

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

**LUIZA HELENA DE GODOY SANTOS**

**INVESTIGANDO A INTERAÇÃO ENTRE A LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE  
(HDL) E CÉLULAS ENDOTELIAIS**

**São Paulo**

**2024**

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

**INVESTIGANDO A INTERAÇÃO ENTRE A LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE  
(HDL) E CÉLULAS ENDOTELIAIS**

**LUIZA HELENA DE GODOY SANTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia da  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de  
São Paulo

Orientadora: Professora Doutora Graziella Eliza Ronsein

**São Paulo**

**2024**

## SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS .....	5
RESUMO .....	6
RESUMO EM INGLÊS .....	7
1. INTRODUÇÃO .....	8
1.1 Inflamação e as proteínas de adesão .....	8
1.2. A HDL e o risco de Infecção .....	10
1.3. A HDL e a modulação da expressão de moléculas de adesão .....	11
2. OBJETIVOS .....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
3.1. Isolamento de lipoproteínas plasmáticas .....	14
3.2. Análise da qualidade do isolamento de HDL por ultracentrifugação	15
3.3. Quantificação de S1P por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) acoplada à espectrometria de massas (MS) .....	16
3.4. Cultura de células HUVEC primárias .....	17
3.5. Cultura de células HUVEC imortalizadas .....	17
3.6. Análise da presença de moléculas de adesão por imunodetecção utilizando-se a técnica de Western Blot .....	17
3.7. Análise da abundância de moléculas de adesão por imunodetecção utilizando-se a técnica de <i>In-Cell</i> Western .....	18
3.8. Preparo de amostras para análise por espectrometria de massas	19
3.9. Aquisição de dados por espectrometria de massas .....	20
3.10. Análise de dados de espectrometria de massas .....	21
3.11. Análises estatísticas utilizadas .....	21

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
4.1. Análise da HDL isolada por ultracentrifugação sequencial .....	22
4.1.1. Análise da qualidade do isolamento por eletroforese em gel .....	22
4.1.2. Quantificação de S1P .....	23
4.2. Resposta das células endoteliais ao estímulo inflamatório .....	24
4.2.1. Comparação dos modelos endoteliais através da análise qualitativa da expressão de moléculas de adesão .....	24
4.2.2. Efeito do estímulo por TNF $\alpha$ em células endoteliais primárias .....	25
4.2.2.1. Otimização da metodologia <i>In-Cell Western</i> .....	25
4.2.2.2. Efeito concentração-dependente do estímulo de TNF $\alpha$ na expressão de E-Selectina .....	27
4.2.2.3. Análise dos processos enriquecidos pela ativação com TNF $\alpha$ .....	27
4.3. Potencial papel protetivo do pré-tratamento com HDL em relação à expressão de E-Selectina em células endoteliais primárias .....	29
4.3.1. Análise por imunodetecção .....	29
4.3.2. Análise por espectrometria de massas .....	32
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
7. ANEXOS .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear <i>Kappa B</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-C	Colesterol de Lipoproteína de Alta Densidade
S1P	Esfingosina-1-Fosfato
S1P1	Receptor 1 de Esfingosina-1-Fosfato
APO M	Apolipoproteína M
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

## RESUMO

DE GODOY SANTOS, L. H., **Investigando a interação entre a lipoproteína de alta densidade (HDL) e as células endoteliais**, Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo

**Introdução:** A associação entre a HDL e eventos cardiovasculares está bem estabelecida, uma vez que esta lipoproteína participa de diversos processos relacionados ao metabolismo de lipídios e do transporte reverso do colesterol. Recentemente, um novo papel protetor relacionado às doenças infecciosas vem sendo atribuído a HDL. De fato, baixas concentrações de colesterol em HDL (HDL-C) determinadas geneticamente foram causalmente relacionadas a maiores chances de hospitalizações por doenças infecciosas. Este novo papel da HDL parece estar relacionado a apolipoproteína M, transportada na circulação pela HDL e que, por sua vez, é a principal chaperona carreadora do esfingolipídio bioativo esfingosina-1-fosfato (S1P). A interação da S1P com seus receptores celulares está relacionada com a diminuição da expressão de moléculas de adesão leucocitária em células endoteliais. As moléculas de adesão são fundamentais para a interação e migração de leucócitos circulantes para tecidos infectados. Embora esse processo seja extremamente relevante para resolução de infecções, sua exacerbação pode comprometer a homeostase do endotélio vascular. Desta forma, têm-se como objetivo deste trabalho de conclusão de curso investigar a interação da HDL com as células endoteliais.

**Materiais e métodos:** Moléculas de adesão leucocitária (E-Selectina e VCAM-1) foram quantificadas por imunofluorescência (*In-Cell Western*) e por proteômica baseada em espectrometria de massas em células endoteliais primárias (HUVEC) expostas a TNF $\alpha$ . O papel da HDL sob a expressão destas moléculas de adesão também foi avaliado. **Resultados e Discussões:** Através dos experimentos realizados, uma metodologia de alta processividade para detecção e quantificação de E-Selectina em um modelo celular robusto foi otimizada e conclui-se que a expressão da proteína é dependente da concentração da citocina TNF $\alpha$  de forma linear até 10 ng/mL. Além disso, a detecção de outras moléculas de adesão foi possibilitada utilizando-se proteômica baseada em espectrometria de massas. Em células em cultura, a expressão de E-Selectina e VCAM-1 é exclusiva do tratamento com a citocina e a expressão de ICAM-1, embora não exclusiva, é fortemente regulada positivamente na sua presença. Corroborando a literatura disponível, o tratamento com pools de HDL de indivíduos aparentemente saudáveis é capaz de reduzir a expressão de todas as moléculas de adesão estudadas. **Conclusão:** o pré-tratamento com HDL de indivíduos aparentemente saudáveis é capaz de causar diminuição da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, mecanismo que pode estar relacionado com a correlação inversa entre a taxa de hospitalização por doenças infecciosas e as concentrações de HDL-C circulante.

**Palavras-chave:** Lipoproteína de Alta Densidade, Inflamação, Células Endoteliais, Proteção

## ABSTRACT

DE GODOY SANTOS, L. H., **Investigando a interação entre a lipoproteína de alta densidade (HDL) e as células endoteliais**, Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo

**Introduction:** The association between High-Density Lipoprotein (HDL) and cardiovascular events is well established, once this lipoprotein is involved in a variety of processes related to lipid metabolism and reverse cholesterol transport. Recently, a new protective role has been attributed to HDL. Thus, a causal relationship between genetically determined low HDL cholesterol levels and higher risk of infectious diseases hospitalizations has been found. This new HDL role is believed to be related to one of HDL's apolipoproteins, the apolipoprotein M, which is the principal carrier chaperone of a bioactive sphingolipid, sphingosine-1-phosphate (S1P). The interaction between S1P with its receptor Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 regulates adhesion molecule expression, leading to less leukocyte adhesion. Adhesion molecules are fundamental to allow the migration of leukocytes to infected tissues, and, although this process is relevant for infection resolution, its exacerbation is detrimental for the organism. The purpose of this work is to investigate the interplay between HDL and endothelial cells expressing adhesion molecules. **Material and Methods:** Primary HUVEC endothelial cells were stimulated by TNF $\alpha$  and measured adhesion molecules by immunofluorescence assay (In-Cell Western) and by mass spectrometry-based proteomics. **Results and Discussion:** A new high throughput methodology aiming the detection of E-Selectin in a robust cellular model was optimized, with the expression of the protein being linearly dependent of the TNF $\alpha$  concentrations up to 10 ng/mL. The detection of other adhesion molecules was achieved through liquid chromatography coupled mass spectrometry. In culture primary HUVEC cells, the expression of E-Selectin and VCAM-1 is exclusive to TNF $\alpha$  treatment and, although not exclusive, the expression of ICAM-1 is strongly upregulated by this cytokine. In accordance with available literature, the treatment with HDL from apparently healthy subjects was capable of reducing the expression of all adhesion molecules of interest. **Conclusion:** the treatment with HDL from apparently healthy subjects is capable of reducing significantly the expression of adhesion molecules in endothelial cells, by a mechanism that may be related to the inverse correlation between the rate of hospitalization for infectious diseases and circulating HDL-C levels.

**Keywords:** High-Density Lipoprotein, Inflammation, Endothelial Cells, Protection

## INTRODUÇÃO

### 1.1. Inflamação e as proteínas de adesão

A adesão célula-célula é um componente fundamental para a organização de tecidos. No sistema imune, as moléculas de adesão estão amplamente presentes e desempenham papéis fisiológicos fundamentais, como permitir a maturação leucocitária através da migração entre órgãos de maturação e órgãos linfóides secundários e permitir uma patrulha eficiente contra agentes infecciosos e tecidos lesionados (Springer, 1994). No cenário inflamatório, a migração dos leucócitos da corrente sanguínea para tecidos específicos é um processo coordenado por diversos mediadores químicos e moléculas, que atuam conjuntamente para uma resposta imune efetiva e capaz de resolver os danos causados ao tecido e a infecção (Springer, 1994). As principais células capazes de migrar para tecidos infeccionados são leucócitos mieloides (como os neutrófilos e os monócitos) e linfócitos previamente ativados. O padrão de migração de cada leucócito, embora conte com geralmente as mesmas etapas, pode ser afetado pela velocidade de resposta a quimiocinas, expressão de moléculas de adesão e número de células circulantes.

As células endoteliais saudáveis são, junto com os leucócitos, protagonistas do processo de migração leucocitária, uma vez que se apresentam como a barreira celular responsável por separar os tecidos do sangue circulante. A interação dos leucócitos com o endotélio requer proteínas de membrana presentes tanto no endotélio quanto nos leucócitos e é fundamental para permitir a migração leucocitária. O endotélio saudável, na ausência de citocinas pró-inflamatórias, expressa poucas moléculas de adesão e, portanto, a migração leucocitária é diminuta; já em casos de lesão tecidual ou infecção, citocinas e quimiocinas liberadas por mastócitos, macrófagos residentes ou células dendríticas ativam as células endoteliais que são induzidas a expressar moléculas de adesão, como a *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1), a E-Selectina e a *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) e auxiliam, junto com as quimiocinas, no recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea para os sítios de inflamação. Uma vez que a expressão de tais moléculas de adesão é estímulo-dependente, em indivíduos saudáveis, a migração de leucócitos para tecidos ocorre apenas quando necessário (Abbas *et al.*, 2010).

O processo de migração pode ser dividido em etapas mais específicas, onde cada etapa apresenta moléculas de adesão protagonistas, sendo elas: (1) a produção de citocinas e ativação endotelial em sítios de inflamação, (2) a rolagem leucocitária, (3) a ativação de integrinas por quimiocinas, (4) a interação firme dos leucócitos mediadas por integrina e, por fim, (5) a diapedese pelo endotélio e migração para o tecido. A primeira etapa consiste na ativação de células endoteliais por citocinas, como o Fator de Necrose Tumoral Alfa (do inglês *Tumor Necrosis Factor Alpha*, *TNF $\alpha$* ) que, ao interagirem com seus receptores celulares, induzem uma série de mudanças morfológicas, geração de segundos mensageiros e fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B, que promovem a expressão de moléculas de adesão (Liu *et al.*, 2017). As moléculas E-Selectina e VCAM-1 são expressas apenas mediante a estímulo, enquanto a ICAM-1 é constitutivamente expressa, porém, é fortemente regulada positivamente na presença de citocinas.

Em seguida, a E-Selectina, expressa de 1 a 2 horas após o estímulo inflamatório, entra como molécula de destaque no processo, sendo responsável por ocasionar o rolamento dos leucócitos sobre a superfície endotelial. Os ligantes de E-Selectina presentes nos leucócitos são carboidratos complexos sialilados relacionados à família Lewis X ou Lewis A, que podem estar presentes em diversas glicoproteínas de leucócitos (Mcever, 2015). A interação da E-Selectina com seus ligantes é considerada fraca e pode ser facilmente quebrada pela força de cisalhamento da corrente sanguínea. Devido a esse caráter fraco, a interação entre as moléculas se faz e desfaz frequentemente, o que faz com que os leucócitos rolem sobre a camada endotelial, até que uma interação mais forte seja formada. Além da E-Selectina, a L-Selectina presente em leucócitos também interage com sialomucinas presentes no endotélio e também contribuem para o rolamento.

Durante o processo de rolamento, quimiocinas produzidas por células residentes do tecido estão concomitantemente sendo apresentadas aos leucócitos através da interação com proteoglicanos de heparan sulfato presentes na superfície endotelial (Middleton *et al.*, 2002). A ativação de receptores em leucócitos pelas quimiocinas apresentadas na superfície endotelial fazem com que ocorra a ativação de integrinas, que se tornam mais estendidas e, portanto, capazes de se ligar com maior afinidade aos seus ligantes endoteliais. Nessa etapa, as moléculas da superfamília das imunoglobulinas, VCAM-1 e ICAM-1, entram em destaque. O ligante

leucocitário da VCAM-1 é a integrina  $\alpha 4\beta 1$  ou *Very Late Antigen 4* (VLA-4), ao passo que os da ICAM-1 são as integrinas *Lymphocyte-function Associated Antigen 1* (LFA-1) e *Macrophage 1 Antigen* (MAC-1). A interação entre as proteínas de adesão endoteliais e as integrinas é responsável por fazer o sequestro dos leucócitos, uma vez que formam ligações mais estáveis e mais difíceis de serem rompidas (Vestweber, 2015).

Por fim, ocorre a diapedese pelo endotélio e migração para o tecido, onde os leucócitos atravessam as junções endoteliais e migram para o tecido infectado/danificado. Para que a diapedese seja possibilitada, devem haver alterações passageiras nas junções endoteliais, que serão desfeitas para permitir a migração (Muller, 2016).

## 1.2. A HDL e o risco de infecção

A correlação do conteúdo de colesterol (C) carregado pelas partículas de lipoproteína de alta densidade (do inglês *High-Density Lipoprotein*, HDL) com eventos cardiovasculares está bem descrita na literatura, uma vez que a partícula participa de diversos processos relacionados ao metabolismo de lipídios, incluindo o transporte reverso do colesterol (Feingold Kr, 2000; Tall *et al.*, 2008; Khera *et al.*, 2011; Björkegren e Lusis, 2022). Interessantemente, estudos clínicos também demonstraram que a concentração plasmática de HDL-C tem uma relação inversa com o risco de desenvolvimento de complicações hospitalares e com o desfecho de morte relacionadas à infecção. Além disso, estudos experimentais fornecem informações sobre o papel da HDL na inflamação.

Inicialmente, estudos com coortes menores mostraram que baixas concentrações plasmáticas de HDL-C estavam associadas ao desenvolvimento de infecções hospitalares pós-cirúrgicas (Delgado-Rodríguez *et al.*, 1997; Canturk *et al.*, 2002). Além disso, estudos em pacientes hospitalizados demonstraram a relação entre a HDL e o risco de desenvolvimento de infecções: um estudo demonstrou que um perfil inverso concentração-dependente de HDL-C foi relacionado à chance de desenvolvimento de sepse, onde uma diminuição de 1 mg/dL de HDL-C na circulação aumentava em 3% a chance de desenvolvimento de sepse severa (Grion *et al.*, 2010). Já um segundo estudo demonstrou a relação entre as concentrações de HDL-C e o

desenvolvimento de infecções hospitalares em pacientes pós infarto agudo do miocárdio, onde concentrações maiores que 38.5 mg/dL foram determinantes para o menor desenvolvimento de complicações hospitalares com sensibilidade e especificidade moderadas (Rodríguez-Sanz *et al.*, 2013).

Corroborando os trabalhos envolvendo coortes menores previamente citados, estudos recentes com coortes maiores demonstraram mais uma vez a relação de doenças infecciosas com a concentração de HDL-C. Um estudo prospectivo realizado com 97.166 pacientes demonstrou que, em um modelo ajustado para riscos multifatoriais, uma relação em U foi relatada entre a concentração de HDL-C e o risco de desenvolvimento de infecção, no qual concentrações baixas (< 31 mg/dL) ou altas (> 100 mg/dL) de HDL-C aumentavam em 75% e 43%, respectivamente, o risco relativo quando comparado com indivíduos com concentrações entre 85 e 95 mg/dL. O estudo também demonstrou que, em um modelo ajustado por idade e gênero, uma correlação inversa entre a concentração de HDL-C e o risco de infecções foi encontrado, onde indivíduos cujo a concentração era inferior a 39 mg/dL, o risco relativo de desenvolvimento de infecção era 24% maior quando comparado a indivíduos cujo a concentração era superior a 77 mg/dL (Madsen *et al.*, 2018).

Por fim, um estudo prospectivo realizado com 407.558 pacientes mostrou uma relação causal da concentração de HDL-C determinada geneticamente com o risco de necessidade de hospitalização causada por doenças infecciosas. O estudo demonstrou que o aumento de 1 mmol/L de HDL-C está relacionado com a diminuição em 38% da probabilidade de adquirir qualquer infecção. Adicionalmente, o score poligênico influenciando a concentração de HDL-C está associado com uma diminuição do risco de hospitalização por doenças infecciosas, onde um aumento de uma unidade de desvio padrão no score poligênico da HDL-C está relacionada a redução de 6% no risco de hospitalização por qualquer doença infecciosa, além de chances 10% menores de uso de qualquer antibiótico (o que estaria relacionado a episódios de infecção leve a moderada) (Trinder *et al.*, 2020).

### **1.3. A HDL e a modulação da expressão de moléculas de adesão**

Como discutido anteriormente em “Inflamação e as proteínas de adesão”, a expressão de moléculas de adesão e migração leucocitária é um processo importante

para a resolução de infecções e danos ao tecido. Porém, o aumento expressivo de moléculas de adesão causada por mediadores pró-inflamatórios circulantes e a ativação contínua do endotélio, como observado no cenário séptico, pode ocasionar a aderência e migração de leucócitos em tecidos não inflamados ou danificados, processo responsável por causar um dano inflamatório ao tecido saudável sem que haja de fato uma resposta contra um agente patológico (Ince *et al.*, 2016). A inflamação excessiva pode, inclusive, prejudicar a barreira endotelial, alterando seu fenótipo para disfuncional. Nota-se, portanto, a importância da manutenção da homeostase, onde a expressão de moléculas de adesão e migração leucocitária sejam funcionais para a resolução da infecção sem que haja dano aos tecidos saudáveis e prejuízo ao equilíbrio hemodinâmico (Parent e Eichacker, 1999).

Uma nova função da HDL parece envolver um papel regulador da manutenção da integridade endotelial relacionada à migração leucocitária através da modulação da expressão de moléculas de adesão no endotélio (Galvani *et al.*, 2015; Ruiz *et al.*, 2017) Existem uma variedade de populações de HDL plasmáticas, que se diferenciam na sua composição proteica e lipídica, bem como na quantidade de colesterol carregada (Davidson *et al.*, 2022). Uma pequena fração das partículas de HDL (~5%) carrega uma proteína pertencente à família das lipocalinas, a Apolipoproteína M (Apo M) que, por sua vez, possui uma estrutura que permite a ancoragem de um esfingolipídio bioativo, a Esfingosina-1-Fosfato (S1P). A maior parte de S1P plasmática é carregada pela Apo M da HDL (~65%), e uma parte minoritária é carregada pela albumina plasmática (~35%) (Christoffersen *et al.*, 2011).

O estudo de Galvani *et al.* demonstrou a importância da interação da S1P com seu receptor S1P1 em células endoteliais no contexto aterosclerótico e inflamatório. Observações *in-vivo* demonstraram que regiões curvas de vasos (que estão mais suscetíveis à formação de placas de aterosclerose, como a curvatura descendente da aorta) que estão submetidas à um fluxo hemodinâmico turbulento apresentavam maior presença das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 quando comparadas às regiões de vasos submetidas à fluxo laminar. A expressão dessas moléculas coincidiu com a menor abundância do Receptor 1 de Esfingosina-1-Fosfato (S1P1) na membrana plasmática e maior abundância em regiões intracelulares, indicando internalização do receptor após a sua ativação. Já no modelo *in-vitro*, os pesquisadores demonstraram que a incubação de células HUVEC (*Human Umbilical Cord Endothelial Cells*) com HDL carreadora de Apo M a partir de concentrações de

40 µg/mL foram capazes de diminuir a expressão de ICAM-1 após estímulo com TNF $\alpha$ , ao passo que HDL desprovida de Apo M, não. Corroborando com a diminuição de ICAM-1, demonstrou-se ainda que a incubação com HDL era responsável pela diminuição da fosforilação da subunidade p65 do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, portanto, diminuição de sua ativação.

Já o estudo de Ruiz *et al.* foi capaz de demonstrar o papel protetor da HDL em células HAEC (Human Aortic Endothelial Cells) primárias estimuladas com TNF $\alpha$ . Células tratadas com ApoM ligada à S1P possuem uma expressão menor de RNAm para ICAM-1, VCAM-1 e E-Selectina em relação às células apenas estimuladas com TNF $\alpha$ , indicando uma diminuição da transcrição dos genes codificadores para estas moléculas. Além disso, experimentos de citometria de fluxo realizados nas mesmas condições demonstraram que o tratamento com Apo M ligada à S1P, foi capaz de diminuir a abundância de E-Selectina e VCAM-1 na membrana plasmática, mas sem alterar a abundância de ICAM-1. Em concordância com o papel biológico destas moléculas no cenário inflamatório, o tratamento com Apo M ligada à S1P também foi capaz de diminuir a adesão leucocitária e aumentar a integridade da barreira endotelial em células estimuladas por TNF $\alpha$ .

Como a Apo M é carregada pela HDL no plasma, incubações com HDL total, HDL carreadora de Apo M e HDL desprovida de Apo M foram realizadas para averiguar se outro componente da HDL é capaz de diminuir as moléculas de adesão frente a um estímulo inflamatório. Em concordância com os resultados previamente obtidos, apenas as preparações que continham Apo M (HDL total e HDL carreadora de Apo M) foram capazes de causar diminuição significativa na abundância de moléculas de adesão. Os pesquisadores, por fim, demonstraram que o receptor protagonista na atuação anti-inflamatória da HDL é o S1P1 através da utilização de diversos inibidores farmacológicos seletivos para os receptores de S1P celulares expressos pelo modelo celular utilizado, onde apenas após a inibição do S1P1 não foi possível observar diminuição das moléculas de adesão.

## OBJETIVOS

Por meio deste Trabalho de Conclusão de Curso, busca-se investigar a relação das células endoteliais com a HDL. Como objetivos específicos, espera-se:

- 1) Comparar o modelo celular endotelial primário e imortalizado em relação a expressão de proteínas de adesão
- 2) Desenvolver metodologias analíticas capazes de detectar moléculas de adesão presentes em células endoteliais
- 3) Avaliar o potencial papel protetor do pré-tratamento com HDL em células endoteliais sob efeito de TNF $\alpha$

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Isolamento de Lipoproteínas Plasmáticas

Para o isolamento da HDL do plasma sanguíneo de indivíduos voluntários aparentemente saudáveis, soluções salinas foram preparadas com sal de brometo de potássio (Sigma Aldrich, #793604-500G) ou cloreto de sódio (Sigma Aldrich, #S9625-1KG) até a obtenção da densidade aproximada necessária e, então, as densidades foram finamente ajustadas com auxílio de um densímetro.

A coleta de sangue dos voluntários aparentemente saudáveis foi aprovada pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CAAE 60860016.5.0000.0067) e foi realizada em tubos contendo EDTA. O plasma sanguíneo foi separado das células sanguíneas por centrifugação (3.000 rpm, 15 minutos, 20 °C) e armazenado a – 80 °C até uso posterior. A HDL foi isolada a partir do plasma sanguíneo por meio de ultracentrifugação sequencial em tubos de policarbonato de 1 mL utilizando o rotor TLA 120.2 (Beckman Coulter). O método de ultracentrifugação sequencial consiste em duas etapas que visam sequencialmente (1) separar todas as lipoproteínas dos demais componentes plasmáticos e (2) separar a HDL das demais lipoproteínas (Silva *et al.*, 2020).

Para separar as lipoproteínas dos componentes plasmáticos (Silva *et al.*, 2020), assumiu-se a densidade do plasma como 1.006 g/cm<sup>3</sup> e ajustou-se para 1.21 g/cm<sup>3</sup> com solução de brometo de potássio ( $d = 1.3 \text{ g/cm}^3$ ) e, então, ultracentrifugou-se as amostras (120.000 rpm, 6 horas, 5 °C). Após o término da centrifugação, coletou-se 350 uL fração superior ( $d < 1.21 \text{ g/cm}^3$ ), correspondente a fração de lipoproteínas) com auxílio de uma seringa Hamilton.

Segundo, a densidade relativa das lipoproteínas foi calculada através da divisão da massa de 100 µL de solução pela massa de 100 µL de água. Obtida a medida, a densidade foi ajustada para 1.063 g/cm<sup>3</sup> com o volume necessário de solução de cloreto de sódio 1.006 g/cm<sup>3</sup> e uma segunda ultracentrifugação foi realizada (120.000 rpm, 2 horas, 5 °C). Após o término da segunda centrifugação, coletou-se 250 uL da fração inferior correspondente a HDL ( $d < 1.063 \text{ g/cm}^3$ ) com o auxílio de uma seringa Hamilton. Por fim, dialisou-se a amostra três vezes contra 150 vezes o volume de solução de HDL em tampão de fosfato de potássio/EDTA e uma última diálise foi realizada em tampão de fosfato de potássio/EDTA/Sacarose 2% para armazenamento da HDL à – 80°C até uso posterior. As amostras foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford.

### **3.2. Análise da qualidade do isolamento de HDL por ultracentrifugação sequencial**

Para análise da qualidade da HDL isolada por ultracentrifugação, realizou-se corridas eletroforéticas desnaturante (SDS-Page) e nativa. Para o gel SDS-Page, 10 ug de amostra foram preparadas em um tampão de amostra composto por Tris 1M (pH = 6.8), Glicerol, 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS,) Azul de Bromofenol e β-Mercaptoetanol; seguido a adição da massa de proteínas, as amostras foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos. Os géis utilizados foram um gel de poliacrilamida 12% para resolução e um gel de poliacrilamida 5% para empilhamento das amostras. A corrida eletroforética foi realizada no sistema eletroforético da Bio-Rad com aplicação de voltagem constante (200V), durante 1 hora, a temperatura ambiente.

Para realização da eletroforese em gel nativo, um gel comercial (Bio-Rad, #4561096) foi utilizado. Uma massa de 10 µg de amostra foram carregadas junto com um tampão de amostra contendo 62.25 mM de Tris-HCL, 40% de glicerol e 0.01% de azul de bromofenol. O tampão de corrida utilizado continha 50 mM de Tris-HCl e 384 mM de Glicina. A corrida eletroforética foi realizada em voltagem constante (50V), durante 16 horas, a 4°C.

Por fim, para coloração dos géis, utilizou-se uma solução de Comassie. 0.1% em 50% de Metanol e 10% de Ácido Acético durante 60 minutos, sob leve agitação.

Para a descoloração dos géis, utilizou-se uma solução contendo 50% de Metanol e 10% de Ácido Acético até que as bandas das proteínas estivessem visíveis em relação ao *background*. Os géis foram hidratados com água durante 2 horas e a fluorescência emitida pelo Comassie foi lida no equipamento Odyssey DLx, através do software Li-Cor Acquisition (Versão 1.2).

### **3.3 Quantificação de S1P por cromatografia líquida de Alta Pressão (HPLC) acoplada à espectrometria de massas (MS)**

Para quantificação de S1P nas amostras de HDL previamente isoladas, um protocolo de extração foi utilizado (Ieronimakis *et al.*, 2013). Para isso, 5 µL de padrão interno de S1P-C17 (3 µM, Avanti, #860641-P-1mg) foram adicionados em 15 µg de HDL (15 µg de proteínas em partículas de HDL) e agitado vigorosamente num shaker orbital. Então, 50 µL de tampão citrato de sódio 30 mM (Sigma Aldrich, #S4641)/fosfato de sódio dibásico 40 mM (Sigma Aldrich, #S0876-500G) e 275 µL de 1-butanol (Sigma Aldrich, #281549-1L) foram adicionados nas amostras. Seguiu-se para extração em shaker orbital (10 minutos, 1400 rpm, 20 °C). Após o fim da extração, 220 µL da camada de butanol foram retirados, transferidos para um novo tubo e secas. Para quantificação no sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (HPLC/MS), as amostras foram ressuspensas em 125 µL de solução Metanol 50% e 0.1% de Ácido Fórmico filtrada e degaseificada.

Uma curva padrão de S1P foi preparada adicionando volumes necessários de S1P e um volume fixo de padrão interno S1P-C17. No total, 9 pontos foram preparados, correspondendo as concentrações de 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 2.5 e 1 fmol/µL. A curva foi injetada (10 µL/ponto, em triplicata) em sistema de cromatografia líquida Shimadzu acoplado à detector do tipo QTRAP 4000 utilizando uma coluna cromatográfica C18 (Phenomenex, Luna 2.5 µm C18(2)-HST 100<sup>a</sup> 100 × 2 mm) com fluxo de 0.25 mL/min. O ponto de menor concentração foi o primeiro a ser injetado, seguido das concentrações crescentes. A aquisição foi feita no modo SRM (*Selected Reaction Monitoring*) e as transições monitoradas foram: 380.3/264.3 e 380.3/81.9 para S1P endógena e 366.2/93.0, 366.2/82.0 e 366.2/250.3 para o padrão interno S1P-C17. A quantificação de S1P foi realizada utilizando o fragmento de maior intensidade (m/z 264.3), integrando a área sob a curva.

### **3.4. Cultura de células HUVEC primárias**

Para os experimentos com o modelo primário, um pool de células HUVEC primárias (Lonza Bioscience, #C2519A) foram cultivadas em meio EBM-2 suplementado com kit EGM-2 (Lonza Bioscience, #CC-3156 e #CC-4176) entre as passagens 1 e 7. Para repique, as células foram lavadas com HEPES 25 mM (37°C) e 2.5 mL de solução de Tripsina/EDTA (Lonza Bioscience, #CC-5012) foram adicionados; as células foram incubadas por 2 a 3 minutos (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) e 5 mL de solução neutralizadora de tripsina (Lonza Bioscience, #CC-5002) foram adicionados. As células foram então coletadas e centrifugadas (1500 rpm, 7 minutos, 10 °C) e o *pellet* foi ressuspensionado em 2 mL de meio. As células foram contadas pelo método de exclusão de azul de tripan com auxílio da câmara de Neubauer ou com auxílio do contador de células (Thermo Fisher Scientific, Countess™ 3 Automated Cell Counter) e a densidade desejada de células foi plaqueada em nova garrafa ou placa.

### **3.5. Cultura de células HUVEC imortalizadas**

Para os experimentos com o modelo imortalizado, um pool de células HUVEC (ATCC, #CRL-1730) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Vitrocell, #00080) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (#COD), 1% de Penicilina/Estreptomicina (Santa Cruz Biotechnology, #sc-3690), 1 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, #P5280) e 10 mM de HEPES (Sigma-Aldrich, #H3375) entre as passagens 13 e 20. Para repique, as células foram lavadas com HEPES 25 mM (37°C) e 5 mL de solução de Tripsina/EDTA (Lonza Bioscience, #CC-5012) foram adicionados; as células foram incubadas por 5 minutos (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) e 5 mL de meio de cultura foram adicionados para neutralização da tripsina. As células foram então coletadas e centrifugadas (1500 rpm, 10 minutos, 20 °C) e o *pellet* foi ressuspensionado em 2 mL de meio. As células foram contadas de forma análoga ao modelo primário.

### **3.6. Análise da presença de moléculas de adesão por imunodetecção utilizando-se a técnica de Western Blot**

O ensaio para análise qualitativa da presença de moléculas de adesão nas duas linhagens de células endoteliais utilizadas foi o Western Blot. Para isso, as

amostras foram reduzidas com  $\beta$ -mercaptoetanol e carregadas em um gel de poliacrilamida 10% e uma corrida eletroforética foi realizada até que a frente de corrida atingisse a extremidade inferior do gel, de forma análoga ao descrito em “Análise da Qualidade do isolamento de HDL por ultracentrifugação sequencial”. Então, o conteúdo do gel foi transferido para membranas de PVDF (16 horas, 4 °C, 90 mA constante) em um sistema úmido contendo tampão de transferência contendo 20% de metanol. As membranas foram então lavadas com TBS, bloqueadas com solução 5% de leite sem gordura e incubadas com o anticorpo primário anti-E-Selectina (Santa Cruz Biotechnology, #sc-544698, 0.1  $\mu$ g/mL), anti-VCAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, #sc-13160, 0.1  $\mu$ g/mL) ou anti-ICAM-1 (Abcam, #ab109361, 0.1  $\mu$ g/mL) humana (16 horas, 4 °C, sob agitação). A detecção da proteína  $\alpha$ -Tubulina (Abcam, #ab52866) foi utilizada como normalizador de carregamento de amostras no gel. Então, as amostras foram lavadas com solução de TBS-T 0.05% e incubadas com anticorpo secundário anti-rato (KPL, #04-18-06, 0.001  $\mu$ g/mL) ou anti-coelho (KPL, #04-15-16, 0.001  $\mu$ g/mL) conjugados com HRP. Por fim, as amostras foram incubadas brevemente com kit revelador contendo luminol (Thermo Fisher Scientific, #A38555) e a quimioluminescência emitida foi lida com auxílio do equipamento ChemiDoc™ MP (BioRad, versão 2.4.0.03).

### **3.7. Análise da abundância de moléculas de adesão por imunodetecção utilizando-se a técnica de *In-Cell Western***

A detecção e quantificação das proteínas de adesão em células endoteliais foi realizada através da técnica de *In-Cell Western* com detecção no infravermelho. Para tal, células endoteliais foram plaqueadas em placas de 96 poços pretas de fundo transparente e mantidas em cultura até 90-95% de confluência atingida. Em seguida, as células foram colocadas em condição de privação de soro fetal bovino, mas mantidas com os demais suplementos contidos no kit EGM-2 (16 horas, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). As células foram então pré-tratadas com HDL previamente isolada (2h, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) e estimuladas com TNF $\alpha$  (Sigma-Aldrich, #T6674, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).

Após o estímulo, as células foram fixadas com metanol a – 20 °C (10 minutos, 4°C), lavadas com PBS e as ligações inespecíficas foram bloqueadas através da incubação com solução bloqueadora (100 uL por poço, Li-Cor Intercept Blocking Buffer

(PBS), #927-70001, 1.5 horas, temperatura ambiente, sob agitação). Então, seguiu-se para incubação com os anticorpos primários de camundongo anti-E-Selectina (Santa Cruz Biotechnology, #sc-544698) e anti-VCAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, #sc-13160) humanas (50 µL por poço, 20 horas, 4 °C, sob agitação); após a incubação, os poços foram lavados com PBS-T 0.1% (5 minutos, temperatura ambiente, sob agitação). Por fim, os poços foram incubados com anticorpo secundário anti-camundongo IRDye 800CW (Li-Cor Bioscience, #926-32210, 1 µg/mL) e normalizador CellTag 700 stain (Li-Cor Biosciences, #926-41090, 1 µg/mL) fluorescentes (50 µL por poço, 1.5 horas, temperatura ambiente, sob agitação), lavados com PBS-T 0.1% e destinados para leitura da fluorescência emitida em 800 e 700 nm. A quantificação bruta dos pixels foi realizada pelo *software* Li-Cor Acquisition (Versão 1.2) e os dados obtidos foram tratados pelo *software* Empiria Studio (Versão 3.0).

### **3.8. Preparo de amostras para análise por espectrometria de massas**

Para a análise das amostras por espectrometria de massas, células HUVEC primárias ou imortalizadas foram plaqueadas em placas de 6 poços e mantidas em cultura até 95% de confluência. O pré-tratamento com solução de HDL de indivíduos aparentemente saudáveis e o estímulo com TNF $\alpha$  foi realizado de forma análoga ao descrito em “Análise da abundância de moléculas de adesão por imunofluorescência”. A lise das células foi realizada através da raspagem das células dos poços utilizando um tampão contendo 1% de SDS em bicarbonato de amônio 100 mM.

Para o preparo de amostras para análise por espectrometria de massas, o método de digestão *Filter Assisted Sample Preparation* (FASP) foi utilizado (Gomes et al., 2024). As proteínas contidas no lisado total foram quantificadas pelo método de reação com ácido bicinconílico (BCA) e alíquotas contendo 10 µg de proteínas foram separadas para digestão.

A solução de proteínas foi adicionada em filtros de 10 kDa (EMD Millipore, #UFC901096) previamente passivados com solução de Tween-20 0.1%. As amostras foram lavadas quatro vezes pela adição de solução de Ureia 8 M (14.000 g, 20 minutos, 20 °C), reduzidas pela adição de ditiotreitol 10 mM (DTT, Bio-Rad, # 1610611, 30 minutos, 37 °C, 600 rpm) e alquiladas com Iodoacetamida 20 mM (IAA, Bio-Rad,

#1632109, 40 minutos, temperatura ambiente, 600 rpm). Ao final da alquilação, as amostras foram lavadas com bicarbonato de amônio 25 mM (14.000 g, 20 minutos, 20 °C) para retirada dos remanescentes de DTT e IAA. Ao fim, adicionou-se mais uma vez a solução de Ambic 25 mM e centrifugou-se (14.000 g, 2 minutos, 20 °C) até que um volume de cerca de 200 uL ficasse retido nos filtros. Neste volume, adicionou-se volume de solução de Tripsina 0.1 ug/mL em ácido acético 1 mM para proporção 1:25 tripsina:proteínas (m/m) e incubou-se (16 horas, 37 °C, 100 rpm) para clivagem das proteínas em peptídeos.

Em seguida, os peptídeos foram eluídos por centrifugação (14.000 g, 25 minutos, 20 °C) e secos em speedvac. Ao fim, foram ressuspensos em ácido fórmico 0.1% para concentração final de 0.1 µg/mL de peptídeos.

### **3.9. Aquisição de dados por proteômica baseada em espectrometria de massas**

Para a análise por espectrometria de massas, o sistema nano-LC Easy nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a detector do tipo Orbitrap Fusion Lumos com fonte de ionização *nanospray Flex NG* (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado. Um gradiente linear de solvente A (0.1% de Ácido Fórmico) e de solvente B (80% de Acetonitrila em 0.1% de Ácido Fórmico) foi utilizado para separação dos peptídeos.

Cada amostra previamente digerida foi carregada numa coluna do tipo trap (Acclaim PepMap 100, C18, 3 µm, 75 µm × 2 cm, nanoViper, Thermo Fisher Scientific) e lavadas com 20 uL de solvente A utilizando uma pressão constante de 500 bar. Em seguida, os peptídeos foram eluidos em uma coluna C18 (Acclaim PepMap RSLC, C18, 2 µm, 75 µm × 15 cm, nanoViper, Thermo Fisher Scientific) sob um fluxo de 300 nL/minuto. Os peptídeos foram então eluídos da coluna usando um gradiente linear de 5-28% de B (80 minutos de corrida) seguido de um gradiente linear de 28-40% de B (10 minutos de corrida). Por fim, a porcentagem de solvente B foi aumentada para 95% em 2 minutos e a coluna foi lavada (12 minutos). Ao fim de cada corrida, o sistema foi reequilibrado com 100% de fase A antes de uma nova injeção.

As amostras foram analisadas utilizando o Orbitrap Fusion Lumos operando no modo ESI positivo com temperatura do capilar à 300°C. Para as amostras corridas em modo de aquisição dependente de dados (*Data Dependent Analysis*, DDA), um espectro MS1 (resolução de 120.000 a *m/z* 200) foi seguido de um espectro de MS2

(resolução de 30.000 a  $m/z$  200, tempo de enchimento máximo do Trap de 54 ms, janela de isolamento de 1.2  $m/z$ ) em um ciclo de 3 segundos. Os íons precursores foram fragmentados por HCD com energia de colisão normalizada de 30 e os uma vez selecionados para MS2 foram excluídos para nova fragmentação MS2 por 40 segundos.

### **3.10. Análise dos dados de proteômica baseada em espectrometria de massas**

Os dados brutos obtidos foram comparados com o banco de dados de proteínas humanas (UniProt, 20428 entradas revisadas, baixado em 09/01/2024) através do software MaxQuant, onde os peptídeos encontrados na amostra foram comparados com um banco de dados com digestão *in-silico* (Cox et al., 2011). Para identificação, um mínimo de dois peptídeos, sendo um deles único da proteína, foi estabelecido como critério e a tripsina foi utilizada como enzima utilizada para digestão, onde até duas clivagens perdidas foram toleradas. Além disso, a modificação fixa da carbamidometilação das cisteínas e as modificações variáveis da oxidação da metionina e acetilação *N*-terminal dos peptídeos foram definidas. O algoritmo de *Label-Free Quantification* (LFQ) foi utilizado para realizar a quantificação da abundância relativa das amostras, e o algoritmo de *Match Between Runs* (MBR) foi utilizado para auxiliar nas quantificações. Os dados foram tratados com auxílio de softwares para análise estatística e de geração de gráficos, como o Perseus, R, gProfiler, GraphPad e Excel (Tyanova e Cox, 2018).

### **3.11. Análises estatísticas utilizadas**

Os dados obtidos nos experimentos de *In-Cell Western* foram comparados por teste T de Student não pareado com significância de 95%. Os dados obtidos por proteômica baseada em espectrometria de massas foram analisados inicialmente por teste T de Student não pareado e os p-valores foram ajustados pelo método *Permutation-Based FDR* com significância de 95%, pois múltiplas comparações foram realizadas entre todas as proteínas das amostras. Seguindo a hipótese pré-especificada, para as moléculas de adesão identificadas por proteômica, os dados

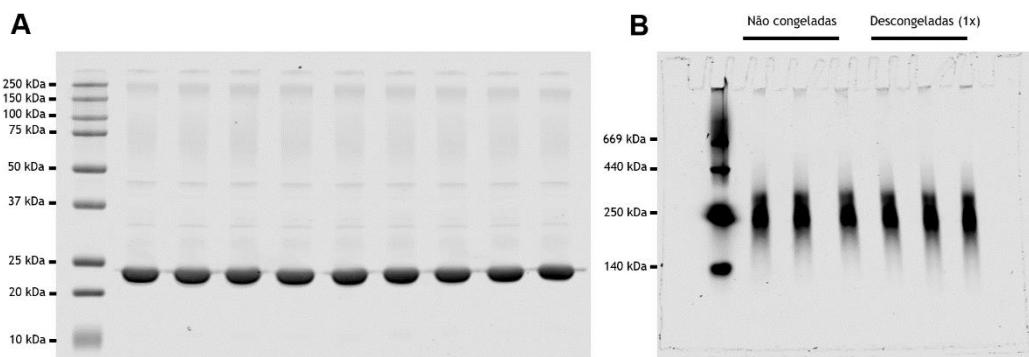
obtidos foram comparados entre os grupos apenas tratado com TNF $\alpha$  e tratado com HDL + TNF $\alpha$  através do teste T de Student não pareado com significância de 95%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise da HDL isolada por ultracentrifugação sequencial

#### 4.1.1. Análise da qualidade do isolamento por eletroforese

Para verificar o sucesso do isolamento da HDL de outros componentes e lipoproteínas plasmáticas, corridas eletoforéticas em gel desnaturante e em gel nativo foram realizadas (Figura 1).



**Figura 1.** Géis eletroforéticos de 10  $\mu$ g de HDL isolada por ultracentrifugação sequencial. (A) Gel desnaturante (SDS-PAGE). Todas as replicatas são técnicas e referem-se à um mesmo pool de HDL. (B) Gel nativo de amostras não congeladas ou congeladas e descongeladas uma vez. As replicatas de cada condição são técnicas e referem-se à um mesmo pool de HDL.

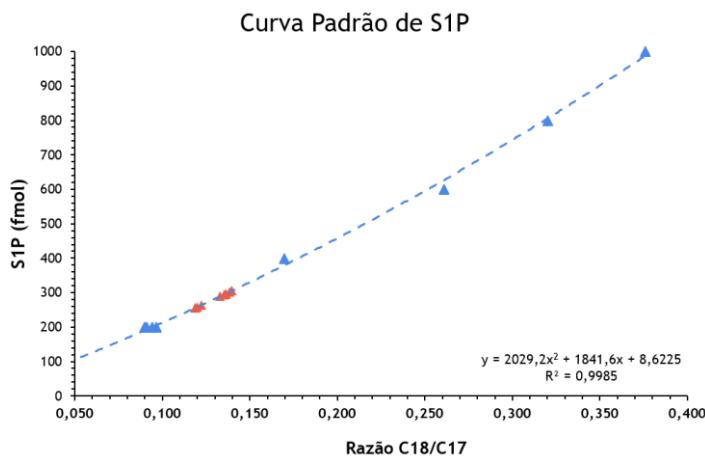
Através do gel desnaturante, pode-se notar uma banda proeminente na região dos 25 kDa. Essa banda é referente à Apolipoproteína 1 (Apo A1), principal componente da proteíco HDL. Nota-se a ausência de banda proeminente na região compreendida entre 75 e 50 kDa, característica de uma das principais proteínas plasmáticas, a albumina (~66.5 kDa). Por fim, nota-se também a ausência de uma banda proeminente de alto peso molecular (~500 kDa), que ficaria presa no início do gel e é eferente a Apolipoproteína B (Apo B), principal proteína da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL).

Através do gel nativo, pode-se notar que a HDL se mantém na estrutura nativa tanto em amostras não congeladas quanto em amostras que passaram por um ciclo

de congelamento a -80 °C/descongelamento. Com isso, conclui-se que a HDL isolada não possui contaminação significativa com outras proteínas plasmáticas ou lipoproteínas e se mantém na sua estrutura nativa após o processo de armazenamento, mantendo-se viável para a utilização em ensaios biológicos.

#### 4.1.2. Quantificação de S1P

Após da análise qualitativa da qualidade da HDL isolada por ultracentrifugação, a quantificação de S1P, esfingolipídio carreado pela Apo M e tido como responsável pela atividade anti-inflamatória da HDL frente à células endoteliais, foi realizada utilizando um sistema de HPLC acoplada a um espectrômetro de massas do tipo QTRAP 4000 (Figura 2).



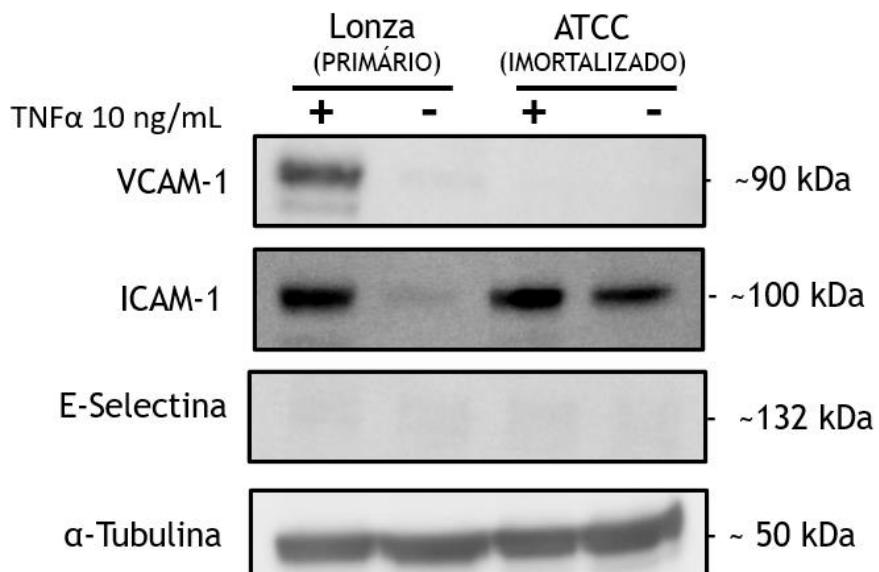
**Figura 2.** Quantificação de S1P em HDL isolada por ultracentrifugação. Os pontos em azul correspondem à curva de calibração realizada com o Padrão de S1P. Os pontos em vermelho correspondem à replicatas do pool de HDL ( $n = 9$ ).

Através deste experimento, conclui-se que a HDL isolada de indivíduos aparentemente saudáveis carrega S1P. A foi realizada utilizando-se o método de SRM conforme descrito na metodologia. Os valores encontrados foram corrigidos pela intensidade de S1P-C17 (padrão interno), pela quantidade de massa da qual a S1P foi extraída (15 µg) e pelo volume utilizado após extração (220 µL de 275 µL). A razão C18/C17 encontrada nas amostras foi de  $0,131 \pm 0,008$ . Após as correções, têm-se que a concentração de S1P de indivíduos aparentemente saudáveis é de  $309,33 \pm 20,19$  fmol de S1P/µg de proteínas de HDL.

## 4.2. Resposta das células endoteliais ao estímulo inflamatório

### 4.2.1. Comparação dos modelos endoteliais através da análise qualitativa da expressão das moléculas de adesão

Os modelos endoteliais primários e imortalizados foram comparados em relação à expressão de moléculas de adesão após o tratamento com TNF $\alpha$  10 ng/mL, utilizando-se a técnica de Western Blot com anticorpos específicos para cada proteína, conforme descrito em materiais e métodos (Figura 3).



**Figura 3.** Bandas de quimioluminescência para as proteínas de interesse: VCAM-1, ICAM-1 e E-Selectina extraídas dos modelos celulares primário e imortalizado. A  $\alpha$ -Tubulina foi utilizada como proteína controle de carregamento de amostras.

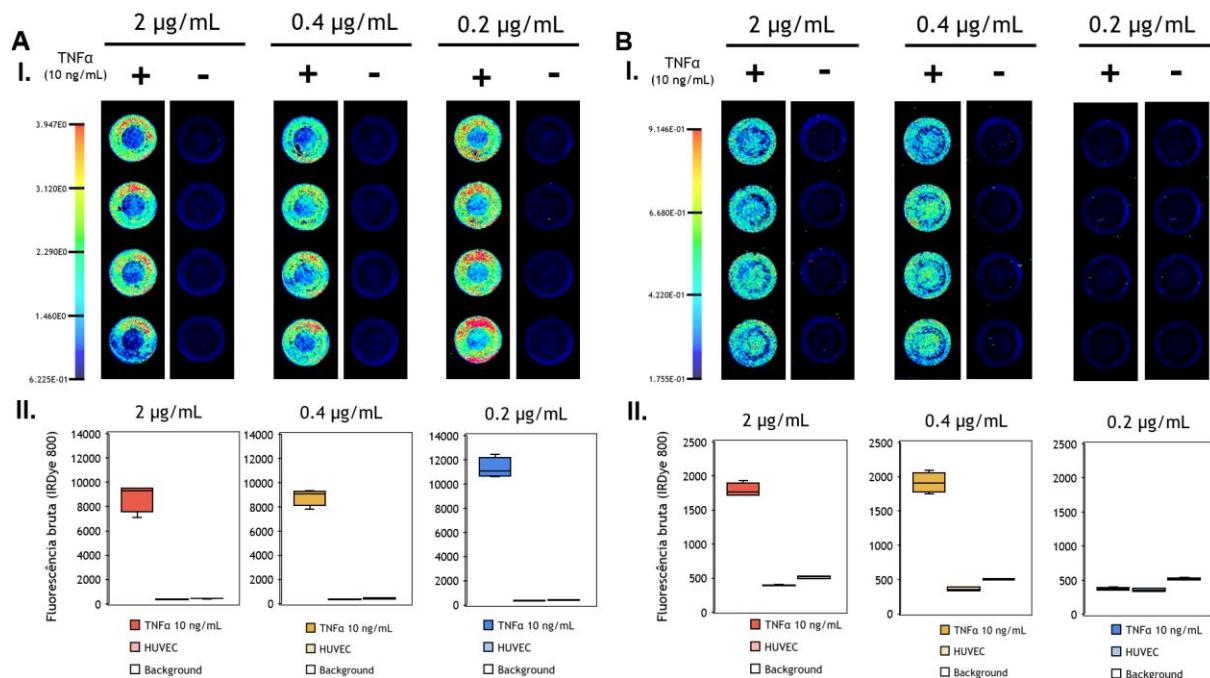
Nota-se por meio deste experimento que apenas o modelo endotelial primário é capaz de expressar VCAM-1 quando estimulado com TNF $\alpha$ . Embora ambos os modelos expressem ICAM-1, a expressão é mais significativa no modelo primário quando comparado ao modelo imortalizado. Não foi possível detectar quimioluminescência para E-Selectina para células tratadas com TNF $\alpha$  em nenhum dos modelos, porém, a detecção foi possibilitada por fluorescência no modelo primário (por *In-Cell Western*, descrito em “Otimização da metodologia de *In-Cell Western*” com maior detalhe). Desta forma, por apresentar maior robustez na investigação da expressão de moléculas de adesão no cenário inflamatório, visto que a adesão e

migração leucocitária depende das três moléculas de adesão, o modelo primário foi selecionado para continuidade dos experimentos.

#### 4.2.2 Efeito do estímulo com TNF $\alpha$ em células endoteliais primárias

##### 4.2.2.1 Otimização da metodologia de *In-Cell Western*

Conhecendo-se que apenas células primárias estimuladas com TNF $\alpha$  expressam VCAM-1, a otimização da metodologia de *In-Cell Western* foi realizada para permitir a realização de ensaios com amostras biológicas. Durante a otimização, três concentrações de anticorpo primário contra a molécula de interesse foram utilizadas (2, 0.4 ou 0.2  $\mu$ g/mL) e dois métodos de fixação (Metanol a -20°C ou Paraformaldeído (PFA) 4%) foram utilizados; para os poços fixados com PFA 4%, a permeabilização posterior foi realizada com Triton-X 0.05%. A fluorescência bruta do anticorpo secundário IRDye 800 foi comparada para avaliar a melhor relação entre emissão de sinal decorrente da presença das moléculas e *background* (Figura 4 e 5, respectivamente para E-Selectina e VCAM-1).

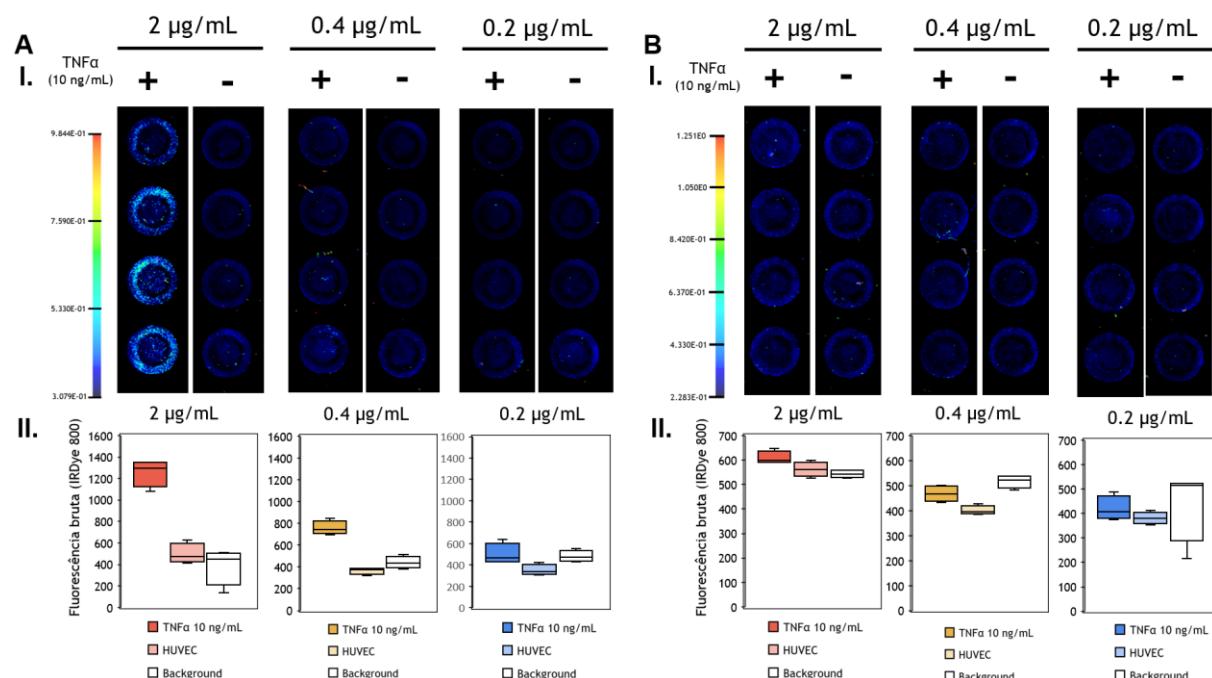


**Figura 4.** Otimização da metodologia de *In-Cell Western* para detecção de E-Selectina em células endoteliais primárias em concentrações distintas de anticorpo primário. Em (A) células fixadas e

permeabilizadas com metanol e em (B) células fixadas com PFA 4% e permeabilizadas com Triton-X 0.05%. (I) Imagens obtidas após a leitura da fluorescência pelo software Odyssey DLx e em (II) Quantificação bruta dos pixels da fluorescência emitida pelo anticorpo IRDye 800.

Para detecção de E-Selectina, nota-se que tanto a fixação com metanol quanto a fixação com PFA 4% foram capazes de produzir fluorescência detectável em duas concentrações de anticorpo primário, porém, a fluorescência detectada com a fixação com metanol foi mais eficiente, produzindo uma intensidade cerca de 5 vezes maior para a mesma concentração de anticorpo primário. Desta forma, a concentração de 0.2 µg/mL e fixação com metanol foram os procedimentos escolhidos para continuidade dos experimentos, pois apresentam a melhor relação sinal/ruído.

Para a detecção de VCAM-1, nota-se que não houve fluorescência detectável após fixação com PFA 4% em nenhuma das diluições utilizadas e, portanto, esse método não pode ser utilizado para futuros ensaios biológicos. Já a fixação com metanol possibilitou a detecção de fluorescência na concentração de anticorpo primário de 2 µg/mL. Porém, em comparação com a E-Selectina, a detecção de VCAM-1 foi menos eficiente e uma concentração elevada de anticorpo primário deve ser utilizada para a produção de uma fluorescência significativa e, por este motivo, a E-Selectina foi utilizada para ensaios futuros envolvendo amostras biológicas.

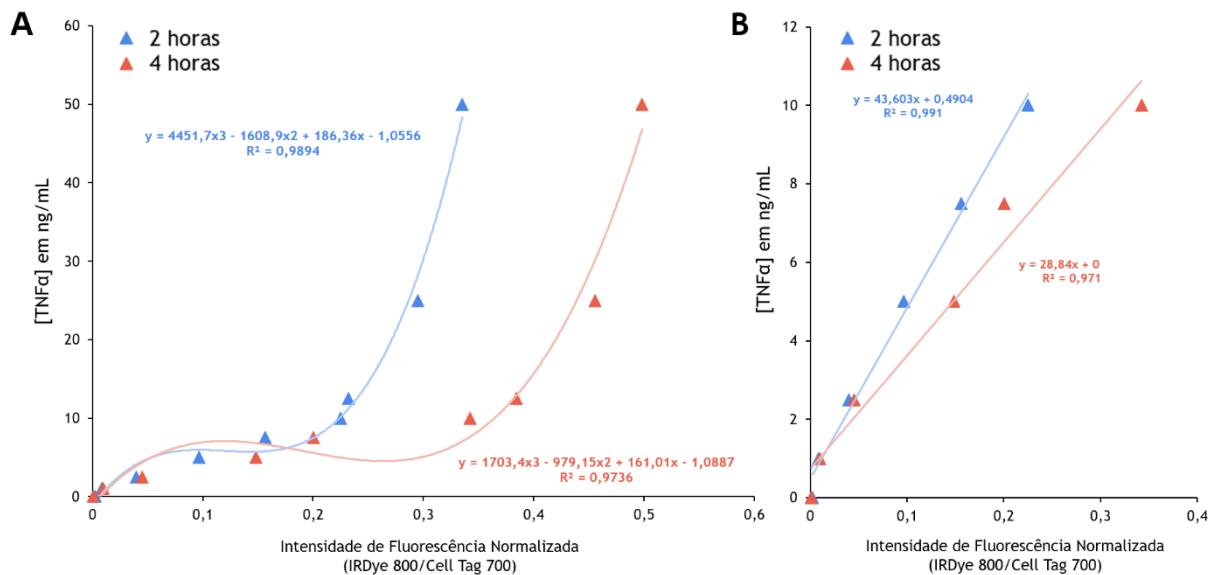


**Figura 5.** Otimização da metodologia de *In-Cell* Western para detecção de VCAM-1 em células endoteliais primárias em concentrações distintas de anticorpo primário. Em (A) células fixadas e

permeabilizadas com metanol e em (B) células fixadas com PFA 4% e permeabilizadas com Triton-X 0.05%. (I) Imagens obtidas após a leitura da fluorescência do anticorpo secundário IRDye 800 e normalizador Cell Tag 700 pelo software Odyssey DLx e em (II) Quantificação bruta dos pixels da fluorescência emitida pelo anticorpo IRDye 800.

#### 4.2.2.2. Efeito concentração-dependente do estímulo de TNF $\alpha$ na expressão de E-Selectina

O efeito do estímulo com diferentes concentrações de TNF $\alpha$  (50, 25, 12.5 10, 7.5, 5, 2.5 e 1 ng/mL) na expressão de E-Selectina foi avaliado em dois momentos: após 2 horas e 4 horas de incubação (Figura 6, Figura Anexo 1).

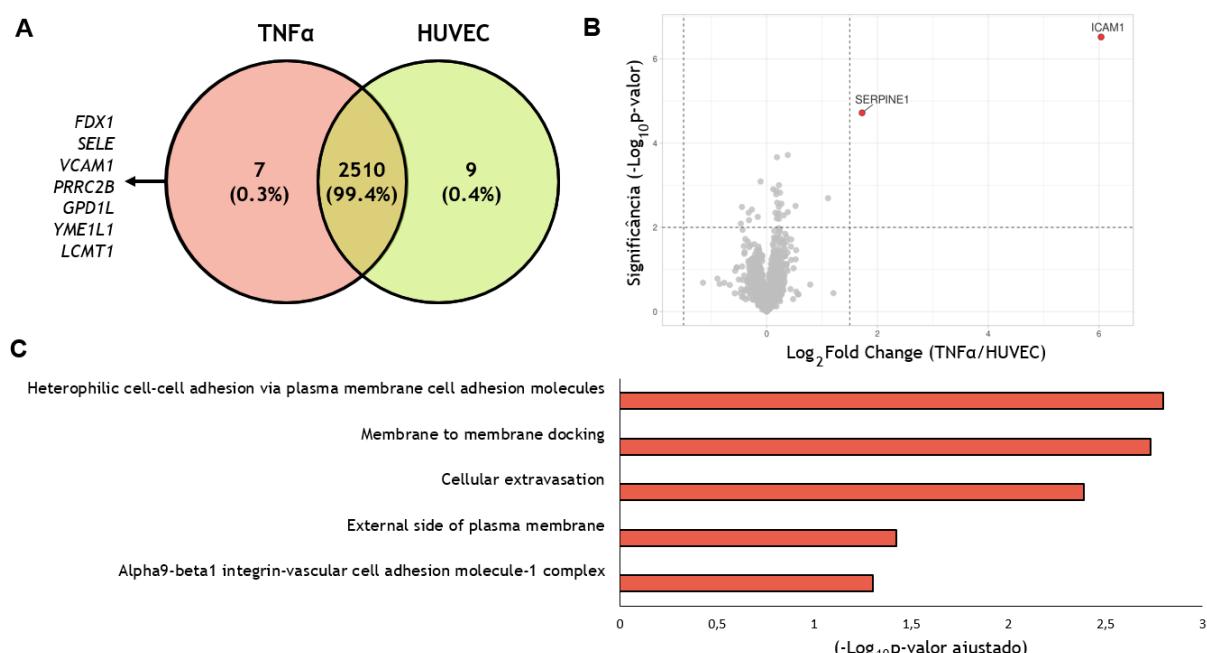


**Figura 6.** Expressão de E-Selectina é dependente do tempo de incubação e da concentração de TNF $\alpha$ . Resultados da intensidade de fluorescência média normalizada (IRDye 800/Cell Tag 700) de células HUVEC estimuladas com TNF $\alpha$  em cada condição ( $n = 6$ ). (A) Regressão de todos os pontos obtidos. (B) Regressão dos pontos iniciais.

Considerando todas as concentrações de TNF $\alpha$  utilizadas, a fluorescência emitida segue uma regressão polinomial de três inflexões para os dois tempos testados. Interessantemente, nos pontos iniciais, 0 a 10 ng/mL, a regressão é linear. Portanto, conclui-se que a metodologia *In-Cell* Western é capaz de detectar fluorescência em pequenas concentrações de TNF $\alpha$  e que a expressão de E-Selectina é linearmente dependente da concentração de TNF $\alpha$  até 10 ng/mL.

#### 4.2.2.3. Análise dos processos celulares enriquecidos pela ativação com TNF $\alpha$

A análise do proteoma das células endoteliais primárias estimuladas com TNF $\alpha$  possibilitou o estudo dos processos enriquecidos pelo tratamento (Figura 7). O critério para a proteína ser considerada exclusiva foi estar presente em 3 ou mais replicatas de um grupo experimental e ausente nas demais replicatas do outro. Já para as proteínas diferencialmente abundantes, um teste T de student bicaudal foi realizado, com significância de 95% e correção pelo método de Permutation-based False Discovery Rate também com significância de 95%. O enriquecimento dos processos celulares foi realizado através dos processos celulares dos quais as proteínas exclusivas e diferencialmente abundantes participam por meio da ferramenta gProfiler.



**Figura 7.** Efeito do estímulo por TNF $\alpha$  (10 ng/mL) em células endoteliais primárias. **(A)** Número de proteínas exclusivas em cada grupo. **(B)** Volcano-plot para os genes codificadores de proteínas aumentadas após o tratamento com TNF $\alpha$ . **(C)** Processos celulares aos quais as proteínas exclusivas e aumentadas no tratamento com TNF $\alpha$  estão relacionadas.

Como esperado, as proteínas de adesão endotelial VCAM-1 e E-Selectina são exclusivas do tratamento com TNF $\alpha$ , não sendo encontradas no grupo não estimulado. São proteínas importantes nos processos de rolamento (E-Selectina) e adesão firme (VCAM-1) dos leucócitos ao endotélio, processo fundamental para permissão da migração leucocitária, como apresentado anteriormente em “Inflamação e as proteínas de adesão”. As proteínas codificadas pelos genes *FDX1*, *PRRC2B*,

*GPD1L* e *LCMT1* possuem funções não relacionadas à membrana ou inflamação e suas funções celulares estão descritas em anexo (Tabela 1 do Anexo). Já em relação as proteínas aumentadas, a ICAM-1 também é uma proteína de adesão endotelial e é importante para a interação com proteínas leucocitárias durante a transmigração de leucócitos pelo endotélio.

A proteína codificada pelo gene *SERPINE1*, proteína inibidora da ativação de plasminogênio 1 (PAI-1), tem uma atuação significante na coagulação e possui papel regulatório durante a migração celular. Durante a coagulação, a enzima conversora de plasminogênio (PLAT) converte o plasminogênio em sua forma ativa, a plasmina, processo relevante para degradação de coágulos. Já a PAI-1 inibe a PLAT e, portanto, diminui a conversão de plasminogênio em plasmina, favorecendo a coagulação. A presença desta proteína é relevante pois, durante o cenário inflamatório, além da expressão de moléculas de adesão no endotélio, diversos fatores contribuem para aumento da coagulação e, portanto, a proteína pode se apresentar como futuro alvo de investigação em relação à função endotelial no cenário inflamatório (William, 2003).

Os processos biológicos dos quais as proteínas aumentadas e exclusivas participam são relacionados à interação membrana-membrana e adesão via proteínas de adesão, processos estes que são fundamentais à inflamação e migração leucocitária. Desta forma, concluiu-se que o tratamento com TNF $\alpha$  é um modelo válido e adequado para a investigação da hipótese de que o pré-tratamento com HDL de indivíduos aparentemente saudáveis é responsável por diminuir a migração leucocitária através da diminuição da expressão de proteínas de membrana.

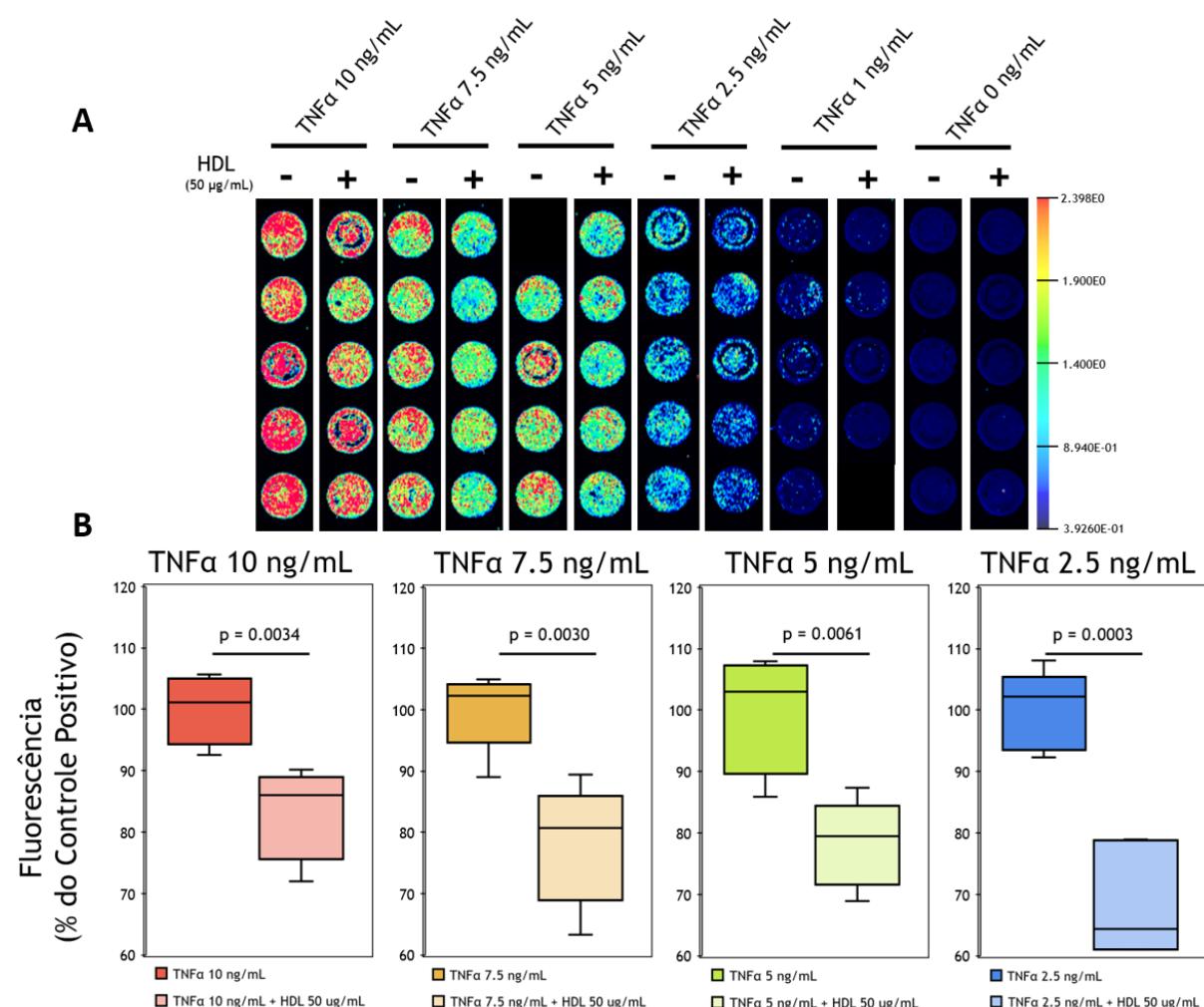
#### **4.3. Potencial papel protetor do pré-tratamento com HDL em relação à expressão de E-Selectina em células endoteliais primárias**

##### **4.3.1. Análise por imunodetecção**

Após a padronização das condições utilizadas no experimento de *In-Cell* Western, a hipótese de que o pré-tratamento com um pool de HDL de indivíduos aparentemente saudáveis é capaz de diminuir a expressão de E-Selectina em células endoteliais primárias quando comparadas a células não tratadas com HDL foi testada. Para isso, as células foram incubadas com 50  $\mu$ g/mL de um pool de HDL de indivíduos aparentemente saudáveis ( $n = 5$ ) (2 horas, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), ativadas com diversas

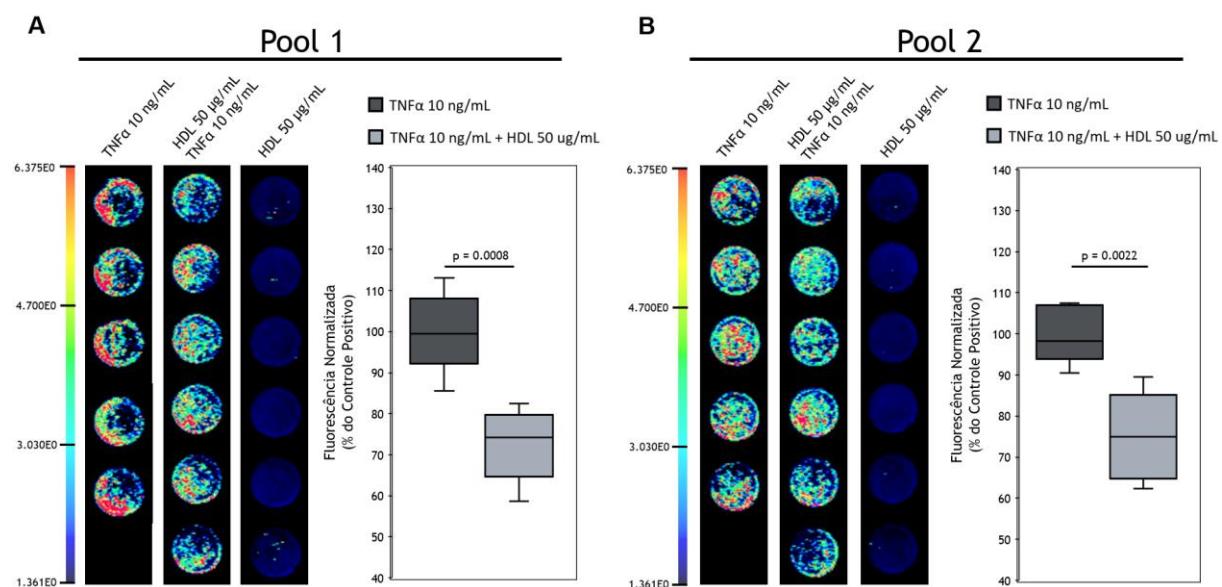
concentrações de TNF $\alpha$  e as fluorescências emitidas pelo anticorpo secundário IRDye 800 e normalizador Cell Tag 700 foram medidas.

Através destes resultados, pode-se concluir que a HDL é capaz de diminuir significativamente a expressão de E-Selectina em células endoteliais ativadas em diversas concentrações de TNF $\alpha$ , quando comparada com células não tratadas por HDL. Em média, em concentrações decrescentes de TNF $\alpha$  (10, 7.5, 5 e 2.5 ng/mL), o pré-tratamento com HDL é capaz de reduzir aproximadamente 17%, 22%, 22% e 31%, respectivamente a expressão de E-Selectina. (Figura 8).



**Figura 8.** Papel protetor da HDL na expressão de E-Selectina em células endoteliais primárias. **(A)** Imagens obtidas após a leitura da fluorescência no equipamento Odyssey DLx do anticorpo IRDye 800 e do normalizador Cell Tag 700 **(B)** Quantificação bruta dos pixels de cada condição ( $n = 5$  ou 4). A fluorescência foi normalizada pelo controle positivo de cada condição e os resultados foram expressos em porcentagem. Os p-valores representados correspondem ao resultado obtido após realização de teste T de Student não pareado com nível de significância de 95% (para concentrações decrescentes de TNF $\alpha$ ,  $p = 0.0034$ ,  $p = 0.0030$ ,  $p = 0.0061$  e  $p = 0.0003$ , respectivamente).

Apesar da HDL ter sido capaz de causar redução na expressão de E-Selectina para todas as concentrações de TNF $\alpha$ , escolheu-se a concentração de 10 ng/mL para continuidade dos experimentos uma vez que a expressão de E-Selectina é mais abundante nesta concentração. Em seguida, para confirmar os resultados, outros pools de HDL foram utilizados para o experimento Pool 1 ( $n = 3$  indivíduos) e Pool 2 ( $n = 4$  indivíduos). Novamente, pode-se observar que os poços pré-tratados com HDL de indivíduos aparentemente saudáveis apresentaram menor intensidade de fluorescência quando comparado aos poços não tratados. O pré-tratamento com HDL diminuiu a expressão de E-Selectina em aproximadamente 27% e 25%, respectivamente, para pool 1 e pool 2 (Figura 9). Os poços apenas tratados com HDL ou apenas células controle sem estímulo com TNF $\alpha$  não apresentaram fluorescência significativa.



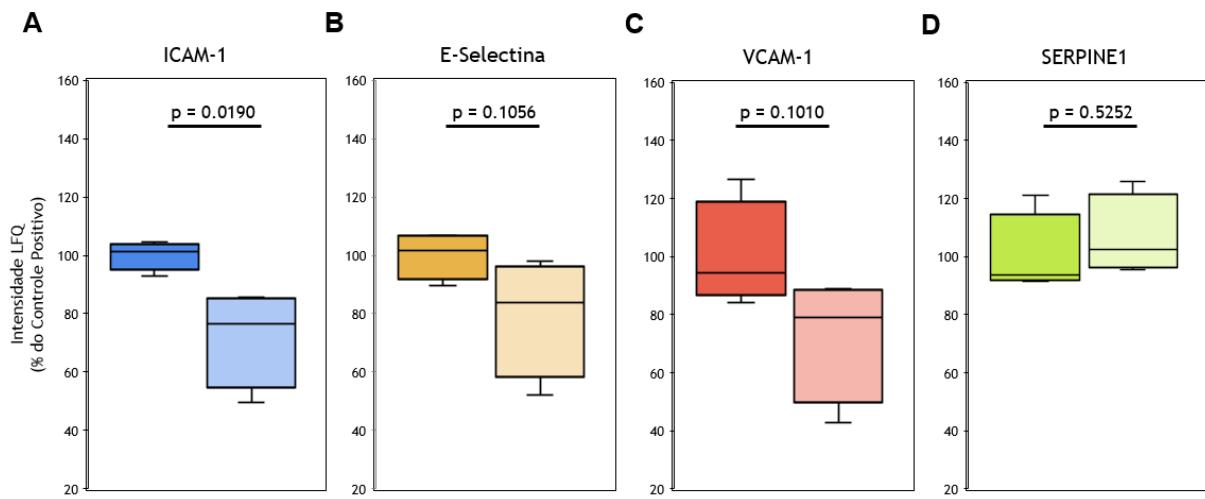
**Figura 9.** Reprodutibilidade do papel protetivo da HDL na expressão de E-Selectina em células endoteliais primárias. Imagens obtidas após a leitura da fluorescência no equipamento Odyssey DLx do anticorpo IRDye 800 e do normalizador Cell Tag 700 e quantificação bruta dos pixels de cada condição ( $n = 5$  ou 6) normalizadas pelo controle positivo e expressas em porcentagem. **(A)** Pool 1 de HDL ( $n = 3$ ) e **(B)** Pool 2 de HDL ( $n = 4$ ). Os p-valores representados correspondem ao resultado obtido após realização de teste T de Student não pareado com nível de significância de 95% (para Pool 1,  $p = 0.0008$  e para Pool 2,  $p = 0.0022$ ).

Os resultados *in-vitro* obtidos em relação à expressão de E-Selectina nas células endoteliais tratadas com HDL carregada de S1P através da metodologia *In-Cell* Western corroboram com os resultados obtidos na literatura (Ruiz *et al.*, 2017) e apresentam-se especialmente úteis para utilização da molécula como um marcador da inflamação em ensaios de alta processividade, como por exemplo em um ensaio com amostras clínicas visando-se avaliar o papel da HDL em cenários inflamatórios/infecciosos.

#### **4.3.2 Análise das moléculas de adesão por proteômica baseada em espectrometria de massas**

A análise por LC-MS/MS permitiu analisar a abundância relativa não apenas de E-Selectina mas também das demais moléculas de adesão de interesse e das demais proteínas exclusivas e aumentadas após o estímulo com TNF $\alpha$  (Figura 10). Os resultados apresentados referem-se a busca dos peptídeos realizada apenas para as amostras dos grupos tratados com TNF $\alpha$ , visto que os grupos de controle negativo (apenas células HUVEC e apenas células estimuladas com HDL) não apresentaram intensidade para as proteínas de interesse (no caso da VCAM-1 e E-Selectina) ou apresentam uma regulação positiva muito significativa após tratamento com TNF $\alpha$  (no caso da ICAM-1). As demais proteínas que se apresentaram como exclusivas do tratamento com TNF $\alpha$  não foram analisadas pois na busca realizada apresentaram-se com intensidade LFQ igual a zero em duas ou mais réplicas.

Através destes resultados nota-se que, assim como observado para E-Selectina pelo ensaio *In-Cell* Western, a HDL possui papel protetor em relação à expressão das outras duas moléculas de adesão estudadas (ICAM-1 e VCAM-1), porém, causou aumento não estatisticamente significativo na expressão da proteína codificada pelo gene *SERPINE1*. Em relação à porcentagem de redução média causada pelo pré-tratamento com HDL, têm-se: 27% para ICAM-1, 21% para E-Selectina e 27% para VCAM-1.



**Figura 10.** Papel protetor da HDL na expressão de proteínas de adesão celular analisado por LC-MS/MS. (A) ICAM-1 (B) E-Selectina (C) VCAM-1 e (D) SERPINE1. Os p-valores correspondem ao resultado do teste T de student não pareado com significância de 95% (para ICAM-1,  $p = 0.0190$ , para E-Selectina,  $p = 0.1056$ , para VCAM-1,  $p = 0.1010$  e  $p = 0.5252$  para SERPINE1).

Através destes resultados nota-se que, embora não apresentem p-valores estatisticamente significativos para significância de 95% para redução de VCAM-1 e E-Selectina, nota-se um potencial papel redutor do pré-tratamento com HDL, onde a mediana de todos os tratados com HDL apresentou-se reduzida em relação as células não tratadas. A ausência de significância estatística pode estar relacionada com a dificuldade metodológica apresentada para realizar a extração de proteínas de membrana para análise proteômica, o que pode causar impacto final na identificação. Esta dificuldade metodológica também reflete outro aspecto relevante para explicar os resultados estatísticos: os coeficientes de variância; na análise por proteômica, para as células pré-tratadas com HDL e estimuladas com TNF $\alpha$  (10 ng/mL), o coeficiente de variação é de 30%, ao passo que o coeficiente de variação obtido pela mesma condição no experimento de In-Cell Western são 9% (Figura 8), 12% (Figura 9A) e 12% (Figura 9B) para os experimentos apresentados em ordem neste trabalho, respectivamente

Resultados anteriores do grupo (Souza Junior *et al.*, 2021) demonstram que, em indivíduos infectados pelo vírus SARS-CoV-2 que desenvolveram complicações severas, há um remodelamento no proteoma da HDL, que passa a apresentar maior presença de proteínas inflamatórias, como a Serum Amyloid 1 e 2 (SAA1 e SAA1)

quando comparados a indivíduos que desenvolveram sintomas leves quando infectados e, inclusive, a abundância de Apo M na HDL foram utilizados como preditores do desfecho de morte. Neste contexto, torna-se objetivo de investigação futura o fato de que o remodelamento do proteoma da HDL seja responsável pela perda do seu caráter protetor e, portanto, não consiga suprimir a expressão de moléculas de adesão de forma eficiente.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Ao final do trabalho de conclusão de curso, foi possível realizar a escolha de um modelo celular robusto para estudos clínicos, otimizar uma metodologia inovadora de alta processividade para detecção e quantificação de E-Selectina em células endoteliais e uma metodologia de proteômica baseada em espectrometria de massas capaz de detectar e quantificar as demais moléculas de adesão. Corroborando com a literatura, os resultados referentes à diminuição da expressão de E-Selectina e ICAM-1 observado em células endoteliais tratadas com HDL de indivíduos aparentemente saudáveis demonstram um importante papel protetor do endotélio desta lipoproteína. Em relação à VCAM-1, um potencial papel protetivo do pré-tratamento com HDL foi observado e técnicas de preparo de amostra específicas para enriquecimento de proteínas de membrana devem ser realizados para investigação mais profunda. Esta nova função de manutenção da homeostase endotelial verificada para as partículas de HDL durante o cenário infeccioso pode estar associada com a menor taxa de hospitalização de indivíduos com concentração mais elevada de HDL-C. Este trabalho contribui para o entendimento da funcionalidade da HDL em cenários inflamatórios infecciosos e abre caminhos para estudos moleculares da sinalização envolvida na diminuição da expressão de moléculas de adesão, em especial, o mecanismo pelo qual a sinalização por S1P1 é responsável por diminuir a ativação por TNF $\alpha$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

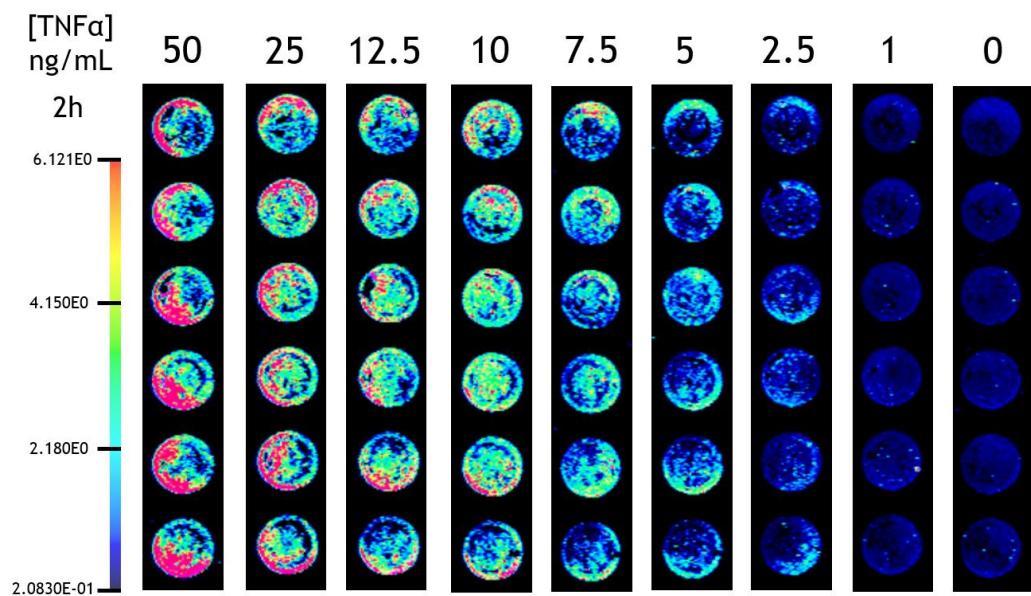
- (1) ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. ***Cellular and molecular immunology***: Saunders/Elsevier 2010.
- (2) BJÖRKEGREN, J. L. M.; LUSIS, A. J. Atherosclerosis: Recent developments. **Cell**, v. 185, n. 10, p. 1630-1645, May 12 2022. ISSN 1097-4172.
- (3) CANTURK, N. Z. et al. Risk of nosocomial infections and effects of total cholesterol, HDL cholesterol in surgical patients. **Clin Nutr**, v. 21, n. 5, p. 431-6, Oct 2002. ISSN 0261-5614.
- (4) CHRISTOFFERSEN, C. et al. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 23, p. 9613-8, Jun 07 2011. ISSN 1091-6490.
- (5) COX, J. et al. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. **J Proteome Res**, v. 10, n. 4, p. 1794-805, Apr 01 2011. ISSN 1535-3907.
- (7) DAVIDSON, W. S. et al. The HDL Proteome Watch: Compilation of studies leads to new insights on HDL function. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**, v. 1867, n. 2, p. 159072, Feb 2022. ISSN 1879-2618.
- (8) DELGADO-RODRÍGUEZ, M. et al. Total cholesterol, HDL-cholesterol, and risk of nosocomial infection: a prospective study in surgical patients. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 18, n. 1, p. 9-18, Jan 1997. ISSN 0899-823X.
- (9) FEINGOLD KR, A. B., BOYCE A, ET AL. **Introduction to Lipids and Lipoproteins** 2000.
- (10) GALVANI, S. et al. HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P1 to limit vascular inflammation. **Sci Signal**, v. 8, n. 389, p. ra79, Aug 11 2015. ISSN 1937-9145.
- (11) GOMES, F. A. et al. Robust assessment of sample preparation protocols for proteomics of cells and tissues. **Biochim Biophys Acta Proteins Proteom**, v. 1872, n. 5, p. 141030, Sep 01 2024. ISSN 1878-1454.
- (12) GRION, C. M. et al. Lipoproteins and CETP levels as risk factors for severe sepsis in hospitalized patients. **Eur J Clin Invest**, v. 40, n. 4, p. 330-8, Apr 2010. ISSN 1365-2362.

- (13) IERONIMAKIS, N. et al. Increased sphingosine-1-phosphate improves muscle regeneration in acutely injured mdx mice. **Skelet Muscle**, v. 3, n. 1, p. 20, Aug 01 2013. ISSN 2044-5040.
- (14) INCE, C. et al. THE ENDOTHELIUM IN SEPSIS. **Shock**, v. 45, n. 3, p. 259-70, Mar 2016. ISSN 1540-0514.
- (15) 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, Jan 13 2011. ISSN 1533-4406.
- (16) LIU, T. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther**, v. 2, p. 17023-, 2017. ISSN 2095-9907.
- (17) MADSEN, C. M. et al. U-shaped relationship of HDL and risk of infectious disease: two prospective population-based cohort studies. **Eur Heart J**, v. 39, n. 14, p. 1181-1190, Apr 07 2018. ISSN 1522-9645.
- (18) MCEVER, R. P. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. **Cardiovasc Res**, v. 107, n. 3, p. 331-9, Aug 01 2015. ISSN 1755-3245.
- (19) MIDDLETON, J. et al. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. **Blood**, v. 100, n. 12, p. 3853-60, Dec 01 2002. ISSN 0006-4971.
- (20) MULLER, W. A. Localized signals that regulate transendothelial migration. **Curr Opin Immunol**, v. 38, p. 24-9, Feb 2016. ISSN 1879-0372.
- (21) PARENT, C.; EICHACKER, P. Q. NEUTROPHIL AND ENDOTHELIAL CELL INTERACTIONS IN SEPSIS: The Role of Adhesion Molecules. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 13, n. 2, p. 427-447, 1999. ISSN 0891-5520.
- (22) RODRÍGUEZ-SANZ, A. et al. High-density lipoprotein: a novel marker for risk of in-hospital infection in acute ischemic stroke patients? **Cerebrovasc Dis**, v. 35, n. 3, p. 291-7, 2013. ISSN 1421-9786.
- (23) RUIZ, M. et al. High-Density Lipoprotein-Associated Apolipoprotein M Limits Endothelial Inflammation by Delivering Sphingosine-1-Phosphate to the Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 37, n. 1, p. 118-129, Jan 2017. ISSN 1524-4636.
- (24) SILVA, A. R. M. et al. Comparing Data-Independent Acquisition and Parallel Reaction Monitoring in Their Abilities To Differentiate High-Density Lipoprotein Subclasses. **J Proteome Res**, v. 19, n. 1, p. 248-259, Jan 03 2020. ISSN 1535-3907.

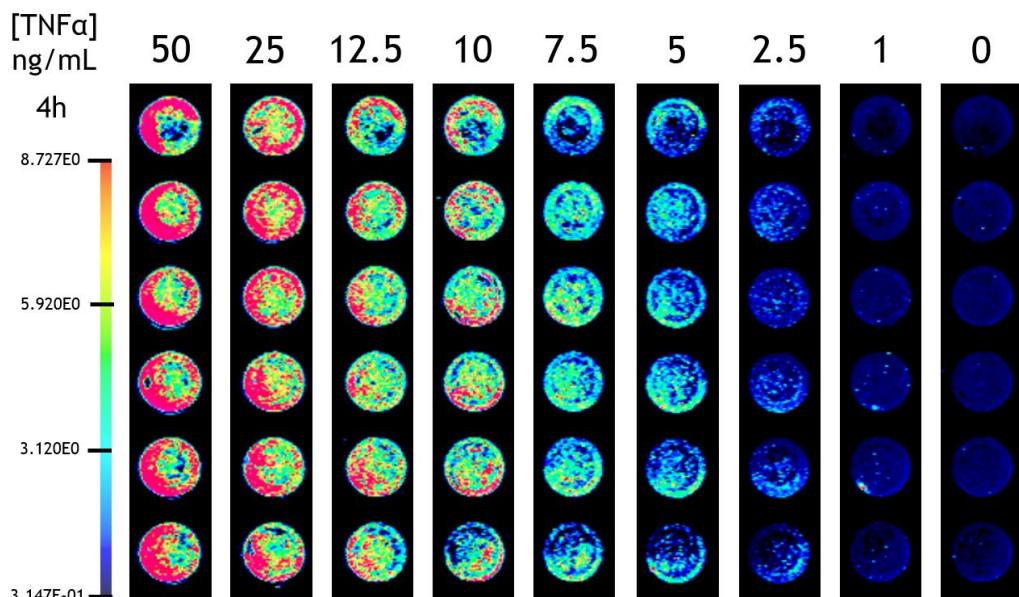
- (25) SOUZA JUNIOR, D. R. et al. HDL proteome remodeling associates with COVID-19 severity. **J Clin Lipidol**, v. 15, n. 6, p. 796-804, 2021. ISSN 1933-2874.
- (26) SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 301-314, 1994. ISSN 0092-8674.
- (27) 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, May 2008. ISSN 1932-7420.
- (28) TRINDER, M. et al. Causal Inference for Genetically Determined Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol and Risk of Infectious Disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 40, n. 1, p. 267-278, Jan 2020. ISSN 1524-4636.
- (29) TYANOVA, S.; COX, J. Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. **Methods Mol Biol**, v. 1711, p. 133-148, 2018. ISSN 1940-6029.
- (30) VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 11, p. 692-704, Nov 2015. ISSN 1474-1741.
- (31) WILLIAM, C. A. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 3765-3777, 2003. ISSN 0006-4971.

## ANEXOS

A



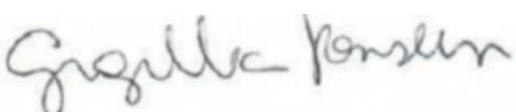
B



**Figura Anexo 1.** Expressão de E-Selectina é dependente do tempo de incubação e da concentração de TNF $\alpha$ . Imagens obtidas após a leitura da fluorescência no equipamento Odyssey DLx do anticorpo IRDye 800 e do normalizador Cell Tag 700. Células endoteliais estimuladas com diversas concentrações de TNF $\alpha$  por (A) 2 horas e (B) 4 horas.

Gene	Funcionalidade resumida
<i>FDX1</i>	Participa na síntese de diversos hormônios esteroides
<i>PRRC2B</i>	Proteína mediadora da tradução de RNAm específicos e controladora do ciclo celular
<i>GPD1L</i>	Regula a corrente de sódio cardíaca
<i>LCMT1</i>	Adiciona uma metila ao grupo carboxil C-terminal de uma leucina da proteína Fosfatase 2A para formação de resíduos de alfa-leucina ésteres.

**Tabela 1.** Funcionalidade resumida das demais proteínas encontradas como exclusivas do tratamento com TNF $\alpha$ .

Luiza Helena de Godoy Santos 

---

Luiza Helena de Godoy Santos  
09/10/2024

---

Profa. Dra. Graziella Eliza Ronsein  
09/10/2024