



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

ERICKA GARCIA LEITE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDO PELO 2-NITRATO-
1,3-DIBUTOXIPROPANO (NDBP) NA FUNÇÃO VASCULAR
EM MODELO DE ATHEROSCLEROSE**

JOÃO PESSOA-PB

2019

ERICKA GARCIA LEITE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO 2-NITRATO-
1,3-DIBUTOXIPROPANO (NDBP) NA FUNÇÃO VASCULAR
EM MODELO DE ATEROSCLEROSE**

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Camille de Moura Balarini

JOÃO PESSOA-PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L533a Leite, Ericka Garcia.

Avaliação dos efeitos induzidos pelo
2-Nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP) na função vascular
em modelo de aterosclerose / Ericka Garcia Leite. -
João Pessoa, 2019.

89 f. : il.

Orientação: Camille de Moura Balarini.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/Biotecnologia.

1. Disfunção endotelial, aterosclerose, óxido nítrico.

I. Balarini, Camille de Moura. II. Título.

UFPB/BC

Ericka Garcia Leite

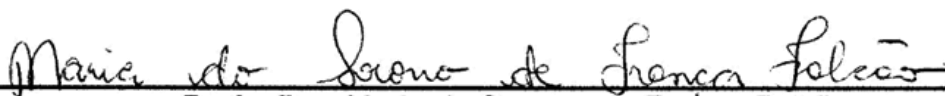
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO 2-NITRATO-1,3-DIBUTOXIPROPANO (NDBP) NA FUNÇÃO VASCULAR EM MODELO DE ATEROSCLEROSE

Aprovado em 30/08/19

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Camille de Moura Balarini
Orientadora



Profa. Dra. Maria do Socorro de Frahça Falcão
Examinador interno

Prof. Dr. Patrick Wander Endlich
Examinador externo

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (suplente)
Examinador interno

Profa. Dra. Isabele Santos Gomes (suplente)
Examinador externo

JOÃO PESSOA-PB

2019

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por guiar sempre meus passos, me direcionando sempre para os melhores caminhos, pelas inúmeras bênçãos que tem outorgado em minha vida das quais nem sou merecedora. Todo meu percurso até aqui foi planejado por Ele.

Aos meus pais que são meu maior tesouro, por todo apoio e incentivo, por sempre acreditarem e torcerem por mim, amo vocês mais que tudo!! Este trabalho é dedicado a vocês, pois tudo que faço sempre será por vocês e para vocês!

A minha orientadora Profa. Camille de Moura Balarini, por ter me proporcionado essa experiência incrível, obrigada por todo ensinamento, paciência e incentivo. Sempre digo que não foi eu quem a escolheu e sim Deus que me presenteou com uma pessoa tão maravilhosa e uma profissional excepcional. Tenho muito orgulho de dizer que sou sua aluna e mais orgulho ainda quando dizem “essa é mesmo pupila da Camille”. Espero continuar tendo a honra de trabalhar com a senhora.

Meus agradecimentos aos professores Ian Amaral e Maria do Socorro que participaram da banca de qualificação sua contribuição para melhora deste trabalho.

Meus agradecimentos aos professores Patrick Wander e Socorro de França por aceitarem ocupar a banca de defesa como titulares e aos professores Ian Amaral e Isabele Santos como suplentes.

A professora Josiane, sempre muito amável e acessível, muito obrigado por toda sua ajuda.

Ao Professor Valdir Braga, e a todos que fazem parte do laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA-UFPB), com certeza é minha segunda família, vocês me proporcionaram momentos maravilhosos. Agradeço aos técnicos Clênia, Matheus e Sara por toda ajuda nesse percurso.

A Ellen Sonnaly, Atalia Flôr, Clara Rittmeyer, Lucas Rannier e Mickael Sousa pela amizade, pelas conversas, pelos ótimos momentos compartilhados, incentivo e disposição a ajudar. Vocês são incríveis e muito especiais!!

A Alana Loregian, Juliana Santana e Rodrigo Martins pelo auxílio nos experimentos e pela amizade. Obrigada por compartilharem cada momento comigo,

os de desespero e os de felicidade pelos experimentos darem certo. Vocês são muito queridos e especiais.

Ao professor Isac Almeida de Medeiros por ter aberto as portas do seu laboratório, a Fátima e ao Pablo por toda ajuda.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas pelo ensinamento e por fazerem parte da minha formação, vocês são maravilhosos.

A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

As minhas amigas Lêda Maria e Déborah Gomes por todo apoio e incentivo, pela compreensão nos momentos de ausência e acolhimento nos meus momentos de surto, por estarem comigo em todos os momentos bons e ruins. Amo vocês!

RESUMO

A aterosclerose é uma doença arterial crônica, de caráter inflamatório e fibroproliferativo que acomete milhares de pessoas ao ano sendo uma das principais causas de morte a nível mundial. A disfunção endotelial é uma das principais alterações detectáveis durante o desenvolvimento da aterosclerose. Caracterizada por vasodilatação prejudicada e aumento da resposta vasoconstritora, principalmente pela diminuição da biodisponibilidade de NO e perda da sinalização da via NO/GMPc/PKG. Experimentalmente, pode ser demonstrada por prejuízo do relaxamento dependente de endotélio à acetilcolina (ACh) e aumento da resposta de contração à fenilefrina (Fen). Os nitratos orgânicos vêm sendo utilizados há anos para tratamento de doenças cardiovasculares mimetizando o papel do NO endógeno. Porém, a utilização desses compostos a longo prazo resulta no desenvolvimento de tolerância. Neste estudo foi avaliado um nitrato orgânico sintetizado a partir da glicerina, o 2-nitrato-1,3-dibutoxipropano (NDBP). Com o objetivo de avaliar os efeitos do NDBP na função vascular em modelo de aterosclerose, utilizou-se camundongos machos, das linhagens C57BL/6 (CT) e nocautes para a apolipoproteína E (apoE^{-/-}), os quais respectivamente receberam dieta padrão e dieta aterogênica *Western Type* (Rhoister, São Paulo, Brasil), contendo 41% de calorias em forma de lipídios e 1,5% de colesterol a partir de 8 semanas de vida, durante as 12 semana subsequentes. Os animais foram separados em 3 grupos: animais C57 controle com dieta padrão, animais apoE^{-/-} com dieta aterogênica e animais apoE^{-/-} com dieta aterogênica tratados com NDBP cronicamente. O sangue dos animais foi coletado para dosagem de colesterol total. As aortas dos animais foram coletadas e processadas para estudos em banho de órgãos ou avaliação histológica da deposição de placa (coloração Oil-Red), produção de EROs (DHE) e NO (DAF-2DA). A função vascular foi avaliada por meio da construção de curvas concentração-resposta à ACh (100 pM – 30 µM), após pré-contracção com fenilefrina (FEN, 10 µM) e curvas concentração-resposta à FEN (100 pM – 30 µM). Para avaliar a produção basal de NO por método indireto, após uma pré-contracção com FEN (10µM) os anéis foram incubados com o inibidor não específico da isoformas da óxido nítrico sintase L-NAME (100 µM). Com intuito de avaliar a influência do NDBP sobre a função vascular, os anéis foram incubados com NDBP (10 µM) em seguida foram realizados os testes de função vascular. A avaliação da atividade vasorrelaxante do NDBP foi realizada por meio de curvas concentração-resposta ao NDBP (100 pM – 30 µM) após pré-contracção com FEN (10 µM) em anéis com e sem endotélio. Para avaliar se o efeito do NPBP sobre a função vascular é dependente de NO ou de atividade antioxidante, os anéis foram incubados com NDBP (10µM) mais hidroxycobalamina (HDX, 100µM) ou tempol (1µM). No grupo apoE^{-/-} que foi tratado cronicamente por 14 dias, após o tratamento foi realizado teste de função vascular e avaliação da produção basal de NO. Os animais apoE^{-/-} apresentaram incremento de aproximadamente 12 vezes nos níveis de colesterol (CT 58.2±3.6 vs. apoE^{-/-} 704.9±29.9) e marcante deposição de placa (CT 0±0 vs. apoE^{-/-} 57±4.9). Nos grupos sem tratamento crônico observou-se que os animais apoE^{-/-} demonstraram marcante disfunção endotelial com comprometimento no relaxamento a ACh (CT R_{máx}: 76.7±5.4 e pD₂: 7.9±0.3 vs. apoE^{-/-} R_{máx}: 62.7±5.5 e pD₂: 6.7±0.2) e maior resposta a FEN (CT R_{máx}: 51.1±9.2 e pD₂: 6.8±0.06 vs. apoE^{-/-} R_{máx}: 82.0±8.3 e pD₂: 6.8±0.07). Através de método indireto, a produção de NO endógeno encontrou-se diminuída nesses animais, demonstrada pela diminuição no delta de contração após bloqueio com L-NAME (CT 0.46±0.04 e

45.3±4.1% vs. apoE 0.30±0.01 e 33.2±1.9%). O mesmo foi observado através do método direto utilizando DAF-2DA: os animais apoE^{-/-} apresentaram diminuição na produção de NO (CT 131855±15774 vs. apoE^{-/-} 84057±13397). A produção de NO diminuída nos animais apoE^{-/-} foi revertida após incubação com NDBP, demonstrada por aumento na concentração de NO medida por DAF-2DA em ambos os grupos (CT 196357±18312 vs. apoE^{-/-} 223507±6996). Através da utilização da sonda DHE observou-se que os animais apoE^{-/-} apresentaram aumento na produção de EROs (CT 114036±15280 vs. apoE^{-/-} 166649±13022) e após incubação com NDBP a produção de EROs foi diminuída nesses animais (136043±8281). O NDBP promoveu relaxamento vascular na mesma proporção em ambos os grupos na ausência de endotélio (apoE^{-/-} R_{máx}: 93±4.1 e pD₂: 5.8±0.3; CT R_{máx}: 102±9.6 e pD₂: 5.6±0.4), porém na presença de endotélio os animais apoE^{-/-} demonstraram maior sensibilidade ao composto (R_{máx}: 76±11,3 e pD₂: 7,2±0,4) quando comparados ao controle (R_{máx}: 69±6,7; pD₂: 7,3±0,4). Após incubação com NDBP o prejuízo ao relaxamento a ACh observado nos animais apoE^{-/-} foi revertido (79,4±3,9; pD₂: 8,2±0,4) quando comparado ao controle (R_{máx}: 76,0±3,7; pD₂: 7,9±0,2). A melhora da função vascular induzida pelo NDBP foi abolida após incubação conjunta com HDX (R_{máx}: 59,9±7,1 e pD₂: 6,6±0,3). O relaxamento induzido pelo NDBP em vasos de animais apoE^{-/-} sem endotélio (R_{máx}: 93±4,1; pD₂: 5,8±0,3) foi abolido após pré-incubação com HDX (R_{máx}: 0,5±0,6; pD₂: 6,8±0,9). No intuito de avaliar se o NDBP possui atividade antioxidante, o tempol (mimético da SOD) foi pré-incubado com ou sem NDBP. O tempol pré-incubado com NDBP não tem seu efeito potencializado (R_{máx}: 65,1±7,3) quando comparado ao tempol sem NDBP (R_{máx}: 67,4±9,5). Os animais apoE^{-/-} tratados cronicamente com NDBP (40mg/kg/in), apresentaram reversão no quadro de disfunção endotelial, demonstrado por melhora na resposta de relaxamento a ACh quando comparado aos animais apoE^{-/-} não tratados (R_{máx}: 87,4±3,1; pD₂: 7,8±0,1 vs. R_{máx}: 62,7±5,5; pD₂: 6,7±0,2 respectivamente), equiparando aos animais controle (R_{máx}: 76,7±5,4; pD₂: 7,9±0,3). Também apresentaram aumento na produção basal de NO demonstrado pelo aumento no delta de contração quando comparado ao apoE^{-/-} não tratado (Δ : 0,39±0,2 vs. Δ : 0,30±0,01 respectivamente). Desta maneira, é possível concluir que o NDBP apresenta efeitos benéficos na aterosclerose experimental, sendo capaz de reverter o quadro de disfunção endotelial através do aumento da biodisponibilidade de NO e de seu efeito antioxidante.

Palavras-Chave: Disfunção endotelial, aterosclerose, óxido nítrico, doadores de NO.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic arterial disease of inflammatory and fibroproliferative nature that affects thousands of people a year and is one of the leading causes of death worldwide. Endothelial dysfunction is one of the major detectable changes during the development of atherosclerosis. Characterized by impaired vasodilation and increased vasoconstrictor response, mainly by decreased NO bioavailability and loss of NO / GMPc / PKG signaling. Experimentally, it can be demonstrated by impaired endothelium-dependent relaxation of acetylcholine (ACh) and increased phenylephrine contraction response (Phe). Organic nitrates have been used for years to treat cardiovascular diseases mimicking the role of endogenous NO. However, long-term use of these compounds results in the development of tolerance. In this study an organic nitrate synthesized from glycerin, 2-nitrate-1,3-dibutoxypropane (NDBP) was evaluated. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of NDBP on vascular function in an atherosclerosis model. Male mice from C57BL / 6 (CT) and apolipoprotein E (apoE^{-/-}) knockouts were used, which respectively received standard diet and Western type atherogenic diet (Rhoister, São Paulo, Brazil), containing 41% of calories in the form of lipids and 1.5% cholesterol from 8 weeks of life over the next 12 weeks. The animals were separated into 3 groups: standard diet C57 control animals, atherogenic diet apoE^{-/-} animals and atherogenic diet apoE^{-/-} animals treated chronically with NDBP. Animal blood was collected for total cholesterol measurement. Animal aortas were collected and processed for organ bath studies or histological evaluation of plaque deposition (Oil-Red staining), ROS production (DHE) and NO (DAF-2DA). Vascular function was assessed by constructing ACh concentration-response curves (100 pM - 30 μM) after phenylephrine pre-contraction (PHE, 10 μM) and PHE concentration-response curves (100 pM - 30 μM). To assess endogenous NO production by indirect method, after pre-contraction with PHE (10μM) the rings were incubated with the non-specific nitric oxide synthase isoform inhibitor L-NAME (100 μM). In order to evaluate the influence of NDBP on vascular function, the rings were incubated with NDBP (10 μM) and vascular function tests were performed. The evaluation of NDBP vasorelaxant activity was performed by NDBP concentration-response curves (100 pM - 30 μM) after PHE pre-contraction (10 μM) in rings with and without endothelium. To assess whether the effect of NPBP on vascular function is dependent on NO or antioxidant activity, the rings were incubated with either NDBP (10μM) plus hydroxycobalamin (HDX, 100μM) or tempol (1μM). In the apoE^{-/-} group that was chronically treated for 14 days, after treatment, vascular function test and baseline NO production were evaluated. The apoE^{-/-} animals showed approximately 12-fold increase in cholesterol levels (TC 58.2 ± 3.6 vs. apoE^{-/-} 704.9 ± 29.9) and marked plaque deposition (CT 0 ± 0 vs. apoE^{-/-} 57 ± 4.9). The apoE^{-/-} animals showed marked endothelial dysfunction with impaired ACh relaxation (CT Rmax: 76.7 ± 5.4 and pD2: 7.9 ± 0.3 vs. apoE^{-/-} Rmax: 62.7 ± 5.5 and pD2: 6.7 ± 0.2) and higher response to PHE (CT Rmax: 51.1 ± 9.2 and pD2: 6.8 ± 0.06 vs. apoE^{-/-} Rmax: 82.0 ± 8.3 and pD2: 6.8 ± 0.07). By indirect method, basal NO production was decreased in these animals, demonstrated by the decrease in delta contraction after L-NAME blockade (CT 0.46 ± 0.04 and 45.3 ± 4.1% vs. apoE^{-/-} 0.30 ± 0.01 and 33.2 ± 1.9 %). The same was observed by the direct method using DAF-2DA: apoE^{-/-} animals showed decrease in NO production (CT 131855 ± 15774 vs. apoE^{-/-} 84057 ± 13397). Decreased NO production in apoE^{-/-} animals was reversed following acute NDBP treatment, demonstrated by increased NO concentration measured by DAF-2DA in both groups (CT 196357 ± 18312 vs.

apoE^{-/-} 223507 ± 6996). Using the DHE probe it was observed that the apoE^{-/-} animals showed increase in the production of ROS (CT 114036 ± 15280 vs. apoE^{-/-} 166649 ± 13022) and after incubation with NDBP ROS production was decreased in these animals (136043 ± 8281).. NDBP promoted vascular relaxation to the same extent in both groups with absence of endothelium (apoE^{-/-} Rmax: 93 ± 4.1 and pD2: 5.8 ± 0.3; CT Rmax: 102 ± 9.6 and pD2: 5.6 ± 0.4), however in the presence of endothelium apoE^{-/-} animals showed higher sensitivity to the compound (Rmax: 76 ± 11.3 and pD2: 7.2 ± 0.4) when compared to control (Rmax: 69 ± 6.7; pD2: 7.3 ± 0.4). Acute NDBP treatment reversed the ACh relaxation impairment observed in apoE^{-/-} animals (79.4 ± 3.9; pD2: 8.2 ± 0.4) when compared to control (Rmax: 76.0 ± 3.7 pD2: 7.9 ± 0.2). NDBP-induced vascular function improvement was abolished after joint incubation with HDX (Rmax: 59.9 ± 7.1 and pD2: 6.6 ± 0.3). NDBP-induced relaxation in apoE^{-/-} endothelium-free animal (Rmax: 93 ± 4.1; pD2: 5.8 ± 0.3) was abolished after HDX pre-incubation (Rmax: 0.5 ± 0.6, pD2: 6.8 ± 0.9). In order to assess whether NDBP has antioxidant activity, tempol (SOD mimetic) was pre-incubated with or without NDBP. Tempol pre-incubated with NDBP has no potentiated effect (Rmax: 65.1 ± 7.3) when compared to tempol without NDBP (Rmax: 67.4 ± 9.5). ApoE^{-/-} animals treated chronically with NDBP (40mg / kg / in) showed reversal in endothelial dysfunction, demonstrated by an improved relaxation response to ACh when compared to untreated apoE^{-/-} animals (Rmax: 87, 4 ± 3.1; pD2: 7.8 ± 0.1 vs. Rmax: 62.7 ± 5.5; pD2: 6.7 ± 0.2 respectively), equating to the control animals (Rmax: 76.7 ± 5.4; pD2: 7.9 ± 0.3). They also showed an increase in basal NO production demonstrated by the increase in delta contraction when compared to untreated apoE^{-/-} (Δ: 0.39 ± 0.2 vs. Δ: 0.30 ± 0.01 respectively). Thus, it can be concluded that NDBP has beneficial effects on experimental atherosclerosis, being able to reverse endothelial dysfunction by increasing NO bioavailability and its antioxidant effect.

Palavras-Chave: Endothelial Dysfunction, atherosclerosis, nitric oxide, NO donors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Projeção de mortes por causa nos anos de 2004, 2015 e 2030.....	19
Figura 2: Cinecoronariografia.....	20
Figura 3: Estrutura e mecanismos catalíticos da NOS funcional.....	23
Figura 4: Síntese de NO pela NOS.....	23
Figura 5: Ativação da guanilato-ciclase solúvel.....	24
Figura 6: Mecanismo de ação do NO nas células musculares lisas do vaso.....	25
Figura 7: Formação da placa aterosclerótica.....	26
Figura 8: Diapedese de monócitos.....	28
Figura 9: Desenvolvimento e progressão da aterosclerose.....	30
Figura 10: Estrutura química do 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP).....	36
Figura 11: Esquematização da adição das hastes de aço ao anel aórtico.....	44
Figura 12: Esquema do equipamento para estudo de reatividade vascular.....	44
Figura 13: Registro típico representativo do teste de viabilidade vascular.....	45
Figura 14: Registro típico do teste de endotélio.....	46
Figura 15: Avaliação da produção basal de NO.....	47
Figura 16: Quantificação de placa aterosclerótica por meio do teste “ <i>en face</i> ”.....	54
Figura 17: Quantificação de placa aterosclerótica cortes transversais.....	55
Figura 18: Marcação com DHE.....	65
Figura 19: Marcação com DAF.....	66
Figura 20: Sinalização de cálcio via SOCE.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Representação gráfica da análise do perfil de colesterol total.....	53
Gráfico 2: : Representação gráfica das curvas dose-resposta à Acetilcolina.....	56
Gráfico 3: Representação gráfica das curvas dose-resposta à Fenilefrina.....	57
Gráfico 4: Representação gráfica da produção basal de NO vascular.....	58
Gráfico 5: Representação gráfica das curvas dose-resposta à acetilcolina em animais controle e apoE ^{-/-} com e sem tratamento com NDBP.....	59
Gráfico 6: Representação gráfica das curvas de relaxamento a ACh após tratamento com NDBP, comparação entre grupos.....	60
Gráfico 7: Representação gráfica das curvas dose-resposta ao NDBP comparativa entre grupos.....	61
Gráfico 8: Representação gráfica das curvas de relaxamento ao NDBP comparativa entre animais pertencentes ao mesmo.....	62
Gráfico 9: Representação gráfica das curvas de relaxamento a ACh em animais apoE ^{-/-} tratados com NDBP em comparação a animais tratados com NDBP+tempol ou tempol apenas.....	63
Gráfico 10: Representação gráfica da participação do NO no efeito do NDBP.....	63
Gráfico 11: Curva de relaxamento ao NDBP em animais apoE ^{-/-} na ausência de endotélio com ou sem HDX.....	64
Gráfico 12: Produção basal de NO após tratamento crônico.....	67
Gráfico 13: Avaliação da função vascular comparativa entre grupos sem tratamento e tratado cronicamente com NDBP.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Doadores de NO e mecanismo de liberação do NO.....	34
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ACh: Acetilcolina
AMPc: Adenosina monofosfato cíclico
ApoE: Apolipoproteína E
ApoE^{-/-}: Camundongo deficiente em apolipoproteína E
ATP: Adenosina trifosfato
BH4: 5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina
CT: Animais controle da linhagem C57BL/6
DATASUS: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
dAUC: Diferença entre as áreas abaixo da curva
DCV: Doenças cardiovasculares
eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
FAD: flavina-adenina dinucleotídeo
FEN: Fenilefrina
FMN: flavina mononucleotídeo
GC: Guanilato cicase
GMPc: Guanosina monofosfato cíclico
GTP: Guanosina trifosfato
IL: Interleucina
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox: Lipoproteína de baixa densidade oxidada
L-NAME: N-G-nitro-L-arginina metil éster
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NDBP: 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintase
OMS: Organização mundial da saúde
pD2: logaritmo negativo na base 10 da CE₅₀ de um agonista (-log CE₅₀)
PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas
PKA: Proteína quinase A
PKG: Proteína quinase dependente de GMPc
R_{máx}: Resposta máxima
SRA-I: Receptor scavenger classe A I

SRA-II: Receptor scavenger classe A II

SBC: Sociedade Brasileira de Cardiologia

sGC: Guanilato ciclase solúvel

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Doenças cardiovasculares.....	18
1.2 Homeostasia e o endotélio vascular	19
1.3 Regulação do tônus vascular e o NO.....	21
1.4 Disfunção endotelial e aterosclerose	26
1.5 Modelo experimental de aterosclerose.....	30
1.6 Doadores de NO.....	32
1.7 Nitratos orgânicos e o 2-NITRATO-1,3-DIBUTOXIPROPANO (NDBP).....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivos gerais.....	40
3.2 Objetivos específicos	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Animais experimentais.....	42
4.2 Grupos experimentais.....	42
4.3 Substância teste.....	42
4.4 Drogas e soluções utilizadas.....	43
4.5 Análises Bioquímicas.....	43
4.6 Cirurgia e reatividade vascular.....	43
4.6.1 Avaliação da viabilidade vascular e teste de endotélio.....	45
4.6.2 Avaliação da função vascular.....	46
4.6.3 Avaliação da atividade do NDBP sobre a função endotelial.....	46
4.6.4 Produção de NO.....	47
4.6.5 Avaliação da atividade vasorrelaxante do NDBP.....	48
4.7 Histologia.....	48
4.7.1 Corte histológico e coloração com OilRed.....	48
4.7.2 Teste “en face”.....	49
4.7.3 Marcação com DHE.....	49
4.7.4 Marcação com DAF.....	49
4.8 Análise estatística.....	50
5. RESULTADOS	53
5.1 Análises bioquímicas.....	53
5.2 Deposição de placa aterosclerótica.....	53

5.3 Reatividade vascular.....	55
5.3.1 Avaliação da função endotelial.....	55
5.3.2 Produção basal de NO vascular.....	57
5.3.3 Avaliação do efeito induzido pelo NDBP sobre a função endotelial	58
5.3.4 Atividade direta do NDBP sobre o tecido vascular.....	60
5.3.5 Ação do NDBP e atividade antioxidante.....	62
5.3.6 Participação do NO no efeito induzido pelo NDBP.....	63
5.4 Produção de espécies reativas de oxigênio.....	64
5.5 Produção de NO pelo endotélio vascular.....	65
5.6 Tratamento crônico com NDBP influencia a produção de NO pelo endotélio.....	66
5.7 Tratamento crônico com NDBP reverte a disfunção endotelial.....	67
6. DISCUSSÃO.....	70
7. CONCLUSÃO.....	79
8. REFERÊNCIAS.....	81

INTRODUÇÃO

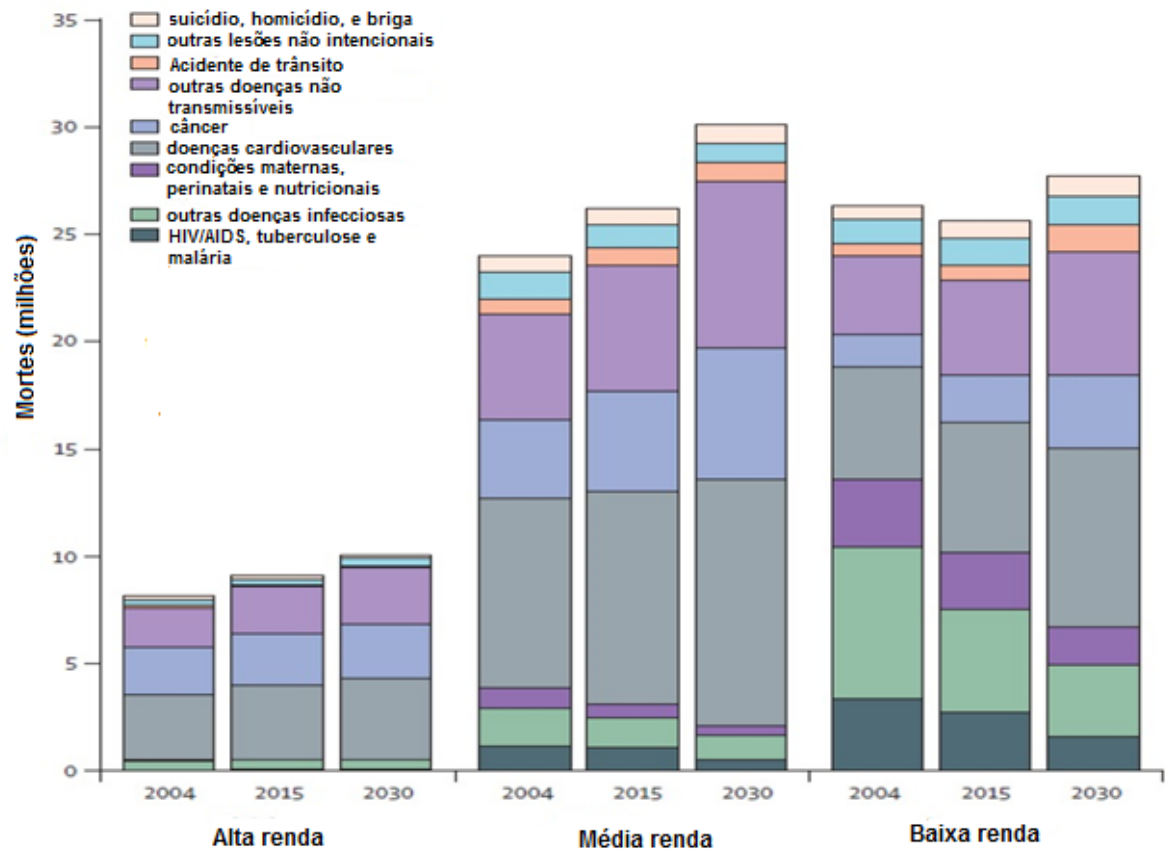
1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) acometem milhares pessoas ao ano e representam um risco de saúde pública. De acordo com a organização mundial de saúde (OMS) é a causa número um de mortes a nível global. Cerca de 17,9 milhões de pessoas morreram por DCV em 2016, representando cerca de 31% dos óbitos (WHO, 2017). Existem vários fatores de risco que favorecem o desenvolvimento dessas doenças, como: alimentação com alto teor de colesterol, obesidade, uso nocivo de álcool, tabagismo, sedentarismo e doenças já estabelecidas (CARLUCCHI, 2013; Sanchis-Gomar et al. 2016; WHO, 2017).

As taxas de mortalidade por DCV em relação a outras doenças são maiores em países em desenvolvimento com baixa e média renda comparada aos países desenvolvidos (**Figura 1**). Essa realidade deve-se a condições socioeconômicas e falta de um sistema de saúde pública eficaz. Financeiramente, as DCV sobrecarregam as economias desses países (BEAGLEHOLE & BONITA, 2008; SANCHIS-GOMAR et al. 2016; WHO, 2017). No Brasil em 2007 houve um gasto de R\$ 1.466.421.385,12 com internações por DCV, representando 69% dos gastos hospitalares no Sistema Único de Saúde (SUS) (RIBEIRO, 2012).

Figura 1: Projeção de mortes por causa nos anos de 2004, 2015 e 2030.



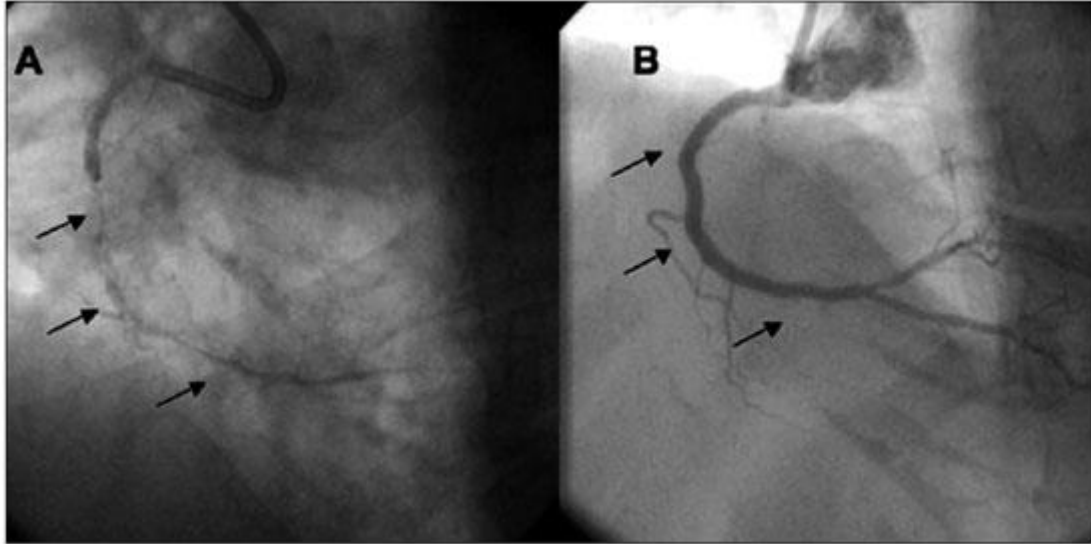
Fonte: adaptado de Beaglehole & Bonita (2008).

Os países foram divididos por grupos de renda, países de alta, média e baixa renda.

Dentre as DCVs a cardiopatia isquêmica é uma causa importante de morbimortalidade no Brasil, costuma ser precedido por quebra da homeostasia vascular, ocasionando o desenvolvimento de um processo aterosclerótico. A aterosclerose é uma doença arterial crônica, de caráter inflamatório e fibroproliferativo, que tem seu desenvolvimento iniciado ainda na infância. É caracterizada pelo depósito de gordura na parede das artérias, reduzindo seu calibre e consequentemente o fluxo sanguíneo para a região (**Figura 2**). Em artérias coronárias, a diminuição do fluxo sanguíneo para o coração ocasiona a morte de cardiomiócitos. Essas células possuem uma capacidade limitada de regeneração e durante o processo de isquemia são incapazes de compensar a perda celular, levando a complicações como o infarto agudo do miocárdio (IAM) (DATASUS, 2014; TU & ZOLDAN, 2018; GIMBRONE & GARCÍA-CARDEÑA, 2016; THEODOROU & Boon, 2018; YU & LIU, 2018; HADI et al., 2005). No Brasil, o IAM é a causa número um de mortes no país, com cerca de 100 mil óbitos anualmente (DATASUS, 2014).

Com base nos dados epidemiológicos alarmantes, pessoas com alto risco cardiovascular necessitam de detecção e tratamento precoce da doença, usando de aconselhamento e medicamentos que sejam eficazes (OMS, 2017)

Figura 2: Cinecoronariografia.



Fonte: Maldonado (2007).

Artéria coronária direita pré e pós-angioplastia. No painel A, as setas apontam para o acometimento aterosclerótico. No painel B, visualizamos o resultado final após implante de três *stents*.

1.2 Homeostasia e o endotélio vascular

O sistema cardiovascular é responsável pelo transporte de sangue para todos os tecidos, a fim de garantir oferta de oxigênio e nutrientes necessários para vitalidade das células. Desta forma, são criticamente dependentes da integridade funcional das células vasculares (LUZ, et al., 2005).

O endotélio vascular é um tecido estruturalmente simples, porém funcionalmente complexo. É constituído de uma camada única de células que revestem a superfície luminal de todo sistema circulatório incluindo os menores capilares (GIMBRONE & GARCÍA-CARDEÑA, 2016; RAJENDRAN et al., 2013; ROBERT et al., 2005). Essas células são de extrema importância, pois são responsáveis por uma multiplicidade de processos que mantem a homeostase vascular (DUNN & DAS 2017; OZKOR & QUYYUMI, 2011; RAJENDRAN et al., 2013). Tais funções incluem filtração de fluídos; secreção de compostos vasoativos que atuam de forma parácrina regulando o tônus vascular; controle da coagulação e trombólise; remodelamento vascular e a resposta inflamatória e imune (CAHILL & REDMOND, 2016; RAJENDRAN et al., 2013).

O endotélio é capaz de detectar alterações nas forças hemodinâmicas ou outros sinais transmitidos pelo sangue como balanço oxidativo e essa comunicação é efetivada pela presença de receptores ligados à membrana para numerosas moléculas, incluindo proteínas, partículas transportadoras de lipídios, metabólitos e hormônios. A informação pode ser detectada em qualquer lugar do organismo sendo transmitida para todas as outras células endoteliais por meio de comunicações intercelulares (RAJENDRAN et al., 2013; LUZ, et al., 2005). Essa conexão integrada é importante e necessária, sobretudo quando se consideram substâncias vasoativas com meia vida bastante curta e que não conseguem percorrer grandes distâncias a partir do ponto onde foram sintetizados, como é o caso do óxido nítrico (NO), principal fator relaxante liberado pelo endotélio em vasos de condutância (LUZ, et al., 2005).

1.3 Regulação do tônus vascular e o NO

O trabalho pioneiro de Furchgott e Zawadzki foi importante para o reconhecimento do papel significativo das células endoteliais na regulação do tônus vascular. Em 1980 descreveram pela primeira vez o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina em preparações isoladas de vasos sanguíneos. Observaram, porém, que era necessário que endotélio vascular que reveste os vasos estivesse presente e intacto. Eles postularam que a acetilcolina (ACh) ao interagir com o endotélio liberava um fator relaxante que denominaram de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), o qual se difundia para o músculo liso vascular promovendo o vasorrelaxamento (FURCHGOTT, 1980). Em 1987 Ignarro e colaboradores identificaram que o EDRF era na verdade o NO, um composto caracterizado em 1977 por Ferid Murad que, quando liberado por nitratos, promovia relaxamento em células musculares lisas (ARNOLD et al., 1977; IGNARRO et al., 1987). Essa descoberta rendeu a Robert F. Furchgott, Ferid Murad e Louis J. Ignarro o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1998.

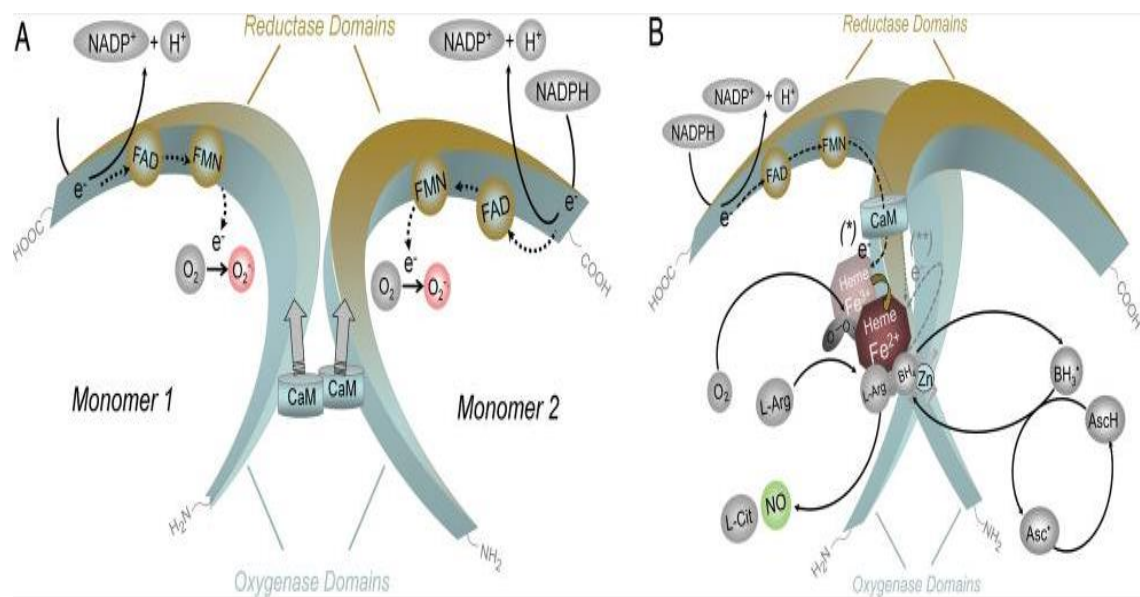
O NO desempenha diversas atividades e medeia ativamente muitas das funções protetoras exercidas pelo endotélio intacto. No lúmen vascular tem propriedade antitrombótica, por meio da inibição da adesão e agregação plaquetária (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012; LUIKING et al., 2010; MANOURY et al., 2012). Diminui a expressão da proteína quimiotática MCP-1 e de várias moléculas de adesão, impedindo assim a adesão de leucócitos ao endotélio vascular e a migração

de leucócitos para a parede vascular (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012; LUIKING et al., 2010). Na túnica média vascular, o NO promove o relaxamento das células musculares lisas, inibe a mitogênese e proliferação celular (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012).

O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por ação de uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases (NOS). Tais enzimas apresentam-se em três isoformas: NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), expressas principalmente em células endoteliais e em neurônios respectivamente, e NOS induzida (iNOS) expressa principalmente em células imunes (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012; KESHET & EREZ, 2018; LUIKING et al., 2010). As isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias: NOS constitutiva (eNOS e nNOS) dependentes de cálcio e calmodulina e a NOS induzível (iNOS) ativada por citocinas. As três isoformas utilizam L-arginina como substrato, oxigênio molecular e fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADPH) como co-substratos. As NOS possuem em cada lado da molécula duas subunidades funcionalmente complementares formando um dímero. É necessária a presença de alguns cofatores para que desempenhem sua atividade, são eles: flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), ferroprotoporfirina IV (heme) e tetraidrobiopterina (BH_4) além do substrato L-arginina. Cada subunidade possui dois domínios, um c-terminal redutase (que recebe elétrons do NADPH) que contém sítios de ligação para NADPH, FMN e FAD, e um domínio N-terminal oxidase que possui sítios de ligação para o ferro heme, para BH_4 e para o substrato L-arginina. As duas subunidades são unidas por um sítio de ligação para o complexo cálcio-calmodulina. Na ausência de algum dos substratos ou cofatores ocorre o desacoplamento da NOS e ao invés de produzir NO ocorre a formação de ânion superóxido ($\bullet O_2^-$) (**Figura 3**) (DIAS et al., 2011; FÖRSTERMANN U & SESSA, 2012; STUHR et al., 2001).

Para produzir NO, a NOS precisa de passos em uma reação. Primeiramente a NOS hidroliza L-arginina a N^w -hidroxi-L-arginina, e em um segundo passo, oxida N-hidroxi-L-arginina a citrulina e NO (**Figura 4**) (STUHR et al., 2001).

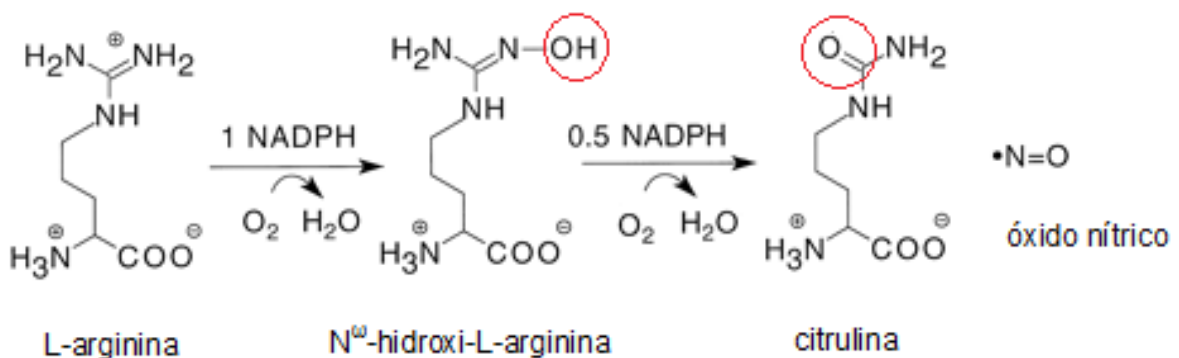
Figura 3: Estrutura e mecanismos catalíticos da NOS funcional.



Fonte: Förstermann & Sessa (2012).

(A) Na ausência de algum dos cofatores a NOS fica desacoplada, não conseguindo formar um dímero. Os monômeros de NOS são capazes de transferir elétrons de NADPH, para FAD e FMN, porém não conseguem completar a transferência de modo adequado. Desta forma não podem catalisar a produção de NO, ao invés disso, os elétrons vazam e são captados pelo oxigênio molecular, produzindo radical superóxido (•O₂⁻). (B) Na presença dos cofatores, a NOS pode formar um dímero funcional. As duas porções são unidas por um sítio de ligação para o complexo cálcio-calmodulina, essencial para que a transferência de elétrons ocorra de forma adequada. O grupamento heme é essencial para a transferência de elétrons entre os domínios das flavinas (FMN) para o heme do monômero oposto. A transferência de elétrons para o ferro heme promove sua ativação, com consequente ligação ao oxigênio molecular, este complexo catalisa a oxidação do nitrogênio guanidinoterminal da L-arginina, promovendo a síntese de NO e subproduto L-citrulina.

Figura 4: Síntese de NO pela NOS.

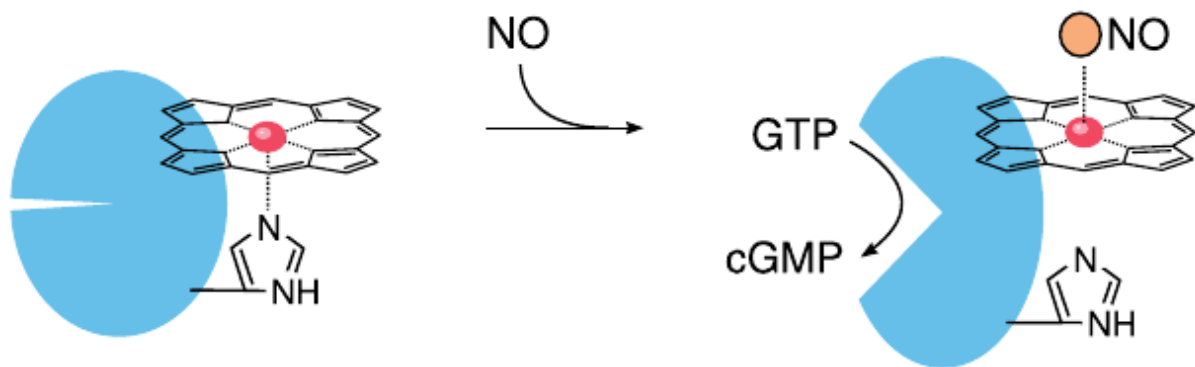


Fonte: adaptado de Stuehr et al. (2001).

Na primeira etapa, a NOS consome 1 mol de NADPH para hidroxilar a L-arginina em N^ω-hidroxil-L-arginina, que é um intermediário ligado à enzima. Depois disso, a NOS consome 0,5 mol de NADPH para oxidar N^ω-hidroxil-L-arginina em citrulina e NO.

O NO produzido pelas células endoteliais se difunde e na musculatura lisa vascular, em condições fisiológicas, ativa a enzima guanilato-ciclase solúvel (GCs) por ligação do NO ao ferro do grupamento heme. Essa ligação induz uma alteração conformacional da enzima, estimulando a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (**Figura 5**) (MONCADA & HIGGS, 2006; PEREIRA et al 2011; POTOKA et al., 2018).

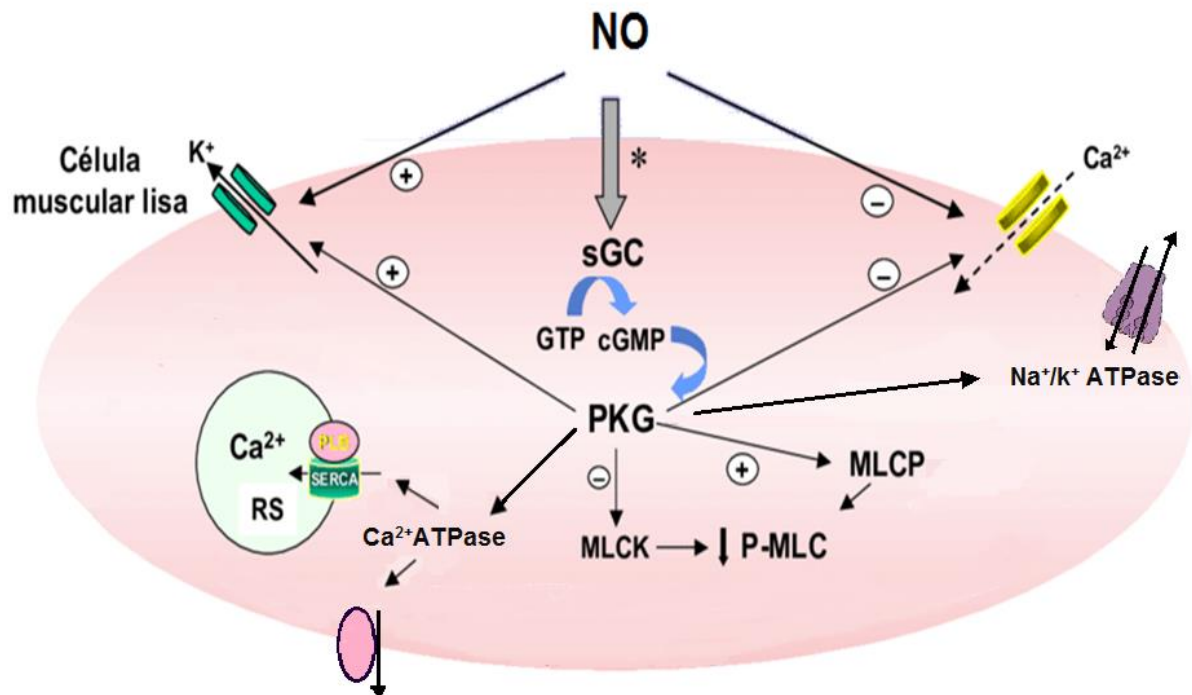
Figura 5: Ativação da guanilato-ciclase solúvel.



Fonte: Palmer (2018).

O aumento de GMPc ativa uma quinase específica chamada PKG (proteína quinase dependente de GMPc). Quinases são proteínas que fosforilam um determinado substrato proteico, induzindo sua ativação ou inibição. A PKG promove vasodilatação da musculatura do vaso através da diminuição do cálcio (Ca^{2+}) intracelular. Essa diminuição de Ca^{2+} ocorre tanto pela ativação da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), por meio fosforilação do fosfolamban (proteína que inibe a SERCA) aumentando a recaptção de Ca^{2+} para dentro do retículo, como pela saída de Ca^{2+} para o meio extracelular através da ativação da Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática. A PKG e o NO (por via direta) podem ativar canais K^{+} como também ativar a $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPase, induzindo hiperpolarização da célula e consequentemente fechamento de canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem (tipo L). A PKG também fosforila a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), diminuindo a sua atividade e assim, reduzindo a fosforilação da MLC (cadeia leve da miosina). Também ativa a fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP) que contribui para diminuir a fosforilação de MLC, consequentemente promovendo relaxamento do vaso (**Figura 6**) (AIRES, 2012; CAI et al. 2016; DIAS, 2007; LAURINDO et al 2018; MANOURY et al., 2012; MONCADA & HIGGS, 2006).

Figura 6: Mecanismo de ação do NO nas células musculares lisas do vaso



Fonte: adaptado de Dias (2007).
Explicação no texto.

Existem outros fatores relaxantes produzidos pelo endotélio, como as prostaciclina (PGI_2), derivadas a partir da clivagem do ácido araquidônico por ação da enzima cicloxigenase (COX) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (AIRES, 2012; FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2009). As células endoteliais também produzem e liberam fatores vasoconstritores como a endotelina, angiotensina II e prostanoides.

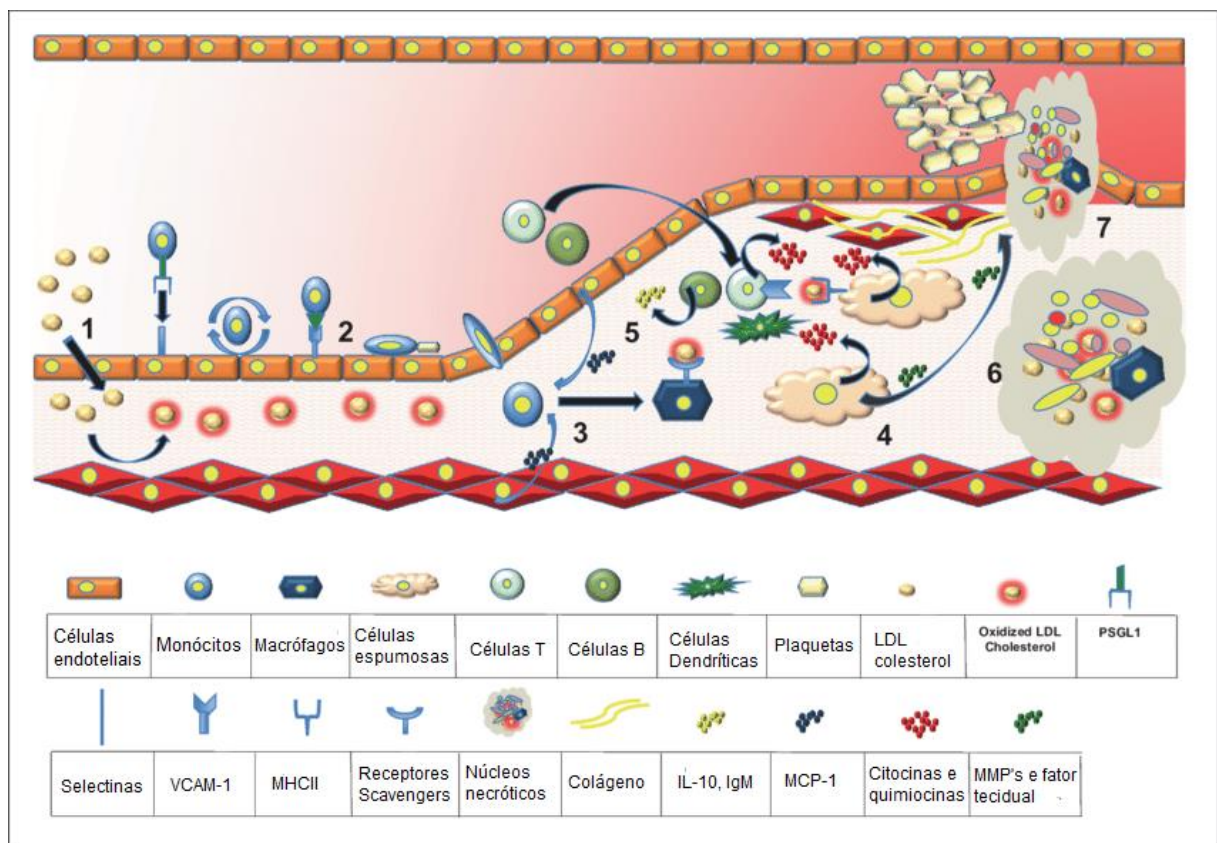
Vale ressaltar que nenhum mecanismo funciona isoladamente, sendo que a contração da musculatura lisa induzida pelos fatores contractantes, será contraposta pela liberação de fatores vasodilatadores. O resultado final, contração ou relaxamento vascular, será o balanço entre estas duas forças contrárias (AIRES, 2012).

Um desequilíbrio entre a produção de mediadores que regulam o tônus vascular e a homeostasia caracterizam um processo denominado de disfunção endotelial. Esse processo contribui para a patogênese e progressão da aterosclerose (CAHILL & REDMOND, 2016; OZKOR & QUYYUMI, 2011; RAJENDRAN et al., 2013; YIN et al., 2017).

1.4 Disfunção endotelial e aterosclerose

Os fatores de risco cardiovascular causam danos à vasculatura. As lesões iniciais ocorrem especialmente em locais onde o fluxo sanguíneo é turbilhonar, interferindo nas funções normais do endotélio. Isto ocorre tipicamente em bifurcações arteriais promovem uma maior produção de radicais livres pela ação da NADPH oxidase. Esses radicais podem inativar as moléculas de NO diminuindo sua biodisponibilidade bem como destruir a BH₄, caracterizando a disfunção endotelial (BALARINI, 2013; DAVIGNON & GANZ, 2004). Essa disfunção leva a uma alteração na permeabilidade das células endoteliais favorecendo com que moléculas de LDL presentes na circulação penetrem e sejam oxidadas (LDL-ox) na camada subendotelial, tornando-as citotóxicas (**Figura 7**) (MA et al., 2016; DAVIGNON & GANZ, 2004).

Figura 7: Formação da placa aterosclerótica.



Fonte: Adaptado de Wolf et al. (2014).

Eventos chave (1) O colesterol LDL entra no espaço subendotelial, é oxidado em LDL-ox e ativa as células endoteliais (CE) que passam a expressar moléculas de adesão celular. (2) Monócitos rolam sobre o endotélio, aderem nas CE e entram na camada íntima vascular. (3) Dentro da íntima, eles se transformam em macrófagos após estimulação com o M-CSF. (4) Ao absorver o oxLDL, os macrófagos tornam-se células espumosas que produzem citocinas pró-inflamatórias. (5) Enquanto a inflamação acelera, as células T, células B e células dendríticas entram na placa e regulam a

inflamação. (6) Células dendríticas, lipídeos e matriz extracelular formam um núcleo necrótico. (7) Uma vez que a capa fibrosa de colágeno é degradada por metaloproteases, a capa fica delgada e se rompe, o núcleo necrótico entra em contato com o sangue, as plaquetas são ativadas e o vaso é ocluído por um trombo.

As LDL-ox expõem diversos neoepítomos tornando-as imunogênicas e desencadeando a liberação de fatores inflamatórios (MA et al., 2016). O depósito dessas lipoproteínas na parede do vaso é um processo chave para o início da aterogênese e ocorre de maneira proporcional à concentração dessas moléculas no sangue (MA et al., 2018; SBC, 2017; ZMYSŁOWSKI & SZTERK, 2017).

Esse processo ativa as células endoteliais e elas passam a expressar quimiocinas, responsáveis pelo recrutamento de leucócitos, um das mais potentes é a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). As células endoteliais ativadas também produzem citocinas inflamatórias como interleucina-1, interleucina-4, Interleucina-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), moléculas de adesão como selectinas de plaquetas (P-selectina), selectinas de células endoteliais (E-selectina), VCAM-1, ICAM-1 (SBC, 2017; SINGH, 2002; WEISSBERG, 2000).

Induzidos por proteínas quimiotáticas, leucócitos são atraídos para a superfície endotelial, onde as integrinas dos leucócitos ligam-se às moléculas de adesão do endotélio, permitindo a transferência dessas células para a camada subendotelial, fenômeno conhecido como diapedese (**Figura 8**). Os monócitos são as primeiras células recrutadas ao local e uma vez na íntima das artérias, são expostos a várias citocinas, incluindo o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), diferenciando-os em macrófagos com capacidade fagocítica e de apresentação de antígeno (GISTERÅ & HANSSON, 2017; LUZ, et al., 2005). Este processo está associado à presença de receptores de reconhecimento de padrões presente nessas células, como receptores do tipo *scavengers* e receptores *Toll-like* (TLR). Os receptores *scavengers* medeiam a captação de partículas de LDL oxidadas, levando à formação de células espumosas (macrófagos ricos em lipídios não digeridos), enquanto o TLR inicia cascatas de sinalização que levam à ativação inflamatória. Isso pode causar liberação de moléculas vasoativas, como: NO, endotelinas e vários eicosanóides, incluindo leucotrienos (HANSSON, 2009; MILLER et al., 2003)

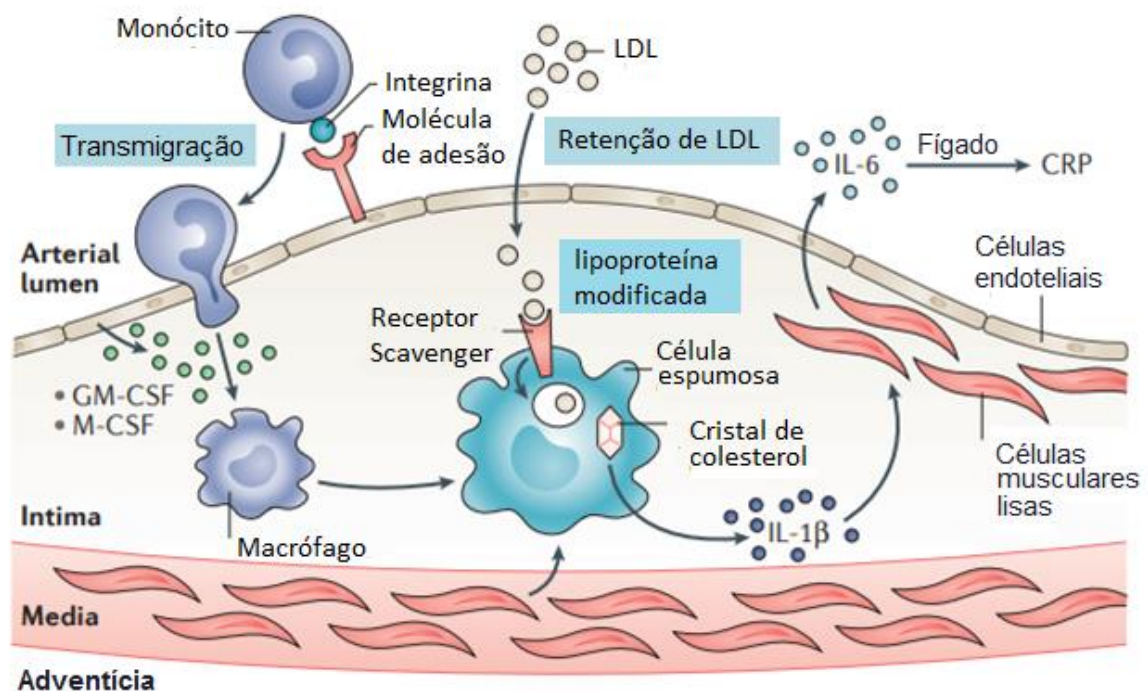
Essas células sintetizam citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8) e TNF- α , aumentando a resposta inflamatória e recrutando mais monócitos (BLANKENBERG et al. 2001; LI & MEHTA, 2000). Cristais de colesterol

se formam no interior dos macrófagos e ativam o inflamassoma da proteína 3, resultando na liberação de IL-1 β , que estimula as células musculares lisas a produzir IL-6. Tanto a IL-1 β quanto a IL-6 exercem efeitos pró-inflamatórios. O IL-6 circulante também pode sinalizar ao fígado a produção de proteína C reativa (GISTERÅ & HANSSON, 2017).

A resposta imune inata é acompanhada pela secreção de quimiocinas e citocinas, bem como pela apresentação de antígenos, que juntos cooperam para iniciar a resposta imune adaptativa definitiva. Os linfócitos T apesar de serem menos numerosos que os macrófagos, são de fundamental importância durante a aterogênese. Eles interagem com as células apresentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, células endoteliais) e diferenciam-se modulando a resposta inflamatória local (HANSSON, 2009; SBC, 2017).

Leucócitos e células endoteliais liberam fatores de crescimento que promovem a proliferação das células musculares lisas que migram para a túnica íntima e secretam colágeno e proteoglicanos para formação de uma capa fibrosa. Os proteoglicanos extracelulares, ligam-se aos lípidos e aumentam progressivamente a sua capacidade de ligação aos lípidos por extensão dos seus braços dissacarídicos (GERTHOFFER, 2007; INSULL JR, 2009).

Figura 8: Diapedese de monócitos.

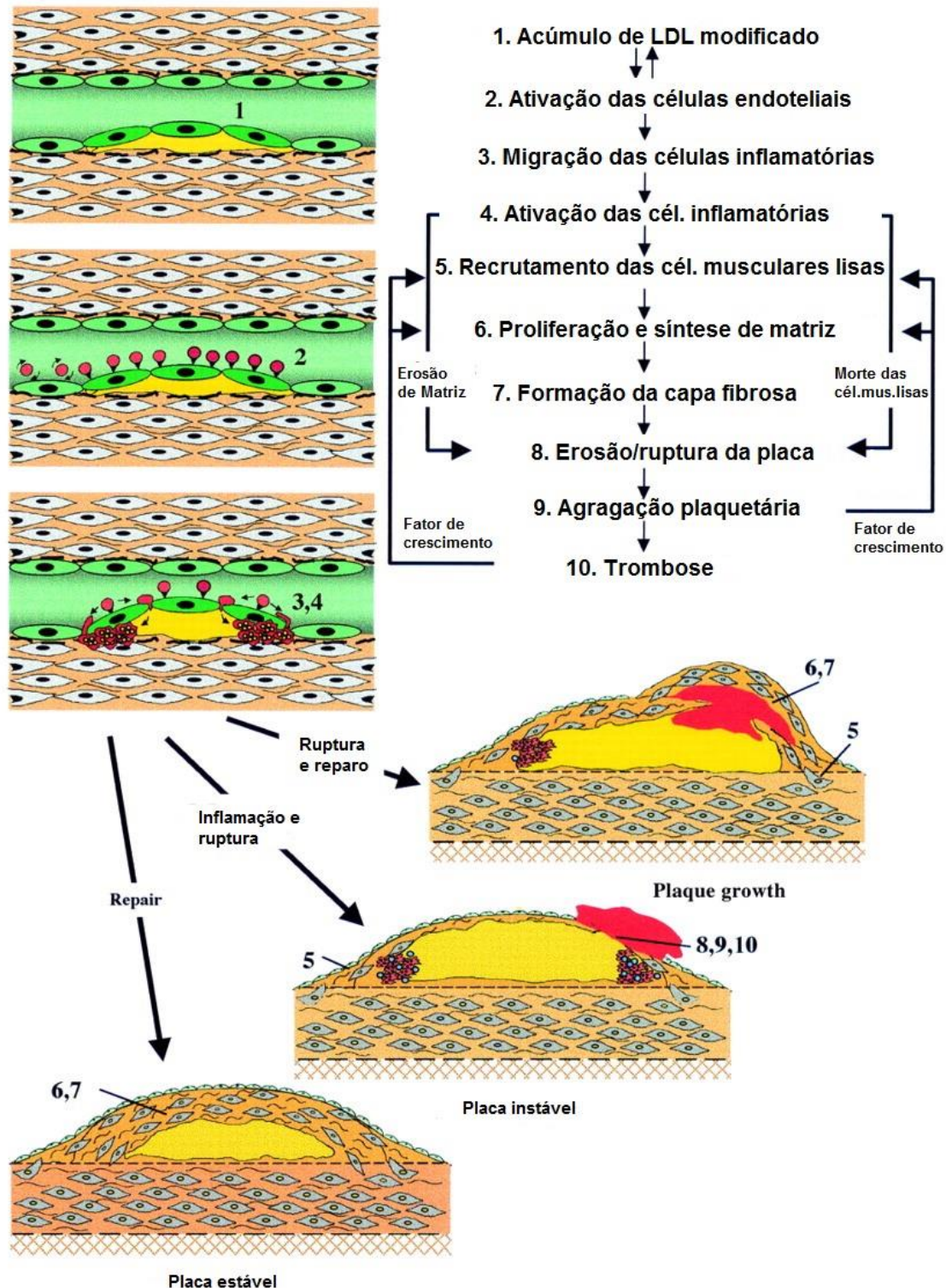


Fonte: Adaptado de Gisterå & Hansson (2017). Explicação no texto.

As citocinas pró-inflamatórias liberadas pelas células T, como o interferon gama (INF- γ) tem efeitos tóxicos em macrófagos e células musculares lisas, levando a formação de núcleos necróticos que causam mais inflamação. Núcleos necróticos ricos em lipídios se formam e dominam a parte central da íntima, ocupando, em última instância, 30% a 50% do volume da parede arterial. O tecido fibroso é adicionado para formar uma capa fibrosa sobre os núcleos necróticos. Isso forma as lesões da placa fibrosa que se desenvolvem para se tornar a lesão dominante (BADIMON & VILAHUR, 2014; INSULL JR, 2009; WEISSBERG, 2000).

À medida que o ateroma progride, o número de células musculares lisas diminui e as células espumosas sofrem apoptose liberando metaloproteases ativas que degradam a capa fibrosa. A morte de células musculares lisas reduz a síntese de colágeno, deixando a capa fibrosa mais delgada. Esses processos deixam a placa aterosclerótica mais vulnerável à ruptura (ATAOKA et al., 2001; BADIMON & VILAHUR, 2014; INSULL JR, 2009; WEISSBERG, 2000; XAVIER, 2013). A ruptura ou erosão da capa fibrosa expõe a matriz colágena altamente trombogênica e o núcleo lipídico à circulação e leva inevitavelmente ao acúmulo e ativação das plaquetas. Esse processo induz o recrutamento de novas células musculares lisas sob a influência de mitógenos, em particular o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e trombina. O trombo também contém grandes quantidades de fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) responsável pelo controle, diferenciação, proliferação celular, desenvolvimento e reparo tecidual. Esses fatores, portanto, impulsionam a formação de uma nova capa fibrosa sobre o trombo, aumentando, assim, o tamanho da lesão. Os tamanhos das lesões ateroscleróticas aumentam como consequência de episódios repetidos de ruptura e reparo (**Figura 9**) (WEISSBERG, 2000).

Figura 9: Desenvolvimento e progressão da aterosclerose.



Fonte: adaptado de Weissberg (2000).
Explicação no texto.

1.5 Modelo experimental de aterosclerose

Numerosas espécies de animais já foram utilizadas para estudo da patogênese da aterosclerose, porém os modelos mais úteis eram restritos a animais

relativamente grandes, como primatas, coelhos e porcos (NAKASHIMA, et al 1994). Considerando a necessidades de modelos úteis, porém menores e de fácil manuseio, pombos, hamsters e ratos foram utilizados, porém apresentaram problemas peculiares à sua espécie, não sendo adequados para estudo da patogênese (DROBNIK, et al., 2000; NAKASHIMA, et al 1994).

Camundongos também são altamente resistentes à aterosclerose, com exceção da linhagem C57BL/6, que ao serem alimentados com dieta rica em colesterol e contendo ácido cólico podem desenvolver aterosclerose, porém não se assemelha ao processo que ocorre em humanos (PAIGEN et al., 1985).

Sendo assim, devido a necessidade de um modelo ideal para estudo da aterosclerose em 1992 foi criado um modelo de camundongo geneticamente modificado, no qual o gene que codifica a apolipoproteína E (apoE) foi inativado em células tronco embrionárias por meio de recombinação homóloga (camundongo apoE knockout - apoE^{-/-}) (PLUMP, et al., 1992).

A apoE funciona como um componente das lipoproteínas do plasma que contribui para o transporte de lipídios entre células de diferentes órgãos e dentro de tecidos específicos. Descoberta no início dos anos 70 é uma das várias apolipoproteínas associadas a lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), remanescentes de quilomícrons e certas subclasses de lipoproteínas de alta densidade (HDL).

Existem três isoformas variantes principais de apoE, designadas apoE2, apoE3 e apoE4 (codificadas por alelos polimórficos, ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4), além de mais de 20 variantes raras. É sintetizada pelo fígado, cérebro, rins e outros tecidos. Todas as isoformas da apoE desempenham um papel chave na eliminação destas lipoproteínas, pois é um dos principais ligantes de dois tipos de receptores de superfície celular: os receptores de LDL (receptor B/E) e receptores específicos para apoE. Sua ausência compromete este processo e favorece o acúmulo de tais partículas no plasma, levando à hipercolesterolemia espontânea nestes animais, que pode ser exacerbada pela adição de uma dieta aterogênica rica em lipídios (BALARINI, 2013; HUANG & MAHLEY 2014).

Os eventos sequenciais envolvidos na formação de lesões e formação de placa nos animais apoE^{-/-} ocorrem de forma espontânea e são semelhantes aquelas observadas em humanos (NAKASHIMA, et al 1994). Desta forma esses animais vêm

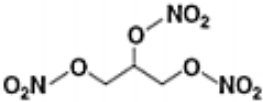
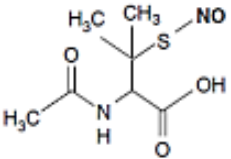
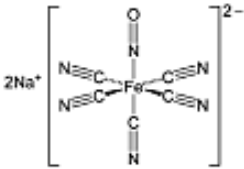
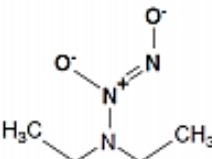
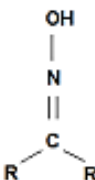
sendo bastante utilizados para estudo da patogênese da aterosclerose e de novos agentes terapêuticos.

1.6 Doadores de NO

Um dos desenvolvimentos mais surpreendentes em pesquisa tem sido a descoberta do papel fisiológico e fisiopatológico do NO no organismo (LEHMANN, 2000). Por mais de 100 anos doadores de NO foram utilizados para tratamento de doenças cardiovasculares, incluindo angina, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva, porém sem a compreensão exata de seu mecanismo de ação e princípio ativo, até 1987 quando foi estabelecido o que princípio ativo desses compostos era de fato o NO (IGNARRO et al., 1987).

Doadores de NO são uma classe quimicamente heterogênea de substâncias com um mecanismo de ação molecular comum, a capacidade de liberar NO ao interagir com o sistema biológico, mimetizando sua função endógena (IACHINI BELLISARII et al., 2011; IGNARRO et al., 2002). As vias que conduzem a liberação de NO diferem grandemente entre as classes de compostos. Geralmente os doadores liberam NO por meio de três tipos de mecanismos principais: doação espontânea de NO, liberação de NO por catálise enzimática e liberação de NO por reações químicas com ácidos, álcali, metal ou tiol (**Tabela 1**) (FEELISCH, 1998).

Tabela 1: Doadores de NO e mecanismo de liberação do NO.

Nome	Composto representativo	Mecanismo para geração de NO	
		Não-enzimático	Enzimático
Nitratos orgânicos		Hidrólise e nitrosação, tióis, luz e aquecimento	Enzimas citosólicas e microsossomais, enzimas ligadas à membrana, xantina oxidase, CyP450 e Glutathione-S-transferase (GST)
S-nitrosotióis		OH ⁻ e luz	Enzima desconhecida
Nitroprussiato de Sódio		Luz, tióis, nucleófilos	Enzimas ligadas a membranas, como co-fatores a NADH e NADPH
NONOates		Catálise ácida	Desconhecido
Oximas		Espontânea	Enzimas NADPH-dependentes

Fonte: FRANÇA-SILVA, 2010.

O nitroprussiato de sódio (NPS) é um nitrato inorgânico utilizado em hospitais para fornecer redução rápida da pressão arterial em crises hipertensivas. Também é a droga de escolha em estudos clínicos, onde é reconhecido como o padrão ouro na vasodilatação dependente do NO, mas independente do endotélio (MILLER & MEGSON, 2007). O NPS é relativamente estável e não libera o NO espontaneamente. Em vez disso, a geração de NO requer luz, moléculas teciduais ou redução de elétrons. Contudo, existem algumas limitações quanto ao uso do

NPS, uma vez que o NO liberado por esses compostos é acompanhada pela formação de cianeto, que apresenta toxicidade ao organismo.

Os diazeniodiolatos, conhecidos como NONOatos, são compostos capazes de gerar espontaneamente NO sem qualquer necessidade de transferência de elétrons, cofatores, ativação metabólica ou ativação redox. Os NONOatos transportam um grupo diolato $[N(O-)N=O]$ ligado a um nucleófilo (geralmente uma amina). Decompõem-se espontaneamente em solução a pH e temperatura fisiológicos para gerar NO. A taxa de decomposição depende exclusivamente da estrutura do nucleófilo, pH e temperatura do meio e não é influenciada por agentes redutores ou tecido biológico. Atualmente, os NONOatos ainda não estão aprovados para uso clínico (LIANG & NACHARAJU, 2015)

Os S-nitrosotióis são uma classe de compostos doadores que liberam NO espontaneamente. Contêm uma única ligação química entre um grupo tiol (sulfidrilo) (R-SH) e a porção NO. Vários fatores estão relacionados com a taxa de liberação de NO por esses compostos, como íons metálicos, agentes redutores, enzimas, luz, calor e pH (LIANG & NACHARAJU, 2015).

As oximas portam a função $C=NOH$, também encontrado no L-N^W-hidroxil-arginina, composto intermediário da conversão de L-arginina em NO pela NOS. As oximas são capazes de liberar NO de forma espontânea ou através de enzimas dependentes da NADPH oxidase (BERANOVA, et al., 2005).

Os nitratos orgânicos liberam NO por mecanismos não-enzimáticos, incluindo hidrólise e nitrosação, reação com tióis, luz e aquecimento, ou ainda por reação enzimática. A nitroglicerina (NTG) foi o primeiro nitrato orgânico já sintetizado. Em 1879 a NTG foi introduzida por William Murrell para o tratamento de angina pectoris (MURRELL, 1879).

1.7 Nitratos orgânicos e o 2-nitrato-1,3-dibutoxipropano (NDBP)

Os nitratos orgânicos são os doadores de NO mais antigos conhecidos e mais comumente utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares. São ésteres de ácido nítrico de álcoois mono ou poli-hídricos. Requerem bioativação enzimática ou não enzimática para liberar o NO. Os principais nitratos são: NTG, dinitrato de isossorbida, 5-mononitrato de isossorbida e tetranitrato de pentaeritritol (PETN) (BARRETO, et al., 2005 DESHPANDE, et al., 2012).

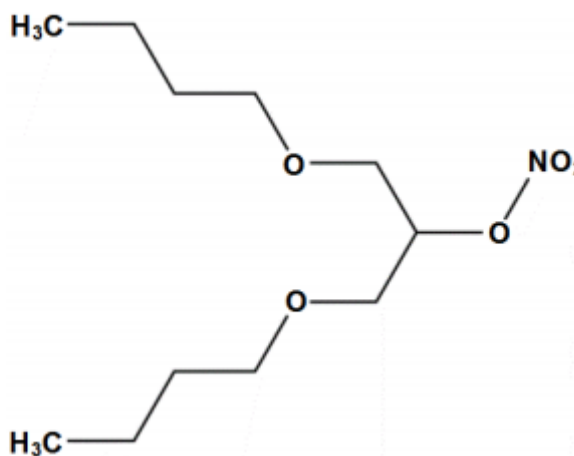
A NTG é o nitrato melhor estudado, usado principalmente no alívio agudo da angina, enquanto outras preparações de liberação mais lenta, como o mononitrato de isossorbida (MILLER & MEGSON, 2007). O mecanismo responsável pela vasodilatação produzida por esses compostos consiste na liberação de NO ativando a via NO/GMPc/PKG, com consequente diminuição de Ca^{2+} intracelular e relaxamento da musculatura vascular. Os principais efeitos dos nitratos orgânicos nas cardiopatias isquêmicas estão relacionados principalmente à vasodilatação dos vasos de capacitância e dos vasos de condutância. A dilatação dos vasos de capacitância reduz o retorno venoso, a pré-carga ventricular e a tensão na parede do vaso. A dilatação dos vasos de condutância reduz a pós-carga, outro determinante do consumo de oxigênio miocárdico. Dilatam as artérias coronárias epicárdicas, incluindo segmentos estenóticos, melhorando o fluxo sanguíneo nas áreas isquêmicas (IACHINI BELLISARII et al., 2011).

A principal limitação na utilização desses compostos é que o tratamento crônico resulta no rápido desenvolvimento de tolerância e doses cada vez mais altas são necessárias para obter o efeito desejado (MILLER & MEGSON, 2007; CSONT & FERDINANDY, 2005). Além disso, outros efeitos negativos estão associados ao tratamento a longo prazo com nitratos orgânicos, como aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo e disfunção endotelial, eventos os quais também estão relacionados com o desenvolvimento da tolerância (CSONT & FERDINANDY, 2005).

Estudos têm sido realizados com o intuito de desenvolver novos nitratos orgânicos que sejam eficazes na terapia cardiovascular, porém que não levem ao desenvolvimento de tolerância. Baseado nisso o Prof. Dr. Petrônio Figueiredo de Athayde Filho e colaboradores do departamento de Química da UFPB desenvolveram o nitrato orgânico 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP), o qual está sendo objeto de pesquisas.

O NDBP foi sintetizado a partir da glicerina, um subproduto produzido em alta quantidade na rota de produção do biodiesel. Possui um peso molecular de 249,304, fórmula molecular é $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ e sua estrutura química pode ser observada na figura 10.

Figura 10: Estrutura química do 2-nitrato-1,3-dibutoxipropano (NDBP)



Fonte: FRANÇA-SILVA, 2012.

Estudo realizado por França-Silva (2012) demonstrou que o NDBP induziu o vasorrelaxamento em anéis de artéria mesentérica superior de rato por meio da liberação de NO e subsequente ativação da via NO/GMPc/PKG e ativação dos canais de K^+ (FRANÇA-SILVA, et al., 2012).

Além da ação vasorrelaxante do NDBP, foi observado que o composto atenua o estresse oxidativo em animais hipertensos, via redução na produção de ânion superóxido por indução da NADPH oxidase (PORPINO et al., 2016). Também foi demonstrado que o NDBP, diferentemente dos outros nitratos orgânicos utilizados atualmente, não induz tolerância, o que se apresenta como uma vantagem em relação a eles (FRANÇA-SILVA, 2012). Isto faz do NDBP um promissor agente terapêutico no tratamento e doenças cardiovasculares.

Contudo, como se trata de uma molécula nova, não existem estudos demonstrando o efeito do NDBP sobre vasos de grande calibre, tampouco na presença de aterosclerose.

Tendo em vista que não se possui estudos que avaliam o efeito do NDBP na função vascular em modelos de aterosclerose, nossa hipótese foi que o NDBP seria capaz de reverter o quadro de disfunção endotelial associado à hipercolesterolemia, aumentar níveis de NO e reduzir o estresse oxidativo.

Desta forma, estes fatores embasaram a escolha dos camundongos apoE^{-/-} para nossa pesquisa, pois consistem em um excelente modelo experimental para o estudo da aterogênese.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O infarto agudo do miocárdio (IAM) representa um problema de saúde pública e é uma das principais causas de mortes no Brasil. Essa doença costuma ser precedida por um processo de disfunção endotelial e aumento de estresse oxidativo, acarretando no desenvolvimento de aterosclerose, o qual obstrui o vaso causando isquemia.

Tendo em vista que a disfunção endotelial é o processo chave para o desenvolvimento da aterogênese, e o principal mecanismo que inicia a disfunção endotelial é a diminuição da biodisponibilidade de NO e aumento de estresse oxidativo, o restabelecimento dos níveis de NO poderiam retardar ou reverter esse quadro. Os nitratos orgânicos são os mais utilizados na clínica para tratamento de doenças cardiovasculares em episódios agudos, porém não são ideais para tratamentos crônicos já que resultam no rápido desenvolvimento de tolerância.

Nesse sentido é de fundamental importância o desenvolvimento de novos bioprodutos, como novos nitratos orgânicos, que sejam mais eficazes para tratamento de doenças cardiovasculares e não induzam tolerância, tendo como objetivo de diminuir complicações, em particular o infarto agudo do miocárdio. Desta forma o NDBP pode ser muito promissor no tratamento das doenças cardiovasculares associadas a dislipidemias, por aumentar os níveis de NO e diferenciando dos outros nitratos orgânicos já utilizados atualmente por não induzir o processo de tolerância.

OBJETIVOS

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do NDBP sobre a função vascular em modelo de aterosclerose experimental.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do NDBP:
 - ✓ Na função vascular em vasos de grande calibre (aorta) com o intuito de verificar se o composto é capaz de reverter o quadro de disfunção endotelial em modelos de aterosclerose experimental;
 - ✓ Na produção endógena de NO;
 - ✓ No quadro de estresse oxidativo;
- ✓ Na resposta vasorrelaxante produzida pelo composto na presença

MATERIAIS E MÉTODOS

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados para a pesquisa camundongos (*Mus musculus*) machos das linhagens C57BL/6 (C57, controle, n=16) e animais *knockout* para apolipoproteína E (apoE^{-/-}, n=20) com 8 semanas de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) do centro de Biotecnologia da Faculdade Federal da Paraíba (CBIOTEC/UFPB).

Os animais foram mantidos em estante com circulação e exaustão de ar, sob temperatura (21±1) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12 horas) controladas, tendo livre acesso a ração e água.

Todos os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) do CBIOTEC/UFPB sob parecer nº1544070318.

4.2 Grupos experimentais

Os camundongos apoE^{-/-} com 8 semanas de idade começaram a receber uma dieta aterogênica Western Type (Rhoister, São Paulo, Brasil), contendo 41% de calorias em forma de lipídios e 1,5% de colesterol. Foram mantidos sob essa dieta por 12 semanas para acelerar o desenvolvimento da disfunção endotelial e da placa aterosclerótica.

Os animais C57 foram submetidos ao mesmo protocolo que os camundongos apoE^{-/-}, porém foram alimentados com dieta padrão, uma vez que não era objetivo do trabalho a indução de disfunção endotelial nestes animais.

Um grupo de animais apoE^{-/-}, após as 12 semanas de dieta, foram submetidos a um tratamento de 14 dias com NDBP (40 mg/Kg) por via intraperitoneal.

Desta forma os animais foram divididos em três grupos experimentais: C57 controle, apoE^{-/-} com dieta e apoE^{-/-} com dieta tratado com NDBP cronicamente.

4.3 Substância teste

O 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP) foi cedido para a pesquisa pelo laboratório do Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho do Departamento de Química da UFPB, o qual foi solubilizado em cremofor na proporção de 1:1 e diluído

em água destilada. As etapas do processo de síntese do NDBP foram descritas previamente nos estudos de Santos (2009).

4.4 Drogas e soluções utilizadas

Foram utilizadas para a realização do experimento as seguintes substâncias: acetilcolina (ACh), fenilefrina (FEN), N-G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), hidroxocobalamina, indometacina, nitroglicerina, xilazina e cetamina obtidos da Sigma-Aldrich (EUA).

Foi utilizada a solução nutritora de Krebs modificada (concentrações em mM: NaCl 115; KCL 4,7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; KH_2PO_4 1,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; Glicose 11,1; NaHCO_3 25) gaseificada com uma mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) em pH 7,4.

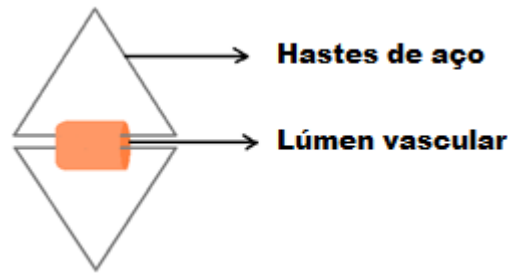
4.5 Análises bioquímicas

O sangue coletado (processo de coleta descrito no tópico 4.6) foi centrifugado por 10 minutos a 3.000rpm em centrífuga refrigerada (8°C), o plasma obtido foi utilizado para dosagem de colesterol total utilizando *kit* enzimático colorimétrico (Bioclin®, Quibasa, Belo Horizonte, Brasil) de acordo com as orientações do fabricante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro automático (Chemwell T, Chemistry Analyzer, 4600, USA).

4.6 Cirurgia e reatividade vascular

Após as 12 semanas (grupos de animais que receberam apenas dieta) ou após 14 semanas (grupo de animais que receberam dieta e tratamento crônico com NDBP), os animais foram eutanasiados com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal e submetidos a toracotomia. Os pulmões foram retirados e o sangue foi coletado da caixa torácica, em seguida foi realizada a retirada do coração e da aorta torácica de maneira cuidadosa. As peças retiradas foram transferidas para uma placa de Petri contendo solução nutritora de Krebs. Foi retirado todo tecido adiposo da aorta, que foi cortada em 3 ou 4 anéis de aproximadamente 3mm. Hastes de aço inoxidável em formato de triângulo foram introduzidas no lúmen vascular, como demonstrado na **figura 11**.

Figura 11: Esquematização da adição das hastes de aço ao anel aórtico.

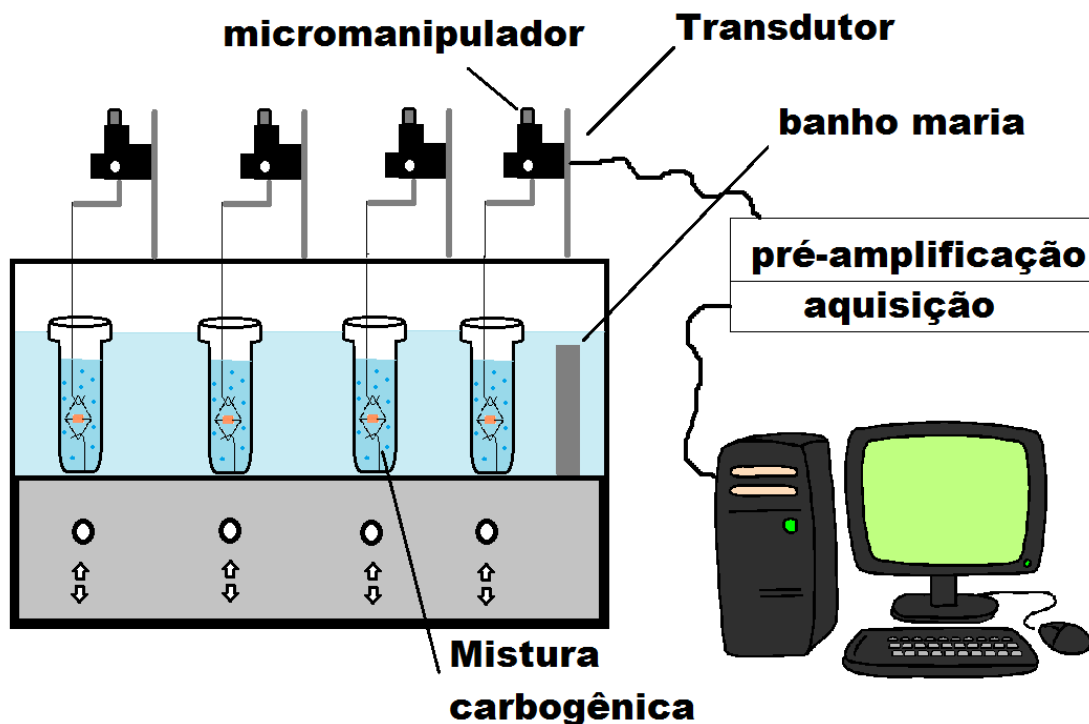


Fonte: a autora (2018).

As hastes contendo os anéis aórticos foram introduzidos em uma cuba contendo 10ml de solução de Krebs e mistura carbogênica mantidos no banho-maria a 37°C. Uma das hastes foi fixada na parede da cuba e a outra haste foi acoplada a um transdutor de tensão isométrica, conectado ao sistema de aquisição de dados PoweLab™ (software versão 4.2, ADInstruments, MA, EUA) para permitir o registro de alterações no tônus vascular mediante a ação de drogas vasoativas (**Figura 12**).

Os anéis foram mantidos sob uma tensão basal de 0,5 gramas durante um período de estabilização de 60 minutos, com troca da solução de Krebs a cada 15 minutos.

Figura 12: Esquema do equipamento para estudo de reatividade vascular

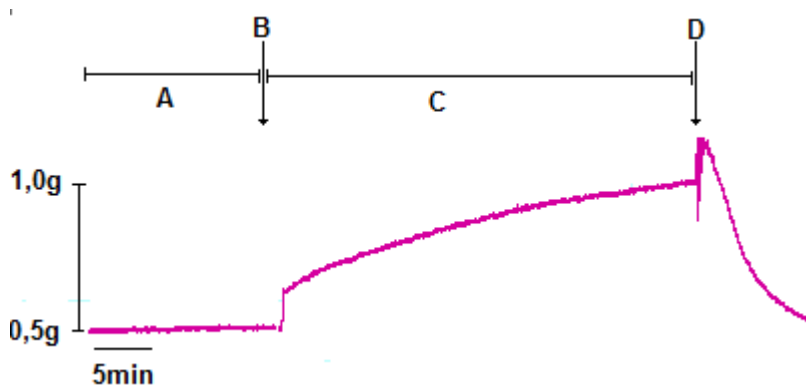


Fonte: a autora (2018)

4.6.1 Avaliação da viabilidade vascular e teste de endotélio

Para avaliação da viabilidade dos anéis, após a estabilização de 60 minutos, foi adicionado a cada cuba 125mM de cloreto de potássio (KCl), por um período de 30 minutos. Os anéis foram considerados viáveis quando desenvolveram um valor de contração de aproximadamente o dobro da tensão basal (1,0g). Após o período de 30 minutos a solução nutritora foi trocada, seguindo um período de estabilização de 15 minutos (**Figura 13**).

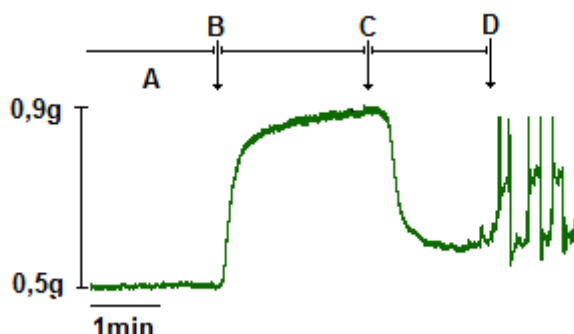
Figura 13: Registro típico representativo do teste de viabilidade vascular



Fonte: a autora (2018). A: fase final do período de estabilização de 1 hora com lavagem a cada 15 minutos. B: Adição de 125mM KCl. C: contração máxima estimulada pelo KCl durante 30 minutos até aproximadamente 1g. D: troca da solução nutritora.

Com a viabilidade dos anéis assegurada, após a estabilização, foi realizado um teste para verificação da integridade do endotélio. Foram adicionados a cada cuba 10 μ M do agonista alfa adrenérgico fenilefrina (FEN) obtendo-se um valor de contração igual ou superior a 50% do obtido pelo KCl. Após a formação do platô, 10 μ M do agonista de receptores muscarínicos acetilcolina (ACh) foi adicionada a cada cuba. Os anéis considerados com endotélio viável (E+) foram aqueles que obtiveram um valor de relaxamento maior que 50% da contração induzida pela FEN. Aqueles os quais o relaxamento foi menor que 10% foram considerados com endotélio inviável (E-). Após o teste de endotélio, a solução de Krebs foi trocada três vezes e os anéis foram submetidos a um período de estabilização de 15 minutos (**Figura 14**).

Figura 14: Registro típico do teste de endotélio.



Fonte: a autora (2018). A: final do período de estabilização de 15 minutos. B: adição de fenilefrina. C: adição de acetilcolina. D: Troca da solução nutritiva.

4.6.2 Avaliação da função vascular

Os testes de reatividade foram realizados em todos os grupos por meio da construção de curvas dose-resposta a substâncias vasoativas. Após o período de estabilização, os vasos foram submetidos a concentrações crescentes de substâncias vasoativas, permitindo o registro da variação de tensão em função da concentração das doses.

Para avaliar a função endotelial, os anéis foram submetidos a uma pré-contracção com Fen ($10\mu\text{M}$) e realizado uma curva de relaxamento com ACh de 10^{-10}M a $3 \times 10^{-5}\text{M}$. Também foi realizada uma curva de contracção de contracção com Fen de 10^{-10}M a $3 \times 10^{-5}\text{M}$.

4.6.3 Avaliação da atividade do NDBP sobre a função endotelial

Nos grupos de animais que não receberam tratamento crônico, com o objetivo de avaliar a ação do NDBP sobre a função vascular, após o período de estabilização de 15 minutos, $10\mu\text{M}$ NDBP foi adicionado a cada cuba e incubado por 20 minutos. Após o período de incubação, foi induzida uma contracção com FEN ($10\mu\text{M}$) e realizada curva dose resposta a ACh (10^{-10}M a $3 \times 10^{-5}\text{M}$). O mesmo protocolo foi utilizado para construção da curva dose-resposta a FEN (10^{-10}M a $3 \times 10^{-5}\text{M}$), após os 20 minutos de incubação do NDBP.

Para investigar se a ação do NDBP sobre a função endotelial é dependente de NO, foi utilizado a hidroxocobalamina (HDX) um sequestrador de NO radicalar

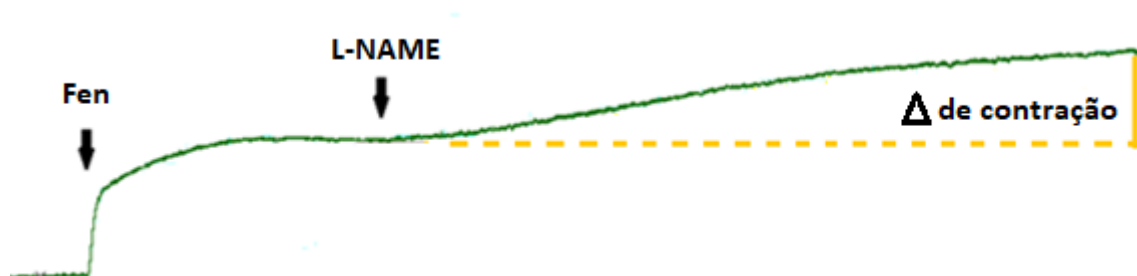
(ALUSTAU, 2010). Após estabilização de 15 minutos, foi adicionado NDBP (10 μ M) mais HDX (100 μ M) e foram incubados por um período de 20 minutos. Após o período de incubação a solução nutritora foi trocada três vezes para retirada dos compostos, seguida por um período de estabilização de 5 minutos. Os anéis foram induzidos a uma contração com FEN (10 μ M) e realizada curva dose resposta a ACh (10⁻¹⁰M a 3x10⁻⁵M).

Com o objetivo de investigar como o NDBP age sobre a função vascular, se sua ação depende de efeito antioxidante, foi utilizado o tempol, um mimético da superóxido dismutase (SOD) (BALARINI, 2013). Após o período de estabilização de 15 minutos, foi adicionado 10 μ M de NDBP mais 1 μ M de tempol e foram incubados por 20 minutos. Após o período de incubação foi induzida uma contração com FEN (10 μ M) e realizada curva dose resposta a ACh (10⁻¹⁰M a 3x10⁻⁵M).

4.6.4 Produção de NO

Teste realizado em todos os grupos de animais. Tendo em vista que o NO é o principal fator relaxante produzido pelo endotélio, para avaliar sua produção de forma indireta, foi utilizado o N-G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um análogo da L-arginina que inibe de forma não específica as isoformas da NOS (BALARINI, 2013). Após o período de estabilização, foi induzido uma pré-contração com Fen (10 μ M), após a formação do platô, os anéis foram incubados com L-NAME (100 μ M) durante 20 minutos. Foi calculado o delta de contração após a adição de L-NAME (Figura 15).

Figura 15: Avaliação da produção basal de NO



Fonte: a autora (2018)

4.6.5 Avaliação da atividade vasorrelaxante do NDBP

Após uma pré-contracção com FEN ($10\mu\text{M}$) concentrações crescentes e cumulativas de NDBP (10^{-10}M a $3\times 10^{-5}\text{M}$) foram aplicadas para obtenção de uma curva dose-resposta, tanto em anéis com endotélio viável (E+) como em anéis sem endotélio (E-) nos grupos de animais sem tratamento crónico.

Para confirmar o papel do NDBP como doador de NO, após estabilização de 15 minutos, foi incubamos HDX ($100\mu\text{M}$) por um período de 20 minutos, em seguida realizamos curva de relaxamento ao NDBP (10^{-10}M a $3\times 10^{-5}\text{M}$).

4.7 Histologia

Animais dos grupos que receberam apenas dieta foram separados para realização de análise histológica, ao final das 12 semanas da dieta, foram anestesiados com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal e em seguida foram perfundidos com salina tamponada com fosfato (PBS) em pH 7,4 por punção cardíaca. Em seguida, os tecidos foram fixados com paraformaldeído a 4% em PBS. As aortas foram retiradas e dissecadas do tecido conjuntivo e armazenadas em fixador até o momento do processamento histológico.

4.7.1 Corte histológico e coloração com OilRed

Algumas das aortas armazenadas em fixador foram utilizadas para realização de cortes histológicos. As aortas foram montadas em OCT (Sakura Finetek, Califórnia, EUA) e congeladas. Após congelamento foram realizados cortes de $6\mu\text{m}$ de espessura em criostato manual (Leica, CM 1850, Alemanha). Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e armazenados em geladeira. Após 24 horas foi realizada a coloração com o corante de lipídios neutros Oil-Red-O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para quantificação de placa aterosclerótica. O OCT foi retirado das lâminas após lavagem cuidadosa com água destilada, as lâminas foram mantidas em contato com o corante com os cortes voltados para baixo, para evitar precipitação, pelo período de 10 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada para retirada do excesso de corante e cobertas por PBS e lamínula. Os cortes foram analisados em microscópio interfaceado a uma câmara digital, a análise das imagens capturadas foi realizada pelo sistema de análise *Image J*.

A área com deposição de placa foi expressa como porcentagem do lúmen vascular ocupada pela placa aterosclerótica.

4.7.2 Teste “en face”

Algumas das peças fixadas foram separadas para quantificação de placa aterosclerótica por meio do teste “en face”. As aortas foram abertas longitudinalmente e coradas com o corante Oil-Red-O. As aortas foram lavadas com água destilada para retirada do excesso do corante e fotografadas após serem fixadas em lâmina coberta por lamínula. A análise das imagens capturadas foi realizada pelo sistema de análise *Image J*

4.7.3 Marcação com DHE

O dihidroetídio (DHE) tem sido utilizado como sonda para detecção de ânions superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) formando um produto intermediário, o 2-hidroxi-etídio (2-OHEt^+) que se intercala com os ácidos nucleicos e emite uma fluorescência vermelha (WOJTALA et al. 2014). Animais de ambos os grupos foram anestesiados e perfundidos com KREBS 30% sacarose, as aortas foram retiradas e dessecadas do tecido conjuntivo. As aortas foram incluídas em OCT e realizados cortes de 6 μm de espessura montados em lâminas gelatinizadas. As lâminas foram separadas em 4 grupos: animais $\text{apoE}^{-/-}$, C57, apoE tratados e C57 tratados. Os cortes não fixados foram lavados com KREBS para retirada do OCT e foram mantidos a temperatura de 37°C por 30 minutos, nas lâminas dos grupos tratados, foi adicionado NDBP 10 μM em solução de KREBS. Passado os 30 minutos, o excesso de KREBS foi retirado e os cortes foram incubados com DHE (2 μM) em solução de KREBS durante 30 minutos em câmara úmida e protegida da luz. Após os 30 minutos o excesso de DHE foi retirado às lâminas foram seladas e levadas imediatamente ao microscópio de fluorescência acoplado a câmera digital (Nikon Eclipse TI-E, Nikon, Japão) para análise. A intensidade de fluorescência foi quantificada em fotomicrografias utilizando o programa *Image J*.

4.7.4 Marcação com DAF

O diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA) é um corante fluorescente permeável à membrana celular que permite a determinação do NO intracelular. O

DAF-2DA é convertido a 4,5- diaminofluoresceína (DAF-2) por meio da ação de esterases intracelulares. O DAF-2 não é permeável à membrana celular permanecendo, portanto, no interior das células. Na presença de NO e oxigênio, um produto fluorescente é formado, o triazolofluoresceína (DAF-2T) que emite fluorescência de cor verde. Assim, a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração de NO intracelular (KOJIMA et al. 1998).

Desta forma, para avaliação da produção de óxido nítrico vascular, os cortes montados em lâminas gelatinizadas (mesmo processo do tópico 4.7.3) foram separadas em 4 grupos: animais apoE^{-/-}, C57, apoE^{-/-} tratados e C57 tratados. Os cortes não fixados foram lavados com KREBS para retirada do OCT e foram mantidos a temperatura de 37°C por 30 minutos, nas lâminas dos grupos tratados, foi adicionado NDBP 10 µM em solução de KREBS. Após os 30 minutos o excesso de Krebs foi retirado e os cortes foram incubados com DAF-2DA (2 µM) em solução de KREBS durante 30 minutos em câmara úmida e livre da luz. Após os 30 minutos o excesso do corante foi retirado, as lâminas foram seladas e levadas imediatamente ao microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TI-E, Nikon, Japão) para análise. A intensidade de fluorescência foi quantificada em fotomicrografias utilizando o programa *Image J*

4.8 Análise estatística

As curvas dose-resposta de relaxamento a ACh foram expressas como a porcentagem de relaxamento em relação ao nível máximo de pré-contracção. As curvas dose-resposta de contracção foram expressas como a porcentagem de contracção em relação ao nível basal. A resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade ao agonista expressa como pD_2 (logaritmo negativo na base 10 da CE_{50}) foram calculados por regressão não linear (Prism 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Nas curvas de relaxamento a ACh, alguns resultados estão expressos como a diferença entre as áreas abaixo da curva (dAUC) na presença e na ausência da incubação com NDBP.

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística das curvas entre os grupos, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de 2 vias para medidas repetidas, seguida pelo post hoc de Tukey. As

comparações entre as $R_{\text{máx}}$, pD_2 , dados bioquímicos e histológicos entre os grupos foi feita por ANOVA de 1 via, seguida pelo post hoc de Tukey. As comparações estatísticas entre dois grupos foram feitas por teste t de Student não pareado. As análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As comparações intragrupo de $R_{\text{máx}}$ e pD_2 na presença e ausência de bloqueio foram feitas por teste t. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando o $p < 0,05$.

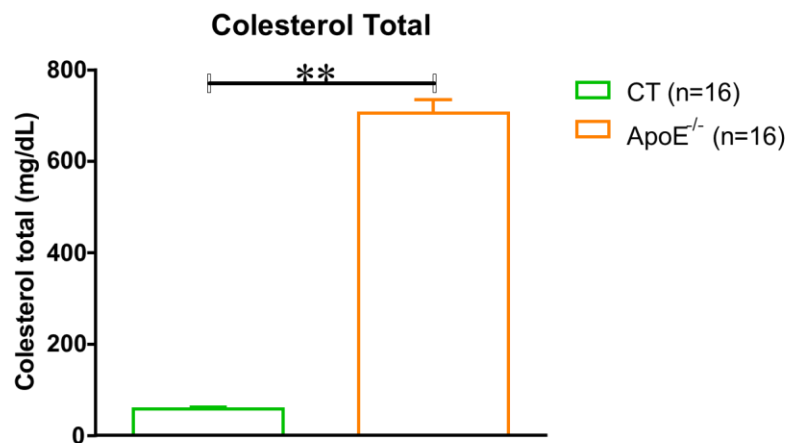
RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Análises bioquímicas

Ao final do protocolo inicial de 12 semanas, o sangue dos animais foi coletado e realizado a análise de colesterol total. Como esperado, os animais apoE^{-/-} obtiveram o perfil de colesterol ($704,9 \pm 29,9^{**}$) maior que os animais C57 controle ($58,2 \pm 3,6$). Considerando que os animais apoE^{-/-} receberam dieta aterogênica, eles apresentaram um aumento de cerca de 12 vezes na concentração de colesterol comparado aos animais controle (gráfico 1).

Gráfico 1: Representação gráfica da análise do perfil de colesterol total.

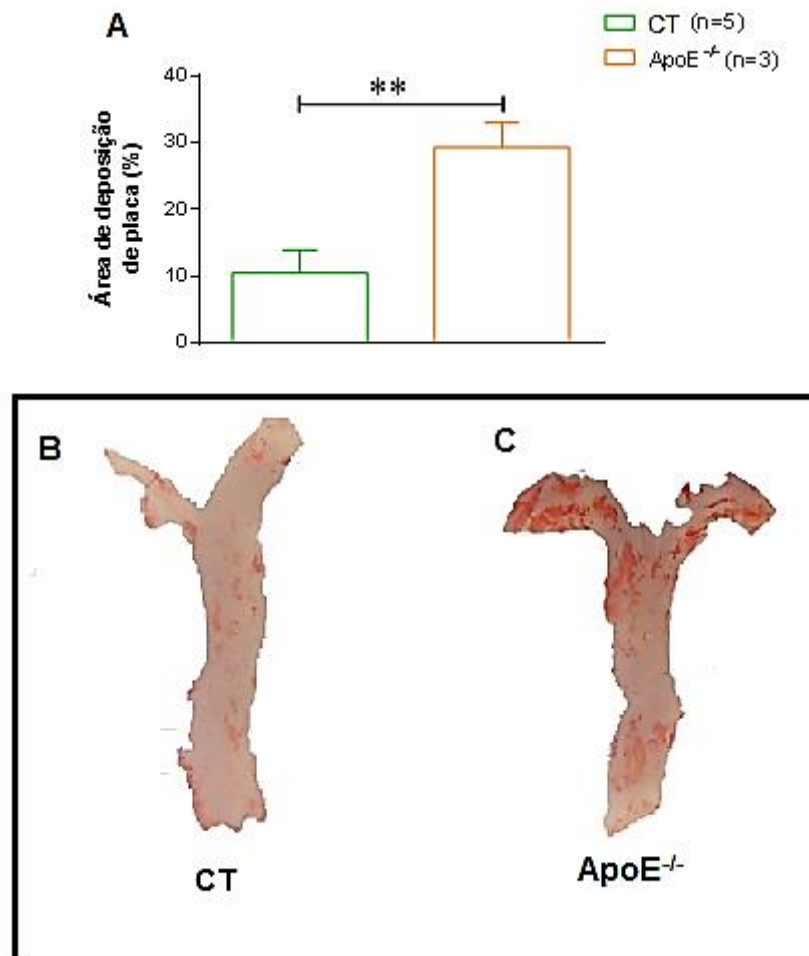


Valores expressos com média $\pm$ EPM. $^{**}p < 0,01$ apoE^{-/-} vs. CT.

5.2 Deposição de placa aterosclerótica

A quantificação da deposição de placa na aorta dos animais estudados foi avaliada ao longo de toda a aorta através de cortes longitudinais por meio do teste “*en face*” e através de cortes transversais do vaso, corados com corante de lipídios neutros *Oil-Red*. Na figura 16A observa-se que os animais apoE^{-/-} apresentaram marcante deposição de placa ($29,3 \pm 2,1^{**}$) quando comparados ao controle ($10,5 \pm 1,5$). As placas estavam localizadas ao longo de toda aorta dos animais apoE^{-/-} embora a maior concentração de placa foi observada no arco aórtico (**Figura 16C**).

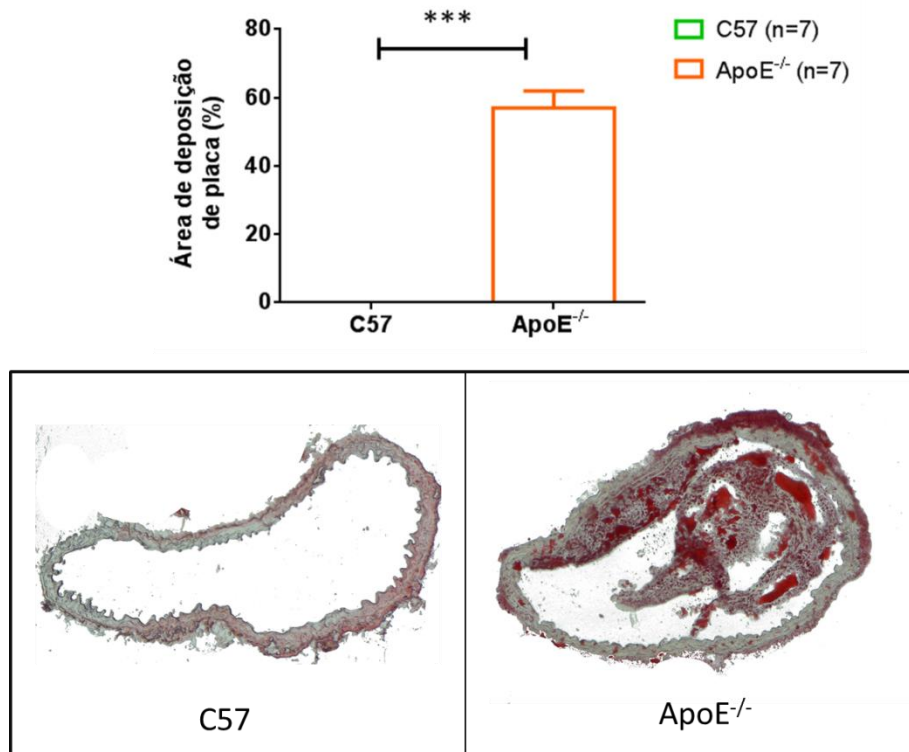
Figura 16: Quantificação de placa aterosclerótica por meio do teste “*en face*”.



A: Representação gráfica da deposição de placa aterosclerótica na aorta de animais controle e apoE^{-/-}. A área corada com corante é expressa como uma porcentagem da área total da superfície. B e C: imagem dos cortes longitudinais corados com *OilRed*. **p<0,01 controle vs. apoE^{-/-}.

As medidas da área da placa aterosclerótica em cortes transversais foram consistentes com a preparação observadas no teste “*en face*”. Observou-se diferença significativa na deposição de placas nos animais apoE^{-/-} (57±4,9***) comparado ao controle (0±0), onde nos animais controle não foi observado deposição de placas (**Figura 17**).

Figura 17: Quantificação de placa aterosclerótica cortes transversais.



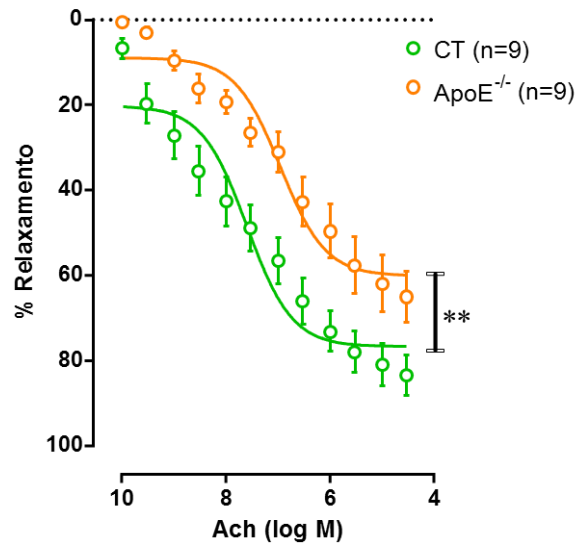
Representação gráfica da deposição de placas ateroscleróticas na aorta de animais controle e apoE^{-/-}. Imagem de cortes transversais de aorta coradas com Oil-Red. ***p<0,01 CT vs. apoE^{-/-}.

5.3 Reatividade vascular

5.3.1 Avaliação da função endotelial

A função endotelial foi avaliada com base na realização da curva de relaxamento à ACh após indução de contração com FEN. Como observado no gráfico 2, os camundongos apoE^{-/-} apresentam prejuízo no relaxamento vascular (Rmáx 62,7±5,5; pD₂ 6,7±0,2**) comparado com o grupo controle (Rmáx: 76,7±5,4; pD₂: 7,9±0,3). Demonstrando que os animais apoE^{-/-} possuem um endotélio comprometido.

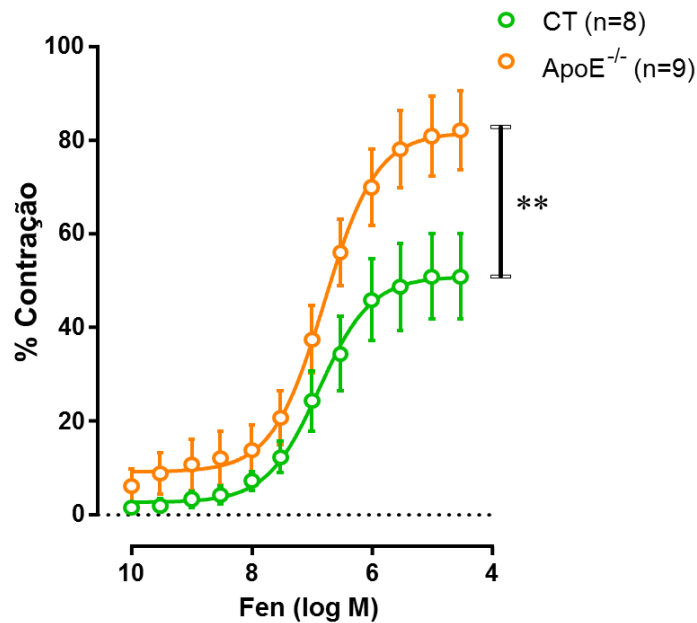
Gráfico 2: Representação gráfica das curvas dose-resposta à Acetilcolina.



Curva de relaxamento à ACh comparativa entre animais controle e animais apoE^{-/-}. Valores expressos com média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$ CT vs. apoE^{-/-}.

Também foi realizada curva de contração a FEN. Como demonstrado no gráfico 3, os camundongos apoE^{-/-} apresentam uma maior resposta a FEN ($R_{\text{máx}}$: $82,0 \pm 8,3^*$; pD_2 : $6,8 \pm 0,07$) em relação ao grupo controle ($R_{\text{máx}}$: $51,1 \pm 9,2$; pD_2 : $6,8 \pm 0,06$). Tendo em consideração que a disfunção endotelial é caracterizada por prejuízo no relaxamento vascular e aumento da resposta vasoconstritora, através desses resultados, pode-se afirmar que os animais apoE^{-/-} possuem marcante disfunção endotelial.

Gráfico 3: Representação gráfica das curvas dose-resposta à Fenilefrina.

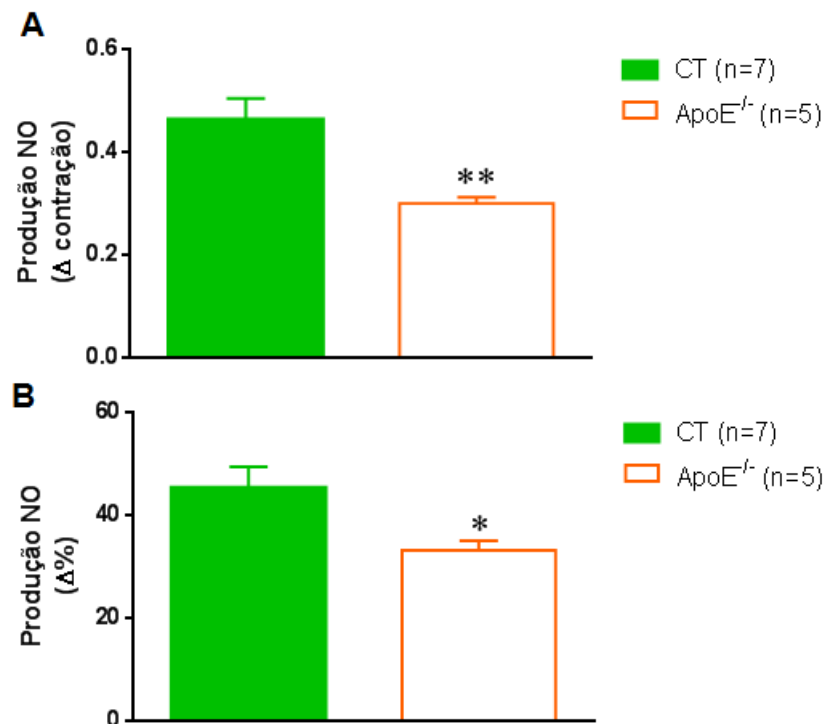


Curva dose-resposta a fenilefrina comparativas entre animais controle (CT) e apoE^{-/-}. Valores expressos com média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$ apoE^{-/-} vs. CT.

5.3.2 Produção basal de NO vascular

Tendo em vista que o NO é o principal vasodilatador produzido pelo endotélio mensuramos sua produção basal após bloqueio com L-NAME, um inibidor não seletivo na NOS. Após uma indução de contração com FEN foi adicionado L-NAME cessando toda produção basal de NO pela NOS, inativando a cascata NO/GMP_c/PKG, levando a uma contração máxima do vaso. Um delta de contração é calculado com os valores obtidos antes da adição do L-NAME e após a contração máxima, determinando a produção basal de NO. Como observado no gráfico 4, os animais apoE^{-/-} obtiveram um delta de contração menor (Δ : $0,30 \pm 0,01^{**}$; $\Delta\%$ $33,2 \pm 1,9^*$) do que o grupo controle (Δ : $0,46 \pm 0,04$; $\Delta\%$ $45,3 \pm 4,1$), demonstrando que os animais apoE^{-/-} estão com prejuízo na produção de NO quando comparado ao grupo controle.

Gráfico 4: Representação gráfica da produção basal de NO vascular.

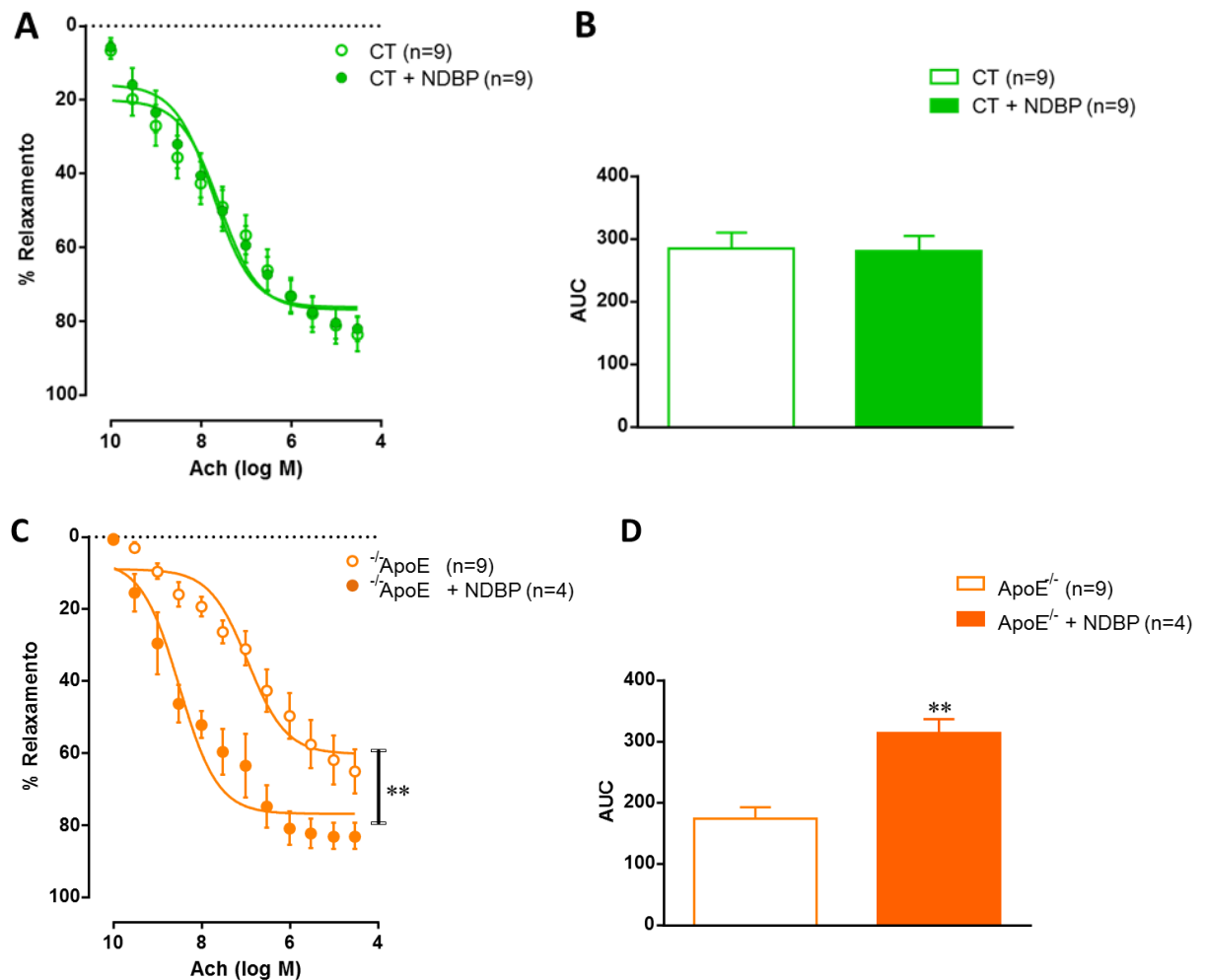


A: representação gráfica do delta de contração após bloqueio realizado pelo L-NAME. B: representação gráfica da porcentagem do delta de contração (Δ%). **p<0,01 vs. CT e *p<0,05 vs. CT.

5.3.3 Avaliação do efeito induzido pelo NDBP sobre a função endotelial

Para avaliar o efeito do NDBP sobre a função endotelial, os anéis foram incubados com NDBP durante 20 minutos e em seguida foi realizado uma curva dose-resposta à ACh após uma pré-contracção com Fen. Como observado no gráfico 5A, nos animais controle a resposta de relaxamento à ACh (Rmáx: 76,7±5,4; pD₂: 7,9±0,3) não foi alterada após o tratamento com NDBP (Rmáx: 76,0±3,7; pD₂: 7,9±0,2), podendo ser observado também no gráfico 5B que não houve diferença da área abaixo da curva desses animais (286±25 vs. 280±25, Δ-5,1±6,6). Nos animais apoE^{-/-} (gráfico 5C) o relaxamento à ACh (Rmáx: 62,7±5,5; pD₂: 6,7±0,2) foi maior após tratamento com NDBP (Rmáx: 79,4±3,9; pD₂: 8,2±0,4**) podendo ser demonstrado no gráfico 5D por aumento da área abaixo da curva (174±18 vs. 313±23**, Δ134,5±16,8** vs. C57).

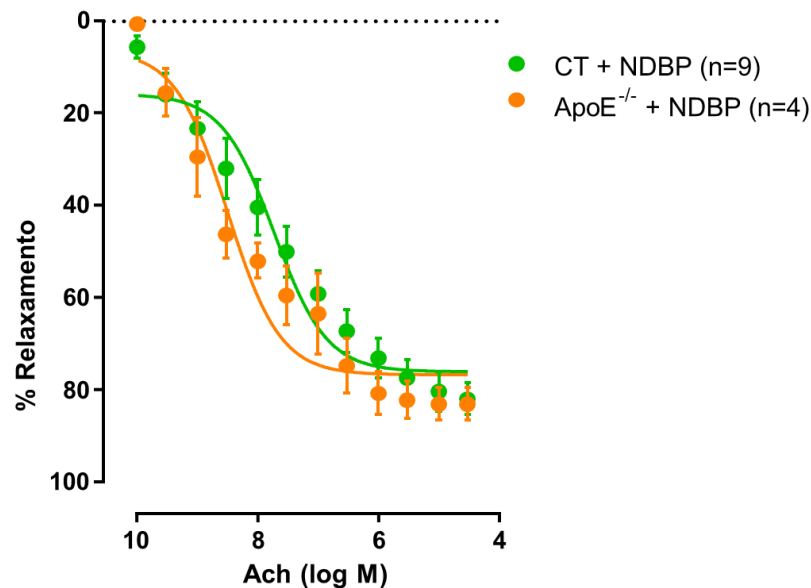
Gráfico 5: Representação gráfica das curvas dose-resposta à acetilcolina em animais controle e apoE^{-/-} com e sem tratamento com NDBP.



A: curva de relaxamento à ACh comparativa entre animais controle tratados e não tratados com NDBP. B: Representação gráfica entre as áreas abaixo da curva (dAUC). C: curva de relaxamento à ACh comparativa entre animais apoE^{-/-} tratados e não tratados com NDBP. D: Representação gráfica entre as áreas abaixo da curva. Valores expressos com média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$ vs.respectivo controle.

Após a incubação dos anéis com NDBP, o prejuízo na função endotelial foi revertido e o relaxamento vascular desses animais se equiparou ao dos animais controle (Gráfico 6).

Gráfico 6: Representação gráfica das curvas de relaxamento a ACh após tratamento com NDBP, comparação entre grupos.

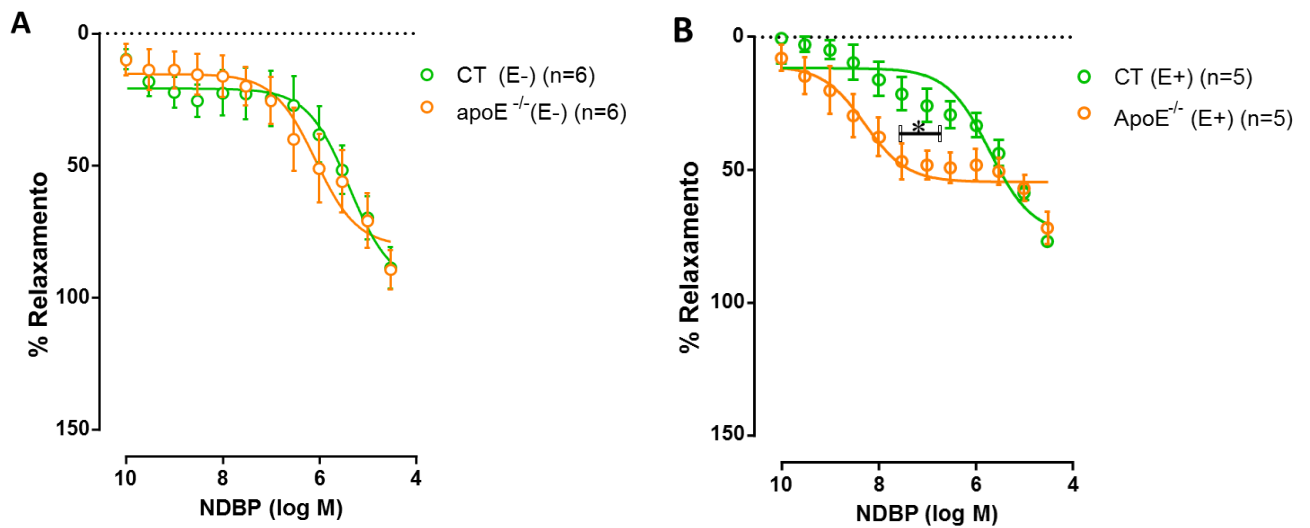


Curva de relaxamento à ACh comparativa entre grupos controle e apoE^{-/-} tratados com NDBP. Valores expressos com média $\pm$ EPM.

5.3.4 Atividade direta do NDBP sobre o tecido vascular

Para avaliar a atividade vasorrelaxante do NDBP foram realizadas curvas dose-resposta ao NDBP após pré-contracção com Fen em vasos com e sem endotélio. Como observado no gráfico 7A, o NDBP promoveu relaxamento na mesma proporção entre animais controle e apoE^{-/-} (Rmáx: 102 $\pm$ 9,6; pD₂: 5,6 $\pm$ 0,4 vs. Rmáx: 93 $\pm$ 4,1; pD₂: 5,8 $\pm$ 0,3 respectivamente) na ausência de endotélio. Na presença de endotélio (gráfico 7B) os animais apoE^{-/-} apresentaram um deslocamento significativo da curva para a esquerda em relação ao controle. Contudo, não houve diferença significativa nos valores de Rmáx e pD₂ (CT: 69 $\pm$ 6,7 e 7,3 $\pm$ 0,4 e apoE^{-/-} 76 $\pm$ 11,3 e 7,2 $\pm$ 0,9, respectivamente).

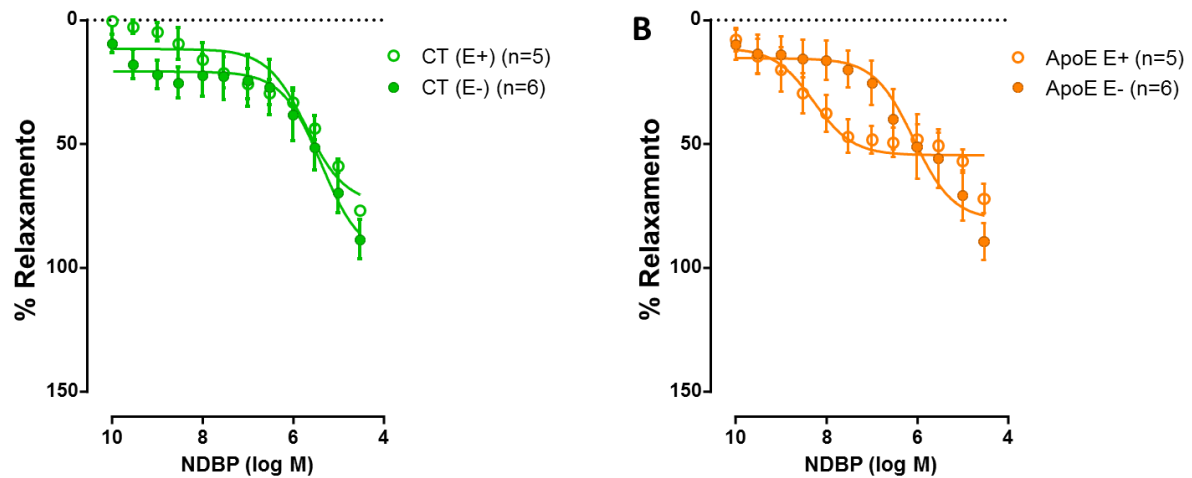
Gráfico 7: Representação gráfica das curvas de relaxamento ao NDBP comparativa entre grupos.



A: Curva de relaxamento ao NDBP comparativa entre animais controle e $\text{apoE}^{-/-}$ na ausência de endotélio. B: Curva de relaxamento ao NDBP comparativa entre animais $\text{apoE}^{-/-}$ e animais controle na presença de endotélio. Valores expressos com média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

A comparação das curvas dos animais pertencentes aos mesmos grupos, na presença ou ausência de endotélio, demonstra que para o grupo controle a presença de endotélio não é fundamental para o efeito vasodilatador do NDBP (as curvas praticamente se sobrepõem) (gráfico 8A). No grupo $\text{apoE}^{-/-}$, a curva na presença do endotélio é visivelmente deslocada para a esquerda, embora não haja diferença significativa na resposta máxima e sensibilidade (gráfico 8B).

Gráfico 8: Representação gráfica das curvas de relaxamento ao NDBP comparativa entre animais pertencentes ao mesmo grupo.

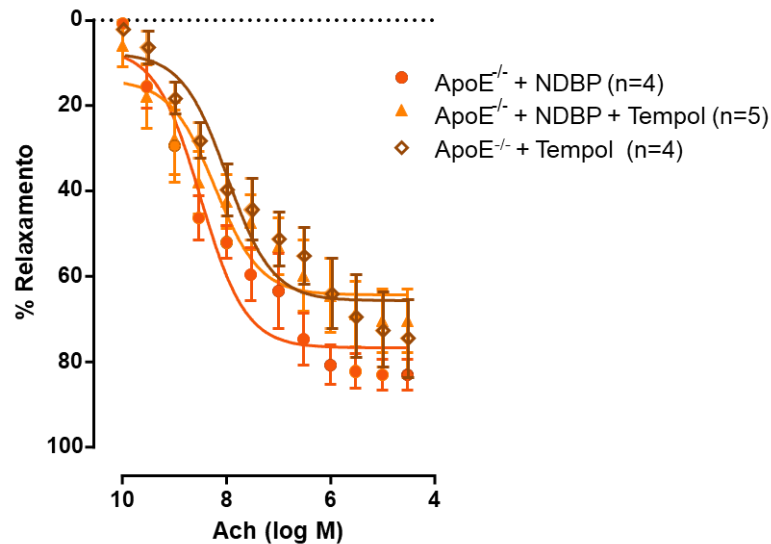


A: Curva de relaxamento ao NDBP comparativa entre animais controle na presença e ausência de endotélio. B: Curva de relaxamento ao NDBP comparativa entre animais apoE^{-/-} na presença e ausência de endotélio. Valores expressos com média $\pm$ EPM.

5.3.5 Ação do NDBP e atividade antioxidante

Tendo em vista que o NDBP reverteu o quadro de disfunção endotelial observado nos animais apoE^{-/-}, avaliamos se o uso concomitante de um antioxidante poderia potencializar os efeitos do NDBP. Para isso, os vasos foram incubados com NDBP apenas, com tempol apenas (uma substância antioxidante mimética da superóxido dismutase) ou com NDBP + tempol. Como pode ser observado no gráfico 9, os efeitos benéficos do NDBP sobre a função endotelial não foram potencializados pelo uso concomitante com tempol, tendo em vista que o relaxamento à ACh no grupo tratado *in vitro* apenas NDBP (Rmáx 79,4 $\pm$ 3,9; pD₂ 8,2 $\pm$ 0,4) não foi estatisticamente diferente que o grupo tratado com NDBP e tempol (Rmáx: 65,1 $\pm$ 7,3; pD₂: 8,3 $\pm$ 0,3). Tampouco houve diferença entre o grupo que recebeu apenas NDBP ou NDBP + tempol em relação ao grupo que recebeu apenas tempol (Rmáx: 67,4 $\pm$ 9,5; pD₂: 8,0 $\pm$ 0,3).

Gráfico 9: Representação gráfica das curvas de relaxamento a ACh em animais apoE^{-/-} tratados com NDBP em comparação a animais tratados com NDBP+tempol ou tempol apenas.

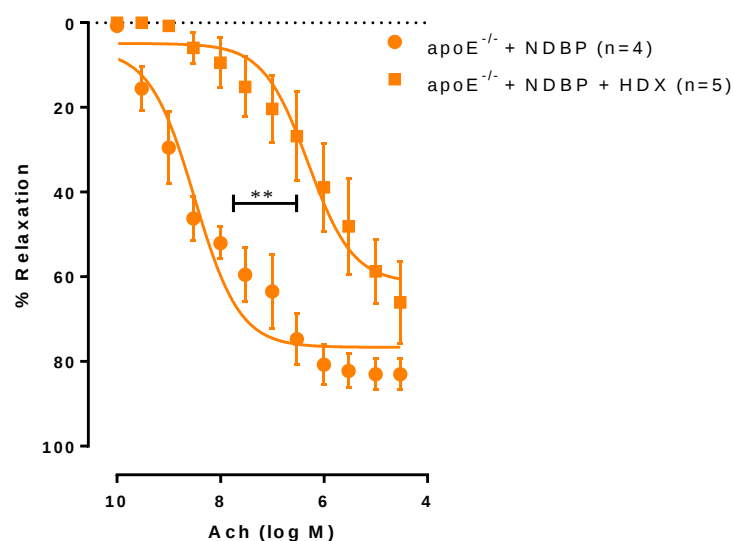


Valores expressos com média $\pm$ EPM.

5.3.6 Participação do NO no efeito induzido pelo NDBP

Para avaliar se o efeito benéfico sobre a função endotelial do NDBP estava relacionado à liberação de NO, os anéis aórticos foram incubados com HDX um sequestrador de NO. Como pode ser observado no gráfico 10, o relaxamento à ACh dos anéis incubados com NDBP e HDX (Rmáx: 59,9 $\pm$ 7,1*; pD₂: 6,6 $\pm$ 0,3*) foi menor que aqueles que receberam apenas NDBP (Rmáx: 79,4 $\pm$ 3,9; pD₂: 8,2 $\pm$ 0,4).

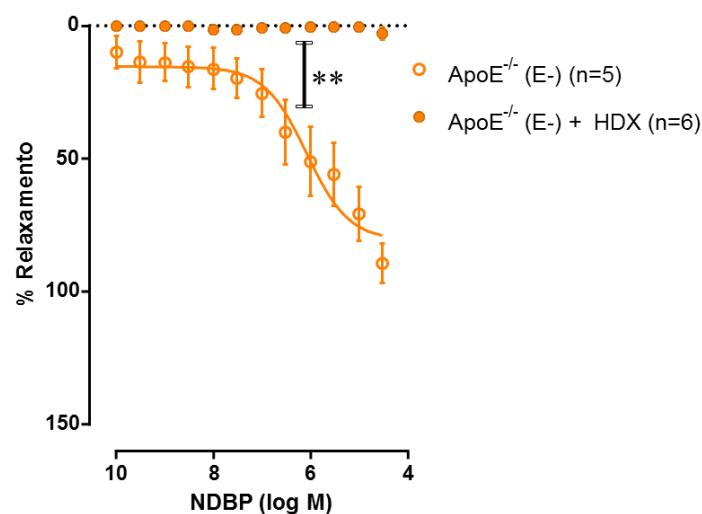
Gráfico 10: Representação gráfica da participação do NO no efeito do NDBP.



Valores expressos com média $\pm$ EPM. p<0,01.

Além disso, a construção de curvas de relaxamento ao NDBP em anéis sem endotélio incubados com HDX aboliu completamente o relaxamento induzido pelo nitrato, como observado no gráfico 11 através dos valores de $R_{\text{máx}}$ e pD_2 ($\text{apoE}^{-/-}$: $93 \pm 4,1$ e $5,8 \pm 0,3$ vs. $\text{apoE}^{-/-} + \text{HDX}$: $0,5 \pm 0,6^{**}$ e $6,8 \pm 0,9$ respectivamente) confirmando seu papel como doador de NO.

Gráfico 11: Curva de relaxamento ao NDBP em animais $\text{apoE}^{-/-}$ na ausência de endotélio com ou sem HDX.

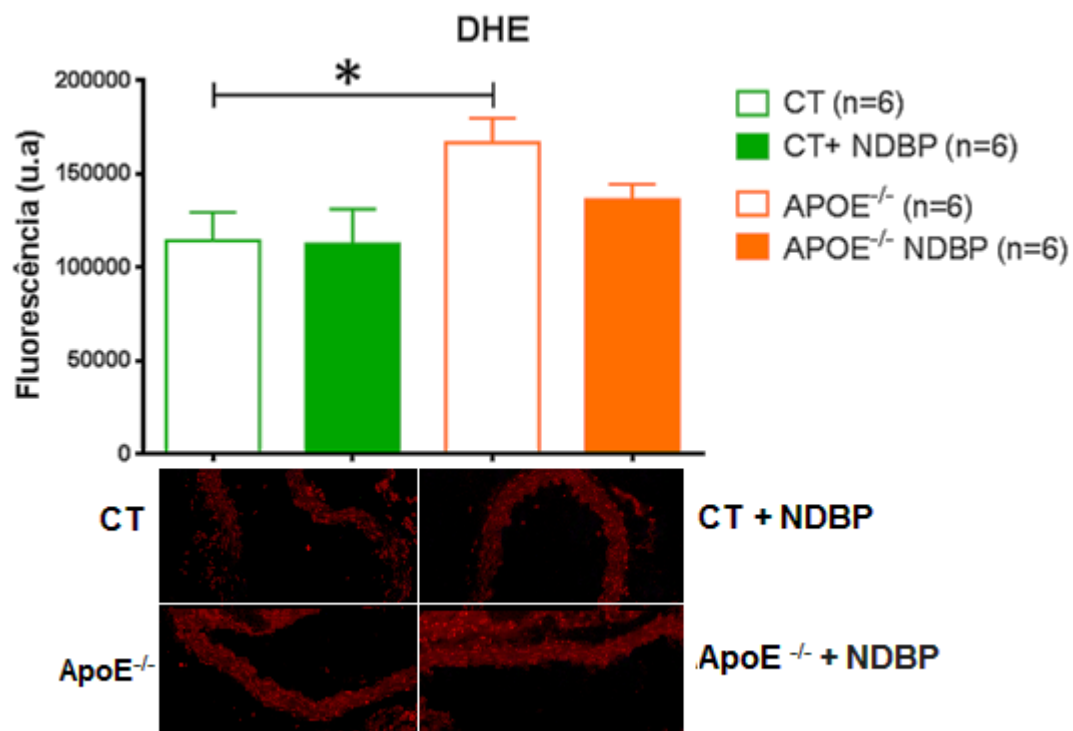


Valores expressos com média $\pm$ EPM. $^{**}p < 0,01$.

5.4 Produção de espécies reativas de oxigênio

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) vascular foi avaliada através da marcação com o corante fluorescente dihidroetídio (DHE) em cortes histológicos não fixados. Como observado na figura 18 os animais $\text{apoE}^{-/-}$ apresentaram aumento na produção de espécies reativas de oxigênio ($166649 \pm 13022^{*}$) comparado aos animais controle (114036 ± 15280). Não foi observada diferença entre os grupos após o tratamento com NDBP (CT 112514 ± 18519 vs. $\text{apoE}^{-/-}$ 136043 ± 8281).

Figura 18: Marcação com DHE.

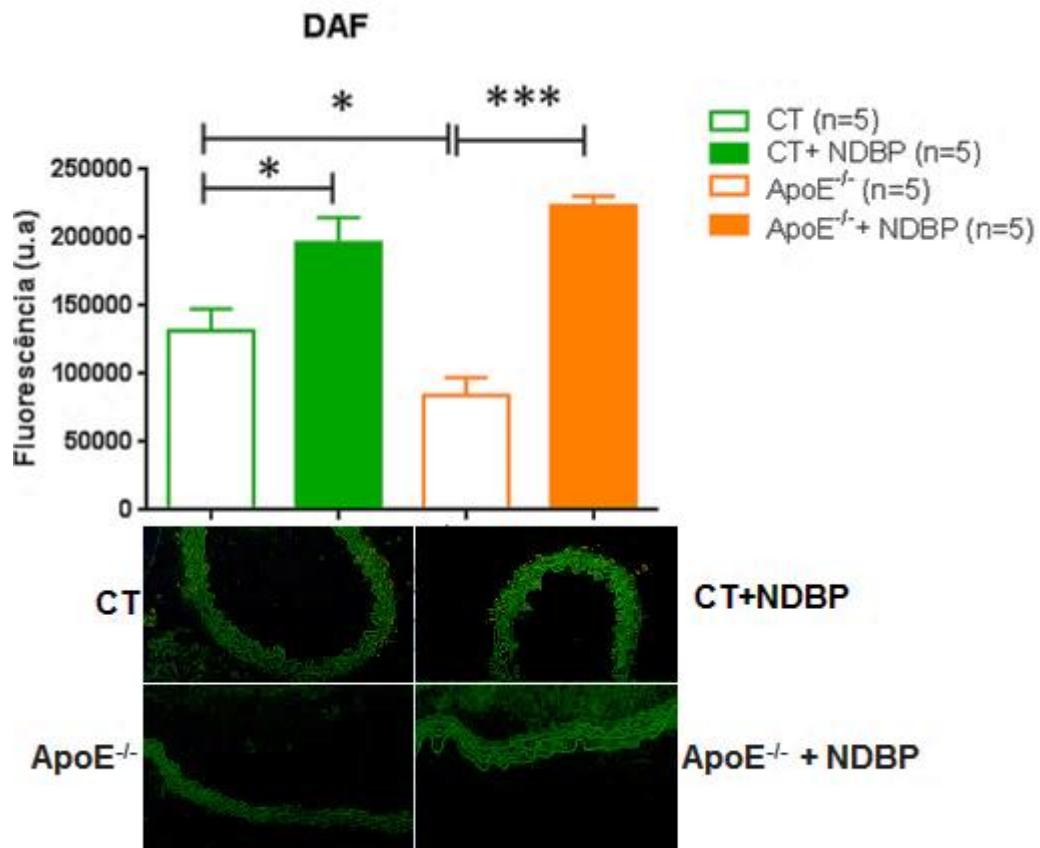


Representação gráfica da marcação com DHE de aorta de animais controle e apoE^{-/-} sem tratamento e tratados com NDBP. Imagem de cortes histológicos transversais de aorta de animais de respectivos grupos. *p<0,05 CT vs. apoE^{-/-}.

5.5 Produção de NO pelo endotélio vascular

A produção de NO vascular foi avaliada através da marcação com o corante diacetato de 4,5- diaminofluoresceína (DAF-2DA) em cortes histológicos não fixados. A fluorescência produzida foi considerada proporcional ao NO formado. Como pode ser observado na figura 19, os animais apoE^{-/-} apresentaram diminuição na produção de NO (84057±13397) comparado aos animais controle (131855±15774*). Após o tratamento com NDBP os níveis de NO aumentaram em ambos os grupos (CT 196357±18312 vs. apoE^{-/-} 223507±6996).

Figura 19: Marcação com DAF.

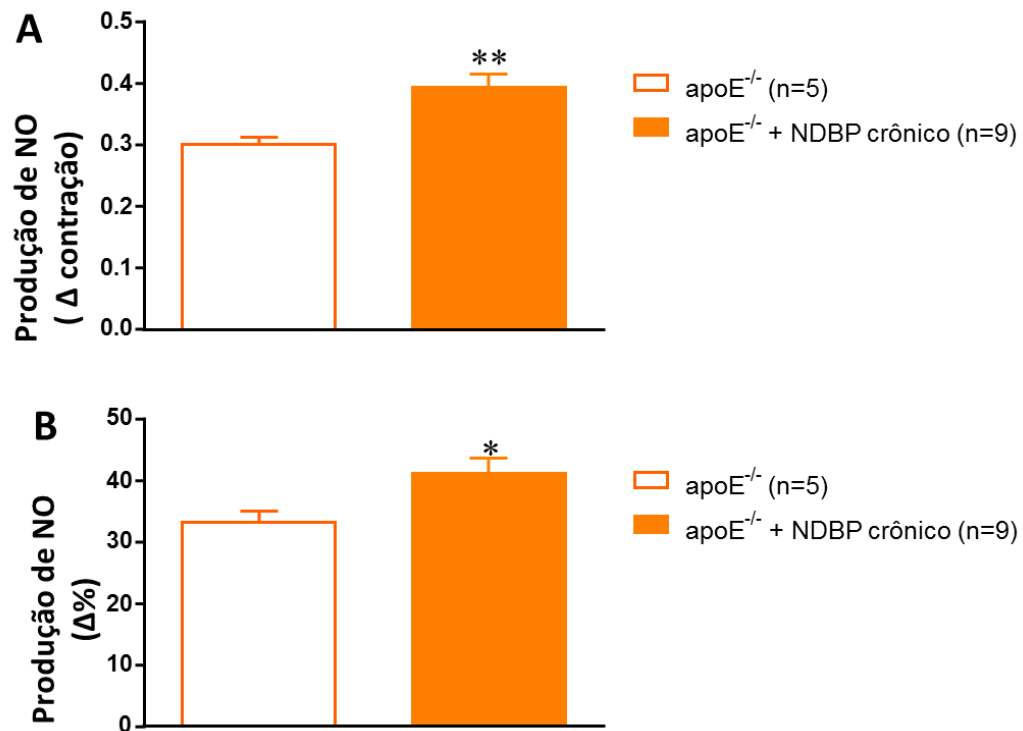


Representação gráfica da marcação com DAF-2DA em animais controle e apoE^{-/-} sem tratamento e tratados com NDBP. As imagens mostram cortes histológicos marcados com DAF-2DA de animais de respectivos grupos. *p<0,05 CT vs. apoE^{-/-}, *p<0,05 CT vs. CT tratado com NDBP e ***p<0,001 apoE^{-/-} vs. apoE^{-/-} tratado com NDBP.

5.6 Tratamento crônico com NDBP influencia a produção de NO pelo endotélio

No intuito de avaliar a influência do tratamento crônico com NDBP sobre a produção de NO pelo endotélio, um grupo de animais apoE^{-/-} recebeu tratamento com NDBP por um período de 14 dias, ao final do tratamento o NO basal foi mensurado após bloqueio com L-NAME. Como observado no gráfico 12, os animais que receberam tratamento obtiveram maior produção de NO (Δ : $0,39 \pm 0,2^{**}$ e $\Delta\%$: $41,3 \pm 2,5^*$) quando comparado aos animais sem tratamento (Δ : $0,30 \pm 0,01$ e $\Delta\%$: $33,2 \pm 1,9$) confirmando que o NDBP tem influência sobre o endotélio.

Gráfico 12: Produção basal de NO após tratamento crônico.

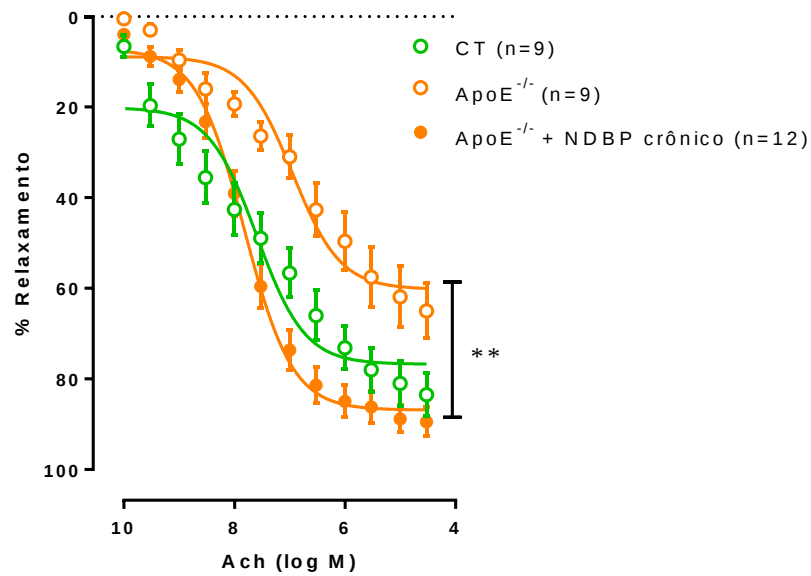


Valores expressos com média $\pm$ EPM. **p<0,01 vs. apoE^{-/-} e *p<0,01 vs. apoE^{-/-}

5.7 Tratamento crônico com NDBP reverte a disfunção endotelial

Ao final dos 14 dias de tratamento com NDBP a função endotelial foi avaliada com base na realização da curva de relaxamento à ACh após indução de contração com FEN. O quadro de disfunção endotelial observada nos animais apoE^{-/-}, demonstrada por prejuízo no relaxamento a ACh (Rmáx: 62,7 $\pm$ 5,5; pD₂: 6,7 $\pm$ 0,2**) foi revertida nos animais que receberam tratamento crônico com NDBP (Rmáx: 87,4 $\pm$ 3,1[#]; pD₂: 7,8 $\pm$ 0,1^{##}) equiparando aos níveis dos animais controle (Rmáx: 76,7 $\pm$ 5,4; pD₂: 7,9 $\pm$ 0,3). Esses resultados corroboram com os observados no tratamento agudo.

Gráfico 13: Avaliação da função vascular comparativa entre grupos sem tratamento e tratado cronicamente com NDBP.



Valores expressos com média $\pm$ EPM . ** $p < 0,01$ vs. C57, # $p < 0,05$ vs. apoE e ## $p < 0,01$ vs. apoE

DISCUSSÃO

6.0 DISCUSSÃO

Nossos principais resultados demonstraram que o NDBP é capaz de reverter o quadro de disfunção endotelial aumentar os níveis de NO vascular e reduzir o estresse oxidativo observado nos animais apoE^{-/-}.

Em nosso estudo foram utilizados camundongos apoE^{-/-} com o intuito de avaliar os efeitos do NDBP como forma de tratamento na aterosclerose experimental. Tendo em vista que a formação de placa ocorre de forma espontânea e os eventos sequenciais envolvidos na formação das lesões nesses animais são semelhantes àsquelas observadas em humanos, esse modelo foi considerado ideal para nossa pesquisa (NAKASHIMA, et al 1994). A linhagem C57BL/6 também desenvolve aterosclerose quando suplementado com dieta rica em colesterol e contendo ácido cólico, porém, os eventos sequenciais envolvidos na aterogênese são diferentes aos observados em humanos (PAIGEN, et al., 1985). Desta forma, apenas animais apoE^{-/-} receberam dieta aterogênica, com o intuito de acelerar o desenvolvimento de disfunção endotelial e placa aterosclerótica.

Nossos resultados demonstraram um aumento nos níveis de colesterol em aproximadamente 12 vezes na linhagem apoE^{-/-} comparado ao controle. São resultados esperados, tendo em vista que esses animais receberam dieta aterogênica e que eles não expressam apolipoproteína E que tem como principal função reduzir o colesterol circulante. Nossos resultados corroboram com o demonstrado em outros estudos, onde a dieta aterogênica foi suplementada em animais apoE^{-/-} (BALARINI, 2013; BATISTA, 2015; EVOLA, et al., 2016; MIRANDA, 2013; LIU, et al. 2018).

A aterosclerose se desenvolve de forma espontânea nesses animais, com a utilização de dieta comercial, células espumosas podem ser observadas na vasculatura com aproximadamente 10 semanas de idade, células espumosas e células musculares lisas podem ser vistas a partir de 15 semanas de idade e placas fibrosas aparecem a partir de 20 semanas de idade (BALARINI, 2013; MEIR & LEITERSDORF, 2004; PORTO, 2011). Em nossas análises histológicas realizadas em cortes de aorta longitudinais corados com *Oil-Red*, pôde-se observar que os animais apoE^{-/-}, após 12 semanas alimentados com dieta aterogênica, apresentaram uma obstrução de cerca de 57% do lúmen vascular, enquanto os animais controle não apresentaram formação de placa.

A disfunção endotelial é uma resposta multifatorial complexa, podendo ser caracterizada por comprometimento da vasodilatação em resposta a ACh (BAR, et al., 2019). Crauwels e colaboradores no ano de 2003 observaram que animais expostos a hipercolesterolemia prolongada, em segmentos livres de placa, não demonstraram alterações na resposta de relaxamento, sugerindo que a disfunção endotelial observada nos animais apoE^{-/-} se desenvolve em segmentos ateroscleróticos, estando fortemente correlacionada com o tamanho da lesão. Observaram também que a inibição da eNOS aboliu completamente a resposta de relaxamento, indicando que um defeito na via mediada pelo NO é responsável pela disfunção endotelial em camundongos apoE^{-/-} (CRAUWELS, et al., 2003). Estudos mostram que anéis isolados de camundongos apoE^{-/-} jovens (16-18 semanas de idade) e alimentados com dieta padrão, exibem uma resposta de relaxamento a ACh preservada quando comparada com aos animais controle (BONTHU, et al., 1997; FRANSEN, et al., 2008; WANG, et al., 2000). Os mesmos resultados foram observados em animais adultos (20-35 semanas de idade) (ILLENEUVE, et al., 2003). Apenas em animais idosos (50-70 semanas de idade) foi demonstrado marcante disfunção endotelial, hipercolesterolemia e aterosclerose estabelecida (CRAUWELS, et al., 2003; WANG, et al., 2000). A utilização da dieta aterogênica, como citado anteriormente, acelera o processo de formação de placas e consequentemente, acelera a disfunção endotelial.

Em concordância com o relatado na literatura (BALARINI, 2013; CRAUWELS, et al., 2003; FRANSEN, et al., 2008), nossos animais apoE^{-/-} suplementados com dieta aterogênica, apresentaram marcante disfunção endotelial, com prejuízo no relaxamento vascular a ACh.

Um fator essencial que contribui para a disfunção endotelial é o estresse oxidativo, que pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de EROs endógenos e a presença de enzimas antioxidantes. O estado hiperlipidêmico está associado com propriedades físicas alteradas das membranas celulares, o que pode facilitar o escape de radicais livres a partir da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou a ativação da NADPH-oxidase. A NADPH oxidase é um dos mais importantes sistemas de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) no sistema cardiovascular, em geral, o aceptor de elétrons é o oxigênio e o produto da reação de transferência de elétrons é o ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) (LOMNITSKI, et al., 1999; ZANARDO, 2016). O NO é rapidamente inativado pela ação oxidativa do $\bullet\text{O}_2^-$.

formando peroxinitrito (ONOO^-) diminuindo sua biodisponibilidade e consequentemente comprometendo a função vascular (CHEN, et al., 2010).

Porém a NADPH-oxidase não é a única fonte de produção de EROS. Para desempenhar sua atividade, a NOS necessita estar em forma de dímero, porém, na ausência de algum dos substratos ou cofatores ocorre seu desacoplamento e ao invés de produzir NO ocorre a formação de ânion superóxido $\bullet\text{O}_2^-$ (DIAS et al., 2011; FÖRSTERMANN U & SESSA, 2012; STUCHR et al., 2001).

Estudos mostram que em camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ jovens, antes da formação da placa e com relaxamento mediado pela ACh preservado, a biodisponibilidade do NO já parece estar diminuída, sendo uma das primeiras alterações detectáveis (PRENDERGAST, et al. 2014; YAGHOUBI, et al. 2000).

Desta forma, o estresse oxidativo e diminuição da biodisponibilidade de NO, são considerados um dos principais mecanismos envolvidos no processo de disfunção endotelial (BALARINI, 2013).

Levando isso em consideração, avaliamos a produção basal de NO de forma indireta utilizando o inibidor não seletivo da NOS, o L-NAME. O endotélio é responsável pela manutenção do tônus vascular através da produção de compostos vasoativos, o bloqueio da NOS cessa a produção de NO produzida pelo vaso, aumentando a resposta contrátil. Após uma pré-contração com Fen e formação de um platô, o L-NAME foi adicionando, cessando a produção de NO vascular, aumentando resposta de contração a Fen. Um delta de contração foi calculado, podendo ser inferido quanto de NO estava sendo produzido para modular a contração. Constatamos que os animais $\text{apoE}^{-/-}$ apresentaram diminuição na produção de NO comparado ao controle, o mesmo observado por Balarini (BALARINI, 2013). A avaliação da produção de NO de forma direta foi realizada em cortes histológicos, por técnica de fluorescência através da utilização do DAF, que na presença de NO emite uma fluorescência de cor verde. Assim como no método indireto, a análise da fluorescência também demonstrou diminuição na produção de NO. Esses resultados também refletem no aumento da resposta de contração a fenilefrina observada no gráfico 3, visto que os animais $\text{apoE}^{-/-}$ produzem menos NO para modular a resposta contrátil.

O estresse oxidativo também foi avaliado através de marcação com DHE. que ao ser oxidado por ânions superóxido forma um produto intermediário, que se intercala com os ácidos nucleicos e emite uma fluorescência de cor vermelha.

Nossos resultados revelaram um aumento na intensidade de fluorescência nos animais apoE^{-/-}, indicando aumento na produção de EROs.

Com base nos resultados obtidos, observamos que os animais apoE^{-/-} apresentaram marcante disfunção endotelial, diminuição na produção NO e aumento do estresse oxidativo. Com base nisso, utilizamos o NDBP como forma de tratamento *in vitro* e avaliamos seus efeitos e mecanismo de ação sobre esses parâmetros.

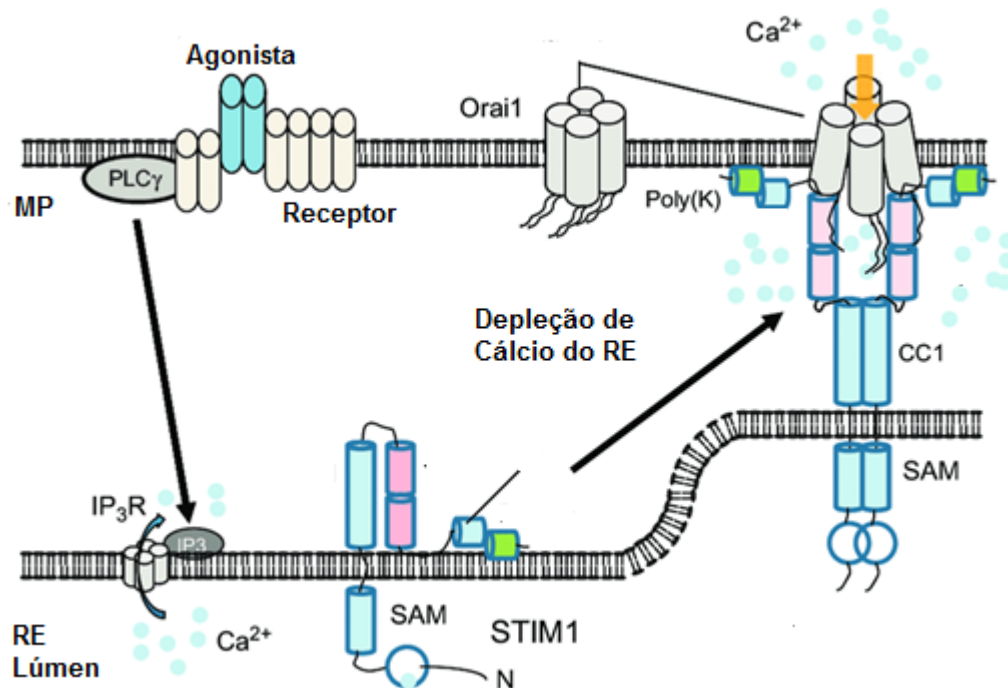
Na atualidade, os doadores de NO tem sido grande foco de pesquisas, visto que são capazes de liberar essa molécula em diversas partes do organismo (SERAFIM, et al., 2012).

França-Silva (2010) observou através de suas análises *in vitro* que o NDBP exerceu efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos tanto na presença como na ausência de endotélio, sugerindo que o efeito do composto é provavelmente devido à ação direta do NO sobre o músculo liso vascular. O mesmo foi observado em nossas análises onde o NDBP promoveu relaxamento de forma igual entre os grupos apoE^{-/-} e controle na ausência de endotélio, demonstrando que a sensibilidade da musculatura lisa ao NO se mantém preservada. Porém ao comparar os dois grupos, a pD₂ nos animais apoE^{-/-} foi maior do que nos animais controle, indicando que esses animais são mais sensíveis ao NDBP na presença de endotélio. Bonaventura e colaboradores demonstraram em seus estudos que o nitroprussiato de sódio (NPS) em aorta de ratos, apresenta efeito relaxante potencializado na presença de endotélio por ativação da NOS constitutiva, através do aumento de Ca²⁺ intracelular nas células endoteliais (BONAVENTURA, et al. 2008).

Já foi demonstrado que os animais apoE^{-/-} apresentam uma redução da via SOCE (*store-operated Ca²⁺ entry*) uma via de entrada de Ca²⁺ regulada por receptor que é ativada em resposta à depleção de Ca²⁺ (**Figura 20**) (PRENDERGAST, et al. 2014). Lin e colaboradores observaram em seus estudos que a eNOS é melhor ativada pelo Ca²⁺ que entra na célula via SOCE do que o Ca²⁺ liberado pelo retículo (LIN, et al., 2000). Prendergast et al. (2014) demonstraram então que a SOCE reduzida nos camundongos apoE^{-/-} poderia resultar em ativação menos eficiente da eNOS e, assim, explicar a resposta de relaxamento reduzida observada por eles. Desta forma, supomos que o NDBP poderia ter melhorado a via SOCE, ativando a NOS, tendo seu efeito potencializado,

podendo explicar o aumento na sensibilidade ao composto, assim como o ocorrido com o NPS. Porém os animais controle não apresentaram a mesma resposta, talvez por já possuírem um endotélio funcional, o NDBP não exerceu efeito nesses animais.

Figura 20: Sinalização de cálcio via SOCE.



Fonte: SRIKANTH & GWACK, 2013, editada pelo autor.

Em condições de repouso Orai1 e estromal-1 (STIM-1 *Stromal Interaction Molecule 1*) estão distribuídos nas membranas da membrana plasmática e retículo endoplasmático. A ligação do agonista ao seu receptor ativa a fosfolipase C que cliva Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) em inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol. O IP₃ se difunde pelo citoplasma e se acopla à canais de cálcio ligante-dependentes no retículo endoplasmático, liberando Ca²⁺. A depleção de Ca²⁺ é “percebida” pela molécula de interação STIM1, que se oligomeriza e se transloca às junções adjacentes à membrana plasmática para interagir com canais Orai1 (Unidades formadoras dos poros na membrana plasmática nesta via) abrindo estes canais permitindo a entrada de Ca²⁺ via SOCE.

Com o intuito de avaliar o efeito do NDBP sobre a função vascular, os anéis aórticos foram incubados com o composto e em seguida foi realizada curva dose-resposta a ACh. O NDBP foi capaz de reverter o prejuízo na resposta de relaxamento a ACh nos animais apoE^{-/-} equiparando ao relaxamento dos animais controle. A literatura demonstra que o mesmo efeito foi observado pela ação de outros nitratos orgânicos (HACKER, et al., 2001; MÜLLER, et al., 2004).

Os nitratos orgânicos possuem potentes efeitos vasodilatadores quando administrados de forma aguda, porém os efeitos hemodinâmicos e anti-isquêmicos desses compostos são rapidamente perdidos com a administração a longo prazo, devido ao rápido desenvolvimento de tolerância e disfunção endotelial, que na maioria dos casos está relacionada ao aumento do estresse oxidativo intracelular (DAIBER & MÜNZEL, 2015).

A fim de investigar se o tratamento crônico com NDBP seria capaz de induzir o mesmo efeito observado no tratamento agudo, os animais apoE^{-/-} foram tratados por 14 dias com o composto via intraperitoneal. Ao final do tratamento realizamos os testes de função vascular, onde observamos que a disfunção endotelial nesses animais foi revertida, sendo demonstrada por melhora na resposta de relaxamento a ACh. O mesmo foi observado por Paulo e colaboradores (2018) onde utilizaram um nitrato orgânico também sintetizado a partir da glicerina, o 1,3-bis (hexiloxi) propano-2-ila (NDHP), para tratamento crônico em modelo experimental de hipertensão. O tratamento com NDHP atenuou a hipertensão e disfunção endotelial no modelo (PAULO, et al., 2018). Também realizamos tratamento agudo in vitro com nitroglicerina em anéis aórticos de animais apoE^{-/-}, onde observamos melhora no relaxamento a ACh. Sendo assim, o efeito benéfico do NDBP na melhora da função vascular, não é exclusivo desse doador de NO.

Considerando que os nitratos orgânicos são conhecidos por sua atividade de doar NO, buscamos confirmar a participação do NO na resposta induzida pelo NDBP através da utilização da hidroxycobalamina (HDX), um sequestrador de NO. A HDX em sua estrutura apresenta a cabalamina oxidada [Cb (III)] que sequestra o NO do meio extracelular, formando um complexo [Cb (III)-NO] (KRUSZYNA, 1998). Foi realizada uma pré-incubação com NDBP e HDX nos anéis aórticos dos animais apoE^{-/-} por um período de 20 minutos. Visando que o HDX estaria sequestrando todo NO liberado pelo NDBP, se a ação do composto na melhora da função vascular fosse por outro mecanismo independente de NO, a resposta não seria alterada. Porém a HDX atenuou a resposta de relaxamento a ACh, sugerindo que o mecanismo de ação pelo qual o NDBP é capaz de reverter a disfunção endotelial nesse modelo, é dependente de NO.

A quantificação de NO também foi avaliada após tratamento com NDBP, através da utilização do DAF. Observamos aumento significativo da fluorescência tanto nos animais apoE^{-/-} como nos animais controle, demonstrando aumento nas

concentrações de NO na vasculatura, reforçando nossa hipótese que os efeitos induzidos pelo NDBP ocorrem por meio da liberação de NO. Concordando com os achados de França-Silva que também observou que a cinética de liberação de NO pelo NDBP é semelhante a apresentada pela nitroglicerina (NTG) (FRANÇA-SILVA, 2012).

A via clássica de relaxamento NO/GMPc/PKG está implicada no mecanismo de ação dos nitratos orgânicos. O NO ativa a enzima guanilato-ciclase solúvel (GCs) por ligação do NO ao ferro do grupamento heme. Essa ligação induz uma alteração conformacional da enzima, estimulando a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc). O aumento de GMPc ativa uma quinase específica chamada PKG (proteína quinase dependente de cGMP). A PKG atua fosforilando sítios alvo promovendo vasodilatação da musculatura do vaso através da diminuição do cálcio (Ca^{+}) intracelular e inativação da maquinaria contrátil (MONCADA & HIGGS, 2006; PEREIRA et al 2011; POTOKA et al., 2018).

Como citado anteriormente um fator essencial que contribui diminuição da biodisponibilidade de NO é o estresse oxidativo, caracterizado por desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes. Os animais apoE^{-/-} apresentaram incremento na produção de espécies reativas de oxigênio, o mesmo demonstrado por Balarini (2013).

Com o propósito de avaliar o mecanismo envolvido na ação do NDBP na melhora da função vascular nos animais apoE^{-/-}, utilizamos o tempol, um mimético da SOD, e avaliamos se esse efeito estava relacionado com atividade antioxidante. O tempol não alterou a resposta de relaxamento, sugerindo que a melhora na função vascular exercida pelo NDBP depende, entre outros, de seu efeito antioxidante. Para avaliar a produção de EROs de forma direta, utilizamos a sonda DHE com ou sem incubação prévia com NDBP. Observamos diminuição de EROs nos animais apoE^{-/-} incubados com NDBP, confirmando os resultados anteriores com tempol que o NDBP possui atividade antioxidante. Nossos resultados corroboram com os observados por Porpino e colaboradores onde observaram em seus experimentos que o tratamento crônico com NDBP foi capaz de reduzir o estresse oxidativo em rins, fígado e coração em modelos de hipertensão renal, via redução na produção de ânion superóxido através da modulação da NADPH oxidase (PORPINO, et al., 2016).

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, propomos que o NDBP é um potencial agente terapêutico no tratamento da aterosclerose. Mesmo na ausência de alterações no perfil lipídico, apresentou efeitos vasculares benéficos como melhora da disfunção endotelial através do aumento da biodisponibilidade de NO e efeito antioxidante.

CONCLUSÃO

7.0 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, o NDBP demonstrou efeitos benéficos frente à aterosclerose experimental. Os tratamentos *in vitro* e crônico foram capazes de reverter o quadro de disfunção endotelial observada nesse modelo de estudo. Os mecanismos envolvidos na ação do composto envolvem efeito direto da doação de NO, aumentando sua biodisponibilidade, como também efeitos no endotélio, melhorando a função vascular. Também foi observado que o NDBP possui atividade antioxidante.

Em conjunto, esses resultados sugerem que o NDBP é um promissor agente terapêutico no tratamento da aterosclerose, com importantes efeitos cardioprotetores.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- AIRES, M.M. **Fisiologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- ALUSTAU, M.C. **Envolvimento da via óxido nítrico na resposta vasodilatadora induzida pelo nitrato tetra-hidrofurfurílico (NTHF) em artéria mesentérica superior de rato**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba. 2010. Dissertação de mestrado.
- ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 1977;74:3203–7.
- ATAOKA, H.; KUME, N.; MIYAMOTO, S., et al. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**. 2001; 21(6): 955 -960.
- BADIMON, L.; VILAHUR, L. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. **Journal of internal medicine**. 2014; 276(6):618-32.
- BALARINI, C.M. **Avaliação dos efeitos vasculares do sildenafil na aterosclerose experimental**. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo. 2013. Tese de doutorado.
- BAR, A.; TARGOSZ-KORECKA, M.; SURAJ, J., et al. Degradation of glycocalyx and multiple manifestations of endothelial dysfunction coincide in the early phase of endothelial dysfunction before atherosclerotic plaque development in apolipoprotein e/low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Journal of the American Heart Association**. 2019; 19: 8(6): e011171.
- BARRETO, R.L.; CORREIA, C; ROQUE D; MUSCARA, M. N.. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química nova**. 2005 . 28(6): 1046-1054.
- BARTON, M.; HAUDENSCHILD, C,C.; D'USCIO, L.V. et al. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 1998; 95 (24): 14367-72.
- BATISTA, A. T. **Efeito do tratamento com sildenafil sobre as células de baço de camundongos ApoE^{-/-}**. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo. 2015. Dissertação de mestrado.
- BEAGLEHOLE, R.; BONITA, R. Global public health: a scorecard. **The Lancet**. 2008. 372(9654), 1988–1996.
- BERANOVA, P.; CHALUPSKY, K.; KLESCHYOV, A.L., et al. N-ômega-hidroxy-l-arginine homologues and hydroxylamine as nitric oxide-dependent vasorelaxant agents. **EJP**, v. 516, p.260-267. 2005.

BLANKENBERG, S.; BARBAUX, S.; TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 2003; 170(2):191-203.

BONAVENTURA, D; LUNARDI, C.N. et al. A novel mechanism of vascular relaxation induce by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. Nitric oxide : biology and chemistry. **Nitric oxide : biology and chemistry**. 2008; 18 (4): 287-95.

BONTHU, S.; HEISTAD, D.D., et al. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**. 1997;17(11):2333–2340.

BRUNTON, T.L. The action of nitrate of amyl on the circulation. **Journal of anatomy and physiology**. 1870; 5(Pt1): 92-101.

CAHILL, P.A.; REDMOND, E.M. Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**. 2016; 248: 97 - 109

CAI, J-J.; WEN, J.; JIANG, W.H., et al. Androgen actions on endothelium functions and cardiovascular diseases. **Journal of Geriatric Cardiology**. 2016;13(2):183-196.

CARLUCCHI, E.M.S., et al. Obesidade e sedentarismo: fatores de risco para doença cardiovascular. **Comunicação em ciências da saúde**. 2013; 24(4):375-384,.

CHEN, X.; ZHANG, H.; MCAFEE, S.; ZHANG, C. The reciprocal relationship between adiponectin and LOX-1 in the regulation of endothelial dysfunction in ApoE knockout mice. American journal of physiology. **Heart and circulatory physiology**. 2010; 299(3):H605–H612.

CRAUWELS, H.M. et al. Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI . **Cardiovascular Research**. 2003; 59(1): 189–199.

CSONT, T.; FERDINANDY, P. Cardioprotective effects of glyceryl trinitrate: beyond. vascular nitrate tolerance. **Pharmacology & Therapeutics**. 2005; 105: 57–68.

DATASUS, **Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde**. Disponível em: DATASUS, Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. Disponível em <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php> Acesso 10/09/2018.

DAIBER, A.; MÜNZEL, T. Organic Nitrate Therapy, Nitrate Tolerance, and Nitrate-Induced Endothelial Dysfunction: Emphasis on Redox Biology and Oxidative Stress. **Antioxidants & redox signaling**. 2015;23(11):899–942.

DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**. 2004;109(23 Suppl 1):III27-32.

DESHPANDE, S.R.; SATYANARAYANA, K.; RAO, M.N.; PAI, K.V. Nitric oxide modulators: an emerging class of medicinal agents. **Indian journal of pharmaceutical sciences**. 2012;74(6):487-97.

DIAS, F.A.L. **Papel da enzima óxido nítrico sintase induzível no desenvolvimento da hipertrofia e disfunção cardíaca**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2007. Tese de doutorado.

DIAS, R.G.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, M. Nitric Oxide and the Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. 2011; 96 (1): 68-75.

DROBNIK, J. et al. Response of aorta connective tissue matrix to injury caused by vassopressin-induced hypertension or hypercholesterolemia. **Journal of physiology and pharmacology**. 2000; 51(3): 521–533.

DUNN, S.M.; DAS, K.C. Decreased EDHF-mediated relaxation is a major mechanism in endothelial dysfunction in resistance arteries in aged mice on prolonged high-fat sucrose diet. **Physiological Reports**. 2017;5(23):e13502.

EVOLA, M.; HALL, A.; WALL, T. et al. Oxidative stress impairs learning and memory in apoE knockout mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**. 2010; 96(2): 181-6.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. EDHF: an update. **Clinical Science**. 2009; 117(4), 139–155.

FEELISCH, M. the use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 358, p. 113-122, 1998.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**. 2012;33(7):829-837

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZK, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of the arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. 1980; 228:373-376.

FRANÇA-SILVA, M.S. **Avaliação dos efeitos induzidos pelo 2-Nitrato-1, 3-Dibutoxiopropano (NDBP) sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos - abordagens in vivo e in vitro**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2010. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)

FRANÇA-SILVA, M.S; LUCIANO, M.N; RIBEIRO, T.P; SILVA, J.S., et al. The 2-nitrate-1,3-dibutoxypropan, a new nitric oxide donor, induces vasorelaxation in mesenteric arteries of the rat. **European Journal of Pharmacology**. 2012. 5;690(1-3):170-5.

FRANSEN, P., VAN ASSCHE T., et al. Endothelial function in aorta segments of apolipoprotein E-deficient mice before development of atherosclerotic lesions. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**. 2008; 455(5):811–8.

GERTHOFFER, W.T. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. **Circulation Research**. 2007; 100: 607–621.

GIMBRONE, M.A.; GARCÍA-CARDEÑA, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. **Circulation research**. 2016;118(4):620-36.

GISTERÅ, A.; HANSSON, G.K. The immunology of atherosclerosis. **Nature Reviews Nephrology**. 2017; 13(6): 368–380.

HACKER, A.; MÜLLER, S.; MEYER, W.; KOJDA, G. The nitric oxide donor pentaerythritol tetranitrate can preserve endothelial function in established atherosclerosis. **British journal of pharmacology**. 2001; 132(8): 1707–1714.

HADI, H.A.; CARR, C.S.; AL SUWAIDI, J. Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome. **Vascular Health and Risk Management**. 2005;1(3):183-198.

HANSSON, G.K. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 2009; 7(1):328-31.

HUANG, Y.; MAHLEY, R.W. Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's Diseases. **Neurobiology of disease**. 2014; 72:3-12.

IACHINI BELLISARII, F.; RADICO, F.; MUSCENTE, F., et al. Nitrates and Other Nitric Oxide Donors in Cardiology - Current Positioning and Perspectives. **Cardiovascular Drugs and Therapy**. 2011; 26(1), 55–69.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M., et al. 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**. 1987; 84: 9265-9

IGNARRO, L.J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO, J. Nitric Oxide Donors and Cardiovascular Agents Modulating the Bioactivity of Nitric Oxide. **Circulation Research**. 2002; 90: 21-28.

ILLENEUVE, N.; FORTUNO, A. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. **Journal of vascular research**. 2003;40(2):87–96.

INSULL, J.R.W. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. **The American Journal Of Medicine**. 2009; 122(1): S3-S14.

KESHET, R.; EREZ, A. Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. **Disease Models & Mechanisms**. 2018;11(8):dmm033332.

KOBAYASHI, T.; MIYAUCHI, T.; IWASA, S. et al. Corresponding distributions of increased endothelin-B receptor expression and increased endothelin-1 expression

in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice with advanced atherosclerosis. **Pathology international**. 2000; 50 (12): 929-36.

KOJIMA, H. et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. **Analytical chemistry**. 1998; 70(13):2446-2453.

KRUSZYNA, H.; MAGYAR, J.; ROCHELLE, L. G. et al. Spectroscopic studies of nitric oxide (NO) interactions with cobalamins: reaction of NO with superoxocobalamin (III) likely accounts for cobalamin reversal of the biological effects of NO. **The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**. 1998; 285(2):665-71.

LAURINDO, F.R.M., et al. Endothelium-Dependent Vasodilation: Nitric Oxide and Other Mediators. **Endothelium and Cardiovascular Diseases**. 2018; 97-113.

LI, D.; MEHTA, J.L. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. **Circulation**. 2000; 101(25):2889-2895.

LIANG, H.; NACHARAJU, P.; FRIEDMAN, A.; FRIEDMAN, J.M. Nitric oxide generating/releasing materials. **Future science OA**. 2015;1(1):FSO54.

LIN S.; FAGAN K.A. ; KX LI. Et al. Sustained endothelial nitric-oxide synthase activation requires capacitative Ca²⁺ entry. **The Journal of biological chemistry**. 2000; 275(24):17979-85.

LIU, B.; ZHANG, Y., et al. Western diet feeding influences gut microbiota profiles in apoE knockout mice. **Lipids in Health and Disease**. 2018; 17 (1): 159.

LEHMANN, J. Nitric oxide donors - current trends in therapeutic applications. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. 2000; 10(5): 559–574.

LOMNITSKI, L.; , CHAPMAN, S.; HOCHMAN, U.M. et al. Antioxidant mechanisms in apolipoprotein E deficient mice prior to and following closed head injury. **Biochimica et biophysica acta**. 1999;1453(3):359-68.

PAULO, L.L.; CRUZ, J.C.; ZHUGE, Z., et al. The novel organic mononitrate NDHP attenuates hypertension and endothelial dysfunction in hypertensive rats. **Redox Biology**. 2018; 15:182–191.

LUIKING, Y.C.; ENGELEN, M.P.K.J.; DEUTZ, N.E.P. Regulation of nitric oxide production in health and disease. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**. 2010;13(1):97-104.

LUZ, P.L.; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. Endotélio doenças cardiovasculares. 1ed. São Pulo: **Athenus**, 2005.

MA, S.; TIAN, X.Y.; ZHANG, Y., et al. E-selectin-targeting delivery of microRNAs by microparticles ameliorates endothelial inflammation and atherosclerosis. **Scientific Reports**. 2016; 6:22910.

MA, S.; WANG, S.; LI, M.; ZHANG, Y.; ZHU, P. The effects of pigment epithelium-derived factor on atherosclerosis: putative mechanisms of the process. **Lipids in health and disease**. 2018;17(1):240.

MAJED, B.H.; KHALIL, R.A. Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. **Pharmacological reviews**. 2012;64(3):540-82.

MALDONADO, G., et al. Implante de Múltiplos Stents Farmacológicos para o Tratamento da Doença Multiarterial em Paciente Diabética. **Revista Brasileira de cardiologia invasiva**. 2007; 15(3): 302-306.

MANOURY, B.; MONTIEL, V.; BALLIGAND, J.L. Nitric oxide synthase in post-ischaemic remodelling: new pathways and mechanisms. **Cardiovascular Research**. 2012; 9(2): 304–315.

MEIR, K.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse: a decade of progress. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. 2004; 24(6):1006-1014.

MILLER, Y.I.; CHANG, M.K.; BINDER, C.J.; SHAW, P.X.; WITZTUM, J.L. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. **Current opinion in lipidology**. 2003; 14(5): 437-45.

MILLER, M.R.; MEGSON, I.L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**. 151(3): 305–321. 2007.

MIRANDA, L.S. **Investigação do papel da apolipoproteína-e no crescimento neurítico em culturas primárias do gânglio cervical superior de camundongos**. Belo horizonte: Universidade federal de Minas Gerais. 2013. Dissertação de mestrado.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**. 2006;147(Suppl 1):S193-S201.

MÜLLER, S.; KÖNIG, I.; MEYER, W.; KOJDA, L. Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by eccentric isosorbide mononitrate. **Journal of the American College of Cardiology**. 2004; 44(3):624-31.

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

MÜNDEL, T.; DAIBER, A.; GORI, T. More answers to the still unresolved question of nitrate tolerance. **European Heart Journal**. 2013. 34(34): 2666-73.

MURRELL, W. Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. **The Lancet**. 1879; 113(2894): 225-227.

NAKASHIMA, Y., et al. ApoE-Deficient Mice Develop Lesions of All Phases of Atherosclerosis Throughout the Arterial Tree. **Arteriosclerosis and Thrombosis**. 1994; 14(1): 133-140.

OZKOR, M.A.; QUYYUMI, A.A. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and Vascular Function. **Cardiology Research and Practice**. 2011;2011:156146.

PAIGEN, B. et al. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. **Atherosclerosis**.1985; 57(1):65–73,.

PEREIRA, A.C.; PAULO, M., el al. Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds. **Brazilian journal of medical and biological research**. 2011;44(9):947-957.

PALMER, M. **Pharmacology of nitric oxide**. 2016. Acessado em 15/09/2018. Disponível em: <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/NitricOxide.html>

PLUMP, A.S.; SMITH, J.D., et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**. 1992;71(2):343–353.

PORPINO, S.K; ZOLLBRECHT, C., et al. Nitric oxide generation by the organic nitrate NDBP attenuates oxidative stress and angiotensin II-mediated hypertension. **British Journal Pharmacology**. 2016. 173(14):2290-302.

PORTO, M. L. **A terapia com células mononucleares atenua a aterosclerose em camundongos apoe knockout**. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo. 2011. Dissertação de mestrado

POTOKA, K.P., et al. Nitric Oxide–Independent Soluble Guanylate Cyclase Activation Improves Vascular Function and Cardiac Remodeling in Sickle Cell Disease. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. 2018; 58(5): 636-647

PRENDERGAST, C.; QUAYLE, J.; BURDYGA, T.; WRAY, S. Atherosclerosis affects calcium signalling in endothelial cells from apolipoprotein E knockout mice before plaque formation. **Cell Calcium**. 2014; 55(3):146-54.

RAJENDRAN, P.. et al. The Vascular Endothelium and Human Diseases. **International Journal of Biological Sciences**. 2013;9(10):1057-1069.

RIBEIRO, A.G.; COTTA, R.M.M.; RIBEIRO, S.M.R. A promoção da saúde e a prevenção integrada dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. **Ciência & Saúde Coletiva**. 2012;17(1), 7-17.

ROBERT, M.B; et al; Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor: A Cousin to Nitric Oxide and Prostacyclin. **Anesthesiology** 2005;102(6):1261-1277.

SANCHIS-GOMAR, F.; PEREZ-QUILIS, C.; LEISCHIK, R.; LUCIA, A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. **Annals of Translational Medicine**. 2016; 4(13):256.

SANTOS, A.F. **Novas perspectivas da glicerina – Síntese de novos nitratos com propriedades farmacológicas e melhoradores de cetano**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba. 2009. Dissertação de mestrado.

SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2017. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abc/v109n2s1/0066-782X-abc-109-02-s1-0001.pdf>

SERAFIM, R.A.M.; PRIMI, M.C.; TROSSINI, G.H.G.; FERREIRA, E.I. Nitric oxide: State of the art in drug design. **Current medical chemistry**. 2012. 19:386-405.

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

SRIKANTH, S.; , GWACK, Y. Molecular regulation of the pore component of CRAC channels, Orai1. **Current topics in membranes**. 2013; 71: 181-207.

STEINBERG, D. Atherogenesis in perspective: hipercolesterolemia and inflammation as partners in crime. **Nature Medicine**. 2002; 8(11).

STUCHR, D.; POU, S; ROSEN, G.M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. **The Journal of Biological Chemistry**. 2001; 276:1433-1436.

TU, C.; ZOLDAN, J. Moving iPSC-Derived Cardiomyocytes Forward to Treat Myocardial Infarction. **Cell Stem Cell**. 2018; 6;23(3):322-323.

THEODOROU, K; BOON, R.A. Endothelial Cell Metabolism in Atherosclerosis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. 2018;6:82.

VILHENA, F.S.D.S. **Mecanismos de nitrosilação de ferro porfirinas por snap: cinética de reação e estabilidade em ambiente aeróbico**. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica Do Rio De Janeiro. 2006. Tese de doutorado.

WAINSTEIN, M.V. **Contribuição da endotelina-1 para o tônus simpático coronariano de seres humanos: experimentos com antagonistas dos receptores ET-A**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2000. Tese de doutorado.

WANG, Y.X.; HALKS-MILLER, M., et al Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**. 2000; 278(2): H428-34.

WATKINS, H; FARRALL, M. Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress. **Nature Reviews Genetics**. 2006; 7:163-173.

WEISSBERG, P. Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. **Heart**. 2000; 83(2):247-252

WHO, World Health Organization. 2017. Disponível em: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

WOJTALA, A. et al. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. **Methodos in enzymology**. 42: 243–262.

WOLF, D.; STACHON, P.; BODE C.; ZIRLIK A. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. **Hamostaseologie**.2014;34(1):63-71

XAVIER, H.T; IZAR, M.C; FARIA NETO, J.R; et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**. 101(4 suppl 1). 2013.

YAGHOUBI, M.; OLIVER-KRASINSKI, J. CAYATTE, A.J.; COHEN, R.A. Decreased sensitivity to nitric oxide in the aorta of severely hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of cardiovascular pharmacology**. 2000; 36(6):751-7.

YAMASHIRO, K.; MILSOM, A.B.; DUCHENE, J., et al. Alterations in nitric oxide and endothelin-1 bioactivity underlie cerebrovascular dysfunction in ApoE-deficient mice. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**. 2010;30(8):1494–1503.

YIN, D.; WANG, Q.; ZHOU, X.; LI, Y. Endothelial dysfunction in renal arcuate arteries of obese Zucker rats: The roles of nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factors, and calcium-activated K⁺ channels. **PLoS ONE**. 2017;12(8):e0183124.

YU, L.; LIU, H. Perillaldehyde prevents the formations of atherosclerotic plaques through recoupling endothelial nitric oxide synthase. **Journal of cellular biochemistry**. 2018.

ZANARDO, T.E.C. **Influência da hipercolesterolemia sobre célulastronco mesenquimais da medula óssea de camundongos apoe knockout**. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo. 2016. Dissertação de Mestrado.

ZMYSŁOWSKI, A.; SZTERK, A. Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. **Lipids in health and disease**. 2017;16(1):188.