

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

ROXANE CARVALHO LIMA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE NITRATO DE SÓDIO E
Lactobacillus plantarum WJL PARA O TRATAMENTO DA ATEROSCLEROSE
EM CAMUNDONGOS FÊMEAS *KNOCKOUT* PARA APOLIPOPROTEÍNA E**

JOÃO PESSOA – PB

2020

ROXANE CARVALHO LIMA

Área de concentração: BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Linha de pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE AGENTES TERAPÊUTICOS,
PROFILÁTICOS E DE DIAGNÓSTICO

Título da dissertação:

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE NITRATO DE SÓDIO E
Lactobacillus plantarum WJL PARA O TRATAMENTO DA ATEROSCLEROSE EM
CAMUNDONGOS FÊMEAS *KNOCKOUT* PARA APOLIPOPROTEÍNA E

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal da Paraíba como
requisito para a obtenção do título de Mestre
em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

JOÃO PESSOA – PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732a Lima, Roxane Carvalho.

Avaliação dos efeitos da associação entre nitrato de sódio e *Lactobacillus plantarum* WJL para o tratamento da aterosclerose em camundongos fêmeas knockout para apolipoproteína E / Roxane Carvalho Lima. - João Pessoa, 2020.

67 f. : il.

Orientação: Valdir de Andrade Braga.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBiotec.

1. Doenças cardiovasculares. 2. Nitrato inorgânico. 3. Probiótico. I. Braga, Valdir de Andrade. II. Título.

UFPB/BC

Roxane Carvalho Lima

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE NITRATO DE SÓDIO E
Lactobacillus plantarum WJL PARA O TRATAMENTO DA ATEROSCLEROSE
EM CAMUNDONGOS FÊMEAS KNOCKOUT PARA APOLIPOPROTEÍNA E**

Aprovada em 05/06/2020

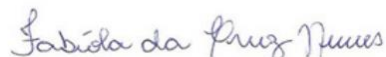
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga
Orientador



Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Membro interno



Profa. Dra. Fabíola da Cruz Nunes
Membro externo

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida.

A Nossa Senhora por me conceder força para superar as dificuldades e ser o meu amparo nos momentos de angústia.

Aos meus pais Margareth e Ridagno e minha irmã Raíne pelo amor, incentivo e apoio incondicional ao longo dessa caminhada.

Aos meus avós maternos Elisa (*in memoriam*) e Waldemir (*in memoriam*) e avós paternos Heliane e Elmanoel por nunca medirem esforços pra eu pudesse ter a melhor educação possível.

A Guilherme, meu namorado. Obrigada pelo carinho, paciência, compreensão, por ser meu porto seguro e me trazer paz nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga por ter acreditado em mim e no meu potencial sem mesmo me conhecer. Agradeço pela oportunidade de fazer parte do LACONCHA.

À Profa. Dra. Marciane Magnani por ter aberto as portas do LPMA e ter me recebido com tanto carinho, fazendo com que eu me sentisse acolhida. Guardo no coração todos os momentos de confraternização.

À Profa. Dra. Camille Balarini pela paciência e ensinamentos. Obrigada por ser tão solícita, prestativa e também pelo apoio psicológico e emocional.

À Iynna, minha parceira de experimentos. Sem a sua ajuda tudo teria sido bem mais difícil. Sou muito grata por sua amizade e por tudo que passamos juntas ao longo desses dois anos. Foram muitos momentos alegres e também muitas dificuldades, mas conseguimos vencer.

Aos meus amigos do FunLab (Iynna, Camila, Mickael, Danilo, Anderson, Giovana, Luciana, Micaelle, Patrícia, Airlla, Sara, Alynne e Larissa). A amizade de vocês foi um presente que ganhei nesse mestrado. Obrigada por tornarem os dias no laboratório muito melhores e mais leves.

Aos demais amigos por compreenderem os meus momentos de ausência e por sempre me incentivarem e apoiarem.

A Ericka, Francineide e Clara por sempre estarem dispostas a ajudar e ensinar.

Aos técnicos no LACONCHA (Sara, Clênia e Matheus) pelo trabalho desempenhado no laboratório em cuidar dos animais e pela ajuda quando necessária.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por todo o conhecimento compartilhado.

À banca por aceitarem participar desse momento tão importante para mim e por todas as contribuições.

Às agências de fomento CAPES e FAPESQ pelo apoio financeiro.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

(São Francisco de Assis)

RESUMO

A aterosclerose é uma patologia que está associada ao aumento dos níveis de colesterol e é considerada uma das principais causas que levam ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Sua patogênese se caracteriza pela formação de placas (ateromas) ao longo das artérias, estimulada por um processo inflamatório. A inflamação ocorre devido aos danos às paredes arteriais provocados por diversos fatores de risco como diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia. O nitrato inorgânico está amplamente disponível na dieta, podendo ser encontrado em vegetais de folhas verdes e beterraba. Na via nitrato-nitrito-NO, o nitrato é reduzido a nitrito por bactérias presentes na cavidade oral. Quando alcança o estômago, o nitrito é reduzido a óxido nítrico. O óxido nítrico é importante para a homeostase vascular, uma vez que induz o relaxamento dos vasos, evitando assim a adesão de elementos celulares e diminuindo a inflamação. Por meio dessa ação, o óxido nítrico atua como antiaterogênico, sendo fundamental na gênese da aterosclerose. Probióticos são organismos vivos que trazem benefícios à saúde de seu hospedeiro e estão presentes no intestino de pessoas saudáveis. Estudos recentes demonstram sua possível capacidade de prevenir a aterosclerose por meio da redução do colesterol total, LDL e triglicerídeos. O presente estudo avaliou os efeitos da associação entre nitrato inorgânico e probiótico administrado por via oral para o tratamento da aterosclerose em camundongos fêmeas *knockout* para apolipoproteína E. Foram utilizados camundongos das linhagens C57BL/6 e apoE^{-/-}, onde os últimos receberam dieta aterogênica a partir de 8 semanas de idade. Os tratamentos duraram 12 semanas e consistiam em nitrato inorgânico (NaNO₃) diluído em água (10mM) e probiótico (*Lactobacillus plantarum* WJL) administrado por meio de gavagem (10⁹ UFC/mL). Dessa forma, os animais foram divididos em cinco grupos: C57BL/6, *knockout* para apolipoproteína E controle (apoE^{-/-} CT), *knockout* para apolipoproteína E tratado com nitrato inorgânico (apoE^{-/-} NT), *knockout* para apolipoproteína E tratado com probiótico (apoE^{-/-} PB) e *knockout* para apolipoproteína E tratado com nitrato inorgânico e probiótico (apoE^{-/-} NT+PB). O soro foi utilizado para a dosagem de colesterol total. A aorta foi coletada para a avaliação de deposição de placas ateroscleróticas. Para a realização do teste de tolerância à glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina (ITT) coletou-se uma gota de sangue da ponta da cauda dos animais através de uma incisão. Os camundongos apoE^{-/-} CT (n = 7) mostraram incremento de 9 vezes no nível de colesterol total comparado com os C57BL/6 (n = 9) (816 ± 3.1 mg/dL vs. 90 ± 7.2 mg/dL) e o nitrato apresentou efeito hipocolesterolêmico (816 ± 3.1 mg/dL vs. 619 ± 92 mg/dL (n = 4)). Além disso, a associação de nitrato + probiótico (n = 7) foi capaz de reduzir a deposição das placas ateroscleróticas (13 ± 0.98% (n = 6) vs. 5.2 ± 0.72% (n = 9)). Os grupos C57BL/6 e apoE^{-/-} CT mostraram perfis glicêmicos semelhantes, mas os grupos tratados com probiótico e com a associação apresentaram pico aos 15 minutos da curva do teste de tolerância à glicose, retornando aos valores basais ao longo do tempo. Entretanto, nenhum dos tratamentos alterou o teste de tolerância à insulina. Assim, conclui-se que o tratamento com nitrato é suficiente para reduzir o colesterol na aterosclerose, entretanto a associação de nitrato e probiótico é necessária para que haja uma eficiente redução das placas ateroscleróticas.

Palavras-chave: Doenças cardiovasculares, nitrato inorgânico, probiótico.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a pathology that is associated with increased cholesterol levels and is considered one of the main causes that lead to the development of cardiovascular diseases. Its pathogenesis is characterized by the formation of plaques (atheromas) along the arteries, stimulated by an inflammatory process. Inflammation occurs due to damage to arterial walls caused by several risk factors such as diabetes, hypertension and hypercholesterolemia. The inorganic nitrate is widely available in the diet and can be found in green leafy vegetables and beets. In the nitrate-nitrite-NO pathway, nitrate is reduced to nitrite by bacteria present in the oral cavity. When it reaches the stomach, the nitrite is reduced to nitric oxide. The nitric oxide is important for vascular homeostasis, since it induces the relaxation of vessels, thus preventing the adhesion of cellular elements and decreasing inflammation. Through this action, nitric oxide acts as an anti-atherogen, being fundamental in the genesis of atherosclerosis. Probiotics are living organisms that bring health benefits to their host and are present in the intestines of healthy people. Recent studies demonstrate its possible ability to prevent atherosclerosis by reducing total cholesterol, LDL and triglycerides. The present study evaluated the effects of the association between inorganic nitrate and orally administered probiotic for the treatment of atherosclerosis in female apolipoprotein E *knockout* mice. Mice of the C57BL/6 and apoE^{-/-} strain were used, where the apoE^{-/-} ones received an atherogenic diet from 8 weeks of age. The treatments lasted 12 weeks and consisted of inorganic nitrate (NaNO₃) diluted in water (10mM) and probiotic (*Lactobacillus plantarum* WJL) administered by gavage (10⁹ CFU/mL). Thus, the animals were divided into five groups: C57BL/6, control apolipoprotein E *knockout* (apoE^{-/-} CT), apolipoprotein E *knockout* treated with inorganic nitrate (apoE^{-/-} NT), apolipoprotein E *knockout* treated with probiotic (apoE^{-/-} PB) and apolipoprotein E *knockout* treated with inorganic nitrate and probiotic (apoE^{-/-} NT+PB). Serum was used to measure total cholesterol. The aorta was collected to assess the deposition of atherosclerotic plaques. To perform glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT), a drop of blood was collected from the tip of the animals' tail through an incision. The apoE^{-/-} CT (n = 7) mice showed a 9-fold increase in total cholesterol level compared to C57BL/6 (n = 9) (816 ± 3.1 mg/dL vs. 90 ± 7.2 mg/dL) and nitrate had a hypocholesterolemic effect (619 ± 92 mg/dL vs. 619 ± 92 mg/dL, (n = 4)). In addition, the association of nitrate + probiotic was able to reduce the deposition of atherosclerotic plaques (13 ± 0.98% (n = 6) vs. 5.2 ± 0.72% (n = 9)). The groups C57BL/6 and apoE^{-/-} CT showed similar glycemic profiles but the groups treated with probiotic and with the association peaked at 15 minutes of the glucose tolerance test curve, returning to baseline values over time. However, none of the treatments changed the insulin tolerance test. Thus, it is concluded that treatment with nitrate is sufficient to reduce cholesterol in atherosclerosis, however the association of nitrate and probiotic is necessary for an efficient reduction of atherosclerotic plaques.

Key words: Cardiovascular diseases, inorganic nitrate, probiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxa de internação hospitalar por DCNT.....	18
Figura 2 – Efeitos do estrogênio no sistema cardiovascular.....	19
Figura 3 – Comparação entre artéria saudável e artéria com aterosclerose.....	20
Figura 4 – Migração de monócitos.....	22
Figura 5 – Produção de NO via NOS.....	25
Figura 6 – Circulação entero-salivar de nitrato.....	27
Figura 7 – Delineamento experimental.....	36
Figura 8 – Representação gráfica da análise de colesterol total.....	41
Figura 9 – Quantificação de placas ateroscleróticas em cortes transversais.....	42
Figura 10 – Representação gráfica das curvas no GTT e AUC.....	43
Figura 11 – Representação gráfica das curvas no ITT e AUC.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas padrão e aterogênica.....	35
Tabela 2 – Médias da análise de colesterol total (mg/dL).....	41
Tabela 3 – Médias da análise de deposição de placas (% do lúmen vascular).....	43
Tabela 4 – Médias dos grupos no GTT de acordo com o tempo (mg/dL).....	43
Tabela 5 – Médias dos grupos no ITT de acordo com o tempo (mg/dL).....	44

LISTA DE ABREVIACÕES

ANOVA	Análise de variância
apoE^{-/-}	Camundongo <i>knockout</i> para apolipoproteína E
AUC	Área abaixo da curva
BH4	Tetrahidrobiopterina
DCV	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes mellitus
DNCT	Doenças crônicas não transmissíveis
DO	Densidade óptica
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócito e macrófagos
GTT	Teste de tolerância à glicose
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HFD	Dieta rica em gordura
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
ISMN	Mononitrato de isossorbida
ITT	Teste de tolerância à insulina

KKA(y)	Camundongos modelo para diabetes e obesidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLr^{-/-}	Camundongo <i>knockout</i> para receptores de LDL
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MRS	De Man, Rogosa & Sharpe
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NK	Célula <i>natural killer</i>
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
NTG	Nitroglicerina
OCT	Temperatura ótima de corte
OMS	Organização Mundial de Saúde
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Proteína C reativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RPM	Rotações por minuto
SMC	Célula do músculo liso
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2

TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade formadora de colônia
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Doenças cardiovasculares.....	18
2.1.1 Doenças cardiovasculares em mulheres.....	19
2.2 Aterosclerose.....	20
2.2.2 Modelos experimentais de aterosclerose.....	23
2.3 Óxido nítrico.....	24
2.3.1 Doadores de NO.....	25
2.3.2 Nitrato inorgânico.....	26
2.4 Microbiota.....	27
2.5 Probióticos.....	28
2.5.1 <i>Lactobacillus plantarum</i> WJL.....	29
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 OBJETIVOS.....	33
4.1 Objetivo geral.....	33
4.2 Objetivos específicos.....	33
5 METODOLOGIA.....	35
5.1 Animais.....	35
5.2 Grupos experimentais e tratamentos.....	35
5.2.1 Tratamento com nitrato de sódio.....	36
5.2.2 Tratamento com <i>Lactobacillus plantarum</i> WJL.....	36
5.2.3 Linhagem e inóculo para gavagem.....	37
5.3 Dosagem de colesterol total.....	37

5.4 Histologia vascular.....	38
5.5 Teste de tolerância à glicose.....	38
5.6 Teste de tolerância à insulina.....	38
5.7 Análise estatística.....	39
6 RESULTADOS.....	41
6.1 Dosagem de colesterol total.....	41
6.2 Histologia vascular.....	42
6.3 Teste de tolerância à glicose.....	43
6.4 Teste de tolerância à insulina.....	44
7 DISCUSSÃO.....	46
8 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	55

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são as que mais matam no mundo inteiro e englobam um conjunto de doenças que incluem hipertensão, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca e aterosclerose. Sedentarismo, tabagismo, alimentação inadequada e diabetes são apenas alguns dos fatores de risco que predis põem às DCV (MOZAFFARIAN *et al.*, 2016; SEMB *et al.*, 2020).

Após a menopausa, as mulheres têm mais riscos de desenvolver DCV devido à diminuição do estrogênio no organismo, pois sugere-se que tal hormônio tenha função cardioprotetora (MAHMOODZADEH; DWORATZEK, 2019).

Dentro desse contexto, a aterosclerose se destaca como uma das principais doenças cardiovasculares, caracterizando-se pelo depósito de gordura nas artérias, fazendo com que o fluxo sanguíneo seja prejudicado ou até mesmo interrompido, levando à consequências como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (HEAD; DAUNERT; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 2017; HERRINGTON *et al.*, 2016).

Já utilizados na clínica, os nitratos orgânicos são eficazes doadores de NO usados em casos de angina e hipertensão, mas após algum tempo eles causam tolerância e doses cada vez mais altas são necessárias para se obter o efeito desejado (DAIBER; MÜNZEL, 2015). No quadro de aterosclerose há um déficit na biodisponibilidade de óxido nítrico e diferentemente dos nitratos orgânicos, os nitratos inorgânicos não promovem tolerância e têm surgido como potenciais candidatos à doadores de NO (FÖRSTERMANN; XIA; LI, 2017; JACKSON *et al.*, 2018).

Amplamente estudados nos dias atuais devido à suas inúmeras vantagens, os probióticos são organismos vivos que conferem benefícios ao seu hospedeiro. Muitas são as bactérias que possuem atividade probiótica e seus efeitos hipocolesterolêmicos, hipoglicêmicos e até mesmo anti-inflamatórios já foram descritos em diversos estudos (NAGPAL *et al.*, 2012; TIDERENCEL; HUTCHEON; ZIEGLER, 2020).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi associar o nitrato de sódio ao *Lactobacillus plantarum* WJL a fim de obter efeitos benéficos na gênese da aterosclerose em camundongos fêmeas *knockout* para apolipoproteína E.

REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

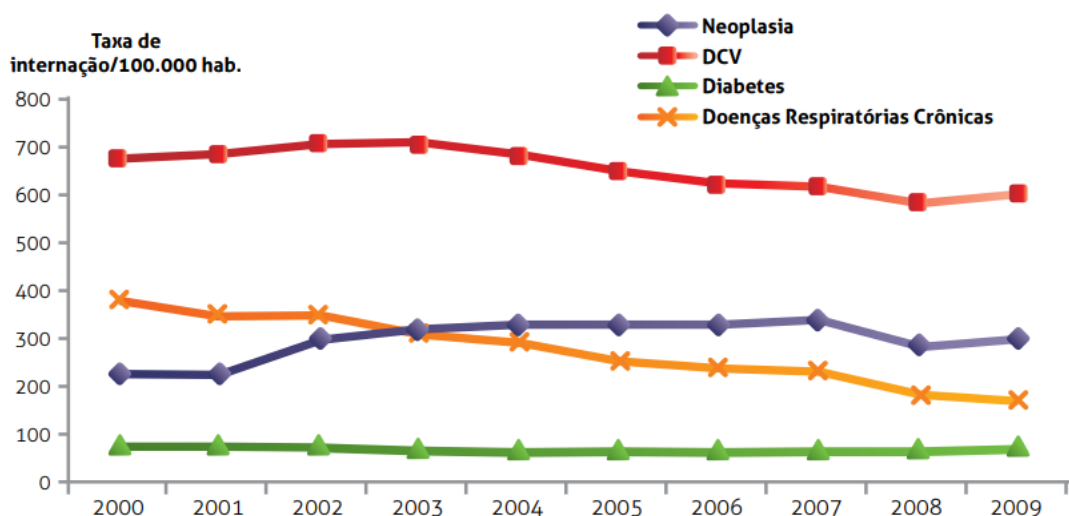
2.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são um conjunto de distúrbios que atingem o coração e os vasos sanguíneos. Elas são a principal causa de morte no mundo sendo responsáveis por levar cerca de 17,7 milhões de pessoas à óbito em 2015. Isso representa 31% de todas as mortes em âmbito global. É possível observar um aumento recente na carga dessas doenças principalmente em países de baixa e média renda (OPAS, 2017).

Diversos fatores de risco predisõem às DCV, entre eles fatores comportamentais (uso de tabaco, ingestão excessiva de álcool, dietas inadequadas, sedentarismo) e fatores fisiológicos (hipertensão, colesterol e glicemia elevados). Há também determinantes subjacentes que influenciam no desenvolvimento e surgimento dessas doenças, estando esses associados à mudanças econômicas, sociais e culturais (WHO, 2016).

No Brasil, as DCV representam 27,7% das mortes no país (MASSA; DUARTE; FILHO, 2019) e são as principais causas de hospitalizações por doenças crônicas não transmissíveis, gerando altos custos ao sistema nacional de saúde (Figura 1) (BRASIL, 2011).

Figura 1 – Taxa de internação hospitalar por DCNT



Fonte: BRASIL (2011).

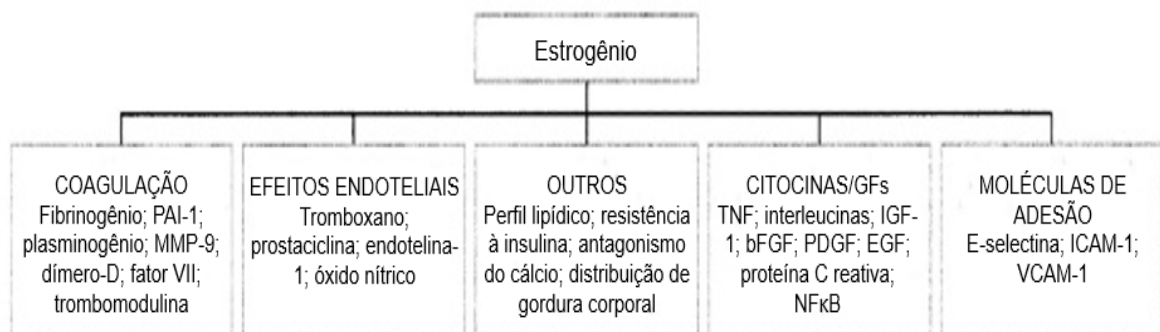
Grande parte dos óbitos decorrentes de eventos cardiovasculares são atribuídos à aterosclerose e suas complicações. De acordo com dados do Ministério da Saúde, a aterosclerose foi a causa de mais de 40.000 mortes entre os anos de 1996 e 2017, enquanto o infarto agudo do miocárdio, uma de suas consequências mais comuns, tirou a vida de 1.592.204 pessoas no mesmo período (DATASUS, 2019).

2.1.1 Doenças cardiovasculares em mulheres

As DCV continuam sendo a principal causa de morte em mulheres. Estatísticas mostram que as mulheres desenvolvem DCV entre 10 e 15 anos mais tarde do que os homens, mas no período do climatério acontecem modificações hormonais, circulatórias e sanguíneas que parecem aumentar o risco de eventos cardiovasculares, entre eles a aterosclerose. Estudos indicam que os hormônios sexuais, especialmente o estrogênio, atuam como protetores do sistema cardiovascular de mulheres antes da menopausa quando comparadas com homens da mesma faixa etária (KETEEPE-ARACHI; SHARMA, 2017; IORGA *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2018).

Já demonstrou-se que o estrogênio melhora o perfil lipídico, diminuindo o desenvolvimento da aterosclerose. Ele é capaz de aumentar a sinalização de NO nos vasos, melhorando a capacidade de resposta dos mesmos. Também foi visto que o estrogênio possui efeito benéfico na resistência à insulina e altera o metabolismo da glicose. Além disso, ele apresenta efeito imunomodulador na resposta inflamatória do processo de aterogênese (Figura 2) (BAKER *et al.*, 2003; MURPHY, 2011).

Figura 2 – Efeitos do estrogênio no sistema cardiovascular



Fonte: adaptado de BAKER *et al.* (2003).

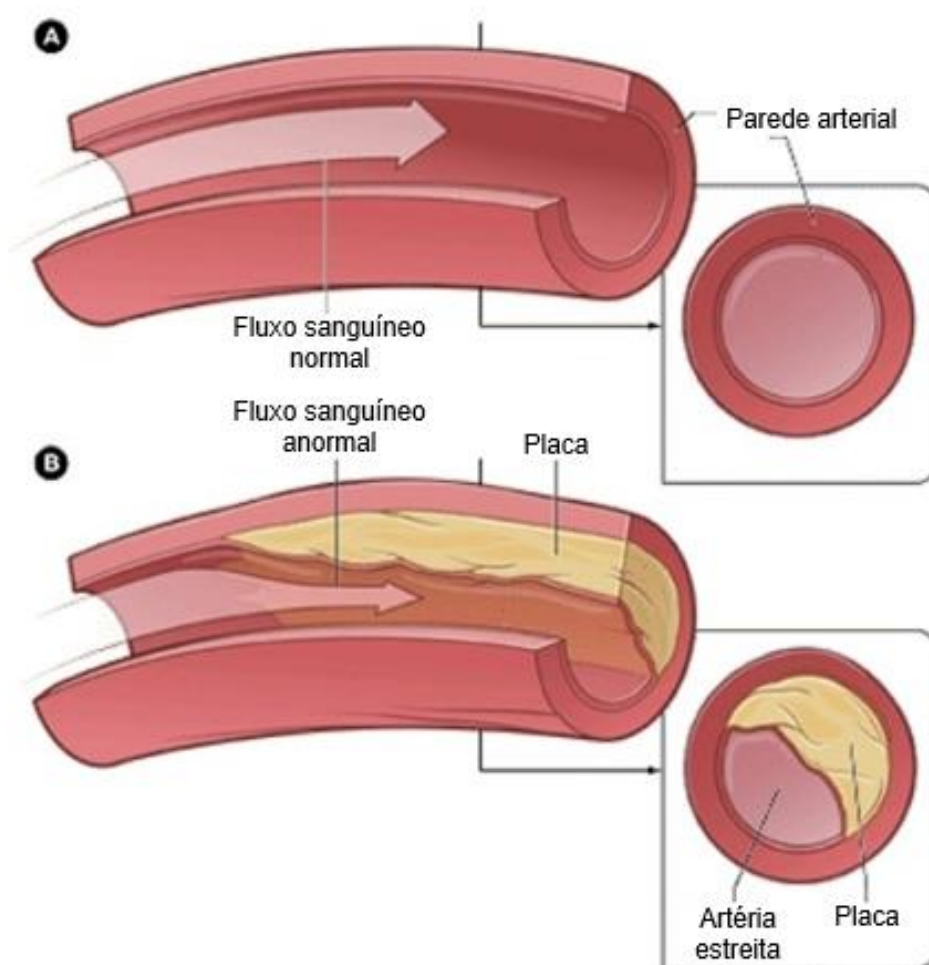
Efeitos do estrogênio no sistema cardiovascular: coagulação, endotélio, inflamação e adesão.

Assim, faz-se necessários estudos mecanísticos acerca dos componentes celulares e moleculares pelos quais o estrogênio é capaz de proteger o sistema cardiovascular (OPARIL; TOLBERT, 2001; XING *et al.*, 2009).

2.2 Aterosclerose

De natureza crônica e progressiva, a aterosclerose é caracterizada pela deposição de material gorduroso e/ou fibroso na camada mais interna, a íntima, de artérias de médio e grande calibre, resultando na formação de placas ateroscleróticas ou ateromas (Figura 3). Seu nome deriva da palavra grega “*atheros*” que significa mingau, fazendo referência à aparência do conteúdo lipídico do núcleo das placas (RAJAMANI; FISHER, 2017; LIBBY *et al.*, 2019).

Figura 3 – Comparação entre artéria saudável e artéria com aterosclerose



Fonte: adaptado de NHBLI (2018).

A figura A representa uma artéria saudável com fluxo sanguíneo normal. A figura B representa uma artéria com ateroma.

Esse acúmulo de gordura a longo prazo causa enrijecimento das artérias e bloqueio no fluxo sanguíneo ocasionando sérias consequências como infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares (RAFIEIAN-KOPAEI *et al.*, 2014).

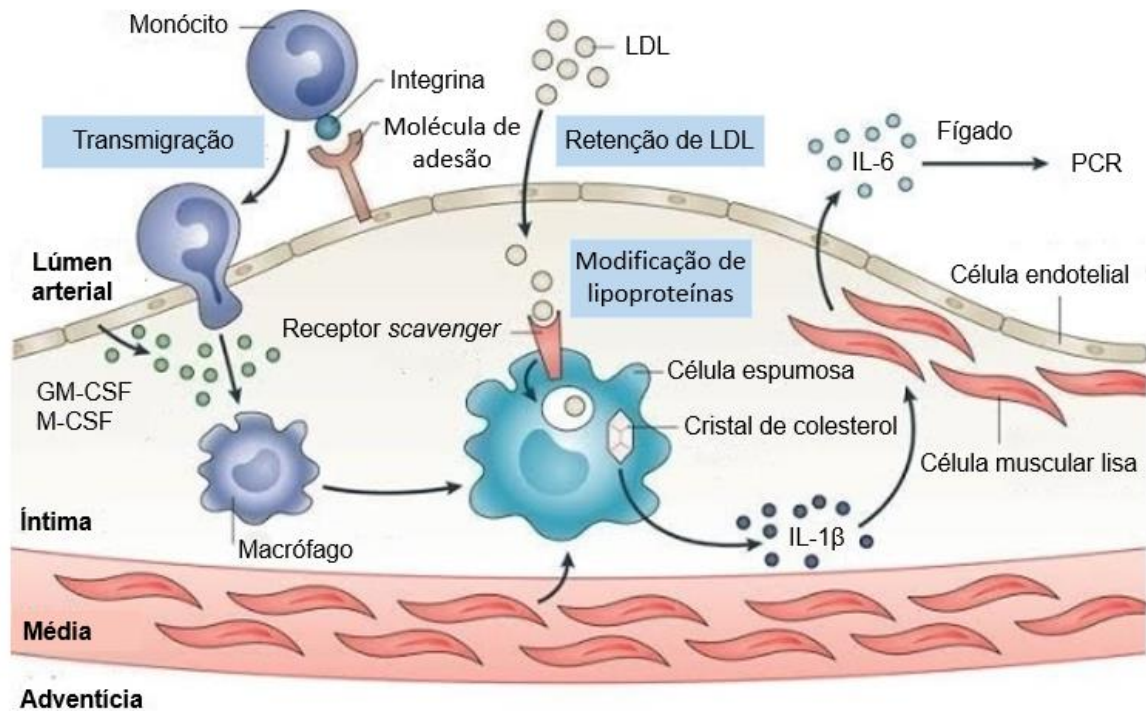
É uma patologia de caráter multifatorial, desencadeada por fatores de risco (hipertensão, diabetes, hiperlipidemia, etc.) que atuam em vários pontos de sua via patogênica (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011). Há algumas décadas, muitos estudos têm sido realizados para demonstrar o papel essencial da inflamação no processo de aterogênese e a aterosclerose como doença inflamatória, o que já foi comprovado a nível molecular e descrito em vários modelos animais (HANSSON; HERMANSSON, 2011; LIBBY, 2012; LEE *et al.*, 2017; FAVA; MONTAGNANA, 2018).

A disfunção endotelial é a característica inicial e ponto chave da ateroprogessão; a biodisponibilidade de NO é diminuída promovendo disfunção vascular (SIASOS *et al.*, 2018). Os fatores de risco supracitados causam danos às paredes das artérias e estimulam uma resposta imunológica. As primeiras lesões ocorrem em regiões de bifurcações e nos arcos arteriais, locais onde o fluxo é mais turbulento, submetendo o endotélio à estresse de cisalhamento. Dessa forma, o endotélio disfuncional se torna mais permeável, favorecendo a migração e retenção de lipoproteínas plasmáticas, especialmente LDL, para o espaço subendotelial (ROSS, 1999; LIMA *et al.*, 2015; SOUILHOL *et al.*, 2020).

Após migrarem e serem retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação e modificações enzimáticas, resultando em uma série de reações pró-inflamatórias que culminam na ativação, recrutamento e transmigração de diferentes células da imunidade inata (monócitos, neutrófilos, mastócitos, células NK e células dendríticas), mas a imunidade adquirida também faz parte da progressão da aterosclerose através das células T (Th1 e Th2) (BADIMON; VILAHUR, 2014; TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015). As oxLDL estimulam o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na parede endotelial e a liberação de quimiocinas como a MCP-1, atraindo monócitos que migram por quimiotaxia para o subendotélio. Chegando lá, eles se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos reconhecem as oxLDL por meio de receptores *scavenger*, englobam as moléculas de lipoproteína e dão origem às células espumosas ricas em conteúdo lipídico, principais componentes das estrias gordurosas (Figura 4) (GISTERÅ; HANSSON, 2017; DA LUZ *et al.*, 2018). Algumas dessas células morrem por apoptose por terem a função migratória comprometida, produzindo um

núcleo necrótico no centro da placa aterosclerótica (RAFIEIAN-KOPAEI *et al.*, 2014; GONZALEZ; TRIGATTI, 2017).

Figura 4 – Migração de monócitos



Fonte: adaptado de GISTERÅ; HANSSON (2017).

A disfunção endotelial altera a permeabilidade do endotélio e com isso ocorre a migração e retenção de partículas de LDL. O acúmulo de lipoproteínas na camada subendotelial regula positivamente moléculas de adesão e atrai monócitos para o local da lesão. Os monócitos entram por diapedese no espaço subendotelial e em resposta ao M-CSF e GM-CSF se diferenciam em macrófagos. Os receptores *scavenger* capturam as LDL e se transformam em células espumosas. Os cristais de colesterol presentes nessas células fazem com que haja a liberação de IL-1 β , estimulando as células do músculo liso a produzir IL-6. Tal citocina pode sinalizar para o fígado para que ele produza PCR, um biomarcador que se encontra elevado em pacientes com aterosclerose.

A liberação de citocinas (IL-1 e TNF- α), quimiocinas e fatores de crescimento (PDGF, FGF, TGF- β) pelas células endoteliais aumenta o recrutamento de monócitos e faz com que as células musculares lisas migrem da camada média para a íntima, como também induzem a sua proliferação. A partir desse processo, forma-se a capa fibrosa composta por SMCs e componentes da matriz extracelular, como elastina e colágeno (SINGH *et al.*, 2002; RAFIEIAN-KOPAEI *et al.*, 2014).

A capa fibrosa tem como função proteger a placa e o seu núcleo lipídico rico em oxLDL, colesterol e células apoptóticas, além de causar modificações no fluxo sanguíneo. Ao passo que a inflamação progride, mais células sofrem apoptose e metaloproteínas da matriz degradam as fibras de colágeno, deixando a placa mais

vulnerável (EL KHATIB *et al.*, 2012; BENTZON *et al.*, 2014; ANLAMBERT; LENBURY; BELL, 2017). Devido à vulnerabilidade, a placa pode se romper expondo a matriz colágena trombogênica, permitindo que componentes da coagulação entrem em contato com o conteúdo do interior da placa, produzindo um trombo que se estende para o lúmen arterial (INSULL, 2009; LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011). Dessa forma, a aterosclerose predispõe a outros eventos cardiovasculares, como cardiopatia isquêmica, acidentes vasculares e doença arterial periférica (NDREPEPA, 2017).

2.2.1 Modelos experimentais de aterosclerose

Para ajudar no entendimento da aterosclerose e procura de novos agentes terapêuticos, modelos experimentais que compreendem uma variedade de animais de pequeno e grande porte tem sido utilizada para o estudo do processo de aterogênese permitindo que as condições do experimento, dieta e fatores de risco possam ser cuidadosamente controlados (GETZ; REARDON, 2012). A primeira demonstração experimental de que a aterosclerose poderia ser induzida em animais de laboratório data de 1908 e a identificação do papel fundamental do aumento do colesterol plasmático na aterogênese ocorreu devido ao estudo em coelhos, sendo esses os primeiros modelos animais para a pesquisa da patologia (LEE *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas, os ratos têm sido amplamente empregados e se tornaram a espécie mais comum no estudo da aterosclerose em razão da sua rápida reprodução, além de possuírem baixo custo de manutenção. No entanto, seu perfil lipídico difere em comparação com os seres humanos. Em camundongos, grande parte do colesterol é transportado em partículas de HDL, enquanto em humanos esse transporte ocorre em sua maioria em lipoproteínas de baixa densidade. Por consequência, esses animais possuem níveis baixos de LDL aterogênico e VLDL, sendo considerado um fator limitante. Para driblar essa limitação, os pesquisadores fizeram uso de tecnologias que envolviam a manipulação do DNA para criar modelos de camundongos geneticamente modificados (KAPOURCHALI *et al.*, 2014; VESELI *et al.*, 2017).

A apolipoproteína E é uma proteína sintetizada pelo fígado e por diversos tecidos e tipos celulares, incluindo macrófagos, estando envolvida na captação e eliminação de lipoproteínas pelo fígado. Devido à suas funções, ela foi determinada como um alvo favorável para a criação de modelos de aterosclerose. A partir disso,

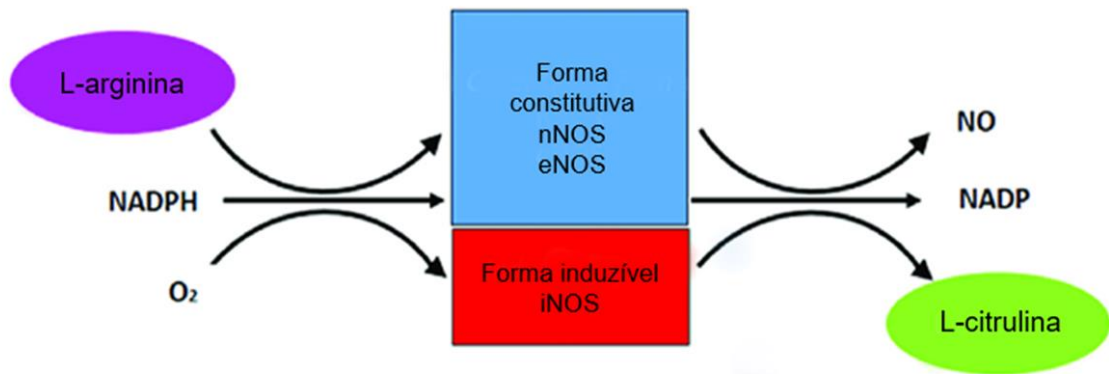
no ano de 1992, foram desenvolvidos os camundongos *knockout* para apolipoproteína E (apoE^{-/-}), resultando em hipercolestoremia e desenvolvimento de lesões ateroscleróticas de maneira espontânea, mesmo quando alimentados com dieta padrão, processo que pode ser acelerado com a administração de dieta aterogênica. As lesões normalmente aparecem na raiz da aorta, no arco aórtico e nas artérias carótidas e com 3 meses de idade os depósitos de gordura já podem ser observados (PLUMP *et al.*, 1992; GREENOW; PEARCE; RAMJI, 2005; SASSO *et al.*, 2016; POZNYAK *et al.*, 2020). Com isso, os animais apoE^{-/-} foram o modelo de escolha para o nosso estudo.

2.3 Óxido nítrico

O fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) foi descoberto em 1980 por Furchgott e Zawadzki. Alguns anos depois, foi definido o EDRF era na verdade o NO (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; IGNARRO *et al.*, 1987). Ela é uma molécula importante na manutenção da homeostase vascular e como neuromoduladora, podendo ativar canais protéicos e iônicos a fim de promover vasodilatação. Baixos níveis ou a perda de sua função estão relacionados ao desenvolvimento de DCV (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2012; MENDES-JÚNIOR *et al.*, 2015; RAMESHRAD *et al.*, 2016). Por ser muito versátil, o NO está envolvido em vários processos fisiológicos além do relaxamento vascular, a exemplo da secreção de insulina, tônus das vias aéreas, agregação plaquetária, adesão leucocitária, angiogênese, peristaltismo, entre outros (DIAS; NEGRÃO; KRIEGER, 2011; BIELLI *et al.*, 2015).

O NO é produzido por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintase. Juntamente com cofatores como oxigênio, NADPH e BH₄, as NOS convertem L-arginina em L-citrulina, sendo o NO um dos produtos dessa reação (Figura 5). Existem três isoformas das NOS: NOS neuronal (nNOS ou NOS1), NOS induzível (iNOS ou NOS2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3). Duas dessas enzimas (nNOS e eNOS) são reguladas pelo aumento dos níveis intracelulares de cálcio. No entanto, em algumas situações, elas são capazes de aumentar a produção de NO independentemente do nível de cálcio em resposta a estímulos como o estresse de cisalhamento (BRUCKDORFER, 2005; LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015; GHIMIRE *et al.*, 2017).

Figura 5 – Produção de NO via NOS



Fonte: adaptado de LIND *et al.* (2017).

O papel indispensável do NO no sistema cardiovascular pode ser compreendido através das ações periféricas que desempenha no organismo, como a manutenção do tônus vascular e regulação da pressão arterial. A redução dos níveis de NO oriundos da desregulação de sua síntese e/ou sua degradação em demasia por estresse oxidativo podem dar início a uma disfunção endotelial, ocasionando diminuição no processo de vasodilatação dependente do endotélio e redução da capacidade que as células endoteliais possuem de suprimir processos inflamatórios e trombose (VERAS *et al.*, 2013).

2.3.1 Doadores de NO

Os doadores de NO são uma classe de substâncias quimicamente diversificadas, mas com mecanismo de ação comum: a capacidade de liberar NO devido à interação com o sistema biológico, simulando a sua ação endógena. Devido à sua curta meia-vida *in vivo* e das limitações para o seu uso em experimentos, muitos compostos com capacidade de liberar NO tem sido utilizados como instrumento na investigação da sua função nas áreas da fisiologia e fisiopatologia cardiovascular e desde 1980 novos doadores de óxido nítrico vem sendo desenvolvidos (IGNARRO; NAPOLI; LOSCALZO, 2002; BELLISARII *et al.*, 2012).

Nitrovasodilatadores, como os nitratos orgânicos, são utilizados na clínica há mais de um século. A NTG, o nitrato mais estudado, é empregado principalmente no alívio agudo da dor associada à angina, enquanto o ISMN é usado para o tratamento de angina crônica. O NPS é usado em crises hipertensivas, onde é necessária uma redução rápida da pressão arterial. Ele também é a droga de escolha para a realização de estudos clínicos, sendo considerado o padrão ouro. Além desses, outros nitratos

como os S-nitrosotióis e os diazeniodiolatos também são importantes doadores de NO (MILLER; MEGSON, 2007; HERMAN; MONCADA, 2005).

Nesse cenário, como citado anteriormente, os nitratos inorgânicos surgem como uma alternativa de tratamento para as DCV. Apesar de demonstrarem em parte efeitos favoráveis, ainda há necessidade de comprovar a sua eficácia através de estudos clínicos. Caso esses ensaios sejam exitosos e constatem a efetividade da terapia com nitrato inorgânico, representaria uma opção terapêutica eficaz, barata acessível e sem os grandes efeitos colaterais que são observados na terapia crônica com nitratos orgânicos (MÜNZEL; DAIBER, 2018).

2.3.2 Nitrato inorgânico

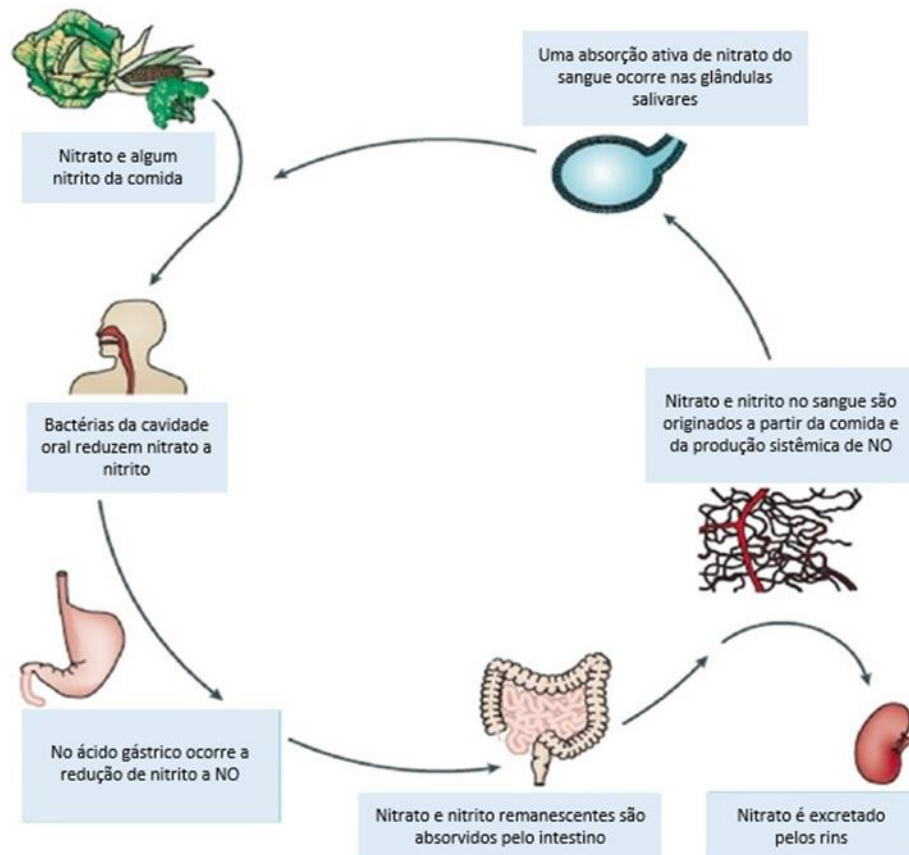
O nitrato (NO_3^-) inorgânico é um ânion que pode ser naturalmente encontrado em diversos alimentos, principalmente em vegetais de folhas verdes e beterraba, também servindo como conservante de produtos cárneos processados. Por muitos anos, persistiu a crença de que o consumo desse composto elevava o risco de câncer e, como consequência, a OMS estabeleceu valores aceitáveis para sua ingestão diária (0 a 3,7mg/kg de peso corporal). Entretanto, nas últimas décadas, estudos têm demonstrado que o nitrato é reciclado no sangue e nos tecidos de maneira fisiológica, agindo como substrato alternativo na produção de NO (LUNDBERG; GOVONI, 2004; HORD; TANG; BRYAN, 2009; OMAR; ARTIME; WEBB, 2012; SHANNON *et al.*, 2019).

Após ser ingerido, parte do nitrato é reduzido a nitrito por meio de bactérias comensais presentes na cavidade oral. Posteriormente, o nitrito é reduzido a NO quando entra em contato com o ambiente ácido do estômago. Essa via é conhecida como nitrato-nitrito-NO e complementa a via enzimática, pois ambas atuam em paralelo. Em condições de hipóxia, a expressão das enzimas NOS é diminuída, então, a via nitrito-dependente entra em cena, desenvolvendo funções positivas em situações de déficit de oxigênio (Figura 6) (VENTO; AUGUSTO; REIS, 2011; MCNALLY; GRIFFIN; ROBERTS, 2016).

Atualmente, nitratos orgânicos como a nitroglicerina e o nitroprussiato de sódio são utilizados na clínica para o tratamento da angina pectoris e hipertensão, mas seu uso a longo prazo causa tolerância no organismo, diferente dos nitratos inorgânicos, onde esse fenômeno não é observado (SHARMA; KASS, 2017). Isso os torna bons

candidatos como potenciais alternativas terapêuticas nas DCV. Sua suplementação em humanos e modelos animais tem mostrado efeitos hipotensores, hipolipidêmicos, anti-inflamatórios e antioxidantes, além de regular a homeostase da glicose e a via de sinalização da insulina, melhorando o quadro de resistência à mesma e a função vascular (BAHADORAN *et al.*, 2015).

Figura 6 – Circulação entero-salivar de nitrato



Fonte: adaptado de LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG (2008).

O nitrato inorgânico ingerido é rapidamente absorvido no intestino delgado. Apesar de grande parte ser excretada na urina, cerca de 25% é concentrado nas glândulas salivares. Ele pode ser encontrado em altas concentrações em vegetais de folhas verdes. Após o consumo, bactérias anaeróbicas facultativas reduzem o nitrato a nitrito pela ação da nitrato redutase. No estômago, o nitrito é decomposto para formar NO. O nitrato e nitrito restantes são absorvidos pelo intestino e podem ir para a circulação, convertendo-se em NO bioativo no sangue e tecidos em condições de hipóxia.

2.4 Microbiota

O termo microbiota se refere à população de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal. Ela é composta por bactérias, fungos, vírus e arqueias que desempenham funções fisiológicas e bioquímicas. A manutenção da integridade intestinal, captação de energia, proteção contra patógenos e regulação da imunidade

são apenas alguns papéis que a microbiota exerce no organismo do hospedeiro. (THURSBY; JUGE, 2017; JIN *et al.*, 2019; KATSIMICHAS *et al.*, 2019).

Entretanto, nos últimos anos, evidências tem sugerido que além de trazer efeitos benéficos, a microbiota também está associada ao desenvolvimento de doenças (Figura 7). Isso acontece quando há um quadro de disbiose ocasionado por padrões alimentares inadequados, estresse e uso de antibióticos (WANG *et al.*, 2017; JIN *et al.*, 2019).

Nesse contexto, modular a microbiota intestinal para que ela se torne saudável é uma potencial abordagem terapêutica para o tratamento de doenças crônicas causadas por disbiose (PAN *et al.*, 2019). A rebiose pode ser feita através da administração de probióticos, a exemplo de *Lactobacillus* spp., que atuam como se fossem células tronco, reabastecendo e rejuvenescendo a microbiota ali presente (APPANNA, 2018).

2.5 Probióticos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, probióticos são definidos como organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001), podendo ser encontrados em iogurtes, alimentos fermentados e suplementos alimentares (NCCIH, 2019). Muitas espécies microbianas exercem propriedades probióticas, onde as mais importantes são as bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (KECHAGIA *et al.*, 2013).

Os probióticos devem possuir determinadas características para que possam desempenhar bem a sua função, como: ser compatíveis com o hospedeiro, não patogênicos; ser resistentes ao pH ácido e à ação biliar ao passarem pelo tubo digestivo; aptos a colonizar rapidamente a mucosa intestinal interagindo com outras espécies bacterianas; ser metabolicamente ativos ao chegar ao intestino e capazes de estimular o sistema imune (SAAD, 2006; KECHAGIA *et al.*, 2013).

Nos últimos anos eles tem sido alvo de estudos devido à sua aplicabilidade em inúmeras áreas que compreendem desde a indústria alimentícia até a prática clínica.

Entre os inúmeros benefícios dos probióticos, pode-se destacar a sua capacidade de reduzir os níveis de colesterol (Figura 8). Diversos estudos

demonstram a sua eficácia em modelos animais e também em humanos (DAMODHARAN *et al.*, 2015; RYAN *et al.*, 2015; COSTABILE *et al.*, 2017; PALANIYANDI *et al.*, 2019) e muitas são as hipóteses sugeridas para explicar tal fato, como a absorção do colesterol pelas bactérias, desconjugação de ácidos biliares e alteração do metabolismo de lipídios através da ação de ácidos graxos de cadeia curta (MODANÊSI; MERCER; BERNARDI, 2016).

Além disso, também podem ser utilizados para casos de diabetes, atuando na melhora dos níveis glicêmicos e na redução da resistência à insulina (TIDERENCEL; HUTCHEON; ZIEGLER, 2020) e em estudos em modelos animais para aterosclerose algumas linhagens são capazes de reduzir a formação de placas ateroscleróticas (NABI *et al.*, 2016).

2.5.1 *Lactobacillus plantarum* WJL

O *Lactobacillus plantarum* é uma bactéria ácido-lática que pode ser frequentemente encontrada nos mais variados nichos que compreendem desde plantas, alimentos como carne, peixes, vegetais e laticínios fermentados até o trato gastrointestinal de animais e humanos (SIEZEN *et al.*, 2010).

A linhagem de *L. plantarum* WJL foi originalmente isolada do intestino da *Drosophila melanogaster*, a mosca-da-fruta, sendo considerada um simbiote, proporcionando benefícios ao seu hospedeiro. Um estudo de Storelli *et al.* (2011) demonstrou que ela é capaz de promover crescimento larval sistêmico através da otimização das vias de sinalização hormonal integradas, no entanto, os mecanismos moleculares pelos quais a bactéria desempenha seus efeitos positivos ainda são amplamente desconhecidos (MARTINO *et al.*, 2015). Seu genoma inicialmente sequenciado foi publicado em 2013 (KIM *et al.*, 2013).

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

Considerando que as DCV são um problema de saúde pública, a busca por estratégias de modo a minimizar as taxas de mortalidade associadas a esses eventos tem sido um desafio constante. Cabe ressaltar que os homens apresentam eventos cardiovasculares mais cedo do que as mulheres. No entanto, evidências experimentais sugerem que a aterosclerose é mais proeminente em indivíduos do sexo feminino (VON SCHEIDT *et al.*, 2017). Além disso, há na literatura uma escassez de estudos experimentais realizados em fêmeas.

Em relação à associação entre o nitrato de sódio e o *Lactobacillus plantarum* WJL, já se sabe que, diferente dos nitratos orgânicos utilizados atualmente na clínica, os nitratos inorgânicos não induzem tolerância a longo prazo (SHARMA; KASS, 2017) e vários estudos demonstram o potencial hipocolesterolêmico de linhagens probióticas (BU; WANG, 2018; WEGIELSKA; SULIBURSKA, 2016; HUANG *et al.*, 2014; CHIANG; PAN, 2012; PORTUGAL *et al.*, 2006).

Desse modo, pode-se considerar que o tratamento com a associação supracitada seja uma alternativa promissora no tratamento da aterosclerose.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da associação entre nitrato de sódio e *Lactobacillus plantarum* WJL para o tratamento da aterosclerose em camundongos fêmeas *knockout* para apolipoproteína E.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do tratamento crônico da associação entre nitrato inorgânico e probiótico em camundongos fêmeas apoE^{-/-} e seus controles *wild type* C57BL/6 sobre os seguintes parâmetros:

- Dosagem de colesterol total;
- Histologia vascular (análise de deposição de placas ateroscleróticas);
- Teste de tolerância à glicose;
- Teste de tolerância à insulina.

METODOLOGIA

5 METODOLOGIA

5.1 Animais

Camundongos (*Mus musculus*) isogênicos, fêmeas, das linhagens C57BL/6 (controles *wild type*) e animais *knockout* para apolipoproteína E com 8 semanas de vida foram utilizados.

Os animais foram 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). Eles foram acondicionados em estantes com circulação de ar (Alesco, São Paulo, Brasil) e mantidos sob condições controladas de temperatura ($21\pm1^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12 horas) e tiveram acesso à água e ração *ad libitum*.

Todos os protocolos foram executados de acordo com os princípios éticos e foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba (parecer nº 2614170918).

5.2 Grupos experimentais e tratamentos

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais: 1) C57BL/6: animais C57BL/6 sem tratamento (controle negativo); 2) apoE^{-/-} CT: animais apoE^{-/-} sem tratamento (controle positivo); 3) apoE^{-/-} NT: animais apoE^{-/-} tratados com nitrato de sódio, 4) apoE^{-/-} PB: animais apoE^{-/-} tratados com *Lactobacillus plantarum* WJL e 5) apoE^{-/-} NT+PB: animais apoE^{-/-} tratados com nitrato de sódio e *Lactobacillus plantarum* WJL. No total foram utilizados 43 animais distribuídos entre os grupos.

Ao atingirem 8 semanas de idade, os camundongos apoE^{-/-}, que antes eram alimentados com dieta padrão, passaram a receber dieta aterogênica *Western Type* (Rhoster, São Paulo, Brasil), contendo 41% de calorias em forma de lipídios e 1,5% de colesterol (Tabela 1). Esta dieta foi administrada para acelerar o processo de desenvolvimento das placas ateroscleróticas (VESELI *et al.*, 2017).

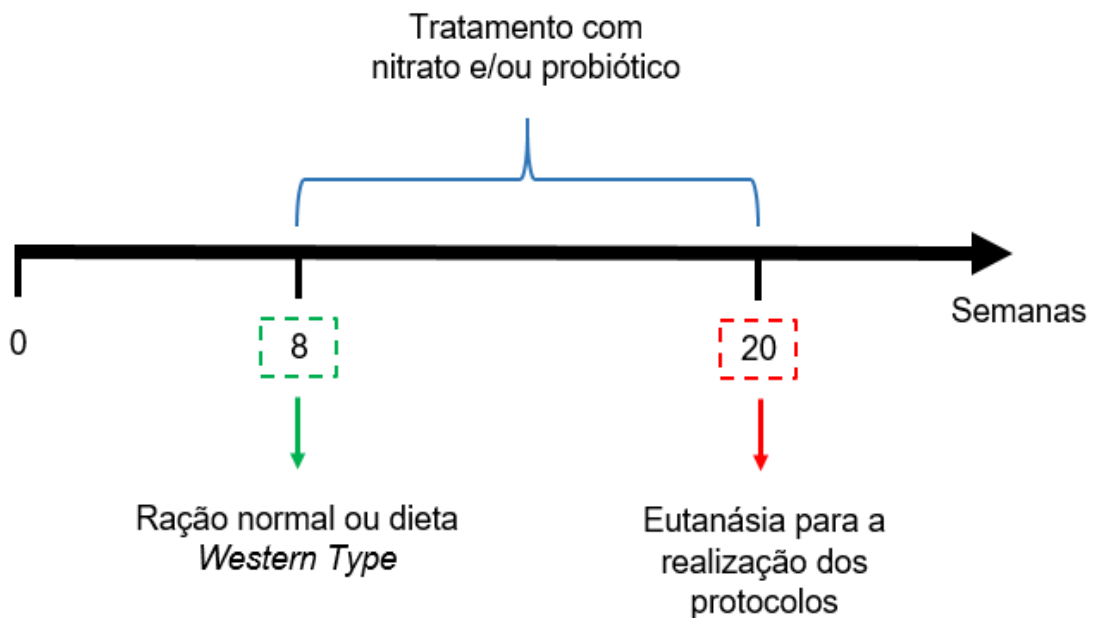
Tabela 1 – Composição das dietas padrão e aterogênica

Dieta padrão	Dieta aterogênica
Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico,	Amido de milho, DL-metionina, caseína, banha de porco, carbonato de cálcio,

cloreto de sódio, óleo vegetal, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.	celulose, colesterol, mix mineral AIN-76, mix vitamínico AIN-93, sacarose, tert-butilhidroquinona.
--	--

O tratamento teve duração de 12 semanas e após este período as análises foram realizadas de acordo com os protocolos propostos (Figura 9).

Figura 7 – Delineamento experimental



Fonte: elaborado pela autora (2020).

5.2.1 Tratamento com nitrato de sódio

O nitrato de sódio (NaNO_3) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi diluído em água em uma concentração de 10mM (JÄRDET *et al.*, 2014). Este preparado foi colocado nas garrafas e os animais tiveram acesso à água *ad libitum*.

5.2.2 Tratamento com *Lactobacillus plantarum* WJL

Os animais foram tratados por meio de gavagem com *Lactobacillus plantarum* WJL. A linhagem foi preparada e administrada diariamente e cada camundongo recebeu uma dose de 300µL contendo 10^9 UFC/mL.

5.2.3 Linhagem e inóculo para gavagem

A linhagem de *Lactobacillus plantarum* WJL utilizada neste estudo foi cedida pela Profa. Dra. Marciane Magnani do Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos (LPMA), pertencente ao Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) do Centro de Tecnologia (CT) da Universidade Federal da Paraíba, mediante colaboração com o Prof. Dr. Hubert Vidal do Instituto de Genômica Funcional de Lyon, França.

A linhagem estoque foi mantida em criotubo em um banco a -20°C e reativada pela transferência de 100µL desse estoque para um tubo de ensaio contendo 10mL de caldo MRS estéril e incubado a 37°C sob anaerobiose por 72 horas. Após a ativação, 100µL da linhagem crescida foram transferidos para um novo tubo de ensaio com 10mL de caldo MRS estéril e incubado a 37°C sob anaerobiose por 24 horas para ser utilizado no dia seguinte e assim sucessivamente até o fim das 12 semanas de tratamento.

O conteúdo do tubo de ensaio com a linhagem crescida foi transferido para um tubo tipo Falcon estéril e centrifugado por 15 minutos a uma temperatura de 4°C a 3500 RPM. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células bacterianas sedimentadas foram ressuspensas em 5mL de PBS e homogeneizadas por 30 segundos em agitador tipo vórtex.

Em seguida, foi realizada a contagem de microrganismos em espectrofotômetro manual com DO expressa em absorbância baseada na propriedade de turvação. Foi utilizada uma cubeta contendo PBS sem inóculo e outra com a presença do inóculo para comparação de diferença de luz absorvida pelas mesmas. A leitura foi padronizada para 0,7 de absorbância com o equipamento ajustado para o comprimento de onda de 625nm. As suspensões possuíam 10⁹ UFC/mL a partir da DO estabelecida.

5.3 Dosagem de colesterol total

O colesterol total foi dosado utilizando-se um *kit* comercial colorimétrico (Bioclin®, Quibasa, Belo Horizonte, Brasil) de acordo com as orientações do fabricante. As leituras foram executadas em espectrofotômetro automático (ChemWell-T).

5.4 Histologia vascular

Após a eutanásia, os animais foram perfundidos com PBS, pH 7,4. Em seguida, os tecidos foram fixados com paraformaldeído a 4% em PBS. A aorta foi cuidadosamente retirada, dissecada do tecido conjuntivo e armazenada em fixador até o momento do processamento histológico.

Para a realização dos cortes histológicos (6 µm de espessura), a aorta foi montada no composto Tissue Tek® OCT (Sakura Finetek, Califórnia, EUA), congelada e cortada em micrótomo criostato (Leica CM1850, Nussloch, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas e armazenados em geladeira até o momento da coloração por, no máximo, 1 semana.

A quantificação da deposição de placas ateroscleróticas foi feita em cortes corados com o corante de lipídios neutros Oil-Red-O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O Tissue Tek® OCT foi retirado cuidadosamente das lâminas com água destilada e as lâminas foram mantidas em contato com o corante com os cortes voltados para baixo, para evitar precipitação, por 10 minutos. O excesso de corante foi lavado com água destilada e os cortes foram cobertos por PBS e lamínula. As lesões ateroscleróticas foram quantificadas em fotomicrografias capturadas utilizando-se um microscópio interfaceado a uma câmera digital e as imagens foram analisadas com o sistema *Image J*. A área de deposição de placa foi expressa como porcentagem do lúmen vascular ocupado pela mesma.

5.5 Teste de tolerância à glicose

Com os animais em jejum *overnight* (14 horas), foi injetada uma solução de 25% de glicose em salina 0,9% estéril a uma dose de 2g de glicose/kg de peso corporal via intraperitoneal. Com uma pequena incisão na ponta da cauda do camundongo, uma gota de sangue foi obtida para a verificação da glicemia nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60 e 90 minutos fazendo-se uso de tiras reativas e glicosímetro portátil (Accu-Chek® Active, Roche Diagnóstica Brasil Ltda.) (AYALA *et al.*, 2010; BOWE *et al.*, 2014).

5.6 Teste de tolerância à insulina

Com os animais alimentados, foi aplicada 0,75U de insulina humana regular (Humulin® R, Eli Lilly, São Paulo, Brasil) por kg de peso corporal via intraperitoneal.

Com uma pequena incisão na cauda do camundongo, uma gota de sangue foi obtida para a verificação da glicemia nos tempos 0 (basal), 30, 60, 90 e 120 minutos fazendo-se uso de tiras reativas e glicosímetro portátil (Accu-Chek® Active, Roche Diagnóstica Brasil Ltda.) (AYALA *et al.*, 2010; BOWE *et al.*, 2014).

5.7 Análise estatística

Os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ EPM e analisados estatisticamente empregando-se ANOVA *one-way* ou *two-way* seguido pelo *post hoc* de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

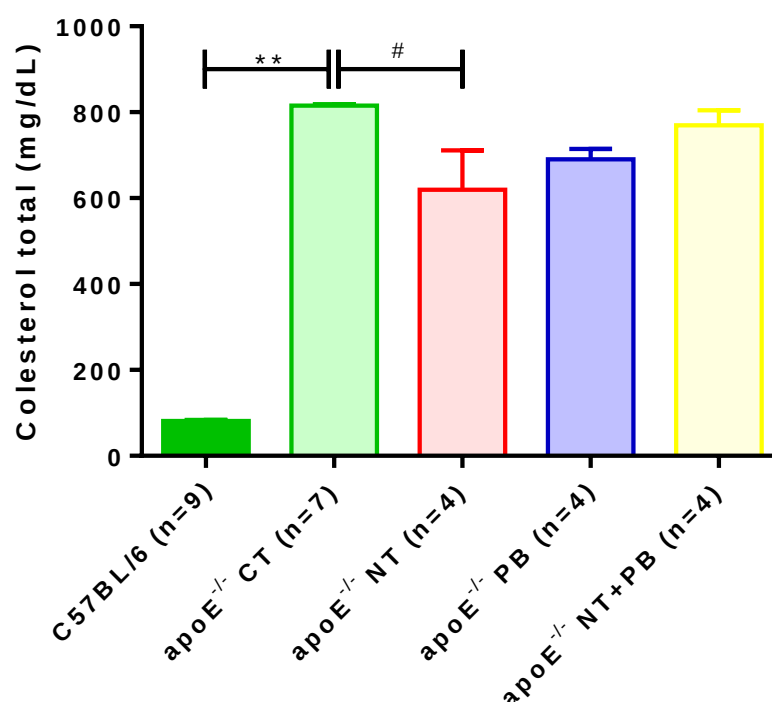
RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Dosagem de colesterol total

Ao final das 12 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para a dosagem de colesterol total. Os animais apoE^{-/-} CT apresentaram perfil de colesterol mais elevado que os animais controle (C57BL/6). Considerando que os animais apoE^{-/-} receberam dieta aterogênica, eles apresentaram um aumento de cerca de 9 vezes na concentração de colesterol total comparado aos C57BL/6. Os animais tratados com o nitrato inorgânico apresentaram diferença no perfil de colesterol em comparação aos animais do grupo apoE^{-/-} CT, diferentemente dos grupos apoE^{-/-} tratados com probiótico e com a associação. Nestes, não houve alteração nos níveis de colesterol total (Figura 10). As médias de cada grupo estão apresentadas na Tabela 2.

Figura 8 – Representação gráfica da análise de colesterol total



**p<0,01 C57BL/6 vs. apoE^{-/-} CT e #p<0,05 apoE^{-/-} CT vs. apoE^{-/-} NT.

Tabela 2 – Médias da análise de colesterol total (mg/dL)

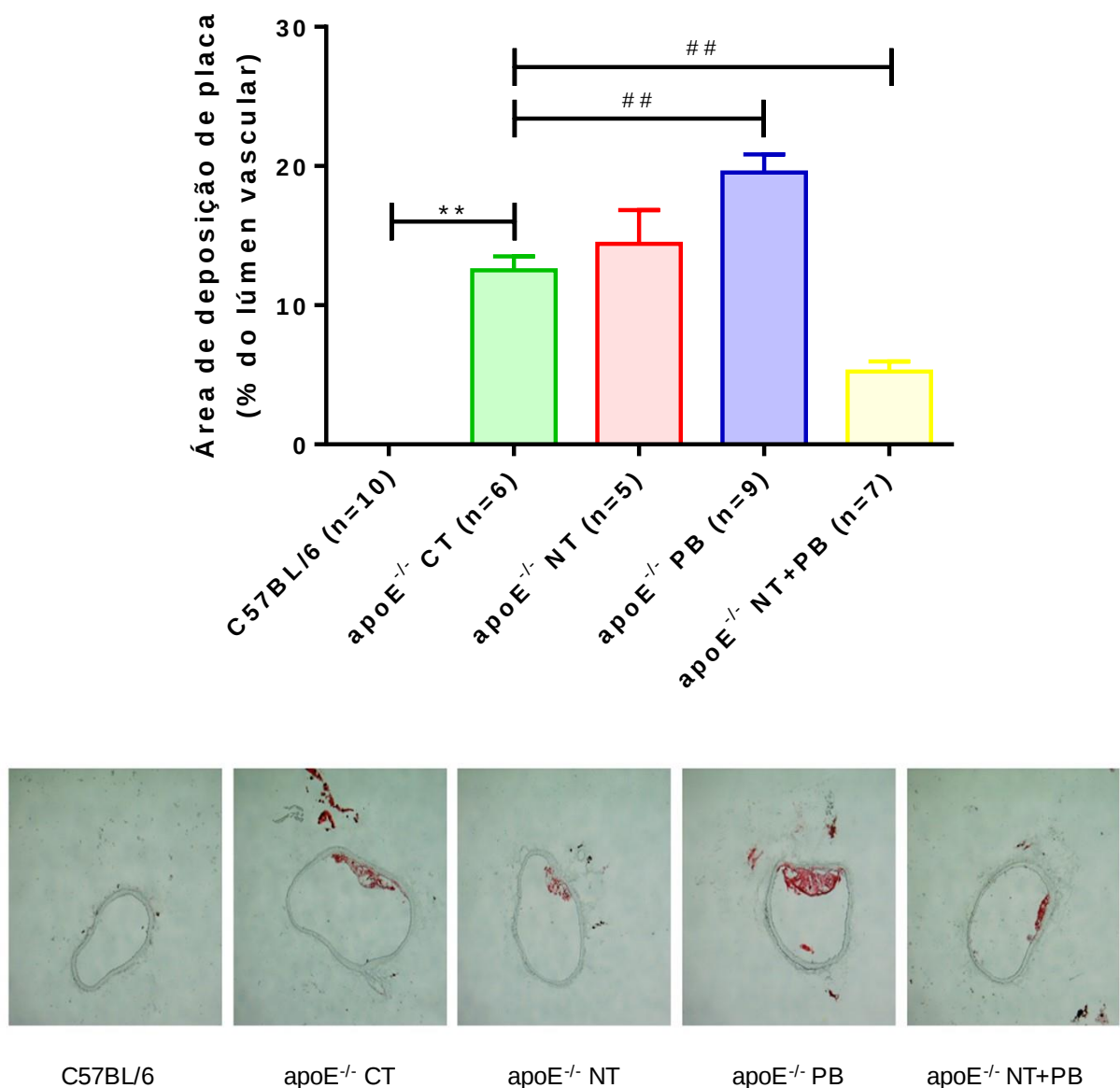
C57BL/6	apoE ^{-/-} CT	apoE ^{-/-} NT	apoE ^{-/-} PB	apoE ^{-/-} NT+PB
90 ± 7.2	816 ± 3.1	619 ± 92	691 ± 24	770 ± 34

Valores expressos como média ± EPM.

6.2 Histologia vascular

A quantificação de placas ateroscleróticas na aorta dos camundongos foi realizada por meio de cortes transversais corados com o corante de lipídios neutros Oil-Red-O. Observa-se que os animais apoE^{-/-} CT apresentaram maior deposição de placas quando comparados aos C57BL/6. O grupo apoE^{-/-} PB demonstrou aumento e o grupo apoE^{-/-} NT+PB diminuição da deposição de placas comparando-se ao grupo apoE^{-/-} CT. As fotomicrografias representam imagens típicas de cada um dos grupos (Figura 11).

Figura 9 – Quantificação de placas ateroscleróticas em cortes transversais



Representação gráfica da análise de deposição de placas na aorta dos camundongos. As imagens abaixo do gráfico representam fotos típicas de cortes histológicos corados com Oil-Red-O de cada um dos respectivos grupos estudados. **p<0,01 vs. C57BL/6 e ##p<0,01 vs. apoE^{-/-} CT.

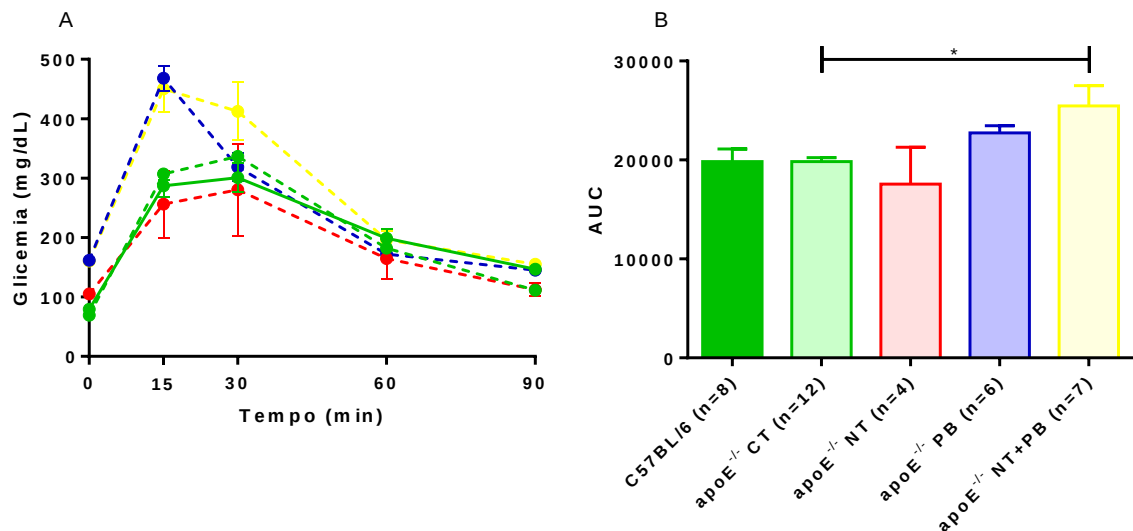
Tabela 3 – Médias da análise de deposição de placas (% do lúmen vascular)

C57BL/6	apoE ^{-/-} CT	apoE ^{-/-} NT	apoE ^{-/-} PB	apoE ^{-/-} NT+PB
0.0 ± 0.0	13 ± 0.98	14 ± 2.4	20 ± 1.3	5.2 ± 0.72

Valores expressos como média ± EPM.

2.3 Teste de tolerância à glicose

O teste de tolerância à glicose foi realizado em animais submetidos a jejum *overnight*. Os resultados demonstram que a glicemia do grupo apoE^{-/-} CT se mostrou semelhante ao do grupo C57BL/6. Isso significa que os animais apoE^{-/-} CT possuem perfil glicêmico equivalente ao controle saudável, apontando que o quadro de aterosclerose não causou intolerância à glicose. Em relação aos grupos apoE^{-/-} com tratamento, nota-se que os animais tratados com probiótico e com a associação apresentaram um pico de glicemia aos 15 minutos e níveis glicêmicos basais mais elevados (Figura 12). As médias dos grupos de acordo com o tempo estão representadas na Tabela 4.

Figura 10 – Representação gráfica das curvas no GTT e AUC

Foi mensurada a glicemia nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60 e 90 minutos após injeção i.p. de glicose. A figura 12A mostra as curvas glicêmicas ao longo do tempo. A figura 12B apresenta a AUC correspondente às curvas glicêmicas. *p<0,05 vs. apoE^{-/-} CT.

Tabela 4 – Médias dos grupos no GTT de acordo com o tempo (mg/dL)

Tempo (min)	C57BL/6	apoE ^{-/-} CT	apoE ^{-/-} NT	apoE ^{-/-} PB	apoE ^{-/-} NT+PB
0 (basal)	79 ± 4.0	69 ± 2.2	105 ± 8.4	162 ± 7.68**	160 ± 6.3**

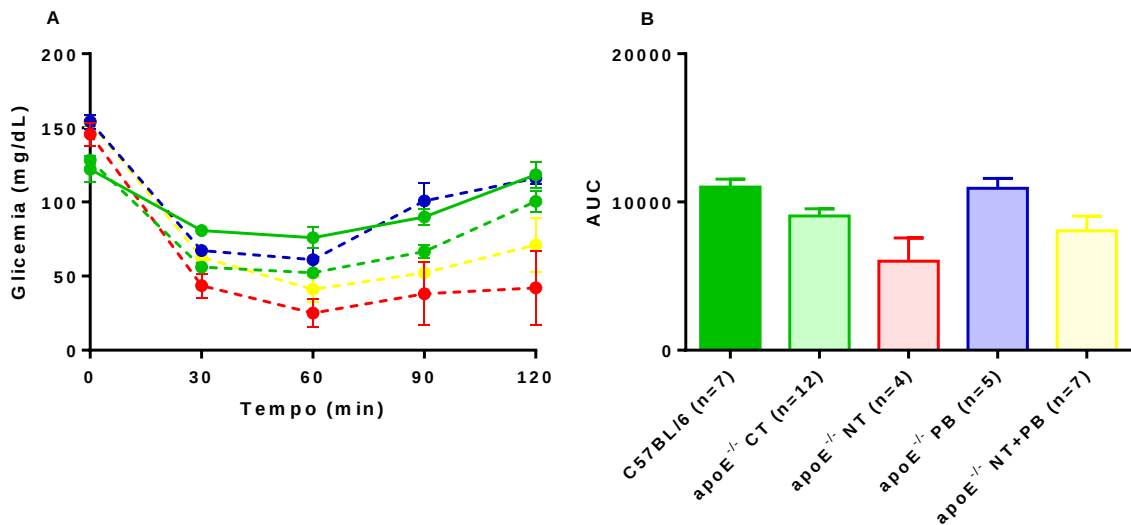
15	287 ± 19	307 ± 9.9	256 ± 56	468 ± 21**	450 ± 39**
30	301 ± 25	337 ± 7.6	280 ± 78	319 ± 23	412 ± 49*
60	199 ± 16	182 ± 7.6	165 ± 35	172 ± 8.2	196 ± 15
90	147 ± 6.4	111 ± 4.1	112 ± 11	145 ± 4.7	155 ± 5.4

Valores expressos como média ± EPM. *p<0,05 e **p<0,01 vs. apoE^{-/-} CT.

6.4 Teste de tolerância à insulina

Para a avaliação da sensibilidade à insulina foi feito o teste de tolerância com os animais em estado alimentado. O grupo apoE^{-/-} CT mostrou ser estatisticamente semelhante ao grupo C57BL/6 e não houve influência dos tratamentos na sensibilidade à insulina levando-se em consideração o grupo apoE^{-/-} CT (Figura 13). As médias dos grupos de acordo com o tempo estão representadas na Tabela 5.

Figura 11 – Representação gráfica das curvas no ITT e AUC



A glicemia foi mensurada nos tempos 0 (basal), 30, 60, 90 e 120 minutos após injeção i.p. de insulina regular. A figura 13A mostra as curvas ao longo do tempo. A figura 13B apresenta a AUC das curvas.

Tabela 5 – Médias dos grupos no ITT de acordo com o tempo (mg/dL)

Tempo (min)	C57BL/6	apoE ^{-/-} CT	apoE ^{-/-} NT	apoE ^{-/-} PB	apoE ^{-/-} NT+PB
0 (basal)	122 ± 8.9	127 ± 3.6	146 ± 7.8	154 ± 4.6	154 ± 4.0
30	81 ± 3.9	60 ± 4.6	44 ± 8.0	67 ± 3.2	63 ± 2.1
60	76 ± 7.1	57 ± 5.5	25 ± 9.5	61 ± 8.0	41 ± 8.4
90	90 ± 5.5	71 ± 5.9	38 ± 21	101 ± 12*	52 ± 14
120	118 ± 8.6	101 ± 6.2	42 ± 25*	116 ± 3.9	71 ± 18*

Valores expressos como média ± EPM. *p<0,05 e **p<0,01 vs. apoE^{-/-} CT.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

A aterosclerose é responsável por altos índices de mortalidade e morbidade em todo o mundo. Ela se caracteriza como uma doença crônica e progressiva que afeta as artérias de médio e grande calibre (CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007; LAHOZ; MOSTAZA, 2007). Hiperlipidemia, hipertensão, diabetes e tabagismo são apenas alguns fatores de risco que levam ao seu desenvolvimento. De acordo com estudos epidemiológicos, mulheres na pré-menopausa tem menos chances de serem acometidas por DCV em comparação com homens da mesma idade, mas a incidência aumenta nas mulheres após a menopausa, apontando os efeitos positivos do estrogênio sobre o sistema cardiovascular (ZHANG *et al.*, 2018).

Entre os diversos modelos animais existentes hoje em dia, os animais apoE^{-/-} foram os escolhidos para utilização nesse trabalho por já serem bem estabelecidos para o estudo da aterosclerose e dos efeitos dos fatores de risco na sua progressão (SASSO *et al.*, 2016). A partir de 10 semanas de idade, eles começam a apresentar lesões em locais tipicamente afetados pela aterosclerose humana, como a aorta e artérias coronárias e pulmonares (PLUMP *et al.*, 1992; DESURMONT *et al.*, 2000) e o surgimento de ateromas pode ser mais rápido a partir da administração de uma dieta *Western Type* (VESELI *et al.*, 2017).

O intuito do presente estudo foi avaliar os efeitos da associação entre o nitrato de sódio e *Lactobacillus plantarum* WJL para o tratamento da aterosclerose e avaliar parâmetros metabólicos em camundongos fêmeas *knockout* para apolipoproteína E.

A hipercolesterolemia é considerada um dos principais precursores da aterogênese. Ela causa aumento da permeabilidade vascular permitindo a migração de lipídios para a camada íntima (BERGHEANU; BODDE; JUKEMA, 2017). Em nosso estudo, os apoE^{-/-} demonstraram um aumento de cerca de 9 vezes nos níveis de colesterol total comparados aos C57BL/6. Esse é um resultado esperado tendo em vista que eles receberam dieta aterogênica (OPPI; LÜSCHER; STEIN, 2019) com o intuito de acelerar o processo de disfunção endotelial e desenvolvimento de ateromas. A apolipoproteína E tem papel importante no metabolismo de lipídios, sendo responsável pela distribuição dessas moléculas entre os tecidos e células do corpo (HUANG; MAHLEY, 2014) e os camundongos apoE^{-/-} não a expressam. Isso explica o motivo desses animais possuírem perfil de colesterol total mais alto que os *wild type*,

corroborando com estudos realizados anteriormente (SMITH *et al.*, 2010; BALARINI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2018; OLIVEIRA, *et al.*, 2019).

O nitrato inorgânico dietético foi considerado como um vilão há mais de meio século devido à sua associação com o processo de carcinogênese, mas isso tem mudado, pois o interesse científico em seus efeitos benéficos na saúde cardiovascular tem crescido exponencialmente (LUNDBERG; CARLSTRÖM; WEITZBERG, 2018). Bakker *et al.* (2016) utilizaram o NaNO_3 em uma dosagem baixa e o mesmo foi capaz de melhorar a disfunção endotelial e a estabilidade das placas ateroscleróticas em camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ submetidos a uma dieta hiperlipídica e Marsch *et al.* (2016) mostraram que a suplementação prolongada com nitrato não causou efeitos colaterais sistêmicos em camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$. Em humanos, alguns trabalhos sugerem que o nitrato inorgânico é capaz de reduzir a pressão arterial (KAPIL *et al.*, 2015; KERLEY *et al.*, 2018). No presente trabalho, o NaNO_3 reduziu os níveis de colesterol total nos animais $\text{apoE}^{-/-}$ quando comparados com seu controle, mesmo resultado encontrado por Li *et al.* (2016). Os autores constataram que o nitrato proveniente do espinafre a uma dose de 60mg/kg foi favorável sobre o perfil lipídico plasmático de camundongos alimentados com dieta rica em gordura e frutose.

Quanto aos probióticos, muitos pesquisadores tem demonstrado seu potencial hipolipidêmico. Huang *et al.* (2014) observaram que o *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 impede a aterosclerose inibindo a absorção intestinal de colesterol em camundongos $\text{apoE}^{-/-}$, Chan *et al.* (2016) demonstraram que a intervenção do *Lactobacillus rhamnosus* GG se mostrou benéfica na redução de colesterol em animais que receberam dieta hiperlipídica e Fuentes *et al.* (2013) relatam a eficácia de três linhagens de *Lactobacillus plantarum* (CECT 7527, CECT 7528 e CECT 7529) na diminuição do colesterol em adultos hipercolesterolêmicos. Em nossos achados, o *Lactobacillus plantarum* WJL falhou em mostrar o mesmo efeito, corroborando com estudos clínicos realizados anteriormente (SIMONS; AMANSEC; CONWAY, 2006; HATAKKA *et al.*, 2008), sugerindo que os resultados dependem da linhagem utilizada.

Como já citado anteriormente, a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica causada pelo acúmulo de lipídios na parede arterial com consequente infiltração de monócitos e outras células do sistema imune, culminando na formação de uma placa ateromatosa (WIERER *et al.*, 2018). Em nosso estudo, foi possível observar que os animais $\text{apoE}^{-/-}$ CT apresentaram maior deposição de placas,

ocupando cerca de 13% do lúmen vascular comparado aos camundongos do grupo C57BL/6, o que já era esperado devido ao nosso modelo experimental e a administração de dieta aterogênica para que o processo de formação de placas ateroscleróticas fosse acelerado.

Na literatura é possível encontrar relatos de linhagens probióticas que foram eficazes em reduzir a deposição de placas em modelos animais. Fang *et al.* (2019) administraram *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 por 12 semanas em animais apoE^{-/-} alimentados com HFD e observaram que a linhagem foi capaz de atenuar a formação de placas, diminuindo a lesão aterosclerótica. Um estudo realizado com camundongos fêmeas apoE^{-/-} conduzido por Chan *et al.* (2016) fez uso de uma mistura probiótica e os autores reportam redução no desenvolvimento de placas por meio da alteração do perfil microbiano intestinal. Em oposição, nossos dados revelam que o *Lactobacillus plantarum* WJL aumentou a área de deposição de placas, sendo esse um mecanismo inédito.

Nesse estudo pioneiro, a associação entre nitrato inorgânico e probiótico foi capaz de reduzir a deposição de placas ateroscleróticas. Khambata *et al.* (2017) mostraram que apesar de não ter efeito na área total da placa, o nitrato inorgânico por meio da dieta resultou em redução no acúmulo de macrófagos, juntamente com aumento de conteúdo do músculo liso, sugerindo que a placa se tornou mais estável e como descrito acima, os probióticos são capazes de inibir a formação de placas (FUENTES *et al.*, 2013). De antemão, podemos sugerir que a associação entre os dois compostos potencializou seus efeitos, mas a mecanística por trás do seu benefício ainda precisa ser elucidada.

Muito se fala sobre a relação entre diabetes e aterosclerose e, de fato, as duas condições estão intimamente conectadas. A hiperglicemia induz modificações no tecido vascular a nível molecular e acelera o processo de aterogênese em casos de diabetes tipo 1 e 2 (ARONSON; RAYFIELD, 2002; CHAIT; BORNFELDT, 2009). Estresse oxidativo, disfunção endotelial e inflamação vascular são fatores fisiopatológicos próprios do desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2 e contribuem de maneira direta para o surgimento de DCV (AGUIAR; DUARTE; CARVALHO, 2019).

Os animais apoE^{-/-} CT receberam dieta aterogênica por 12 semanas, mas não houve diferença em seu perfil glicêmico no GTT quando comparados aos C57BL/6.

Pettersson *et al.* (2012) conduziram um estudo onde camundongos machos e fêmeas foram submetidos à dieta rica em gordura e as fêmeas se mostraram protegidas contra a síndrome metabólica causada pela alimentação. Os autores indicam que tal efeito pode se dar pela ação do estrogênio.

O grupo apoE^{-/-} NT obteve valores semelhantes aos grupos C57BL/6 e apoE^{-/-} CT, ou seja, o tratamento manteve os níveis glicêmicos dentro da normalidade, não havendo incremento e nem piora no GTT. Na literatura, algumas pesquisas são controversas. Matthews *et al.* (2018) demonstram que o nitrato inorgânico não melhora os efeitos da hiperglicemia em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, enquanto outros trabalhos relatam o seu sucesso em modelo animal hiperglicêmico e em camundongos com deficiência de eNOS (CARLSTRÖM *et al.*, 2010; KHALIFI *et al.*, 2015).

Os grupos apoE^{-/-} PB e apoE^{-/-} NT+PB apresentaram um pico glicêmico aos 15 minutos da curva e glicemia basal mais elevada, mas logo após os animais tratados com probiótico conseguiram retornar à níveis normais, coincidindo com ambos os controles. Os camundongos tratados com a associação mantiveram a glicemia elevada por um período maior de tempo, mas também conseguiram se igualar aos demais grupos. Na AUC, o grupo apoE^{-/-} NT+PB se mostrou estatisticamente diferente do apoE^{-/-} CT.

Diversas pesquisas descrevem os probióticos como uma alternativa promissora na regulação glicêmica, como a de Andersson *et al.* (2010), onde o *Lactobacillus plantarum* DSM 15313 reduziu a glicose plasmática em animais C57BL/6 alimentados com alto teor de gordura e Rune *et al.* (2016) afirmam que a modulação da microbiota intestinal melhora vários parâmetros, inclusive a tolerância à glicose em camundongos apoE^{-/-}. Esses são apenas alguns exemplos dentre tantos outros existentes na literatura que reportam os efeitos benéficos de linhagens probióticas quanto à glicemia (AOKI *et al.*, 2017; BALAKUMAR *et al.*, 2018; KHALILI *et al.*, 2019). Corroborando com o que foi encontrado em nosso estudo, Fålk e Bäckhed (2012) não observaram sucesso de linhagens de *Lactobacillus reuteri* sobre o GTT de animais *knockout* para apolipoproteína E.

A associação entre nitrato inorgânico e probiótico é inédita e não há relatos de seu uso, por isso, os fatores que levaram com que sua utilização em nosso modelo

experimental sugerissem uma leve tendência de intolerância à glicose permanecem desconhecidos.

Responsável por atuar como regulador do metabolismo celular, a insulina é um hormônio essencial em nosso organismo (ORMAZABAL *et al.*, 2018). Em casos de pacientes com DM e aterosclerose, é muito comum o quadro de resistência à insulina ocasionada por glicotoxicidade e lipotoxicidade (AZEVEDO; VICTOR; OLIVEIRA, 2010).

Os grupos C57BL/6 e apoE^{-/-} CT mantiveram a sensibilidade à insulina, apontando que mesmo a dieta aterogênica não foi capaz de induzir resistência nesses animais. Citando mais uma vez o estudo de Petersson *et al.* (2012), as fêmeas parecem ser mais resistentes à síndrome metabólica até quando são alimentadas com uma HFD. Em humanos, comparando-se com homens da mesma faixa etária, mulheres na pré-menopausa possuem sensibilidade à insulina preservada devido ao estrogênio circulante e o risco de diabetes tipo 2 e DCV aumenta após a menopausa (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013). Evidências em modelos animais corroboram com o descrito acima. O grupo de Riant *et al.* (2009) utilizou camundongos machos, fêmeas e fêmeas ovariectomizadas em seu estudo e administraram tanto dieta padrão quanto hiperlipídica. Foi observado que os níveis de estrogênio foram capazes de exercer um efeito protetor contra a resistência à insulina nas fêmeas alimentadas com HFD e Yan *et al.* (2018) obtiveram resultados semelhantes com o mesmo modelo experimental.

Como abordado anteriormente, probióticos têm sido utilizados como reguladores glicêmicos e também possuem efeitos sobre a resistência à insulina (ALARD *et al.*, 2015; BAGAROLLI *et al.*, 2017; ÇELİK; SÖĞÜT, 2019). Em nosso modelo, a linhagem de *Lactobacillus plantarum* WJL não se mostrou efetiva, apenas mantendo os valores próximos daqueles encontrados nos grupos C57BL/6 e apoE^{-/-} CT. O mesmo achado foi relatado por Fåk e Bäckhed (2012). Eles administraram linhagens de *Lactobacillus reuteri* em camundongos apoE^{-/-}, mas não foram observados efeitos significativos no ITT.

O tratamento com a associação não aumentou a sensibilidade à insulina como era esperado e o NaNO₃ apresentou diferença no último ponto da curva, mas não é o suficiente para afirmar que tal composto obteve êxito. Apesar dos nossos resultados,

na literatura é possível encontrar relatos do nitrato inorgânico e seus efeitos na resistência à insulina. A suplementação com nitrato dietético melhorou a resistência em camundongos KKA(y) diabéticos tipo 2 (OHTAKE *et al.*, 2015), a sensibilidade à insulina foi aumentada em ratos alimentados com dieta rica em frutose (ESSAWY; ABDEL-SATER; ELBAZ, 2014) e a deficiência de nitrato e nitrito levou à síndrome metabólica e disfunção endotelial em animais C57BL/6 (KINA-TANADA *et al.*, 2017).

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

No presente trabalho desenvolvemos um produto composto pela associação entre nitrato de sódio e *Lactobacillus plantarum* WJL para o tratamento da aterosclerose em camundongos fêmeas *knockout* para apolipoproteína E que se mostrou eficaz na redução das placas ateroscleróticas experimentalmente. Por se tratar de um estudo original, o mecanismo responsável por tal efeito ainda não foi desvendado, havendo a necessidade de mais investigação. Também observamos que o nitrato de sódio de maneira isolada foi capaz de diminuir os níveis de colesterol total desses animais.

O uso da associação se mostra como uma alternativa promissora para o tratamento da aterosclerose e estudos clínicos que possam garantir a sua eficácia em pacientes corresponderá a uma nova etapa dessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C.; DUARTE, R.; CARVALHO, D. Nova abordagem para o tratamento da diabetes: da glicemia à doença cardiovascular. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 38, n. 1, p. 53-63, jan. 2019.
- ALARD, J.; LEHRTER, V.; RHIMI, M.; MANGIN, I.; PEUCELLE, V.; ABRAHAM, A. L.; MARIADASSOU, M.; MAGUIN, E.; WALIGORA-DUPRIET, A. J.; POT, B.; WOLOWCZUK, I.; GRANGETTE, C. Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, dez. 2015.
- ANDERSSON, U.; BRÄNNING, C.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G.; ALENFALL, J.; ÖNNING, G.; NYMAN, M.; HOLM, C. Probiotics lower plasma glucose in the high-fat fed C57BL/6 mouse. **Beneficial Microbes**, v. 1, n. 2, p. 189-196, jun. 2010.
- ANLAMBERT, W.; LENBURY, Y.; BELL, J. Modeling fibrous cap formation in atherosclerotic plaque development: stability and oscillatory behavior. **Advances in Difference Equations**, v. 2017, n. 195, 2017.
- AOKI, R.; KAMIKADO, K.; SUDA, W.; TAKII, H.; MIKAMI, Y.; SUGANUMA, N.; HATTORI, M.; KOGA, Y. A proliferative probiotic Bifidobacterium strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 43522, 2017.
- APPANNA, V. D. Dysbiosis, probiotics, and prebiotics: in diseases and health. *In: Human microbes – the power within*. Singapura: Springer, 2018. p. 81-122.
- ARONSON, D.; RAYFIELD, E. J. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. **Cardiovascular Diabetology**, v. 1, n. 1, abr. 2002.
- AYALA, J. E.; SAMUEL, V. T.; MORTON, G. J.; OBICI, S.; CRONIGER, C. M.; SHULMAN, G. I.; WASSERMAN, D. H.; MCGUINNESS, O. P. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, n. 10, p. 525-534, set/out. 2010.
- AZEVEDO, S.; VICTOR, E. G.; OLIVEIRA, D. C. Diabetes mellitus e aterosclerose: noções básicas da fisiopatologia para o clínico geral. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 8, n. 6, nov./dez. 2010.
- BADIMON, L.; VILAHUR, G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. **Journal of Internal Medicine**, v. 276, n. 6, dez. 2014.
- BAGAROLLI, R. A.; TOBAR, N.; OLIVEIRA, A. G.; ARAÚJO, T. G.; CARVALHO, B. M.; ROCHA, G. Z.; VECINA, J. F.; CALISTO, K.; GUADAGNINI, D.; PRADA, P. O.; SANTOS, A.; SANTOS, A.; SAAD, S. T. O.; SAAD, M. J. A. Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 50, p. 16-25, dez. 2017.
- BAHADORAN, Z.; GHASEMI, A.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F.; HADAEIGH, F. Beneficial effects of inorganic nitrate/nitrite in type 2 diabetes and its complications. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, n. 16, 2015.
- BAKER, L.; MELDRUM, K. K.; WANG, M.; SANKULA, R.; VANAM, R.; RAIESDANA, A.; TSAI, B.; HILE, K.; BROWN, J. W.; MELDRUM, D. R. The role of estrogen on

cardiovascular disease. **Journal of Surgical Research**, v. 115, n. 2, p. 325-344, dez. 2003.

BAKKER, J. R.; BONDONNO, N. P.; GASPARI, T. A.; KEMP-HARPER, B. 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^{-/-} mouse fed with a high fat diet. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 99, p. 189-198, out. 2016.

BALAKUMAR, M.; PRABHU, D.; SATHISHKUMAR, C.; PRABU, P.; ROKANA, N.; KUMAR, R.; RAGHAVAN, S.; SOUNDARAJAN, A.; GROVER, S.; BATISH, V. K.; MOHAN, V.; BALASUBRAMANYAM, M. Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. **European Journal of Nutrition**, v. 57, p. 279-295, 2018.

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 mice. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 3, jan. 2013.

BELLISARII, F. C.; RADICO, F.; MUSCENTE, F.; HOROWITZ, J.; CATERINA, R. Nitrates and other nitric oxide donors in cardiology – current positioning and perspectives. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 26, n. 1, p. 55-69, fev. 2012.

BENTZON, J. F.; OTSUKA, F.; VIRMANI, R.; FALK, E. Mechanisms of plaque formation and rupture. **Circulation Research**, v. 114, n. 12, p. 1852-1866, 2014.

BERGHEANU, S. C.; BODDE, M. C.; JUKEMA, J. W. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis. **Netherlands Heart Journal**, v. 25, p. 231-242, fev. 2017.

BIELLI, A.; SCIOLI, M. G.; MAZZAGLIA, D.; DOLDO, E.; ORLANDI, A. Antioxidants and vascular health. **Life Sciences**, v. 143, p. 209-216, 2015.

BOWE, J. E.; FRANKLIN, Z. J.; HAUGE-EVANS, A. C.; KING, A. J.; PERSAUD, S. J.; JONES, P. M. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. **Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. G13-G25, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2011. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022**. Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_acoes_enfrent_dcnt_2011.pdf. Acesso em: 28 dez. 2019.

BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 3-31, fev./abr. 2005.

BU, J.; WANG, Z. Cross-talk between gut microbiota and heart via the routes of metabolite and immunity. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2018, 2018.

CARLSTRÖM, M.; LARSEN, F. J.; NYSTRÖM, T.; HEZEL, M.; BORNIEQUEL, S.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 41, out. 2010.

ÇELİK, M. N.; SÖĞÜT, M. Ü. Probiotics improve chemerin levels and metabolic syndrome parameters in obese rats. **Balkan Medical Journal**, v. 36, n. 5, p. 270-275, set. 2019.

CHAIT, A.; BORNFELDT, K. E. Diabetes and atherosclerosis: is there a role for hyperglycemia?. **Journal of Lipid Research**, v. 50, abr. 2009.

CHAN, Y. K.; BRAR, M. S.; KIRJAVAINEN, P. V.; CHEN, Y.; PENG, J.; LI, D.; LEUNG, F. C. C.; EL-NEZAMI, H. High fat diet induced atherosclerosis is accompanied with low colonic bacterial diversity and altered abundances that correlates with plaque size, plasma A-FABP and cholesterol: a pilot study of high fat diet and its intervention with *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) or telmisartan in apoE^{-/-} mice. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 264, nov. 2016.

CHAN, Y. K.; EL-NEZAMI, H.; CHEN, Y.; KINNUNEN, K.; KIRJAVAINEN, P. V. Probiotic mixture VSL#3 reduce high fat diet induced vascular inflammation and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. **AMB Express**, v. 6, n. 61, ago. 2016.

CHIANG, S. S.; PAN, T. M. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 903-916, 2012.

CORRÊA-CAMACHO, C. R.; DIAS-MELICIO, L. A.; SOARES, A. M. V. C. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 41-48, jan./mar. 2007.

COSTABILE, A.; BUTTARAZZI, I.; KOLIDA, S.; QUERCIA, S.; BALDINI, J. SWANN, J. R.; BRIGIDI, P.; GIBSON, G. R. An *in vivo* assessment of the cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* ECGC 13110402 in normal to mildly hypercholesterolaemic adults. **PloS One**, v. 12, n. 12, dez. 2017.

DA LUZ, P. L.; CHAGAS, A. C. P.; DOURADO, P. M. M.; LAURINDO, F. R. M. Endothelium in atherosclerosis: plaque formation and its complications. **Endothelium and Cardiovascular Diseases**, p. 493-512, 2018.

DAIBER, A.; MÜNZEL, T. Organic nitrate therapy, nitrate tolerance, and nitrate-induced endothelial dysfunction: emphasis on redox biology and oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 11, out. 2015.

DAMODHARAN. K.; LEE, Y. S.; PALANIYANDI, S. A.; YANG, S. H.; SUH, J. W. Preliminary probiotic and technological characterization of *Pediococcus pentosaceus* strain KID7 and *in vivo* assessment of its cholesterol-lowering activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 768, ago. 2015.

DATASUS. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. 2019. **Estatísticas vitais**. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>. Acesso em: 29 dez. 2019.

DESURMONT, C.; CAILLAUD, J. M.; EMMANUEL, F.; BENOIT, P.; FRUCHAR, J. C.; CASTRO, G.; BRANELLEC, D.; HEARD, J. M.; DUVERGER, N. Complete atherosclerosis regression after human apoE gene transfer in apoE-deficient/nude mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 2, p. 435-442, fev. 2000.

DIAS, R. G.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, M. H. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 1, p. 68-75, 2011.

EL KHATIB, N.; GENIEYS, S.; KAZMIERCZAK, B.; VOLPERT, V. Reaction-diffusion model of atherosclerosis development. **Journal of Mathematical Biology**, v. 65, n. 2, p. 349-374, ago. 2012.

ESSAWY, S. S.; ABDEL-SATER, K. A.; ELBAZ, A. A. Comparing the effects of inorganic nitrate and allopurinol in renovascular complications of metabolic syndrome in rats: role of nitric oxide and uric acid. **Archives of Medical Science**, v. 10, n. 3, p. 537-545, jun. 2014.

FÅK, F.; BÄCKHED, F. *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in apoE^{-/-} mice. **PloS One**, v. 7, n. 10, out. 2012.

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^{-/-} mice fed with a high-fat diet. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 8, p. 3533-3541, 2019.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. 2001. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria – joint FAO/WHO expert consultation**. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2020.

FAVA, C.; MONTAGNANA, M. Atherosclerosis is an inflammatory disease which lacks a common anti-inflammatory therapy: how human genetics can help to this issue, a narrative review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

FÖRSTERMANN, U.; XIA, N.; LI, H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 120, n. 4, fev. 2017.

FRANÇA-SILVA, M. S.; LUCIANO, M. N.; RIBEIRO, T. P.; SILVA, J. S.; SANTOS, A. F.; FRANÇA, K. C.; NAKAO, L. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A. The 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan, a new nitric oxide donor, induces vasorelaxation in mesenteric arteries of the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 690, n. 1-3, p. 170-175, set. 2012.

FUENTES, M. C.; LAJO, T.; CARRIÓN, J. M.; CUNE, J. Cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolemic adults. **The British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 10, p. 1866-1872, mai. 2013.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, nov. 1980.

GETZ, G. S.; REARDON, C. A. Animal models of atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 5, p. 1104-1115, mai. 2012.

GHIMIRE, K.; ALTMANN, H. M.; STRAUB, A. C.; ISENBERG, J. S. Nitric oxide: what's new to NO?. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 312, n. 2, p. C254-C262, mar. 2017.

GISTERÅ, A.; HANSSON, G. K. The immunology of atherosclerosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, p. 368-380, abr. 2017.

GONZALEZ, L.; TRIGATTI, B. L. Macrophage apoptosis and necrotic core development in atherosclerosis: a rapidly advancing field with clinical relevance to imaging and therapy. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 33, n. 3, p. 303-312, mar. 2017.

GREENOW, K.; PEARCE, N. J.; RAMJI, D. P. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 5, p. 329-342, mai. 2005.

HANSSON, G. K.; HERMANSSON, A. The immune system in atherosclerosis. **Nature Immunology**, v. 12, p. 204-212, fev. 2011.

HATAKKA, K.; MUTANEN, M.; HOLMA, R.; SAXELIN, M.; KORPELA, R. *Lactobacillus rhamnosus* LC205 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii* JS administered in capsules is ineffective in lowering serum lipids. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 441-447, 2008.

HEAD, T.; DAUNERT, S.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. The aging risk and atherosclerosis: a fresh look at arterial homeostasis. **Frontiers in Genetics**, v. 8, dez. 2017.

HERMAN, A. G.; MONCADA, S. Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of atherosclerosis. **European Heart Journal**, v. 26, n. 19, p. 1945-1955, out. 2005.

HERRINGTON, W.; LACEY, B.; SHERLIKER, P.; ARMITAGE, J.; LEWINGTON, S. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. **Circulation Research**, v. 118, n. 4, fev. 2016.

HORD, N. G.; TANG, Y.; BRYAN, N. S. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, n. 1, p. 1-10, 2009.

HUANG, Y.; MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 72, p. 3-12, dez. 2014.

HUANG, Y.; WANG, J.; QUAN, G.; WANG, X.; YANG, L.; ZHONG, L. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 prevents atherosclerosis via inhibition of intestinal cholesterol absorption in apolipoprotein E-knockout mice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7496-7504, 2014.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, L. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, dez. 1987.

IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO, J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. **Circulation Research**, v. 90, n. 1, p. 21-28, 2002.

INSULL JR, W. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 122, n. 1, p. S3-S14, jan. 2009.

IORGA, A.; CUNNINGHAM, C. M.; MOAZENI, S.; RUFFENACH, G.; UMAR, S.; EGHBALI, M. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. **Biology of Sex Differences**, v. 8, n. 33, 2017.

JACKSON, J. K.; PATTERSON, J. A.; MACDONALD-WICKS, L. K.; OLDMEADOW, C.; MCEVOY, M. A. The role of inorganic nitrate and nitrite in cardiovascular disease risk factors: a systematic review and meta-analysis of human evidence. **Nutrition Reviews**, v. 76, n. 5, p. 348-371, mai. 2018.

JÄRDET, C.; PHILLIPSON, M.; HOLM, L.; LUNDBERG, J. O.; BORNIEQUEL, S. Preventive and therapeutic effects of nitrite supplementation in experimental inflammatory bowel disease. **Redox Biology**, v. 2, p. 73-81, 2014.

JIN, M.; QIAN, Z.; YIN, J.; XU, W.; ZHOU, X. The role of intestinal microbiota in cardiovascular disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 4, p. 23-43-2350, fev. 2019.

KAPIL, V.; KHAMBATA, R. S.; ROBERTSON, A.; CAULFIELD, M. J.; AHLUWALIA, A. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients. **Hypertension**, v. 65, n. 2, fev. 2015.

KAPOURCHALI, F. R.; SURENDIRAN, G.; CHEN, L.; UITZ, E.; BAHADORI, B.; MOGHADASIAN, M. H. Animal models of atherosclerosis. **World Journal of Clinical Cases**, v. 2, n. 5, p. 126-132, mai. 2014.

KATSIMICHAS, T.; ANTONOPOULOS, A. S.; KATSIMICHAS, A.; OHTANI, T.; SAKATA, Y.; TOUSOULIS, D. The intestinal microbiota and cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**, v. 115, n. 10, p. 1471-1486, ago. 2019.

KECHAGIA, M.; BASOULIS, D.; KONSTANTOPOULOU, S.; DIMITRIADI, D.; GYFTOPULOU, K.; SKARMOUTSOU, N.; FAKIRI, E. M. Health benefits of probiotics: a review. **ISRN Nutrition**, v. 2013, jan. 2013.

KERLEY, C. P.; DOLAN, E.; JAMES, P. E.; CORMICAN, L. Dietary nitrate lowers ambulatory blood pressure in treated, uncontrolled hypertension: a 7-d, double-blind, randomised, placebo-controlled, cross-over trial. **British Journal of Nutrition**, v. 119, n. 6, p. 658-663, mar. 2018.

KETEEPE-ARACHI, T.; SHARMA, S. Cardiovascular disease in women: understanding symptoms and risk factors. **European Cardiology Review**, v. 12, n. 1, p. 10-13, ago. 2017.

KHALIFI, S.; RAHIMPOUR, A.; JEDDI, S.; GHANBARI, M.; KAZEROUNI, F.; GHASEMI, A. Dietary nitrate improves glucose tolerance and lipid profile in an animal model of hyperglycemia. **Nitric Oxide**, v. 44, p. 24-30, jan. 2015.

KHALILI, L.; ALIPOUR, B.; JAFARABADI, M. A.; HASSANALILOU, T.; ABBASI, M. M.; FARAJI, I. Probiotic assisted weight management as a main factor for glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 5, 2019.

KHAMBATA, R. S.; GHOSH, S. M.; RATHOD, K. S.; THEVATHASAN, T.; FILOMENA, F.; XIAO, Q.; AHLUWALIA, A. Antiinflammatory actions of inorganic nitrate stabilize

the atherosclerotic plaque. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 4, jan. 2017.

KIM, E. K.; PARK, Y. M.; LEE, O. Y.; LEE, W. J. Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* strain WJL, a *Drosophila* gut symbiont. **Genome Announcements**, v. 1, n. 6, nov./dez. 2013.

KINA-TANADA, M.; SAKANASHI, M.; TANIMOTO, A.; KANAME, T.; MATSUZAKI, T.; NOGUCHI, K.; UCHIDA, T.; NAKASONE, J.; KOZUKA, C.; ISHIDA, M.; KUBOTA, H.; TAIRA, Y.; TOTSUKA, Y.; KINA, S.; SUNAKAWA, H. Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and cardiovascular death in mice. **Diabetology**, v. 60, n. 6, p. 1138-1151, jun. 2017.

LAHOZ, C.; MOSTAZA, J. M. Atherosclerosis as a systemic disease. **Revista Española de Cardiología**, v. 60, n. 2, p. 184-195, fev. 2007.

LEE, Y. T.; LAXTON, V.; LIN, H. Y.; CHAN, Y. W. F.; FITZGERALD-SMITH, S.; TO, T. L. O.; YAN, B. P.; LIU, T.; TSE, G. Animal models in atherosclerosis. **Biomedical Reports**, v. 6, n. 3, p. 259-266, jan. 2017.

LI, T.; LU, X.; SUN, Y.; YANG, X. Effects of spinach nitrate on insulin resistance, endothelial dysfunction markers and inflammation in mice with high-fat and high-fructose consumption. **Food & Nutrition Research**, v. 60, set. 2016.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 9, p. 2045-2051, set. 2012.

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

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, p. 317-325, mai. 2011.

LIMA, L. C. F.; BRAGA, 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, 2015.

LIND, M.; HAYES, A.; CAPRNDIA, M.; PETROVIC, D.; RODRIGO, L.; KRIZLIAK, P.; ZULLI, A. Inducible nitric oxide synthase: good or bad?. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 370-375, set. 2017.

LIU, B.; ZHANG, Y.; WANG, R.; AN, Y.; GAO, W.; BAI, L.; LI, Y.; ZHAO, S.; FAN, J.; LIU, E. Western diet feeding influences gut microbiota profiles in apoE knockout mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 159, jul. 2018.

LUNDBERG, J. O.; CARLSTRÖM, M.; WEITZBERG, E. Metabolic effects of dietary nitrate in health and disease. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 9-22, jul. 2018.

LUNDBERG, J. O.; GLADWIN, M. T.; WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, p. 623-641, ago. 2015.

LUNDBERG, J. O.; GOVONI, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 395-400, 2004.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 156-168, fev. 2008.

MAHMOODZADEH, S.; DWORATZEK, E. The role of 17 β -estradiol and estrogen receptors in regulation of Ca²⁺ channels and mitochondrial function in cardiomyocytes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, mai. 2019.

MARKOWIAK, P.; ŚLIZEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 1021, set. 2015.

MARSCH, E.; THEELEN, T. L.; JANSSEN, B. J. A.; BRIEDE, J. J.; HAENEN, G. R.; SENDEN, J. M. G.; VAN LOON, L. J. C.; POEZE, M.; BIERAU, J.; GJBELS, M. J.; DAEMEN, M. J. A. P.; SLUIMER, J. C. The effect of prolonged dietary nitrate supplementation on atherosclerosis development. **Atherosclerosis**, v. 245, p. 212-221, fev. 2016.

MARTINO, M. E.; BAYJANOV, J. R.; JONCOUR, P.; HUGHES, S.; GILLET, B.; KLEEREBEZEM, M.; SIEZEN, R.; VAN HIJUM, S. A. F. T.; LEULIER, F. Resequencing of the *Lactobacillus plantarum* strain WJL genome. **Genome Announcements**, v. 3, n. 6, nov./dez. 2015.

MASSA, K. H. C.; DUARTE, Y. A. O.; FILHO, A. D. P. C. Análise da prevalência de doenças cardiovasculares e fatores associados em idosos, 2000-2010. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 1, jan. 2019.

MATTHEWS, V. B.; HOLLINGSHEAD, R.; KOCH, H.; CROFT, K. D.; WARD, N. C. Long-term dietary nitrate supplementation does not prevent development of metabolic syndrome in mice fed a high-fat diet. **International Journal of Endocrinology**, v. 2018, ago. 2018.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The role of strogens in control of energy balance and glucose homeostasis. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 3, p. 309-338, jun. 2013.

MCNALLY, B.; GRIFFIN, J. L.; ROBERTS, L. D. Dietary inorganic nitrate: from villain to hero in metabolic disease?. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 1, p. 67-78, jan. 2016.

MELO, J. B.; CAMPOS, R. C. A.; CARVALHO, P. C.; MEIRELES, M. F.; ANDRADE, M. V. G.; ROCHA, T. P. O.; FARIAS, W. K. S.; MORAES, M. J. D.; SANTOS, J. C.; NETO, J. A. F. Fatores de risco cardiovasculares em mulheres climatéricas com doença arterial coronariana. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 1, p. 4-11, 2018.

MENDES-JÚNIOR, L. G.; GUIMARÃES, D. D.; GADELHA, D. D. A.; DINIZ, T. F.; BRANDÃO, M. C. R.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; LEMOS, V. S.; FRANÇA-SILVA, M. S.; BRAGA, V. A. The new nitric oxide donor cyclohexane nitrate induces vasorelaxation, hypotension, and antihypertensive effects via NO/cGMP/PKG pathway. **Frontiers in Physiology**, v. 6, 2015.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 3, p. 305-321, jun. 2007.

MODANÊSI, P. V. G.; MERCER, N. S.; BERNARDI, J. F. B. Efeitos do uso de probióticos na hipercolesterolemia. **Revista de Pesquisa em Saúde**, v. 17, n. 1, p. 47-50, jan-abr. 2016.

MOZAFFARIAN, D.; BENJAMIN, E. J.; GO, A. S.; ARNETT, D. K.; BLAHA, M. J.; CUSHMAN, M.; DAS, S. R.; FERRANTI, S.; DESPRÉS, J. P.; FULLERTON, H. J.; HOWARD, V. J.; HUFFMAN, M. D.; ISASI, C. R.; JIMÉNEZ, M. C.; JUDD, S. E.; KISSELA, B. M.; LICHTMAN, J. H.; LISABETH, L. D.; LIU, S.; MACKEY, R. H.; MAGID, D. J.; MCGUIRE, D. K.; MOHLERLL, E. R.; MOY, C. S.; MUNTNER, P.; MUSSOLINO, M. E.; NASIR, K.; NEUMAR, R. W.; NICHOL, G.; PALANIAPPAN, L.; PANDEY, D. K.; REEVES, M. J.; RODRIGUEZ, C. J.; ROSAMOND, W.; SORLIE, P. D.; STEIN, J.; TOWFIGHI, A.; TURAN, T. N.; VIRANI, S. S.; WOO, D.; YEH, R. W.; TURNER, M. B. Heart disease and stroke statistics – 2016 updates. **Circulation**, v. 133, n. 4, jan. 2016.

MÜNDEL, T.; DAIBER, A. Inorganic nitrite and nitrate in cardiovascular therapy: a better alternative to organic nitrates as nitric oxide donors?. **Vascular Pharmacology**, v. 102, p. 1-10, mar. 2018.

MURPHY, E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 109, n. 2, p. 687-696, set. 2011.

NABI, X. H.; MA, C. Y.; MANAER, T.; HEIZATI, M.; WULAZIBIEKE, B.; AIERKEN, L. Anti-atherosclerotic effect of traditional fermented cheese whey in atherosclerotic rabbits and identification of probiotics. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 16, n. 309, ago. 2016.

NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, D.; BEHARE, P. V.; JAIN, S.; YADAV, H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiology Letters**, v. 332, n. 1, p. 1-15, set. 2012.

NCCIH. National Center for Complementary and Integrative Health. 2019. **Probiotics: what you need to know**. Disponível em: <https://nccih.nih.gov/health/probiotics/introduction.htm#hed1>. Acesso em: 08 fev. 2020.

NDREPEPA, G. Atherosclerosis and ischaemic heart disease: here to stay or gone tomorrow. **Indian Journal of Medical Research**, v. 146, n. 3, p. 293-297, set. 2017.

NHLBI. National Heart, Lung, and Blood Institute. 2018. **Atherosclerosis**. Disponível em: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/atherosclerosis>. Acesso em: 29 dez. 2019.

OHTAKE, K.; NAKANO, G.; EHARA, N.; SONODA, K.; ITO, J.; UCHIDA, H.; KOBAYASHI, J. Dietary nitrate supplementation improves insulin resistance in type 2 diabetic KKA(y) mice. **Nitric Oxide**, v. 44, p. 31-38, jan. 2015.

OLIVEIRA, T. F.; BATISTA, P. R.; LEAL, M. A.; CAMPAGNARO, B. P.; NOGUEIRA, B. V.; VASSALLO, D. V.; MEYRELLES, S. S. Chronic cadmium exposure accelerates the development of atherosclerosis and induces vascular dysfunction in the aorta of apoE^{-/-} mice. **Biological Trace Element Research**, v. 187, n. 1, p. 163-171, jan. 2019.

OMAR, S. A.; ARTIME, E.; WEBB, A. J. A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 4, p. 229-240, 2012.

OPARIL, S.; TOLBERT, T. Cardiovascular effects of estrogen. **American Journal of Hypertension**, v. 14, n. S3, p. 186S-193S, jun. 2001.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. 2017. **Doenças cardiovasculares**. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096. Acesso em: 27 dez. 2019.

OPPI, S.; LÜSCHER, T. F.; STEIN, S. Mouse models for atherosclerosis research – which is my line?. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 6, abr. 2019.

ORMAZABAL, V.; NAIR, S.; ELFEKY, O.; AGUAYO, C.; SALOMON, C.; ZUÑIGA, F. A. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. **Cardiovascular Diabetology**, v. 17, n. 122, 2018.

PALANIYANDI, S. A.; DAMODHARAN, K.; SUH, J. W.; YANG, S. H. Probiotic characterization of cholesterol-lowering *Lactobacillus fermentum* MJM60397. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, ago. 2019.

PAN, H.; GUO, R.; JU, Y.; WANG, Q.; ZHU, J.; XIE, Y.; ZHENG, Y.; LI, T.; LIU, Z.; LU, L.; LI, F.; TONG, B.; XIAO, L.; XU, X.; LEUNG, E. L. H.; LI, R.; YANG, H.; WANG, J.; ZHOU, H.; JIA, H.; LIU, L. A single bacterium restores the microbiome dysbiosis to protect bones from destruction in a rat model of reumathoid arthritis. **Microbiome**, v. 7, n. 107, jul. 2019.

PETTERSSON, U. S.; WALDÉN, T. B.; CARLSSON, P. O.; JANSSON, L.; PHILLIPSON, M. Female mice are protect against high-fat induced metabolic syndrome and increase in the regulatory T cell population in adipose tissue. **PloS One**, v. 7, n. 9, 2012.

PLUMP, A. S.; SMITH, J. D.; HAYEK, T.; AALTO-SETÄLÄ, 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, out. 1992.

PORTUGAL, L. R.; GONÇALVES, J. L.; FERNANDES, L. R.; SILVA, H. P. S.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Effect of *Lactobacillus delbrueckii* on cholesterol metabolism in germ free mice and on atherogenesis in apolipoprotein E knock-out mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 5, p. 629-635, 2006.

POZNYAK, A. V.; SILAEVA, Y. Y.; OREKHOV, A. N.; DEYKIN, A. V. Animal models of human atherosclerosis: current progress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, n. 3, 2020.

RAFIEIAN-KOPAEI, M.; SETORKI, M.; DOUDI, M.; BARADARAN, A.; NASRI, H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 5, n. 8, p. 927-946, 2014.

RAJAMANI, K.; FISHER, M. An overview of atherosclerosis. **Primer on Cerebrovascular Diseases**, v. 2, p. 105-108, 2017.

RAMESHRAD, M.; BABAEI, H.; AZARMI, Y.; FOULADIA, D. F. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. **Life Sciences**, v. 145, p. 190-204, 2016.

RIANT, E.; WAGET, A.; COGO, H.; ARNAL, J. F.; BURCELIN, R.; GOURDY, P. Estrogens protect high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2109-2117, mai. 2009.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 115-126, 1999.

RUNE, I.; ROLIN, B.; LARSEN, C.; NIELSEN, D. S.; KANTER, J. E.; BORNFELDT, K. E.; LYKKESFELDT, J.; BUSCHARD, K.; KIRK, R. K.; CHRISTOFFERSEN, B.; FELS, J. J.; JOSEFSEN, K.; KIHIL, P.; HANSEN, A. K. Modulating the gut microbiota improves glucose tolerance, lipoprotein profile and atherosclerotic plaque development in apoE-deficient mice. **PloS One**, v. 11, n. 1, 2016.

RYAN, J. J.; HANES, D. A.; SCHAFER, M. B.; MIKOLAI, J.; ZWICKEY, H. Effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* on cholesterol and lipoprotein particles in hypercholesterolaemic adults: a single-arm, open-label pilot study. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 21, n. 5, mai. 2015.

SAAD, S. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, 2006.

SASSO, G. L.; SCHLAGE, W. K.; BOUÉ, S.; VELJKOVIC, E.; PEITSCH, M. C.; HOENG, J. The apoE^{-/-} model mice: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 146, mai. 2016.

SEMB, A. G.; IKDHAL, E.; WIBETOE, G.; CROWSON, C.; ROLLEFSTAD, S. Atherosclerotic cardiovascular disease prevention in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 16, p. 361-379, 2020.

SHANNON, O. M.; GRISOTTO, G.; BABATEEN, A.; MCGRATTAN, A.; BRANDT, K.; MATHERS, J. C.; SIERVO, M. Knowledge and beliefs about dietary inorganic nitrate among UK-based nutrition professionals: development and application of the KINDS online questionnaire. **BMJ Open**, v. 9, 2019.

SHARMA, K.; KASS, D. A. Inorganic nitrates. **Circulation Research**, v. 120, n. 7, p. 1057-1059, mar. 2017.

SIASOS, G.; SARA, J. D.; ZAROMYTIDOU, M.; PARK, K. H.; COSKUN, A. U.; LERMAN, L. O.; OIKONOMOU, E.; MAYNARD, C. C.; FOTIADIS, D.; STEFANOY, K.; PAPAFAKLIS, M.; MICHALIS, L.; FELDMAN, C.; LERMAN, A.; STONE, P. H. Local low shear stress and endothelial dysfunction in patients with nonobstructive coronary atherosclerosis. **Journal of The American College of Cardiology**, v. 71, n. 19, mai. 2018.

SIEZEN, R. J.; TZENEVA, V. A.; CASTIONI, A.; WELS, M.; PHAN, H. T.; RADEMAKER, J. L.; STARRENGURG, M. J.; KLEEREBEZEM, M.; MOLENAAR, D.; VLIEG VAN HYLCKAMA, J. E. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 3, fev. 2010.

SIMMONS, L. A.; AMANSEC, S. G.; CONWAY, P. Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 16, n. 8, p. 531-535, dez. 2006.

SINGH, R. B.; MENGI, S. A.; XU, Y. J.; ARNEJA, A. S.; DHALLA, N. S. Pathogenesis of atherosclerosis: a multifactorial process. **Experimental & Clinical Cardiology**, v. 7, n. 1, p. 40-53, 2002.

SMITH, D. D.; TAN, X.; TAWFIK, O.; MILNE, G.; STECHSCHULTE, D. J.; DILEEPAN, K. N. Increased aortic atherosclerotic plaque development in female apolipoprotein E-null mice is associated with elevated thromboxane A₂ and decreased prostacyclin production. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 309-316, jun. 2010.

SOUILHOL, C.; SERBANOVIC-CANIC, J.; FRAGIADAKI, M.; CHICO, T. J.; RIDGER, V.; RODDIE, H.; EVANS, P. C. Endothelial responses to shear stress in atherosclerosis: a novel role for developmental genes. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, p. 52-63, 2020.

STORELLI, G.; DEFAYE, A.; ERKOSAR, B.; HOLS, P.; ROYET, J.; LEULIER, F. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 3, p. 403-414, set. 2011.

TABAS, I.; GARCÍA-CARDEÑA, G.; OWENS, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. **Journal of Cell Biology**, v. 219, n. 1, p. 13-25, abr. 2015.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823-1836, mai. 2017.

TIDERENCEL, K. A.; HUTCHEON, D. A.; ZIEGLER, J. Probiotics for the treatment of type 2 diabetes: a review of randomized controlled trials. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 36, n. 1, jan. 2020.

VENTO, D. A.; AUGUSTO, V. S.; REIS, G. S. Via nitrato-nitrito-óxido-nítrico: aspectos fisiológicos e terapêuticos. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 21, n. 2, p. 60-64, abr./jun. 2011.

VERAS, R. C.; RODRIGUES, K. G.; ALUSTAU, M. C.; ARAÚJO, I. G.; BARROS, A. L.; ALVES, R. J.; NAKAO, L. S.; BRAGA, V. A.; SILVA, D. F.; MEDEIROS, I. Participation of nitric oxide pathway in the relaxation response induced by E-cinnamaldehyde oxime in superior mesenteric artery isolated from rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 58-66, 2013.

VESELI, B. E.; PERROTTA, P.; DE MEYER, G. R. A.; ROTH, L.; VAN DER DONCKT, C.; MARTINET, W.; DE MEYER, G. R. Y. Animal models of atherosclerosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 816, p. 3-13, dez. 2017.

VON SCHEIDT, M.; ZHAO, Y.; KURT, Z.; PAN, C.; ZENG, L.; YANG, X.; SCHUNKERT, H.; LUSIS, A. J. Applications and limitations of mouse models for understanding human atherosclerosis. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 2, p. 248-261, fev. 2017.

WANG, B.; YAO, M.; LV, L.; LING, Z.; LI, L. The human microbiota in health and disease. **Engineering**, v. 3, n. 1, p. 71-82, fev. 2017.

WEGIELSKA, I.; SULIBURSKA, J. The role of intestinal microbiota in the pathogenesis of metabolic diseases. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 15, n. 2, p. 201-211, 2016.

WEIRER, M.; PRESTEL, M.; SCHILLER, H. B.; YAN, G.; SCHAAB, C.; AZGHANDI, S.; WERNER, J.; KESSLER, T.; MALIK, R.; MURGIA, M.; AHERRAHROU, Z.; SCHUNKERT, H.; DICHGANS, M.; MANN, M. Compartment-resolved proteomic analysis of mouse aorta during atherosclerotic plaque formation reveals osteoclastic-specific protein expression.. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 17, n. 2, p. 321-334, fev. 2018.

WHO. World Health Organization. 2016. **Hearts: technical package for cardiovascular disease management in primary health care**. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252661/9789241511377-eng.pdf;jsessionid=BA798E220712E34B142CC095F976BEF7?sequence=1>. Acesso em: 27 dez. 2019.

XING, D.; NOZELL, S.; CHEN, Y. F.; HAGE, F.; OPARIL, S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 3, p. 289-295, fev. 2009.

YAN, H.; YANG, W.; ZHOU, F.; LI, X.; PAN, Q.; SHEN, Z.; HAN, G.; NEWELL-FUGATE, A.; TIAN, Y.; MAJETI, R.; LIU, W.; XU, Y.; WU, C.; ALLRED, K.; ALLRED, C.; SUN, Y.; GUO, S. Estrogen improves insulin sensitivity and suppresses gluconeogenesis via the transcription factor foxo1. **Diabetes**, v. 68, n. 2, fev. 2019.

ZHANG, G.; LI, C.; ZHU, N.; CHEN, Y.; YU, Q.; LIU, E.; WANG, R. Sex differences in the formation of atherosclerosis lesion in apoE^{-/-} mice and the effect of 17 β -estradiol on protein S-nitrosylation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 1014-1021, mar. 2018.