

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

DOUGLAS RICARDO DE SOUZA JUNIOR

**USO DA PROTEÔMICA PARA INVESTIGAÇÃO DO ESTRESSE INDUZIDO POR
COLESTEROL EM MACRÓFAGOS HUMANOS E POTENCIAL EFEITO
PROTETOR DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL)**

São Paulo, SP

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**USO DA PROTEÔMICA PARA INVESTIGAÇÃO DO ESTRESSE INDUZIDO POR
COLESTEROL EM MACRÓFAGOS HUMANOS E POTENCIAL EFEITO
PROTETOR DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL)**

DOUGLAS RICARDO DE SOUZA JUNIOR

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Graziella Eliza Ronsein

São Paulo, SP

2019

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	4
RESUMO	5
RESUMO GRÁFICO	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Isolamento das lipoproteínas	11
3.2 Acetilação da LDL	11
3.3 Quantificação de proteínas	12
3.4 Cultura celular	12
3.5 Quantificação de colesterol	13
3.6 Coloração das células com Oil Red-O	14
3.7 Preparo das amostras para espectrometria de massas	14
3.8 Análise proteômica em espectrômetro de massas	15
3.9 Análise dos dados	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Otimização de metodologia de ultracentrifugação	16
4.2 Avaliação da incorporação de colesterol em macrófagos humanos	18
4.3 Análise do secretoma de macrófagos carregados com colesterol	18
4.3.1 Análise das proteínas diferencialmente expressas	18
4.3.2 Análise dos processos biológicos enriquecidos	22
4.4 Efeitos da exposição de macrófagos espumosos à HDL	25
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
7. ANEXOS	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	<i>ATP-binding cassette A1 transporter</i>
ABCG1	<i>ATP-binding cassette G1 transporter</i>
AcLDL	LDL acetilada
APOA1	Apolipoproteína A1
DCVs	Doenças cardiovasculares
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

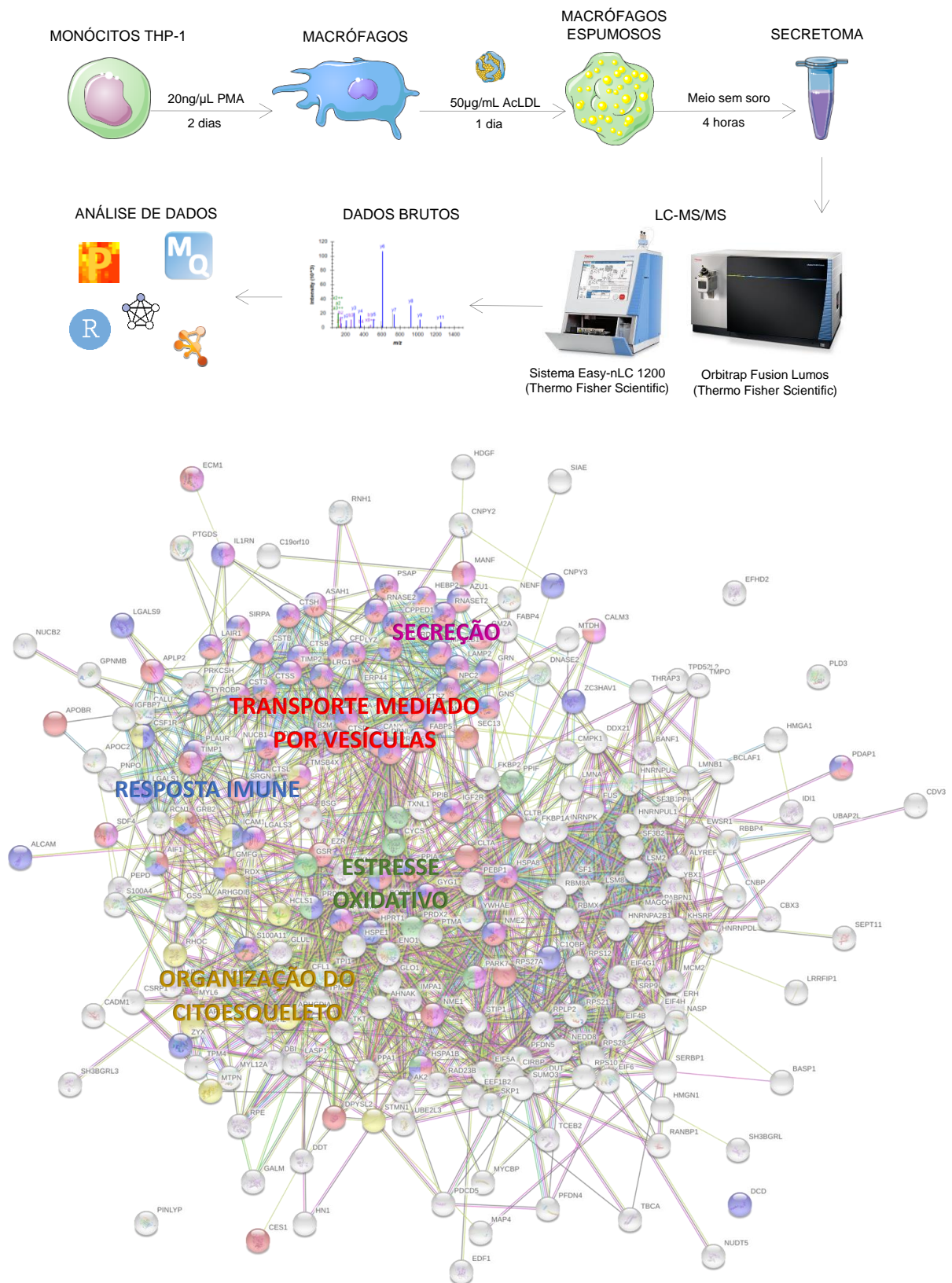
RESUMO

SOUZA JR, D.R. **Uso da proteômica para investigação do estresse induzido por colesterol em macrófagos humanos e potencial efeito protetor da lipoproteína de alta densidade (HDL).** 2019. 37p. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo.

Introdução: As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no Brasil e no mundo, principalmente em decorrência da aterosclerose. Parte de seu mecanismo é devido ao acúmulo da lipoproteína de baixa densidade (LDL) no espaço subendotelial, sua oxidação e subsequente fagocitose pelos macrófagos, tornando-os células espumosas. Essas células acumulam colesterol, ésteres de colesterol e seus metabólitos oxidados. Por outro lado, a HDL é tida como cardioprotetora, principalmente por promover o efluxo de colesterol e reduzir a quantidade desse lipídeo nas células espumosas. No entanto, ainda são pouco compreendidos os mecanismos moleculares e a resposta de macrófagos humanos ao excesso de colesterol, sua relação com o desenvolvimento de aterosclerose e o papel protetor da HDL. **Objetivo:** O objetivo deste projeto é estudar alterações no secretoma de macrófagos humanos causadas pelo excesso de colesterol, tentando-se entender seus efeitos, e avaliar o potencial papel modulador da HDL neste quadro. **Materiais e métodos:** Diferentes técnicas foram empregadas para se atingir os objetivos propostos, dentre elas estão ultracentrifugação para isolamento de lipoproteínas, cultura celular, espectrometria de massas (LC-MS/MS) e análises de dados utilizando softwares de proteômica e estatística, além de pesquisa bibliográfica na literatura científica para se entender os dados obtidos. **Resultados:** Os resultados mostraram que a LDL acetilada promove um aumento do pool de colesterol intracelular. Os efeitos do excesso de colesterol podem ser observados pelas diferenças da expressão de proteínas no secretoma desses macrófagos, principalmente aquelas relacionadas à ativação do sistema imune, ativação celular, secreção, estresse oxidativo e transporte mediado por vesículas. Além disso, observou-se que a HDL promove o efluxo de colesterol em células espumosas e esse efeito é dependente do excesso de colesterol, nas condições realizadas. **Conclusão:** A incubação com LDL acetilada promove um aumento de colesterol intracelular, que fica disponível para efluxo após incubação com HDL. Esse excesso de colesterol causa alterações importantes nas células espumosas, aumentando a secreção de proteínas relacionadas ao sistema imune, resposta inflamatória, estresse oxidativo, remodelação do citoesqueleto e transporte vesicular, contribuindo para o desenvolvimento e agravamento do quadro aterosclerótico.

Palavras-chave: colesterol; lipoproteínas; macrófagos; proteômica.

RESUMO GRÁFICO



1. INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares e lipoproteínas

As doenças cardiovasculares (DCVs), principalmente as doenças coronarianas e o acidente vascular cerebral, representam a principal causa de morte no Brasil e no mundo, sendo sua prevenção uma das prioridades da atenção primária em saúde (Ribeiro *et al.*, 2016). A principal causa das DCVs é a aterosclerose, uma condição inflamatória crônica (Frostegård, 2013). Evidências indicam que o acúmulo da lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*) na camada íntima das artérias de médio e grande calibre leva ao desenvolvimento da aterosclerose. Isso ocorre principalmente em resposta à oxidação dessas lipoproteínas, seu acúmulo no espaço subendotelial, aumento da expressão de moléculas de adesão, recrutamento de células do sistema imune e ativação de uma resposta vascular inflamatória que leva à formação de placas ateroscleróticas cheias de lipídeos (Gisterå e Hansson, 2017).

A LDL consiste em um conjunto de partículas heterogêneas que variam em tamanho, composição e estrutura, mas que possuem uma única cópia de apolipoproteína B por partícula (Hevonoja *et al.*, 2000). A LDL pode ser modificada na parede das artérias ao ser exposta a um ambiente oxidativo, propiciado pela ação de enzimas como mieloperoxidase, xantina oxidase e NADPH oxidases (Sun *et al.*, 2016). Pesquisadores afirmam que possivelmente uma das alterações mais importantes relacionadas a modificação da partícula de LDL é a mudança no seu padrão de reconhecimento. A partícula oxidada deixa de ser reconhecida e internalizada pelo receptor de LDL (LDLR), cuja expressão é regulada negativamente pela concentração de colesterol, e passa a ser reconhecida por receptores do tipo *scavenger*, como CD36 e SR-AI (Levitan *et al.*, 2010), que não são regulados pela concentração de colesterol. Uma vez fagocitada pelos macrófagos, a partícula de LDL é degradada e o receptor pode ser reciclado ou não (Zanoni *et al.*, 2018). Em modelos experimentais, o colesterol proveniente de LDL acetilada, por exemplo, pode ser convertido em ésteres de colesterol no retículo endoplasmático e armazenado em *lipid droplets* no citoplasma (Wang *et al.*, 2007). Além disso, o colesterol também pode ser oxidado intracelularmente a oxisteróis (Chen *et al.*, 2015). Os oxisteróis são importantes sinalizadores de inflamação, pois são capazes de ativar os receptores

LXR (do inglês *Liver X Receptors*), induzindo a expressão de genes envolvidos na homeostase de colesterol, o que resulta em aumento de efluxo de colesterol e redução da expressão de receptor de LDL (Shibata e Glass, 2010).

Assim, o papel da LDL como fator de risco para aterosclerose é bastante claro, já que quando modificada é capaz de entregar colesterol às células dos tecidos periféricos, levando a formação de macrófagos espumosos (do inglês *macrophage foam cells*), que são as células características da aterosclerose (Witztum e Steinberg, 1991; Bensinger e Tontonoz, 2008; Ley *et al.*, 2011). Contrário à LDL, a lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *high density lipoprotein*) possui um efeito cardioprotetor (Shea *et al.*, 2019). O mecanismo desse efeito cardioprotetor não está completamente esclarecido (Cuchel *et al.*, 2018). Entretanto, parte dele se deve à capacidade da HDL de mobilizar o excesso de colesterol de macrófagos das paredes das artérias por diversos mecanismos (Rothblat *et al.*, 1999). Estudos utilizando animais fortemente indicam que a HDL promove efluxo de colesterol das células espumosas em vasos ateromatosos (Heinecke, 2011).

A HDL plasmática consiste em um grupo heterogêneo de pequenas partículas discoidais e esféricas que possuem uma camada externa de fosfolipídios e colesterol livre e um centro hidrofóbico contendo ésteres de colesterol e triacilgliceróis (Camont *et al.*, 2011). Além desses lipídeos, a HDL possui um conteúdo proteico bastante importante (apolipoproteína A1 e A2 representam, respectivamente, 70% e 20% do conteúdo proteico presente na partícula), no entanto, acredita-se que mais de 90 proteínas façam parte de sua composição (Shao e Heinecke, 2018).

A relação inversa entre a redução do risco de desenvolvimento das DCVs e a alta concentração de colesterol na HDL (HDL-C) já é utilizada na prática clínica há muito tempo (Gordon *et al.*, 1977; Di Angelantonio *et al.*, 2009). Portanto, seria esperado que fármacos capazes de elevar o conteúdo de HDL-C plasmático pudessem diminuir o risco de DCVs. Porém, falhas em triagens clínicas recentes com fármacos que aumentam HDL-C plasmática (Tall *et al.*, 2008; Boden *et al.*, 2011; Rader e Tall, 2012; Schwartz *et al.*, 2012; Eyvazian e Frishman, 2017) e múltiplos estudos genéticos (Voight *et al.*, 2012; Willer *et al.*, 2013; Holmes *et al.*, 2015) geraram dúvidas se o aumento de HDL-C induzido terapêuticamente teria efeito benéfico (Davidson, 2014).

HDL e o efluxo de colesterol

O papel da HDL no transporte reverso de colesterol, via pela qual o excesso de colesterol é transportado de tecidos (incluindo placas ateromatosas) ao fígado para eliminação, foi estabelecido por estudos clínicos independentes. Estes estudos mostraram que a capacidade da HDL em remover o colesterol de células em cultura prediz o risco de desenvolver uma doença cardiovascular melhor do que os níveis de HDL-C plasmático (Khera *et al.*, 2011; Rohatgi *et al.*, 2014; Hutchins e Heinecke, 2015; Saleheen *et al.*, 2015; Karathanasis *et al.*, 2017). No entanto, os mecanismos determinantes da capacidade de efluxo de colesterol da HDL são, em grande parte, desconhecidos.

Até o momento, quatro diferentes vias para o efluxo de colesterol das células foram identificadas. Duas vias são ativas e mediadas por transportadores chamados ABC (do inglês *ATP-binding cassette*). O transportador ABCA1 exporta colesterol para a apolipoproteína A1 livre (deslipidada) ou pobre em lipídios (também conhecida como pré-beta HDL) (Oram *et al.*, 2000). O transportador ABCG1 medeia o efluxo de colesterol para a partícula de HDL madura (Kennedy *et al.*, 2005). As duas vias passivas de efluxo são a difusão aquosa e difusão facilitada por receptores SR-B1 (do inglês, *scavenger receptor class B type I*). Estas vias são impulsionadas pelo gradiente de concentração de colesterol, e têm partículas de HDL médias e grandes como aceptoras (Phillips, 2014). O receptor SR-B1 é responsável pela absorção seletiva de ésteres de colesterol da HDL pelas células hepáticas (Hoekstra, 2017; Linton *et al.*, 2017), além de mediar o fluxo bidirecional de colesterol livre entre células periféricas e HDL (Kellner-Weibel *et al.*, 2000). Todas as vias contribuem de maneira diferente para a capacidade de efluxo de colesterol (De La Llera-Moya *et al.*, 2010).

Colesterol e inflamação

O colesterol é uma molécula muito importante para a fisiopatologia da aterosclerose, sendo capaz de induzir ativação de respostas inflamatórias por diversas vias (Tall e Yvan-Charvet, 2015). Dentre as respostas produzidas, está a redução do efluxo de colesterol, o que acaba por amplificar o processo inflamatório (Tall e Yvan-Charvet, 2015). Modelos animais transgênicos *knockout* para o receptor de LDL (*Ldlr*^{-/-}) alimentados com dietas ricas em colesterol permitiram a identificação

de um conjunto de proteínas tidas como responsivas a esteróis (MSRP, do inglês *macrophage sterol-responsive proteins*) (Becker *et al.*, 2010). Além disso, também foi verificada que a conexão entre obesidade e inflamação para o desenvolvimento de aterosclerose se deve, pelo menos em parte, ao IFN- γ , um importante mediador inflamatório (Reardon *et al.*, 2018). Dessa forma, parte das propriedades anti-inflamatórias da HDL (Barter *et al.*, 2004; Yvan-Charvet *et al.*, 2008) podem ser devido a supressão da resposta mediada por INF- γ (Suzuki *et al.*, 2010) com possível modulação dessas MSRP.

Para estudar os efeitos do excesso de colesterol em macrófagos humanos, é necessário escolher uma técnica analítica potente, tal como é a proteômica baseada em espectrometria de massas. Esta técnica permite o sequenciamento e estudo das proteínas numa dada amostra biológica de uma maneira integrada, favorecendo o estudo de processos biológicos complexos (Aebersold e Mann, 2016). Uma das vantagens deste tipo de tecnologia está no estudo da abundância de milhares de proteínas com diversas ordens de magnitude presentes numa mesma amostra (Meissner e Mann, 2014). Por se tratar de uma técnica complexa, diversas metodologias diferentes surgiram ao longo dos anos, sendo que a mais utilizada é aquela conhecida como proteômica *shotgun* (ou pela sigla DDA, do inglês *data-dependent acquisition*) (Meissner e Mann, 2014). Graças aos avanços recentes nos métodos de aquisição, a proteômica por DDA é capaz de deduzir diferenças na intensidade de proteínas em diferentes condições de forma confiável, sendo considerada uma técnica qualitativa e quantitativa (Lam *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

O objetivo central do projeto é estudar alterações no secretoma de macrófagos humanos causadas por excesso de colesterol. Como objetivos específicos, espera-se:

- 1) Entender os efeitos do excesso de colesterol em macrófagos humanos em cultura através de análise proteômica celular;
- 2) Avaliar o potencial papel modulador da HDL sob o efeito de excesso de colesterol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento das lipoproteínas

O sangue de voluntários aparentemente saudáveis foi coletado em tubos contendo EDTA e essa coleta foi aprovada pelo comitê de ética (o projeto está cadastrado na plataforma Brasil sob o título “Proteômica Redox da Inflamação”, CAAE nº60860016.5.0000.0067). O plasma foi separado por centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos, aliquotado e congelado a -80°C até seu uso. A LDL foi isolada a partir de plasma por ultracentrifugação (Mendez *et al.*, 1991) utilizando um rotor TLA 120.2 (Beckman Coulter) a 5°C e velocidade de 120.000 rpm por 6 horas. Em resumo, 790µL de plasma foram adicionados a um tubo de policarbonato (Beckman Coulter), seguido da adição de 190µL de solução de densidade 1,3g/cm³, atingindo-se densidade final de 1,063g/cm³. Neste processo, a LDL e VLDL ($d < 1,063$) encontram-se no topo do tubo, e as proteínas plasmáticas e HDL ($d > 1,063\text{g/cm}^3$), na porção inferior do tubo. Os 375µL da fração superior do tubo foram coletados (fração contendo LDL) e o conteúdo proteico quantificado por Bradford.

As soluções para isolamento foram preparadas com sal de brometo de potássio (Sigma) até a obtenção da densidade almejada. Após o isolamento, as lipoproteínas foram dialisadas contra 300 vezes seu volume em solução de tampão fosfato de potássio 20mM pH 7,4 contendo 100µM de DTPA (Diethylenetriaminepentaacetic acid, Sigma) em copo de diálise MWCO 3kDa (Thermo Fisher Scientific). O tampão foi trocado duas vezes com um intervalo mínimo de 2h30 para atingir o equilíbrio. Em seguida, a LDL foi acetilada quimicamente com anidrido acético.

Para obtenção de soro rico em HDL (e depletado de apolipoproteína B (Shea *et al.*, 2019)), o plasma coletado foi convertido em soro pela incubação com cloreto de cálcio 25mM por 1h. Dez partes de soro foram então incubadas por 20 min com quatro partes de uma solução 20% de polietilenoglicol 8kDa (preparado em 200mM de tampão glicina pH 10). O tubo foi centrifugado (10.000 rpm por 30 minutos, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para os experimentos.

3.2 Acetilação da LDL

A acetilação da LDL foi feita de acordo com protocolo prévio (Basu *et al.*, 1976). Num balão de fundo redondo, sob agitação constante a 4°C, o volume total de LDL foi

adicionado de um volume de solução de acetato de sódio 3M (Sigma). Em seguida, alíquotas pequenas de 2µL de anidrido acético (J.T.Baker) foram adicionadas num período total de 1h até atingir 1,5 vezes a massa total de proteínas contida inicialmente. Por fim, a solução ficou 30 minutos em agitação sem adição de anidrido acético. A LDL agora acetilada (AcLDL) foi então dialisada contra tampão fosfato de potássio 20mM contendo 100µM de DTPA e o conteúdo proteico foi quantificado por Bradford.

A eficiência da acetilação foi verificada através de gel de agarose (Basu *et al.*, 1976) com pequenas modificações. De maneira resumida, o gel de agarose 0,5% (Sigma) foi corrido em tampão Tris-Tricina pH 8,6 a 100V por 2h30 e corado durante a noite com Azul de Coomassie (InstantBlue, Sigma).

3.3 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas pelo método do ácido bicinonínico (BCA) foi realizada conforme instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific). Resumidamente, 25µL de amostra ou curva foram adicionados em poços de uma placa de 96 poços e 200µL do reagente foram adicionados em seguida. A placa foi incubada por 30 minutos a 37°C e a absorbância foi medida a 562nm.

A quantificação pelo método de Bradford também foi realizada de acordo com instruções do fabricante (Bio-Rad). Resumidamente, 10µL de amostra ou curva foram adicionados em poços de uma placa de 96 poços, seguido da adição de 200µL do reagente e incubação por 5 min a temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 595nm.

A quantificação de proteínas foi baseada na construção de uma curva padrão utilizando albumina (BSA) com concentrações variando de 50 a 500mg/L. Todas as medidas foram realizadas em leitor de placas Synergy H1 (BioTek), sempre que possível em triplicatas técnicas.

3.4 Cultura celular

Monócitos humanos da linhagem THP-1 (BCRJ) foram utilizados como modelo celular para os experimentos (Kritharides *et al.*, 1998). Eles foram mantidos em cultura em meio RPMI-1640 (vitrocell) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS, vitrocell), 1%

de antibiótico (P/S, vitrocell), 10mM de HEPES (Sigma) e 50 μ M β -mercaptoetanol (Sigma). Os monócitos foram diferenciados em macrófagos pela adição de 20ng/mL de PMA (Phorbol 12-miristato 13-acetato, Sigma) por 48h antes da realização dos experimentos.

Um milhão de monócitos da linhagem THP-1 foram plaqueados em placa de 6 poços (Corning) e diferenciados com PMA. Em seguida, foram incubados por 20h na presença de 50 μ g/mL de AcLDL. A monocamada de células foi lavada com PBS e incubada por 4h na presença de meio sem FBS nem phenol-red (Sigma). Após esse período, o meio das células (secretoma) foi removido, transferido para um microtubo, o conteúdo foi concentrado por filtro de cutoff (Amicon Ultra 3kDa, Millipore) até cerca de 400 μ L. Em seguida, o conteúdo proteico foi precipitado com acetona (1 parte de secretoma para 4 partes de acetona gelada a -20°C) durante a noite. O pellet de proteínas foi ressuspendido em bicarbonato de amônio 100mM (Mallinckrodt) contendo 0,1% de desoxicolato de sódio (Sigma). As proteínas foram quantificadas por BCA e 10 μ g foram reservados para análise proteômica.

Para verificar o efeito da HDL em macrófagos humanos, os monócitos foram diferenciados em macrófagos e carregados com colesterol como descrito acima e, em seguida, foram expostos por 4h a 2,8% de soro rico em HDL (depletado de apolipoproteína B), sendo que o colesterol intracelular foi extraído e quantificado.

3.5 Quantificação de colesterol

Após a retirada do meio de cultura, as células foram lavadas com PBS. Em seguida, às placas foi adicionado um solvente de extração (hexano 3:2 isopropanol, v:v) por 15 minutos seguido de uma nova extração por 15 minutos adicionais. As amostras foram secadas sob fluxo de gás nitrogênio (N₂) e armazenadas a -20°C até análise. Ao esqueleto celular remanescente, foi adicionado hidróxido de sódio 0,2M por 2h para extração das proteínas com intuito de normalizar a quantidade de colesterol. As proteínas foram quantificadas por BCA.

As amostras de colesterol foram ressuspendidas em tampão de ressuspensão (fosfato de potássio 0,1M pH 7,4, NaCl 50mM, colato de sódio 1% e Triton X-100 0,1%). A análise de colesterol por kit comercial (método enzimático-fluorimétrico) foi realizada conforme instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific) com pequenas

alterações. Resumidamente, 50µL da amostra (diluída em tampão de reação fornecido pelo próprio fornecedor) foram adicionados em uma placa de 96 poços preta de fundo chato (Corning) e incubadas com 20U/mL de catalase por 15 min a 37°C. Em seguida, 50µL de um tampão de reação foi adicionado (300µM do reagente Amplex® Red, 2U/mL de horseradish peroxidase, 2U/mL de colesterol oxidase e 1,6U/mL de colesterol esterase diluídos em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,4, NaCl 50mM, ácido cólico 5mM e Triton X-100 0,1%). A placa foi incubada por 30min a 37°C e a intensidade de fluorescência foi medida em um leitor de placas (Synergy H1, BioTek) com comprimentos de onda de 550nm (excitação) e 590nm (emissão). Para a determinação da quantidade de colesterol, foi construída uma curva padrão com diluições seriadas (0,125 a 8ng/µL) a partir de colesterol padrão 2mg/mL.

3.6 Coloração das células com Oil Red-O

Para verificar a presença de lipídios neutros (como ésteres de colesterol) e, portanto, avaliar a incorporação de colesterol nas células incubadas com AcLDL, foi realizada a coloração das células com o corante Oil Red-O (Sigma). Para isso, as células tiveram seu meio removido, foram lavadas com PBS, fixadas com para-formaldeído 4% em PBS (Sigma) por 30 minutos e coradas com Oil Red-O 0,3% em isopropanol e água (3:2, v:v) por 15 min. O excesso de corante foi removido com isopropanol 60% e as células foram fotografadas utilizando microscópio óptico (Nikon Eclipse TS100, aumento de 400x).

3.7 Preparo das amostras para espectrometria de massas

Dez µg de proteínas provenientes do secretoma foram digeridas utilizando tripsina (Promega). Em resumo, as amostras foram reduzidas com ditioneitol 10mM (DTT, Bio-Rad) por 1h a 37°C, alquiladas com iodoacetamida 15mM (IAA, Bio-Rad) por 30 min (25°C) e o excesso de IAA captado utilizando-se DTT 2,5mM por 15 min (25°C). Tripsina (0,25µg, razão 1:40 com massa de proteína digerida) foi incubada junto a amostra por 4h a 37°C; em seguida, uma segunda digestão com tripsina (0,2µg) foi realizada durante a noite a 37°C. Por fim, a digestão foi parada com 0,5% v/v de ácido trifluoroacético (TFA, Sigma) e as amostras foram agitadas em vórtice e

centrifugadas a 14.000 rpm por 30 min para retirada do desoxicolato. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

Em seguida, as amostras foram dessalinizadas utilizando o protocolo de C18-StageTip (Supelco) (Rappsilber *et al.*, 2007). De maneira resumida, as colunas manufaturadas em ponteiros de 200µL foram condicionadas com metanol e equilibradas duas vezes com TFA 0,1%. As amostras foram carregadas duas vezes e lavadas outras dez com TFA 0,1%, e por fim, foram eluídas utilizando 60% acetonitrila (ACN) / 40% água (com 0,1% TFA). Então, os peptídeos foram secados sob vácuo, ressuspensos em 100µL de 0,1% TFA por 4h e centrifugados por 30 min a 14.000rpm (4°C). Por fim, o sobrenadante foi transferido para uma placa de injeção no espectrômetro de massas.

3.8 Análise proteômica em espectrômetro de massas

Um sistema nano-LC Easy-nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific) acoplado à um instrumento Orbitrap Fusion Lumos equipado com uma fonte nanospray (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado. Os solventes do nano-LC foram água com 0,1% de ácido fórmico (A) e ACN (80% em água, v:v) com 0,1% de ácido fórmico (B). Quatro µL das amostras de secretoma ou o controle (400ng) foram carregadas numa coluna de cromatografia do tipo trap (Acclaim PepMap 75 µM, 2 cm, C18, 3µm, 100Å, Thermo) e lavadas com 20µL de solvente A numa pressão constante (500 bar). Depois disso, a amostra foi eluída para a coluna do nano-LC (Acclaim PepMap RSLC, 50µM, 15 cm, C18, 2µM, 100 Å, Thermo) usando um fluxo de 300nL/min. Um gradiente linear de 5% a 28% de B em 80 minutos foi seguido de um gradiente linear de 28 a 40% de B em dez minutos. Então, a porcentagem de solvente B foi aumentada de 40% para 95% de B em 2 minutos, e mantida constante por mais doze minutos. Os dados foram adquiridos usando um scan em MS1 seguido de scans MS2 dependentes de dados num ciclo de 3 segundos. Íons percursores uma vez selecionados para MS2 foram excluídos por 30 segundos. A resolução do modo MS1 foi estabelecida em 120.000 (a m/z 200), monitorando a variação de 400 a 1600 m/z. O scan MS1 total foi seguido de aquisição de dado dependente MS2 com resolução de 30.000 (a m/z 200), com tempo máximo de enchimento do trap de 54ms, janela de isolamento de 1,2Th e energia de colisão normalizada de 30.

3.9 Análise dos dados

A busca das proteínas da amostra foi realizada utilizando o software MaxQuant (Max Planck Institute, (Cox e Mann, 2008)) contra o banco de dados do proteoma humano UniProt (20336 entradas em 14/06/2018), com modificações fixas de carbamidometilação da cisteína e modificações variáveis de oxidação de metionina e acetilação N-terminal. Tripsina foi selecionada como a enzima com especificidade semi-trípica e até 2 clivagens perdidas, e para quantificação foram necessários pelo menos dois peptídeos (ao menos um deles único). As análises estatísticas de proteômica foram realizadas pelo software Perseus (Max Planck Institute, (Tyanova *et al.*, 2016)), com uma rede de proteínas montadas pelo plugin ClueGo do software Cytoscape v. 3.5.1 (Bindea *et al.*, 2009) e pelo software de predição de interação proteína-proteína String (v. 11.0, <https://string-db.org>, (Szklarczyk *et al.*, 2019)). Demais análises estatísticas foram realizadas pelo software RStudio (v. 3.4.2, <https://www.rstudio.com/>) e gráficos foram elaborados no RStudio e Excel. O nível de significância utilizado para as análises estatísticas foi de 95% e um *false discovery rate* (Benjamini-Hochberg FDR) foi de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização de metodologia de ultracentrifugação

A etapa inicial para o desenvolvimento deste projeto se deu pela otimização das metodologias de ultracentrifugação para isolamento de LDL, com objetivo de obter o maior rendimento possível.

Na primeira etapa da otimização decidiu-se avaliar se 2h seria tempo suficiente para separação da LDL do restante das proteínas plasmáticas. Dados da literatura mostram que 90 minutos a 120.000 rpm seria suficiente para essa separação, pois quanto maior a velocidade de rotação, menor o tempo necessário para separação das lipoproteínas e menor a contaminação por proteínas plasmáticas, avaliada pela presença de albumina (Pietzsch *et al.*, 1995). Entretanto, duas horas não foram suficientes para retirar a contaminação com albumina, conforme gel de agarose (figura 1A). Dessa forma, um segundo teste foi realizado com um tempo de 6 horas para separação da LDL (figura 1B). Além disso, também foi realizada a quantificação de

colesterol e proteínas em cada uma das diferentes frações coletadas do tubo de ultracentrífuga (frações 1 a 5 no gel, figura 1C), sendo que cada fração continha 125 μ L do topo do tubo.

Em concordância com o resultado da figura 1B, pode-se perceber que a contaminação com albumina aparece a partir da 5^a fração (correspondente a 625 μ L de amostra) e, ainda, a maior parte da contribuição total de lipoproteínas provém da primeira e segunda fração (250 μ L). Ainda, analisando-se a figura 1C, percebe-se que o conteúdo de colesterol diminui drasticamente a partir da 3^a fração. Portanto, foi decidido que os 375 μ L superiores do tubo seriam utilizados para prosseguimento com acetilação da LDL.

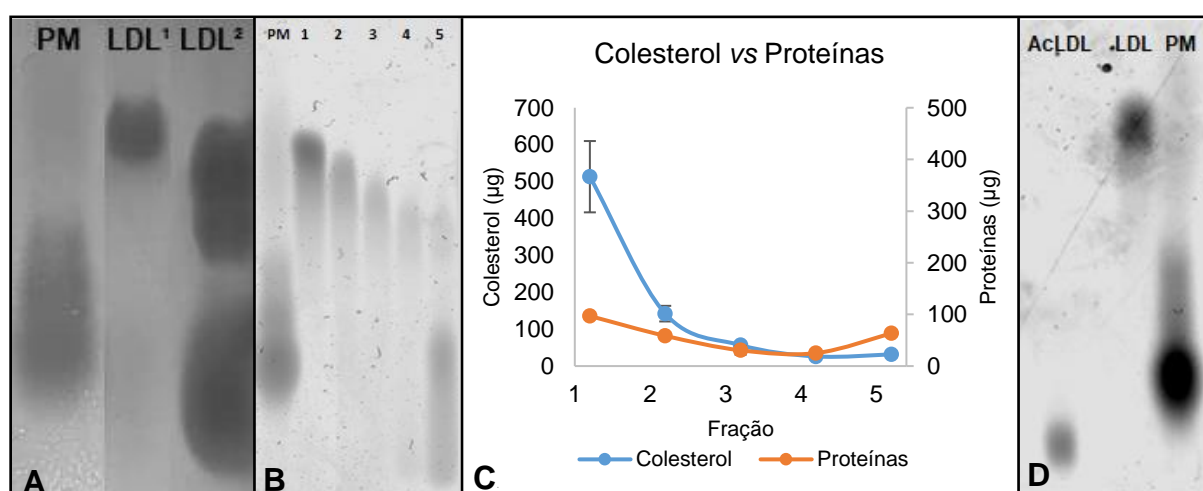


Figura 1. Análise da pureza da LDL. A) Gel de agarose contendo LDL e padrão de peso molecular (PM) contendo albumina. LDL¹: LDL purificada previamente; LDL²: LDL separada por ultracentrifugação de 2h. B) Gel de agarose contendo as diferentes frações do isolamento de LDL por 6h de ultracentrifugação. Na primeira linha encontra-se o padrão de peso molecular contendo albumina (PM). C) Quantificação de colesterol e proteínas das frações coletadas no tubo de ultracentrífuga após 6 h de ultracentrifugação. D) Gel de agarose após a acetilação da LDL. Fonte: autoria própria.

Conforme descrito nas metodologias, a acetilação da LDL foi realizada com anidrido acético e a confirmação dessa acetilação foi feita pela comparação da mobilidade eletroforética entre a LDL acetilada (AcLDL) e a LDL não acetilada. Um exemplo pode ser visto na figura 1D. A comparação entre as mobilidades permite observar que a LDL acetilada migrou mais no campo eletroforético em relação à LDL. Este resultado era esperado, já que a incubação com anidrido acético leva à formação

de acetil-lisina (Baeza *et al.*, 2014), o que diminui a carga positiva da partícula e, consequentemente, aumenta sua carga líquida negativa.

4.2 Avaliação da incorporação de colesterol em macrófagos humanos

Uma vez otimizada a etapa de ultracentrifugação e acetilação da LDL, a próxima etapa do projeto objetivou avaliar a incorporação de colesterol em macrófagos humanos (linhagem de células THP-1). Dessa maneira, foram utilizadas técnicas de microscopia e quantificação de colesterol (método enzimático-fluorimétrico) para verificar se as células, quando incubadas com AcLDL, tornavam-se macrófagos espumosos (figura 2).

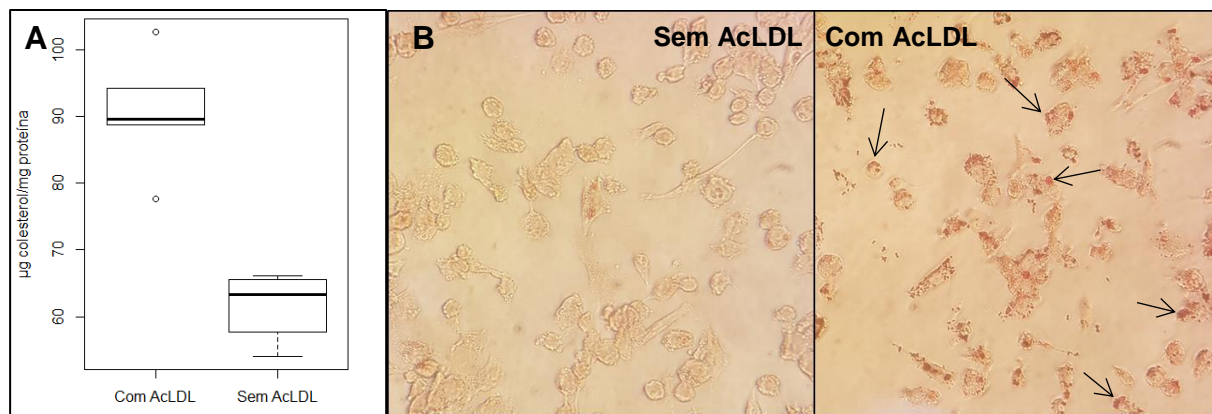


Figura 2. Células THP-1 incubadas com AcLDL por 24h para incorporação de colesterol. A) Quantificação de colesterol por metodologia de fluorescência em placa. B) Microscopia óptica de células coradas com Oil Red-O (aumento de 400x), com setas mostrando alguns *lipid droplets*. Fonte: autoria própria.

Os resultados da figura 2 indicam um aumento aproximado de 48%, em média, no conteúdo de colesterol nas células incubadas com AcLDL ($61,3 \pm 5,3$ versus $90,5 \pm 9,1$ μg de colesterol por mg de proteína intracelular; $n=5$; $p<0,001$; figura 2A). Esse resultado é corroborado pelo aumento na quantidade de *lipid droplets* (corados com Oil Red-O) observados na figura 2B quando as células são expostas à AcLDL.

4.3 Análise do secretoma de macrófagos carregados com colesterol

4.3.1 Análise das proteínas diferencialmente expressas

Com intuito de verificar quais proteínas são secretadas pelos macrófagos frente à incorporação de colesterol, após 24h de incubação com AcLDL, os macrófagos

foram deixados em meio sem soro por 4h e então as proteínas do sobrenadante (denominadas em conjunto como secretoma) foram coletadas. Após quantificação pelo método de BCA, as proteínas foram digeridas, analisadas por espectrometria de massas e os peptídeos obtidos foram pesquisados contra o banco de dados de proteínas humanas. Após refinamento, os resultados mostraram que haviam 725 proteínas presentes em todas as replicatas de pelo menos um dos grupos (tratado com AcLDL ou controle, n=5 por grupo). Dentre essas proteínas, 456 foram tidas como diferencialmente expressas (teste t não pareado, e correção por comparações múltiplas através do método de Benjamin-Hochberg. P ajustado < 0.05). Para verificar se as proteínas que estavam no secretoma eram realmente proteínas normalmente secretadas, foi utilizado o enriquecimento de localização celular do software String, que mostrou que grande parte das proteínas pertencem ao espaço extracelular ($P < 10^{-22}$) ou são parte do grânulo secretório ($P < 10^{-41}$), ainda que a maioria das proteínas identificadas tenham sido classificadas como citoplasmáticas ($P < 10^{-93}$). Esse resultado provavelmente ocorreu devido a um pouco de morte celular que acontece após retirada do PMA como estímulo de diferenciação (Spano *et al.*, 2013).

Para reduzir a complexidade dos dados desse secretoma foi construído um gráfico de análise de componentes principais (PCA, figura 3). Pela análise desse gráfico pode-se concluir que 83,5% da variabilidade total dos dados é explicada apenas pelo primeiro componente. Além disso, as replicatas de cada um dos dois grupos estão agrupadas juntas, indicando que cada grupo possui uma variabilidade similar entre as replicatas e que há uma grande variabilidade entre grupo tratado e controle, ou seja, a diferença observada entre os dois grupos se deve à incubação com AcLDL.

Percebe-se que o tratamento dos macrófagos humanos em cultura com AcLDL leva a uma alteração considerável nas proteínas secretadas por estas células (figura 4). Foi obtida uma lista de proteínas mais expressas no controle ou no tratado através de um teste-t não pareado e com correção por Benjamin-Hochberg e o resultado pode ser observado na figura 4. A lista completa de proteínas diferencialmente expressas presentes no secretoma de macrófagos incubados com AcLDL pode ser encontrada no anexo 1.

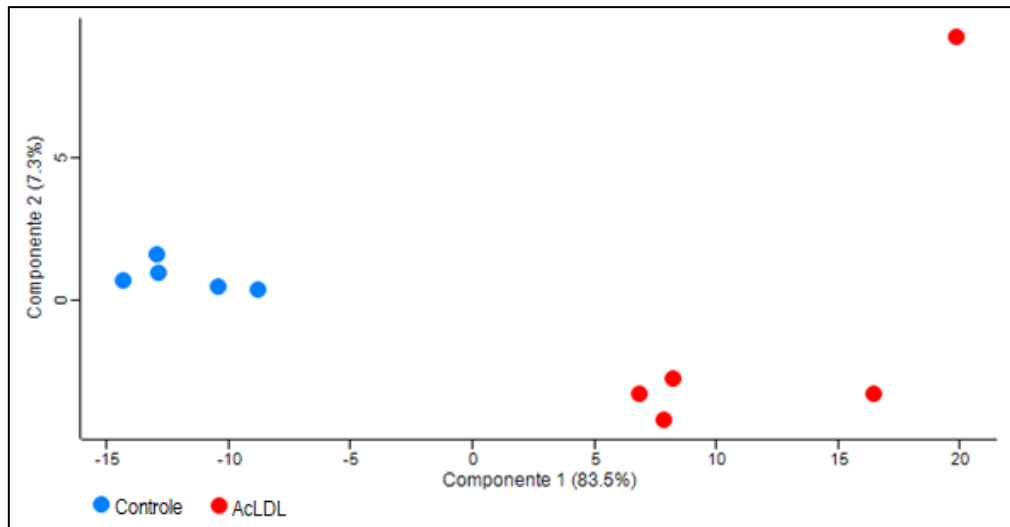


Figura 3. Análise de componentes principais (PCA). Os dois primeiros componentes foram plotados um contra o outro. Em azul estão representadas as replicatas do grupo controle e, em vermelho, do grupo tratado com AcLDL. Fonte: autoria própria.

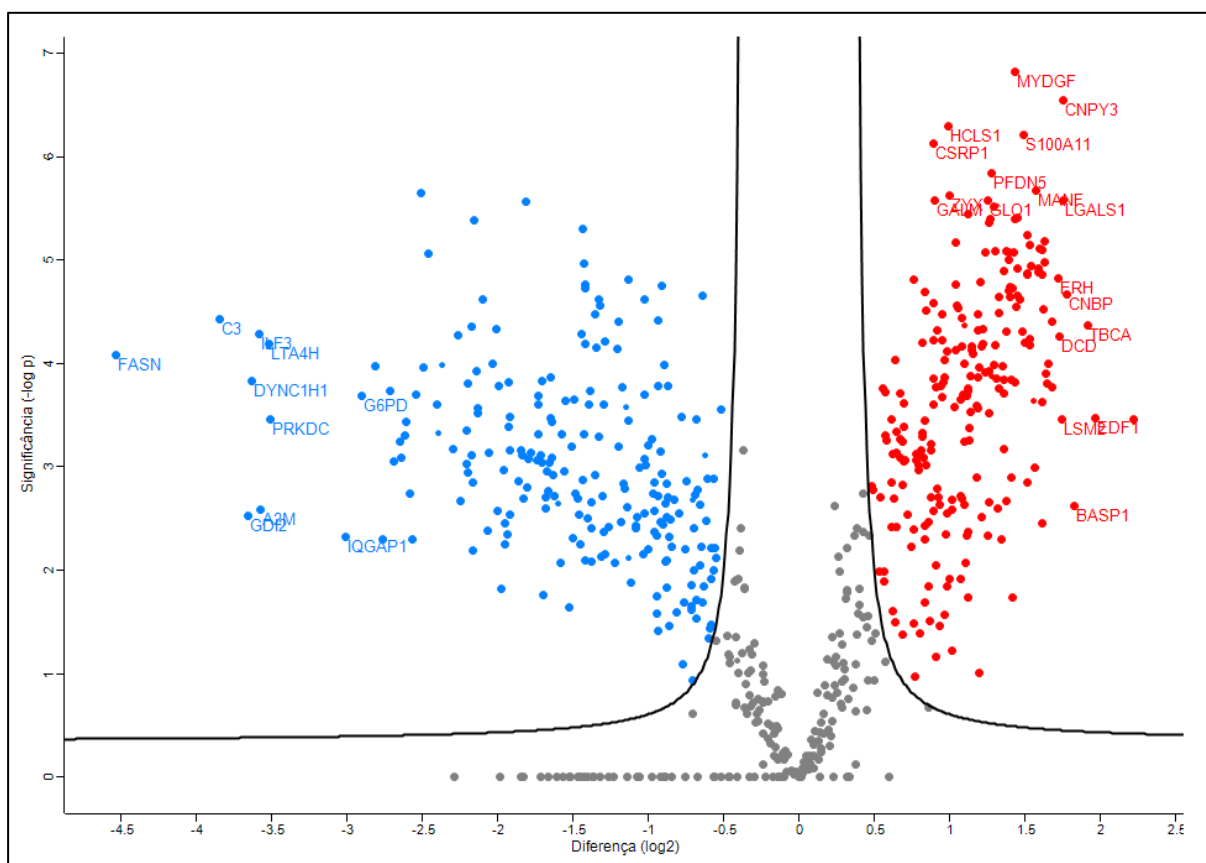


Figura 4. Proteômica do secretoma de macrófagos carregados com colesterol representada em um volcano plot. Para cada proteína, o valor de significância ($-\log_{10}$ p-valor de um teste t-Student) foi plotado contra o \log_2 da diferença entre o grupo controle e tratado com AcLDL. As proteínas significativamente mais expressas no grupo tratado com AcLDL estão dispostas à direita do valor de 0 no eixo x (acima da linha preta, em vermelho), enquanto as proteínas significativamente menos expressas estão à esquerda (acima da linha preta, em azul). Fonte: autoria própria.

Dentre as proteínas encontradas menos expressas no secretoma de macrófagos espumosos, estão ácido graxo sintase (FASN) e complemento C3. Visto que as partículas de LDL modificada possuem também ácidos graxos na forma de triacilgliceróis, parece coerente haver redução na enzima responsável por sua síntese. Por sua vez, o sistema complemento parece ter um efeito ainda não completamente esclarecido e controverso na fisiopatologia da aterosclerose. Níveis plasmáticos de C3 estão positivamente correlacionados com o risco de doenças cardiovasculares, no entanto, modelos murinos *knockout* para o gene C3 apresentam tamanho de placa aterosclerótica maior (Bogomolova *et al.*, 2019).

Dentre as proteínas mais expressas em macrófagos espumosos, está a proteína MYDGF (do inglês *myeloid-derived growth factor*), cujas funções ainda são incertas. O MYDGF parece desempenhar um papel no reparo cardíaco após lesão isquêmica e promover a proliferação de células endoteliais (Korf-Klingebiel *et al.*, 2015). A disfunção das células endoteliais faz parte da patogênese da aterosclerose (Theodorou e Boon, 2018). Outra proteína mais secretada por macrófagos espumosos é a NPC2 (do inglês *NPC intracellular cholesterol transporter 2*), que junto a NPC1 atua no tráfego intracelular de colesterol do compartimento lisossomal (Cologna e Rosenhouse-Dantsker, 2019). Além dessas, também estava mais expressa a proteína ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule 1*), que é uma proteína de adesão que, quando expressa em células endoteliais, promove a adesão e transmigração de leucócitos pela parede arterial (Malekmohammad *et al.*, 2019). No entanto, o papel de ICAM-1 expressa por macrófagos é um pouco enigmática, mas parece ter um efeito na polarização de macrófagos em seu fenótipo anti-inflamatório M2 (Gu *et al.*, 2017).

Também aumentada no secretoma dos macrófagos carregados com colesterol estava o CSF1R (do inglês *colony stimulating factor 1 receptor*) e a cistatina-c. Sabe-se que a proliferação de macrófagos é uma importante etapa no desenvolvimento de aterosclerose e o CSF1 (do inglês *colony stimulating factor 1*) é responsável por regular sobrevivência, proliferação e diferenciação de macrófagos através do receptor CSF1R (Wei *et al.*, 2015). Por fim, níveis elevados de cistatina-C estão associados com aterosclerose e parecem ser indicativos bons de risco aumentado para doenças cardiovasculares (Kobayashi *et al.*, 2017).

Exclusivamente identificada no secretoma de macrófagos carregados com colesterol estava a MIF (do inglês *Macrophage migration inhibitory factor*), que é uma citocina pró-inflamatória secretada em resposta a estresse oxidativo (Gupta *et al.*, 2016). Ela possui um efeito pró-aterogênico ao recrutar células inflamatórias e está relacionada à desestabilização de placas ateroscleróticas (Schober *et al.*, 2008). Este resultado é importante, uma vez que citocinas são mais difíceis de serem encontradas em métodos de proteômica *shotgun* por conta da sua baixa abundância biológica e reduzida massa molecular, uma vez que o método preferencialmente fragmenta e identifica os peptídeos mais intensos de uma amostra (Kupcova Skalnikova *et al.*, 2017).

4.3.2 Análise dos processos biológicos enriquecidos

Com a lista de proteínas diferencialmente expressas no secretoma de macrófagos espumosos obtidas pelo software Perseus (anexo 1), foi realizado um enriquecimento com o plugin ClueGO do software Cytoscape e também pelo software String. As redes de proteínas fazem parte de diferentes processos biológicos e parte pode ser observado na figura 5.

Diversos processos biológicos estavam enriquecidos no secretoma de macrófagos carregados com colesterol. De acordo com o software String, os principais processos biológicos enriquecidos ($P < 10^{-10}$) foram relacionados ao sistema imune, ativação celular, secreção celular e transporte mediado por vesículas. Além disso, diversos outros processos celulares também, como aqueles relacionados ao metabolismo de colesterol, migração leucocitária, regulação negativa da sinalização de apoptose, regulação da atividade do fator de transcrição NF- κ B e estresse redox.

Esses resultados são interessantes porque em macrófagos carregados com colesterol há um aumento da quantidade de oxisteróis. Estes oxisteróis são reconhecidos pelos receptores nucleares da família LXR, responsáveis por regular a expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo de colesterol, aumentando-se a expressão dos transportadores de efluxo ABCA1 e ABCG1 e apolipoproteínas da família APOC e APOE (Shibata e Glass, 2010). Além da homeostase de colesterol, esses receptores LXRs também regulam a expressão de genes inflamatórios e da

imunidade inata, visto que sua ativação antagoniza a expressão de genes das vias de sinalização TLR4, IL-1 β e TNF- α . (Bensinger e Tontonoz, 2008).

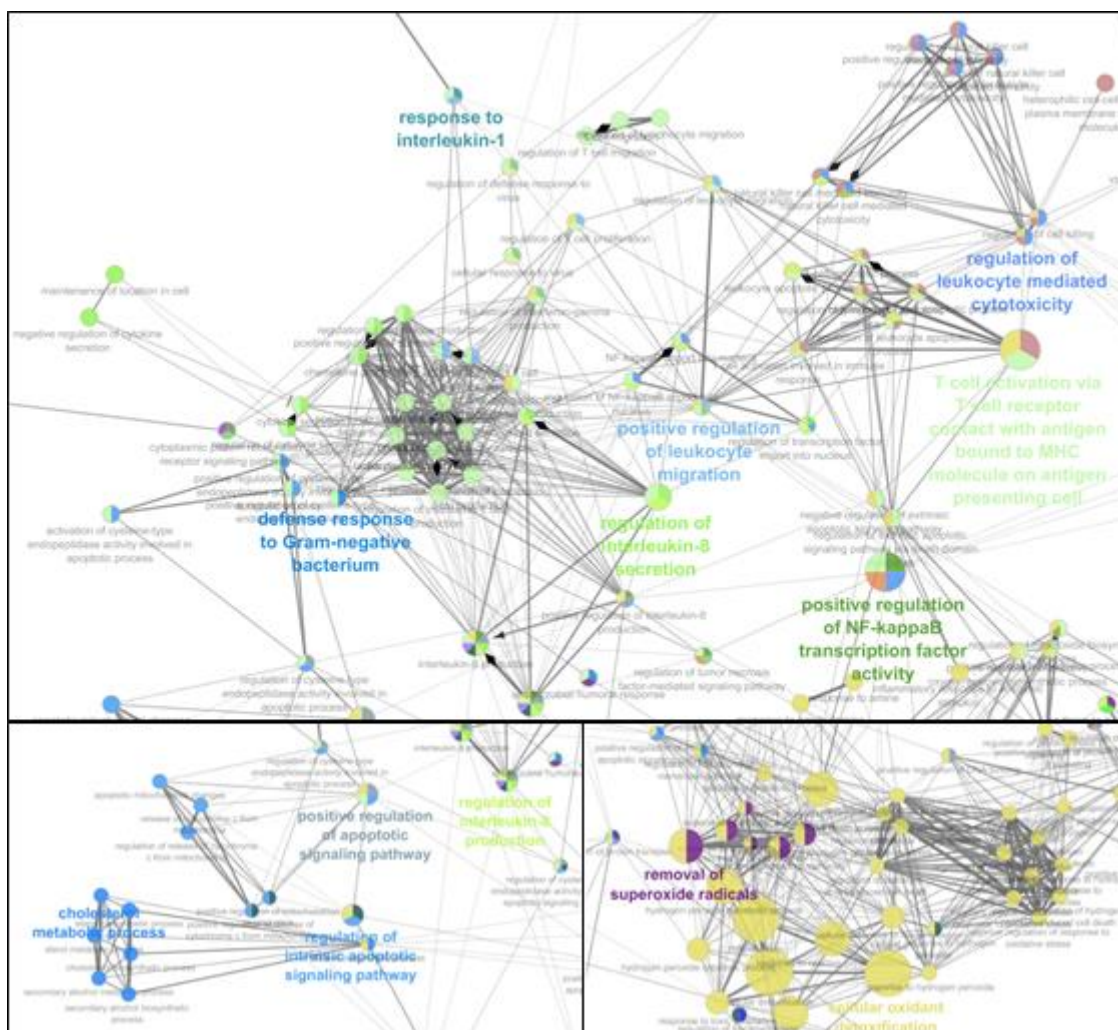


Figura 5. Análise de enriquecimento das proteínas significativamente mais expressas no secretoma de macrófagos expostos ao excesso de colesterol. Fonte: autoria própria.

Um dos processos enriquecidos foi o transporte mediado por vesículas. As vesículas extracelulares são extremamente importantes por servirem para comunicação entre células e regularem uma série de processos celulares relacionados a aterosclerose (Deng *et al.*, 2019). *In vitro*, macrófagos liberam vesículas com alto potencial de calcificação e agregação que contém proteínas S100A9 e anexina-5 (Wang *et al.*, 2019), ambas encontradas nesta análise, sendo que S100A9 estava mais expressa nas células carregadas com colesterol. Em modelos celulares, vesículas extracelulares obtidas a partir de células espumosas

promovem maior adesão e migração de células musculares lisas vasculares devido à regulação de vias do citoesqueleto de actina (Niu *et al.*, 2016), condizente com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que vias de regulação de citoesqueleto mostraram-se enriquecidas.

Objetivando identificar uma rede de proteínas regulada mediante acúmulo de colesterol, pesquisadores publicaram em 2010 um artigo utilizando o secretoma de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos *Ldlr*^{-/-} e *ApoE*^{-/-} alimentados com dieta rica em gorduras e colesterol. Seus resultados mostraram uma rede de proteínas que interagem fisicamente e que possuem atividades biológicas de transporte vesicular, ligação a lipídeos e regulação do citoesqueleto (Becker *et al.*, 2010). Em concordância com as proteínas diferencialmente expressas desse artigo, nesse trabalho de conclusão de curso também foram encontradas aumento na expressão de APOE e C3 e redução na expressão de RBMX (*RNA-binding motif protein*) e PSAP (prosaposina). Além disso, o enriquecimento realizado pelos softwares String e Cytoscape a partir de nossos dados também mostra um aumento da expressão de proteínas relacionadas a transporte vesicular e regulação do citoesqueleto ($P < 10^{-12}$).

Já em 2012, pesquisadores obtiveram o secretoma de macrófagos peritoneais murinos com o objetivo de estudar as proteínas diferencialmente expressas após incubação com AcLDL. Foi identificado um conjunto de 15 proteínas que, de acordo com os critérios estabelecidos, mostraram-se diferencialmente expressas e participavam de funções relacionadas a biologia lisossomal, ativação do sistema complemento e metabolismo lipídico (Suzuki *et al.*, 2012). Ao comparar os resultados aqui obtidos com resultados desse artigo, após refinamento, foram também encontradas 9 dessas proteínas, como aumento de cistacina-C, receptor do fator estimulador de colônia 1 (CSF1R) e catepsinas D e L e redução de proteína C3 do complemento. É importante ressaltar que os experimentos realizados pelos artigos citados (Becker *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2012) empregaram células de origem murina, ao contrário do que foi feito nesse trabalho de conclusão de curso, que empregou macrófagos humanos em cultura celular. Dessa forma, eventuais diferenças biológicas devem ser levadas em consideração.

Uma vez que os resultados obtidos no presente trabalho corroboram dados de literatura, pode-se supor que o aumento no secretoma de proteínas envolvidas com

função lisossomal, como catepsinas D e L e aumento de prosaposina estão relacionados. A catepsina D é responsável pela clivagem de prosaposina, que por sua vez está relacionada ao tráfego intracelular de colesterol e expressão do transportador de efluxo ABCA1 (Haidar *et al.*, 2006). As catepsinas são enzimas proteolíticas que parecem desempenhar um importante papel na fisiopatologia da aterosclerose. A catepsina D está implicada na proteólise parcial da apolipoproteína B-100, o que resulta na agregação de partículas de LDL, que são mais facilmente fagocitadas pelos macrófagos (Zhao e Herrington, 2016). As catepsinas D e L estão relacionadas com regulação de apoptose, formação de núcleo necrótico e ruptura de placas ateroscleróticas (Li *et al.*, 2009).

Outro processo biológico enriquecido foi aquele relacionado à estresse oxidativo ($P < 10^{-5}$), com proteínas tais como peroxirredoxinas, catalase e superóxido dismutase aumentadas no secretoma de macrófagos espumosos. Esses resultados são coerentes, visto que o estresse oxidativo faz parte da fisiopatologia da aterosclerose e a incubação com LDL modificada induz a produção de ânion superóxido, aumenta o estresse oxidativo local e leva a uma resposta inflamatória decorrente em macrófagos (Hung *et al.*, 2006).

4.4 Efeitos da exposição de macrófagos espumosos à HDL

Um dos efeitos mais estudados e tido como o mecanismo cardioprotetor mais importante da HDL é sua capacidade de efluxo de colesterol, que é a etapa inicial do transporte reverso de colesterol (Annema e Tietge, 2012). Essa capacidade de efluxo prediz melhor o risco de doenças cardiovasculares do que a concentração de colesterol contido na HDL (HDL-C) e protege as células da toxicidade induzida por colesterol ou oxisteróis (Yvan-Charvet *et al.*, 2010). No entanto, apenas um terço da variabilidade na capacidade de efluxo de colesterol pode ser explicada pelo conteúdo de colesterol contido na HDL (HDL-C) (Hutchins e Heinecke, 2015). Assim, entender os mecanismos e moléculas responsáveis por esse efeito cardioprotetor é desafiador e importante (Ronsein e Vaisar, 2019), podendo contribuir, inclusive, para que novos fármacos sejam desenvolvidos.

Para verificar parte desse efeito protetor, os macrófagos THP-1 incubados ou não com AcLDL foram expostos a soro rico em HDL por 4h (figura 6). Primeiramente,

percebe-se que a incubação dos macrófagos com AcLDL aumenta o conteúdo de colesterol total intracelular, condizente inclusive com o resultado previamente encontrado (figura 2A). Além disso, pode-se observar uma tendência do soro rico em HDL em reduzir a quantidade de colesterol intracelular, ou seja, de promover o efluxo de colesterol de células espumosas ($P = 0,064$) (Sankaranarayanan *et al.*, 2010). Esse soro rico em HDL parece não promover nenhum efeito nas células não carregadas com colesterol, e parte do motivo para isso é que as células foram privadas de soro (que contém colesterol) por 1 dia antes da incubação com HDL (Kritharides *et al.*, 1998).

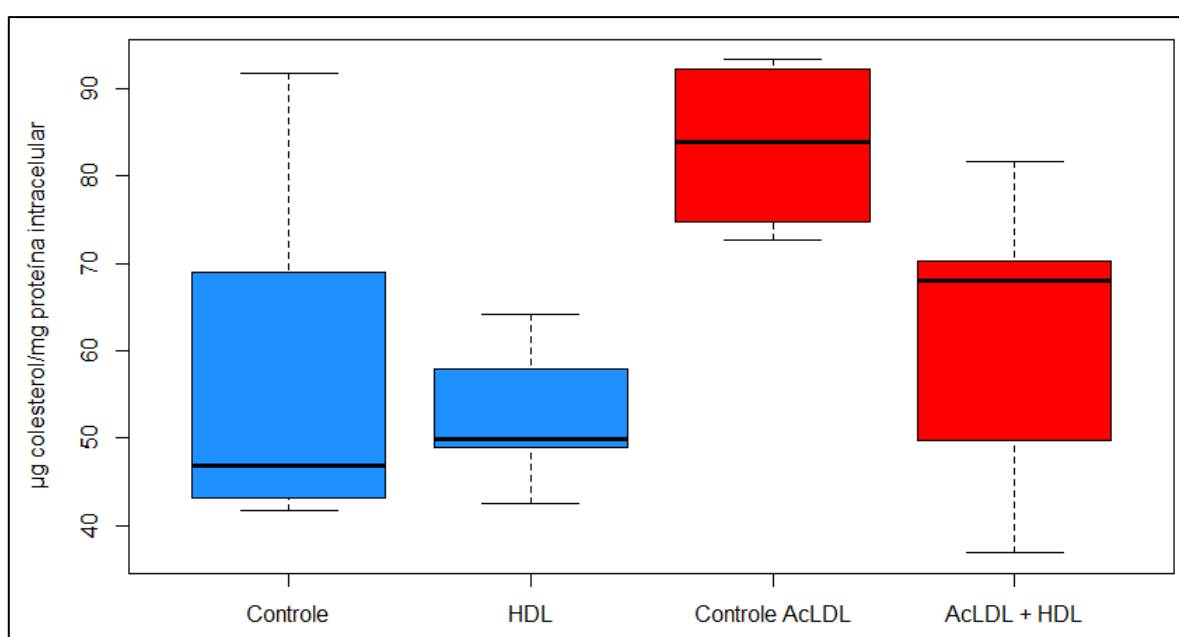


Figura 6. Quantificação de colesterol intracelular (n=5 por grupo). Em azul estão representados as replicatas sem tratamento com AcLDL e, em vermelho, as replicatas cujos macrófagos foram incubados com AcLDL. Fonte: autoria própria.

Espera-se que a incubação com HDL controle respostas inflamatórias, como por exemplo, pela prevenção da ativação de genes responsivos ao IFN- γ (Suzuki *et al.*, 2010). Ainda assim, faltam estudos mecanísticos que desvendem os efeitos da HDL em macrófagos espumosos e modulações que essa lipoproteína cause no proteoma. Desta forma, futuros experimentos deverão ser realizados com intuito de verificar a influência de cada via de transporte de colesterol para a capacidade de efluxo total, verificar as alterações no secretoma que são causadas devido à presença de HDL e realizar isolamento de proteínas de membrana para verificar alterações de sinalização causadas por excesso de colesterol.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final do trabalho de conclusão de curso foi possível determinar os efeitos do excesso de colesterol em células espumosas no contexto da aterosclerose. Uma metodologia de isolamento direto de LDL foi otimizada pra que essa lipoproteína pudesse ser acetilada quimicamente e, então, incubada com macrófagos humanos, o que promoveu um esperado aumento na quantidade de colesterol celular, com formação de células espumosas características. Esse colesterol fica, portanto, disponível para efluxo, observado pela redução na concentração de colesterol intracelular após incubação com soro rico em HDL. Os resultados mais importantes, no entanto, dizem respeito às alterações das proteínas secretadas causadas pela incorporação de colesterol. Levando-se em consideração os dados obtidos e a discussão frente a literatura recente, pode-se concluir que o excesso de colesterol leva a um aumento de secreção de proteínas relacionadas ao sistema imune, transporte de vesículas, remodelamento do citoesqueleto, citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo, o que contribui para que um microambiente pró-inflamatório seja formado, permitindo a progressão da aterosclerose. Este trabalho contribuiu para entendimento dos efeitos do excesso de colesterol e sua relação com a aterosclerose. Mais estudos precisam ser feitos para aprofundar o entendimento nos mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos observados e para verificar se a HDL é capaz de atenuá-los ou revertê-los.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature**, v.537, n.7620, p.347-55, 2016.

ANNEMA, W.; TIETGE, U.J. Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies. **Nutr Metab (Lond)**, v.9, n.1, p.25, 2012.

BAEZA, J. et al. Stoichiometry of site-specific lysine acetylation in an entire proteome. **J Biol Chem**, v.289, n.31, p.21326-38, 2014.

BARTER, P.J. et al. Antiinflammatory properties of HDL. **Circ Res**, v.95, n.8, p.764-72, 2004.

BASU, S.K. et al. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.73, n.9, p.3178-82, 1976.

BECKER, L. et al. A macrophage sterol-responsive network linked to atherogenesis. **Cell Metab**, v.11, n.2, p.125-35, 2010.

BENSINGER, S.J.; TONTONAZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature**, v.454, n.7203, p.470-7, 2008.

BINDEA, G. et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. **Bioinformatics**, v.25, n.8, p.1091-3, 2009.

BODEN, W.E. et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. **N Engl J Med**, v.365, n.24, p.2255-67, 2011.

BOGOMOLOVA, A.M. et al. Hypoxia as a Factor Involved in the Regulation of the apoA-1, ABCA1, and Complement C3 Gene Expression in Human Macrophages. **Biochemistry (Mosc)**, v.84, n.5, p.529-539, 2019.

CAMONT, L.; CHAPMAN, M.J.; KONTUSH, A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. **Trends Mol Med**, v.17, n.10, p.594-603, 2011.

CHEN, Y. et al. THP1 macrophages oxidized cholesterol, generating 7-derivative oxysterols specifically released by HDL. **Steroids**, v.99, n.Part B, p.212-8, 2015.

COLOGNA, S.M.; ROSENHOUSE-DANTSKER, A. Insights into the Molecular Mechanisms of Cholesterol Binding to the NPC1 and NPC2 Proteins. **Adv Exp Med Biol**, v.1135, p.139-160, 2019.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nat Biotechnol**, v.26, n.12, p.1367-72, 2008.

CUCHEL, M. et al. JCL roundtable: High-density lipoprotein function and reverse cholesterol transport. **J Clin Lipidol**, v.12, n.5, p.1086-1094, 2018.

DAVIDSON, W.S. HDL-C vs HDL-P: how changing one letter could make a difference in understanding the role of high-density lipoprotein in disease. **Clin Chem**, v.60, n.11, p.e1-3, 2014.

DE LA LLERA-MOYA, M. et al. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.30, n.4, p.796-801, 2010.

DENG, W. et al. Extracellular vesicles in atherosclerosis. **Clin Chim Acta**, v.495, p.109-117, 2019.

DI ANGELANTONIO, E. et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. **JAMA**, v.302, n.18, p.1993-2000, 2009.

EYVAZIAN, V.A.; FRISHMAN, W.H. Evacetrapib: Another CETP Inhibitor for Dyslipidemia With No Clinical Benefit. **Cardiol Rev**, v.25, n.2, p.43-52, 2017.

FROSTEGÅRD, J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. **BMC Med**, v.11, p.117, 2013.

GISTERÅ, A.; HANSSON, G.K. The immunology of atherosclerosis. **Nat Rev Nephrol**, v.13, n.6, p.368-380, 2017.

GORDON, T. et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. **Am J Med**, v.62, n.5, p.707-14, 1977.

GU, W. et al. ICAM-1 regulates macrophage polarization by suppressing MCP-1 expression via miR-124 upregulation. **Oncotarget**, v.8, n.67, p.111882-111901, 2017.

GUPTA, Y. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Secretion Is Induced by Ionizing Radiation and Oxidative Stress in Cancer Cells. **PLoS One**, v.11, n.1, p.e0146482, 2016.

HAIDAR, B. et al. Cathepsin D, a lysosomal protease, regulates ABCA1-mediated lipid efflux. **J Biol Chem**, v.281, n.52, p.39971-81, 2006.

HEINECKE, J. HDL and cardiovascular-disease risk--time for a new approach? **N Engl J Med**, v.364, n.2, p.170-1, 2011.

HEVONOJA, T. et al. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. **Biochim Biophys Acta**, v.1488, n.3, p.189-210, 2000.

HOEKSTRA, M. SR-BI as target in atherosclerosis and cardiovascular disease - A comprehensive appraisal of the cellular functions of SR-BI in physiology and disease. **Atherosclerosis**, v.258, p.153-161, 2017.

HOLMES, M.V. et al. Mendelian randomization of blood lipids for coronary heart disease. **Eur Heart J**, v.36, n.9, p.539-50, 2015.

HUNG, Y.C.; HONG, M.Y.; HUANG, G.S. Cholesterol loading augments oxidative stress in macrophages. **FEBS Lett**, v.580, n.3, p.849-61, 2006.

HUTCHINS, P.M.; HEINECKE, J.W. Cholesterol efflux capacity, macrophage reverse cholesterol transport and cardioprotective HDL. **Curr Opin Lipidol**, v.26, n.5, p.388-93, 2015.

KARATHANASIS, S.K. et al. The Changing Face of HDL and the Best Way to Measure It. **Clin Chem**, v.63, n.1, p.196-210, 2017.

- KELLNER-WEIBEL, G. et al. Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. **Biochemistry**, v.39, n.1, p.221-9, 2000.
- KENNEDY, M.A. et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. **Cell Metab**, v.1, n.2, p.121-31, 2005.
- KHERA, A.V. et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. **N Engl J Med**, v.364, n.2, p.127-35, 2011.
- KOBAYASHI, T. et al. Association between high cystatin C levels and carotid atherosclerosis. **World J Cardiol**, v.9, n.2, p.174-181, 2017.
- KORF-KLINGEBIEL, M. et al. Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. **Nat Med**, v.21, n.2, p.140-9, 2015.
- KRITHARIDES, L. et al. Cholesterol metabolism and efflux in human THP-1 macrophages. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.18, n.10, p.1589-99, 1998.
- KUPCOVA SKALNIKOVA, H. et al. Advances in Proteomic Techniques for Cytokine Analysis: Focus on Melanoma Research. **Int J Mol Sci**, v.18, n.12, 2017.
- LAM, M.P. et al. Cardiovascular proteomics in the era of big data: experimental and computational advances. **Clin Proteomics**, v.13, p.23, 2016.
- LEVITAN, I.; VOLKOV, S.; SUBBAIAH, P.V. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. **Antioxid Redox Signal**, v.13, n.1, p.39-75, 2010.
- LEY, K.; MILLER, Y.I.; HEDRICK, C.C. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.31, n.7, p.1506-16, 2011.
- LI, W. et al. Cathepsin L is significantly associated with apoptosis and plaque destabilization in human atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.202, n.1, p.92-102, 2009.
- LINTON, M.F. et al. SR-BI: A Multifunctional Receptor in Cholesterol Homeostasis and Atherosclerosis. **Trends Endocrinol Metab**, v.28, n.6, p.461-472, 2017.
- MALEKMOHAMMAD, K.; SEWELL, R.D.E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects. **Biomolecules**, v.9, n.8, 2019.
- MEISSNER, F.; MANN, M. Quantitative shotgun proteomics: considerations for a high-quality workflow in immunology. **Nat Immunol**, v.15, n.2, p.112-7, 2014.
- MENDEZ, A.J.; ORAM, J.F.; BIERMAN, E.L. Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. **J Biol Chem**, v.266, n.16, p.10104-11, 1991.
- NIU, C. et al. Macrophage Foam Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Adhesion. **J Am Heart Assoc**, v.5, n.10, 2016.
- ORAM, J.F. et al. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. **J Biol Chem**, v.275, n.44, p.34508-11, 2000.
- PHILLIPS, M.C. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. **J Biol Chem**, v.289, n.35, p.24020-9, 2014.
- PIETZSCH, J. et al. Very fast ultracentrifugation of serum lipoproteins: influence on lipoprotein separation and composition. **Biochim Biophys Acta**, v.1254, n.1, p.77-88, 1995.

RADER, D.J.; TALL, A.R. The not-so-simple HDL story: Is it time to revise the HDL cholesterol hypothesis? **Nat Med**, v.18, n.9, p.1344-6, 2012.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nat Protoc**, v.2, n.8, p.1896-906, 2007.

REARDON, C.A. et al. Obesity and Insulin Resistance Promote Atherosclerosis through an IFN γ -Regulated Macrophage Protein Network. **Cell Rep**, v.23, n.10, p.3021-3030, 2018.

RIBEIRO, A.L. et al. Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. **Circulation**, v.133, n.4, p.422-33, 2016.

ROHATGI, A. et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. **N Engl J Med**, v.371, n.25, p.2383-93, 2014.

RONSEIN, G.E.; VAISAR, T. Deepening our understanding of HDL proteome. **Expert Rev Proteomics**, 2019.

ROTHBLAT, G.H. et al. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. **J Lipid Res**, v.40, n.5, p.781-96, 1999.

SALEHEEN, D. et al. Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v.3, n.7, p.507-13, 2015.

SANKARANARAYANAN, S. et al. Importance of macrophage cholesterol content on the flux of cholesterol mass. **J Lipid Res**, v.51, n.11, p.3243-9, 2010.

SCHOBER, A.; BERNHAGEN, J.; WEBER, C. Chemokine-like functions of MIF in atherosclerosis. **J Mol Med (Berl)**, v.86, n.7, p.761-70, 2008.

SCHWARTZ, G.G. et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. **N Engl J Med**, v.367, n.22, p.2089-99, 2012.

SHAO, B.; HEINECKE, J.W. Quantifying HDL proteins by mass spectrometry: how many proteins are there and what are their functions? **Expert Rev Proteomics**, v.15, n.1, p.31-40, 2018.

SHEA, S. et al. Cholesterol Mass Efflux Capacity, Incident Cardiovascular Disease, and Progression of Carotid Plaque. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.39, n.1, p.89-96, 2019.

SHIBATA, N.; GLASS, C.K. Macrophages, oxysterols and atherosclerosis. **Circ J**, v.74, n.10, p.2045-51, 2010.

SPANO, A.; BARNI, S.; SCIOLA, L. PMA withdrawal in PMA-treated monocytic THP-1 cells and subsequent retinoic acid stimulation, modulate induction of apoptosis and appearance of dendritic cells. **Cell Prolif**, v.46, n.3, p.328-47, 2013.

SUN, Q.A.; RUNGE, M.S.; MADAMANCHI, N.R. Oxidative stress, NADPH oxidases, and arteries. **Hamostaseologie**, v.36, n.2, p.77-88, 2016.

SUZUKI, M. et al. Cholesterol accumulation regulates expression of macrophage proteins implicated in proteolysis and complement activation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.32, n.12, p.2910-8, 2012.

SUZUKI, M. et al. High-density lipoprotein suppresses the type I interferon response, a family of potent antiviral immunoregulators, in macrophages challenged with lipopolysaccharide. **Circulation**, v.122, n.19, p.1919-27, 2010.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Res**, v.47, n.D1, p.D607-D613, 2019.

TALL, A.R.; YVAN-CHARVET, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v.15, n.2, p.104-16, 2015.

TALL, A.R. et al. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. **Cell Metab**, v.7, n.5, p.365-75, 2008.

THEODOROU, K.; BOON, R.A. Endothelial Cell Metabolism in Atherosclerosis. **Front Cell Dev Biol**, v.6, p.82, 2018.

TYANOVA, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nat Methods**, v.13, n.9, p.731-40, 2016.

VOIGHT, B.F. et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. **Lancet**, v.380, n.9841, p.572-80, 2012.

WANG, M.D. et al. Different cellular traffic of LDL-cholesterol and acetylated LDL-cholesterol leads to distinct reverse cholesterol transport pathways. **J Lipid Res**, v.48, n.3, p.633-45, 2007.

WANG, Y. et al. Exosomes: An emerging factor in atherosclerosis. **Biomed Pharmacother**, v.115, p.108951, 2019.

WEI, Y. et al. Regulation of Csf1r and Bcl6 in macrophages mediates the stage-specific effects of microRNA-155 on atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.35, n.4, p.796-803, 2015.

WILLER, C.J. et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. **Nat Genet**, v.45, n.11, p.1274-1283, 2013.

WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **J Clin Invest**, v.88, n.6, p.1785-92, 1991.

YVAN-CHARVET, L.; WANG, N.; TALL, A.R. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.30, n.2, p.139-43, 2010.

YVAN-CHARVET, L. et al. Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. **Circulation**, v.118, n.18, p.1837-47, 2008.

ZANONI, P. et al. Endocytosis of lipoproteins. **Atherosclerosis**, v.275, p.273-295, 2018.

ZHAO, C.F.; HERRINGTON, D.M. The function of cathepsins B, D, and X in atherosclerosis. **Am J Cardiovasc Dis**, v.6, n.4, p.163-170, 2016.

7. ANEXOS

Anexo 1 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no secretoma de macrófagos carregados com AcLDL.

Tabela 1. Proteínas mais expressas no secretoma de células carregadas com AcLDL.

	Valor de p	Gene	Proteína ¹		Valor de p	Gene	Proteína ¹
1	1.5E-07	MYDGF	Q969H8	47	2.2E-05	CNBP	P62633
2	2.9E-07	CNPY3	Q9BT09	48	2.2E-05	GRB2	P62993
3	5.0E-07	HCLS1	P14317	49	2.3E-05	CDV3	Q9UKY7
4	6.2E-07	S100A11	P31949	50	2.3E-05	TPM4	P67936
5	7.5E-07	CSRP1	P21291	51	2.4E-05	DDT	P30046
6	1.5E-06	PFDN5	Q99471	52	2.6E-05	HSPA8	P11142
7	2.1E-06	MANF	P55145	53	2.8E-05	ASAH1	Q13510
8	2.4E-06	ZYX	Q15942	54	2.8E-05	PSAP	P07602
9	2.7E-06	LGALS1	P09382	55	2.9E-05	S100A4	P26447
10	2.7E-06	GLO1	Q04760	56	3.0E-05	PLAUR	Q03405
11	2.7E-06	GALM	Q96C23	57	3.1E-05	CTSH	P09668
12	3.0E-06	SERBP1	Q8NC51	58	3.2E-05	HSPE1	P61604
13	3.6E-06	AHNAK	Q09666	59	3.3E-05	GSR	P00390
14	3.9E-06	CLTB	P09497	60	3.3E-05	ENO1	P06733
15	4.0E-06	SF3B1	O75533	61	3.7E-05	MYL12A	P19105
16	4.0E-06	RCN1	Q15293	62	4.0E-05	CPPED1	Q9BRF8
17	4.4E-06	CAT	P04040	63	4.2E-05	TBCA	O75347
18	5.7E-06	SRP9	P49458	64	4.3E-05	RAD23B	P54727
19	6.5E-06	CALM3	P0DP25	65	4.7E-05	TKT	P29401
20	6.8E-06	LGALS9	O00182	66	4.7E-05	CFD	P00746
21	7.2E-06	PPIB	P23284	67	4.8E-05	LAMP1	P11279
22	7.7E-06	NUDT5	Q9UKK9	68	4.9E-05	GSS	P48637
23	7.9E-06	NENF	Q9UMX5	69	4.9E-05	DNASE2	O00115
24	8.1E-06	CIRBP	Q14011	70	5.4E-05	DCD	P81605
25	8.3E-06	PEBP1	P30086	71	5.8E-05	ARHGDIB	P52566
26	8.3E-06	DUT	P33316	72	6.0E-05	APOBR	Q0VD83
27	8.5E-06	TPM3	P06753	73	6.0E-05	HNRNPA2B1	P22626
28	8.5E-06	SH3BGRL3	Q9H299	74	6.2E-05	RPS27A	P62979
29	9.9E-06	PRDX1	Q06830	75	6.4E-05	CBX3	Q13185
30	1.1E-05	LSM8	O95777	76	6.4E-05	PDXK	O00764
31	1.2E-05	LGALS3	P17931	77	6.7E-05	RBMX	P38159
32	1.2E-05	SOD1	P00441	78	6.7E-05	DBI	P07108
33	1.2E-05	SH3BGRL	O75368	79	6.8E-05	GNPMB	Q14956
34	1.3E-05	NPC2	P61916	80	6.9E-05	RBBP4	Q09028
35	1.3E-05	LYZ	P61626	81	6.9E-05	ALCAM	Q13740
36	1.3E-05	ARHGDIA	P52565	82	7.3E-05	FUS	P35637
37	1.4E-05	CNPY2	Q9Y2B0	83	7.4E-05	MTDH	Q86UE4
38	1.4E-05	PPIA	P62937	84	7.6E-05	EWSR1	Q01844
39	1.5E-05	ERH	P84090	85	8.0E-05	NME1	P15531
40	1.6E-05	KHSRP	Q92945	86	9.2E-05	YWHAE	P62258
41	1.6E-05	TMPO	P42167	87	9.4E-05	TXNL1	O43396
42	1.7E-05	HDGF	P51858	88	1.0E-04	PTMA	P06454
43	1.8E-05	NUCB2	P80303	89	1.0E-04	BSG	P35613
44	1.8E-05	IGFBP7	Q16270	90	1.0E-04	TIMP2	P16035
45	2.0E-05	CLTA	P09496	91	1.1E-04	ECM1	Q16610
46	2.0E-05	PRDX6	P30041	92	1.1E-04	LASP1	Q14847

(continua)

	Valor de p	Gene	Proteína ¹		Valor de p	Gene	Proteína ¹
93	1.2E-04	NUCB1	Q02818	152	7.5E-04	IMPA1	P29218
94	1.2E-04	CTSL	P07711	153	7.6E-04	SF1	Q15637
95	1.3E-04	HMG1	P05114	154	8.1E-04	CTSD	P07339
96	1.3E-04	GRN	P28799	155	8.1E-04	SF3B2	Q13435
97	1.3E-04	PEPD	P12955	156	8.5E-04	HNRNPU	Q00839
98	1.4E-04	PRDX2	P32119	157	8.6E-04	EIF4B	P23588
99	1.4E-04	LAP3	P28838	158	8.9E-04	AK2	P54819
100	1.4E-04	EFHD2	Q96C19	159	9.5E-04	NEDD8	Q15843
101	1.4E-04	RNASET2	O00584	160	9.7E-04	SDF4	Q9BRK5
102	1.4E-04	TMSB4X	P62328	161	1.0E-03	GYG1	P46976
103	1.4E-04	IDI1	Q13907	162	1.1E-03	THRAP3	Q9Y2W1
104	1.5E-04	ALYREF	Q86V81	163	1.3E-03	PTGDS	P41222
105	1.5E-04	PRKCSH	P14314	164	1.3E-03	PDAP1	Q13442
106	1.6E-04	SIRPA	P78324	165	1.4E-03	FH	P07954
107	1.6E-04	RPLP2	P05387	166	1.4E-03	CADM1	Q9BY67
108	1.7E-04	TXN	P10599	167	1.5E-03	PPA1	Q15181
109	1.7E-04	FABP4	P15090	168	1.5E-03	CAPG	P40121
110	1.7E-04	CSF1R	P07333	169	1.6E-03	C1QBP	Q07021
111	1.8E-04	MDH2	P40926	170	1.7E-03	RPS12	P25398
112	1.8E-04	EIF4G1	Q04637	171	1.8E-03	MTPN	P58546
113	1.8E-04	MCM2	P49736	172	1.9E-03	HEBP2	Q9Y5Z4
114	1.9E-04	HNRNPK	P61978	173	1.9E-03	MAP4	P27816
115	2.0E-04	NME2	P22392	174	2.0E-03	GMFG	O60234
116	2.0E-04	CST3	P01034	175	2.0E-03	RBM8A	Q9Y5S9
117	2.0E-04	HSPA1B	P0DMV9	176	2.0E-03	SRGN	P10124
118	2.1E-04	HNRNPDL	O14979	177	2.0E-03	FABP5	Q01469
119	2.1E-04	EEF1B2	P24534	178	2.1E-03	PPIH	O43447
120	2.2E-04	TPI1	P60174	179	2.1E-03	STMN1	P16949
121	2.3E-04	ZC3HAV1	Q7Z2W4	180	2.2E-03	FKBP1A	P62942
122	2.4E-04	FKBP2	P26885	181	2.3E-03	APOC2	P02655
123	2.4E-04	MYL6	P60660	182	2.3E-03	LRG1	P02750
124	2.5E-04	SKP1	P63208	183	2.4E-03	BASP1	P80723
125	2.5E-04	CTSS	P25774	184	2.4E-03	TCEB2	Q15370
126	2.6E-04	MAGOH	P61326	185	2.5E-03	RPS21	P63220
127	2.7E-04	LAMP2	P13473	186	2.6E-03	GM2A	P17900
128	2.9E-04	PINLYP	A6NC86	187	2.6E-03	DDX21	Q9NR30
129	3.0E-04	RNASE2	P10153	188	2.8E-03	B2M	P61769
130	3.4E-04	EDF1	O60869	189	2.9E-03	RDX	P35241
131	3.4E-04	LSM2	Q9Y333	190	3.0E-03	SIAE	Q9HAT2
132	3.4E-04	RPS28	P62857	191	3.5E-03	IL1RN	P18510
133	3.4E-04	HPRT1	P00492	192	3.5E-03	PFDN4	Q9NQP4
134	3.6E-04	TPD52L2	O43399	193	3.7E-03	PYCARD	Q9ULZ3
135	4.1E-04	CYCS	P99999	194	3.8E-03	STIP1	P31948
136	4.2E-04	CALU	O43852	195	3.8E-03	MAN2B1	O00754
137	4.6E-04	PARK7	Q99497	196	3.9E-03	RHOC	P08134
138	4.7E-04	PGAM1	P18669	197	4.0E-03	CMPK1	P30085
139	5.0E-04	APLP2	Q06481	198	4.3E-03	CSTB	P04080
140	5.0E-04	EIF6	P56537	199	4.3E-03	TYROBP	O43914
141	5.4E-04	LMNB1	P20700	200	4.5E-03	PABPN1	Q86U42
142	5.5E-04	RNH1	P13489	201	4.6E-03	RANBP1	P43487
143	5.5E-04	BANF1	O75531	202	4.6E-03	CES1	P23141
144	5.6E-04	HNRNPUL1	Q9BUJ2	203	4.6E-03	DPYSL2	Q16555
145	5.6E-04	TIMP1	P01033	204	4.6E-03	LAIR1	Q6GTx8
146	6.0E-04	HMGA1	P17096	205	5.0E-03	UBAP2L	Q14157
147	6.8E-04	PPIF	P30405	206	5.0E-03	EIF4H	Q15056
148	7.0E-04	CTSB	P07858	207	5.8E-03	UBE2L3	P68036
149	7.0E-04	GNS	P15586	208	6.1E-03	BCLAF1	Q9NYF8
150	7.2E-04	SEC13	P55735	209	7.4E-03	SEPT11	Q9NVA2
151	7.5E-04	CTSZ	Q9UBR2	210	8.4E-03	RPE	Q96AT9

(continua)

	Valor de p	Gene	Proteína ¹		Valor de p	Gene	Proteína ¹
211	9.0E-03	AZU1	P20160	223	1.8E-02	CANX	P27824
212	1.0E-02	ERP44	Q9BS26	224	1.8E-02	SUMO3	P55854
213	1.0E-02	EZR	P15311	225	1.9E-02	NASP	P49321
214	1.0E-02	DBNL	Q9UJU6	226	2.0E-02	EIF5A	P63241
215	1.2E-02	PDCD5	O14737	227	2.2E-02	LMNA	P02545
216	1.2E-02	HN1	Q9UK76	228	2.5E-02	YBX1	P67809
217	1.3E-02	GAA	P10253	229	2.6E-02	CFL1	P23528
218	1.4E-02	PNPO	Q9NVS9	230	2.7E-02	MYCBP	Q99417
219	1.4E-02	RPS10	P46783	231	2.8E-02	GLUL	P15104
220	1.5E-02	ICAM1	P05362	232	2.8E-02	IGF2R	P11717
221	1.5E-02	PLD3	Q8IV08	233	3.1E-02	AIF1	P55008
222	1.6E-02	LRRFIP1	Q32MZ4				

¹ID da Proteína (Uniprot). Fonte: autoria própria.**Tabela 2.** Proteínas menos expressas no secretoma de células carregadas com AcLDL.

	Valor de p	Gene	Proteína ¹		Valor de p	Gene	Proteína ¹
1	2.2E-06	HIST2H3A	Q71DI3	42	1.6E-04	RPS13	P62277
2	2.7E-06	RPL12	P30050	43	1.6E-04	CCT6A	P40227
3	4.2E-06	CCT3	P49368	44	1.7E-04	PFN1	P07737
4	4.9E-06	RPS4X	P62701	45	1.7E-04	RPL5	P46777
5	8.7E-06	RPL14	P50914	46	1.8E-04	GAPDH	P04406
6	1.1E-05	ILF2	Q12905	47	1.9E-04	RNPEP	Q9H4A4
7	1.6E-05	PABPC1	P11940	48	2.0E-04	NPEPPS	P55786
8	1.7E-05	RPL13A	P40429	49	2.0E-04	PABPC4	Q13310
9	1.8E-05	HSPH1	Q92598	50	2.0E-04	G6PD	P11413
10	1.9E-05	RPS3A	P61247	51	2.1E-04	PARP1	P09874
11	2.2E-05	COL6A1	P12109	52	2.2E-04	PDIA3	P30101
12	2.4E-05	HIST1H2AJ	Q99878	53	2.3E-04	RPS16	P62249
13	2.4E-05	RPL30	P62888	54	2.5E-04	DPP7	Q9UHL4
14	2.4E-05	CCT8	P50990	55	2.5E-04	SERPINF1	P36955
15	2.7E-05	AGT	P01019	56	2.5E-04	ANPEP	P15144
16	3.3E-05	RPL8	P62917	57	2.5E-04	RPS2	P15880
17	3.8E-05	C3	P01024	58	2.6E-04	XRCC5	P13010
18	3.9E-05	PACSIN2	Q9UNF0	59	2.7E-04	RPL15	P61313
19	4.0E-05	RPS8	P62241	60	2.8E-04	HYOU1	Q9Y4L1
20	4.3E-05	ACLY	P53396	61	3.0E-04	HEXB	P07686
21	4.6E-05	RPS9	P46781	62	3.3E-04	KPNB1	Q14974
22	5.2E-05	ILF3	Q12906	63	3.3E-04	TGFBI	Q15582
23	5.2E-05	OLA1	Q9NTK5	64	3.4E-04	RPL18	Q07020
24	5.3E-05	ALDOC	P09972	65	3.5E-04	PRKDC	P78527
25	6.1E-05	SRSF2	Q01130	66	3.5E-04	ALDH9A1	P49189
26	6.5E-05	CORO1B	Q9BR76	67	3.6E-04	PDIA6	Q15084
27	6.5E-05	LTA4H	P09960	68	3.7E-04	RPL10A	P62906
28	7.1E-05	RPS6	P62753	69	3.7E-04	ALDOA	P04075
29	7.2E-05	AHCY	P23526	70	4.0E-04	HSP90AA1	P07900
30	8.4E-05	FASN	P49327	71	4.4E-04	HIST1H2BL	Q99880
31	1.0E-04	LDHA	P00338	72	4.7E-04	XRCC6	P12956
32	1.0E-04	VCL	P18206	73	4.8E-04	ATIC	P31939
33	1.0E-04	SSB	P05455	74	4.8E-04	CA2	P00918
34	1.1E-04	RPLP0	P05388	75	4.8E-04	ACTR2	P61160
35	1.1E-04	HIST1H4A	P62805	76	5.0E-04	PGD	P52209
36	1.2E-04	NAPRT	Q6XQN6	77	5.1E-04	PGLS	O95336
37	1.4E-04	RPL27A	P46776	78	5.4E-04	GNB2L1	P63244
38	1.5E-04	RPL27	P61353	79	5.6E-04	MYH9	P35579
39	1.5E-04	DYNC1H1	Q14204	80	6.2E-04	PPT1	P50897
40	1.5E-04	DHX9	Q08211	81	6.3E-04	TALDO1	P37837
41	1.6E-04	CCT4	P50991	82	6.4E-04	ARCN1	P48444

(continua)

	Valor de p	Gene	Proteína ¹		Valor de p	Gene	Proteína ¹
83	6.6E-04	RPL6	Q02878	142	2.3E-03	P4HB	P07237
84	6.8E-04	APEH	P13798	143	2.5E-03	IDH1	O75874
85	6.9E-04	H2AFV	Q71UI9	144	2.5E-03	MDH1	P40925
86	6.9E-04	CD81	P60033	145	2.6E-03	A2M	P01023
87	7.1E-04	GNB2	P62879	146	2.6E-03	RPS25	P62851
88	7.2E-04	DDB1	Q16531	147	2.7E-03	PPP2R1A	P30153
89	7.4E-04	FERMT3	Q86UX7	148	2.8E-03	RCC2	Q9P258
90	7.6E-04	ARPC4	P59998	149	2.8E-03	SAMHD1	Q9Y3Z3
91	7.6E-04	TLN1	Q9Y490	150	2.9E-03	EPRS	P07814
92	7.6E-04	ATP6V1A	P38606	151	2.9E-03	PNP	P00491
93	7.7E-04	DPP3	Q9NY33	152	3.0E-03	GDI2	P50395
94	8.1E-04	PDIA4	P13667	153	3.0E-03	HNRNPH1	P31943
95	8.2E-04	LCP1	P13796	154	3.1E-03	NCL	P19338
96	8.3E-04	CAP1	Q01518	155	3.2E-03	EEF1G	P26641
97	8.3E-04	CAPZA2	P47755	156	3.3E-03	COTL1	Q14019
98	8.5E-04	HSP90B1	P14625	157	3.3E-03	SNRNP70	P08621
99	8.8E-04	ARPC1B	O15143	158	3.4E-03	LGALS3BP	Q08380
100	9.0E-04	GSTO1	P78417	159	3.4E-03	AGRN	O00468
101	9.0E-04	COPG1	Q9Y678	160	3.5E-03	WARS	P23381
102	9.3E-04	COPB2	P35606	161	3.6E-03	ARPC3	O15145
103	9.5E-04	RPL7A	P62424	162	3.6E-03	PSMC4	P43686
104	1.0E-03	CCT7	Q99832	163	3.8E-03	RPS18	P62269
105	1.1E-03	EIF4A1	P60842	164	3.9E-03	RAN	P62826
106	1.1E-03	PLOD3	O60568	165	3.9E-03	TRIM28	Q13263
107	1.1E-03	ASS1	P00966	166	3.9E-03	HADH	Q16836
108	1.1E-03	ACTN4	O43707	167	3.9E-03	APBB1IP	Q7Z5R6
109	1.2E-03	CAPZB	P47756	168	4.1E-03	GANAB	Q14697
110	1.2E-03	EEF2	P13639	169	4.2E-03	SRSF1	Q07955
111	1.2E-03	FSCN1	Q16658	170	4.3E-03	NACA	Q13765
112	1.3E-03	SF3A1	Q15459	171	4.4E-03	HSPA4	P34932
113	1.3E-03	SNRPD2	P62316	172	4.6E-03	GPX1	P07203
114	1.4E-03	CCT2	P78371	173	4.7E-03	EEF1A1P5	Q5VTE0
115	1.4E-03	HSP90AB1	P08238	174	4.7E-03	IQGAP1	P46940
116	1.4E-03	NAP1L1	P55209	175	4.8E-03	PDCD6IP	Q8WUM4
117	1.4E-03	SF3B3	Q15393	176	5.0E-03	ARPC2	O15144
118	1.4E-03	CLTC	Q00610	177	5.1E-03	ACTR3	P61158
119	1.4E-03	CAPZA1	P52907	178	5.5E-03	RPL18A	Q02543
120	1.5E-03	PKM	P14618	179	5.6E-03	CCAR2	Q8N163
121	1.6E-03	PGK1	P00558	180	5.8E-03	ANP32B	Q92688
122	1.6E-03	RPS3	P23396	181	5.9E-03	YWHAG	P61981
123	1.7E-03	SRSF7	Q16629	182	6.0E-03	RPL13	P26373
124	1.7E-03	FDPS	P14324	183	6.0E-03	RALY	Q9UKM9
125	1.8E-03	PLEC	Q15149	184	6.2E-03	ACTA1	P68133
126	1.8E-03	GPI	P06744	185	6.2E-03	TSTA3	Q13630
127	1.8E-03	EMILIN2	Q9BXX0	186	6.4E-03	COPA	P53621
128	1.8E-03	RAP1A	P62834	187	6.5E-03	PPP2CA	P67775
129	1.9E-03	OTUB1	Q96FW1	188	7.0E-03	VCP	P55072
130	1.9E-03	IL4I1	Q96RQ9	189	7.0E-03	CCT5	P48643
131	1.9E-03	LDHB	P07195	190	7.4E-03	ANP32E	Q9BTT0
132	2.0E-03	ACTB	P60709	191	7.6E-03	RPL4	P36578
133	2.0E-03	RPL34	P49207	192	7.6E-03	UGP2	Q16851
134	2.0E-03	AKR1A1	P14550	193	8.0E-03	RPS24	P62847
135	2.0E-03	CTPS1	P17812	194	8.1E-03	PSME2	Q9UL46
136	2.1E-03	VASP	P50552	195	8.1E-03	QPRT	Q15274
137	2.1E-03	RPL28	P46779	196	8.2E-03	RPL3	P39023
138	2.1E-03	ACTN1	P12814	197	8.3E-03	DDX39B	Q13838
139	2.2E-03	PSMD11	O00231	198	8.4E-03	DARS	P14868
140	2.2E-03	EEF1D	P29692	199	8.8E-03	PSMC2	P35998
141	2.3E-03	WDR1	O75083	200	9.9E-03	YWHAH	Q04917

(continua)

	Valor de p	Gene	Proteína ¹		Valor de p	Gene	Proteína ¹
201	1.0E-02	ANXA2	P07355	213	1.7E-02	TCP1	P17987
202	1.2E-02	HSPA5	P11021	214	1.8E-02	SUB1	P53999
203	1.2E-02	HSPD1	P10809	215	1.9E-02	NUTF2	P61970
204	1.2E-02	PLEK	P08567	216	2.0E-02	PSMC1	P62191
205	1.3E-02	GSTP1	P09211	217	2.0E-02	PTGES3	Q15185
206	1.3E-02	SYNCRIP	O60506	218	2.2E-02	SND1	Q7KZF4
207	1.4E-02	ERAP1	Q9NZ08	219	2.3E-02	PGM2	Q96G03
208	1.4E-02	HNRNPC	P07910	220	2.4E-02	G3BP1	Q13283
209	1.4E-02	FAM49B	Q9NUQ9	221	2.5E-02	SPP1	P10451
210	1.5E-02	NPM1	P06748	222	2.6E-02	GARS	P41250
211	1.5E-02	PRMT1	Q99873	223	2.9E-02	APOE	P02649
212	1.5E-02	UBA1	P22314				

¹ID da Proteína (Uniprot). Fonte: autoria própria.

Douglas Ricardo de Souza Junior

Douglas Ricardo de Souza Junior, 02/09/2019

Graziella Ronsein

Graziella Eliza Ronsein, 02/09/2019