



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**IVYNNA SUELLEN JUSTINO VIDAL**

**TRATAMENTO DA ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA  
APOLIPOPROTEÍNA E: ASSOCIAÇÃO DE UM DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO E  
PROBIÓTICOS**

**JOÃO PESSOA, PB**

**2020**

IVYNNA SUELLEN JUSTINO VIDAL

**TRATAMENTO DA ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA  
APOLIPOPROTEÍNA E: ASSOCIAÇÃO DE UM DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO E  
PROBIÓTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), como requisito para obtenção de título de mestre.

**ORIENTADOR:** PROF. DR. VALDIR DE ANDRADE BRAGA

**JOÃO PESSOA**

**2020**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

V649t Vidal, Iyvynna Suellen Justino.

Tratamento da aterosclerose em camundongos knockout para apolipoproteína E: associação de um doador de óxido nítrico e probióticos / Iyvynna Suellen Justino Vidal. - João Pessoa, 2020.

63 f. : il.

Orientação: Valdir de Andrade Braga.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/Biotecnologia.

1. Disfunção endotelial. 2. Lactobacillus plantarum WJL. 3. NaNO<sub>3</sub>. I. Braga, Valdir de Andrade. II. Título.

UFPB/BC

IVYNNA SUELLEN JUSTINO VIDAL

**TRATAMENTO DA ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA  
APOLIPOPROTEÍNA E: ASSOCIAÇÃO DE UM DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO E  
PROBIÓTICOS**

Aprovado em: 21 de fevereiro de 2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga (Orientador)  
Departamento de Biotecnologia – DBTC (CBIOTEC – UFPB)

*Maria do Socorro de França Falcão*

---

Profa. Dra. Maria do Socorro de França Falcão (Presidente da banca)  
Departamento de Biologia Celular e Molecular - DBM (CBIOTEC – UFPB)

---

*Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes*  
Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Examinador Interno)  
Departamento de Biotecnologia – DBTC (CBIOTEC – UFPB)

---

*Camille de Moura Balarini*  
Profa. Dra. Camille de Moura Balarini (Examinadora Externa)  
Departamento de Fisiologia e Patologia - DFPT (CCS – UFPB)

---

Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa de Souza (Membro suplente)  
Departamento de Biologia Celular e Molecular - DBM (CBIOTEC – UFPB)

---

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves (Membro suplente)  
Departamento de Nutrição - DNUT (CCS – UFPB)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, minha fortaleza!!! Obrigada Senhor por ter me dado força e sabedoria.

Aos mais pais Valdete e Nilvan, pelo amor, apoio, incentivo, conselhos, paciência e compreensão durante os meus estudos. À minha irmã Irla, pelo carinho, amizade e companheirismo. Amo vocês mais que tudo!

Ao Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga, pela orientação, confiança e ensinamentos.

Aos professores Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, Profa. Dra Camille de Moura Balarini por aceitarem ocupar a banca de defesa como efetivos, e a Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa de Souza e Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves, por aceitarem o convite de membros suplentes.

A Profa. Maria do Socorro de França Falcão, por presidir a banca de defesa.

A Prof. Dra. Marciane Magnani, pela colaboração que tornou possível a realização do projeto, pelo incentivo diário, apoio, amizade e pelas confraternizações.

A Prof. Dra. Camille de Moura Balarini, sempre muito amável e disponível, muito obrigado por toda sua ajuda técnica e psicológica.

A todos que fazem parte do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA-UFPB) e do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA-UFPB).

Agradeço à Roxane Carvalho (por ser a melhor dupla que eu poderia ter nesse mestrado!), Camila de Castro, Mickael Sousa, Danilo Duarte, Luciana Nascimento, Micaelle Oliveira, Patrícia Rocha, Sara Madeiro, Giovana Cristina, Anderson Santos e Airla Laana. Pela amizade, incentivo, força, e principalmente pelos momentos de descontrações que passamos juntos durante esses dois anos. Meu querido “FunLab” amo vocês! “Que os probióticos salvem a sua vida!”

Aos técnicos Sara, Clênia e Matheus do LACONCHA e a Seu Gilvandro do LMBA, pela amizade, pelas conversas, por terem me acompanhado durante todo o projeto e estarem sempre à disposição.

À Éricka Garcia, Clara Rittmeyer e a Francineide Fernandes por todo o auxílio nos experimentos!

À Juliane Vasconcelos e Maria Rosa, por estarem comigo em todos os momentos bons e ruins! Amo vocês!

Às minhas amigas karol, Izabelle e Hyanne, pela força, apoio, e obrigada por

estarem há mais de 10 anos presentes em minha vida!

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)  
pelo suporte financeiro.

“O desenvolvimento humano depende fundamentalmente da invenção. Ela é o produto mais importante de seu cérebro criativo. Seu objetivo final é o completo domínio da mente sobre o mundo material e o aproveitamento das forças da natureza em favor das necessidades humanas.”

Nikola Tesla

## RESUMO

A aterosclerose é uma inflamação progressiva vascular, iniciada pela retenção de lipoproteína de baixa densidade (LDL), levando a um estresse oxidativo, redução na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e da vasodilatação, aumento da vasoconstrição e obstrução arterial devido à formação de placas de ateroma. Nitratos inorgânicos e microrganismos probióticos, provenientes de fontes exógenas, surgiram como alternativas para a formação de NO, redução nos níveis de colesterol, diminuição do estresse oxidativo e redução das placas de ateroma. Deste modo, agentes farmacológicos que sejam capazes de melhorar a função vascular são considerados promissores para o combate à aterosclerose. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da associação de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) com *Lactobacillus plantarum* WJL na aterosclerose experimental. Foram utilizados camundongos, machos e fêmeas, das linhagens C57BL/6 e  $\text{apoE}^{-/-}$  knockout para apolipoproteína E. Os camundongos foram divididos em cinco grupos experimentais: C57 controle negativo (c57C),  $\text{apoE}^{-/-}$  controle positivo ( $\text{apoE}^{-/-}$  C),  $\text{apoE}^{-/-}$  nitrato ( $\text{apoE}^{-/-}$  N),  $\text{apoE}^{-/-}$  probióticos ( $\text{apoE}^{-/-}$  P) e  $\text{apoE}^{-/-}$  associação (P+N). Ao final do tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia, o sangue foi coletado para a realização do teste de colesterol total, e a artéria aorta foi coletada para o estudo da função vascular e da análise histológica. A função vascular foi avaliada por meio da construção de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) e também curvas concentração-resposta à FEN. Para avaliar a resposta direta no músculo liso foram realizadas curvas concentração-resposta frente à FEN e posteriormente relaxamento com nitroprussiato de sódio (NPS). Os animais  $\text{apoE}^{-/-}$  C (machos:  $769 \pm 11$ ; fêmeas:  $816 \pm 3,1$ ) apresentaram incremento de aproximadamente nove vezes nos níveis de colesterol em relação ao C57 C (machos:  $85 \pm 2,1$ ; fêmeas:  $76 \pm 2,6$ ). Os animais  $\text{apoE}^{-/-}$  N (machos  $679 \pm 41$ ; fêmeas:  $619 \pm 92$ ), apresentaram redução nos níveis de colesterol quando comparados ao  $\text{apoE}^{-/-}$  C. Nas lesões ateroscleróticas foi identificada uma redução na formação de placas nos machos  $\text{apoE}^{-/-}$  P (machos:  $1,9 \pm 1,3$  vs.  $\text{apoE}^{-/-}$  C:  $12 \pm 0,97$ ). Os animais  $\text{apoE}^{-/-}$  C (machos:  $R_{\text{máx}}: 91,0 \pm 3,69$  e  $\text{EC}_{50}: 6,71 \pm 0,25$ ; fêmeas:  $R_{\text{máx}}: 83,3 \pm 5,10$  e  $\text{EC}_{50}: 7,0 \pm 0,15$ ) não apresentaram disfunção endotelial frente ao relaxamento à ACh quando comparados aos C57 C (machos  $R_{\text{máx}}: 88,8 \pm 5,54$  e  $\text{EC}_{50}: 7,11 \pm 0,12$ ; fêmeas:  $R_{\text{máx}}: 73,2 \pm 4,74$  e  $\text{EC}_{50}: 7,1 \pm 0,27$ ) Os animais tratados também não apresentaram diferenças significativas,  $\text{apoE}^{-/-}$  P (machos:  $R_{\text{máx}}: 90,2 \pm 18,9$  e  $\text{EC}_{50}: 7,2 \pm 0,24$ ; fêmeas:  $R_{\text{máx}}: 85,9 \pm 2,50$  e  $\text{EC}_{50}: 7,2 \pm 0,29$ ),  $\text{apoE}^{-/-}$  N (machos:  $R_{\text{máx}}: 99,5 \pm 6,65$  e  $\text{EC}_{50}: 7,0 \pm 0,12$ ; fêmeas:  $R_{\text{máx}}: 84,8 \pm 10,5$  e  $\text{EC}_{50}: 6,4 \pm 0,22$ ),  $\text{apoE}^{-/-}$  P + N (machos:  $R_{\text{máx}}: 81,1 \pm 5,35$  e  $\text{EC}_{50}: 7,0 \pm 0,10$ ; fêmeas:  $R_{\text{máx}}: 83,6 \pm 5,22$  e  $\text{EC}_{50}: 6,9 \pm 0,23$ ). Já nas curvas resposta à FEN, os  $\text{apoE}^{-/-}$  C (machos:  $R_{\text{máx}}: 102 \pm 1,41$  e  $\text{EC}_{50}: 7,3 \pm 0,079$ ; fêmeas:  $R_{\text{máx}}: 101 \pm 6,10$  e  $\text{EC}_{50}: 6,6 \pm 0,31$ ) demonstraram marcante disfunção endotelial com elevada resposta contrátil quando comparados aos C57 C (machos:  $R_{\text{máx}}: 59,1 \pm 5,39$  e  $\text{EC}_{50}: 7,0 \pm 0,066$ ; fêmeas:  $R_{\text{máx}}: 72,0 \pm 10,3$  e  $\text{EC}_{50}: 7,2 \pm 0,18$ ). Nos machos a disfunção dos animais  $\text{apoE}^{-/-}$  N ( $R_{\text{máx}}: 46,67 \pm 4,27$  e  $\text{EC}_{50}: 6,7 \pm 0,18$ ) e  $\text{apoE}^{-/-}$  P + N ( $R_{\text{máx}}: 62,2 \pm 7,91$  e  $\text{EC}_{50}: 6,9 \pm 0,048$ ), foram revertidas pelos tratamentos. Já na ausência de endotélio, observamos redução nos  $\text{apoE}^{-/-}$  N ( $R_{\text{máx}}: 90,0 \pm 5,66$  e  $\text{EC}_{50}: 7,3 \pm 0,097$ ) e  $\text{apoE}^{-/-}$  P + N ( $R_{\text{máx}}: 105 \pm 6,98$  e  $\text{EC}_{50}: 7,4 \pm 0,04$ ) em comparação ao  $\text{apoE}^{-/-}$  C ( $R_{\text{máx}}: 145 \pm 8,86$  e  $\text{EC}_{50}: 7,7 \pm 0,06$ ). Nas fêmeas frente a curva de FEN com endotélio funcional, a disfunção endotelial foi revertida nos grupos  $\text{apoE}^{-/-}$  P ( $R_{\text{máx}}: 67,2 \pm 5,41$  e  $\text{EC}_{50}: 7,0 \pm 0,13$ ) e  $\text{apoE}^{-/-}$  P + N ( $R_{\text{máx}}: 78,6 \pm 5,05$  e  $\text{EC}_{50}: 7,2 \pm 0,073$ ) em relação ao  $\text{apoE}^{-/-}$  C ( $R_{\text{máx}}: 101 \pm 6,10$  e  $\text{EC}_{50}: 6,6 \pm 0,31$ ). Já na ausência

de endotélio, observamos aumento na sensibilidade nos grupos apoE<sup>-/-</sup> N ( R<sub>máx</sub>: 112 ±7,46 e EC<sub>50</sub>: 7,9±0,06) e apoE<sup>-/-</sup> P + N ( R<sub>máx</sub>: 104± 5,57 e EC<sub>50</sub>: 7,6±0,07) em comparação com o apoE<sup>-/-</sup> C (R<sub>máx</sub>: 117±13,3 e EC<sub>50</sub>: 6,5 ±0,28). Na resposta ao NPS, observamos menor sensibilidade do músculo liso vascular, nos machos apoE<sup>-/-</sup> N (R<sub>máx</sub>: 128±12 e EC<sub>50</sub>: 7,6±0,12 vs. apoE<sup>-/-</sup> C R<sub>máx</sub>: 115 ± 7,5 e EC<sub>50</sub>: 8,3±0,02) e nos apoE<sup>-/-</sup> P + N (R<sub>máx</sub>: 138 ± 7,3 e EC<sub>50</sub>: 7,4±0,08). Enquanto nas fêmeas não foram observadas diferenças significativas, entre os controles C57 C (R<sub>máx</sub>:126±5,5 e EC<sub>50</sub>: 7,4±0,27) e apoE<sup>-/-</sup>-C (R<sub>máx</sub>: 133±11 e EC<sub>50</sub>: 8,1±0,43), e entre os grupos tratados apoE<sup>-/-</sup> P (R<sub>máx</sub>: 110±3,5 e EC<sub>50</sub>: 7,6±0,32), apoE<sup>-/-</sup>-N (R<sub>máx</sub>: 122±12 e EC<sub>50</sub>: 7,2±0,04) e apoE<sup>-/-</sup> N+P (R<sub>máx</sub>: 108±1.1 e EC<sub>50</sub>: 7,2±0,11) em relação ao apoE<sup>-/-</sup>-C. É possível concluir que a associação de NaNO<sub>3</sub> e *L. plantarum* WJL reverteu a disfunção endotelial na aterosclerose experimental em ambos os sexos.

Palavras-chave: Disfunção endotelial, *Lactobacillus plantarum* WJL, NaNO<sub>3</sub>.

## ABSTRACT

Atherosclerosis is a progressive vascular inflammation, initiated by the retention of low-density lipoprotein (LDL), leading to oxidative stress, decrease nitric oxide (NO) bioavailability and vasodilation, increased vasoconstriction, and arterial obstruction due to the formation of atheroma plaques. Inorganic nitrates and probiotic microorganisms, from exogenous sources, have emerged as alternatives for the formation of NO, reduction in cholesterol levels, reduction of oxidative stress and reduction of atheroma plaques. Thus, pharmacological agents that are capable of improving vascular function are considered promising for combating atherosclerosis. The aim of the study was to evaluate the effects of the association of sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$ ) with *Lactobacillus plantarum* WJL on experimental atherosclerosis. Were used mice, male and female, from C57BL/6 and apoE<sup>-/-</sup>knockout strains for apolipoprotein E. The mice were divided into five experimental groups: c57 control (C), apoE<sup>-/-</sup> control (C), apoE<sup>-/-</sup> Nitrate (N), apoE<sup>-/-</sup> Probiotics (P) and apoE<sup>-/-</sup> association (P + N). At the end of the treatment, the animals were euthanized, the blood was collected to perform the total cholesterol test, and the aortic artery was collected for the study of vascular function and histological analysis. Vascular function was assessed by constructing concentration-response curves to acetylcholine (ACh) and also concentration-response curves to PHE. To evaluate the direct response to smooth muscle, concentration-response curves to PHE and relaxation with sodium nitroprusside (SNP) were performed. The apoE<sup>-/-</sup> C (male: 769±11; female: 816 ± 3.1) animals showed an increase of approximately nine times in cholesterol levels in relation to C57 C (male: 85±2.1; female: 76±26). The apoE<sup>-/-</sup> N (male: 679±41; female: 619±92) animals showed a reduction in cholesterol levels when compared to apoE<sup>-/-</sup>C. In atherosclerotic lesions, a reduction in the formation of plaques was identified in apoE<sup>-/-</sup> P males (1.9±1.3 vs. apoE<sup>-/-</sup> C: 12±0.97). The apoE<sup>-/-</sup> C animals (males: R<sub>max</sub>: 91.0 ± 3.69 and EC<sub>50</sub>: 6.71 ± 0.25; females: R<sub>max</sub>: 83.3 ± 5.10 and EC<sub>50</sub>: 7.0 ± 0, 15) didn't present endothelial dysfunction in relation to ACh relaxation when compared to C57 C (males R<sub>max</sub>: 88.8 ± 5.54 and EC<sub>50</sub>: 7.11 ± 0.12; females: R<sub>max</sub>: 73.2 ± 4.74 and EC<sub>50</sub>: 7.1 ± 0.27) The treated animals also didn't present significant differences, apoE<sup>-/-</sup> P (males: R<sub>max</sub>: 90.2 ± 18.9 and EC<sub>50</sub>: 7.2 ± 0.24; females: R<sub>max</sub> : 85.9 ± 2.50 and EC<sub>50</sub>: 7.2 ± 0.29), apoE<sup>-/-</sup> N (males: R<sub>max</sub>: 99.5 ± 6.65 and EC<sub>50</sub>: 7.0 ± 0.12; females: R<sub>max</sub>: 84.8 ± 10.5 and EC<sub>50</sub>: 6.4 ± 0.22), apoE<sup>-/-</sup> P + N (males: R<sub>max</sub>: 81.1 ± 5.35 and EC<sub>50</sub>: 7.0 ± 0.10 ; females: R<sub>max</sub>: 83.6 ± 5.22 and EC<sub>50</sub>: 6.9 ± 0.23). In the PHE response curves, apoE<sup>-/-</sup> C (males: R<sub>max</sub>: 102 ± 1.41 and EC<sub>50</sub>: 7.3 ± 0.079; females: R<sub>max</sub>: 101 ± 6.10 and EC<sub>50</sub>: 6.6 ± 0.31) showed marked endothelial dysfunction with high contractile response when compared to C57 C (males: R<sub>max</sub>: 59.1 ± 5.39 and EC<sub>50</sub>: 7.0 ± 0.066; females: R<sub>max</sub>: 72.0 ± 10.3 and EC<sub>50</sub>: 7.2 ± 0.18). In males the dysfunction of the apoE<sup>-/-</sup> N animals (R<sub>max</sub>: 46.67 ± 4.27 and EC<sub>50</sub>: 6.7 ± 0.18) and apoE<sup>-/-</sup> P + N (R<sub>max</sub>: 62.2 ± 7.91 e EC<sub>50</sub>: 6.9 ± 0.048), were reversed by the treatments. In the absence of endothelium, we observed a reduction in apoE<sup>-/-</sup> N (R<sub>max</sub>: 90.0 ± 5.66 EC<sub>50</sub>: 7.3 ± 0.097) and apoE<sup>-/-</sup> P + N (R<sub>max</sub>: 105 ± 6.98 and EC<sub>50</sub>: 7.4 ± 0.04) compared to apoE<sup>-/-</sup> C (R<sub>max</sub>: 145 ± 8.86 and EC<sub>50</sub>: 7.7 ± 0.06). In females facing the PHE curve with functional endothelium, endothelial dysfunction was reversed in the apoE<sup>-/-</sup> P groups (R<sub>max</sub>: 67.2 ± 5.41 and EC<sub>50</sub>: 7.0 ± 0.13) and apoE<sup>-/-</sup> P + N (R<sub>max</sub>: 78.6 ± 5.05 and EC<sub>50</sub>: 7.2 ± 0.073) in relation to apoE<sup>-/-</sup> C (R<sub>max</sub>: 101 ± 6.10 and EC<sub>50</sub>: 6.6 ± 0.31). In the absence of endothelium, we observed an increase

in sensitivity in the apoE<sup>-/-</sup> N groups ( $R_{\max}$ :  $112 \pm 7.46$  and  $EC_{50}$ :  $7.9 \pm 0.06$ ) and apoE<sup>-/-</sup> P + N ( $R_{\max}$ :  $104 \pm 5.57$  and  $EC_{50}$ :  $7.6 \pm 0.07$ ) compared to apoE<sup>-/-</sup> C ( $R_{\max}$ :  $117 \pm 13.3$  and  $EC_{50}$ :  $6.5 \pm 0.28$ ). In response to NPS, we observed a lower sensitivity of vascular smooth muscle in apoE<sup>-/-</sup> N males ( $R_{\max}$ :  $128 \pm 12.0$  and  $EC_{50}$ :  $7.6 \pm 0.12$  vs. apoE<sup>-/-</sup> C  $R_{\max}$ :  $115 \pm 7.5$  and  $EC_{50}$ :  $8.3 \pm 0.02$ ) and apoE<sup>-/-</sup> P + N ( $R_{\max}$ :  $138 \pm 7.3$  and  $EC_{50}$ :  $7.4 \pm 0.08$ ) While there were no significant differences in females, between controls C57 C ( $R_{\max}$ :  $126 \pm 5.5$  and  $EC_{50}$ :  $7.4 \pm 0.27$ ) and apoE<sup>-/-</sup> C ( $R_{\max}$ :  $133 \pm 11$  and  $EC_{50}$ :  $8.1 \pm 0.43$ ) and among the treated groups apoE<sup>-/-</sup> P ( $R_{\max}$ :  $110 \pm 3.5$  and  $EC_{50}$ :  $7.6 \pm 0.32$ ), apoE<sup>-/-</sup> N ( $R_{\max}$ :  $122 \pm 12$  and  $EC_{50}$ :  $7.2 \pm 0.04$ ) and apoE<sup>-/-</sup> N + P ( $R_{\max}$ :  $108 \pm 1.1$  and  $EC_{50}$ :  $7.2 \pm 0.11$ ) in relation to apoE<sup>-/-</sup> C. It is possible to conclude that the association of NaNO<sub>3</sub> and *L. plantarum* WJL reversed endothelial dysfunction in experimental atherosclerosis in both sexes.

Keywords: Endothelial dysfunction. NaNO<sub>3</sub>. *Lactobacillus plantarum* WJL.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1-</b> Desenvolvimento da aterosclerose .....                                                                   | 20 |
| <b>Figura 2</b> - Relaxamento vascular .....                                                                              | 22 |
| <b>Figura 3</b> - Ciclo enterosalivar no nitrato-nitrito-NO .....                                                         | 24 |
| <b>Figura 4</b> - Esquema do sistema para estudo de reatividade de anéis de aorta .....                                   | 33 |
| <b>Figura 5</b> - Avaliação da viabilidade dos anéis.....                                                                 | 34 |
| <b>Figura 6</b> - Teste para avaliação da função endotelial .....                                                         | 35 |
| <b>Figura 7</b> - Exemplo de curva concentração resposta.....                                                             | 36 |
| <b>Figura 8</b> - Representação gráfica do perfil de colesterol total.....                                                | 38 |
| <b>Figura 9</b> - Quantificação de placa aterosclerótica em cortes transversais nos machos .....                          | 39 |
| <b>Figura 10</b> - Quantificação de placa aterosclerótica em cortes transversais nas fêmeas.....                          | 40 |
| <b>Figura 11</b> - Representação gráfica das curvas dose-resposta à ACh em machos ...                                     | 42 |
| <b>Figura 12</b> - Representação gráfica das curvas dose-resposta à ACh em fêmeas ....                                    | 43 |
| <b>Figura 13</b> - Representação gráfica das curvas dose-resposta a FEN nos machos em anéis com endotélio funcional ..... | 44 |
| <b>Figura 14</b> - Representação gráfica das curvas dose-resposta a FEN nas fêmeas em anéis com endotélio funcional. .... | 45 |
| <b>Figura 15</b> - Representação gráfica das curvas dose-resposta a FEN nos machos em anéis sem endotélio funcional ..... | 46 |
| <b>Figura 16</b> - Representação gráfica das curvas dose-resposta a FEN nas fêmeas em anéis sem endotélio .....           | 47 |
| <b>Figura 17</b> - Representação gráfica das curvas dose-resposta a NPS nos machos em anéis sem endotélio .....           | 48 |
| <b>Figura 18</b> - Representação gráfica das curvas dose-resposta a NPS nas fêmeas em anéis sem endotélio .....           | 49 |

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES**

**ACh:** acetilcolina

**AngII:** angiotensina II

**ANOVA:** Análise de variância

**apoE<sup>-/-</sup> C:** apoE<sup>-/-</sup> controle

**apoE<sup>-/-</sup> N:** apoE<sup>-/-</sup> nitrato

**apoE<sup>-/-</sup> P + N:** apoE<sup>-/-</sup> associação (P + N).

**apoE<sup>-/-</sup> P:** apoE<sup>-/-</sup> probióticos (P)

**apoE<sup>-/-</sup>:** apolipoproteína E

**AVC:** acidente vascular cerebral

**C57 C:** C57 controle

**Ca<sup>2+</sup>:** cálcio

**cGMP:** guanosina monofosfato cíclico

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**DCVs:** doenças cardiovasculares

**DO:** densidade ótica

**EDRFs:** fatores relaxantes derivados do endotélio

**eNOS:** NOS endotelial

**eNOS:** óxido nítrico sintase endotelial

**EROs:** espécies reativas de oxigênio

**E-selectina:** selectinas de células endoteliais

**FEN:** fenilefrina

**GC:** guanilato ciclase

**GTP:** trifosfato de guanosina

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

**IAM:** infarto agudo do miocárdio

**iNOS:** NOS induzida

**L.:** *Lactobacillus*

**LACONCHA:** Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial

**LDL:** lipoproteína de baixa densidade

**LDL-ox:** LDL oxidada

**LMBA:** Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos

**M-CSF:** fator estimulante de colônias de monócitos

**MRS:** Man, Rogosa e Sharpe

**NADPH:** fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

**NaNO<sub>3</sub>:** nitrato de sódio

**nNOS:** NOS neuronal

**NO:** óxido nítrico

**NOS:** NO sintase

**O<sub>2</sub>:** oxigênio

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** ânion superóxido

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PBS:** phosphate buffered saline

**P-selectina:** selectinas de plaquetas

**SBC:** Sociedade Brasileira de Cardiologia

**SNC:** sistema nervoso central

**SNP:** sistema nervoso periférico

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral alfa

**UFPB:** Universidade Estadual da Paraíba

## SUMÁRIO

|                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                          | <b>16</b> |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                | <b>18</b> |
| <b>2.1. Aterosclerose .....</b>                                     | <b>19</b> |
| 2.1.1. Função endotelial e NO .....                                 | 21        |
| 2.1.2. Ciclo enterossalivar .....                                   | 23        |
| <b>2.2. Probióticos.....</b>                                        | <b>24</b> |
| 2.2.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> WJL.....                      | 26        |
| <b>3. HIPÓTESE .....</b>                                            | <b>27</b> |
| <b>4. OBJETIVOS .....</b>                                           | <b>28</b> |
| <b>4.1. Geral .....</b>                                             | <b>28</b> |
| <b>4.2. Específicos .....</b>                                       | <b>28</b> |
| <b>5. MATERIAS E MÉTODOS.....</b>                                   | <b>29</b> |
| <b>5.1. Animais .....</b>                                           | <b>29</b> |
| <b>5.2. Grupos experimentais .....</b>                              | <b>29</b> |
| <b>5.3. Tratamento com Nitrato.....</b>                             | <b>30</b> |
| <b>5.4. Tratamento com probióticos.....</b>                         | <b>30</b> |
| <b>5.5. Dosagem de colesterol .....</b>                             | <b>31</b> |
| <b>5.6. Análise histológica.....</b>                                | <b>31</b> |
| 5.6.1. Coloração com <i>Oil Red</i> .....                           | 31        |
| <b>5.7. Estudos de função vascular.....</b>                         | <b>32</b> |
| 5.7.1. Avaliação da viabilidade dos anéis e teste do endotélio..... | 33        |
| 5.7.2. Reatividade vascular .....                                   | 35        |
| <b>5.8. Análise estatística .....</b>                               | <b>36</b> |
| <b>6. RESULTADOS .....</b>                                          | <b>37</b> |
| <b>6.1. Colesterol total .....</b>                                  | <b>37</b> |
| <b>6.2. Deposição de placa aterosclerótica .....</b>                | <b>38</b> |

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6.3. Reatividade vascular.....</b>                                   | <b>41</b> |
| 6.3.1. Relaxamento dependente do endotélio .....                        | 41        |
| 6.3.2. Participação do endotélio na contração a FEN.....                | 43        |
| 6.3.3. Participação direta da musculatura lisa na contração a FEN ..... | 45        |
| 6.3.4. Resposta do musculo liso ao NO.....                              | 47        |
| <b>7. DISCUSSÃO .....</b>                                               | <b>50</b> |
| <b>8. CONCLUSÃO.....</b>                                                | <b>55</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                | <b>56</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCVs) são caracterizadas como distúrbios que acometem o coração e os vasos sanguíneos. Estima-se que quatro em cada cinco mortes por DCVs sejam ocasionadas devido ao infarto agudo do miocárdio (IAM) e ao acidente vascular cerebral (AVC). O aumento da incidência dessas doenças é atribuído principalmente a hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes, sobrepeso e obesidade (OMS, 2018). As mulheres possuem uma proteção contra doenças crônicas que está ligada ao estrógeno e muitos estudos apontam que ele age como antioxidante que, por sua vez, sustenta a saúde do coração. Estes estudos mostram que a terapia de reposição hormonal em mulheres na menopausa é considerada uma estratégia de baixo risco para reduzir a DCVs (LAGRANHA, 2018).

As DCVs podem iniciar devido à aterosclerose, que consiste em uma inflamação progressiva vascular que tende a se formar no interior das artérias (SOLANKI et al., 2018). Essa resposta inflamatória na parede do vaso leva a deposição de lipídeos, retenção da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e formação das placas de ateroma dentro da camada íntima média das artérias (IVANOVA et al., 2015).

A LDL é fonte de colesterol e lipídios e quando se apresenta em altas concentrações nas artérias, estimula o desenvolvimento da aterosclerose (IVANOVA et al., 2015), bem como a formação das placas ateroscleróticas. Essas placas podem se romper, gerando um trombo que ocasiona a obstrução do vaso (OU et al., 2018). A disfunção endotelial compromete a estrutura e funcionalidade do endotélio, que resulta no início e progressão da aterosclerose, coincidindo com a redução da produção de óxido nítrico (NO) pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), e aumento do estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxidação da LDL no espaço subendotelial (ZAMPETAKI et al., 2013; ANCIÓN, 2019). A redução nos níveis das LDL é a primeira linha de tratamento para as DCVs, incluindo os seguintes fármacos e compostos: inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), estatinas, ácidos fibrícos, ácidos nicotínicos, inibidores da absorção do colesterol (ezetimiba) e sequestrantes dos ácidos biliares (resinas) (PEARSON et al., 2000; BRAUTBAR; BALLANTYN, 2011).

Os nitratos inorgânicos são alternativas para a aumentar a biodisponibilidade

de NO, as quantidades consideráveis de nitrato na dieta são obtidas pela ingestão de vegetais e através da suplementação com drogas doadoras de NO, a exemplo do nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) (JADERT, 2012; BAKKER, 2016).

O uso de bactérias probióticas para reduzir os níveis de LDL ganharam espaço. Isto, porque os probióticos são microrganismos que, quando utilizados de maneira adequada, beneficiam a saúde do hospedeiro. Quanto às DVCs, os probióticos podem reduzir os níveis de colesterol, produzir compostos que inibem enzimas como a HMG-CoA e assimilam o colesterol (DUCHESNEAU et al., 2014). Estudos recentes confirmam que os probióticos apresentam efeitos na proteção contra patógenos na estimulação e aumento da resposta imunológica do hospedeiro (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017). É nesse contexto que o presente trabalho se propõe a avaliar os efeitos da associação de probióticos e  $\text{NaNO}_3$  para o tratamento da aterosclerose em modelos machos e fêmeas de camundongos *knockout* para a apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Estima-se que 31% das causas de mortes no mundo estão relacionadas às DCVs, perfazendo 17,7 milhões por ano (OMS, 2018). As DCVs representam as principais causas de óbitos no mundo, e dentre seus fatores de riscos estão inclusos fatores fisiológicos e comportamentais (OMS, 2019): os fatores fisiológicos envolvem algumas causas hereditárias como a hipertensão, hipercolesterolemia e obesidade. Já os fatores comportamentais, por exemplo, correspondem a alimentos ricos em gorduras, tabagismo, sedentarismo e uso excessivo do álcool.

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2019), no Brasil, cerca de 300 mil pessoas morrem ao ano devido os quadros de DVC. Em 2015, foi constatado que 85% desses óbitos estavam ligados ao quadro de aterosclerose (OMS, 2018), que ocasiona as principais consequências das DCVs: infarto agudo do miocárdio, AVC (RADER; DAUGHERTY, 2008), angina pectoris e morte súbita cardíaca (TABAS et al., 2015) Entre 2010 e 2016, o Ministério da Saúde (2019) apontou que nas mulheres o índice de mortes por AVC reduziu de 39,5 para 35,2, enquanto as DCVs de modo geral reduziram de 55 para 51,6 óbitos por 100 mil habitantes.

Ao comparar os sexos, é visto, redução das taxas de mortalidades entres as mulheres. O Ministério da Saúde (2019), observou que entre os anos de 2010 e 2016, as mortes por AVC nas mulheres, reduziram de 39,5 para 35,2, enquanto as DCVs de modo geral, reduziram de 55 para 51,6 óbitos por 100 mil habitantes. Autores afirmam que as mulheres possuem um efeito cardioprotetor, especificamente, por produzirem níveis significativos de estrógenos, predominantemente na forma de estradiol (LAGRANHA, 2018).

O termo estrógeno refere-se a um pequeno grupo de hormônios esteróides importantes no controle do ciclo reprodutivo (LAGRANHA, 2018) e que apresentam muitos efeitos positivos: participação na fase de crescimento feminino estimulando o crescimento ósseo, aumento do metabolismo corporal e redução na deposição de gordura. Os três principais estrógenos são  $17\beta$ -estradiol, estrona e estriol, que diferem entre si apenas nos grupamentos químicos hidroxila e/ou cetonas, porém exibem em graus variados os mesmos efeitos nos órgãos reprodutores (LAGRANHA, 2018). Esses estrógenos são sintetizados pelos ovários, nos córtices adrenais, fígado e pela placenta durante a gravidez (DEHAINI, 2018). Já na função

cardiovascular, o estrógeno melhora a sensibilidade à insulina e aumenta a sobrevivência de miócitos e células-tronco cardíacas, modula a função vascular e resposta inflamatória, reduzindo o desenvolvimento da aterosclerose (MURPHY, 2011; DEHAINI, 2018).

## **2.1. Aterosclerose**

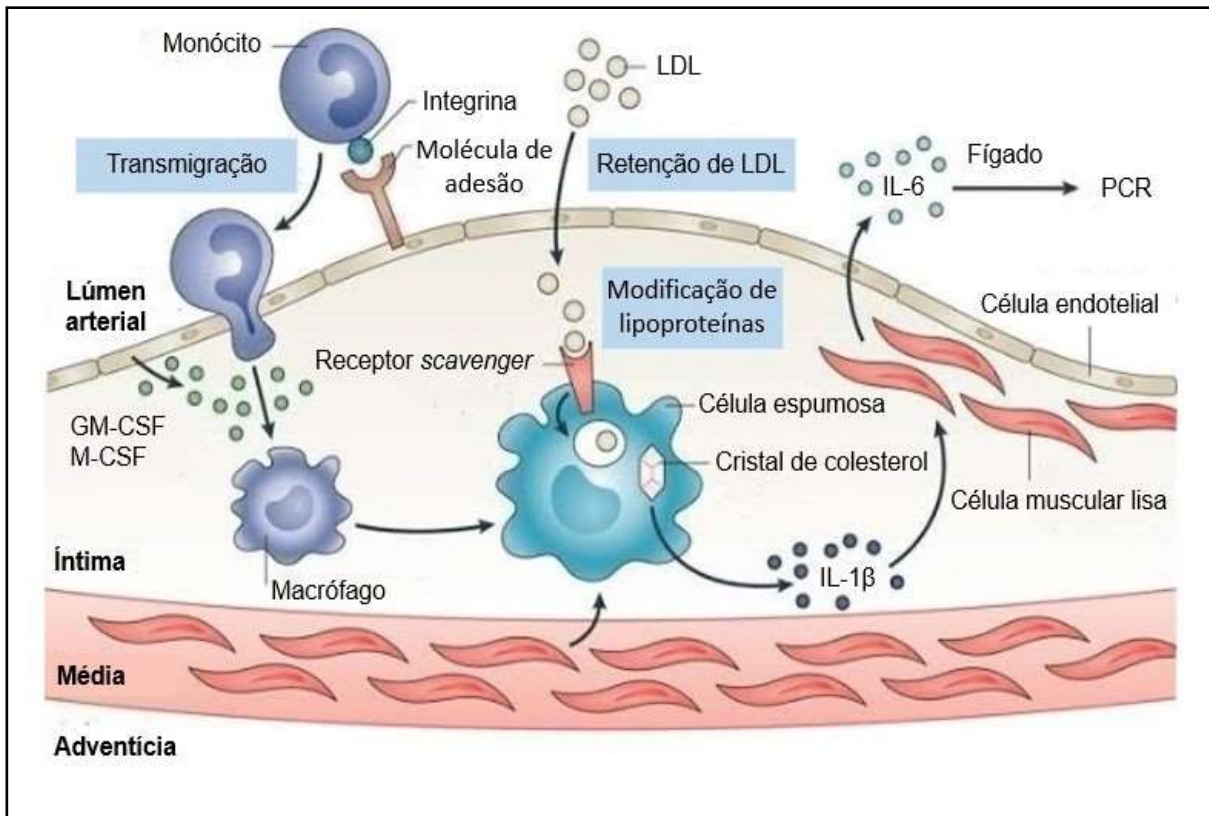
A parede arterial é formada por três camadas: uma camada mais externa, adventícia, contendo terminações nervosas, mastócitos e “vasa vasorum” (pequenos vasos nutridores); a camada média, chamada de túnica média, consiste em células musculares lisas e matriz extracelular que contêm macromoléculas, como o colágeno e elastina; e a camada mais interna, denominada de íntima, que apresenta as células endoteliais. Devido aos fatores de riscos apresentados anteriormente, essas células podem sofrer infiltração das partículas LDL (HUSAIN, 2015), que posteriormente passam a uma condição de LDL oxidada (ox). Essa oxidação está relacionada a um desequilíbrio dos oxidantes e antioxidantes, chamado de estresse oxidativo, que ocorre em locais de inflamação provocando danos nas proteínas, lipídios e ácidos nucléicos (HUSAIN, 2015; EGEA, 2017)

Esse estresse oxidativo está envolvido no início da aterosclerose, uma doença inflamatória vascular (GOIKURIA et al., 2018; LIBBY, 2019). A aterosclerose é iniciada pela retenção dessas LDL na camada íntima das artérias, geralmente nas curvas ou ramos arteriais, que desencadeiam uma resposta inflamatória (GOIKURIA et al., 2018) (figura 1). Quando as partículas de LDL se difundem através das células endoteliais são retidas pela interação entre apolipoproteína B com os compostos da matriz extracelular, os proteoglicanos (MCLAREN et al., 2011). Assim, LDL será acumulada nessa região e sofrerá modificações oxidativas, por proteases e lipases produzindo LDL oxidada (LDL-ox) (TABAS al., 2015).

As LDL-ox estimulam as células endoteliais a produzirem fator estimulante de colônias de monócitos (M-CSF) e citocinas inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e moléculas de adesão como selectinas de plaquetas (P-selectina), selectinas de células endoteliais (E-selectina). Os M-CSF, por sua vez, diferenciam os monócitos em macrófagos, que fagocitam as LDL-ox ficando “carregados” de colesterol, cujo acúmulo forma as células espumosas. Essas células liberam fatores que ao promover

mais a retenção das LDL degradam matriz extracelular e sustentam o processo inflamatório. O resultado das células espumosas é a formação das estrias gordurosas. Essas pequenas estrias podem evoluir para lesões maiores, formando a placa de ateroma (GBAGUIDI et al., 2015; TABAS et al., 2015; GOIKURIA et al., 2018).

**Figura 1-** Desenvolvimento da aterosclerose



Fonte: adaptado de GISTERÃ; HANSSON, 2017

Essa placa, pode apresentar variações em suas composições, além dos macrófagos, células musculares lisas, células apoptóticas, cristais de colesterol, monócitos, células T, células B, células dendríticas, mastócitos, células inflamatórias, proteínas, lipídeos e depósitos de cálcio (HAHN; SCHAWRTZ, 2009). Algumas delas podem se romper e ocasionar erosão no endotélio, isquemia e trombose (FALK et al., 2013), sendo a aterotrombose a principal manifestação clínica da aterosclerose (SBC, 2018).

### 2.1.1. Função endotelial e NO

O endotélio, até o final da década de 70, era considerado apenas como uma barreira permeável e seletiva entre a parede dos vasos e a corrente sanguínea. Devido à descoberta de Furchgott e Zawadzki, em 1980, que vasodilatadores, como a ACh, eram dependentes da presença do endotélio para gerar um relaxamento, o endotélio passou a ser reconhecido com um órgão endócrino que regula o tônus vascular (BROADLEY, K.; BROADLEY, H, 2019).

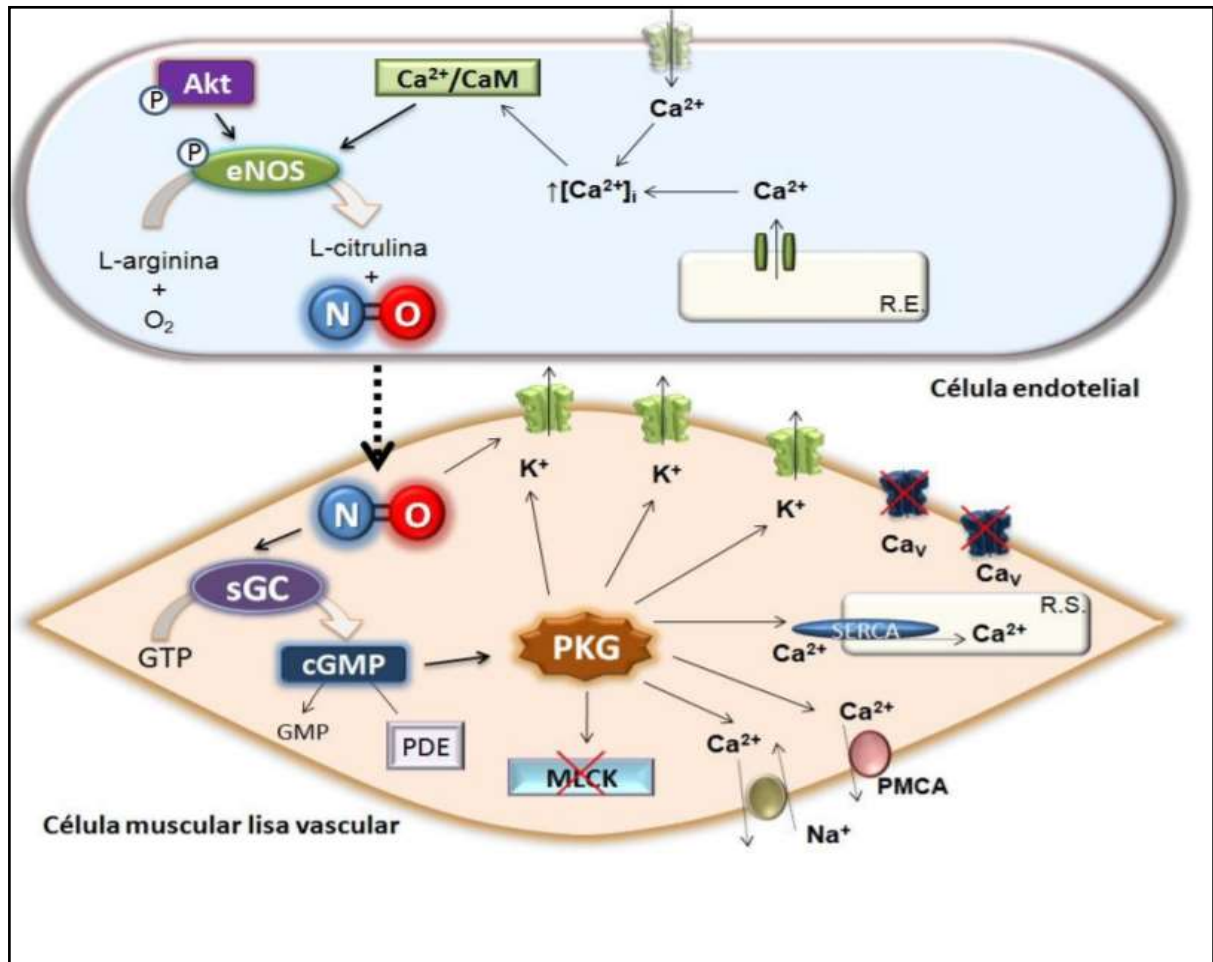
Em aspectos fisiológicos, as células endoteliais atuam na síntese e secreção de substâncias vasoativas de forma que se destacam os fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs), por exemplo, o óxido nítrico (NO) (VERSARI et al., 2009). O NO, é um radical livre gasoso em temperatura ambiente, inorgânico, incolor, lipossolúvel, que apresenta cinco elétrons de nitrogênio e seis de oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. Sua síntese dá-se por meio da oxidação da L-arginina em L-citrulina. A reação química inicia na presença de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) produzindo um intermediário NG-hidroxi-L-arginina, que sofre reação com NADPH e oxigênio ( $\text{O}_2$ ) formando L-citrulina e NO. Em condições fisiológicas, o NO é instável e pode reagir com radicais livres, moléculas com elétrons desemparelhados e metais de transição como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e átomo de ferro de algumas proteínas (PITSIKAS, 2018; FILHO, 2000).

O NO apresenta vários efeitos positivos na homeostase metabólica e cardiovascular, tais como: inibição dos leucócitos e inflamação vascular, estimulação da angiogênese, redução dos níveis lipídicos, ativação de células endoteliais, proliferação de células musculares lisas (DEEL et al., 2018; CHEN et al., 2018), adesão de monócitos a monocamadas de células endoteliais e agregação plaquetária induzida por colágeno, proporcionando efeitos protetores contra o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose (LEE et al., 2016).

O NO convertido da L-arginina difunde para as células musculares lisas, ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Após a sua ativação, a GCs catalisa a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (cGMP). Isso resulta na queda nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico gerando relaxamento da musculatura lisa e aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos e, consequentemente, resulta no aumento do fluxo sanguíneo e redução da pressão

arterial. Por outro lado, os nitrovasodilatadores (exemplo o nitroprussiato de sódio) liberam NO de forma espontânea, ativando assim a CGs gerando relaxamento (figura 2) (TREUER; GONZALEZ, 2015; MONCADA; HIGGS, 1993).

**Figura 2** - Relaxamento vascular



Fonte: MACHADO, 2013

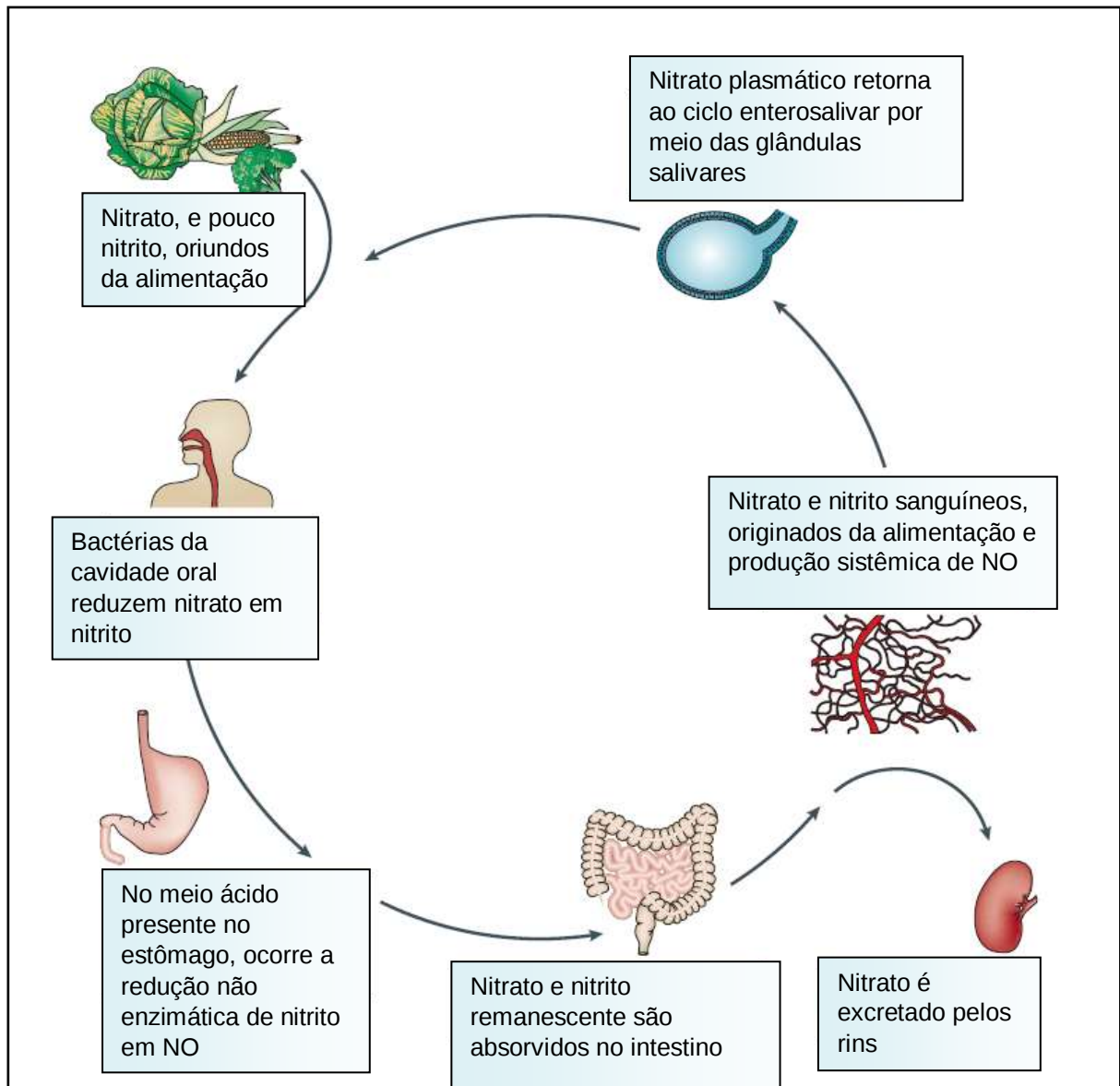
O NO possui três classes de enzimas NO sintase (NOS): NOS endotelial (eNOS), que são expressas em células endoteliais; NOS neuronal (nNOS), encontrada no tecido neuronal; e eNOS induzida (iNOS), cuja síntese é induzida por fatores pró-inflamatórios como citocinas ou endotoxina (CALABRESE et al., 2007; PITSIKAS, 2018). A enzima eNOS é encontrada em vários tipos de células, incluindo células musculares lisas vasculares e macrófagos. Sua expressão é iniciada em resposta a estímulos químicos e físicos, possuindo papéis que funcionam como controladores homeostáticos de algumas funções cardiovasculares o que inclui a inibição da inflamação vascular (LIND et al., 2017). A enzima nNOS, quando é

expressa em neurônios específicos do sistema nervoso central (SNC), está envolvida na aprendizagem, na formação da memória e no controle central da pressão arterial. Quando é expressa no sistema nervoso periférico (SNP), atua como um neurotransmissor atípico, que medeia componentes relaxantes do peristaltismo intestinal, ereção peniana e vasodilatação (FORSTERMANN; SESSA, 2012; LI, et al., 2014). Em contraste, a enzima iNOS pode ser induzida por lipopolissacarídeos bacterianos, citocinas e outros agentes. Em casos da indução de NO por macrófagos, esse atua no controle de bactérias intracelulares e parasitas, de forma que é responsável pela vasodilatação e regulação das doenças inflamatórias, exemplo, a aterosclerose (FORSTERMANN; SESSA, 2012).

### **2.1.2. Ciclo enterossalivar**

As drogas doadoras de NO, a exemplo do nitrato e nitrito inorgânico, provenientes de fontes exógenas ou alimentares, surgiram como alternativas para a formação de NO. Na dieta o nitrato é obtido pela ingestão de vegetais, principalmente nos vegetais de folhas verdes (JADERT, 2012; BAKKER, 2016).

A formação de NO de origem exógena, é conhecido como ciclo enterossalivar ou via nitrato-nitrito-NO (figura 3). Quando ingerido, o nitrato inicialmente é absorvido pelas glândulas salivares cerca de 25%, o restante do nitrato sofre uma redução a nitrito, pelas bactérias anaeróbicas facultativas presentes na microbiota oral, que varia entre os indivíduos (BAKKER, 2016). Um estudo com sequenciamento bacteriano estimou em cerca de 50 a 100 bilhões de bactérias na cavidade oral, composta por mais de 700 espécies, sendo possível identificar que as bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Veillonella* e *Actinomyces* são essenciais para uma microbiota oral saudável, essas bactérias apresentam a enzima nitrato redutase que catalisa a redução de nitrato-nitrito. Após a deglutição, no ambiente ácido do estômago ocorre a redução de nitrito em NO. Esse conjunto de NO derivado de nitrato-nitrito representa uma via independente da NOS que pode ser usada através da suplementação (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008; KOCK, et al. 2016).

**Figura 3** - Ciclo enterosalivar no nitrato-nitrito-NO

Fonte: adaptado de LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2018

## 2.2. Probióticos

Historicamente, a suplementação alimentar iniciou com as primeiras civilizações humanas, com a utilização de leites fermentados com microrganismos vivos. No início do século XX, os produtos lácteos fermentados passaram a ser introduzidos na indústria alimentícia. Em 1907, foi descoberto que as bactérias *Lactobacillus bulgarius* e *Streptococcus thermophilus* estavam envolvidas na fermentação do iogurte e que seu consumo auxiliava a manutenção da saúde intestinal. Somente no final do século XX, observou-se que os compostos lácteos

estimulavam funções tróficas, protetoras e metabólicas na microbiota intestinal (YIRGA, 2015).

A microbiota intestinal apresenta importante papel para a saúde humana, produzindo nutrientes, evitando aderência de microrganismos patogênicos e influenciando o metabolismo da glicose, lipídeos e sistema imune (CAVALLINI et al., 2011). A colonização inicia-se durante o nascimento, quando o recém-nascido sofre exposição pela primeira vez ao ambiente, assim no decorrer da vida passará a evoluir, dependendo principalmente da dieta, estilo de vida e consumo de antibióticos (MOSS et al., 2018).

O termo “probiótico” inclui bactérias que apresentam uma contagem de células viáveis, efeitos benéficos na saúde do hospedeiro (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2018). São microrganismos não patogênicos que a partir da suplementação alimentar podem exercer influências positivas na microbiota no hospedeiro (FAO, 2018). Sua utilização é ampla para a suplementação animal, e após a seleção adequada da cepa, dependendo da espécie e da idade dos animais, a dose pode ser administrada em forma de pó, cápsula, suspensão, pasta ou gel. A depender do protocolo da pesquisa, podem ser utilizados diariamente ou periodicamente, com ou sem aditivos alimentares e em pré-misturas (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2018).

Dentre a grande diversidade de probióticos incluem as bactérias Gram-positivas do gênero *Lactobacillus*, a exemplo da *L. acidophilus*, *L. casei*, do gênero *Bifidobacterium*, *B. species*, *B. longum* (GILLINLAND, 2003), *Bacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Enterococcus* são encontradas naturalmente na microbiota, a maioria dos gêneros e espécies são seguros, exemplo as do gênero *Bacillus* e as *Enterococcus*. Portanto, é necessário otimizar o uso e selecionar as cepas resistentes as temperaturas, umidades, manuseios e armazenamentos (ANADÓN, 2006; MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2018).

Esses microrganismos podem atravessar a parede intestinal como células vivas ou se dividirem rapidamente. Os antígenos liberados serão absorvidos, estimulando diretamente o sistema imunológico (YIRGA, 2015), regulando a sinalização cerebral e respostas imunes, de maneira que liberam hormônios gastrointestinais, ajudam a combater sobrepeso e obesidade (KERRY et al., 2018), auxiliam as células epiteliais a aumentar a função da barreira seletiva intestinal (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2018), auxiliam no tratamento da aterosclerose, incluindo indução de células dendríticas,

redução da absorção de colesterol pelo intestino reduzindo a inflamação vascular (CAVALLINI et al., 2011).

### **2.2.1. *Lactobacillus plantarum* WJL**

A espécie *L. plantarum* é uma bactéria Gram-positiva, produtora de ácido láctico, e pode ser encontrada em diversos nichos ambientais, como vegetais, carne, peixe, laticínio, como também é frequentemente observado no intestino de metazoário, variando da mosca ao trato gastrointestinal humano. Estudos mostram a capacidade de inibir o desenvolvimento da obesidade reduzindo o tecido adiposo mesentérico e favorecendo o metabolismo lipídico em um modelo murino de obesidade induzida por dieta (SIEZEN, 2010; COSTA, 2019). A *L. plantarum* WJL foi isolada como membro das bactérias simbióticas do intestino de *Drosophila* (Ryu, 2008).

### 3. HIPÓTESE

A aterosclerose é uma doença inflamatória que acomete as artérias, promovendo lesões na sua camada íntima, devido ao acúmulo de LDL. Na parede arterial, a LDL sofre oxidação ocasionando um processo inflamatório. A inflamação e o estresse oxidativo são fundamentais no progresso da doença levando ao quadro de DCVs, cuja incidência representa as principais causas de óbitos no mundo.

Existem fortes relações entre as DCVs e o consumo de produtos naturais e dietéticos. Uma delas é a atuação direta no sangue e no endotélio, induzindo a produção de fatores vasoprotetores e uma melhora na disfunção endotelial (AUGER et al., 2016). Por sua vez, os probióticos e os fármacos doadores de NO, possuem efeitos positivos na homeostase metabólica e cardiovascular, auxiliando na redução dos níveis lipídicos.

Agentes que reduzem a inflamação arterial, os níveis de LDL e as placas ateroscleróticas são candidatos fortes para o tratamento da doença. Portanto, o presente estudo se propõe a investigar o efeito da utilização de probióticos (*Lactobacillus plantarum* WJL) e nitrato inorgânico (doador de NO) para o tratamento da aterosclerose em modelos de camundongos apoE<sup>-/-</sup>, avaliando as diferenças entre os sexos, para um melhor diagnóstico e tratamento.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Geral

Avaliar os efeitos da associação de  $\text{NaNO}_3$  e *Lactobacillus plantarum* WJL para o tratamento da aterosclerose em camundongos apoE<sup>-/-</sup> machos e fêmeas.

### 4.2. Específicos

Em animais apoE<sup>-/-</sup>, machos e fêmeas, e seus controles C57BL/6, avaliar:

- Os níveis de colesterol total plasmático;
- Deposição de placa aterosclerótica;
- A função vascular em vasos de grande calibre (aorta) para verificar se o tratamento é capaz de reverter o quadro de disfunção endotelial;

## 5. MATERIAS E MÉTODOS

### 5.1. Animais

Nesse estudo foi utilizado o modelo de camundongo transgênico com *knockout* na apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>) (PLUMP et. al, 1992). Foram utilizados camundongos apoE<sup>-/-</sup> machos e fêmeas e seus controles C57BL/6, com oito semanas de vida, provenientes do Biotério do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com acesso à água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram executados em acordo com princípios éticos e aprovados pela comissão de ética no uso de animais da UFPB (CEUA – 2649170918/2614170918)

### 5.2. Grupos experimentais

Ao atingirem oito semanas de idade, os animais apoE<sup>-/-</sup> receberam dieta aterogênica *Western Type* (Rhoister, São Paulo, Brasil), contendo 41% de calorias em forma de lipídios e 1,5% de colesterol. Essa dieta foi administrada para acelerar o processo de desenvolvimento de disfunção endotelial e das placas de aterosclerose durante as 12 semanas subsequentes.

Os animais, fêmeas e machos, foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

1. Grupo controle negativo C57Bl/6: animais sem tratamento;
2. Grupo controle positivo apoE<sup>-/-</sup>: sem tratamento;
3. Grupo P: animais apoE<sup>-/-</sup> tratados com probióticos;
4. Grupo N: animais apoE<sup>-/-</sup> tratados com NaNO<sub>3</sub>;
5. Grupo P+N: animais apoE<sup>-/-</sup> tratados com probiótico e NaNO<sub>3</sub>;

### 5.3. Tratamento com Nitrato

O  $\text{NaNO}_3$  (Sigma-Aldrich CAS 7631.99-4) foi administrado durante 12 semanas. Para isso, foi utilizado concentração de 10mmol, cerca de 0,86g diluído em 1 litros de água. Este preparado foi alocado nas garrafas e os animais tiveram acesso livre a bebida *ad libitum*.

### 5.4. Tratamento com probióticos

Foi utilizada a linhagem *L. plantarum* WJL. Durante as 12 semanas de tratamento (com dieta e probióticos), os animais receberam os probióticos diariamente diluídos em 300  $\mu\text{L}$  de PBS. e após este período foram avaliados de acordo com as técnicas propostas.

A linhagem *L. plantarum* WJL utilizada no estudo, foi cedida pelo Instituto de Genômica Funcional de Lyon, Lyon, França (mediante colaboração com o professor Dr. Hubert Vidal) e isolada todos os dias no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA), na UFPB (coordenado pela professora Dra. Marciane Magnani).

Foi preparado um caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) em tubos de ensaio esterilizados à 121 °C por 15 minutos, os quais foram utilizados para o da *L. plantarum* WJL, incubada 100  $\mu\text{L}$ , a 37° por 72 horas em jarra de anaerobiose (Permutation, PVC-jarra anaerobiose 2,5L). Após essa primeira ativação, foram feitos repiques diários.

A respectiva suspensão de célula foi transferida para tubo falcon estérelizado e centrifugado por 15 minutos a 3500 rpm sob a temperatura de 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram ressuspensas em 5 mL de salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline* – PBS) estéril para homogeneização por 30 segundos em vortex.

A contagem dos microrganismos foi realizada em espectrofotômetro, com densidade ótica (DO) expressa em absorbância, baseado na propriedade de turvação do meio de cultura. Foi utilizado um tubo contendo a solução tampão ausente do inóculo e outro com a presença do inóculo, para comparação da diferença de luz absorvida entre os tubos. A leitura foi padronizada para 0,7 de absorbância com o equipamento ajustado para 625  $\lambda$ . As suspensões foram padronizadas para 9 log UFC/mL a partir da DO estabelecida (COSTA, 2019).

### 5.5. Dosagem de colesterol

Amostras de plasma foram obtidas após a eutanásia (anestesiados com cetamina 91 mg/kg e xilazina 9,1 mg/kg para em seguida serem guilhotinados) e foram utilizadas para a dosagem de colesterol total, utilizando kits comerciais colorimétricos (Bioclin®, Quibasa, Brasil), de acordo com as orientações do fabricante. As leituras foram executadas em espectrofotômetro manual (Chemwell T, Chemistry Analyzer, 4600, USA).

### 5.6. Análise histológica

A avaliação da deposição de placa aterosclerótica foi feita em grupos de animais diferentes daqueles utilizados para estudos de função vascular. Neste caso, após eutanásia (anestesiados com cetamina 91 mg/kg e xilazina 9,1 mg/kg), os animais foram perfundidos em PBS, pH 7,4. Em seguida, foi realizada a fixação dos tecidos com paraformaldeído a 4% em PBS com pH 7,4. As aortas foram cuidadosamente retiradas, limpas e armazenadas em fixador até o momento do processamento histológico. Para a realização dos cortes histológicos (6 µm de espessura), as peças montadas em OCT (Sakura Finetek, Califórnia, EUA) foram congeladas e cortadas em micrótomo criostato (CM1850, Leica, Nussloch, Alemanha). Os cortes obtidos a partir da raiz da aorta foram montados em lâminas gelatinizadas e armazenados em geladeira até o momento da coloração.

#### 5.6.1. Coloração com *Oil Red*

Após 24 horas foi realizada a coloração com o corante de lipídios neutros Oil-Red-O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para quantificação de placa aterosclerótica. O OCT foi retirado das lâminas após lavagem cuidadosa com água destilada, as lâminas foram mantidas em contato com o corante com os cortes voltados para baixo, para evitar precipitação, pelo período de 10 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada para retirada do excesso de corante e cobertas por PBS e lamínula. Os cortes foram analisados em microscópio interfaceado a uma câmera digital e a análise das imagens capturadas foi realizada pelo sistema de análise *Image J*. A área com deposição de placa foi expressa como porcentagem do lúmen vascular ocupada pela placa aterosclerótica.

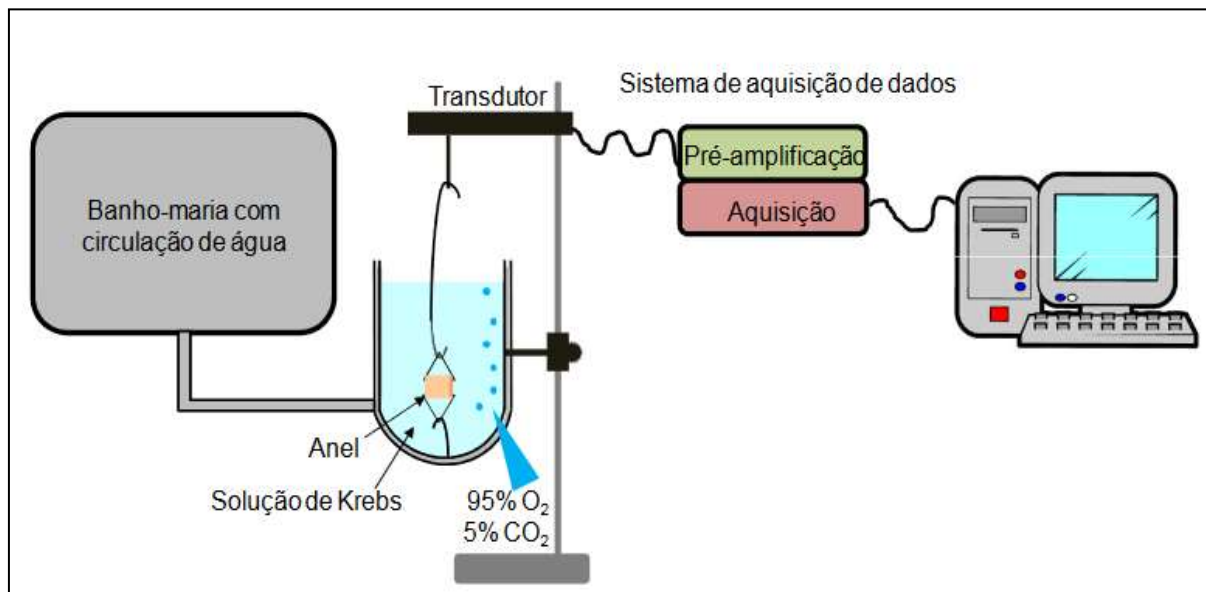
### 5.7. Estudos de função vascular

Ao final do período experimental (12 semanas), os animais foram eutanasiados e submetidos à toracotomia para a exposição do coração e da aorta, os quais foram cuidadosamente retirados do animal e dissecados para retirada de tecido conjuntivo.

As peças foram colocadas em placa de Petri, contendo solução de Krebs modificada (concentrações, em mM: NaCl 115; KCl 4,7;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2;  $\text{NaHCO}_3$  25; glicose 11,1), pH 7,4. A aorta torácica foi limpa do tecido conjuntivo e cortada em 3 ou 4 anéis de aproximadamente 3 milímetros cada. Em seguida, conforme esquematizado na figura 3, os anéis foram acoplados, por meio do lúmen vascular, a triângulos de aço inoxidável, de forma a permanecerem paralelos e então foram acondicionados em cuba de vidro de 5 mL de volume, contendo a mesma solução nutritiva de Krebs, constantemente aerada por mistura carbogênica contendo 95%  $\text{O}_2$  e 5% dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e mantida sob temperatura de 37 °C com o auxílio de um banho-maria com circulação de água (figura 4).

Um dos triângulos foi fixado à parede da cuba e o outro acoplado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica, conectado a um sistema de aquisição de dados PoweLab™ (software versão 4.2, ADInstruments, MA, EUA) para permitir o registro de alterações no tônus vascular mediante a ação de drogas vasoativas. Desta maneira, alterações no diâmetro vascular frente à adição de drogas vasoativas foram captadas e enviadas a um computador.

**Figura 4** - Esquema do sistema para estudo de reatividade de anéis de aorta

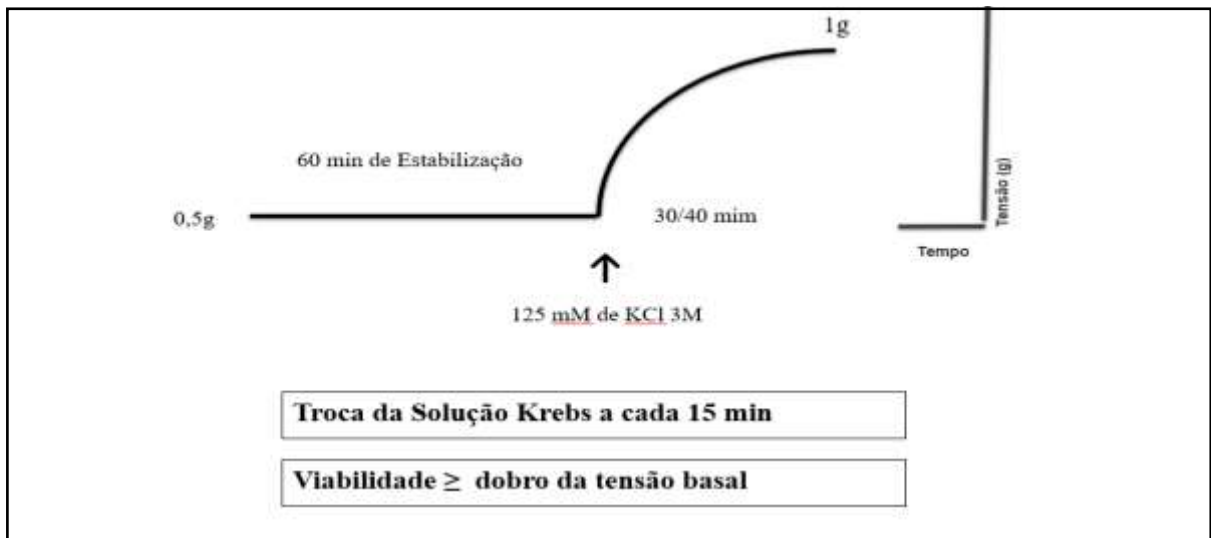


Fonte: Balarini, 2013

#### 5.7.1. Avaliação da viabilidade dos anéis e teste do endotélio

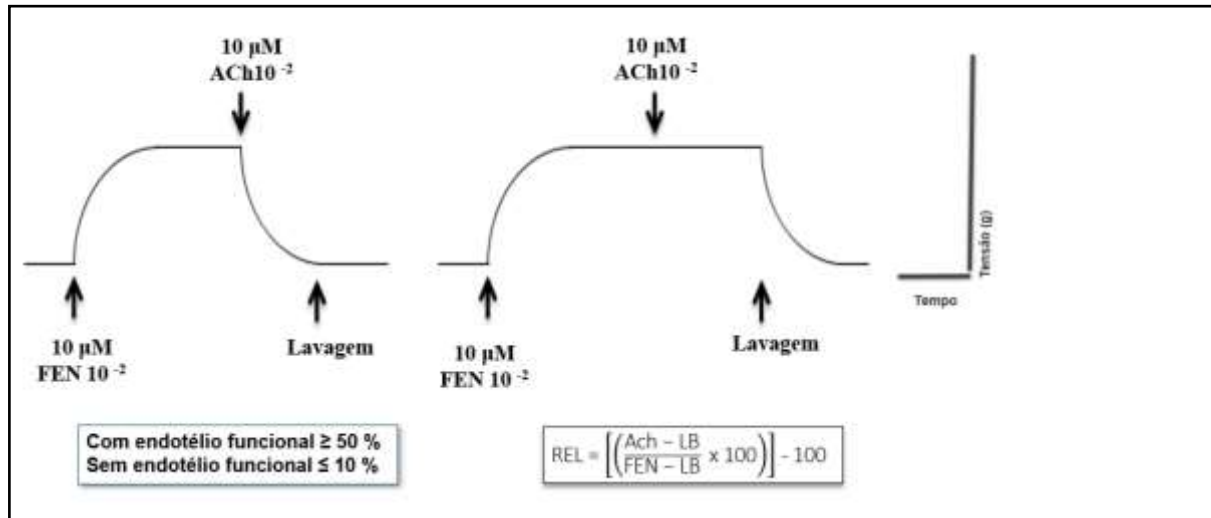
Posterior à montagem do sistema, os anéis foram gradativamente submetidos a uma linha basal (LB) de 0,50 gramas, reajustada quando necessário. Durante o período de estabilização de 60 minutos, a solução das cubas foi trocada a cada 15 minutos, para prevenir a interferência de metabólitos e a linha de base ajustada quando necessário. A viabilidade dos anéis foi avaliada após administração de 125 mM de KCl (420  $\mu$ M de KCL 3M) o qual gerou uma contração por despolarização de, pelo menos, o dobro do valor basal de tensão, ou seja, 1g (figura 5).

**Figura 5** - Avaliação da viabilidade dos anéis



Fonte: Autora, 2020

Com a viabilidade dos anéis assegurada, após a estabilização, foi realizado um teste para verificação da integridade do endotélio. Foram adicionados a cada cuba 10 $\mu$ M do agonista alfa adrenérgico fenilefrina (FEN) obtendo-se um valor de contração igual ou superior a 50% do obtido pelo KCl. Depois da formação do platô, 10 $\mu$ M do agonista de receptores muscarínicos acetilcolina (ACh) foi adicionada a cada cuba. Os anéis considerados com endotélio viável (E+) foram aqueles que obtiveram um valor de relaxamento maior que 50% da contração induzida pela FEN, em relação a linha basal (LB), 0,50g de tensão. Aqueles cujo relaxamento foi menor que 10% foram considerados com endotélio inviável (E-). Após o teste de endotélio, a solução de Krebs foi trocada três vezes e os anéis foram submetidos a um período de estabilização de 15 minutos (figura 6).

**Figura 6** - Teste para avaliação da função endotelial

Fonte: Autora, 2020

### 5.7.2. Reatividade vascular

Os protocolos de reatividade vascular foram executados por meio da construção de curvas dose-resposta a substâncias vasoativas. Neste caso, após a estabilização de 30 minutos, os vasos foram submetidos a doses crescentes de substâncias vasoativas, o que permitiu o registro da variação de tensão em função do tempo.

A escolha das drogas utilizadas foi delineada com o objetivo de responder as principais perguntas no que tange ao comprometimento da função endotelial em animais hipercolesterolêmicos e a esperada melhora da função promovida pelo tratamento com nitrato e/ou probióticos.

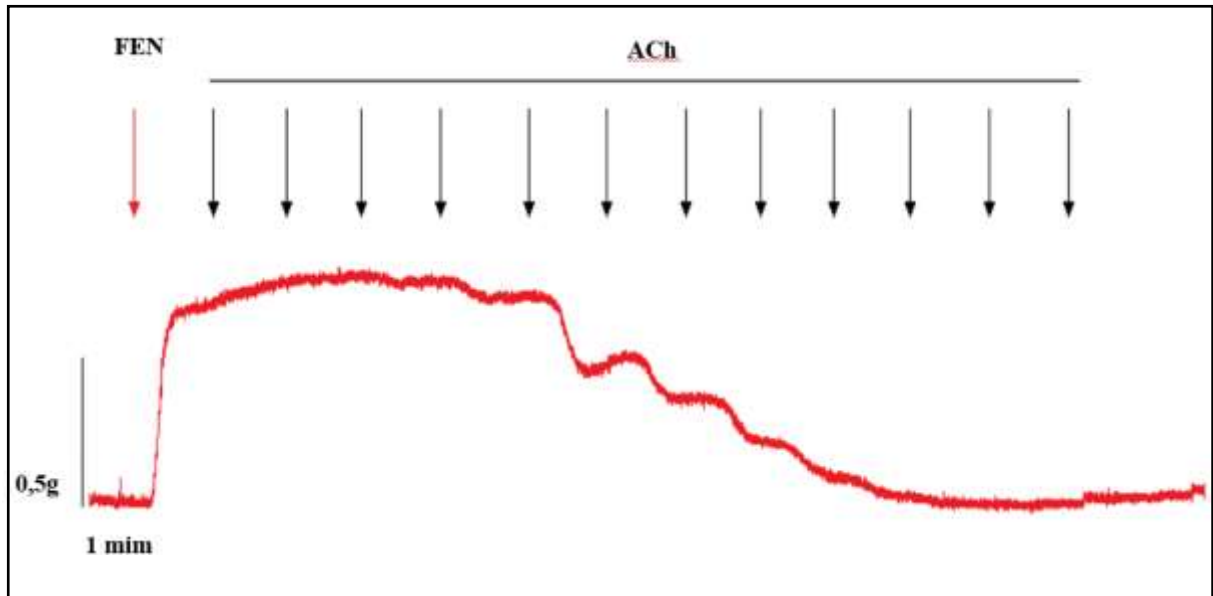
Para avaliar a função endotelial foi realizada uma construção de curvas de relaxamento à acetilcolina (ACh), um agonista de receptores muscarínicos, em anéis com 50% ou mais de células endoteliais, os anéis foram pré-contráídos com FEN (10µM), a exposição a ACh de 10<sup>-10</sup>M a 3x10<sup>-5</sup>M (figura 8) promoveu um relaxamento em anéis de aorta torácica.

Para avaliar a função endotelial, os anéis foram submetidos a uma pré-contracção com FEN e realizado uma curva de relaxamento com ACh de 10<sup>-10</sup>M a 3x10<sup>-5</sup>M (figura 7) Também foi realizada uma curva de contração de contração com FEN de 10<sup>-10</sup>M a 3x10<sup>-5</sup>M. A participação direta do musculo liso foi avaliada por meio da construção de uma curva de contração frente a concentrações crescentes de FEN (10<sup>-</sup>

$10^{-10}$  M a  $3 \times 10^{-5}$  M.).

A sensibilidade do músculo liso ao NO foi avaliada por meio da construção de uma curva de relaxamento frente a concentrações crescentes do doador de NO, NPS ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-5}$  M), que causa relaxamento estimulando diretamente a via GMPc, presente no músculo liso, após pré-contracção com FEN (10  $\mu$ M).

**Figura 7** - Exemplo de curva concentração resposta



Fonte: Balarini, 2013.

### 5.8. Análise estatística

As curvas dose-resposta foram expressas como a porcentagem de relaxamento em relação ao nível máximo de pré-contracção. As curvas dose-resposta de contração foram expressas como a porcentagem de contração em relação ao nível basal. A resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e o log da dose que produziu metade da  $R_{\text{máx}}$  ( $\text{Log EC}_{50}$ ) foram calculados por regressão não linear (*Prism 5, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*). A sensibilidade ao agonista foi expressa como  $\text{EC}_{50}$  ( $-\log \text{EC}_{50}$ ). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As comparações entre as  $R_{\text{máx}}$ ,  $\text{EC}_{50}$ , dados bioquímicos e histológicos foram feitos por ANOVA de 1 via, seguida pelo post hoc de Tukey. As comparações estatísticas entre dois grupos foram feitas por teste t de Student não pareado. As análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 6 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*). As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando o  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

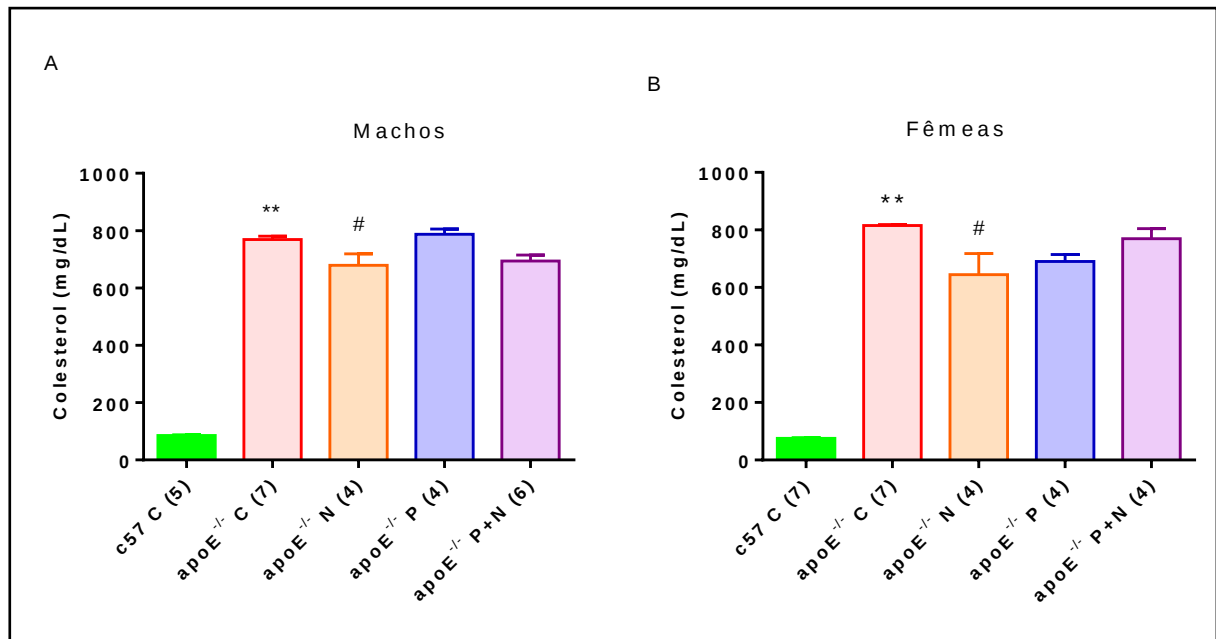
### 6.1. Colesterol total

Como esperado, os animais apoE<sup>-/-</sup> C apresentaram perfil lipídico mais elevado que os animais controles C57 C. Apresentaram um aumento de cerca de nove vezes nas concentrações de colesterol quando comparado com o C57 C (tabela 1). Não houve influência nos grupos apoE<sup>-/-</sup> P e apoE<sup>-/-</sup> P + N. Nesses grupos, a concentração de colesterol foi semelhante ao observado nos camundongos apoE<sup>-/-</sup> C. Já nos apoE<sup>-/-</sup> N foi possível identificar uma redução significativa nos níveis de colesterol em ambos os sexos, quando comparados ao apoE<sup>-/-</sup> C (tabela 1 e figura 8).

**Tabela 1** - Resultados da avaliação do perfil lipídico plasmático.

| <b>Colesterol total<br/>(mg/dL)</b> | <b>C57 C</b> | <b>apoE<sup>-/-</sup> C</b> | <b>apoE<sup>-/-</sup> P</b> | <b>apoE<sup>-/-</sup> N</b> | <b>apoE<sup>-/-</sup> P+N</b> |
|-------------------------------------|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <b>Machos</b>                       | 85±2,1       | 769±11 <sup>**</sup>        | 787±19                      | 679±41 <sup>#</sup>         | 694±21                        |
| <b>Fêmeas</b>                       | 76±2,6       | 816±3,1 <sup>**</sup>       | 691±24                      | 619±92 <sup>#</sup>         | 770±34                        |

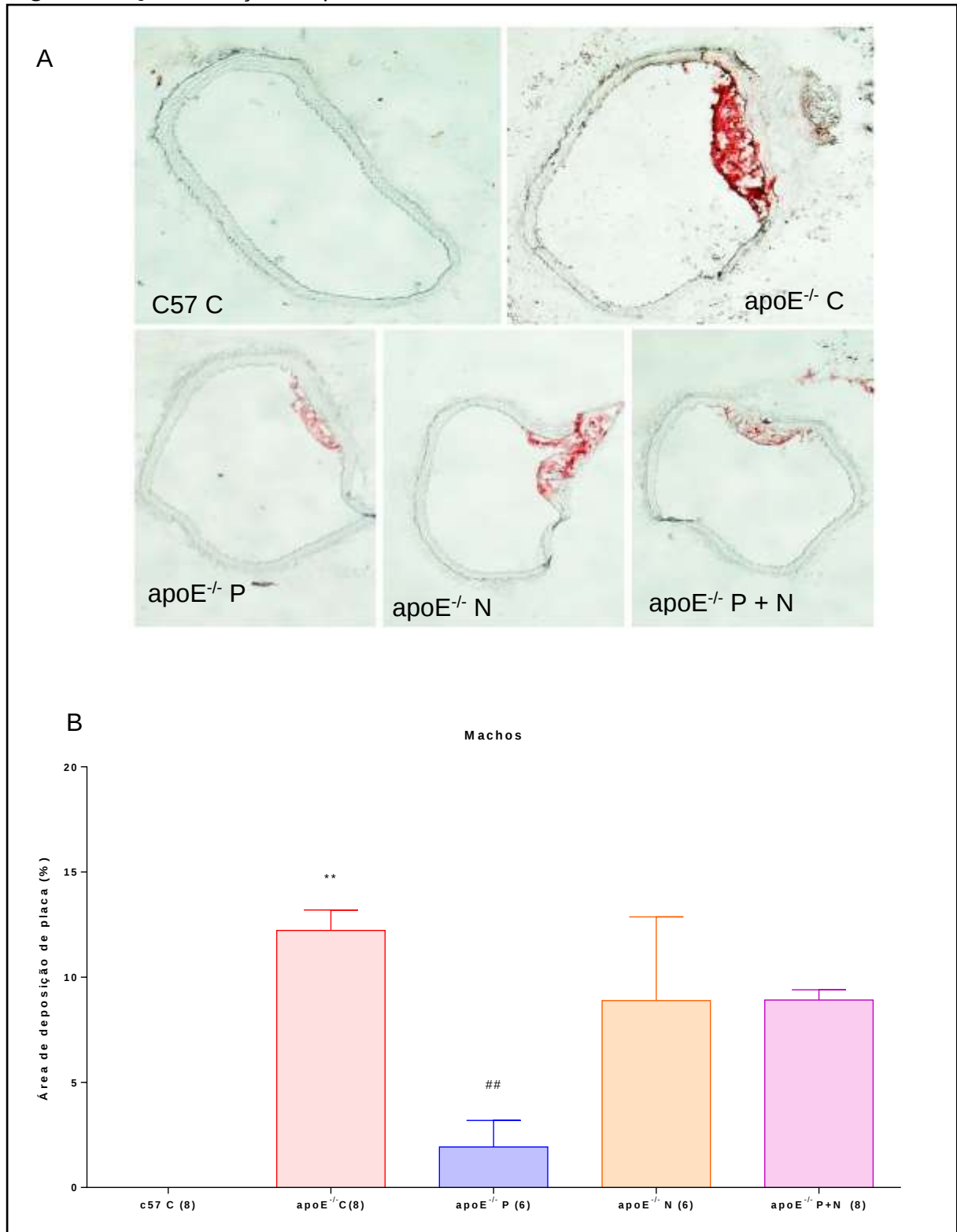
Valores expressos com média ± EPM. <sup>\*\*</sup>p<0,01 vs. C57 C; <sup>#</sup>p<0,05 vs. apoE<sup>-/-</sup> C

**Figura 8** - Representação gráfica do perfil de colesterol total

A = gráficos comparativos entre os machos C57 controles (C), apoE<sup>-/-</sup> nitrato (N), probióticos (P), nitrato + probióticos (P+N) e controle (C), com os respectivos números de animais. B = gráfico comparativos entre as fêmeas C57 controles (C), apoE<sup>-/-</sup> nitrato (N) probióticos (P), nitrato + probióticos (P+N) e controle sem tratamento (C), com os respectivos números de animais. Valores expressos com média  $\pm$  EPM. \*\*p<0,01 vs. C57 C; #p<0,05 vs. apoE<sup>-/-</sup> C.

## 6.2. Deposição de placa aterosclerótica

Na figura 9 é possível observar que os machos apoE<sup>-/-</sup> C (n= 8; 12 $\pm$ 0,97) apresentam marcantes deposições de placas quando comparados aos animais do grupo C57 C (n= 8; 0 $\pm$ 0). As placas foram observadas em maior concentração no arco aórtico. Nos machos, observamos redução significativa nos apoE<sup>-/-</sup> P (n= 6; 1,9 $\pm$ 1,3) em relação ao apoE<sup>-/-</sup> C. Os apoE<sup>-/-</sup> N (n= 6; 8,9 $\pm$ 4,0) e apoE<sup>-/-</sup> P + N (n= 8; 8,9  $\pm$  0,48) não apresentaram dissimilaridades em comparação ao apoE<sup>-/-</sup> C.

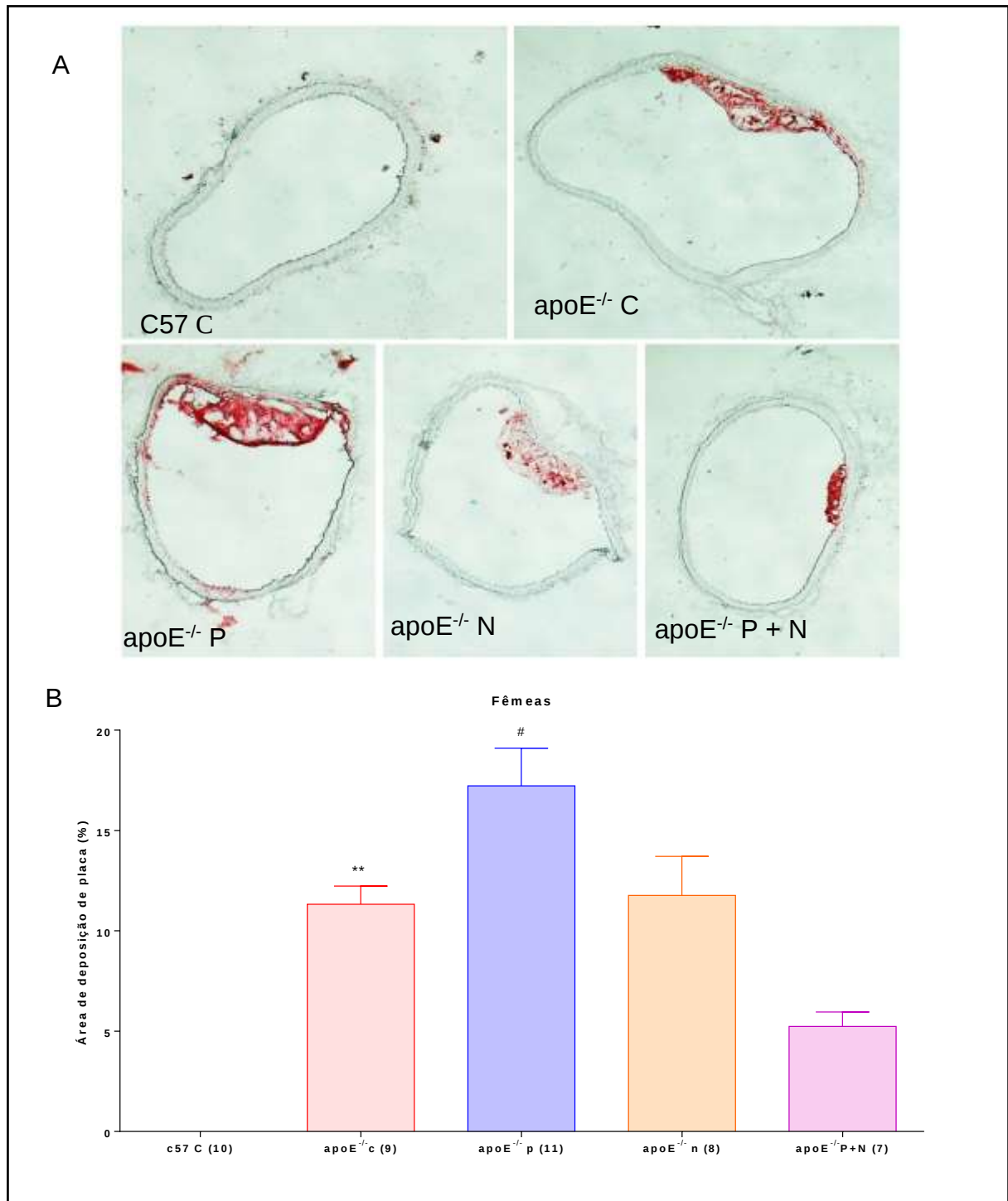
**Figura 9** - Quantificação de placa aterosclerótica em cortes transversais nos machos

A: imagem dos cortes corados com *OilRed*. B: Representação gráfica da deposição de placa aterosclerótica na aorta de animais controle e apoE<sup>-/-</sup>. Valores expressos com média ± EPM. \*\*p<0,01 C57 Cvs. apoE<sup>-/-</sup> C; #p<0,05 e ##p<0,01 vs. apoE<sup>-/-</sup> C.

Nas fêmeas, também foi possível a observação de diferenças estáticas entre apoE<sup>-/-</sup> C (n=9; 11±0,90\*\*) e C57 C (n= 10; 0±0). Nos apoE<sup>-/-</sup> P (n= 11; 17±1,9#) foi

identificada uma maior concentração de placas em comparação com o apoE<sup>-/-</sup> C (n= 9; 11±0,9). Os tratamentos apoE<sup>-/-</sup> N (n= 8; 12±1,9) e apoE<sup>-/-</sup> P + N (n= 7; 5,2±0,72) não apresentaram diferenças (figura 10).

**Figura 10** - Quantificação de placa aterosclerótica em cortes transversais nas fêmeas



A: imagem dos cortes corados com OilRed. B: Representação gráfica da deposição de placa aterosclerótica na aorta de animais controle e apoE<sup>-/-</sup>. Valores expressos com média ± EPM. \*\*p<0,01 C57 Cvs. apoE<sup>-/-</sup> C; #p<0,05 e ##p<0,01 vs. apoE<sup>-/-</sup> C.

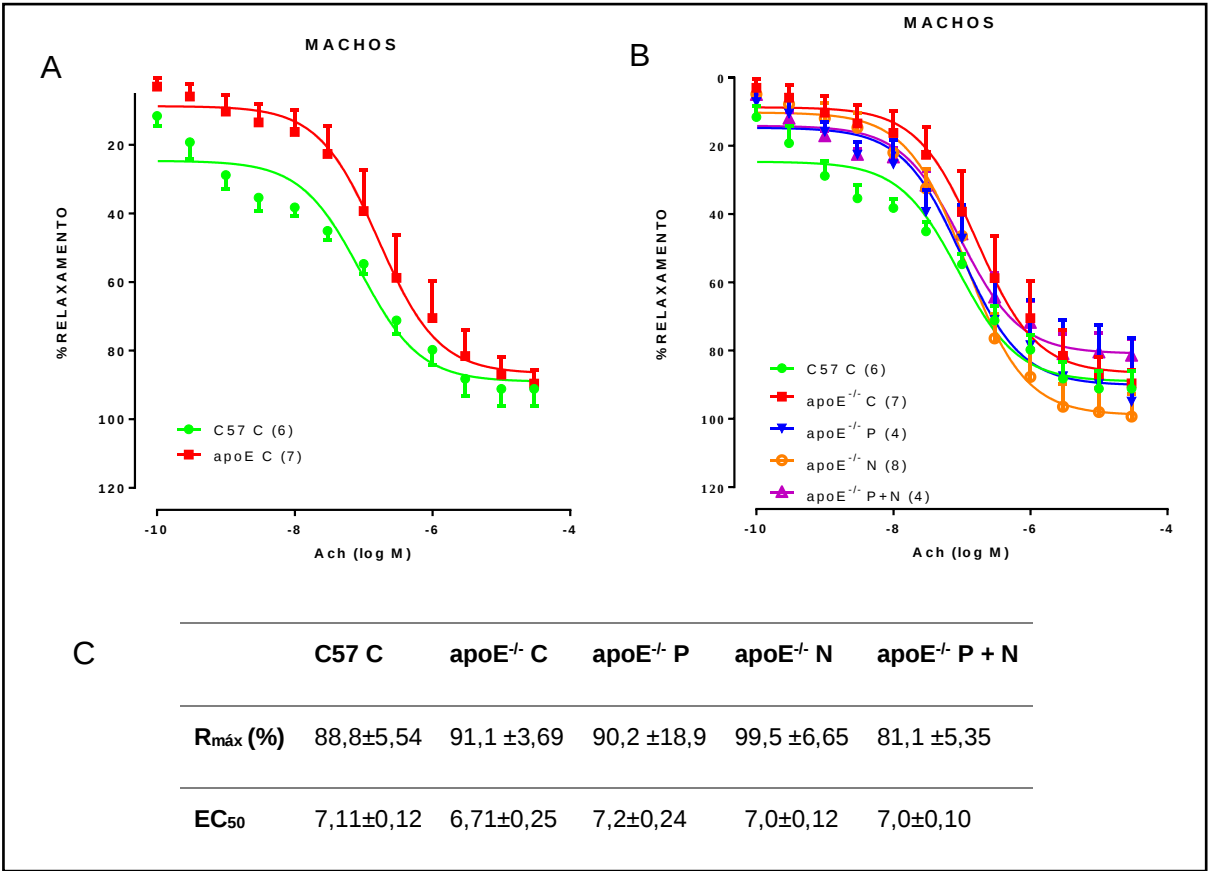
### **6.3. Reatividade vascular**

Os resultados obtidos na reatividade vascular foram avaliados através dos parâmetros das curvas doses-respostas em relação ao  $R_{\text{máx}}$  (eficácia) resposta máxima obtida na curva e o  $EC_{50}$  (sensibilidade) logaritmo de concentração para gerar 50% da resposta máxima.

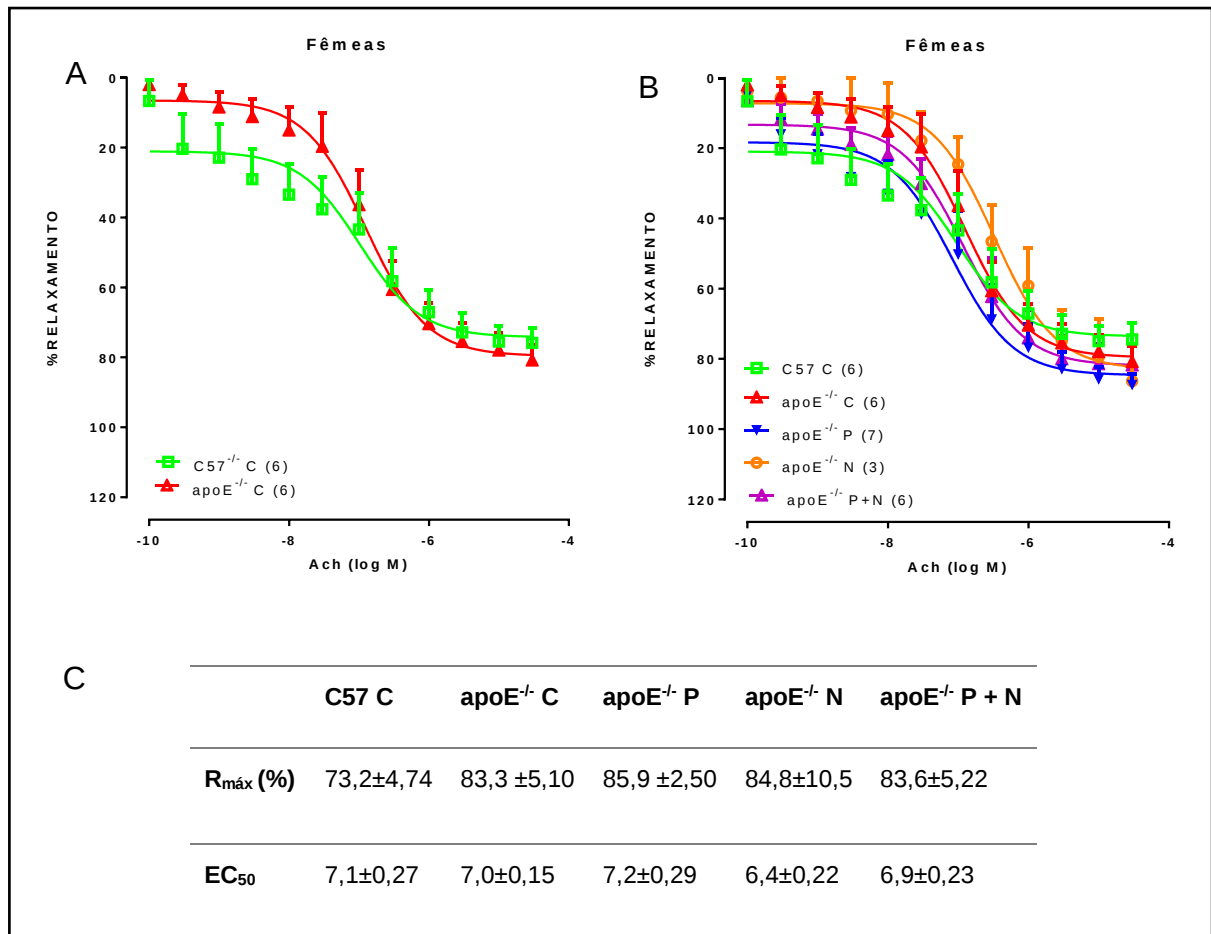
#### **6.3.1. Relaxamento dependente do endotélio**

O relaxamento por ACh em camundongos machos (figura 11A) e fêmeas (figura 12A) foram semelhantes e não foram observadas diferenças significativas (figura 11C e 12C). Em relação aos animais  $\text{apoE}^{-/-}$  machos e fêmeas, não foram observadas diferenças significativas no relaxamento induzido pela ACh entre os tratamentos (Figura 11B E 12B).

Figura 11 - Representação gráfica das curvas dose-resposta à ACh em machos



A: curvas comparativas entre os animais controles C57 e apoE<sup>-/-</sup>. B: agrupamento do C57 controle (C) com todas as curvas dos animais tratados. C: tabela com os valores R<sub>máx</sub>: resposta máxima (eficácia). EC<sub>50</sub>: logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade). Valores expressos com média ± EPM.

**Figura 12** - Representação gráfica das curvas dose-resposta à ACh em fêmeas

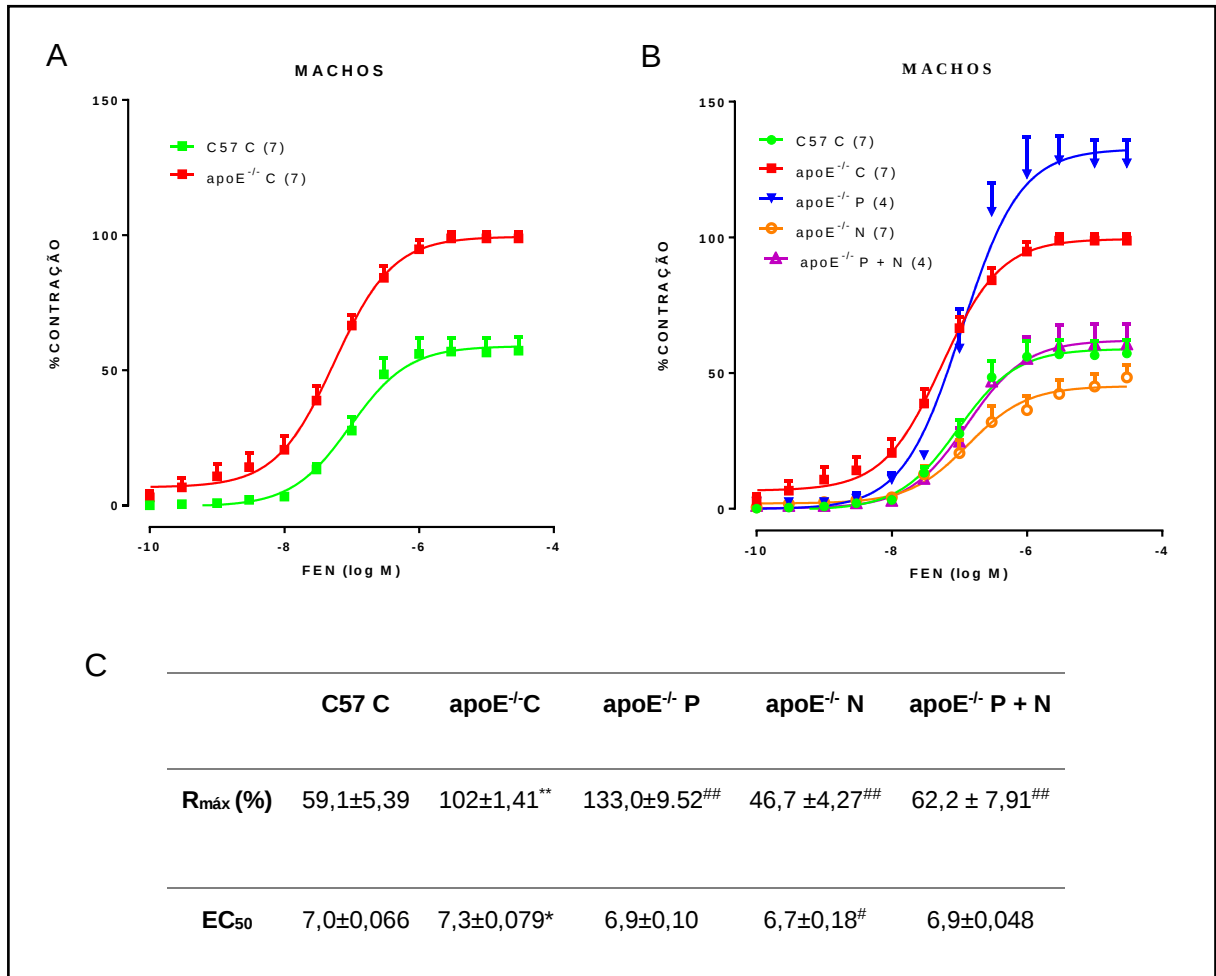
A: curvas comparativas entre os animais controles C57 e apoE<sup>-/-</sup>. B: agrupamento do C57 controle (C) com todas as curvas dos animais tratados. C: tabela com os valores R<sub>máx</sub>: resposta máxima (eficácia). EC<sub>50</sub>: logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade). Valores expressos com média ± EPM.

### 6.3.2. Participação do endotélio na contração a FEN

Ao realizar curvas dose-resposta a contração com FEN, os camundongos apoE<sup>-/-</sup> C machos (figura 13A) e fêmeas (figura 14A) apresentaram resposta significativa a FEN, quando comparados com os camundongos C57 C (figura 13C e 14C).

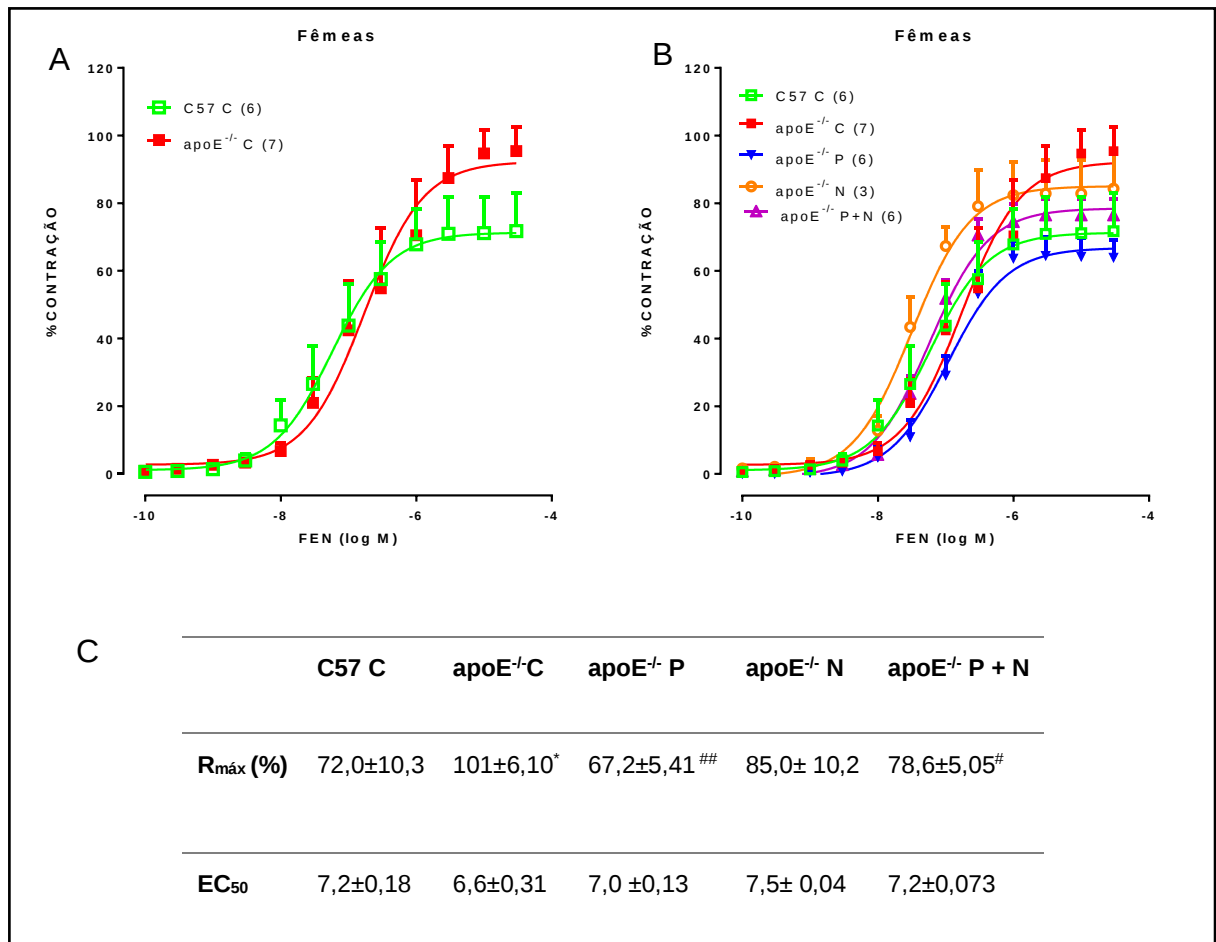
O tratamento dos apoE<sup>-/-</sup> P + N foi capaz de corrigir a vasoconstrição dos animais machos (n= 4; figura 13B) e fêmeas (n= 6; figura 14) se equiparando aos animais controles. Por outro lado, apenas os camundongos apoE<sup>-/-</sup> P fêmeas (figura 14B) apresentaram uma menor vasoconstrição, apresentando dissimilaridade do apoE<sup>-/-</sup> C e se igualando ao C57 C (figura 14C). Além disso, os machos apoE<sup>-/-</sup> P apresentaram maiores porcentagens na contração em relação ao seu controle apoE<sup>-/-</sup> C (figura 14C).

**Figura 13** - Representação gráfica das curvas dose-resposta a FEN nos machos em anéis com endotélio funcional



A: curvas comparativas entre os animais controles C57 C e apoE<sup>-/-</sup> C. B: agrupamento do C57 controle (C) com todas as curvas dos animais tratados. C: tabela com os valores R<sub>máx</sub>: resposta máxima (eficácia). EC<sub>50</sub>: logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade). Valores expressos com média ± EPM. <sup>\*</sup>p<0,05 e <sup>\*\*</sup>p<0,01 vs. C57 C <sup>#</sup>p<0,05 e <sup>##</sup>p<0,01 vs. apoE<sup>-/-</sup> C.

**Figura 14** - Representação gráfica das curvas dose-resposta a FEN nas fêmeas em anéis com endotélio funcional.

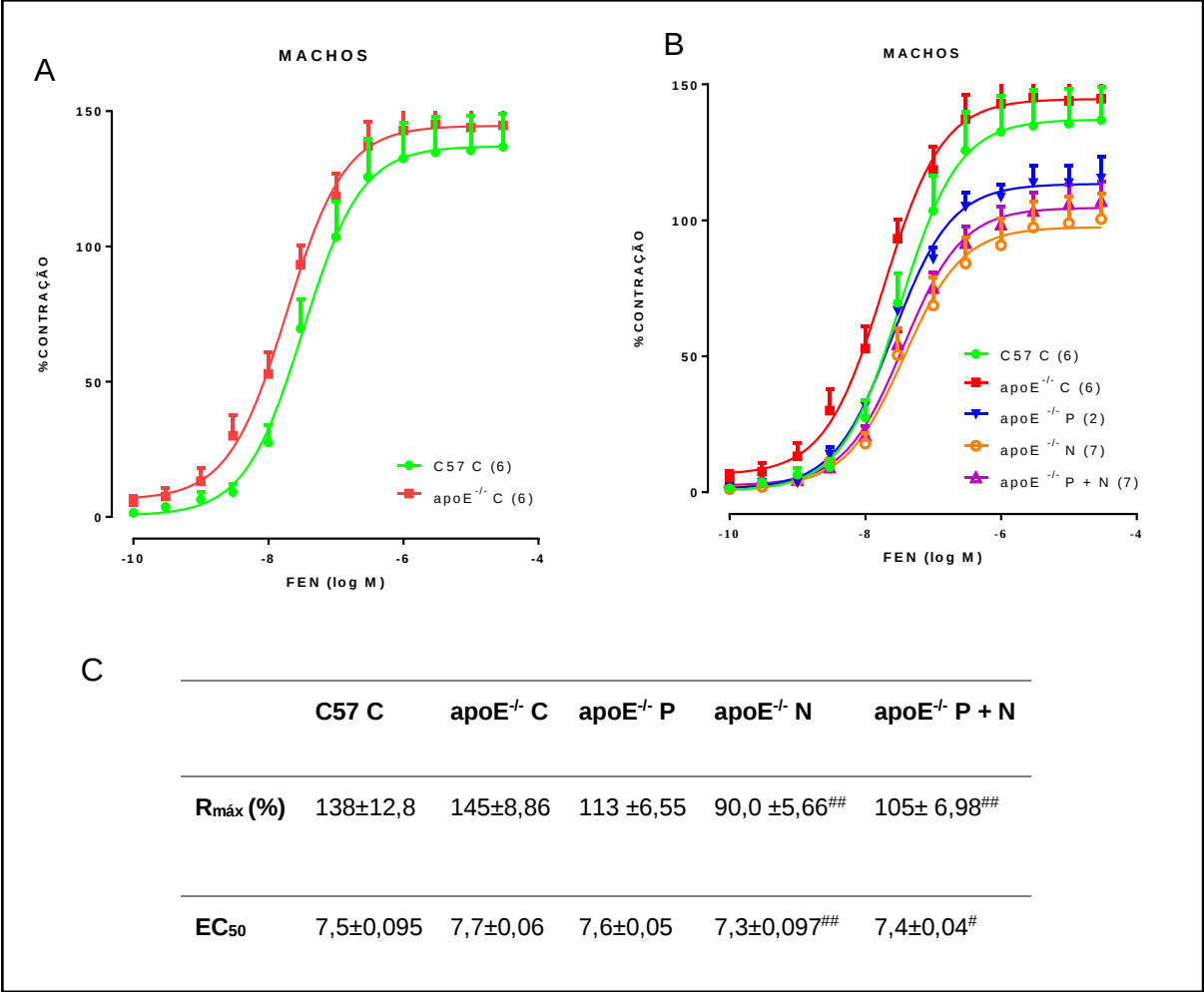


A: curvas comparativas entre os animais controles C57 C e apoE<sup>-/-</sup> C. B: agrupamento do C57 controle (C) com todas as curvas dos animais tratados. C: tabela com os valores R<sub>máx</sub>: resposta máxima (eficácia). EC<sub>50</sub>: logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade). Valores expressos com média ± EPM. \*p<0,05 vs. C57 C # p>0,05 e <sup>##</sup>p<0,01 vs. apoE<sup>-/-</sup> C.

### 6.3.3. Participação direta da musculatura lisa na contração a FEN

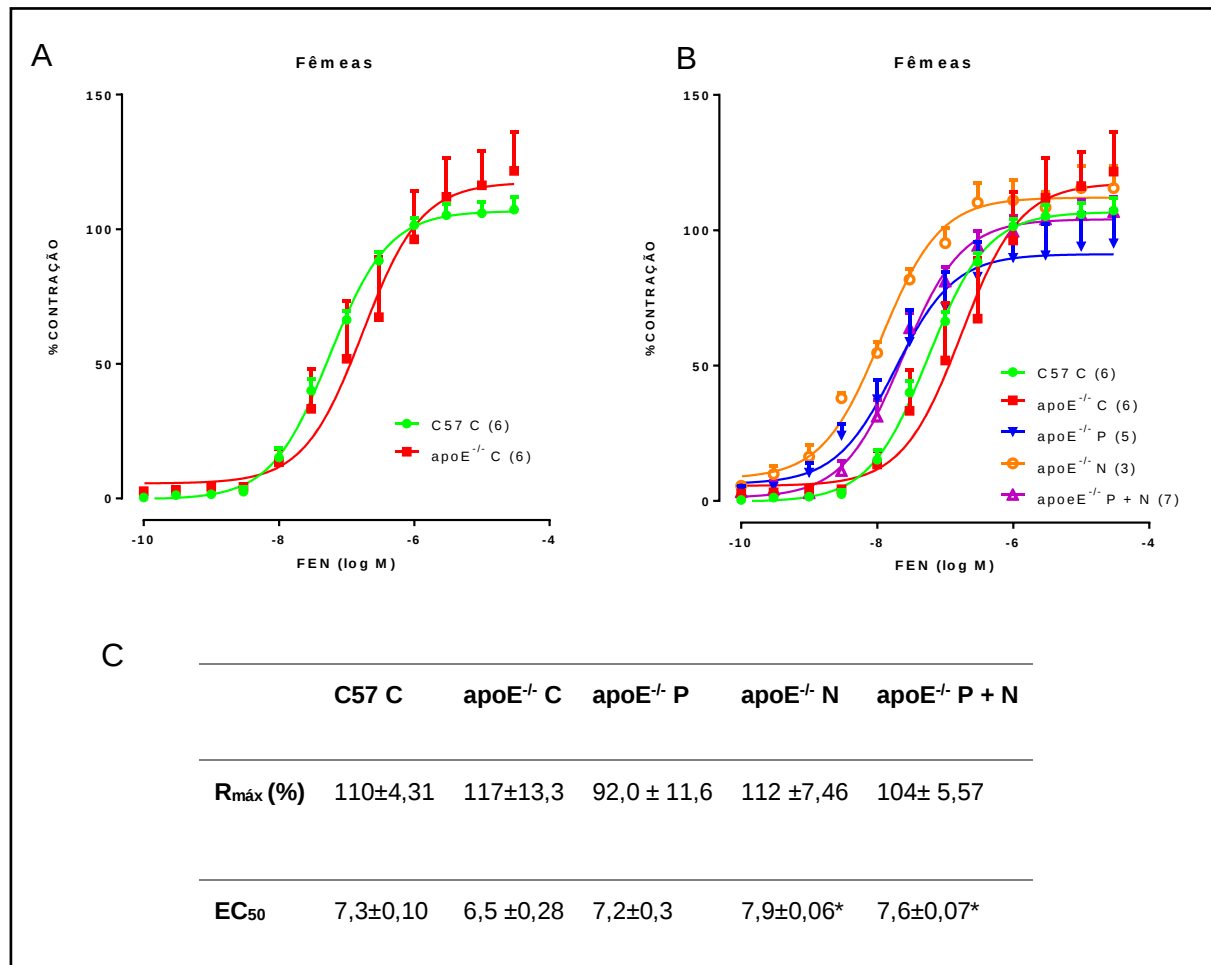
Não foram observadas diferenças significativas entre os controles C57 C e apoE<sup>-/-</sup> C machos (figuras 15A) e fêmeas (figuras 16A). Os tratamentos nos machos apoE<sup>-/-</sup> N (n= 7) e apoE<sup>-/-</sup> P + N (n= 7; figura 15B) reduziram a resposta máxima frente a FEN comparando com os apoE<sup>-/-</sup> C (n= 6; figura 15C). Nas fêmeas foram observados que os tratamentos apoE<sup>-/-</sup> N (n= 3) e apoE<sup>-/-</sup> P + N (n= 7) deixaram a musculatura lisa mais sensíveis, com diferenças significativas no EC<sub>50</sub>, quando comparados com os apoE<sup>-/-</sup> C (n= 6; figura 16).

**Figura 15** - Representação gráfica das curvas dose-resposta a FEN nos machos em anéis sem endotélio funcional



A: curvas comparativas entre os animais controles C57 C e apoE<sup>-/-</sup> C. B: agrupamento do C57 controle (C) com todas as curvas dos animais tratados. C: tabela com os valores R<sub>máx</sub>: resposta máxima (eficácia). EC<sub>50</sub>: logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade). Valores expressos com média ± EPM. <sup>#</sup>p<0,05 e <sup>##</sup>p<0,01 vs. apoE<sup>-/-</sup> C;

**Figura 16** - Representação gráfica das curvas dose-resposta a FEN nas fêmeas em anéis sem endotélio



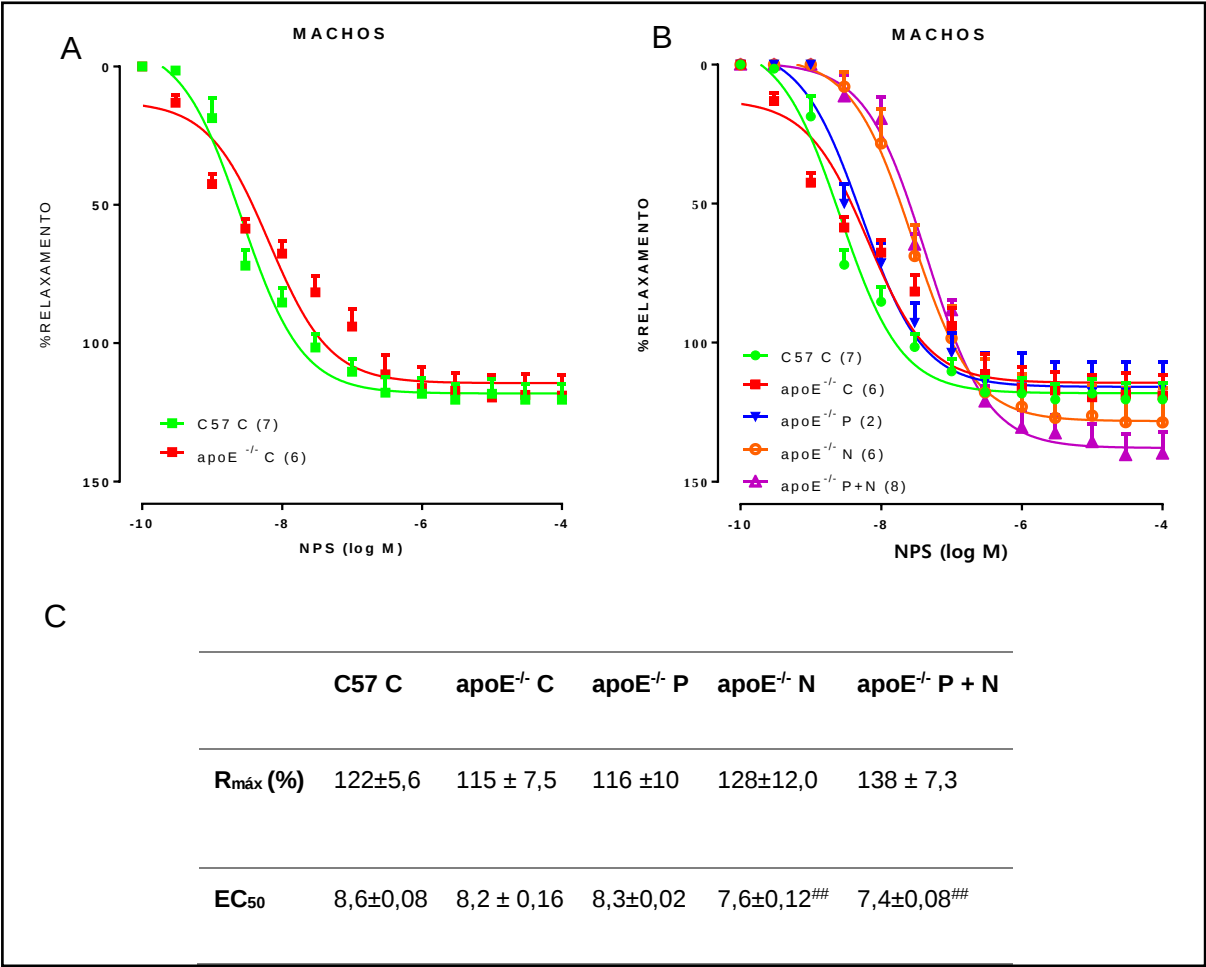
A: curvas comparativas entre os animais controles C57 C e apoE<sup>-/-</sup> C. B: agrupamento do C57 controle (C) com todas as curvas dos animais tratados. C: tabela com os valores R<sub>máx</sub>: resposta máxima (eficácia). EC<sub>50</sub>: logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade). Valores expressos com média ± EPM. \*p<0,05 vs. C57 C; ##p<0,01 vs. apoE<sup>-/-</sup> C

#### 6.3.4. Resposta do musculo liso ao NO

Após pré-contracção com FEN, foi adicionado doses crescentes de NPS. Nos machos não observamos diferenças significativas entre os apoE<sup>-/-</sup> C (n= 6) e o C57 C (n= 7; figura 17A), enquanto nas fêmeas, foi observado uma maior sensibilidade ao NPS nos apoE<sup>-/-</sup> C (n= 4) em relação aos C57 C (n= 6; figura 18A).

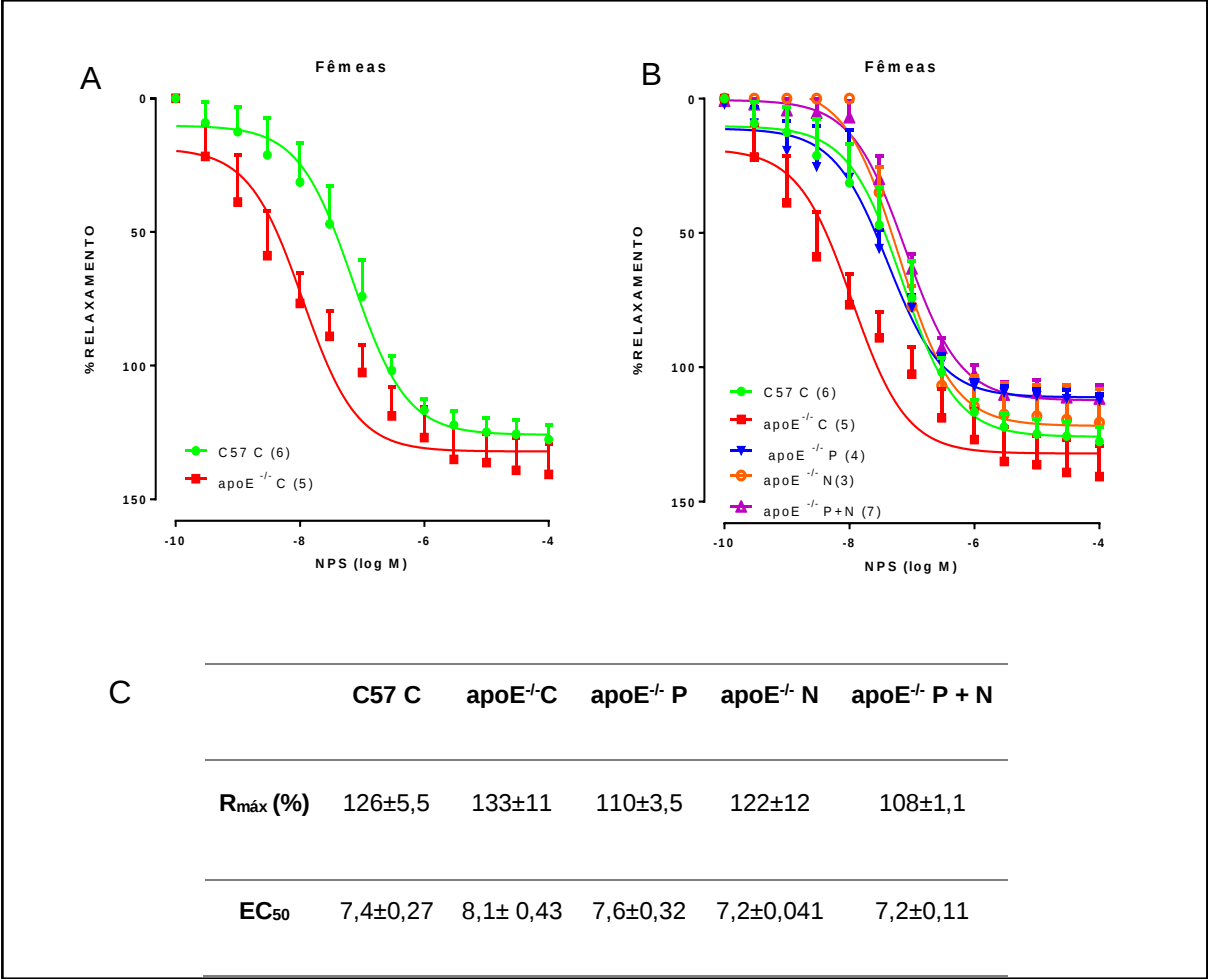
Conforme demonstrado na figura 17B, constatamos, que nos machos apoE<sup>-/-</sup> N (n= 6) e N + P (n= 8) apresentaram menor sensibilidade ao NPS, quando comparados aos apoE<sup>-/-</sup> C (n= 6; figura 17C). Já as fêmeas, apresentaram redução na sensibilidade ao NPS apenas no grupo apoE<sup>-/-</sup> N+P (n= 7; figura 18B e C).

**Figura 17** - Representação gráfica das curvas dose-resposta a NPS nos machos em anéis sem endotélio



A: curvas comparativas entre os animais controles C57 C e apoE<sup>-/-</sup> C. B: agrupamento do C57 controle (C) com todas as curvas dos animais tratados. C: tabela com os valores R<sub>máx</sub>: resposta máxima (eficácia). EC<sub>50</sub>: logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade). Valores expressos com média ± EPM. <sup>##</sup>p<0,01 vs. apoE<sup>-/-</sup> C.

**Figura 18** - Representação gráfica das curvas dose-resposta a NPS nas fêmeas em anéis sem endotélio



A: curvas comparativas entre os animais controles C57 C e apoE<sup>-/-</sup> C. B: agrupamento do C57 controle (C) com todos as curvas dos animais tratados. C: tabela com os valores R<sub>máx</sub>: resposta máxima (eficácia). EC<sub>50</sub>: logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade). Valores expressos com média ± EPM.

## 7. DISCUSSÃO

A alimentação desempenha papel importante para o início e progressão da aterosclerose. Dietas que apresentam grandes quantidades de gorduras e calorias são fatores de risco, assim como sedentarismo e hereditariedade (KOSTOGRYS, 2012). Plump et. al, (1992), quando desenvolveram o modelo apoE<sup>-/-</sup>, observaram que os animais que receberam dieta *western type* apresentaram aumento nos níveis de colesterol comparados aos modelos controle C57BL/6 (*Wild type*).

Nossos resultados demonstraram que a dieta aterogênica administrada aos animais apoE<sup>-/-</sup> durante 12 semanas foi suficiente para gerar um aumento de cerca de nove vezes nos níveis de colesterol plasmático total em relação os controles saudáveis. Esses resultados foram esperados, visto que esses animais não expressam a apolipoproteína, cuja função é reduzir os níveis de colesterol circulante. Esses resultados corroboram com os estudos de Balarini (2013), em que os animais também foram suplementados com a dieta e apresentaram aumento de colesterol em cerca de 12 vezes quando comparados aos controles.

Os probióticos, a exemplo dos *Lactobacillus*, têm se mostrados efetivos para a fermentação e decomposição de substâncias indigestíveis, estimulação do crescimento celular, regulação do sistema imunológico, controle de bactérias patogênicas e efeitos terapêuticos na progressão da aterosclerose (DING, et. al, 2017). Em um estudo com coelhos, a bactéria probiótica *Enterococcus faecium* CRL 183 suplementada durante 30 dias foi capaz de melhorar o perfil lipídico, mas não o desenvolvimento da aterosclerose (CAVALLINI, et al. 2009). Fak e Bacjhed (2012), trataram camundongos apoE<sup>-/-</sup> com três cepas distintas de *Lactobacillus reuteri* (ATCC PTA 4659, DSM 17938 (DSM), e L6798) por 12 semanas, e não observaram efeito no desenvolvimento da aterosclerose ou nos níveis de colesterol e triglicerídeos no sangue. Em nossos achados, ao comparar apenas os grupos suplementados com a cepa probiótica *L. plantarum* WJL e com a associação (*L. plantarum* + NaNO<sub>3</sub>), em machos e fêmeas, os resultados foram similares entre eles, nos quais esses tratamentos não apresentaram diferenças significativas na redução do colesterol.

Os hormônios femininos, os estrógenos, são moduladores importantes no metabolismo dos lipídeos, como redução da oxidação de LDL, alterações na expressão dos receptores para LDL, diminuição da lipase hepática das partículas de

HDL, na modulação da homeostase e inflamações vasculares auxiliando na baixa prevalência de aterosclerose. Estudos mostram que a interrupção desse hormônio após a menopausa aumenta o risco cardiovascular (CARNEIRO et al., 2014; BARTON, 2013). Chiba et al. (2011) pesquisaram se há diferença entre camundongos fêmeas e machos apoE<sup>-/-</sup> alimentados por dieta aterogênica por 16 semanas a partir da 10<sup>a</sup> semana de idade e concluíram que as fêmeas apresentaram lesões ateroscleróticas menores que machos e que o fator hormonal é responsável por proteger as fêmeas contra o desenvolvimento das lesões (CHIBA et al., 2011; MEYRELLES et al., 2011).

Foi realizado cortes histológicos da artéria aorta de todos os grupos de animais estudados, esses cortes foram corados com o *oil-Red* e foi possível observar desenvolvimento de placas na região do arco aórtico e uma porcentagem similar em ambos os sexos, cerca de 10% do lúmen do vaso estava comprometido com a presença dessas placas. Fang et al. (2019) suplementaram os camundongos apoE<sup>-/-</sup> com a cepa *L. rhamnosus* GR-1 durante 12 semanas, e observou redução do tamanho das lesões ateroscleróticas, redução do estresse oxidativo e da inflamação vascular. Em nossos machos, apoE<sup>-/-</sup> P observamos uma redução na porcentagem na placa. Curiosamente, nas fêmeas, apenas os apoE<sup>-/-</sup> P também apresentaram diferenças estáticas frente ao apoE<sup>-/-</sup> C, porém ocorreu um aumento na porcentagem de placas, resultado não esperado. Cabe estudos para identificar a possível interação dos probióticos nas lesões ateroscleróticas de fêmeas apoE<sup>-/-</sup>.

O NO tem como função restaurar a função endotelial essencial para retardar ou prevenir doenças cardiovasculares, pois é um ótimo anti-inflamatório. Estudos mostram que NO suplementado na dieta consegue prevenir lesões isquêmicas (BRYAN, 2007), restaurar a homeostase do NO em animais apoE<sup>-/-</sup> (BRYAN, 2008), reverter a disfunção endotelial pela preservação da redução do cofator tetra- hidrobiopterina (BH 4) e reduzir os níveis circulantes de proteína C reativa (PCR), que é um marcador agudo de inflamação sistêmica, um preditor independente de risco de aterosclerose (STOKES, 2009). Bakker e colaboradores (2016) analisaram diferentes concentrações de NaNO<sub>3</sub> dissolvido em água (10 mmol, 1 mmol e 0,1mmol), os animais tratados apresentaram níveis significativamente elevados de colesterol em comparação com os camundongos controles. Dessa forma, investigamos os efeitos da suplementação de NaNO<sub>3</sub> com doador de NO, observamos redução significativa do colesterol em machos e fêmeas quando comparados com os

apoE<sup>-/-</sup> C sem tratamento.

Quanto ao endotélio, este é responsável pela manutenção da homeostase vascular, cuja função é a regulação de inúmeros processos, a exemplo do tônus vascular através da produção de compostos vasoativos, permeabilidade vascular, migração e proliferação de células musculares lisas. O tônus é controlado pela liberação de substâncias como o NO, prostaciclina, fatores hiperpolarizantes derivados de endotélio e endotelina. A desregulação dessas substâncias pode gerar disfunção endotelial, promover uma diminuição na porcentagem de relaxamento e um aumento na contração do músculo liso (VANHOUTTE et al, 2009; BAR, 2019). A fim de comprovar a disfunção endotelial e uma possível melhoria, utilizamos anéis de artéria aorta dos animais presentes no nosso estudo e realizamos curvas dose-resposta a ACh e FEN.

A acetilcolina, agonista de receptores muscarínicos, ativa a entrada de Ca<sup>2+</sup> no endotélio intacto, esse aumento ativa a eNOS, levando ao relaxamento do vaso, mediado pelo NO. Esse processo caracteriza o comprometimento da resposta a vasodilatação em animais apoE<sup>-/-</sup>. Crauwels et al. (2003) observaram que em anéis de animais apoE<sup>-/-</sup> livres de placas, não se apresentaram alterações nas respostas a ACh quando comparados aos controles saudáveis, mostrando que seus achados evidenciam que a disfunção endotelial não é um processo sistêmico nos apoE<sup>-/-</sup> e que eles mantêm o relaxamento dependente de endotélio, quando não há formação de placas. Wang (2000) e Buus (2011), observaram em seus estudos que animais apoE<sup>-/-</sup> jovens com quatro meses de idade com dieta hipercolesterêmica apresentaram respostas semelhantes ao vasorelaxamento com ACh, quando comparadas a camundongos controles. Mesmo após 20 semanas, com dieta hipercolesterêmica Villeneuve (2003) não detectou alterações no relaxamento com ACh em animais apoE<sup>-/-</sup>. Nossos achados estão em concordância com a literatura. Ao realizarmos curvas de ACh em anéis com endotélio funcional não observamos diferenças significativas nas curvas-respostas, entre os apoE<sup>-/-</sup> C e C57 C machos e fêmeas, também não observamos diferenças entre os animais apoE<sup>-/-</sup> tratados com os apoE<sup>-/-</sup> C.

Contudo, ao realizar curva de FEN observamos que os animais apoE<sup>-/-</sup> C machos e fêmeas apresentaram altas taxas de contração a FEN, que é um agonista de receptores alfa adrenérgicos com atuação direta no músculo liso, mostrando que na presença de um agente constritor as células endoteliais desses animais estão comprometidas e não liberaram compostos vasorelaxantes. Portanto, comprovamos

através das curvas respostas frente à FEN deficiência na regulação do tônus vascular nesses apoE<sup>-/-</sup>.

Na aterosclerose, o ambiente oxidativo podem limitar a produção de NO derivado da eNOS, o nitrito pode induzir diretamente a vasodilatação no endotélio, resultado visto nos experimentos de Bryan (2008) nos quais o nitrito restaurou o tônus vascular após isquemia-reperfusão uma substituição da perda de NO derivado da eNOS em camundongos com deficiência de eNOS. Já Friques et al. (2020) analisaram a influência da contaminação com bisfenol A (BPA), e observaram efeitos protetores cardiovasculares produzidos pela suplementação de probióticos kefir (mix de probióticos) em ratos *wistar*, na qual o kefir foi capaz de restaurar a disfunção do endotélio em um modelo experimental infantil de contaminação ambiental por BPA, apresentando uma resposta de relaxamento semelhante ao controle. Ao analisar os nossos resultados os apoE<sup>-/-</sup> apresentaram melhoria no tônus vascular apresentando menor vasodilatação a FEN em anéis com endotélio funcional, em machos apoE<sup>-/-</sup> N, em ambos os sexos quando associado aos probióticos, e nas fêmeas apoE<sup>-/-</sup> P.

Os efeitos da hipercolesterolemia e aterosclerose na função contrátil vascular são controversos, a depender do agente contrátil, são relatadas porcentagens de contrações altas e baixas (BUUS, 2011). Estudos em cultura de células do músculo liso da aorta e cardiomiócitos mostraram que os probióticos podem aumentar a concentração de Ca<sup>2+</sup>, gerando uma maior resposta contrátil dos vasos sanguíneos e miocárdio (SOBOL et al. 2013). Ao suplementar animais obesos com a linhagem *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 foi observado aumento na resposta contrátil ao KCL e TXA2, e foi sugerido uma ação nos canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem ou mecanismos de influxo ao Ca<sup>2+</sup> (MAURICIO et al. 2017). Nos também identificamos uma intensa resposta máxima na contração a FEN dos animais machos apoE<sup>-/-</sup> P, essa resposta pode ser devido ao influxo de Ca<sup>2+</sup>.

Os músculos lisos são constituintes importantes para a atividade contrátil dos vasos sanguíneos, responde a vários agonistas contráteis devido a um aumento na concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>, eles possuem mecanismos moleculares que modulam a sensibilidade das contrações, fosforilação de proteínas que regulam a atividade funcionais permitindo que o músculo liso se contraia e mantenha a tensão dentro dos órgãos com uma ampla faixa de Ca<sup>2+</sup> (VOROTNIKOV et al., 2002; HALL, 2006). Visto isso, realizamos novamente contração a FEN e relaxamento com um doador de NO exógeno o NPS, dessa vez em anéis sem endotélio funcional, ou seja,

uma atuação direta no músculo liso.

Nas curvas-FEN observamos maiores percentagens de contrações nos animais apoE<sup>-/-</sup> C. Nos machos, identificamos melhoria vascular apresentando menor vasoconstrição nos grupos apoE<sup>-/-</sup> N e apoE<sup>-/-</sup> P + N, corroborando com os nossos dados anteriores na curva de FEN com presença do endotélio funcional. Porém, nos animais fêmeas apoE<sup>-/-</sup> observamos uma maior sensibilidade (EC<sub>50</sub>) a contração com FEN em todas os grupos tratados, mas não identificamos diferenças na resposta máxima, inferindo que os tratamentos influenciam a resposta ao músculo liso, mas não a ponto de aumentar a R<sub>máx</sub>, diferenciando dos machos que apresentaram uma R<sub>máx</sub> foi mais expressiva. Esses dados estão de acordo com Hall e colaboradores (2006), os quais avaliaram o mecanismo da vasoconstrição induzidas por agonistas em artérias mesentéricas humanas, de homens e mulheres, e observaram que nas contrações ao KCL os vasos dos homens apresentaram maiores R<sub>máx</sub> quando comparados aos vasos das fêmeas. Estudos relataram que o sistema vascular disfuncional dos animais apoE<sup>-/-</sup> não depende apenas da biodisponibilidade reduzida do NO, mas também da resposta alterada das células musculares lisas frente ao NO, com isso alguns autores não observaram diferenças nas curvas de NPS entre os apoE<sup>-/-</sup> C e C57 C (WANG et al., 2000; BALARINI et al., 2013).

Ao realizar curvas dose-resposta com o NPS, também não observamos diferenças estatísticas entre os animais controles, indicando que a responsividade do músculo liso vascular ao NO é preservada. Nos machos, observamos uma redução na sensibilidade dos apoE<sup>-/-</sup> N e apoE<sup>-/-</sup> P + N, quando comparados com os apoE<sup>-/-</sup> controles, observamos que a resposta ao NPS não é afetada pela administração dos probióticos, apenas quando associados ao NaNO<sub>3</sub>, sugerindo que *L. plantarum* WJL não afetam a sensibilidade do músculo liso vascular ao NO nos machos. Nas fêmeas tratadas, não observamos diferenças estáticas entre os grupos. Esses resultados dos machos apoE<sup>-/-</sup> podem ser em decorrência a suplementação com o NaNO<sub>3</sub>, pois Bakker e colaboradores (2016), suplementaram animais apoE<sup>-/-</sup> com NaNO<sub>3</sub> (10mmol), por 10 semanas e identificaram um aumento de cerca de 20 vezes nos níveis plasmáticos de nitrato em comparação com os controles.

## 8. CONCLUSÃO

Demonstrou-se pela primeira vez, com este trabalho, que o tratamento crônico com a associação de  $\text{NaNO}_3$  com *L. plantarum* WJL exerce efeitos vasculares benéficos na aterosclerose experimental. De maneira que melhora o tônus vascular, apresentando menor vasoconstrição com a FEN em ambos os sexos. Nossos tratamentos de formas isoladas também apresentaram respostas positivas. O  $\text{NaNO}_3$ , reduziu o colesterol em ambos os sexos, quando comparados aos controles apoE<sup>-/-</sup>, melhorou o tônus vascular, nos machos. Já a cepa de *L. plantarum* WJL, reduziu a formação das lesões de aterosclerose nos machos apoE<sup>-/-</sup> P e uma menor vasodilatação com a FEN (anéis com endotélio funcional), nas fêmeas.

Em conjunto, esses resultados sugerem que a associação é um agente terapêutico promissor no tratamento da aterosclerose, com importantes efeitos cardioprotetores. Porém, são necessárias mais investigações para identificar a segurança dessa associação.

## REFERÊNCIAS

- ANADÓN, A.; MARTINEZ-LARRAÑAGA, M. R.; ARANZAZU-MARTINEZ, M. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, n 1, p 91-95, 2006.
- ANCION, A.; TRIDETTI, J.; TRUNG, M. N.; OURY, C.; LANCELLOTTI, P.; A review of the role of bradykinin and nitric oxide in the cardioprotective action of angiotensin-converting enzyme inhibitors: focus on perindopril. **Cardiology and Therapy**. v. 8, n. 2, p. 179-191, 2019.
- AUGER, C; SAID, A.; NGUYEN, P.N; CHABERT, P.; IDRIS-KHODJA, N.; SCHINI-KERTH, V. B. potential of food and natural products to promote endothelial and vascular health. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 11-18, 2016.
- BAKKER, J. R.; BONDONNO, N. P.; GASPARI, T. A.; HARPER, B. K. K.; MCCASHNEY, A. J.; HODGSON, J. M.; CROFT, K.D.; WARD, N. C.; Low dose dietary nitrate improves endothelial dysfunction and plaque stability in the apoE<sup>-/-</sup> mouse fed a high fat diet. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 99,p. 189-198, 2016
- BALARINI, C. M.; LEAL, M. A.; GOMES, I, B, S.; PEREIRA, T. M. C.; GAVA, A. L.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C; Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 3, 2013
- BAR, A.; KORECKA, M. T.; SURAJ, J.; PRONIEWKI, B.; JASZTAL, A.; STERNAK, M.; PRZYBYLO, M.; KURPINSKA, A.; WALCZAK, M.; KOSTOGRYS, R. B.; SZYMONSKI, M.; CHLOPICKI, S.; degradation of glycocalyx and multiple manifestations of endothelial dysfunction coincide in the early phase of endothelial dysfunction before atherosclerotic plaque development in apolipoprotein e/low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Journal of the American Heart Association**. v. 8, n. 6, 2019.
- BARTON, M. Cholesterol and atherosclerosis: modulation by oestrogen. **Curr Opin Lipidol**. v. 24, n. 3, 2013
- BRYAN , N.S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radic Biol Med**. v. 43, n. 5, 2007.
- BRYAN, N.S.; CALVERT, J. W.; GUNDERWAR, S.; LEFER, D. F.; Dietary nitrite restores NO homeostasis and is cardioprotective in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. **Free Radic Biol Med**. v. 45, n. 4, 2008.
- BUUS, N. H.; HANSSON, N. C.; RODRIGUEZ, R. R.; STANKEVICIUS, E.; ANDERSEN, M. R.; SIFMONSEN, U.; Antiatherogenic effects of oleanolic acid in apolipoprotein E knockout mice. **Journal of Vascular Research**. v. 40, n. 2, p. 87-96, 2003.

CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELI, E.; BUTTERFIELD, D. A.; STELLA, A.; M.; G. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Reviews**, v. 8, p. 766-775, 2007.

CARNEIRO, S. S.; CARMINATI, R. Z.; FREITAS, F. P. S.; PODRATZ, P. L.; BALARINI, C. M.; GRACELI, J. B.; MEYRELLES, S. S.; VAZQUEZ, E. C.; GAVA, A. L.; Endogenous female sex hormones delay the development of renal dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. **Lipids Health Dis.** v. 13, n. 176, 2014.

CAVALLINI, D. C.; BEDANI, R.; BOMDESPACHO, L. Q.; VENDRAMINI, R. C.; ROSSI, E. A. Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health Dis.** v. 8, n. 1, 2009.

CAVALLINI, D. C.; SUZUKI, J. Y.; ABDALLA, D. S.; VENDRAMINI, R. C.; PAULY-SILVEIRA, N. D.; ROSELINO, M. N.; PINTO, R. A. ROSSI, E. A. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 10, p.1-9, 2011.

CHEN, J.; YE, Z.; WANG, X.; CHANG, J.; YANG, M.; ZHANG, H.; HONG, F.; YANG, S. Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 423-428, 2018.

CHIBA T, IKEDA M, UMEGAKI K, TOMITA T: Estrogen-dependent activation of neutral cholesterol ester hydrolase underlying gender difference of atherogenesis in apoE(-/-) mice. **Atherosclerosis**. 2011.

COSTA, W. K. A.; BANDÃO, L. R.; MARTINO, M. E.; GARCIA, E. F.; ALVES, A. F.; SOUZA, E. L.; AQUINO, J. S.; SAARELA, M.; LEULIER, F.; VIDAL, H.; MAGNANI, M.; Qualification of tropical fruit-derived *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotics acting on blood glucose and total cholesterol levels in Wistar rats. **Food Research International**. v. 124, p. 109-117, 2019.

CRAUWELS, H. M.; HOVE, C. E. V.; HOLVOET, P.; HERMAN, A. G.; BULT, H.; Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI. **Cardiovascular Research**. V. 59, n. 1, p. 189-199, 2003.

DEEL, E. D.; OCTAVIA, Y.; WAARD, M. C.; BER, M.; DUNCKER, D. J. Exercise training has contrasting effects in myocardial infarction and pressure overload due to divergent endothelial nitric oxide synthase regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p, 2018.

DEHAINI, H, FARDOUN, M.; SALEH, H.; EL-YAZBI, A.; EID, A. A.; EID, A. H. Estrogen in vascular smooth muscle cells: a friend or a foe?. **Vascular Pharmacology**. v. 111, p. 15-21, 2018.

DING, Y.; QIAN, L.; PANG, J.; LIN, J.; XU, Q.; WANG, L.; HUANG, D.; ZOU, H. The regulation of immune cells by *Lactobacilli*: a potential therapeutic target for anti-atherosclerosis therapy. **Oncotarget**. v. 8, n. 35, p. 59915-59928, 2017.

DUCHESNEAU, C. T.; JONES, M. L.; SHAH, D.; JAIN, P.; SAHA, S.; PRAKASH, S. Cholesterol assimilation by lactobacillus probiotic bacteria: an in vitro investigation. **BioMed Research International**, p 1-9, 2014.

EGEA, J.; FABREGAT, I.; FRAPART, Y. M.; GHEZZI, P.; GORLACH, A.; KIETZMANN, T.; KUBAICHUK, K.; KNAUS, U. G.; LOPEZ, M. G.; GONZALEZ, G. O., et al. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). **Redox Biology**. v. 13, p. 94-162.

FAK, F.; BACKHED, F. *Lactobacillus reuteri* Prevents Diet-Induced Obesity, but not Atherosclerosis, in a Strain Dependent Fashion in Apoe<sup>-/-</sup> Mice. **Plos One**. v. 7, n. 10, 2012.

FALK, E.; NAKANO, M.; BENTZON, J. F.; FINN, A. V.; VIRMANI, R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. **European Heart Journal**, v. 34, n. 10, p. 719-728, 2013.

FANG, Y.; CHEN, H. Q.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; XIA, J.; DING, K.; FANG, Z. Y. Probiotic administration of Lactobacillus rhamnosus GR-1 attenuates atherosclerotic plaque formation in ApoE<sup>-/-</sup> mice fed with a high-fat diet. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. V. 23, 2019.

FAO. **Probiotics**. Localizado em: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/en/>; acessado em: 04 de julho de 2018.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 46, n.3, 2000.

FRIQUES, A. G. F.; SANTOS, F. D. N.; ANGELI, D. B.; SILVA, A. C. S.; DIAS, A. T. AIRES, R.; LEAL, M. A. S.; NOGUEIRA, B. V.; AMORIM, F. G.; CAMPAGNARO, B. P.; PEREIRA, T. M.; TAIMIL, M. C.; MEYRESLLES, S. S.; VASQUEZ, E. C. Bisphenol A contamination in infant rats: molecular, structural, and physiological cardiovascular changes and the protective role of kefir. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. V. 75, 2020.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. v. 288, p. 372-376, 1980.

GBAGUIDI, G. C.; COLIN, S.; STAELS, B. Macrophage subsets in atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 12, p. 10-17, 2015.

GISTERÃ, A.; HANSSON, G. K. The immunology of atherosclerosis. **Nature Reviews Nephrology**. v. 13, n. 6, p. 268-380, 2017.

GOIKURIA, H; VANDRNBROECK, K.; ALLOZA, I. Inflammation in human carotid atheroma plaques. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 39, p. 62-10, 2018.

GOPOJU, R.; PANANGIPALLI, S.; KOTAMRAJU, S. Metformin treatment prevents SREBP2-mediated cholesterol uptake and improves lipid homeostasis during oxidative stress-induced atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 118, p. 85-97, 2018.

HAHN, C.; SCHWARTZ, M. A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, p. 53-62, 2009.

HALL, D. D.; FEEKES, J.A.; ARACHCHIGE, D. A. S.; SHI, M.; HAMID, J.; CHEN, L. STRACK, L. ZAMPONI, G. W.; HORNE M. C. HELL, J. W. Binding of protein phosphatase 2A to the L-type calcium channel Cav1.2 next to Ser1928, its main PKA site, is critical for Ser1928 dephosphorylation. **Biochemistry**. v.45, n, 10, p. 3448-59, 2006.

HARRISON, D.; GRIENDLING, K. K.; LANDMESSER, U.; HORNING, B.; DREXLER, H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **American Journal of Cardiology**, v. 91, n. 3, p. 7-11, 2003.

HUSAIN, K.; HERNANDEZ, W.; ANSARI, R. A.; FERDER, L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. **World Journal Biological Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 209-217, 2015.

IVANOVA, E. A.; BOBRY SHEV, Y.; OREKHOV, A. N. Intimal pericytes as the second line of immune defence in atherosclerosis. **World Journal of Cardiology**, v. 7, n. 10, p. 583-593, 2015.

JADERT, C.; PETERSSON, J.; MASSENA, S.; GRANPENSPARR, L.; HOLM, L.; LUNDBERG, J. O.; PHILLIPSON, M. Decreased leukocyte recruitment by inorganic nitrate and nitrite in microvascular inflammation and NSAID-induced intestinal injury **Free Radical Biology and Medicine**. v. 53. n. 1, p. 683-692, 2012.

LUDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T.; The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature**. v. 7, p. 156- 167, 2008.

KERRY, R. G.; PATRA, J. K.; GOUDA, S.; PARK, Y.; SHIN, H.; DAS, G. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, p. 927 - 939, 2018.

KOCH, C. D.; GLADWIN, M. T.; FREEMAN, B.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; MORRIS, A.; Enterosalivary nitrate metabolism and the microbiome: intersection of microbial metabolism, nitric oxide and diet in cardiac and pulmonary vascular health. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 105, p. 48-67, 2017.

KOLOVOU, G.; ANAGNOSTOPOULOU, K.; MIKHAILIDIS, D. P.; COKKINOS, D. V.; Apolipoprotein E Knockout Models. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 338-351, 2008.

KOSTOGRYS, R. B.; FRANCY-ZARÓW, M.; MASLAK, E.; GAJDA, M.; MATEUSZUK, L.; JACKSON, C. L.; CHLOPICKI, S.; Low carbohydrate, high protein

diet promotes atherosclerosis in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double knockout mice (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>). **Atherosclerosis**. v. 223, n. 2, p. 327-331, 2012.

LAGRANHA, C. J.; SILVA, T. L. A.; SILVA, S. C. A.; BRAZ, G. R. F.; SILVA, A. I.; SELLITTI, D. F.; Protective effects of estrogen against cardiovascular disease mediated via oxidative stress in the brain. **Life Sciences**. v. 192, p. 190-198, 2018.

LEE, J.; BAE, E.; MA, S. K.; KIM, S. W. Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases. **Chonnam Medical Journal**, v. 52, n. 2, p. 81-90, 2016.

LI, H.; HORKE, S.; FORSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 237, n. 1, p. 208-219, 2014.

LIBBY, P.; BURING, J. E.; BADIMON, L.; HANSSON, G. K.; DEANFIELD, BITTERN COURT, M. S.; TOKGOZOGLU, L.; LEWIS, E. F.; Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*. v. 5, n. 56, 2019.

LIMA, L. C. F.; BRAVA, V. A.; SILVA, M. S. F.; CRUZ, J. C.; SANTOS, S. H. S. MONTEIRO, M. M. O.; BALARINI, C. M. Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. **Frontiers in Physiology**, v.6, n. 304, p. 1-15, 2015.

LIND, M.; HAYES, A.; CAPNDA, M.; PETROVIC, D.; RODRIGO, L.; KRUZLIAL, ZULII, A. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 93, p. 370-375, 2017.

MARKOWIAK, P. SLIZEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 2018.

MAURICIO, M. D.; SERNA, E.; MURGA, M. L. F.; PORTERO, J.; ALDASORO, M.; VALLES, S. V.; SANZ, Y.; VILA, J. M.; Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 supplementation restores altered vascular function in an experimental model of obese mice. **International Journal of Medical Sciences**, v. 14, n. 5, p. 444-452, 2007.

MCLAREN, J. E.; MICHAEL, D. R.; ASHLIN, T. G.; RAMJI, D. P. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Progress in Lipid Research*, v. 50, n. 4, p. 331-447, 2011.

MEYRELLES, S. S.; PEOTTA, V. A.; PEREIRA, T. M.; VASQUEZ, E. C.; Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids in Health and Disease**. v. 10, n. 211, 2011.

MONCADA, S.; HIGGS, A.; The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**. v. 329, n. 27, p. 2002-2012. 1993.

MOSS, J. W. E.; WILLIAMS, J. O.; RAMJI, D. P.; Nutraceuticals as therapeutic agents for atherosclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 5. P 1562-1572, 2018.

MURPHY, E.; Estrogen Signaling and Cardiovascular Disease. **Circulation Research**. v. 109, p. 687-696, 2011.

OMS. **Cardiovascular disease**. localizado em:

[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/>](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/>); acessado em: 01 de julho de 2018;

OU, H. X.; GUO, B.; LIU, Q.; LI, Y, K.; YANG, FENG, W.; MO, Z. Regulatory T cells as a new therapeutic target for atherosclerosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2018;

PEARSON, T. A.; LAURORA, I. CHU, H.; KAFONEK, S. The lipid treatment assessment project (L-TAP): a multicenter survey to evaluate the percentages of dyslipidemic patients receiving lipid-lowering therapy and achieving low-density lipoprotein cholesterol goals. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, n. 4, p. 459–467, 2000.

PITSIKAS, N. The role of nitric oxide (NO) donors in anxiety. Lighys and shadows. **Nitric Oxide**, v. 77, p. 6-11, 2018.

PLUMP, A.S.; SMITH, J.D.; HAYEK, T.; AALTO-SETALA, K. WALSH, A. VERSTUYFT, J. G.; RUBIN, E. M.; BRESLOW, J. L; Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**. V. 71, n. 2, p. 343–353,1992.

RADER, D. J.; DAUGHERTY, A.; Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature**, v. 451, p. 904-013, 2008.

RAUTBAR, A; BALLANTYNE, C. M. Pharmacological strategies for lowering LDL cholesterol: statins and beyond. **Nature Reviews Cardiology**, v. 8, n. 5, p. 253–265, 2011.

RYU, J. H.; KIM, S. H.; LEE, H. Y.; BAI, J. Y.; LEE, W. J. Innate Immune Homeostasis by the Homeobox Gene Caudal and Commensal-Gut Mutualism in *Drosophila*. **SCIENCE**. v. 319, n. 5864, p. 777-782.

SBC. **Consensos / Diretrizes**. Localizado em:

<<http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes.asp>>; acessado em: 04 de julho de 2018.

SIEZEN, R. J.; TZENEVA, V. A. CASTIONI, A.; WELS, M.; PHAN, H. T. K. RADEMAKER, J. W. L; VAN, H. V. J. E. T.; Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. **Environmental Microbiology**. v. 12, n. 3, p.758-773, 2010.

SOBOL, C. V.; KOROTKOV, S. M.; BELOSTOTSKAYA, G. B.; NESTEROV, V. P. The influence of probiotics and probiotic product on respiration of mitochondria and intracellular calcium signal in cells of cardiovascular system. **Membrane and Cell Biology**. v. 7, n. 4, p. 294-301, 2013.

SOLANKI, A.; BHATT L. K.; JOHNSTON T. P. Evolving targets for the treatment of atherosclerosis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 187, p. 1-12, 2018.

STROKES, K. Y.; DUGAS, T. R.; TANG, Y.; GARG, H. Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Fisiology**, v. 296, n. 5, 2009.

TABAS, I; CARDEÑA, G. G.; OWENS, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. **Journal of Cell Biology**, v. 209, n. 1, 2015.

TREUER, A. V.; GONZALEZ, D. R.; Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities (Review). **Molecular Medicine Reports**. v. 11, n. 3, p. 1555-1565, 2014.

VANHOUTTE, P. M.; SHIMOKAWA, H.; TANG, E. H.; FELETOU, M.; Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiol (Oxf)**. v. 196, n. 2, p. 193-222, 2009.

VERSARI, D.; DAGHINI, E.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L. TADDEI, S.; Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. **British Journal of Pharmacology**. v. 157, n. 4, p. 527-538, 2009.

VILLENEUVE, N. FORTUNO, A.; SAUVAGE, M.; FOURNUER, N.; BREUGNOT, C.; JACQUEMIN, C.; PETIT, C.; GOSGNACH, W.; CARPENTIER, N.; VANHOUTTE, VILAIN, J. V.; Persistence of the Nitric Oxide Pathway in the Aorta of Hypercholesterolemic Apolipoprotein-E-Deficient Mice. **Journal Vascular Research**. V. 40, n. 2, p. 87-96, 2003.

VOROTNIKOV, A. V.; KRYMSKE, M. A.; SHIRINSKY, V. P.; Signal Transduction and Protein Phosphorylation in Smooth Muscle Contraction. **Biochemistry (Moscow)**, v. 67, n. 12, p. 1309-1328, 2002.

WANG, Y.; MILLER, M. H.; VERGONA, R.; SULLIVAN, M.; Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**. v. 278, 200.

YIRGA, H. The Use of Probiotics in Animal Nutrition. **Journal of Probiotics & Health**. v. 3, n. 132, p. 1-10, 2015.

ZAMPETAKI, A.; DUDEK, K.; MAYR, M. Oxidative stress in atherosclerosis: The role of microRNAs in arterial remodeling. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 64, p. 69-77, 2013.