na ativação da proteína p21Ras (Fig. 29).

Uma vez confirmada a ativação da proteína p21 Ras, avaliamos a participação das ERKs citoplasmática e nuclear para verificar se a compartimentalização destas MAPKs influenciaria a ativação via LNO₂, uma vez que a ERK2 se transloca para o núcleo, fosforila resíduos de serina do receptor nuclear e, conseqüentemente, pode ativar ou inibir sua atividade transcricional. Quando comparamos o efeito do LNO₂ e do LA (0.01μM) na fosforilação da ERK (1/2) citoplasmática, observamos que o LNO₂ apresenta um maior efeito nos tempos 5, 15 e 60 minutos, enquanto que o LA não apresentou nenhum efeito (Fig.30). Entretanto, na presença de C-PTIO, a inibição na ativação de ERK (1/2) citoplasmática foi observada no tempo de 5 minutos (Fig.31).

A próxima etapa foi elucidar qual seria a relevância da MAP quinase ERK (1/2) neste mecanismo. Fizemos uso de um inibidor específico

(PD98095) de MEK-1, a quinase de ERK. Verificamos que houve total inibição na ativação de ERK (Fig.33) e também na ativação do receptor nuclear PPAR (Fig.34). Portanto, esta MAP quinase é essencial no mecanismo de ativação do PPAR pelo LNO₂

Posteriormente avaliamos a fosforilação em resíduos de serina do receptor PPAR dependente de ERK2 por imunoprecipitação. Observamos que o LA aumentou significativamente a fosforilação dos resíduos de serina do PPAR γ comparado ao LNO₂ e controle (Fig.36). Por outro lado, o LNO₂ apresentou aumento significativo da fosforilação de PPAR α comparado ao LA (fig.37.). Estes dados sugerem que a MAPK ERK ativada por LNO₂, transloca-se para o núcleo, fosforila os resíduos de serina dos PPARs e regula sua atividade transcricional.

Considerando que o PPAR é regulado transcricionalmente por LNO₂, analisamos os níveis de RNAm de seus diferentes isotipos. Verificamos que o LNO₂ aumentou a expressão dos subtipos α e β do PPAR, mas não do PPAR γ , sendo que este aumento foi inibido da presença de C-PTIO (fig.42-44). Interessantemente, a expressão do RNAm para CD36, um receptor scavenger cuja expressão é dependente de PPAR γ , apresentou níveis aumentados após estímulo com LNO₂ e inibição na presença de C-PTIO (fig.45). Estes resultados confirmam a hipótese de que a S-nitrosação do resíduo de cisteína 118 da proteína p21 Ras é o evento inicializador da via de sinalização p21Ras/RAF/MEK/ERK e ativação do PPAR.

Von Knethen et al., (2002) verificaram que a ativação do PPAR nas linhagens celulares U937, THP-1 e RAW 264.7 não foi dependente da via de sinalização de GMPC, e sugeriram que poderia ser por uma interação direta do 'NO nas vias de sinalização relacionadas à ativação deste receptor nuclear. Lander et al. 1993, descreveram um mecanismo de sinalização pelo

NO , independente de guanilato monofosfato cíclico (cGMP), através da ativação de proteínas G (que se ligam à guanosina). Estudos *in vitro*, utilizando Ras (proteína G monomérica) recombinante, revelaram que o NO promove uma alteração conformacional da proteína, associada a um estímulo na liberação de GDP e conseqüente associação com GTP, demonstrando que Ras pode ser ativada através de interação com NO Lander et al. (1995). Esta interação resulta na S-nitrosação do resíduo de cisteína 118 de Ras, levando à ativação de uma cascata de proteína quinases, incluindo, ERK. Nos ensaios com as células transfectadas com plasmídeo p21 Ras^{C118S} após estímulo com LNO₂ observamos ausência de resposta na ativação da proteína p21Ras (Fig. 29) e ERK 2 nuclear (Fig.32).

Investigamos também se a MAPK p38 estaria envolvida no mecanismo de ativação do PPAR. Verificamos que a ativação da p38 pelo LNO₂ nas concentrações de 0,0001 a 1 μM não foi estatisticamente significativo, sugerindo que o mecanismo proposto para a ativação de PPAR não é dependente da MAPK p38 (Fig.35.).

Sabendo-se que LNO₂ ativa o receptor nuclear PPAR, investigamos se também seria capaz de ativar o receptor nuclear LXR, mas verificamos que o LNO₂ não é um potente ativador de LXR (Fig.36).

Estes resultados de ativação e fosforilação convergem para a formação de um eficiente complexo transcricional inicial e um controle da resposta ao ligante, além de um novo mecanismo pelo qual o LNO₂ poderia modular a ativação do receptor nuclear PPAR. Portanto, a elucidação do mecanismo de ativação de PPAR induzido por LNO₂ é de suma importância do ponto de vista clínico, pois permite avaliar a diferença entre ligantes endógenos (LNO₂) e sintéticos (tiazolidinedionas) no modo de ativação dos PPARs, já que eles são importantes alvos terapêuticos para o tratamento da

hiperlipidemia e o diabetes. A possibilidade de uma modulação diferencial, seletiva e com afinidade na ativação dos PPARs permitiria o desenvolvimento de fármacos com impacto farmacológico mais favorável que as tiazolidinedionas.

7.0.-Conclusão

Podemos concluir que a ativação do receptor nuclear PPAR por LNO₂ é dependente de NO e da via de sinalização p21Ras/Raf/ERK 1/2, mas não p38 e que é capaz de ativar os três subtipos de PPAR, entretanto não foi capaz de ativar o receptor nuclear LXR.

8.0.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams M, Reginato MJ, Shao D et al. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 1997; 272 (8):5128-32.

Akiyama TE, Sakai S, Lambert G et al. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol* 2002; 22 (8):2607-19.

Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 2001; 81 (3):1269-304.

Baek SJ, Wilson LC, Hsi LC et al. Troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) ligand, selectively induces the early growth response-1 gene independently of PPAR gamma. A novel mechanism for its anti-tumorigenic activity. *J Biol Chem* 2003; 278 (8):5845-53.

Balazy M, Iesaki T, Park JL et al. Vicinal nitrohydroxyeicosatrienoic acids: vasodilator lipids formed by reaction of nitrogen dioxide with arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299 (2):611-9.

Baldus S, Eiserich JP, Mani A et al. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest* 2001; 108 (12):1759-70.

Barbier O, Torra IP, Duguay Y et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22 (5):717-26.

Barger PM, Browning AC, Garner AN et al. p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a potential role in the cardiac metabolic stress response. *J Biol Chem* 2001; 276 (48):44495-501.

Barish GD, Evans RM. PPARs and LXRs: atherosclerosis goes nuclear. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15 (4):158-65.

Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 85 (2-5):267-73.

Brendeford EM, Andersson KB, Gabrielsen OS. Nitric oxide (NO) disrupts specific DNA binding of the transcription factor c-Myb in vitro. *FEBS Lett* 1998; 425 (1):52-6.

Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997; 272 (16):10811-6.

Camp HS, Tafuri SR, Leff T. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology* 1999; 140 (1):392-7.

Cao G, Beyer TP, Yang XP et al. Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *J Biol Chem* 2002; 277 (42):39561-5.

Chawla A, Repa JJ, Evans RM et al. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 2001; 294 (5548):1866-70.

Chinetti G, Lestavel S, Bocher V et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001; 7 (1):53-8.

Coles B, Bloodsworth A, Eiserich JP et al. Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP. *J Biol Chem* 2002; 277 (8):5832-40.

Costet P, Luo Y, Wang N et al. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2000; 275 (36):28240-5.

Delerive P, De Bosscher K, Besnard S et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene

response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1999a; 274 (45):32048-54.

Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 1999b; 85 (5):394-402.

Denicola A, Souza JM, Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (7):3566-71.

Deora AA, Hajjar DP, Lander HM. Recruitment and activation of Raf-1 kinase by nitric oxide-activated Ras. *Biochemistry* 2000; 39 (32):9901-8.

Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20 (5):649-88.

Duez H, Fruchart JC, Staels B. PPARS in inflammation, atherosclerosis and thrombosis. *J Cardiovasc Risk* 2001; 8 (4):187-94.

Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 2002; 296 (5577):2391-4.

Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med* 1998; 19 (4-5):221-357.

Freeman, B., Schopfer, F. Cell signaling actions of nitrated fatty acids-receptor-dependent convergence of eicosanoid and nitric oxide signaling pathways. *Free Rad. Biol. Med.* 2004; 36, suppl. 1: S43.

Fu X, Menke JG, Chen Y et al. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem* 2001; 276 (42):38378-87.

Glass CK. Antiatherogenic effects of thiazolidinediones? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21 (3):295-6.

Goetze S, Xi XP, Kawano H et al. PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33 (5):798-806.

Graham A, Hogg N, Kalyanaraman B et al. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett* 1993; 330 (2):181-5.

Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM et al. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106 (6):679-84.

Han J, Hajjar DP, Tauras JM et al. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem* 2000; 275 (2):1241-6.

Hara H, Adachi T. Contribution of hepatocyte nuclear factor-4 to down-regulation of CYP2D6 gene expression by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 2002; 61 (1):194-200.

Hara H, Mitani N, Adachi T. Inhibitory effect of nitric oxide on the induction of cytochrome P450 3A4 mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in Caco-2 cells. *Free Radic Res* 2000; 33 (3):279-85.

Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ et al. Gender differences in atherosclerosis: possible role of nitric oxide. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26 (5):792-802.

Hu E, Kim JB, Sarraf P et al. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 1996; 274 (5295):2100-3.

Inoue I, Goto S, Matsunaga T et al. The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* 2001; 50 (1):3-11.

Jackson SM, Parhami F, Xi XP et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19 (9):2094-104.

Janowski BA, Willy PJ, Devi TR et al. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996; 383 (6602):728-31.

Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391 (6662):82-6.

Jiang H, Kruger N, Lahiri DR et al. Nitrogen dioxide induces cis-trans-isomerization of arachidonic acid within cellular phospholipids. Detection of trans-arachidonic acids in vivo. *J Biol Chem* 1999; 274 (23):16235-41.

Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA et al. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 2003a; 9 (2):213-9.

Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH et al. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 2002a; 277 (13):11019-25.

Joseph SB, McKilligin E, Pei L et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002b; 99 (11):7604-9.

Joseph SB, Tontonoz P. LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Curr Opin Pharmacol* 2003b; 3 (2):192-7.

Juge-Aubry CE, Hammar E, Siegrist-Kaiser C et al. Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem* 1999; 274 (15):10505-10.

Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ et al. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 1992; 358 (6389):771-4.

Laffitte BA, Tontonoz P. Orphan nuclear receptors find a home in the arterial wall. *Curr Atheroscler Rep* 2002; 4 (3):213-21.

Lander HM, Ogiste JS, Teng KK et al. p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J Biol Chem* 1995; 270 (36):21195-8.

Lander HM, Sehajpal PK, Novogrodsky A. Nitric oxide signaling: a possible role for G proteins. *J Immunol* 1993; 151 (12):7182-7.

Lazennec G, Canaple L, Saugy D et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol* 2000; 14 (12):1962-75.

Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 1997; 272 (6):3137-40.

Lennon AM, Ramage M, Dessouroux A et al. MAP kinase cascades are activated in astrocytes and preadipocytes by 15-deoxy-Delta(12-14)-prostaglandin J(2) and the thiazolidinedione ciglitazone through peroxisome proliferator activator receptor gamma-independent mechanisms involving reactive oxygenated species. *J Biol Chem* 2002; 277 (33):29681-5.

Lepore DA. Detection and quantification of nitric oxide (NO) synthase-independent generation of NO. *Methods Enzymol* 2002; 359:180-6.

Lim DG, Sweeney S, Bloodsworth A et al. Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (25):15941-6.

Lima ES, Di Mascio P, Abdalla DS. Cholesteryl nitrolinoleate, a nitrated lipid present in human blood plasma and lipoproteins. *J Lipid Res* 2003; 44 (9):1660-6.

Lima ES, Di Mascio P, Rubbo H et al. Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry. *Biochemistry* 2002; 41 (34):10717-22.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407 (6801):233-41.

Madej A, Okopien B, Kowalski J et al. [Levels of tumor necrosis factor alpha in serum of patients with hyperlipoproteinemia IIB before and after micronized fenofibrate therapy]. *Pol Arch Med Wewn* 1998; 99 (4):308-13.

Mak PA, Laffitte BA, Desrumaux C et al. Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002; 277 (35):31900-8.

Marino M, Ficca R, Ascenzi P et al. Nitric oxide inhibits selectively the 17beta-estradiol-induced gene expression without affecting nongenomic events in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286 (3):529-33.

Marshall HE, Stamler JS. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry* 2001; 40 (6):1688-93.

Martin G, Duez H, Blanquart C et al. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest* 2001; 107 (11):1423-32.

Marx N, Sukhova GK, Collins T et al. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 1999; 99 (24):3125-31.

Matthews JR, Botting CH, Panico M et al. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 1996; 24 (12):2236-42.

Monteiro HP, Gruia-Gray J, Peranovich TM et al. Nitric oxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, Src kinase, and mitogen-activated protein kinases in murine fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2000; 28 (2):174-82.

Mounho BJ, Thrall BD. The extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to mitogenic and antiapoptotic effects of peroxisome proliferators in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 159 (2):125-33.

Napolitano A, Camera E, Picardo M et al. Acid-promoted reactions of ethyl linoleate with nitrite ions: formation and structural characterization of

isomeric nitroalkene, nitrohydroxy, and novel 3-nitro-1,5-hexadiene and 1,5-dinitro-1, 3-pentadiene products. *J Org Chem* 2000; 65 (16):4853-60.

Napolitano A, Camera E, Picardo M et al. Reactions of hydro(pero)xy derivatives of polyunsaturated fatty acids/esters with nitrite ions under acidic conditions. Unusual nitrosative breakdown of methyl 13-hydro(pero)xyoctadeca-9,11-dienoate to a novel 4-nitro-2-oximinoalk-3-enal product. *J Org Chem* 2002; 67 (4):1125-32.

O'Donnell VB, Eiserich JP, Chumley PH et al. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem Res Toxicol* 1999; 12 (1):83-92.

O'Donnell VB, Freeman BA. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circ Res* 2001; 88 (1):12-21.

Oliver WR, Jr., Shenk JL, Snaith MR et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (9):5306-11.

Panasenko OM, Briviba K, Klotz LO et al. Oxidative modification and nitration of human low-density lipoproteins by the reaction of hypochlorous acid with nitrite. *Arch Biochem Biophys* 1997; 343 (2):254-9.

Pasceri V, Wu HD, Willerson JT et al. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 2000; 101 (3):235-8.

Patel L, Charlton SJ, Marshall IC et al. PPARgamma is not a critical mediator of primary monocyte differentiation or foam cell formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290 (2):707-12.

Peet DJ, Turley SD, Ma W et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998; 93 (5):693-704.

Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N et al. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 2000; 105 (8):1095-108.

Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF et al. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103 (11):1547-60.

Pryor WA, Prier DG, Church DF. Radical production from the interaction of ozone and PUFA as demonstrated by electron spin resonance spin-trapping techniques. *Environ Res* 1981; 24 (1):42-52.

Puddu P, Puddu GM, Muscari A. Peroxisome proliferator-activated receptors: are they involved in atherosclerosis progression? *Int J Cardiol* 2003; 90 (2-3):133-40.

Repa JJ, Liang G, Ou J et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2000a; 14 (22):2819-30.

Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000b; 16:459-81.

Ricote M, Li AC, Willson TM et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391 (6662):79-82.

Rocha Oliveira CJ, Schindler F, Ventura AM et al. Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP Kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.* 2003; 35: 381-396.

Rokos CL, Ledwith BJ. Peroxisome proliferators activate extracellular signal-regulated kinases in immortalized mouse liver cells. *J Biol Chem* 1997; 272 (20):13452-7.

Rosen ED, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and atherosclerosis: ending the heartache. *J Clin Invest* 2000; 106 (5):629-31.

Rubbo H, Freeman BA. Nitric oxide regulation of lipid oxidation reactions: formation and analysis of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Methods Enzymol* 1996; 269:385-94.

Rubbo H, Tarpey M, Freeman BA. Nitric oxide and reactive oxygen species in vascular injury. *Biochem Soc Symp* 1995; 61:33-45.

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM et al. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J* 1996; 15 (19):5336-48.

Schultz JR, Tu H, Luk A et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 2000; 14 (22):2831-8.

Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM et al. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology* 1996; 137 (10):4499-502.

Shao D, Rangwala SM, Bailey ST et al. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature* 1998; 396 (6709):377-80.

Staels B, Dallongeville J, Auwerx J et al. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998; 98 (19):2088-93.

Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB et al. Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (18):11896-901.

Teruel T, Hernandez R, Benito M et al. Rosiglitazone and retinoic acid induce uncoupling protein-1 (UCP-1) in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner in fetal primary brown adipocytes. *J Biol Chem* 2003; 278 (1):263-9.

Thieringer R, Fenyk-Melody JE, Le Grand CB et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo. *J Immunol* 2000; 164 (2):1046-54.

Tobin KA, Ulven SM, Schuster GU et al. Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* 2002; 277 (12):10691-7.

Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 2003; 17 (6):985-93.

Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG et al. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998; 93 (2):241-52.

Venkateswaran A, Repa JJ, Lobaccaro JM et al. Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem* 2000; 275 (19):14700-7.

Von Knethen A, Brune B. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by nitric oxide in monocytes/macrophages down-regulates p47phox and attenuates the respiratory burst. *J Immunol* 2002; 169 (5):2619-26.

Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V et al. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* 1995; 96 (2):741-50.

Way JM, Harrington WW, Brown KK et al. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 2001; 142 (3):1269-77.

Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu Rev Biochem* 2001; 70:341-67.

Winegar DA, Brown PJ, Wilkison WO et al. Effects of fenofibrate on lipid parameters in obese rhesus monkeys. *J Lipid Res* 2001; 42 (10):1543-51.

Yates MT, Lambert LE, Whitten JP et al. A protective role for nitric oxide in the oxidative modification of low density lipoproteins by mouse macrophages. FEBS Lett 1992; 309 (2):135-8.

Zhang B, Berger J, Zhou G et al. Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. J Biol Chem 1996; 271 (50):31771-4.

Zhang Y, Repa JJ, Gauthier K et al. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. J Biol Chem 2001; 276 (46):43018-24.