

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO NITRITO DE SÓDIO
(NaNO₂) E DO 2-NITRATO-1,3-DIBUTOXIPROPANO (NDBP) NA
ATEROSCLEROSE EXPERIMENTAL**

CLÊNIA DE OLIVEIRA CAVALCANTI

JOÃO PESSOA - PB

2024

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

CLÊNIA DE OLIVEIRA CAVALCANTI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO NITRITO DE SÓDIO
(NaNO₂) E DO 2-NITRATO-1,3-DIBUTOXIPROPANO (NDBP) NA
ATEROSCLEROSE EXPERIMENTAL**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico
em Ciências Fisiológicas da Universidade
Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof.^a Dra. Camille de Moura Balarini

JOÃO PESSOA - PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C376a Cavalcanti, Clénia de Oliveira.

Avaliação da atividade anti-inflamatória do nitrito de sódio (NaNO_2) e do 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP) na aterosclerose experimental / Clénia de Oliveira Cavalcanti. - João Pessoa, 2024.

89 f. : il.

Orientação: Camille de Moura Balarini.

Tese (Doutorado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Aterosclerose. 2. Óxido nítrico. 3. Nitrato orgânico. 4. Nitrato inorgânico. I. Balarini, Camille de Moura. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.13-004.6(043)



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



Ata da Sessão de Defesa Pública de Tese de Doutorado do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Associada Universidade Federal da Paraíba, realizada em 26 de janeiro de 2024.

Na data de vinte e seis de janeiro de dois mil e vinte e quatro, às 08h30 (horário local), por meio de Plataforma Virtual (<https://meet.google.com/sfs-pxjb-cnq>), foi realizada a defesa pública da Tese de Doutorado do(a) discente **Clênia de Oliveira Cavalcanti**, com o trabalho intitulado "Avaliação da atividade anti-inflamatória do nitrito de sódio e do 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP) na aterosclerose experimental". A banca examinadora foi constituída pelo(a) orientador(a) Prof.ª Dr.ª Camille de Moura Balarini (UFPB) na qualidade de presidente da banca, pelo 1º examinador (examinadora externa) Prof.ª Dr.ª Luciene Simões de Assis Tafuri (UFPB), 2º examinador (examinador externo) Prof. Dr. Thyago Moreira De Queiroz (UFPE), 3º examinador (examinador externo) Prof. Dr. José Guilherme Ferreira Marques Galvão (UNIFSM) e 4º examinador (examinador interno) Prof. Dr. José Luiz De Brito Alves (UFPB). Após a apresentação pública do trabalho, iniciou-se a arguição do(a) candidato(a) por cada membro da banca examinadora, tendo o(a) candidato(a) o mesmo tempo para responder a cada questionamento. Na sequência, a banca examinadora se reuniu em caráter sigiloso e considerou o(a) candidato(a) APROVADO(A). De acordo com o Artigo 98 §1 §2 da Resolução 35/2019 do CONSEPE, o(a) discente terá até 60 (sessenta) dias, a partir da presente data, para fazer as correções solicitadas pela banca examinadora e entregar as cópias corrigidas da tese à Biblioteca Central da UFPB e à secretaria deste programa, contendo obrigatoriamente a ficha catalográfica fornecida pela Biblioteca Central da UFPB.

Documento assinado digitalmente



CAMILLE DE MOURA BALARINI
Data: 26/01/2024 17:29:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.ª Dr.ª Luciene Simões de Assis Tafuri

Prof. Dr. Thyago Moreira De Queiroz

Prof. Dr. José Guilherme Ferreira

Marques Galvão

Prof. Dr. José Luiz De Brito Alves

Documento assinado digitalmente



THYAGO MOREIRA DE QUEIROZ
Data: 29/01/2024 14:05:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dedico este trabalho aos meus pais, Marlene Gonçalves de Oliveira, José Cavalcanti de Araújo e a minha filha Maria Clara.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por seu imenso amor! Por ser meu amigo e companheiro de todas as horas, aquele que me forma por primeiro.

À minha orientadora, professora Dra. Camille de Moura Balarini, minha gratidão pela acolhida, incentivo e por todo o conhecimento transmitido.

Aos professores da banca de qualificação e defesa, pela colaboração neste trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas por fazerem parte da minha formação profissional.

Ao professor Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, seus alunos e colaboradores, pela substância cedida.

Aos professores Dr. Isac Almeida de Medeiros e Dra. Márcia Regina Piuvezam, minha gratidão por me receberem em seus laboratórios. E aos colegas Alisson, Arthur e Mathania pelo auxílio nos experimentos.

À Sara e Matheus por todo o suporte nas atividades do laboratório

À Emmily, Clara e todos que fazem parte do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Controle Neural da Pressão Arterial pelo incentivo e ajuda na execução desse trabalho. Vocês trouxeram mais leveza e alegria nessa trajetória.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por possibilitar a realização desta pesquisa. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte técnico e financeiro.

Aos meus pais, Marlene e José Cavalcanti, por todo o zelo e cuidado com minha vida e a minha querida filha Maria Clara por iluminar os meus dias.

Aos demais familiares pelo apoio, carinho fraterno e oração, em especial as minhas irmãs, Clécia e Clarissa.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa pesquisa.

Muito obrigada!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência.

Santo Agostinho

RESUMO

As doenças isquêmicas cardíacas e os acidentes vasculares cerebrais estão entre as principais causas de óbitos no mundo e mantém estreita relação com a aterosclerose, uma doença inflamatória crônica do sistema vascular caracterizada por intensa atividade imunológica inata e adaptativa. No processo aterogênico observa-se uma redução na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS). Nesse sentido, uma compreensão aprimorada de novas alternativas terapêuticas para melhorar a biodisponibilidade do NO são necessárias, o que inclui estudo sobre novas classes de medicamentos doadores de NO e a via nitrato-nitrito-NO. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória do nitrito de sódio (NaNO_2) e do 2-nitrato-1,3-dibutoxipropano (NDBP) em modelo de aterosclerose experimental. Efeitos agudos: camundongos C57BL/6 (controles) e $\text{ApoE}^{-/-}$ foram tratados com NaNO_2 (dose 0,1mmol/kg/dia) ou NDBP (dose 40mg/kg/dia) por três dias. Uma hora após o último dia de tratamento, os animais foram estimulados com zimosan (2mg/mL) de modo a induzir inflamação no peritônio. Após 4 horas, o fluido peritoneal foi coletado e utilizado para contagem de células totais e diferencial por microscopia óptica e para quantificação de citocinas (IL-6, IL-10, $\text{TNF-}\alpha$ e MCP-1) por ELISA. Efeitos crônicos: os camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ ao atingirem 8 semanas de idade receberam dieta aterogênica *Western type* por 12 semanas e seus controles receberam dieta padrão para roedores. Durante as 3 últimas semanas receberam por gavagem NaNO_2 (0,1mmol/kg/dia), NDBP (40mg/kg/dia) ou salina. Ao final do tratamento, foi realizada a coleta de sangue para análise do perfil lipídico, peroxidação lipídica, nitrito plasmático e citocinas (IL-6, IL-10, $\text{TNF-}\alpha$ e MCP-1) e as aortas foram removidas e processadas para avaliação histológica da deposição de placa aterosclerótica (coloração com Oil Red), produção de ROS (marcação com dihidroetídeo - DHE) e de NO (marcação com diaminofluoresceína - DAF). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e as comparações estatísticas foram feitas por ANOVA, seguida do *post hoc* de Tuckey, considerando-se significativo $p < 0,05$. No modelo de peritonite, o zimosan, como esperado, induziu aumento da migração celular e dos níveis das citocinas pró-inflamatórias no peritônio. O tratamento com NaNO_2 foi capaz de reduzir o número total de células na cavidade peritoneal, pela redução na migração de polimorfonucleares em camundongos controles e nos camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ reduziu os níveis plasmáticos das citocinas IL-10, $\text{TNF-}\alpha$ e MCP-1. Já o NDBP aumentou a migração celular em ambas linhagens. Em relação aos efeitos crônicos, o tratamento com NaNO_2 reduziu a deposição de placa aterosclerótica, os níveis plasmáticos de MCP-1, o estresse oxidativo sistêmico e *in situ* na aorta, independente de alterações nos níveis de NO, nitrito plasmático e perfil lipídico. O NDBP diferiu do NaNO_2 apenas nos níveis de MCP-1, aumentando essa citocina no plasma. Esses resultados sugerem que o NaNO_2 tem efeito anti-inflamatório agudos e crônicos, sendo capaz de reduzir a deposição de placa aterosclerótica por mecanismos envolvendo a redução do estresse oxidativo e MCP-1. Sugerem ainda que o NDBP apresenta um efeito dual, com ação pro-inflamatória aguda em modelo de peritonite e ação antiaterogênica quando administrado cronicamente.

Palavras chave: Aterosclerose. Óxido Nítrico. Nitrato orgânico. Nitrato inorgânico. Inflamação.

ABSTRACT

Coronary ischemic diseases and cerebrovascular accidents rank among the leading causes of global mortality and maintain a close association with atherosclerosis, a chronic inflammatory vascular disease characterized by intense innate and adaptive immune activity. In the atherogenic process, a reduction in the bioavailability of nitric oxide (NO) and an increase in reactive oxygen species (ROS) are observed. In this context, an enhanced understanding of new therapeutic alternatives to improve NO bioavailability is necessary, including the study of new classes of NO-donating drugs and the nitrate-nitrite-NO pathway. This study aimed to evaluate the anti-inflammatory activity of sodium nitrite (NaNO_2) and 2-nitrate-1,3-dibutoxypropane (NDBP) in an experimental atherosclerosis model. Acute effects: C57BL/6 mice (controls) and $\text{ApoE}^{-/-}$ mice were treated with NaNO_2 (dose 0.1 mmol/kg/day) or NDBP (dose 40 mg/kg) for three days. One hour after the last treatment, the animals were stimulated with zymosan (2 mg/mL) to induce peritoneal inflammation. After 4 hours, peritoneal fluid was collected and used for total and differential cell counts by optical microscopy and for the quantification of cytokines (IL-6, IL-10, TNF- α , and MCP-1) by ELISA. Chronic effects: $\text{ApoE}^{-/-}$ mice, upon reaching 8 weeks of age, received a Western-type atherogenic diet for 12 weeks, while their controls received a standard rodent diet. During the last 3 weeks, they were treated by gavage with NaNO_2 (0.1 mmol/kg/day), NDBP (40 mg/kg/day), or saline. At the end of the treatment, blood samples were collected for lipid profile analysis, lipid peroxidation, plasma nitrite, and cytokines (IL-6, IL-10, TNF- α , and MCP-1). The aortas were removed and processed for histological assessment of atherosclerotic plaque deposition (stained with Oil Red), production of ROS (stained with dihydroethidium - DHE), and NO (stained with diaminofluorescein - DAF). The data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean, and statistical comparisons were made using ANOVA, followed by Tukey's post hoc test, considering $p < 0.05$. In the peritonitis model, zymosan, as expected, induced an increase in cell migration and pro-inflammatory cytokine levels in the peritoneum. Treatment with NaNO_2 reduced the total number of cells in the peritoneal cavity by reducing the migration of polymorphonuclear cells in C57BL/6 mice, and in $\text{ApoE}^{-/-}$ mice, it reduced plasma levels of IL-10, TNF- α , and MCP-1. On the other hand, NDBP increased cell migration in both lineages. Regarding chronic effects, treatment with NaNO_2 reduced atherosclerotic plaque deposition, plasma levels of MCP-1, systemic and *in situ* oxidative stress in the aorta, regardless of changes in NO levels, plasma nitrite, and lipid profile. NDBP differed from NaNO_2 increased MCP-1 levels in plasma. These results suggest that NaNO_2 has acute and chronic anti-inflammatory effects, capable of reducing atherosclerotic plaque deposition through mechanisms involving the reduction of oxidative stress and MCP-1. They also suggest that NDBP has a dual effect, with pro-inflammatory action in the peritonitis model and anti-atherosclerotic action when administered chronically.

Keywords: Atherosclerosis. Nitric oxide. Organic nitrate. Inorganic nitrate. Inflammation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3.1. Aterosclerose.....	20
3.1.1. Características imunológicas da aterosclerose.....	23
3.2. Óxido Nítrico.....	27
3.3. Nitratos orgânicos e NDBP.....	30
3.4. Nitratos e nitritos inorgânicos.....	31
3.5. Caracterização do modelo ApoE ^{-/-}	33
4. METODOLOGIA	36
4.1. Animais.....	36
4.2. Drogas testes.....	36
4.2.1. NDBP.....	36
4.2.2. Nitrito de sódio.....	36
4.3. Grupos experimentais e procedimentos.....	37
4.3.1. Modelo de inflamação aguda (peritonite)	37
4.3.1.1. Coleta do lavado peritoneal e contagem de leucócitos.....	38
4.3.1.2. Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas.....	39
4.3.2. Modelo de aterosclerose experimental.....	40
4.3.2.1. Dosagem de colesterol e suas frações	41
4.3.2.2. Avaliação da peroxidação lipídica plasmática.....	41
4.3.2.3. Avaliação do nitrito plasmático.....	42
4.3.2.4. Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas	42
4.3.2.5. Avaliação da deposição de placa aterosclerótica	42
4.3.2.6. Avaliação do estresse oxidativo e produção de NO em aorta	43
4.4. Análise estatística.....	44

5. RESULTADOS	45
5.1. Efeito agudo do NaNO ₂ e NDBP.....	45
5.1.1. Efeito agudo do NaNO ₂ e do NDBP na migração de células inflamatórias e citocinas em camundongos C57BL/6 fêmea.....	45
5.1.2. Efeito agudo do NaNO ₂ e do NDBP na migração de células inflamatórias e citocinas em camundongos ApoE ^{-/-} fêmea.....	48
5.2. Efeito crônico do NaNO ₂ e NDBP em modelo de aterosclerose experimental.....	51
5.2.1. Perfil lipídico plasmático e dados ponderais.....	51
5.2.2. Deposição de placa aterosclerótica na aorta.....	52
5.2.3. Estresse oxidativo plasmático.....	53
5.2.4. Produção de espécies reativas de oxigênio na aorta.....	54
5.2.5. Produção de óxido nítrico na aorta.....	56
5.2.6. Nitrito plasmático.....	57
5.2.7. Quantificação de citocinas no plasma.....	58
6.DISCOSSAO.....	60
7. CONCLUSÃO.....	72
REFERENCIAS.....	73
APÊNDICES.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Infiltração de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e formação de macrófagos espumosos na parede arterial.....	21
Figura 2: Progressão da aterosclerose.....	22
Figura 3: Metabolismo de NO endógeno e exógeno.....	28
Figura 4: Estresse oxidativo na aterosclerose.....	29
Figura 5: Estrutura química do 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP)	31
Figura 6: Esquema do modelo de peritonite.....	39
Figura 7: Diferenciação de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares	39
Figura 8: Resumo do protocolo de aterosclerose experimental.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito do NaNO ₂ e NDBP na migração de leucócitos totais e diferenciais e nos níveis de citocinas durante peritonite induzida por zimosan em camundongos C57BL/6 fêmea.....	47
Gráfico 2. Efeito do NaNO ₂ e NDBP na migração de leucócitos totais e diferenciais e nos níveis de citocinas durante peritonite induzida por zimosan em camundongos ApoE ^{-/-} fêmea.....	50
Gráfico 3. Efeito do tratamento crônico com NaNO ₂ e NDBP na placa aterosclerótica.....	52
Gráfico 4. Efeito do tratamento crônico com NaNO ₂ e NDBP no estresse oxidativo plasmático.....	54
Gráfico 5. Efeito do tratamento crônico com NaNO ₂ e NDBP no estresse oxidativo na aorta.....	55
Gráfico 6. Efeito do tratamento crônico com NaNO ₂ e NDBP na produção de óxido nítrico na aorta.....	56
Gráfico 7. Efeito do tratamento crônico com NaNO ₂ e NDBP nos níveis de nitrito plasmático.....	58
Gráfico 8. Efeito do tratamento crônico com NaNO ₂ nos níveis plasmáticos de MCP-1 e TNF-α.....	59
Gráfico 9. Efeito do tratamento crônico com NDBP nos níveis plasmáticos de MCP-1 e TNF-α.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais para avaliação do efeito do NDBP ou NaNO ₂ na inflamação aguda: modelo de peritonite em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-}	38
Tabela 2. Perfil lipídico plasmático e dados ponderais dos animais C57BL/6 e ApoE ^{-/-}	53

LISTA DE ABREVIATURAS

- ALK-1:** receptor de ativação like kinase
- ApoE:** Apolipoproteína E
- ApoE^{-/-}:** Camundongo deficiente em apolipoproteína E
- ANOVA:** Análise de variância
- BH4:** 5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina
- CEUA:** Comitê de Ética no Uso de Animais
- cGMP:** Guanosina monofosfato cíclico
- DAMPs:** Padrões moleculares associados a danos
- DAF:** diaminofluoresceína
- DCNT:** Doenças crônicas não transmissíveis
- DCV:** Doenças cardiovasculares
- DHE:** dihidroetídio
- eNOS:** Óxido nítrico sintase endotelial
- EPM:** Erro padrão da média
- GMPc:** Monofosfato cíclico de guanosina
- GM-CSF:** Fator estimulante de colônia de macrófago-granulocito
- GPx:** Glutadiona peroxidase
- HDL:** Lipoproteína de alta densidade
- ICAM-1:** molécula de adesão intercelular-1
- IDL:** Lipoproteína de densidade intermediária
- iNOS:** Óxido nítrico sintase inducível
- IL:** interleucina
- IL-6:** Interleucina 6
- IL-10:** Interleucina 10
- i.p.:** intraperitoneal
- IFN γ :** Interferon gamma
- LDL:** Lipoproteína de baixa densidade
- LPS:** Lipopolissacarídeo
- LDLr^{-/-}:** camundongos *knockout* para o receptor de lipoproteína de densidade
- M1:** macrófagos com fenótipo inflamatório
- M2:** macrófagos com fenótipo anti-inflamatórios
- NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaNO₂: Nitrito de sódio

NF-κB: fator de transcrição nuclear kappaB

MCP-1: Proteína quimioatraente de monócitos-1

M-CSF: Fator estimulador de colônia macrófago

NDBP: nitrato orgânico 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano

MIF: Fator inibitório da migração de macrófago

MMP: Metaloproteinase

NETs: Armadilhas extracelulares de neutrófilos

NO₃⁻: Nitrato

NO₂⁻: Nitrito

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

nNOS: Óxido nítrico Neuronal

O₂: Oxigênio

O₂^{•-}: Superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógeno

PKG: Proteína Kinase G

PON: Paraxonase

PRRs: Receptores de reconhecimento padrão

QM: Quilomícrons

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SR-B1: receptor scavenger classe B tipo 1

SUS: Sistema Único de Saúde

TNFα: Fator de necrose tumoral alpha

Thx: Tioredoxina

oxLDL: LDL oxidado

XO: Xantina oxidase

VCAM-1: Molécula de adesão vascular celular 1

VLDL: Lipoproteínas de muito baixa densidade

VSMCs: Células musculares lisas

1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) constituem o principal grupo de causa de morte em todo o mundo, são responsáveis por cerca de 70% das mortes globais, equivalendo a mais de 38 milhões de mortes por ano. As doenças cardiovasculares (DCV) correspondem 45% de todas as mortes por DCNT representando mais de 17 milhões de óbitos. Distribuição similar é observada no Brasil, onde 72% das mortes resultam de DCNT, sendo 30% devidas a DCV (Oliveira *et al.*, 2022).

As DCVs são um problema de saúde pública com altos impactos socioeconômicos, sendo responsáveis por incapacidade laboral, redução da produtividade e redução das rendas familiares. Os valores diretos e indiretos gastos com DCVs no Brasil têm aumentado nos últimos anos, tendo impacto significativo nos custos com medicamentos, previdência social e morbidade. Estima-se que R\$37,1 bilhões de reais foram empregados em 2015, um aumento percentual de 17% no período de 2010 a 2015. Os custos com saúde no Brasil são estimados em 9,5% do Produto Interno Bruto, sendo 0,7% desses custos vinculados às DCVs (Siqueira *et al.*, 2017).

As doenças isquêmicas cardíacas e os acidentes vasculares cerebrais estão entre as principais doenças do aparelho circulatório e mantém estreita relação com a aterosclerose. A aterosclerose é definida como uma doença crônica e progressiva, caracterizada por uma resposta inflamatória da parede da artéria frente a lesões promovidas por fatores de risco, como dislipidemia, diabetes, hipertensão e outros (ROSS, 1999). Desenvolve-se lentamente iniciando-se nos primeiros anos de vida, podendo culminar posteriormente em graves complicações clínicas como ulcerações e rupturas, que podem evoluir para oclusões agudas trombóticas (Witztum; Steinberg, 1991), contribuindo com alta morbidade e mortalidade (Oliveira *et al.*, 2022).

A inflamação atua como uma base comum para as alterações patológicas ao longo do início e desenvolvimento da aterosclerose. O processo primário de inflamação é acompanhado por um evento secundário de estresse oxidativo. Embora níveis baixos de espécies reativas de oxigênio (ROS) sejam necessários para

regulação da homeostase do oxigênio e sinalização celular, altas níveis de ROS podem induzir estresse oxidativo que é estreitamente associada à patogênese da aterosclerose (Silva *et al.*, 2011).

Uma diminuição na produção e biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e o aumento de ROS são características de muitas das principais doenças crônicas, incluindo a aterosclerose. O NO é gerado endogenamente pela óxido nítrico sintase (NOS) para regular um número de processos fisiológicos, incluindo funções cardiovasculares e metabólicas (Osmar *et al.*, 2016). Outra via para sua geração é a redução em série dos ânions inorgânicos nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) (Lundberg *et al.*, 2008). Esses ânions participam da geração de NO endógeno e também estão presentes na dieta, com vegetais de folhas verdes com alto teor de nitrato (Weitzberg; Lundberg, 2013).

A ingestão de nitrato de fontes vegetais está associada à redução da relação íntima/média em carótida e tem papel importante na prevenção à aterosclerose (Bondonno *et al.*, 2017). Em macrófagos ativados com lipopolissacarídeos (LPS), o nitrito foi eficiente em reduzir a atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e a produção de ROS (Zollbrecht *et al.*, 2016). Stokes e colaboradores (2009) mostraram que o nitrito administrado na água de beber inibiu a adesão e a migração de leucócitos e preveniu a disfunção arteriolar em camundongos alimentados com dieta rica em colesterol. Em humanos, a suplementação dietética de curto prazo com nitrato tem revelado redução da pressão sanguínea (Larsen *et al.*, 2006). Todavia, outros pesquisadores não verificaram efeito na aterogênese com a suplementação prolongada de nitrato na dieta em camundongos *knockout* para o receptor de lipoproteína de baixa densidade ($\text{LDLR}^{-/-}$) (Marsch *et al.*, 2016).

Doadores diretos de NO, como a molsidomina, aumentam a estabilidade da placa aterosclerótica (Roth *et al.*, 2019). Estudos identificaram também uma redução na progressão da formação de lesões, disfunção endotelial e oxidação de LDL após tratamento com dose baixa de tetranitrato de pentaeritritol ou isossorbida em coelhos (Hacker *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2004). Contrariando estes resultados, no entanto, o tratamento contínuo com nitroglicerina ou mononitrato de isossorbida causou disfunção endotelial, aumento da formação de ROS através do aumento da expressão

e atividade de NADPH oxidases e desacoplamento da NOS endotelial (Knorr, *et al.*, 2011; Gori, *et al.*, 2007).

Nesse contexto, a descoberta e a síntese de novos nitratos orgânicos incapazes de induzir tolerância torna-se bastante relevante para o tratamento de desordens cardiovasculares. Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram efeitos benéficos de um novo nitrato orgânico, o 2-nitrato-1,3-dibutoxipropano (NDBP). A motivação para a investigação do NDBP, um novo doador de NO, se justifica por ser um promissor agente terapêutico no tratamento de DCVs e não induzir tolerância (França-Silva, 2012). Pesquisas do nosso grupo tem revelado efeito vasodilatador em anéis de artéria mesentérica superior de rato pela liberação de NO (França-Silva, *et al.*, 2012), redução do estresse oxidativo em animais hipertensos (Porpino *et al.*, 2016) e melhora da função vascular em modelo experimental de aterosclerose (Leite, 2019). Apreciando seus efeitos conhecidos até o momento, o NDBP poderia ser também um candidato para a modulação da resposta inflamatória e redução da aterogênese.

Considerando que a aterosclerose é uma doença inflamatória (Hansson; Libby, 2006; Zhu *et al.*, 2018; Kong *et al.*, 2022), que a redução do NO e o aumento do estresse oxidativo são características marcantes dessa patologia (Balarini *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013) e que há modulação nesses parâmetros com o tratamento com nitrado/nitrito ou NDBP (Lundberg *et al.*, 2015; Zollbrecht *et al.*, 2016; Porpino *et al.*, 2016), nossa hipótese foi que do nitrito de sódio (NaNO_2) e 2-nitrato-1,3-dibutoxipropano (NDBP) teriam efeito benéfico no modelo de aterosclerose experimental ao modular a resposta inflamatória de maneira favorável à redução da placa.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do NDBP e do nitrito de sódio em modelo de aterosclerose experimental.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito do NDBP e do nitrito de sódio em modelo de aterosclerose experimental e seus controles quantificando:

- ✓ Após o tratamento agudo, a migração de leucócitos e subpopulações de células e produção aguda de citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α).
- ✓ Após tratamento crônico, o perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL), o estresse oxidativo plasmático (TBARS), a concentração de nitrito e de citocinas no plasma (IL-6, IL-10, TNF- α e MCP-1), a deposição de placa aterosclerótica, o estresse oxidativo e produção de NO em aorta.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica caracterizada por intensa atividade imunológica inata e adaptativa (Hansson; Libby, 2006; Kong *et al.*, 2022). Tem origem multifatorial, iniciada por disfunção endotelial, resultando em acúmulo e subsequente oxidação de colesterol na camada íntima (Ross, 1999).

Embora o processo aterosclerótico seja característico da camada íntima das grandes e médias artérias, inúmeras alterações ocorrem também na microcirculação, primariamente decorrentes de alterações na função endotelial (Witzum; Steinberg, 1991) e pelo recrutamento de células inflamatórias, em especial dos macrófagos (Bobryshev *et al.*, 2016).

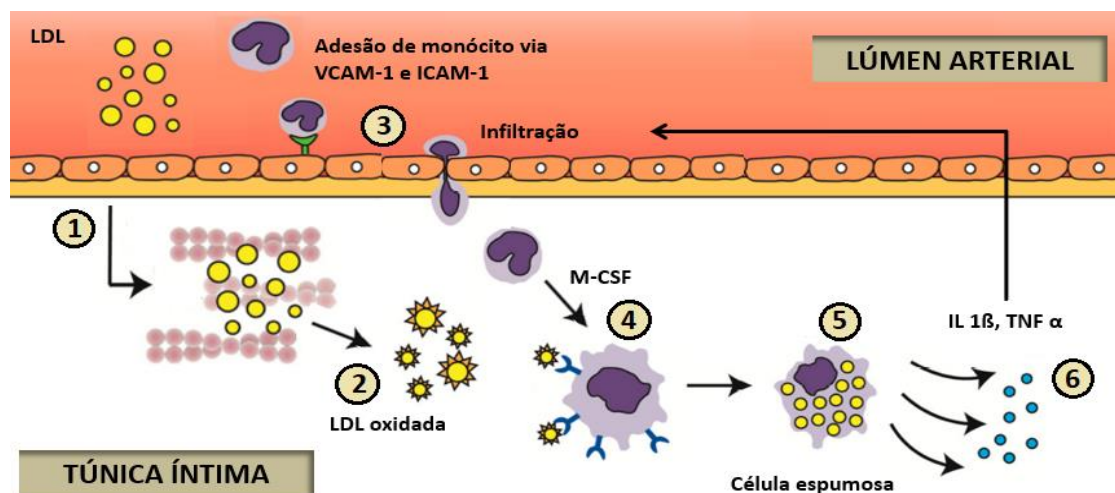
A disfunção endotelial está envolvida na formação de lesões ateroscleróticas pela promoção de mecanismos como regulação positiva de moléculas de adesão, aumento da secreção de quimiocinas e adesão de leucócitos, aumento da permeabilidade celular, aumento da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, ativação plaquetária, citocinas e proliferação e migração de células musculares lisas vasculares. Pode ser decorrente de lesões físicas e bioquímicas e é caracterizada pela redução da biodisponibilidade de vasodilatadores, particularmente do NO e/ou aumento dos fatores de contração derivados do endotélio (Hadi *et al.*, 2005).

O processo aterogênico inicia-se em locais em que o endotélio é submetido a estresse de cisalhamento (raiz aórtica, arco, artéria mesentérica superior e artérias renais). Nesses locais é observada a disfunção endotelial e o aumento da permeabilidade, o que favorece a migração de partículas de lipopoliproteína de baixa densidade (LDL) para o espaço subendotelial (Tabas *et al.*, 2007).

A LDL no sangue atravessa o endotélio para alcançar a área subendotelial, onde é retido e se acumula com o tempo (Figura 1, passo 1). A captação, transporte e retenção de partículas subendoteliais de LDL podem ocorrer de maneira independente do receptor de LDL e contribuir para o início da aterosclerose (Skalen *et al.*, 2002; Tabas *et al.*, 2007). As mudanças de permeabilidade endotelial permitem

o acúmulo de LDL na camada íntima por meio de transporte paracelular ou através de receptores ativos para transcitose através da membrana celular, por transportadores como o receptor *scavenger* classe B tipo 1 (SR-BI) e receptor de ativação *like kinase* (Alk1) (Kraehling *et al.*, 2016). Na túnica íntima as partículas de LDL são oxidadas (oxLDL) e tornam-se imunogênicas (Figura 1, passo 2). As células endoteliais passam a expressar molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e E-selectina o que favorece a diapedese de monócitos (Figura 1, passo 3), transformando-se em macrófagos (Figura 1, passo 4). Os macrófagos internalizam as partículas de oxLDL e tornam-se células espumosas que se acumulam comprometendo a luz do vaso (Figura 1, passo 5) (Freitas Lima *et al.*, 2015).

Figura 1: Infiltração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e formação de macrófagos espumosos na parede arterial



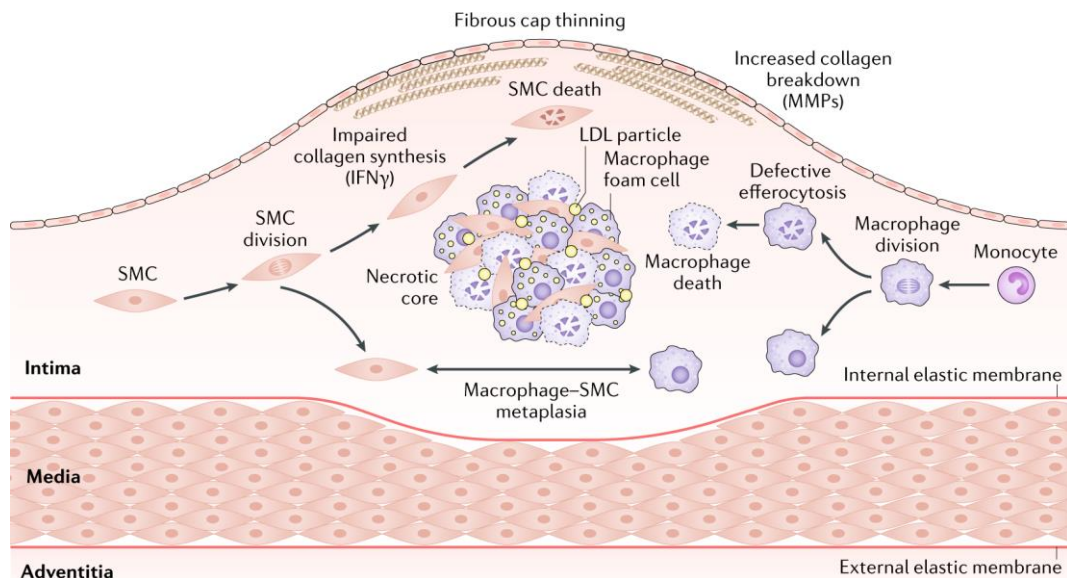
Fonte: Adaptado (Nguyen *et al.*, 2019).

O excesso de oxLDL nas células espumosas causa estresse no retículo endoplasmático, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que desencadeia cascatas apoptóticas. Isso contribui para a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α e metaloproteinases de matriz (MMPs), o que exacerba ainda mais a aterosclerose ao promover a infiltração de células imunes (Figura 1, passo 6) (Nguyen *et al.*, 2019). O processo inflamatório também envolve a migração e proliferação de células musculares lisas, que formam uma capa fibrosa ao redor do núcleo lipídico rico em células espumosas, células necróticas, cristais de colesterol e matriz extracelular (Freitas Lima *et al.*, 2015).

Nas áreas de fluxo perturbado ou oscilante, as células endoteliais desenvolvem um fenótipo pró-inflamatório com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Chatzizisis *et al.*, 2007). As células danificadas por ROS podem apresentar, por exemplo, modificações em sua função devido ao acúmulo de LDLox. Esta alteração pode ser observada nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e, também, em células fagocitárias da região endotelial afetada, sendo responsáveis pelo desenvolvimento da placa de ateroma (Silva *et al.*, 2011).

Os macrófagos desempenham um papel crítico na progressão das placas ateroscleróticas. Particularmente, o equilíbrio entre a morte dos macrófagos e a eliminação das células mortas pelos macrófagos é um fator determinante na progressão e vulnerabilidade da placa (Brophy *et al.*, 2017). Placas com uma capa fibrosa fina e grandes núcleos necróticos têm maior probabilidade de se romper (Virmani *et al.*, 2006). O adelgaçamento da capa fibrosa que envolve o núcleo necrótico rico em lipídios é decorrente da diminuição da síntese de colágeno e do aumento da degradação do colágeno com base na ação do interferon- γ (IFN- γ) e das metaloproteinases de matriz (MMPs), respectivamente. (Shi *et al.*, 2020; Libby, 2019) (Figura 2).

Figura 2: Progressão da aterosclerose



Fonte: (Libby, 2019). Durante a evolução da placa aterosclerótica, as células musculares lisas (SMCs) residentes e recrutadas produzem moléculas de matriz extracelular que contribuem para o espessamento da camada íntima. No entanto, mediadores de células T, como o IFN γ , podem prejudicar a capacidade da SMC de sintetizar colágeno intersticial e, assim, diminuir a capacidade dessas células de reparar e manter a capa fibrosa que cobre o núcleo necrótico. Além disso, os macrófagos ativados apresentam aumento na produção de enzimas da família das metaloproteinases de matriz (MMPs) que degradam o colágeno intersticial deixando a placa susceptível à ruptura.

Níveis elevados de proteína C reativa (PCR), um biomarcador inflamatório, têm sido relacionados a fatores de risco para a aterosclerose como história familiar de doença arterial coronariana, dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes melitus, obesidade, tabagismo e sedentarismo (Santos *et al.*, 2008). A exposição prolongada a esses fatores favorece a degradação da matriz extracelular, tornando a capa fibrosa da placa aterosclerótica propensa à ruptura. Neste caso, fatores teciduais são expostos levando à formação de um trombo que, ao migrar, pode levar a processos isquêmicos em diferentes órgãos incluindo coração e cérebro. No coração, pode levar a infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca, enquanto nas artérias que perfundem o cérebro, pode causar acidente vascular cerebral isquêmico e ataques isquêmicos transitórios. Se a aterosclerose afetar outros ramos arteriais, pode resultar em insuficiência renal, hipertensão, aneurismas da aorta e isquemia crítica do membro (Hansson; Libby, 2006).

3.1.1. Características imunológicas da aterosclerose

O reconhecimento da aterogênese como um processo inflamatório ativo em vez de uma doença de armazenamento de colesterol ou um depósito de cálcio destacou alguns mecanismos inflamatórios importantes. Por exemplo, fagócitos mononucleares contribuem para todos os estágios desta doença, ilustrando a ligação entre inflamação e aterosclerose (Geovanini; Libby, 2018).

Vários estudos apoiam o papel fundamental dos mecanismos inflamatórios na formação do ateroma (Libby, 2012; Libby, 2002; Libby; Ridker; Hansson, 2009; Ridker, 2016). A inflamação relacionada à aterosclerose, desde a lesão inicial até a formação de placa vulnerável, isto é, propensa a ruptura, é mediada por citocinas pró-inflamatórias, vias de sinalização inflamatória, lipídios bioativos e moléculas de adesão (Kleemann; Zadelaar; Kooistra, 2008; Zhu *et al.*, 2018).

Em humanos, as placas ateroscleróticas contêm células inflamatórias e imunes (principalmente macrófagos e células T), bem como células endoteliais vasculares, células musculares lisas, matriz extracelular, lipídios e debris acelulares ricos em lipídios (Jonasson *et al.*, 1986). No primeiro estágio da placa (estrias gordurosas) ocorre o acúmulo de células imunes e gotículas lipídicas na íntima (camada mais interna da artéria). Observa-se principalmente a presença de macrófagos carregados

de lipídios (células espumosas), mas podem haver células T (Hansson; Libby, 2006). Já as placas maduras são mais complexas do que as estrias gordurosas, apresentam uma região central com células espumosas e gotículas lipídicas extracelulares circundada por uma capa de células musculares lisas e uma matriz rica em colágeno (Jonasson *et al.*, 1986). Estão presentes na placa, além dos macrófagos e células T, outros tipos de células como células dendríticas, mastócitos, células B e natural *killer* (Hansson; Libby, 2006).

Desde 1958, os macrófagos foram identificados nas placas de aterosclerose. Trata-se da principal célula da imunidade inata que domina a população de leucócitos em placas, além de participar de forma decisiva em todas as fases de progressão da lesão aterosclerótica. Quando ativados, secretam as metaloproteinases de matriz (MMPs), que por sua vez medeiam a progressão de lesões ateroscleróticas estáveis para um fenótipo instável propenso à ruptura (Johnson, 2007).

No espaço subendotelial os macrófagos sofrem diferenciação e polarização, em especial pelo fator estimulador de colônia macrófago (M-CSF) e fator estimulante de colônia de macrófago-granulocito (GM-CSF), mas também sob estímulo das citocinas e subprodutos locais (Zuniga; Whitw; Zhou, 2014). As células endoteliais, além de produzirem M-CSF e GM-CSF, fornecem fatores quimiotáticos potentes que afetam a quimiotaxia dos leucócitos e modulam o tônus vasomotor através da formação de óxido nítrico (NO), prostaciclina e endotelinas, como por exemplo, a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (Ross, 1993).

Os macrófagos apresentam heterogeneidade e plasticidade e quando expostos a diferentes estímulos externos se diferenciam em subfenótipos. Os dois principais subtipos de macrófagos amplamente aceitos são: pró-inflamatórios (M1) e macrófagos anti-inflamatórios (M2). Citocinas como IL-4, IL-13, IL-10 promovem a polarização M2, enquanto o INF- γ e LPS promovem o fenótipo M1. Adicionalmente, a resposta inflamatória pode ser induzida pelo estresse oxidativo, principalmente a oxidação da LDL, afetando a fenotipagem (Kunsch; Medford, 1999; Libby, 2002).

Assim como monócitos e macrófagos, as células do sistema imune adaptativo também exibem heterogeneidade. Na aterosclerose, as células T CD4⁺ podem se diferenciar em linhagens distintas, incluindo T *helper* 1 (Th1), Th2, Th17, T regulador

(Treg) e muitas outras células Th. As células Th1 produzem TNF- α e IFN- γ , indicando um papel pró-inflamatório e pró-aterogênico. As células Treg promovem a resolução inflamatória e “amortecem” a progressão da aterosclerose através da produção de IL-10 e TGF- β . Já o papel das células Th2, que secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, no desenvolvimento da aterosclerose ainda permanece controverso dependendo do estágio e/ou localização da lesão, bem como do modelo experimental (Mallat *et al.*, 2009).

As citocinas são fatores bioativos que regulam a interação célula a célula e desempenham um papel fundamental no processo de aterosclerose (Takahashi, 2011), além disso, vêm sendo apontadas como alvos terapêuticos (Tousoulis *et al.*, 2016; Tsioufis *et al.*, 2022).

Vários estudos apoiam o envolvimento da IL-1 β na aterotrombose (Dinarello, 2009; Fearon; Fearon, 2008; Kirii *et al.*, 2003). Outros estudos mostram que a superexpressão de IL-1Ra, um antagonista da IL-1, inibe o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos ApoE^{-/-} alimentados com uma dieta rica em colesterol (Merhi-Soussi *et al.*, 2005); e a ausência de IL-1R, receptor da IL-1, reduz a progressão da aterosclerose (Chi *et al.*, 2004).

A IL-6 é outra citocina que tem papéis importantes na fisiopatologia da aterosclerose. Níveis altos de IL-6 estão relacionados à gravidade da doença cardíaca coronariana (Aker *et al.*, 2009) e foram significativamente aumentados em casos de ruptura da placa (Held *et al.*, 2017). A IL-6 é um marcador útil de inflamação em curso (Sherwood; Toliver-Kinsky, 2004) e da vulnerabilidade das placas ateroscleróticas (Zhu *et al.*, 2018; Held *et al.*, 2017; Kamtchum-Tatuene *et al.*, 2022). Estudos revelam que o efeito ateroprotetor é mediado pela redução nos níveis circulantes de IL-6 (Ridker *et al.*, 2018; Ridker *et al.*, 2020) e estudos genéticos demonstram a relação causal entre a sinalização de IL-6 e a doença cardiovascular aterosclerótica (Swerdlow *et al.*, 2012; Georgakis *et al.*, 2021a). Além disso, anticorpos monoclonais humanos visando a IL-6 vem sendo estudados como agentes adjuvantes promissores para prevenir acidente vascular cerebral isquêmico em pacientes com aterosclerose carotídea (Ridker; Rane, 2021; Ridker *et al.*, 2021).

O TNF- α é um componente crítico na ativação do fator de transcrição nuclear kappaB (NF- κ B), um regulador principal da inflamação, e contribui tanto para o início quanto para a manutenção da inflamação vascular. O TNF- α induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e tem efeitos profundos nas células musculares lisas vasculares (VSMCs), incluindo uma mudança fundamental de um fenótipo contrátil para secretor, que favorece proliferação e produção de proteínas da matriz extracelular que estão associadas à hipertrofia medial. Além disso, promove o armazenamento de lipídios e maior motilidade, alterações que sustentam a contribuição das VSMCs para a neoíntima e a formação da placa aterosclerótica. A ausência do TNF- α ou seus receptores em camundongos resulta em proteção contra lesões cardiovasculares agudas e crônicas. Níveis elevados e persistentes de TNF- α podem levar à apoptose e necrose, desestabilização da neoíntima e, eventualmente, ruptura da placa com oclusão do vaso por trombo (Lamb; Choi; Stark, 2020).

A IL-10, por sua vez, é uma citocina anti-inflamatória produzida em grande parte por macrófagos Th2 e células Treg. Na aterosclerose, é considerada protetora contra o desenvolvimento e progressão da placa (Caligiuri *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2010), exercendo seus efeitos protetores por meio da inibição da inflamação (supressão de IL-1, IL-6 e TNF- α), estresse oxidativo, adesão de monócitos endoteliais e apoptose lesional de células espumosas (Yoshioka *et al.*, 2004; Pinderski *et al.*, 2002). Dados em animais sugerem que a IL-10 melhora a estabilidade da placa (Caligiuri *et al.*, 2003) e promove a redução do tamanho da lesão (Pinderski *et al.*, 2002). Todavia, a variação nos resultados dos estudos em humanos sugere que os níveis circulantes de IL-10 provavelmente flutuam de acordo com o contexto clínico (Tsioufis *et al.*, 2022; Goldwater *et al.*, 2019).

Outro mediador importante na fisiopatologia da aterosclerose é a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), uma quimiocina pró-inflamatória (Georgakis *et al.*, 2021b). É expressa principalmente por células inflamatórias e células endoteliais e seu nível de expressão é regulado positivamente após estímulos pró-inflamatórios e lesão tecidual. A quimiocina MCP-1 desempenha um papel na adesão de monócitos às placas ateroscleróticas humanas (Papadopoulou *et al.*, 2008). Estudos experimentais de aterosclerose sugerem que o direcionamento da sinalização de MCP-1 atenua a progressão da aterosclerose e a desestabilização da placa em

camundongos ApoE^{-/-} (Bot *et al.*, 2017; Inoue *et al.*, 2002). Em humanos, níveis mais elevados de MCP-1 estão associados a características histopatológicas, moleculares e clínicas de vulnerabilidade da placa em indivíduos submetidos à endarterectomia carotídea (Georgakis *et al.*, 2021b), à gravidade da doença aterosclerótica subclínica em mulheres na pós-menopausa (Basurto *et al.*, 2019) e a uma maior mortalidade cardiovascular a longo prazo em indivíduos livres de doença cardiovascular evidente (Georgakis *et al.*, 2021c).

3.2. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula sinalizadora em muitos processos fisiológicos, principalmente no sistema cardiovascular, estando a redução de sua biodisponibilidade relacionada a doenças crônicas como a hipertensão, lesão por isquemia reperfusão, aterosclerose e diabetes (Lundberg *et al.*, 2015). No sistema imune, o NO é necessário para defesa do hospedeiro, ajudando a erradicar patógenos invasores e células tumorais. Também é importante na cicatrização normal, atuando na síntese de colágeno e na angiogênese. Contudo, apesar da importância na sinalização fisiológica, o excesso de NO pode ser extremamente citotóxico (Bogdan, 2001).

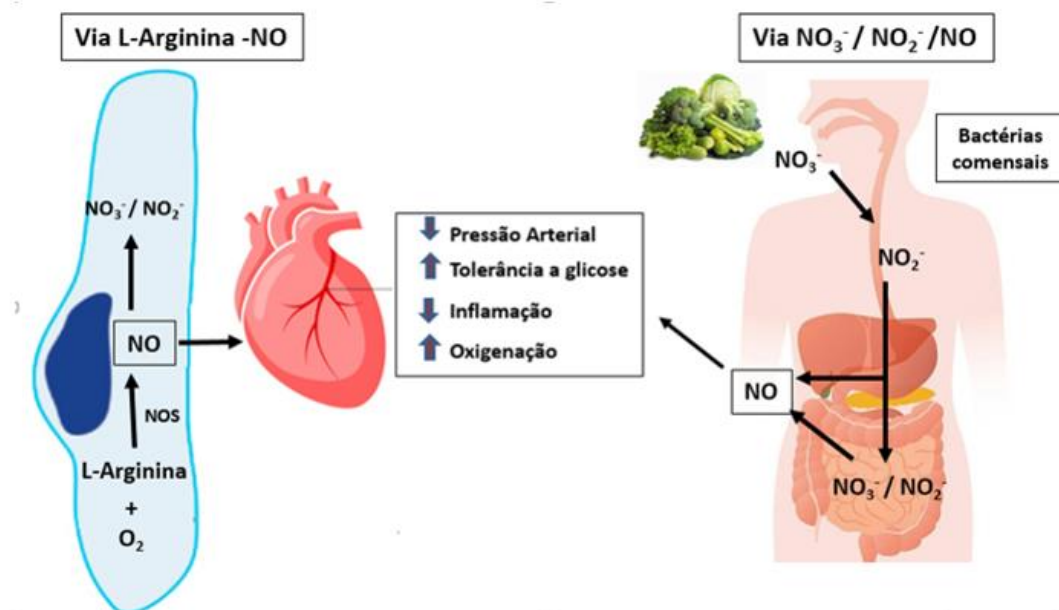
O NO é produzido endogenamente pelo óxido nítrico sintase (NOS) na presença de substratos com a L-argina e de vários cofatores, incluindo o fosfato reduzido de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e tetrahidrobiopterina (BH4). Pode ser produzido independente da NOS pela via nitrato-nitrito-NO, através da redução em série dos ânions inorgânicos nitrato e nitrito (Lundberg *et al.*, 2008). Nesse caso, o NO exógeno é produzido a partir da ingestão dietética de nitratos e nitritos que são reduzidos por bactérias comensais na cavidade oral e protonados em ácido nitroso e decompostos em NO no estômago e nos intestinos (Figura 3) (Ramms; Gordts, 2016).

Existem três isoformas funcionais de NOS: a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), ambas constitutivas, e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), isoforma induzível em situações específicas. A eNOS é expressa principalmente em células endoteliais. Mantém os vasos sanguíneos dilatados, controla a pressão sanguínea e tem vários outros efeitos vasoprotetores e

antiateroscleróticos. Seus níveis podem ser aumentados pelo estresse de cisalhamento ou exercício, assim como podem ser reduzidos por estímulos inflamatórios (Förstermann; Sessa, 2012).

A eNOS e a nNOS produzem NO em pequenas quantidades, enquanto a iNOS, quando é induzida por citocinas e outras células como macrófagos, linfócitos T e neutrófilos, sintetiza quantidades maiores de NO comparada com as isoformas constitutivas. Ao contrário das isoformas constitutivas, a iNOS encontra-se ligada à calmodulina mesmo em baixas concentrações de cálcio intracelular, tornando sua atividade independente das flutuações dos níveis de cálcio (Förstermann; Sessa, 2012).

Figura 3: Metabolismo de NO endógeno e exógeno.



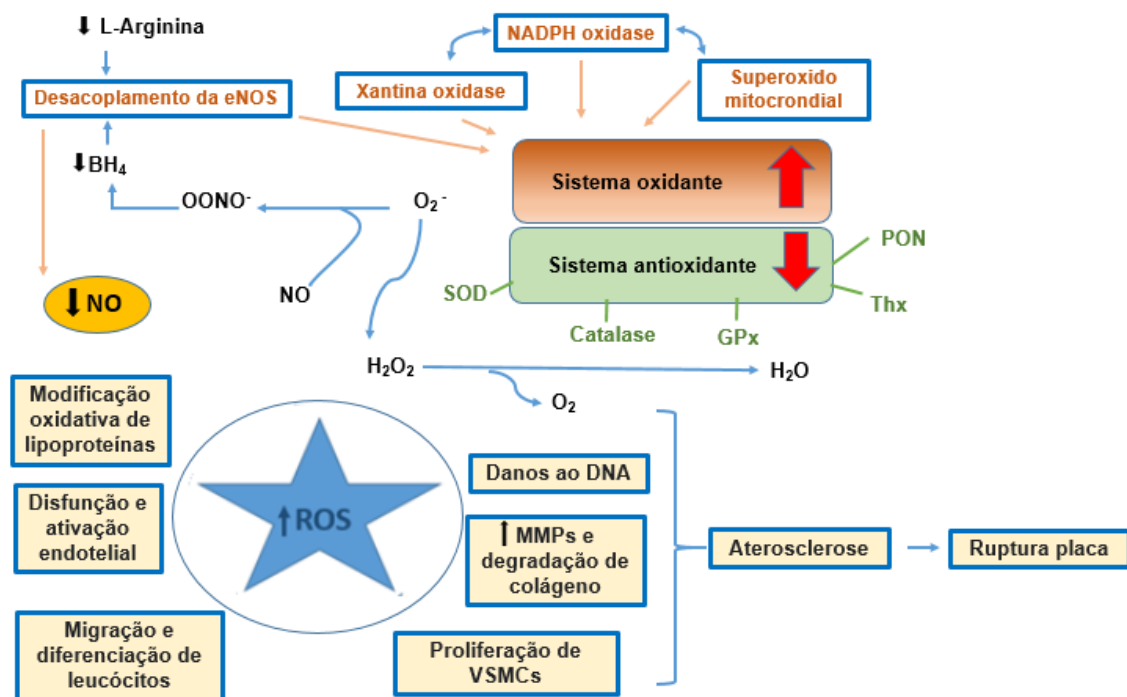
Fonte: Adaptado (Ramms; Gordts, 2016).

A grande quantidade de NO derivado da iNOS tem efeitos citostáticos nas células-alvo, além de contribuir para a fisiopatologia de doenças inflamatórias e choque séptico (Förstermann; Sessa, 2012). O NO derivado de nNOS e eNOS protegem contra a aterosclerose, enquanto a iNOS parece desempenhar um papel pró-aterogênico (Li; Horke; Forstermann, 2014). A disponibilidade reduzida de substratos e cofatores para a produção de NO leva o desacoplamento da NOS, de modo que a enzima passa a produzir superóxido (O_2^-) no lugar do NO, que por sua

vez pode reagir com NO para gerar peroxinitrito (ONOO^-). Este processo contribui para a diminuição progressiva da biodisponibilidade do NO vascular observada durante o envelhecimento e DCV (Lundberg *et al.*, 2015).

As espécies reativas de oxigênio (ROS), a exemplo do O_2^- e ONOO^- , são compostos químicos formados a partir da ativação ou redução de uma molécula de O_2 ou dos produtos derivados de sua redução. Trata-se de um grupo de pequenas moléculas reativas que desempenham papéis críticos na regulação de várias funções celulares e processos biológicos. Embora essencial para a homeostase vascular, a produção descontrolada de ROS está implicada na lesão vascular (Forstermann; Xia; Li, 2017; Chen *et al.*, 2018).

Figura 4: Estresse oxidativo na aterosclerose



Fonte: Adaptado (Kattoor *et al.*, 2017). Desequilíbrio entre o sistema oxidante e antioxidante resulta em redução do óxido nítrico (NO) e aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) com implicações em vários estágios da aterosclerose. eNOS: óxido nítrico sintase endotelial, SOD: superóxido dismutase, GPx: glutathione peroxidases, PON: paraoxonases, Thx: tioredoxinas, MMPs: metaloproteinase de matriz, VSMCs: células musculares lisas.

Durante condições de estresse inflamatório e oxidativo, as ROS são produzidas por vários sistemas, incluindo NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase, xantina oxidase (XO), enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e NOS

desacoplada e disfuncional. Os antioxidantes endógenos funcionam como pontos de controle para evitar as consequências indesejáveis das ROS e um desequilíbrio nos mecanismos oxidantes/antioxidantes leva a um estado de estresse oxidativo (Ramms; Gordts, 2016). Os principais sistemas antioxidantes na parede vascular são a superóxido dismutases (SOD), glutathione peroxidases (GPx) catalases, paraoxonases (PON), tioredoxinas (Thx) e NO (Forstermann; Xia; Li, 2017). A geração de ROS em excesso é um mecanismo crítico na aterosclerose, com implicações na proliferação celular, migração leucocitária, modificação oxidativa das lipoproteínas, disfunção endotelial, danos ao DNA, aumento das metaloproteinases (MMP), degradação de colágeno e proliferação de células musculares lisas (Figura 4) (Kattoor *et al.*, 2017).

3.3. Nitratos orgânicos e NDBP

Nitratos orgânicos como nitroglicerina, mononitrato de isossorbida e dinitrato de isossorbida são comumente usados na terapia de doenças cardiovasculares como doença arterial coronariana sintomática e hipertensão, oferecendo benefícios no manejo de distúrbios vasculares caracterizados por disfunção endotelial e deficiência de NO (Russo; Leopold; Loscalzo, 2002). No entanto, a terapia a longo prazo com nitratos orgânicos resulta no rápido desenvolvimento da tolerância, limitando sua eficácia hemodinâmica e anti-isquêmica e está associada às modificações potencialmente deletérias, como aumento do estresse oxidativo, disfunção endotelial e aumento da ativação simpática (Klemenska; Beręsewicz, 2009).

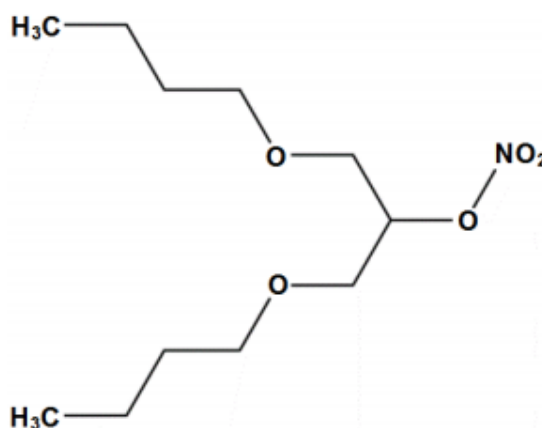
Na aterosclerose, os estudos sobre o efeito da administração crônica de nitratos orgânicos são muito limitados, mas o tratamento a longo prazo de coelhos hipercolesterolêmicos com uma dose baixa de tetranitrato de pentaeritritol (6 mg/kg/dia por 16 semanas) demonstrou reduzir a progressão da formação de lesões, disfunção endotelial e oxidação de LDL (Hacker *et al.*, 2001).

O 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP) é um novo nitrato orgânico sintetizado a partir da glicerina, um importante subproduto da rota de produção do biodiesel. O peso molecular do composto é 249,304, sua fórmula molecular é $C_{11}H_{23}NO_5$ e sua estrutura química pode ser observada na Figura 5.

De acordo com pesquisas recentes em modelos experimentais, o NDBP é um promissor agente terapêutico no tratamento de doenças cardiovasculares. *In vivo*

demonstrou efeito hipotensor e bradicárdico de maneira dose dependente em ratos normotensos não anestesiados e *in vitro* induziu o relaxamento 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). Em animais hipertensos atenuou o estresse oxidativo via redução na produção de ânion superóxido por indução da NADPH oxidase (Porpino *et al.*, 2016). Além disso, o NDBP não induziu tolerância (França-Silva, 2012) e apresentou 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 (Leite, 2019).

Figura 5: Estrutura química do 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP)



Fonte: França-Silva, 2012.

3.4. Nitratos e nitritos inorgânicos

O nitrato e nitrito inorgânico originam-se da oxidação do NO endógeno proveniente da ação da NOS ou através da dieta com vegetais de folhas verdes, que são ricos em nitrato. Os efeitos do nitrato e do nitrito inorgânicos são diversos e incluem vasodilatação, melhora da função endotelial, maior eficiência mitocondrial, menor geração de espécies reativas de oxigênio (OSMAR *et al.*, 2016) e efeitos anti-inflamatórios (Jadert *et al.*, 2012).

Historicamente os nitratos inorgânicos foram utilizados antes mesmo dos nitratos orgânicos, por volta de 700 DC para tratamento de doença coronariana pelos

chineses (Butler; Feelisch, 2008). Contudo, o uso indiscriminado e em altas doses do nitrito inorgânico no tratamento de hipertensão, angina e outras doenças como epilepsia, gerou efeitos colaterais como hipotensão grave e metahemoglobinemia letal, sendo quase extinto da terapia médica. Passaram a ser utilizados apenas como antídoto terapêutico para dois agentes tóxicos, cianeto e sulfeto de hidrogênio (Wilkins *et al.*, 1937).

Todavia, estudos clínicos demonstraram que a suplementação com nitrito é segura e pode ser efetivamente usada como um novo paradigma de tratamento para uma variedade de distúrbios clínicos (Pluta *et al.*, 2011). Os achados de Hezel e colaboradores (2015) também não apoiam um efeito tóxico em longo prazo do nitrato dietético. A suplementação de nitrato foi associada à melhor resposta a insulina, diminuição IL-10 no plasma e tendência de melhora da longevidade. Outros estudos mostram que a suplementação com nitratos ou nitritos é capaz de reduzir o estresse oxidativo e a atividade inflamatória em modelos experimentais de doença renal e cardiovascular, com consequente redução da pressão arterial (Carlstrom *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015). O consumo crônico de NaNO_3 (10mM), a partir dos 15 meses de idade até a morte natural, não exerceu influência sobre a longevidade e tempo de vida médio de ratos Wistar, independentemente do sexo, como também, gerou benefícios sobre a disfunção endotelial em animais idosos (Carvalho, 2021).

O nitrito está associado à prevenção da inflamação microvascular hipercolesterolêmica, revertendo a disfunção endotelial de camundongos C57 alimentados com dieta rica em colesterol (Stokes *et al.*, 2009), melhora da viabilidade de células e órgãos após lesão de isquemia-reperfusão (Münzel; Daiber, 2018), diminuição da produção de superóxido em macrófagos estimulados por LPS através da inibição direta da NADPH oxidase (Yang *et al.*, 2015), redução na formação de peroxinitrito e hipoclorito dentro de neutrófilos ativados após incubação com nitrito inorgânico (Ren *et al.*, 2016), e na aterosclerose, o nitrato inorgânico na dieta está associado a um fenótipo de placa estável (Khambata *et al.*, 2017).

Os efeitos da terapia com nitrito e nitrato inorgânicos, portanto, parecem ir além da função de doador de NO puro, pois mecanismos protetores adicionais como efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios foram identificados em diversos trabalhos

(Khambata *et al.*, 2017; Zollbrecht *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2016 Yang *et al.*, 2015; Stamm *et al.*, 2021). No entanto, apesar desses aspectos positivos, ainda há uma ampla necessidade de estudar a terapia com nitrato e nitrito inorgânico em várias doenças cardiovasculares, pois em caso de sucesso, esse tipo de terapia representaria de fato uma terapia cardiovascular barata, acessível, eficaz e sem grandes efeitos colaterais como aqueles observados em resposta à terapia com nitratos orgânicos (Münzel; Daiber, 2018).

3.5. Caracterização do modelo ApoE^{-/-}

Modelos de camundongos geneticamente modificados, particularmente camundongos deficientes em apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) tem sido amplamente utilizados em estudos de aterosclerose pré-clínica para obter informações sobre os mecanismos subjacentes a essa patologia e no desenvolvimento de novas drogas contra a aterosclerose (Jawien, 2012). É possível estudar o efeito da dieta, o papel da inflamação, oxidação e imunomodulação, coagulação e composição da placa, progressão do ateroma e regressão nos camundongos ApoE^{-/-} (Davignon *et al.*, 1999; Ohashi *et al.*, 2004).

As primeiras evidências de aterosclerose experimental surgiram em 1908 em aorta de coelhos alimentados com uma dieta rica em proteínas animais. Até 1992, a maioria das pesquisas sobre aterosclerose concentrava-se em grandes modelos animais como coelhos, suínos ou primatas. A partir de então foi desenvolvida a primeira linhagem de modelos animais direcionados a genes e o modelo *knockout* ApoE^{-/-} passou a ser bastante utilizado nas pesquisas com aterosclerose (Jawién; Nastalek, Korbut, 2004).

O gene da apoproteína E é um dos principais genes determinantes dos níveis de lipídeos no plasma em seres humanos e camundongos (Hofker *et al.*, 1998). A apoE é uma glicoproteína rica em arginina com peso molecular de 34 kDa, sintetizada principalmente no fígado e cérebro, podendo ser sintetizadas por monócitos e macrófagos nos vasos sanguíneos. Apresenta efeitos locais na homeostase do colesterol e, nas reações inflamatórias que ocorrem nos vasos ateroscleróticos, pode afetar a secreção de várias citocinas devido ao seu papel imunomodulador (Meir *et al.*, 2004). Por ser um constituinte da superfície de lipoproteínas, principalmente very

low-density lipoprotein (VLDL), *high-density lipoprotein* (HDL) e quilomícrons (QM), a apoE desempenha um papel funcional no *clearance* das lipoproteínas plasmáticas (Davignon *et al.*, 1999).

Camundongos deficientes em apoE foram criados por recombinação homóloga de células tronco embrionárias. A deficiência desta apolipoproteína resulta em níveis de colesterol elevados devido à remoção defeituosa das lipoproteínas remanescentes. Logo, o acúmulo de remanescentes de QM e VLDL no plasma constitui o estímulo aterogênico nestes animais (Breslow, 1996). Além disso, a apoE inibe a agregação plaquetária, exerce efeitos antiproliferativos, contribui para o efluxo de colesterol das células nas lesões ateroscleróticas e possui propriedades antioxidantes (Davignon *et al.*, 1999).

Os animais ApoE^{-/-} possuem colesterol plasmático mais alto do que os camundongos sem alteração genética e as lesões encontradas nesse modelo animal experimental apresentam um caráter bastante similar às observadas em seres humanos. Com o uso de dieta comercial normal, a presença de células espumosas é vista com aproximadamente 10 semanas de idade, lesões intermediárias, contendo células espumosas e células musculares lisas, são observadas com 15 semanas e placas fibrosas aparecem nos animais com 20 semanas de idade. O uso de dieta hipercolesterolêmica promove a aceleração do processo aterosclerótico nesses camundongos (Meir *et al.*, 2004).

Há muitas vantagens em utilizar camundongos nas pesquisas envolvendo aterosclerose experimental, uma vez que os animais possuem tamanho pequeno, fácil manutenção e manipulação, curto período de reprodução e *background* genético bem definido (Moghadasian *et al.*, 2001). Os camundongos sem alterações genéticas normalmente tem altos níveis de HDL e baixos níveis de LDL, em contraste com seres humanos que são ricos em LDL e pobres em HDL. Roedores não possuem a proteína de transferência de colesterol éster, enzima que transfere éster de colesterol de HDL para VLDL e LDL. Apesar dessas diferenças, camundongos deficientes em apoE têm fenótipos notavelmente similares àqueles humanos (altos níveis de VLDL, IDL e LDL), tratando-se portando de um modelo reconhecido para pesquisas na área, uma vez que são hipercolesterolêmicos e desenvolvem espontaneamente lesões ateromatosas (Jawień *et al.*, 2004).

A principal diferença deste modelo, em relação a outros modelos de aterosclerose experimental de maior porte, é que a ruptura da placa não comumente é observada, enquanto que a ruptura da placa é bastante comum em humanos e pode levar a ataques cardíacos decorrentes de trombose. A razão potencial para a falta de ruptura da placa em camundongos é que o diâmetro da aorta é inferior a 1 mm, que é menor do que o diâmetro da maior artéria coronária em humanos. À medida que o diâmetro do vaso diminui, a tensão superficial aumenta exponencialmente; assim, no camundongo pode haver tanta tensão superficial que a ruptura da placa não seria provável de ocorrer (Jawień *et al.*, 2004).

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) hipercolesterolêmicos *knockout* para a apolipoproteína E (ApoE^{-/-}), fêmeas, de 8 a 20 semanas de idade, e seus respectivos controles *wild type* da linhagem C57BL/6, pesando 20g a 30g. Todos os animais foram isogênicos, provenientes de cruzamentos *inbred*. Ficaram mantidos em estante com circulação e exaustão de ar (Alesco, São Paulo, Brasil), em gaiolas com no máximo 5 animais, sob condições controladas de temperatura (21±1°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12 horas) e acesso à água e ração *ad libitum*.

A criação, o manuseio e todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as orientações e a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB, número 3386050821.

4.2. Drogas testes

4.2.1. NDBP

O NDBP foi obtido por síntese orgânica a partir da glicerina (Santos *et al.*, 2009), e cedido pelo Prof. Dr. Petrônio Figueiredo de Athayde Filho e colaboradores do departamento de Química da UFPB.

Para realização dos protocolos experimentais o NDBP foi solubilizado em cremofor na proporção de 1:1 e diluído em solução salina (0,9%) para a concentração de 40mg/mL. A dose do NDBP foi embasada em estudos anteriores do nosso grupo (Porpino *et al.*, 2016).

4.2.2. Nitrito de sódio

O nitrito de sódio (NaNO₂), reagente ACS, pureza ≥ 97,0%, foi adquirido da Sigma Aldrich e solubilizado em água destilada para a concentração de 10⁻¹ M, seguido de diluições em solução salina (0,9%) para a concentração de 0,1mmol/mL. A definição da dose ocorreu com base em estudos prévios (Jädert *et al.*, 2012, Montenegro *et al.*, 2016).

4.3. Grupos experimentais e procedimentos

4.3.1. Modelo de inflamação aguda (peritonite)

Utilizamos o modelo de inflamação peritoneal induzida por zimosan (Doherty *et al.*, 1985) para avaliar o possível efeito agudo do NDBP e do nitrito de sódio em camundongos ApoE^{-/-} e C57BL/6 com 8 semanas.

Inicialmente realizamos um pré-tratamento por três dias com NDBP (40 mg/kg, i.p.) ou nitrito de sódio (0,1mmol/kg, i.p.). Após uma hora do último dia de pré-tratamento com NDBP ou nitrito de sódio, os camundongos foram desafiados com 500µL de zimosan na concentração 2mg/mL, preparada em salina (0,9%) estéril.

Os animais C57BL/6 e ApoE^{-/-} foram divididos em sete grupos experimentais: salina, cremofor, zimosan, NDBP, NDBP + zimosan, NaNO₂, NaNO₂ + zimosan. Cada grupo constituído por no mínimo cinco animais. A partir da separação, os grupos NDBP e NDBP + zimosan, foram pré-tratados durante três dias consecutivos com NDBP (dose 40mg/kg, i.p.) e os grupos NaNO₂, NaNO₂ + zimosan receberam pré-tratamento por três dias consecutivos com NaNO₂ (dose 0,1mmol/kg, i.p.). O grupo controle foi tratado apenas com salina, afim de enfrentar o mesmo estresse ocasionado pela injeção dos demais grupos. Os animais do grupo cremofor, foram tratados com dose 40mg/kg i.p. de cremofor, visto que o NDBP foi solubilizado em cremofor na proporção de 1:1 (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos experimentais para avaliação do efeito do NDBP ou NaNO₂ na inflamação aguda: modelo de peritonite em camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-}

GRUPOS	PRÉ- TRATAMENTO (3dias)	DESAFIO
Salina	Salina (i.p.)	
Cremofor	Cremofor (i.p.)	
Zimosan	-	Zimosan (i.p.)
NDBP	NDBP (i.p.)	
NDBP + Zimosan	NDBP (i.p.)	Zimosan (i.p.)
NaNO ₂	NaNO ₂ (i.p.)	
NaNO ₂ + Zimosan	NaNO ₂ (i.p.)	Zimosan (i.p.)

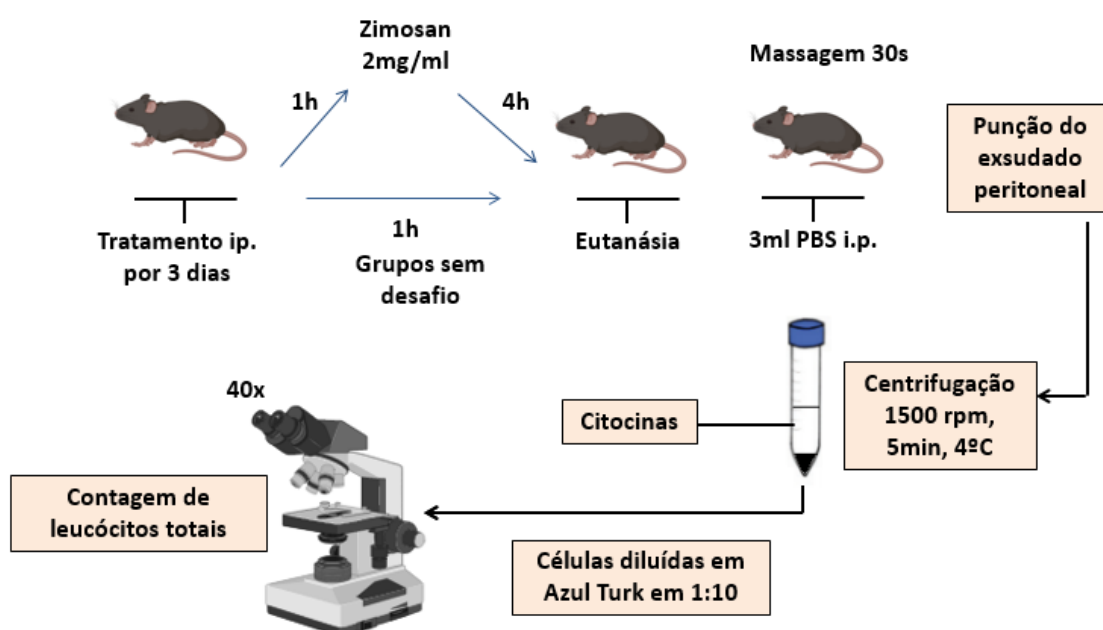
Legenda: i.p.: intraperitoneal. NDBP: 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano.

4.3.1.1. Coleta do lavado peritoneal e contagem de leucócitos

A coleta do lavado peritoneal foi realizada 4 horas após o desafio com zimosan. Os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, e em seguida foi realizado o lavado, introduzindo 3 ml de PBS gelado na cavidade peritoneal. Cuidadosamente, o peritônio foi massageado por 30 segundos seguido da punção do exsudato peritoneal. O exsudato coletado seguiu para tubos tipo eppendorf e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. Após o período de centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem das citocinas (Figura 6).

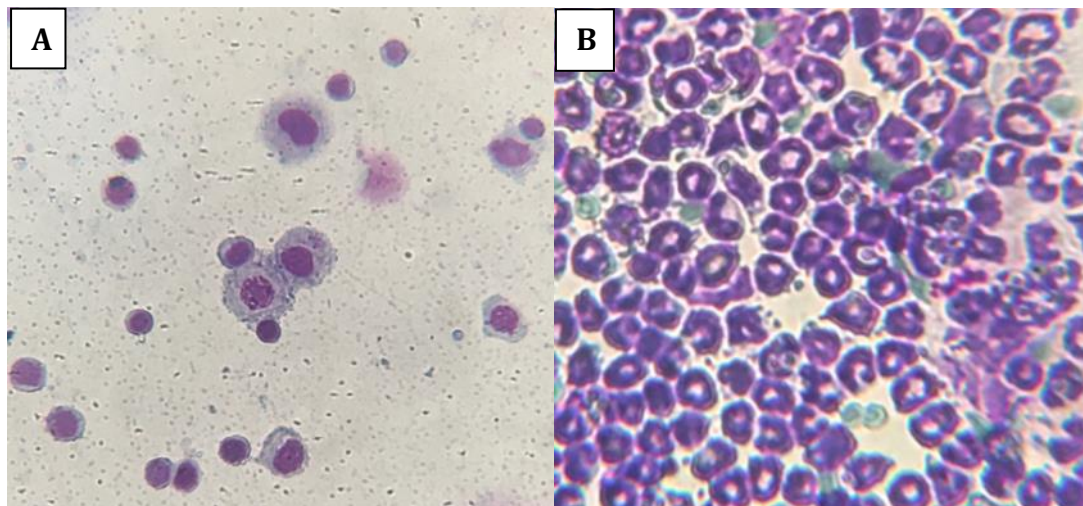
As células presentes nos pellets foram diluídas em azul de Turk (0,01% de cristal violeta em 3% de ácido acético) na proporção de 1:10 e contadas com auxílio da câmara de Neubauer para a determinação dos leucócitos totais. A leitura foi realizada no microscópio óptico em objetiva de 40x (BX40, OLYMPUS). Para a contagem diferencial de células do lavado peritoneal, utilizamos 50µL da suspensão de células do lavado peritoneal e centrifugamos em centrífuga tipo citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400), a 1500 rpm por 10 minutos. As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método de panótico (Figura 6).

Figura 6: Esquema do modelo de peritonite



A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica, utilizando para isso a objetiva de imersão (100x). Cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células. Mononucleares e polimorfonucleares foram identificados segundo coloração e características morfológicas (Figura 7)

Figura 7: Diferenciação de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares



A - Mononucleares (lâmina de um animal C57 do grupo salina) e B - Polimorfonucleares (lâmina de um animal C57 estimulado com zimosan). Objetiva 40x.

4.3.1.2. Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas

Para quantificação das citocinas IL-6, IL-10, TNF- α e MCP-1 utilizamos o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Esse é um dos métodos imunológicos mais utilizados para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, por apresentar grande sensibilidade e especificidade. Existem diversos tipos de ELISA, e nesse trabalho utilizamos o ELISA sanduíche. Nesse método, o anticorpo para um antígeno específico, chamado de anticorpo de captura é, inicialmente, adsorvido no poço da placa de 96 poços. Após isso, a amostra com o antígeno (lavado peritoneal) é adicionada e se liga a esse anticorpo. Logo após, é adicionado outro anticorpo específico para o antígeno, chamado anticorpo de detecção e em seguida, é adicionada a enzima, que irá reagir com o substrato adicionado, gerando cor. A intensidade da reação (cor mais fraca ou mais forte) é proporcional à quantidade de antígeno presente (Goldsby; Kindt; Osborne, 2000).

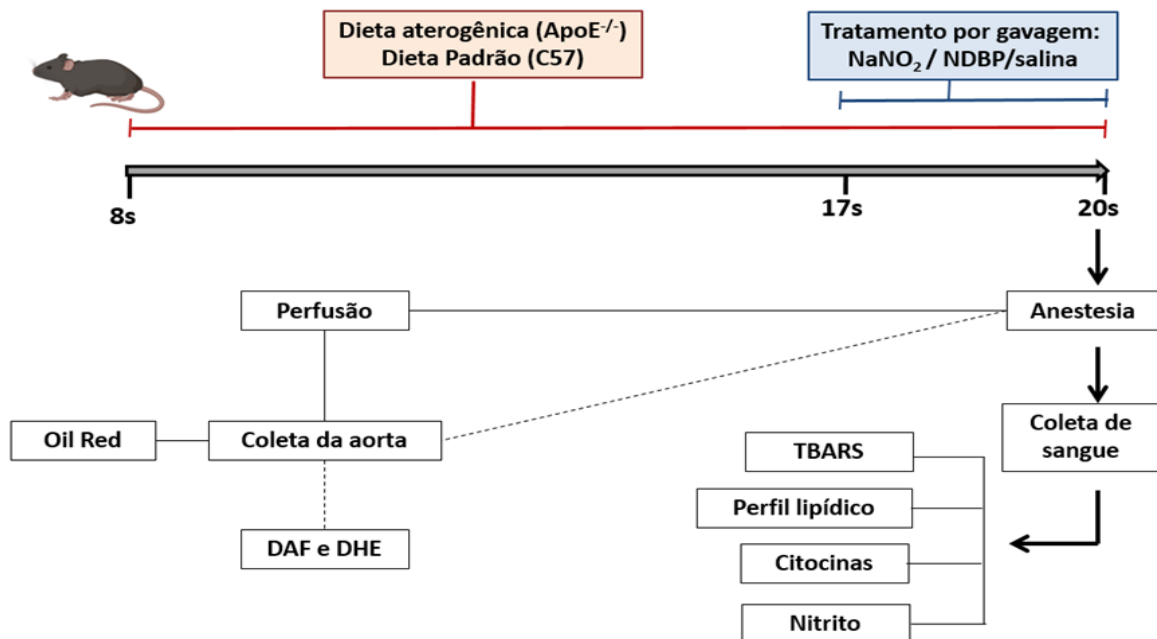
As citocinas IL-6, IL-10, TNF- α e MCP-1 presentes no exsudato peritoneal foram quantificadas por ELISA sanduíche de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). Para tal, as placas de ELISA (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-IL-6, anti-IL-10, anti-TNF- α e anti – MCP-1 diluído em tampão fosfato pH 6,5 e incubadas por 18 horas (overnight) a 4 °C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de soro fetal bovino) por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e adicionadas tanto as amostras a serem analisadas ou diferentes concentrações das citocinas IL-6, IL-10, TNF- α e MCP-1 para a realização das curvas. As placas foram novamente incubadas por 18 horas (overnight) a 4 °C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e o anticorpo de detecção referente a cada citocina foi adicionado e em seguida incubadas por uma hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e o complexo enzimático avidina-peroxidase (*avidin-HRP*) foi adicionado. As placas permaneceram incubadas por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e após 30 minutos, a reação foi interrompida com a solução de parada (ácido fosfórico 1M) e a leitura realizada em leitor de placa a 450 nm.

4.3.2. Modelo de aterosclerose experimental

Para avaliar o efeito crônico do NaNO₂ e do NDBP nos utilizamos o modelo de aterosclerose experimental em camundongos. Os camundongos ApoE^{-/-} ao atingirem 8 semanas de idade receberam dieta aterogênica Western Type (Rhoister, São Paulo, Brasil), contendo 41% de calorias em forma de lipídios e 1,5% de colesterol. Esta dieta foi administrada para acelerar o processo de desenvolvimento de disfunção endotelial e das placas de aterosclerose, durante as 12 semanas subsequentes. Os animais controle receberam dieta padrão para roedores.

O NaNO₂ (0,1mmol/kg/dia), NDBP (40mg/kg/dia) ou salina foram administrados durante as 3 últimas semanas por gavagem, perfazendo seis grupos experimentais C57 + salina, C57 + NaNO₂, C57 + NDBP, ApoE^{-/-} + salina, ApoE^{-/-} + NaNO₂ e ApoE^{-/-} + NDBP. Cada grupo foi constituído por no mínimo cinco animais (n=5).

Figura 8 - Resumo do protocolo de aterosclerose experimental



Fonte: Autor, 2023.

4.3.2.1. Dosagem de colesterol e suas frações

Após a eutanásia e coleta do sangue dos animais, o plasma foi obtido por centrifugação e armazenado a -20°C até uso posterior. Para a dosagem de colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos utilizamos kits comerciais colorimétricos (Bioclin®, Quibasa, Brasil), de acordo com as orientações do fabricante. As leituras foram executadas no espectrofotômetro automático (Chemwell T, Chemistry Analyzer, 4600, USA). As concentrações de VLDL e IDL foram estimadas pela subtração das frações de HDL e LDL do valor de colesterol total plasmático.

4.3.2.2. Avaliação da peroxidação lipídica plasmática

Para obtenção de uma estimativa do estresse oxidativo plasmático, utilizamos a avaliação da peroxidação lipídica conforme previamente padronizado (Cavalcanti *et al.*, 2016). O nível de peroxidação lipídica das amostras foi medido pelo malondialdeído (MDA), que é o produto final da peroxidação lipídica e reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) produzindo um complexo de cor vermelha. Primeiramente, foi separado

125 µL do soro coletado e incubado por 1 hora em banho-maria a 37 °C. Em seguida 200 µL de ácido perclórico foram adicionados e, após homogeneização, o conteúdo centrifugado a 14000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido, misturado com 200 µL de ácido tiobarbitúrico 0,6% e incubado a 100 °C por 1 hora em banho-maria. Após esfriar, a absorbância das amostras foi mensurada em 532 nm em um espectrofotômetro automático (Chemwell T, Chemistry Analyzer, 4600, USA). A curva padrão foi obtida utilizando o 1,1,3,3-tetrametoxipropano (malondialdeído). Os resultados foram expressos como nmol de MDA/mL de soro.

4.3.2.3. Avaliação do nitrito plasmático

Os níveis de nitrito foram mensurados nas amostras de plasma pelo método de Griess (Green *et al.*, 1982). Nesta técnica, 50 µL de amostra foram pipetados para a placa, sendo posteriormente adicionados 50 µL do reagente de Griess [sulfanilamida a 2%, N-(1-naftil)etilenodiamina a 0,2% e ácido ortofosfórico em água destilada/deionizada]. A mistura amostra/reagente de Griess foi incubada por 10 minutos e a leitura, realizada em 540 nm. Todas as incubações foram realizadas a temperatura ambiente e os resultados expressos em µmol/L com base na curva padrão de nitrito (realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5 µM).

4.3.2.4. Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas foram realizada por ELISA conforme descrito anteriormente. As citocinas IL-6, TNF-α, IL-10, MCP-1 presentes no plasma foram quantificadas por ELISA sanduíche de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

4.3.2.5. Avaliação da deposição de placa aterosclerótica

Os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via i.p. e, então, perfundidos com salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline* – PBS), pH 7,4, a uma pressão semelhante à pressão arterial média dos animais (100 mmHg) para manutenção da estrutura vascular. Em seguida, realizou-se a fixação dos tecidos com paraformaldeído a 4% em PBS pH 7,4. As aortas foram cuidadosamente retiradas, limpas e armazenadas em fixador até o momento do

processamento histológico. Para a realização dos cortes histológicos (7 µm de espessura), as peças montadas em meio de inclusão para criostato foram congeladas e cortadas em micrótomo criostato (CM1850, Leica, Nussloch, Alemanha). Os cortes obtidos a partir da raiz da aorta, foram montados em lâminas gelatinizadas e armazenados em geladeira até o momento da coloração por, no máximo, 1 semana. A quantificação da deposição de placa aterosclerótica foi feita em corte corados com Oil-Red-O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após retirada do OCT com água, as lâminas foram mantidas em contato com a solução de corante por 10 minutos. A lesão aterosclerótica foi quantificada utilizando-se um microscópio (Olympus AX70, Olympus, Center Valley, PA, USA), interfaceado a uma câmera digital (VKC150, Hitachi, Tokyo, Japan) e a análise das imagens foi realizada com o sistema de análise Image J (domínio público). A área de lesão em cada animal foi quantificada por um investigador cego ao grupo experimental e expressa como porcentagem do lúmen vascular ocupada pela placa aterosclerótica.

4.3.2.6. Avaliação do estresse oxidativo e produção de NO em aorta

Para a avaliação do estresse oxidativo tecidual *in situ*, cortes de tecido não fixados foram mantidos a 37°C e incubados durante 30 minutos em câmara úmida, com DHE (dihidroetídeo, 5 µM) em solução de Krebs. O DHE é um fluorocromo que, na presença de ânions superóxido e outras ROS, é oxidado a etídeo, interage com o DNA da célula e emite fluorescência vermelha (Sharikabad *et al.*, 2013). A intensidade de fluorescência foi considerada proporcional ao estresse oxidativo tecidual e quantificada em fotomicrografias capturadas utilizando-se um microscópio de fluorescência acoplado a câmera digital microscopia de fluorescência (NIKON Eclipse Ti-E 200-S, NIKON®, Japão), por um observador cego aos protocolos experimentais, utilizando o programa Image J.

Para a avaliação da biodisponibilidade de óxido nítrico tecidual *in situ*, cortes de tecido não fixados foram mantidos a 37°C e incubados durante 30 minutos em câmara úmida, com DAF-2DA (diaminofluoresceína-2 diacetato, 10 µM) em solução de Krebs. O DAF é capaz de penetrar no citoplasma celular, onde é clivado em 4,5-diaminofluoresceína. Na presença de NO dentro da célula, este composto forma um produto triazólico, que emite fluorescência de cor verde, cuja intensidade é proporcional à biodisponibilidade intracelular de NO (Schachnik, 2008). A intensidade

de fluorescência foi quantificada em fotomicrografias capturadas utilizando-se um microscópio de fluorescência, acoplado à câmera digital (NIKON Eclipse Ti-E 200-S, NIKON®, Japão), por um observador cego aos protocolos experimentais, utilizando o programa Image J.

4.4. Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para análise estatística foi realizado a análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguidas do post hoc de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 95%. Foi utilizado o software Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito agudo do NaNO₂ e do NDBP

5.1.1. Efeito agudo do NaNO₂ e do NDBP na migração de células inflamatórias e citocinas em camundongos C57BL/6 fêmea

A administração de zimosan induziu extensa migração de células para a cavidade peritoneal, confirmando a efetividade do modelo experimental. O pré-tratamento de 3 dias com NaNO₂ (dose de 0,1mmol/kg/dia) nos animais estimulados foi capaz de reduzir em 35% a migração dessas células para o peritônio comparado ao grupo zimosan ($3,38 \pm 0,44 \times 10^6$ células/mL vs $5,26 \pm 0,37 \times 10^6$ células/mL, $p < 0,0001$), enquanto o pré-tratamento com NDBP (40mg/kg/dia) nos animais estimulados resultou em aumento no número de leucócitos totais em 66% em relação ao grupo zimosan ($8,75 \pm 0,90 \times 10^6$ células/mL vs $5,26 \pm 0,37 \times 10^6$ células/mL, $p < 0,0001$). Além disso, não houve diferença estatística entre os animais que receberam apenas nitrito de sódio ($1,08 \pm 0,15 \times 10^6$ células/mL), NDBP ($2,27 \pm 0,25 \times 10^6$ células/mL) em relação ao grupo salina ($0,57 \pm 0,08 \times 10^6$ células/mL) (Gráfico 1A).

Na análise das diferentes subpopulações de células, a administração de zimosan induziu aumento no número de polimorfonucleares, com aumento de mais de 250 vezes no exsudato peritoneal em relação ao grupo salina ($5,14 \pm 0,36 \times 10^6$ células/mL vs $0,02 \pm 0,009 \times 10^6$ células/mL, $p < 0,0001$). O pré- tratamento com NaNO₂ nos animais estimulados foi capaz de reduzir em 36% a migração de polimorfonucleares para o peritônio em comparação ao grupo zimosan ($3,28 \pm 0,44 \times 10^6$ células/mL vs $5,14 \pm 0,36 \times 10^6$ células/mL, $p < 0,0001$), enquanto que o tratamento com NDBP nos animais estimulados ($8,13 \pm 0,89 \times 10^6$ células/mL) aumentou o número de polimorfonucleares em 58% comparado ao grupo zimosan. Não houve diferença nas médias do grupo NaNO₂ ($0,13 \pm 0,04 \times 10^6$ células/mL), salina ($0,02 \pm 0,009 \times 10^6$ células/mL), NDBP ($0,83 \pm 0,16 \times 10^6$ células/mL) na contagem de polimorfonucleares (Gráfico 1B).

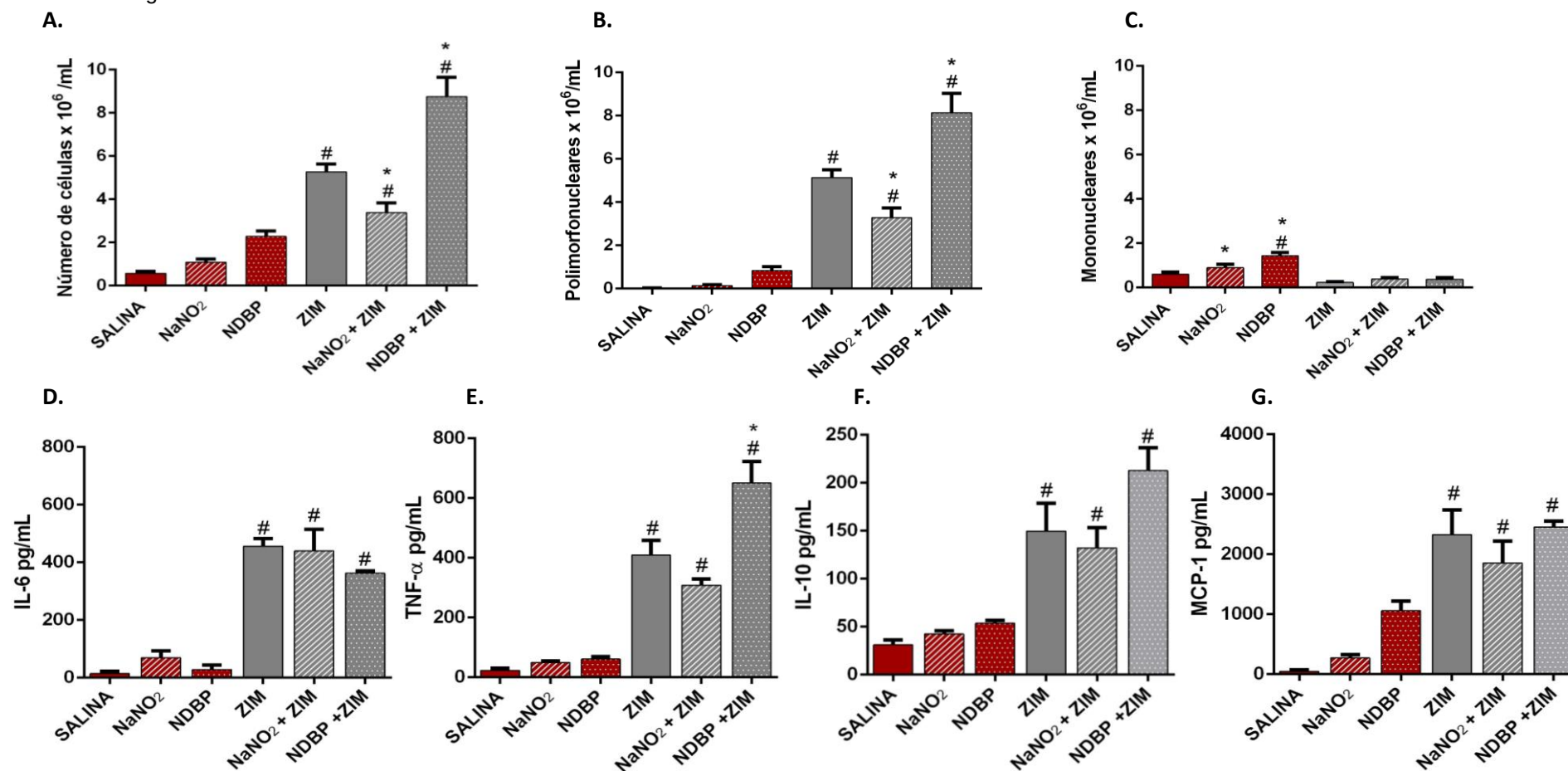
Em relação às células mononucleares, apenas os animais do grupo NDBP diferiram do grupo salina apresentando um aumento no número de mononucleares no infiltrado peritoneal ($1,43 \pm 0,13 \times 10^6$ células/mL vs $0,59 \pm 0,10 \times 10^6$ células/mL,

$p < 0,0001$). Foi observado também um aumento dessa população de células nos grupos que receberam apenas NDBP e NaNO_2 ($0,89 \pm 0,15 \times 10^6$ células/mL) em relação ao grupo zimosan ($0,22 \pm 0,03 \times 10^6$ células/mL) (Gráfico 1C).

Na análise das citocinas, os camundongos C57BL/6 estimulados com zimosan apresentaram aumento significativo nas concentrações (dados em pg/mL) das citocinas IL-6, TNF- α , MCP-1 e IL-10 quando comparadas com as dos animais do grupo salina. O pré-tratamento com NaNO_2 não alterou os níveis das citocinas IL-6, TNF- α , MCP-1 e IL-10 quando comparados ao grupo zimosan. Já o pré-tratamento com NDBP aumentou o nível plasmático de TNF- α . Também não foi observado diferença entre o grupo NaNO_2 ou NDBP sem desafio em comparação ao grupo salina nas citocinas analisadas.

O grupo cremofor não foi ilustrado nos gráficos pois não houve diferença com o grupo salina em nenhum dos parâmetros avaliados.

Gráfico 1: Efeito do NaNO_2 e NDBP na migração de leucócitos totais e diferencial e nos níveis de citocinas durante peritonite induzida por zimosan em camundongos C57BL/6 fêmea



Camundongos C57BL/6 fêmeas (n=5-10) foram pré-tratados durante três dias consecutivos através de injeções intraperitoneais de NaNO_2 (0,1mmol/kg/dia), NDBP (40mg/kg/dia) ou salina. Uma hora após o último dia de pré-tratamento, os animais foram estimulados com 500 μL de zimosan (ZIM) (2mg/mL). Quatro horas após o desafio com zimosan, o exudato peritoneal foi coletado para avaliar o número de leucócitos totais e diferencial e citocinas. A: Número de leucócitos totais. B: Número de leucócitos polimorfonucleares. C: Número de leucócitos mononucleares. D: IL-6. E: TNF- α . F: IL-10 e G: MCP-1. Os dados numéricos estão apresentados em média $\pm$ EPM. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Foi feito ANOVA One-way seguido pelo pós teste de Tukey. # $p < 0,0001$ vs Salina, * $p < 0,0001$ vs ZIM.

5.1.2. Efeito agudo do NaNO₂ e do NDBP na migração de células inflamatórias e citocinas em camundongos ApoE^{-/-} fêmeas

A administração de zimosan nos camundongos ApoE^{-/-} fêmea induziu extensa migração de células para a cavidade peritoneal dos camundongos confirmando a efetividade do modelo experimental. O pré-tratamento (3 dias) com NaNO₂ nos animais estimulados ($4,25 \pm 1,08 \times 10^6$ células/mL) não diferiu de forma significativa do grupo zimosan ($4,22 \pm 0,78 \times 10^6$ células/mL) enquanto que o pré-tratamento com NDBP (40mg/kg) nos animais estimulados ($8,91 \pm 1,50 \times 10^6$ células/mL) resultou em aumento no número de leucócitos totais em 111% em relação ao grupo zimosan. Não houve diferença estatística entre os animais que receberam apenas NaNO₂ ($1,23 \pm 0,33 \times 10^6$ células/mL), o NDBP ($1,98 \pm 0,26 \times 10^6$ células/mL) e o grupo salina ($0,95 \pm 0,25 \times 10^6$ células/mL) (Gráfico 2A).

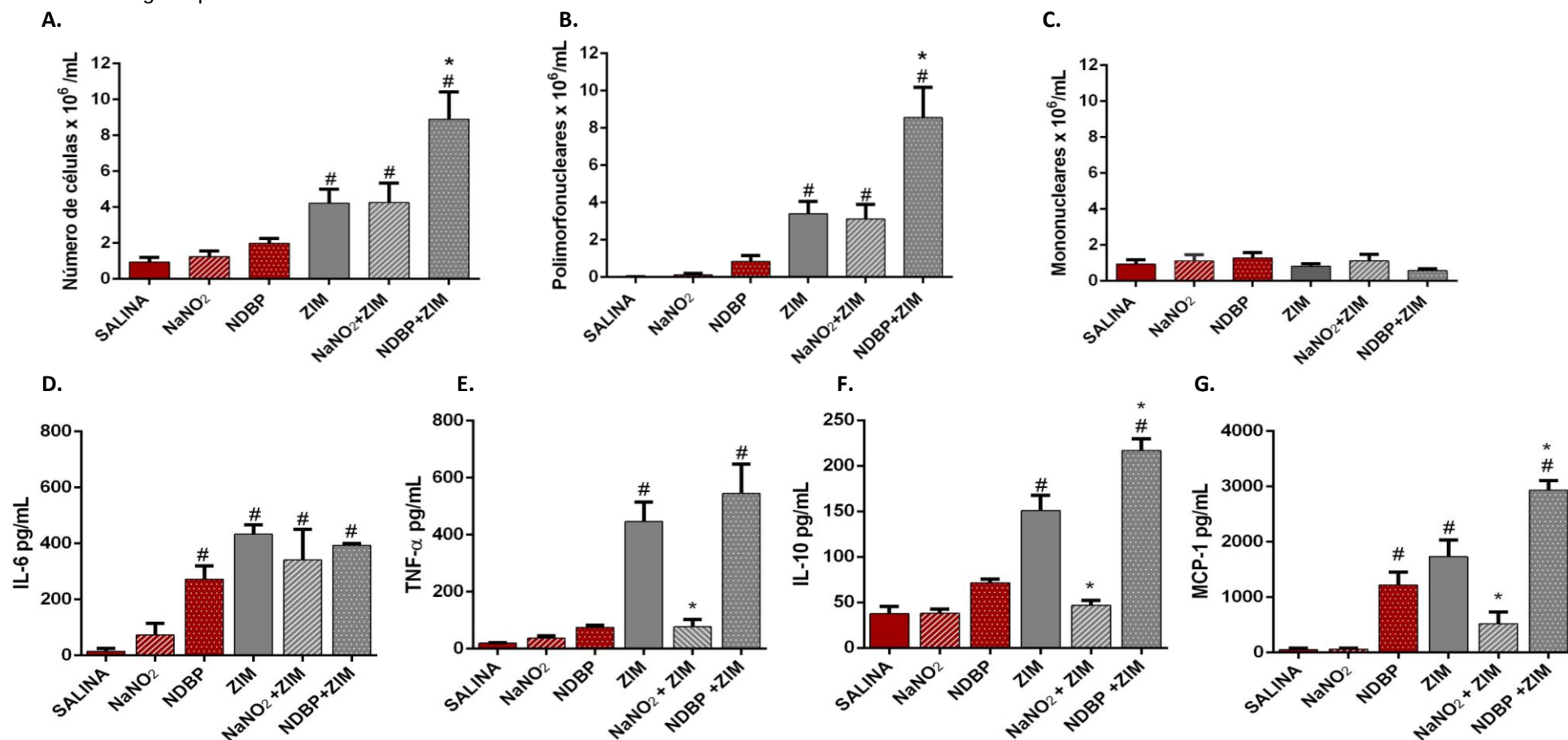
Na análise diferencial das células, a administração de zimosan induziu aumento no número de polimorfonucleares no exsudato peritoneal em aproximadamente 340 vezes relação ao grupo salina ($3,40 \pm 0,65 \times 10^6$ células/mL vs $0,01 \pm 0,005 \times 10^6$ células/mL, $p < 0,0001$). O pré-tratamento com NaNO₂ nos animais estimulados ($3,11 \pm 0,78 \times 10^6$ células/mL) não interferiu na migração de polimorfonucleares para o peritônio em comparação ao grupo zimosan, enquanto que o pré-tratamento com NDBP nos animais estimulados ($8,55 \pm 1,63 \times 10^6$ células/mL) aumentou o número de polimorfonucleares mais de 150% quando comparado ao grupo zimosan ($3,40 \pm 0,65 \times 10^6$ células/mL, $p < 0,0001$). Não houve diferença nas médias dos grupos NaNO₂ ($0,11 \pm 0,07 \times 10^6$ células/mL), NDBP ($0,84 \pm 0,32 \times 10^6$ células/mL) e salina ($0,01 \pm 0,005 \times 10^6$ células/mL) em relação à contagem de polimorfonucleares (Gráfico 2B).

Em relação às células mononucleares, não houve diferença significativa entre os grupos salina ($0,93 \pm 0,25 \times 10^6$ células/mL), NaNO₂ ($1,11 \pm 0,33 \times 10^6$ células/mL), NDBP ($1,28 \pm 0,29 \times 10^6$ células/mL), zimosan ($0,87 \pm 0,18 \times 10^6$ células/mL), NaNO₂ + ZIM ($1,11 \pm 0,037 \times 10^6$ células/mL) e NDBP + ZIM ($0,57 \pm 0,10 \times 10^6$ células/mL) (Gráfico 2C).

Na análise das citocinas os camundongos ApoE^{-/-} estimulados com zimosan apresentaram aumento significativo nas concentrações (pg/mL) das citocinas IL-6, TNF- α , MCP-1 e IL-10 quando comparadas ao grupo salina. O pré tratamento com NaNO₂ nos camundongos ApoE^{-/-} estimulados foi capaz de diminuir os níveis de TNF- α , IL-10 e MCP-1, sem alteração significativa na citocina IL-6. Já o pré tratamento com NDBP nos camundongos ApoE^{-/-} estimulados aumentou os níveis de IL-10 e MCP-1 quando comparado ao grupo zimosan sem alteração nos níveis TNF- α e IL-6. Além disso, não houve diferença entre os grupos NaNO₂ e salina em nenhuma das concentrações das citocinas estudadas. Já o grupo NDBP apresentou níveis mais altos de IL-6 e MCP-1 em comparação ao grupo salina.

O grupo cremofor não foi ilustrado nos gráficos pois não houve diferença com o grupo salina em nenhum dos parâmetros avaliados.

Gráfico 2. Efeito do NaNO_2 e NDBP na migração de leucócitos totais e diferenciais e nos níveis de citocinas durante peritonite induzida por zimosan em camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ fêmea



Camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ fêmeas ($n=5-10$) foram pré-tratados durante três dias consecutivos através de injeções intraperitoneais de NaNO_2 (0,1mmol/kg/dia), NDBP (40mg/kg/dia) ou salina. Uma hora após o último dia de pré-tratamento, os animais foram estimulados com 500 μL de zimosan (ZIM) (2mg/mL). Quatro horas após o desafio com zimosan, o exudato peritoneal foi coletado para avaliar o número de leucócitos totais e diferenciais e citocinas. A: Número de leucócitos totais. B: Número de leucócitos polimorfonucleares. C: Número de leucócitos mononucleares. D: IL-6. E: TNF- α . F: IL-10 e G: MCP-1. Os dados numéricos estão apresentados em média $\pm$ EPM. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Foi feito ANOVA One-way seguido pelo pós teste de Tukey. # $p < 0,0001$ vs Salina, * $p < 0,0001$ vs ZIM

5.2. Efeito crônico do NaNO₂ e NDBP em modelo de aterosclerose experimental

5.2.1. Perfil lipídico plasmático e dados ponderais

Os resultados da avaliação bioquímica do perfil lipídico plasmático e dos dados ponderais dos animais estão descritos na Tabela 2.

Não observamos diferença no peso dos animais antes ou após o período experimental. Os animais ApoE^{-/-}, como previsto, apresentaram perfil lipídico plasmático diferente dos animais C57BL/6. Os camundongos ApoE^{-/-} salina apresentaram um aumento de aproximadamente 2 vezes na concentração de triglicerídeos, 14,3 vezes na concentração de colesterol total quando comparados aos respectivos controles normocolesterolêmicos. O tratamento por 21 dias com NaNO₂ (0,1mmol/kg/dia) ou NDBP (40mg/kg/dia) não influenciou no perfil lipídico camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-}.

Tabela 2. Perfil lipídico plasmático e dados ponderais dos animais C57BL/6 e ApoE^{-/-}

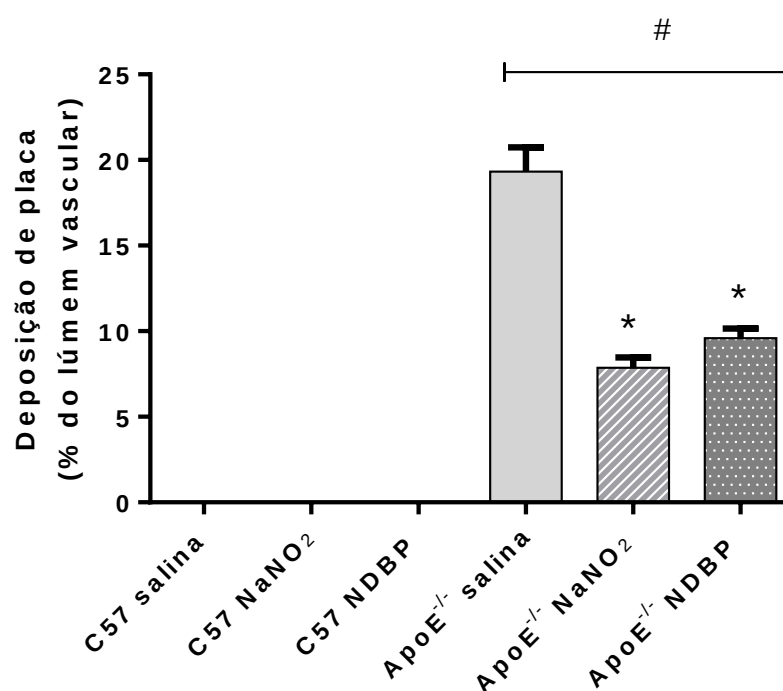
	C57 Salina	C57 NaNO ₂	C57 NDBP	ApoE ^{-/-} salina	ApoE ^{-/-} NaNO ₂	ApoE ^{-/-} NDBP
Peso inicial (g)	21,85±0,35	21,75 ± 0,30	19,81±0,96	19,50 ± 1,01	19,51 ±1,24	19,68±0,78
Peso Final (g)	22,16±0,44	21,90 ± 0,35	19,86±1,22	21,10±1,13	21,32 ±1,05	21,08±0,34
Colesterol (mg/dL)	64,66±16,27	67,42±9,70	42,96±7,20	927,5±64,63#	892,0±75,70#	877,5±77,64#
Triglicerídeos (mg/dL)	39,34±4,00	36,07±5,99	47,45±8,11	84,0 ±12,79#	88,55 ±10,36#	82,27±10,45#
LDL (mg/dL)	8,08±2,04	11,22 ± 2,91	4,94± 1,09	132,1±17,59#	124,0±15,31#	142,5±9,48#
HDL (mg/dL)	44,16±6,30	49,69 ±5,78	41,53±6,12	6,09 ±1,08#	5,52±0,18#	5,86±1,5#
VLDL e IDL (mg/dL)	17,46±5,07	9,26±2,0	16,80±2,30	659,7±80,29#	705,8±64,52#	701,0±99,73#

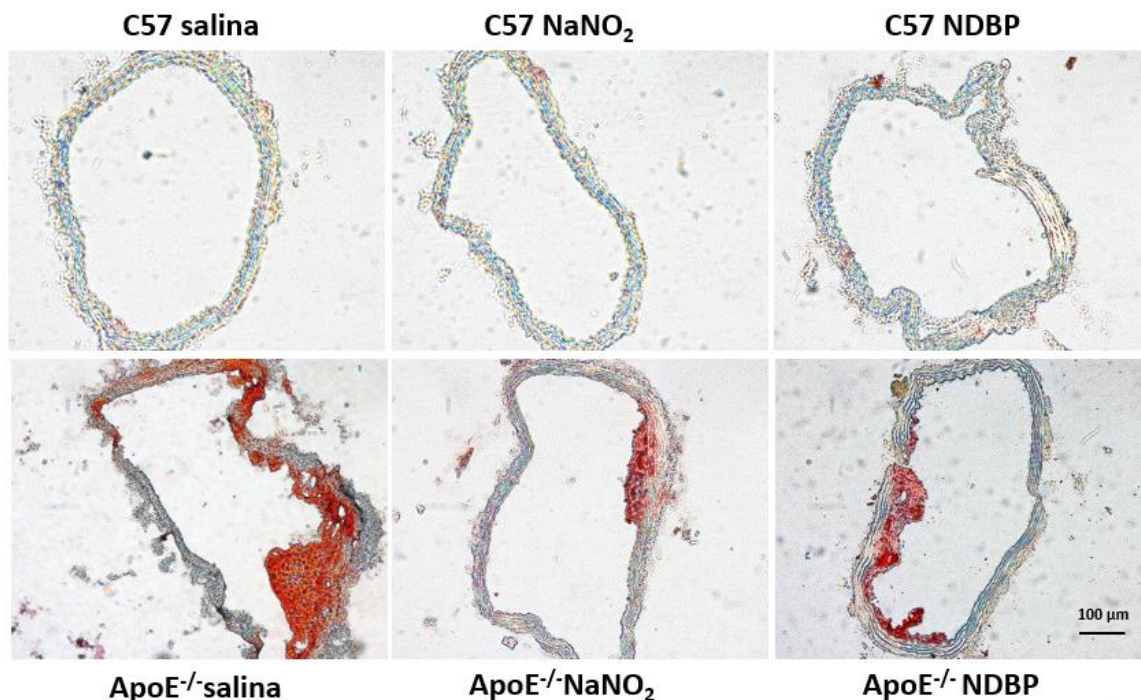
Valores representados como média ± EPM de 5 a 10 animais por grupo. Anova *One way*. #p<0,05 vs C57 salina.

5.2.2. Deposição de placa aterosclerótica na aorta

A quantificação da deposição de placa na aorta dos animais estudados foi avaliada através de cortes transversais do vaso, corados com corante de lipídios neutros *Oil-Red*. Os camundongos ApoE^{-/-} que receberam veículo (salina) apresentam marcante deposição de placa quando comparados aos animais C5BL/6 (salina, NaNO₂ e NDBP). O tratamento por 21 dias com NaNO₂ e NDBP nos animais ApoE^{-/-} resultaram em redução da deposição de placa de aproximadamente 60,7% ($19,33 \pm 1,41$ vs. $7,59 \pm 0,57$ $p < 0,0001$) e 50,44% ($19,33 \pm 1,41$ vs. $9,58 \pm 0,56$ $p < 0,0001$), respectivamente.

Gráfico 3. Efeito do tratamento crônico com NaNO₂ e NDBP na placa aterosclerótica

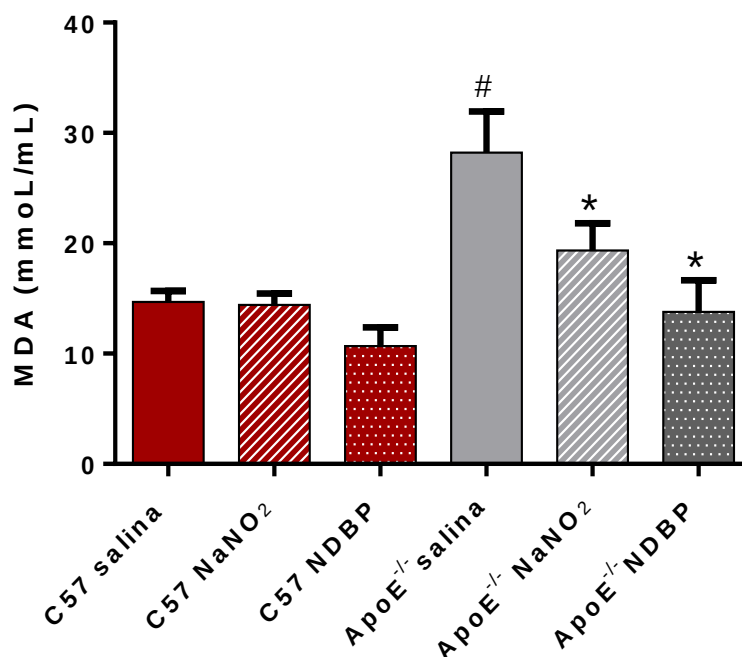




Representação gráfica da deposição de placa aterosclerótica na aorta de animais C57 salina, C57 NaNO₂, C57 NDBP, ApoE^{-/-} salina, ApoE^{-/-} NaNO₂ e ApoE^{-/-} NDBP. Valores representados como média $\pm$ EPM de 8 a 10 anéis por grupo. Anova *One way*. # $p < 0,0001$ vs. C57 salina, * $p < 0,0001$ vs. ApoE^{-/-} salina. As imagens abaixo representam fotos típicas de cortes histológicos de aorta corados com Oil-red de cada um dos respectivos grupos estudados. A barra de escala corresponde a 100µm.

5.2.3. Estresse oxidativo plasmático

A quantificação do MDA, produto final da peroxidação lipídica, foi expressa em mmol/mL e está resumida no gráfico 4. Não houve diferença nos níveis plasmáticos de MDA entre os animais controles: C57 salina ($14,68 \pm 0,99$), C57 NaNO₂ ($14,42 \pm 1,04$) e C57 NDBP ($10,70 \pm 0,75$). Um aumento nos níveis de MDA de cerca de 92% foi observado em camundongos ApoE^{-/-} salina quando comparados aos camundongos C57 salina ($28,20 \pm 3,75$ vs. $14,68 \pm 0,99$). O tratamento com NaNO₂ (0,1mmol/kg/dia) e NDBP (40mg/kg/dia) nos camundongos ApoE^{-/-} por 21 dias por gavagem foi capaz de reduzir os níveis de MDA quando comparado aos camundongos ApoE^{-/-} não tratados ($19,36 \pm 2,45$ e $13,80 \pm 2,84$, respectivamente vs. $28,20 \pm 3,75$, $p < 0,0001$).

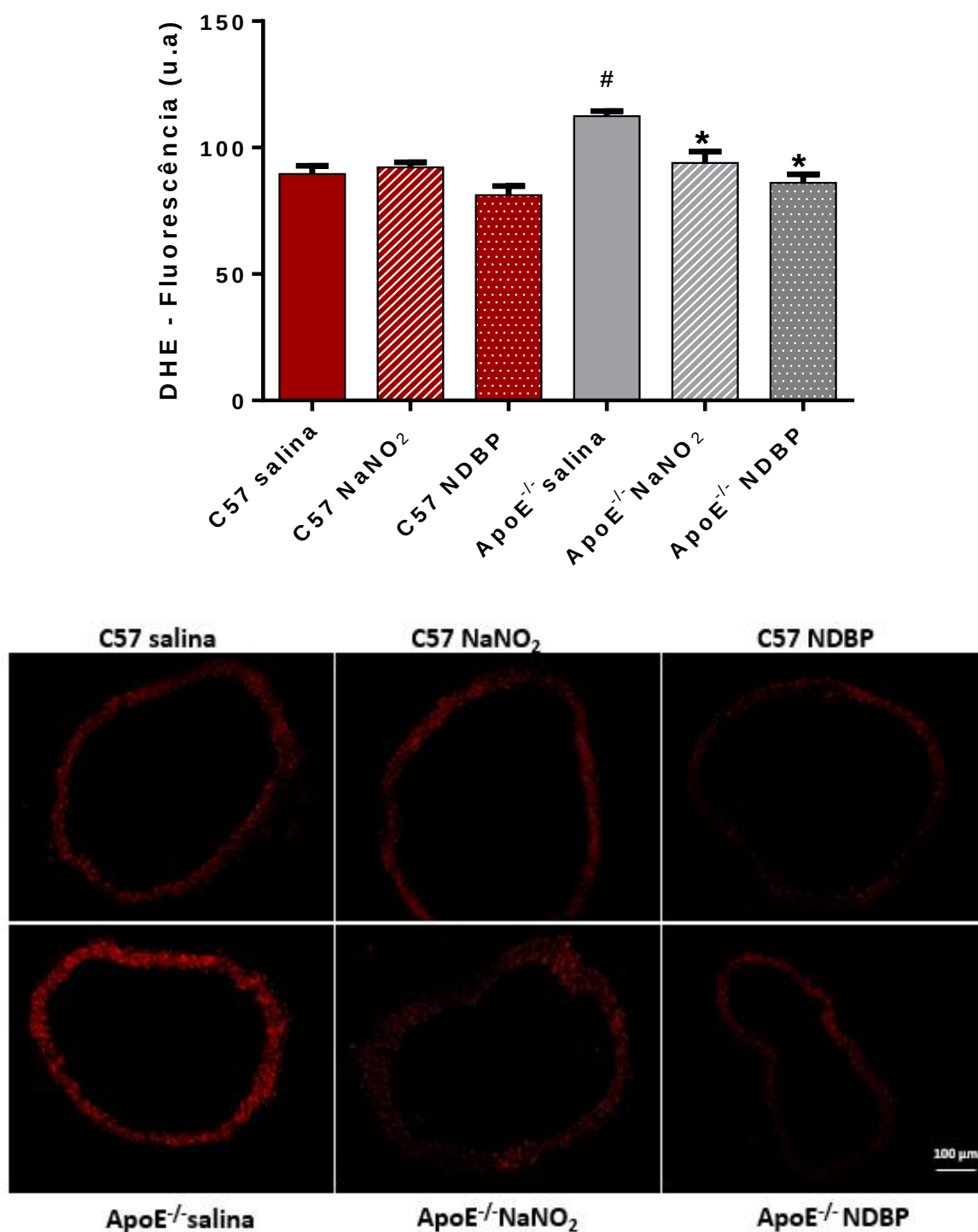
Gráfico 4. Efeito do tratamento crônico com NaNO₂ e NDBP no estresse oxidativo plasmático

Quantificação plasmática de malondialdeído nos diferentes grupos após tratamento com NaNO₂ (0,1mmol/kg/dia), NDBP (40mg/kg/dia) ou salina durante 21 dias consecutivos via gavagem (n= 5-10 animais/grupo). Os dados numéricos foram expressos em media $\pm$ EPM. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Foi feito ANOVA One-way seguido pelo pós teste de Tukey. $p < 0,005$. # $p < 0,0001$ vs. C57 salina, * $p < 0,0001$ vs. ApoE^{-/-} salina.

5.2.4. Produção de espécies reativas de oxigênio na aorta

A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio foi realizada *in situ* na aorta por meio da marcação de cortes histológicos não fixados com o corante fluorescente dihidroetídeo (DHE) e os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência. Não houve diferença entre os animais C57 tratados com salina ($89,61 \pm 3,19$), NaNO₂ ($92,25 \pm 1,99$) ou NDBP ($81,20 \pm 3,61$) nos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio. Os animais ApoE^{-/-} salina apresentaram um aumento do estresse oxidativo em comparação ao grupo controle C57 salina ($112,5 \pm 1,95$ vs $89,61 \pm 3,19$ $p < 0,0001$), o qual foi revertido aos níveis do controle pelo tratamento com NaNO₂ ($93,93 \pm 4,52$) e NDBP ($86,12 \pm 3,31$).

Gráfico 5. Efeito do tratamento crônico com NaNO_2 e NDBP no estresse oxidativo na aorta

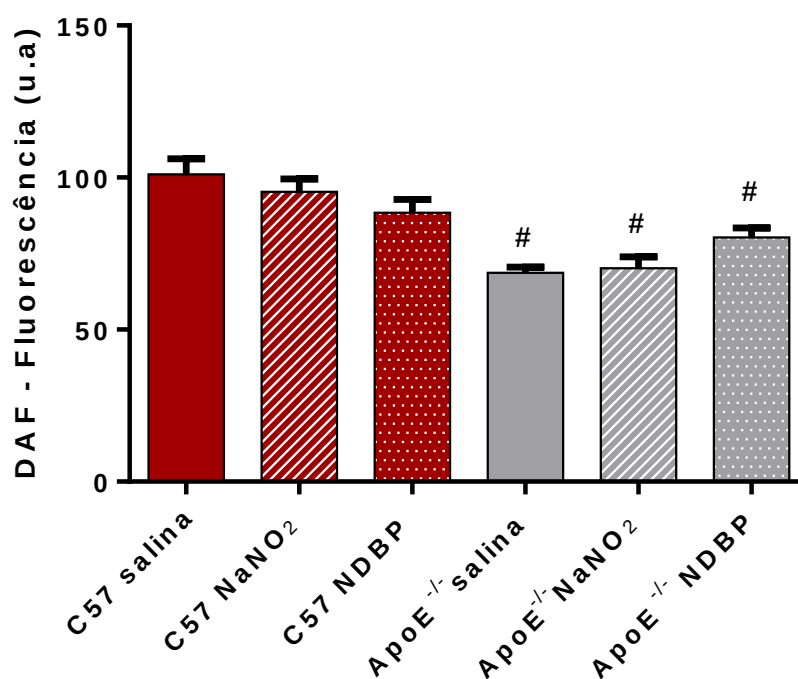


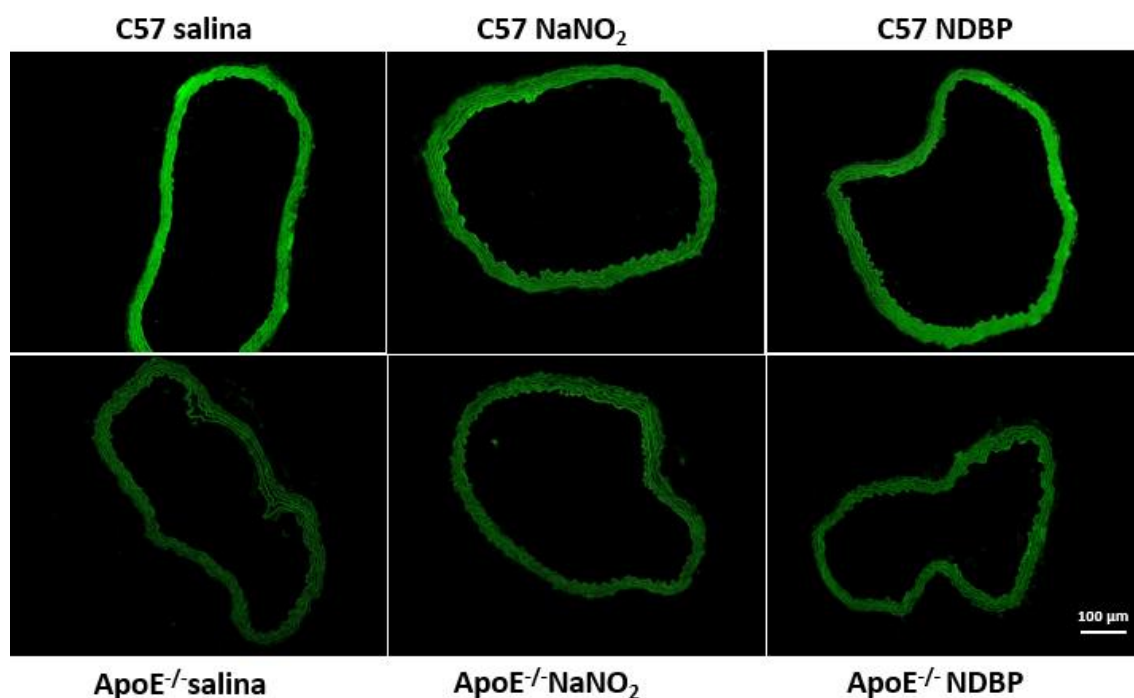
Quantificação do estresse oxidativo em camundongos C57Bl/6 e ApoE^{-/-} fêmeas (n=10-12 anéis/grupo) tratados com NaNO_2 (0,1mmol/kg/dia), NDBP (40mg/kg/dia) ou salina durante 21 dias consecutivos via gavagem. Os dados numéricos foram expressos em média $\pm$ EPM. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Foi feito ANOVA One-way seguido pelo pós teste de Tukey. $p < 0,05$. # $p < 0,0001$ vs. C57 Salina, * $p < 0,0001$ vs ApoE^{-/-} salina. A barra da escala corresponde a 100μm.

5.2.5. Produção de Óxido Nítrico na Aorta

A avaliação da produção de óxido nítrico foi realizada *in situ* na aorta por meio da marcação de cortes histológicos não fixados com DAF-2DA e os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência. Os animais ApoE^{-/-} salina apresentaram uma redução de NO em comparação ao grupo controle C57 salina ($68,74 \pm 11,828$ vs $101,0 \pm 5,178$ $p < 0,0001$). Não houve diferença entre os animais C57 tratados com salina ($101,0 \pm 5,178$), NaNO₂ ($95,31 \pm 4,286$) ou NDBP ($88,49 \pm 4,328$) nos níveis de NO. Nos camundongos ApoE^{-/-}, os tratamentos com NaNO₂ ($70,21 \pm 3,671$) e NDBP ($80,31 \pm 43,152$) não diferiram do grupo ApoE^{-/-} salina ($68,74 \pm 11,828$).

Gráfico 6. Efeito do tratamento crônico com NaNO₂ e NDBP na produção de óxido nítrico na aorta

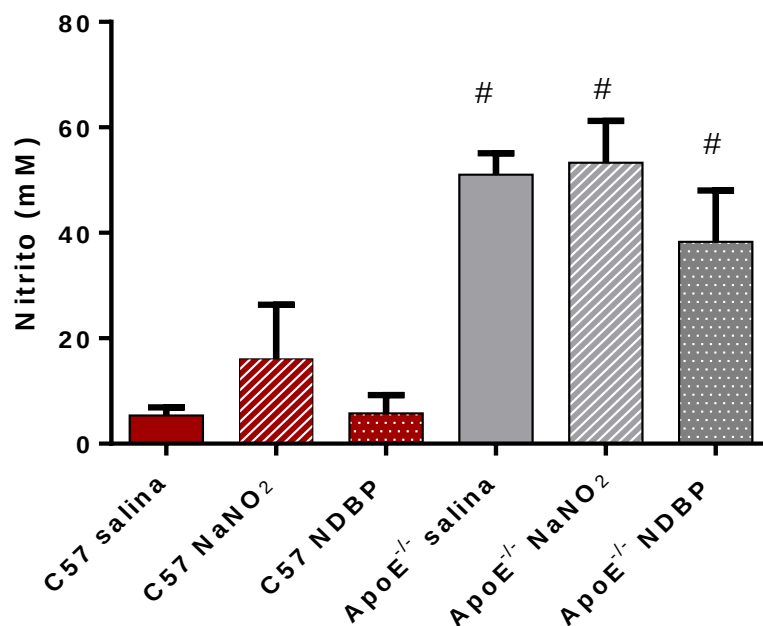




Quantificação do óxido nítrico em camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-} fêmeas (n=15-20 anéis/grupo) tratados com NaNO₂ (0,1mmol/kg/dia), NDBP (40mg/kg/dia) ou salina durante 21 dias consecutivos via gavagem. Os dados numéricos foram expressos em media $\pm$ EPM. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Foi feito ANOVA One-way seguido pelo pós teste de Tukey. $p < 0,05$. # $p < 0,0001$ vs C57 Salina, * $p < 0,0001$ vs ApoE^{-/-} salina. Marcação com DAF. A barra da escala corresponde a 100 μ m.

5.2.6. Nitrito plasmático

A avaliação dos níveis plasmático de nitrito (μ M) foi realizado pelo método de Griess (Green *et al.*, 1982). Não houve diferença entre os animais C57 tratados com salina ($5,34 \pm 1,57$), NaNO₂ ($16,08 \pm 10,30$) ou NDBP ($5,8 \pm 3,45$) nos níveis plasmáticos de nitrito. Os camundongos ApoE^{-/-} apresentaram aumento no nitrito plasmático em relação aos animais C57 salina ($51,0 \pm 4,11$ vs $5,34 \pm 1,57$ $p < 0,0001$). Já os tratamentos com NaNO₂ e NDBP por 21 dias nos animais ApoE^{-/-} não diferiu do grupo ApoE^{-/-} salina ($53,29 \pm 7,94$ vs $51,0 \pm 4,11$; $38,28 \pm 9,75$ vs $51,0 \pm 4,11$, respectivamente).

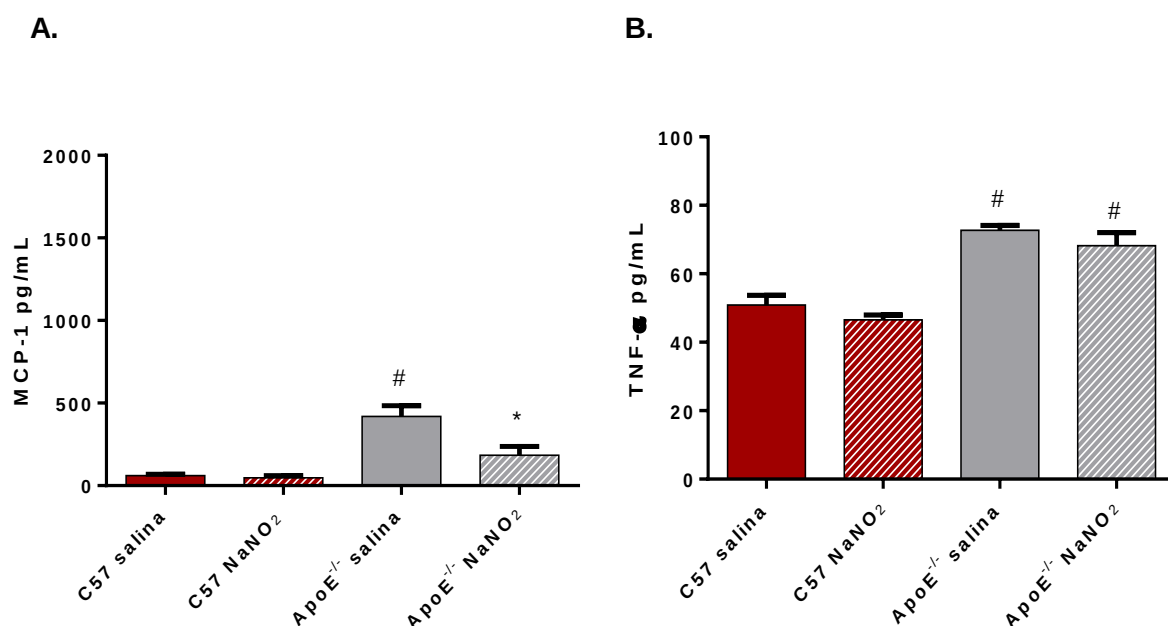
Gráfico 7. Efeito do tratamento crônico com NaNO₂ e NDBP nos níveis de nitrito plasmático

Quantificação do nitrito plasmático em camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-} fêmeas tratadas com NaNO₂ (0,1mmol/kg/dia), NDBP (40mg/kg/dia) ou salina durante 21 dias consecutivos via gavagem (n=5-10 animais/grupo). Os dados numéricos foram expressos em média $\pm$ EPM. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Foi feito ANOVA One-way seguido pelo pós teste de Tukey. $p < 0,05$. # $p < 0,0001$ vs C57 Salina.

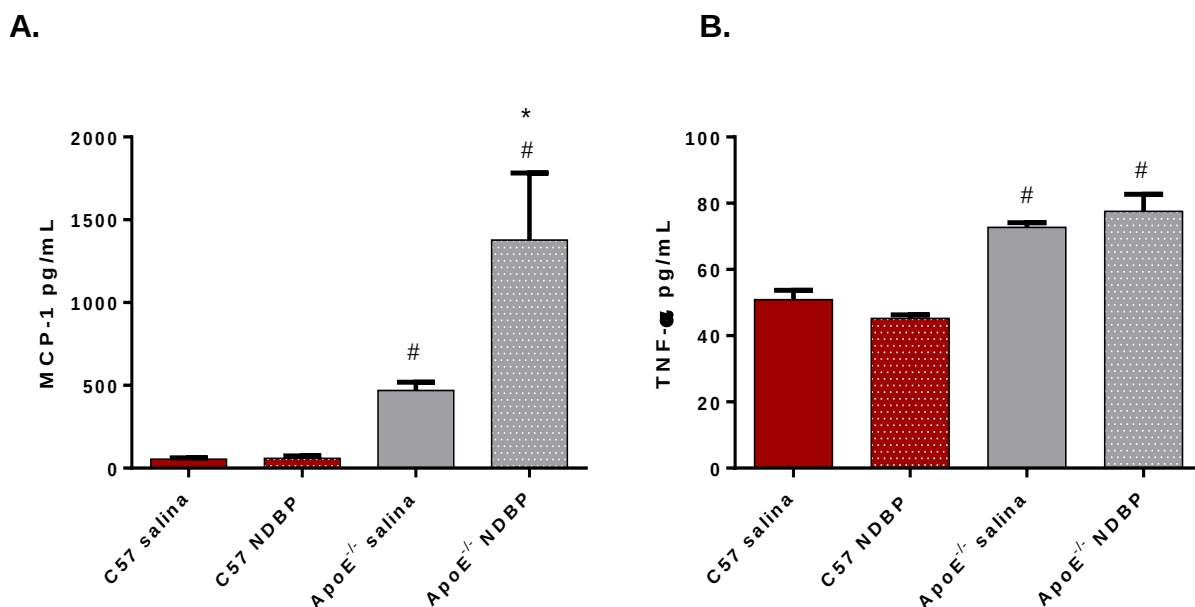
5.2.7. Quantificação de citocinas no plasma

Nos animais C57BL/6, o tratamento com NaNO₂ (Gráfico 8) ou NDBP (Gráfico 9) não resultou diferença nos níveis das citocinas avaliadas em relação ao grupo C57 salina. Já os camundongos ApoE^{-/-} salina apresentaram, no plasma, aumento significativo nas concentrações (pg/mL) das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e MCP-1, quando comparadas com as dos animais do grupo C57 salina (TNF- α : $72,71 \pm 1,38$ vs $50,89 \pm 2,78$; MCP-1: $419,8 \pm 64,31$ vs $60,25 \pm 9,28$, respectivamente).

Os níveis de TNF- α nos animais ApoE^{-/-} tratados com NaNO₂ ($68,19 \pm 3,85$) ou NDBP ($77,56 \pm 5,19$) não diferiram do grupo ApoE^{-/-} salina ($72,71 \pm 1,38$). Em relação à MCP-1, o tratamento com NaNO₂ promoveu nos animais ApoE^{-/-} uma diminuição significativa nos níveis de MCP-1 quando comparados aos animais ApoE^{-/-} salina ($183,6 \pm 54,44$ vs $419,8 \pm 64,31$) (Gráfico 8), enquanto que o tratamento com NDBP resultou em aumento dos níveis plasmáticos dessa citocina ($1377 \pm 405,6$ vs $419,8 \pm 64,31$) (Gráfico 9).

Gráfico 8. Efeito do tratamento crônico com NaNO_2 nos níveis plasmáticos de MCP-1 e $\text{TNF-}\alpha$ 

Quantificação dos níveis plasmáticos das citocinas em camundongos C57Bl/6 e $\text{ApoE}^{-/-}$ fêmeas tratados com NaNO_2 (0,1mmol/kg/dia ou salina durante 21 dias consecutivos via gavagem. A. MCP-1; B. $\text{TNF-}\alpha$. Os dados numéricos foram expressos em média $\pm$ EPM. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Foi feito ANOVA One-way seguido pelo pós teste de Tukey. $p < 0,05$. [#] $p < 0,05$ vs. C57 Salina, ^{*} $p < 0,05$ vs $\text{ApoE}^{-/-}$ salina.

Gráfico 9. Efeito do tratamento crônico com NDBP nos níveis plasmáticos de MCP-1 e $\text{TNF-}\alpha$ 

Quantificação dos níveis plasmáticos das citocinas em camundongos C57Bl/6 e $\text{ApoE}^{-/-}$ fêmeas tratados com NDBP (40mg/kg/dia) ou salina durante 21 dias consecutivos via gavagem. A. MCP-1; B. $\text{TNF-}\alpha$. Os dados numéricos foram expressos em média $\pm$ EPM. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Foi feito ANOVA One-way seguido pelo pós teste de Tukey. $p < 0,05$. [#] $p < 0,05$ vs. C57 Salina, ^{*} $p < 0,05$ vs $\text{ApoE}^{-/-}$ salina.

6. DISCUSSÃO

A aterosclerose é um processo patológico crônico que envolve inflamação juntamente com disfunção endotelial e desregulação lipoproteica (Zhu *et al.*, 2018; Kong *et al.*, 2022). Inicialmente avaliamos o efeito agudo do NDBP e NaNO_2 em animais ApoE^{-/-} e seus controles (C57BL/6) utilizando o modelo de peritonite induzida por zimosan, avaliando a migração celular e a produção de mediadores inflamatórios em resposta a esse estímulo. O modelo de peritonite foi utilizado para esclarecer se os tratamentos com NDBP ou NaNO_2 poderiam ter efeitos anti-inflamatórios de forma aguda.

O zimosan vem sendo apontado como um candidato promissor na indução de doença cardiovascular (Arya *et al.*, 2023). Trata-se de uma substância amplamente utilizada na pesquisa inicial de novas drogas com potencial anti-inflamatório e no estudo dos mecanismos fisiológicos da inflamação (Cash, *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2011; Hung *et al.*, 2011). É um polissacarídeo extraído da parede celular de fungos *Saccharomyces cerevisiae* que induz inflamação com extravasamento de leucócitos para a cavidade peritoneal detectável com pelo menos duas horas após o estímulo e com pico máximo observado após quatro horas (Cash *et al.*, 2009). No peritônio, o zimosan é fagocitado principalmente por macrófagos residentes (Underhill, 2003), com envolvimento dos receptores Toll Like (TLR-2) nessa sinalização (Akira; Takeda; Kaisho, 2001). Após seu reconhecimento, iniciam-se os eventos do processo inflamatório agudo, incluindo infiltração de leucócitos, dor e liberação de vários mediadores como componentes do sistema complemento, prostaglandinas, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio, citocinas e quimiocinas (Underhill, 2003; Doherty *et al.*, 1985; Cash *et al.*, 2009, Arya *et al.*, 2023).

No presente trabalho a administração do zimosan, como esperado, ocasionou aumento na migração celular, no número de polimorfonucleares e na concentração, no líquido peritoneal, das citocinas IL-6, TNF- α , IL-10 e MCP-1 em ambas as linhagens C57BL/6 e ApoE^{-/-}, confirmando a efetividade do modelo. De acordo com Underhill (2003) a sinalização inflamatória em resposta ao zimosan requer a ativação do fator nuclear (NF)- κ B, que é um regulador

fundamental na expressão de muitas citocinas, incluindo IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, quimiocinas e NO. Ajuebor e colaboradores (1998) descreveram ainda que a peritonite induzida por zimosan está associada a aumentos no nível das quimiocinas: proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 α , MIP-2), proteína quimioatática de monócitos (MCP-1) e proteína quimioatática de neutrófilos induzido por citocinas (KC), e indução de aumento tempo-dependente na produção de IL-10 na cavidade peritoneal.

Na aterosclerose observa-se um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e uma maior sinalização de NF- κ B e maior expressão de moléculas de adesão de leucócitos. A adesão de monócitos ao endotélio arterial e subsequente migração para a íntima são eventos centrais na patogênese da aterosclerose. Contudo, outras células do sistema imunológico, como neutrófilos e células T, tem sido considerada uma marca registrada da aterosclerose. Os neutrófilos, por exemplo, utilizam os receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR5 e CXCR2 para infiltrar artérias maiores na aterosclerose e contribuem para a formação de lesões ateroscleróticas predominantemente durante as fases iniciais (Zernecke; Weber, 2014).

O recrutamento de células do sistema imune para locais de inflamação é uma característica chave da resposta imune inata. Os neutrófilos (polimorfonucleares) são as mais numerosas células que atingem o sítio inflamatório (Kolaczowska; Kubes, 2013), e sua redução é um ponto importante para avaliar o potencial anti-inflamatório de uma droga. Nesse sentido, o NaNO₂ (0,1mmol/kg/dia) administrado via intraperitoneal durante três dias antes da indução da peritonite teve uma ação anti-inflamatória nos camundongos C57BL/6, reduzindo a migração celular para o peritônio inflamado, inibindo a migração de polimorfonucleares. Além disso, o NaNO₂ por si só não induziu resposta inflamatória. Todavia, não alterou a migração celular nos camundongos ApoE^{-/-}, possivelmente pelo fato desses camundongos apresentarem precocemente um aumento de ROS e uma disfunção endotelial (Ross, 1993; Fransen *et al.*, 2008; Kattoor *et al.*, 2017) necessitando possivelmente de uma dose maior de NaNO₂ para atingir o efeito similar ao ocorrido nos animais C57BL/6.

Alguns estudos apoiam os nossos achados em relação a redução da migração celular após tratamento com NaNO_2 em camundongos C57BL/6: o pré-tratamento dietético com nitrato por sete dias ou a administração aguda de nitrito intravenoso, reduziu a ativação de leucócitos em resposta a uma inflamação aguda induzida por quimiocina (Jädert *et al.*, 2012); a administração de nitrito na água potável por 2 semanas inibiu a adesão e emigração leucocitária e preveniu a disfunção arteriolar em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em colesterol (Stokes *et al.*, 2009); em culturas de células endoteliais o nitrito impediu de maneira potente a regulação positiva induzida por $\text{TNF-}\alpha$ de ICAM-1 em células endoteliais (Jädert *et al.*, 2012).

A ação anti-inflamatória do NaNO_2 pode ser explicada pela capacidade do nitrito em gerar NO pela via indireta, visto que o NO exerce importantes efeitos anti-inflamatórios pela prevenção da ativação e adesão leucocitária (Kubes; Suzuki; Granger, 1991), ou por meio de vias de sinalização sem formação de NO livre (Bryan *et al.* 2005). De acordo com Jädert e colaboradores (2012), um mecanismo alternativo para os efeitos no recrutamento de leucócitos incluem a interação do nitrito com a formação de superóxido vascular. Estudos já demonstraram que as NADPH oxidases promovem a proliferação leucocitária endotelial via formação de superóxido (Stokes *et al.*, 2001) e que o nitrito é capaz de inibir o estresse oxidativo (Sindler *et al.*, 2011) e tem atuação na regulação negativa direta da NADPH oxidase (Montenegro, *et al.*, 2011).

Em relação aos camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$, esses são uma cepa de camundongo hiperlipidêmico em um fundo genético C57BL/6 que é comumente usado para estudar a fisiopatologia da aterosclerose (Meir, 2004). Uma das características da aterosclerose é o comprometimento da função endotelial, que está presente antes mesmo que ocorram alterações estruturais vasculares (Ross, 1993). A função normal da ApoE é importante para a saúde vascular para proteção contra disfunção endotelial, adesão de monócitos à parede do vaso e sua infiltração no espaço subendotelial, ativação pró-inflamatória de macrófagos, acúmulo de colesterol em macrófagos, oxidação de LDL, migração de células musculares lisas medianas para a camada íntima e proliferação de células musculares lisas na íntima (Alagarsamy; Jaeschke; Hui, 2022).

No presente estudo utilizamos para o protocolo de peritonite animais com 8 semanas. Estudos prévios demonstram que nos camundongos ApoE^{-/-} as VCAM-1 e ICAM-1 são expressas precocemente nas áreas propensas à lesão (Nakashima *et al.*, 1998) e entre 6-10 semanas de idade, a maioria dos camundongos deficientes em ApoE desenvolvem lesões de estrias gordurosas com células espumosas e células musculares lisas migratórias (Jawień *et al.*, 2004). As células espumosas acumulam partículas de LDLox, e estas, induzem a expressão de moléculas de adesão e ligação posterior às células inflamatórias, bem como sua migração no espaço subendotelial (Nguyen *et al.*, 2019). Sabe-se também que o equilíbrio normal entre a formação de NO e ROS é interrompido na aterosclerose antes mesmo da presença de lesões ateroscleróticas (Fransen *et al.*, 2008; Kattoor *et al.*, 2017), e que a hipercolesterolemia aumenta a produção endotelial de ânion superóxido (Ohara; Peterson; Harrison, 1993) e induz uma adesão dependente de superóxido e emigração de leucócitos em vênulas pós-capilares (Stokes *et al.*, 2001).

A geração de ROS em excesso tem implicações na proliferação celular, migração leucocitária, modificação oxidativa das lipoproteínas, disfunção endotelial, danos ao DNA, aumento das metaloproteinases (MMP), degradação de colágeno e proliferação de células musculares lisas (Kattoor *et al.*, 2017). Sendo assim, justifica-se a divergência do efeito agudo do tratamento com NaNO₂ (0,1mmol/kg/dia) nas linhagens C57BL/6 e ApoE^{-/-} pelo fato desses últimos apresentarem, em condições basais, um aumento de ROS, de moléculas de adesão e da migração de células inflamatórias conforme em estudos prévios descritos anteriormente.

Em relação as concentrações de alguns mediadores inflamatórios, curiosamente não observamos diferença estatística nas concentrações das citocinas IL-6, TNF- α , IL-10 e MCP-1 nos camundongos C57BL/6 fêmeas pré-tratados com NaNO₂ quando comparados ao grupo desafiado com zimosan sem tratamento, embora o NaNO₂ nos camundongos C57BL/6 tenha reduzido a migração celular para o sítio inflamado. Já nos camundongos ApoE^{-/-}, apesar do NaNO₂ não diminuir a migração celular nos animais ApoE^{-/-} estimulados, ele reduziu a concentração, no líquido peritoneal, das citocinas TNF α , MCP-1 e IL-

10. Trata-se de um dado importante uma vez que as citocinas são mediadores que exercem função na iniciação, manutenção e perpetuação da resposta inflamatória (O'shea; Murray, 2008), inclusive na aterosclerose (Tousoulis *et al.*, 2016; Geovanini; Libby, 2018).

Khambata e colaboradores (2017) demonstram que o nitrato dietético suprime o recrutamento de neutrófilos e monócitos inflamatórios induzido por TNF- α em camundongos ApoE^{-/-}. A redução dos níveis de TNF- α nos camundongos ApoE^{-/-} está em consonância com estudos em cultura de células endoteliais (Jädert *et al.*, 2012) e em animais suplementos com nitrito (Justice *et al.*, 2015; Ohtake *et al.*, 2017). Além disso, Ohtake e colaboradores (2017) demonstraram que o nitrito dietético suprimiu as transcrições de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , MCP-1 e IL-6 na gordura visceral de maneira dose-dependente, divergindo apenas nos níveis de IL-6.

Diferente do NaNO₂, o tratamento com o nitrato orgânico NDBP (40mg/kg/dia) em modelo de peritonite resultou em aumento na migração celular e no número de polimorfonucleares em ambas as linhagens. O NDBP também aumentou os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias no líquido peritoneal: TNF- α em camundongos C57BL/6 estimulados, MCP-1 e IL-10 em camundongos ApoE^{-/-} estimulados e de IL-6 nos animais ApoE^{-/-} sem estímulo. Além disso, o cremofor não induziu quaisquer efeitos nos animais onde ele foi administrado isoladamente.

A constatação de que o NO possui efeito bifásico sobre a atividade do fator nuclear κ B (NF- κ B) é bastante importante e pode explicar, pelo menos em parte, as ações duais do NO durante o processo inflamatório. Através deste mecanismo, que depende de sua concentração local, o NO pode ativar ou inibir a expressão de diversas proteínas reguladas pelo NF- κ B, modulando assim o perfil de ativação de células imunes (Connelly *et al.*, 2001). O NDBP está associado a uma contínua liberação de NO e redução da atividade da enzima NADPH oxidase, que parece ser dependente da xantina oxidase funcional (Porpino *et al.*, 2016) e em cultura de células musculares lisas de aorta de rato, revela uma cinética de liberação de NO semelhante à apresentada pela nitroglicerina (França-Silva, 2012).

O NO pode desempenhar um papel no dano tecidual, pois pode ser citostático ou citotóxico não apenas para microrganismos invasores, mas também para as células que o produzem e também para as células vizinhas. É provável que o NO tenha um papel multifacetado nas reações inflamatórias, variando desde o aumento da vasodilatação e a formação de edema, passando pela modulação das terminações nervosas sensoriais e da atividade leucocitária, até a citotoxicidade tecidual (Tripathi, *et al.*, 2007). Cabe destaque o fato de que o cremofor, sozinho, não provocou alterações em relação ao grupo salina, reforçando o fato de que os efeitos observados não se devem a esta substância isoladamente.

Vale ressaltar ainda, que não houve alteração significativa na população de mononucleares após o tratamento com NaNO₂ e NDBP nos animais estimulados. Como também não houve mudança significativa na migração de mononucleares nos animais que receberam apenas o zimosan em relação ao grupo salina, embora existam estudos que descrevem um fenômeno de redução inicial no número de macrófagos peritoneais após a injeção com zimosan, possivelmente devido à ativação dessas células aumento de sua aderência nas camadas internas do peritônio (Ajuebor, 1998).

Para avaliar os efeitos crônicos de NaNO₂ e NDBP, camundongos ApoE^{-/-} fêmeas alimentados com dieta aterogênica e seus controles C57BL/6 foram tratados por 21 dias.

Nossos resultados demonstram uma redução na área total da placa por ambos tratamentos: NaNO₂ e NDBP. Alguns ensaios com nitratos inorgânicos não identificaram efeito sobre a área total da placa, mas sim uma maior estabilidade da placa através da redução no acúmulo de macrófagos e uma elevação no acúmulo de músculo liso dentro das placas ateroscleróticas de camundongos ApoE^{-/-} (Khambata *et al.*, 2017) e aumento da expressão de colágeno e redução da deposição de lipídios com a suplementação de nitrato em doses baixas, moderas (Bakker *et al.*, 2016). Contudo, em aterosclerose já estabelecida, foi identificado recentemente uma redução de 50% da área de placa após suplementação dietética de altas doses de nitrato a longo prazo em

camundongos ApoE^{-/-} alimentados com uma dieta rica em gordura (Liu *et al.*, 2023).

Em relação aos nitratos orgânicos, estudos revelam que o tratamento a longo prazo em dose baixa de tetranitrato de pentaeritritol ou isossorbida demonstrou reduzir a progressão da formação de lesões, disfunção endotelial e oxidação de LDL em modelos de roedores (Hacker *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2004). Além disso, o NDBP apresenta efeitos benéficos na aterosclerose experimental, sendo capaz de reverter o quadro de disfunção endotelial em camundongos ApoE^{-/-} (Leite, 2019).

No presente estudo, os camundongos ApoE^{-/-} apresentaram colesterol plasmático mais alto do que os animais C57BL/6 exibindo um aumento de aproximadamente 14 vezes no colesterol total. Nossos achados estão de acordo com o que é demonstrado na literatura para camundongos ApoE^{-/-} que receberam dieta aterogênica (Meyrelles *et al.*, 2011; Balarini, 2013). Nesse modelo murino a depuração hepática de partículas de VLDL e IDL é comprometida, visto que depende da ligação da ApoE ao receptor hepático de LDL (Anoop *et al.*, 2010), justificando o perfil lipoproteico plasmático alterado, com presença de colesterol circulante sobretudo na forma de partículas de VLDL e IDL, ao contrário do que se costuma observar em camundongos (Jawień *et al.*, 2004; Kolovou *et al.*, 2008; Xiangdong *et al.*, 2011).

Embora os lipídios indubitavelmente contribuam causalmente para a aterosclerose, a resposta inflamatória resultante orquestra a progressão e o desfecho da doença (Soehnlein; Libby, 2021). Alguns estudos com estatinas, por exemplo, mostram que a restauração da função endotelial ocorre antes da redução significativa dos níveis séricos de colesterol e que seus efeitos benéficos podem ser devidos não apenas a redução do colesterol, mas também aos seus efeitos pleiotrópicos ou independentes do colesterol (Zhou, Liao, 2009; Liao; Laufs, 2005).

A propósito, não observamos alterações do perfil lipoproteico plasmático em camundongos ApoE^{-/-} tratados com NaNO₂ e com NDBP, quando comparados aos animais hipercolesterolêmicos que receberam apenas veículo.

Mas apesar disso, houve redução da deposição de placa aterosclerótica, em acordo com observações anteriores onde agentes farmacológicos capazes de potencializar a ação do NO reduziram a placa ou aumentaram sua estabilidade sem alteração nas lipoproteínas (Balarini, 2013; Khambata *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017).

Postula-se que a disfunção endotelial em animais ApoE^{-/-} esteja relacionada ao conteúdo de LDL oxidado (oxLDL) e não à hipercolesterolemia em si. Neste caso, a redução do estresse oxidativo, mesmo na manutenção de altas concentrações plasmáticas de colesterol, seria capaz de promover melhora da função endotelial (Jiang *et al.*, 2001). Aumentos do estresse oxidativo e danos oxidativos estão relacionados a danos vasculares e a progressão da aterosclerose (Touyz, 2000; Kattoor *et al.*, 2017). A teoria da oxidação da aterosclerose indica que a modificação oxidativa das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) desempenha um papel central na doença (Klatt, 1996) e que o conteúdo antioxidante do plasma é crítico para a proteção do LDL (Witztum, 1994).

O MDA é um biomarcador de estresse oxidativo (Tsikas, 2017) e na aterosclerose os epítomos MDA foram identificados como pró-inflamatórios servindo como alvos potenciais para intervenções terapêuticas imunológicas em DCVs (Papac-Milicevic *et al.*, 2016). Pacientes com aterosclerose apresentam nível mais altos de MDA em relação aos saudáveis (Tamer *et al.*, 2002).

Nossos resultados revelam que o tratamento crônico com NaNO₂ e o NDBP diminuíram os níveis plasmáticos de MDA de animais ApoE^{-/-}. Evidências crescentes sugerem que o nitrito de sódio exerce efeitos antioxidantes (Amaral *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015; Ren; Ding; Lu, 2016; Stamm *et al.*, 2021). Em modelo hipertensão Doca sal o tratamento com nitrito de sódio (15mg/kg, por 4 semanas) foi associado a redução nos níveis plasmáticos de MDA, 8-isoprostano e normalização da atividade vascular da NADPH oxidase e da xantina oxidorreductase (Amaral *et al.*, 2015). O nitrito dietético também foi capaz de atenuar o estresse oxidativo e ativar genes antioxidantes em coração de ratos durante hipóxia hipobárica (Singh *et al.*, 2012), além de reduzir a geração de O₂^{•-} em monócitos humanos ativados por LPS (Yang *et al.*, 2015) e

de peroxinitrito e hipoclorito em neutrófilos ativados (Ren; Ding; Lu, 2016). Outros estudos apontam também redução dos níveis de MDA em modelo experimental de aterosclerose após tratamentos com substâncias potencialmente antioxidantes, como: naringenina, um bio-flavonóide em frutas cítricas (Zhao *et al.*, 2021), o extrato de tomate (Iswari *et al.*, 2020) e o β -elemeno (Liu *et al.*, 2017).

Corroborando com os nossos achados, estudos prévios do nosso laboratório com o NDBP demonstram redução nos níveis de MDA no pâncreas e fígado em camundongos C57BL/6 com diabetes tipo 1 (Fernandes-Costa *et al.*, 2023) e redução na atividade da NADPH oxidase e nos níveis de superóxido no coração e no córtex renal de camundongos com hipertensão induzida por Ang II (Porpino *et al.*, 2016). Em adição, ao contrário de outros nitratos orgânicos, o NDBP possui a vantagem de não induzir tolerância (França-Silva *et al.*, 2012). Isso é importante, visto que, o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia da tolerância aos nitratos (Münzel; Daiber; Gori, 2013).

Somado aos resultados de redução dos níveis de MDA no plasma, identificamos também uma redução de ROS *in situ* na aorta de animais ApoE^{-/-} tratados com NaNO₂ e NDBP. Reforçando os nossos achados, Rossman e colaboradores (2021) identificaram que a suplementação de nitrito inorgânico melhora a função endotelial com o envelhecimento, diminuindo as espécies reativas de oxigênio mitocondrial/estresse oxidativo e aumentando a resistência ao estresse mitocondrial. A terapia com nitrito por 3 semanas reverte a disfunção endotelial vascular associada à idade, rigidez de grandes artérias elásticas, estresse oxidativo e inflamação (Sindler *et al.*, 2011). Estudos também demonstraram regulação negativa direta da NADPH oxidase pelo nitrito (Montenegro *et al.*, 2011; Zollbrecht *et al.*, 2016).

Em relação ao NDBP, já foi visto por nosso grupo que esse nitrato orgânico não induz tolerância e que o tratamento repetido tem efeitos favoráveis em um modelo de hipertensão renal associada ao estresse oxidativo, estando associado à liberação sustentada de NO e atividade atenuada da NADPH oxidase, que até certo ponto requer xantina oxidase funcional (Porpino *et al.*, 2016).

Todavia, o tratamento crônico com NDBP e NaNO_2 não resultou em aumento significativo nos níveis de NO na aorta quando comparado com os animais $\text{ApoE}^{-/-}$ salina. É possível, que esse achado seja decorrente da ligação do NO com heme. Segundo Kleschyov (2017) o NO-heme móvel pode ser uma forma essencial e previsível da bioatividade relacionada a NOS/NO que pode ser gerada sem a participação do NO livre.

Além disso, os efeitos benéficos do NaNO_2 e do NDBP foram observados apesar de não haver aumento significativo nos níveis plasmáticos de nitrito por ambas terapias. Estudo de Stamm e colaboradores (2021) também não observaram aumento nos níveis de nitrito plasmático após tratamento com nitrito inorgânico (7,5 mg/kg/dia), mesmo com melhora em marcadores de estresse oxidativo e inflamação em modelo de hipertensão arterial induzida por angiotensina-II em camundongos C57BL/6. Na aterosclerose experimental em camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$, os níveis plasmáticos de nitrito aumentaram significativamente com a suplementação de nitrato em dose alta (10 mmol/kg/dia) e moderada (1 mmol/kg/dia), porém sem aumento após suplementação com dose baixa de nitrato (0,1 mmol/kg/dia), mesmo a menor dose apresentando aumento na estabilidade da placa aterosclerótica (Bakker *et al.*, 2016).

Ressaltamos ainda que os animais C57BL/6 e $\text{ApoE}^{-/-}$ estavam em dietas diferentes o que pode justificar os altos níveis de nitrito plasmático nos camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ submetidos a dieta aterogênica por 12 semanas em relação ao grupo controle C57BL/6, que recebeu dieta padrão para roedores. Resultado semelhante foi encontrado Stanimirovi e colaboradores (2016) onde ratos machos alimentados com dieta rica em gordura exibiram um aumento significativo nos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato em comparação com os controles.

Desse modo, embora o NaNO_2 seja um precursor de NO e o NDBP um doador de NO, isso não se reflete necessariamente em aumento de NO dentro da célula e nos níveis plasmáticos de nitrito, e por isso a modulação da placa deve ser decorrente da redução do estresse oxidativo.

Passamos então a investigar as citocinas inflamatórias, já que elas desempenham um papel importante na progressão da placa de aterosclerose (Takahashi, 2011). Os animais ApoE^{-/-}, como esperado, apresentaram níveis de MCP-1 e TNF- α altos, embora não tenhamos observado diferença nas citocinas IL-6 e IL-10 (APÊNDICE 1) em comparação ao grupo controle. Infelizmente, estes dados podem ser decorrentes da interrupção no fornecimento de energia por mais 12h no laboratório, com o consequente descongelamento das amostras no decorrer da realização dos experimentos.

Nossos resultados demonstram que o tratamento com NaNO₂ reduziu os níveis de MCP-1 no líquido peritoneal em camundongos fêmeas ApoE^{-/-} de 8 semanas desafiados com zimosam, como também, em modelo de aterosclerose experimental alimentados com dieta aterogênica por 12 semanas. A proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), também conhecida como CCL2, é expressa principalmente por células inflamatórias e células endoteliais, se liga e ativa o receptor 2 de quimiocina CC (CCR2) e promove o recrutamento de macrófagos e monócitos para a parede do vaso. A MCP-1 é considerada crítica para o início e desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Gosling *et al.*, 1999; Harrington, 2000; Inoue *et al.*, 2002; Lin; Kakkar; Lu, 2014; Georgakis *et al.*, 2021b) e está associada a um maior risco de doença coronariana e acidente vascular cerebral isquêmico (Georgakis *et al.*, 2019).

Estudos corroboram com nossos achados, indicando um papel importante da MCP-1 na patogênese da aterosclerose não mediado pelo colesterol. Boring e colaboradores (1998) observaram uma diminuição geral no tamanho da lesão aterosclerótica com redução de macrófagos e monócitos nas aortas em camundongos deficientes para o receptor MCP-1, CCR2, sem alteração nos níveis globais de colesterol plasmático. A ausência de MCP-1 também proporcionou proteção dramática contra o recrutamento de macrófagos e a formação de lesões ateroscleróticas em camundongos transgênicos apo B, sem alterar o metabolismo das lipoproteínas. Além disso, estudo recente com 1.199 pacientes submetidos à endarterectomia carotídea demonstrou fortes associações entre os níveis de MCP-1 com múltiplas características de vulnerabilidade da placa (núcleo lipídico maior, baixo teor de colágeno, alta carga

de macrófagos, baixa carga de SMC, hemorragia intraplaca) (Georgakis *et al.*, 2021b).

Curiosamente, o tratamento com NDBP aumentou os níveis de MCP-1 em modelo de aterosclerose experimental tanto de forma aguda quanto crônica, embora tenha reduzido as lesões ateroscleróticas. O alta nos níveis de MCP-1 em decorrência do tratamento com NDBP pode explicar o aumento no número de leucócitos no modelo de inflamação aguda. Todavia, pesquisa recente alerta para as ações dicotômicas prejudiciais ou benéficas de MCP-1 produzida não apenas por SMCs, mas também por outros tipos de células lesionadas (Owsiany *et al.*, 2022). Estudo com flavonoides, por exemplo, demonstra que a canflavina aumentou os níveis de mRNA de MCP-1 em células endoteliais da artéria coronária humana de maneira dependente da concentração, embora outros flavonoides como a quercetina, kaempferol e luteolina inibiram substancialmente a expressão e secreção de MCP-1 e prejudicam a migração de monócitos desencadeada por MCP-1 (Brüser; Teichmann; Hinz, 2023).

Embora estudos demonstrem uma relação da MCP-1 com o TNF- α , onde camundongos duplos nocaute TNF- $\alpha^{-/-}$ Apoe $^{-/-}$ apresentaram redução do tamanho da placa no seio aórtico em comparação com o grupo controle Apoe $^{-/-}$ devido à diminuição da expressão de ICAM-1 e VCAM-1 e MCP-1 (Ohta *et al.*, 2005), não encontramos diferença nos níveis plasmático do TNF- α , nos animais tratados com NaNO₂ e NDBP.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, o tratamento crônico com NDBP e NaNO_2 demonstraram efeitos benéficos em modelo de aterosclerose experimental, tais como redução do estresse oxidativo plasmático e *in situ* na aorta, e redução da área total da placa, mesmo na ausência de modificações de colesterol ou alteração do perfil lipoproteico plasmático, níveis de NO *in situ* na aorta e nitrito plasmático. A ação antiaterogênica do NaNO_2 pode ter relação com a quimiocina MCP-1, já que o tratamento foi capaz de reduzi-la em modelo agudo e crônico de inflamação em animais ApoE^{-/-} e diminuir a migração celular em animais normocolesterolêmicos. Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer o efeito dual do NDBP, uma vez que em modelo de inflamação aguda promoveu aumento da migração celular, possivelmente pelo envolvimento da quimiocina MCP-1, embora o tratamento crônico tenha promovido redução na área total da placa.

REFERÊNCIAS

- AJUEBOR *et al.* Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. **Immunology**, v. 95, n. 4, p. 625-630, dez. 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00644.x>.
- AKER, S. *et al.* Influence of interleukin-6 G-174C gene polymorphism on coronary artery disease, cardiovascular complications and mortality in dialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 9, p. 2847-2851, 6 abr. 2009b. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp141>.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, v. 2, n. 8, p. 675-680, ago. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/90609>.
- ALAGARSAMY, J.; JAESCHKE, A.; HUI, D. Y. Apolipoprotein E in Cardiometabolic and Neurological Health and Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9892, 31 ago. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23179892>.
- AMARAL, J. H. *et al.* Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. **Redox Biology**, v. 5, p. 340-346, ago. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.009>.
- ANOOP, S.; MISRA, A.; MEENA, K.; *et al.* Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases. **The Indian Journal of Medical Research**, v.132, p.363-378, 2010.
- ARYA, P.; KUMAR, N.; BHANDARI, U.; *et al.* Hidden attributes of zymosan in the pathogenesis of inflammatory diseases: A tale of the fungal agent. **Iran J Basic Med Sci**, v.26, n.4, p:380-387, 2023.
- BALARINI, C. M. *et al.* Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 1, p. 3, 2013. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-3>.
- BAKKER, J. R.; BONDONNO, N. P.; GASPARI, T. A.; *et al.* Low dose dietary nitrate improves endothelial dysfunction and plaque stability in the ApoE^{-/-} mouse fed a high fat diet. **Free Radical Biology and Medicine**, v.99, p.189-198, 2016.
- BASURTO, L.; GREGORY, M. A.; HERNÁNDEZ, S. B.; *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and fibroblast growth factor-21 (FGF-21) as biomarkers of subclinical atherosclerosis in women. **Experimental gerontology**, v.124, 110624, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.05.013>
- BRYAN, R.M.; YOU, J.; GOLDING, E.M.; MARRELLI, S.P. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Anesthesiology**, v.102, n.6, p.12611-277, 2005.

BROPHY, M. L.; DONG, Y.; WU, H.; *et al.* Eating the Dead to Keep Atherosclerosis at Bay. **Front Cardiovasc Med.**, v.30, n4, p.2, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00002>.

BOBRY SHEV, Y. V. *et al.* Macrophages and their role in atherosclerosis: pathophysiology and transcriptome analysis. **BioMed Research International**, p.1-13, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9582430>.

BONDONNO, C. P. *et al.* Association of Vegetable Nitrate Intake With Carotid Atherosclerosis and Ischemic Cerebrovascular Disease in Older Women. **Stroke**, v. 48, n. 7, p. 1724-1729, jul. 2017.

BORING, L. *et al.* Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. **Nature**, v.394, p.894–897, 1998.

BOT, I.; ORTIZ ZACARÍAS, N. V. DE WITTE, W. E. *et al.* A novel CCR2 antagonist inhibits atherogenesis in apoE-deficient mice, achieving high receptor occupancy. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p.52, 2017.

BRESLOW, J. L. Mouse models of atherosclerosis. **Science**, v.272, n.5262, p.685-688, 1996. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.685>.

BRÜSER, L.; TEICHMANN, E.; HINZ, B. Effect of Flavonoids on MCP-1 Expression in Human Coronary Artery Endothelial Cells and Impact on MCP-1-Dependent Migration of Human Monocytes. **Int J Mol Sci.**, v.24, n.22, p.16047, 2023.

BUTLER, A. R.; FEELISCH, M. Therapeutic Uses of Inorganic Nitrite and Nitrate. *Circulation*, v. 117, n. 16, p. 2151-2159, 22 abr. 2008. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.107.753814>.

CALIGIURI, G.; RUDLING, M.; OLLIVIER, V.; *et al.* Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice." **Mol Med**, v.9, n.1–2, p.10-7, 2003.

CARVALHO, L. Rannier R. A. *et al.* Effects of chronic dietary nitrate supplementation on longevity, vascular function and cancer incidence in rats. **Redox Biology**, v. 48, p. 102209, dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102209>.

CARLSTRÖM, M. *et al.* Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 89, n. 3, p. 574-585, 2011. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq366>.

CASH, J. L.; WHITE, G. E.; GREAVES, D. R. Chapter 17. Zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation. **Methods Enzymol**, v.461, p.379-96, 2009.

CAVALCANTI, C. O.; ALVES, R. R.; DE OLIVEIRA, A. L. *et al.* Inhibition of PDE5 Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats.

Front Physiol., v. 28, p7- 15, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00015>

CHATZIZISIS, Y. S.; COSKUN, A. U.; JONAS, M. *et al.* Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. **J Am Coll Cardiol**, n.49, v. 25, p. 2379-93, 2007.

CHEN, Q.; WANG, Q.; ZHU, J.; XIAO, Q.; ZHANG, L. Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and disease. **Br. J. Pharmacol**, v.175, p.1279-1292, 2018.

CHI, H.; MESSAS, E.; LEVINE, R. A.; GRAVES, D. T.; AMAR, S. Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications. **Circulation**, v. 110, p. 1678-1685, 2004.

CHOI, H. *et al.* Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-KB signaling in residente macrophages. **Blood**, v. 118, p.330-8, 2011.

CONNELLY, L. *et al.* Biphasic Regulation of NF-κB Activity Underlies the Pro- and Anti-Inflammatory Actions of Nitric Oxide. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 3873-3881, 2001. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.3873>.

DAVIGNON, J.; COHN, J. S.; MABILE, L.; BERNIER, L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. **Clinica Chimica Acta**, v.286, p. 115-143, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(99\)00097-2](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(99)00097-2).

DINARELLO, C. A. Interleukin-1beta and autoinflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.** v.360, p.2467- 2470, 2009. <https://doi.org/10.1056/NEJMe0811014>

DOHERTY, N. S. *et al.* Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 769-789, 1 nov. 1985.

FRANSEN, P. *et al.* Função endotelial em segmentos de aorta de camundongos deficientes em apolipoproteína E antes do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. **Pflug. Arco**, v.455, p. 811-818, 2008.

FRANÇA-SILVA, M. S. **Avaliação dos efeitos do NDBP sobre o sistema cardiovascular**. 2012. 115 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2012.

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

FEARON, W. F.; FEARON, D.T. Inflammation and cardiovascular disease: role of the interleukin-1 receptor antagonist. **Circulation**, v.117, n.20, p.2577-9, 2008. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.772491>.

FERNANDES-COSTA, F.; DA SILVA, R.T. G.; FLÔR, A. F. L. *et al.* The organic nitrate NDBP promotes cardiometabolic protection in type 1 diabetic mice. **Journal of Functional Foods**, v.104, 2023.

FREITAS LIMA, L. C.; BRAGA, V. D. A.; do SOCORRO DE FRANÇA SILVA, M.; CRUZ, J. D. C.; SOUSA SANTOS, S. H.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, M. M.; BALARINI, C. D. M. Adipokines, diabetes and atherosclerosis: An inflammatory association. **Front. Physiol**, v.6, p.1-15, 2015.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J.**, v.33, n.7, p.829-37, 2012. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>. Epub 2011

FORSTERMANN, U.; XIA, N.; LI, H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Circ Res.**, v.120, p.713-735, 2017.

GAO, X. *et al.* NADPH oxidase in the renal microvasculature is a primary target for blood pressure-lowering effects by inorganic nitrate and nitrite. **Hypertension**, v.65, n.1, p.161-170, 2015.

GEOVANINI, G. R; LIBBY, P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. **Clin Sci (Lond)**, v.132, n.12, p.1243-1252, 2018.

GEORGAKIS, M. K.; MALIK, R.; LI, X.; *et al.* Regeneron Genetics Center.Genetically downregulated interleukin-6 signaling is associated with a favorable cardiometabolic profile: a phenome-wide association study.**Circulation**, v. 143, p.1177-1180, 2021a.

GEORGAKIS, M. K.; VAN DER LAAN, S. W.; ASARE, Y. *et al.* Monocyte chemoattractant protein 1 levels in human atherosclerotic lesions associated with plaque vulnerability. **Trombo. Vasco. Biol.**, v.41, p.2038–2048, 2021b.

GEORGAKIS, M. K.; DE LEMOS, J. A.; AYERS, C. *et al.* Association of Circulating Monocyte Chemoattractant Protein-1 Levels With Cardiovascular Mortality: A Meta-analysis of Population-Based Studies. **JAMA Cardiol.**, v.6, n.5, p.587–592, 2021c. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.5392>

GEORGAKIS, M. K. *et al.* Genetically determined levels of circulating cytokines and risk of stroke. **Circulation**, v.139, n.2, p.256-268, 2019. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035905>

GOSLING, Jennifa *et al.* MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 6, p. 773-778, 15 mar. 1999. <https://doi.org/10.1172/jci5624>

GOLDSBY R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE B. A. **Kuby Immunology**, 4 ed. W. H. Freeman and Company. 2000.

GORI, T.; DAIBER, A.; DI STOLFO, G.; SICURO, S.; DRAGONI, S.; LISI, M.; MUNZEL, T.; FORCONI, S.; PARKER, J.D. Nitroglycerin causes production of mitochondrial reactive oxygen species: mechanistic insights in vitro. **Can J Cardiol**, v.23, p.990-992, 2007.

GOLDWATER, D.; KARLAMANGLA, A.; MERKIN, S. S.; WATSON, K.; SEEMAN, T. Interleukin-10 as a predictor of major adverse cardiovascular events in a racially and ethnically diverse population: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Ann Epidemiol.**, v.30, p.9-14.e1, 2019.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

HACKER, A.; MÜLLER, S.; MEYER, W.; KOJDA, G. The nitric oxide donor pentaerythritol tetranitrate may preserve endothelial function in established atherosclerosis. *Br. J. Pharmacol.*, v. 132, p.1707-1714, 2001.

HADI, H.A.; CARR, C.S.; AL SUWAIDI, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. **Vasc Health Risk Manag.**, v.1, n.3, p.183-98, 2005.

HAN, X.; KITAMOTO, S.; WANG, H.; BOISVERT, W. A. Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice. **FASEB J.**, v.24, n.8, p.2869–80, 2010.

HANSSON, G. K.; LIBBY, P. "A resposta imune na aterosclerose: uma faca de dois gumes". **Nat Rev Immunol**, v.6, p. 508, 2006.

HARRINGTON, Jennifer R. The Role of MCP-1 in Atherosclerosis. **Stem Cells**, v. 18, n. 1, p. 65-66, jan. 2000. <https://doi.org/10.1634/stemcells.18-1-65>.

HEZEL, M. P. *et al.* Effects of long-term dietary nitrate supplementation in mice. **Redox Biology**, v.5, p.234-242, 2015.

HELD, C. *et al.* Inflammatory Biomarkers Interleukin-6 and C-Reactive Protein and Outcomes in Stable Coronary Heart Disease: Experiences From the STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) **Trial. J Am Heart Assoc.** v.6, n.10, oct, 2017.

HOFKER, M. H.; VAN VLIJMEN, B. J.; HAVEKES, L. M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.137, n.1, p.1-11, 1998.

HUNG, N. D.; KIM, M.R.; SOK, D. E. 2-Polyunsaturated acyl lysophosphatidyl ethanolamine attenuates inflammatory response in zymosan A-induced peritonitis in mice. **Lipids**, v.46, p.893-906, 2011.

INOUE, S.; EGASHIRA, K.; NI, W. *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein 1 gene therapy limits the progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. **Circulation**, v.106, n.21, p.2700-2706, 2002.

ISWARI, R. S.; DAFIP, M.; PURWANTOYO, E. Malondialdehyde (MDA) production in atherosclerosis supplemented with Steamed Tomato. **Pak. J. Biol. Sci.**, v.24, n. 3, p. 319-325, 2020.

JAWIEŃ, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **J Physiol Pharmacol.**, v.55, n.3, p.503-517, sept 2004.

JAWIEN, J. The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.13, p.1-5, 2012. 2012.

JADERT, C; PETERSSON, J.; MASSENA, S. *et al.* Decreased leukocyte recruitment by inorganic nitrate and nitrite in microvascular inflammation and NSAID-induced intestinal injury. **Free Radic Biol Med**, v.52, 683-692, 2012.

JIANG, F.; GIBSON, A.P.; DUSTING, G.J. Endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins in isolated mouse aorta: a comparison with apolipoprotein-E deficient mice. **European Journal of Pharmacology**, v.424, n.2, p.141-149, 2001.

JOHNSON, J. L. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. **Expert Rev Cardiovasc Ther.**, v. 5, p.265-282, 2007.

JONASSON, L.; HOLM, J.; SKALLI, O.; BONDJERS, G; HANSSON, G. K. Regional accumulations of T cells, macrophages and smooth muscle cells in human atherosclerotic plaque. **Arteriosclerosis**, v.6, p. 131-138, 1986.

JUSTICE, J. N. *et al.* Sodium nitrite supplementation improves motor function and skeletal muscle inflammatory profile in old male mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 118, n. 2, p. 163-169, 15 jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00608.2014>.

KATTOOR, A. J.; POTHINENI, N. V. K.; PALAGIRI, D.; MEHTA, J. L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep.**, v.18;19(11), p.42, 2017. doi: 10.1007/s11883-017-0678-6.

KLATT, P.; ESTERBAUER, H. Hipótese oxidativa aterogênese. **J Cardiovasc Risk**, v.3, p. 346-351, 1996.

KHAMBATA, R. S.; GHOSH, S. M.; RATHOD, K. S.; THEVATHSAN, T.; FILOMENA, F.; AHLUWALIA, A. Antiinflammatory actions of inorganic nitrate stabilize the atherosclerotic plaque. **Proc Natl Acad Sci.**, v.114, n.4, p.E550-E559, 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613063114>.

KRAEHLING, J. R. *et al.* Genome-wide RNAi screen reveals ALK1 mediates LDL uptake and transcytosis in endothelial cells. **Nat Commun**, v.21, n.7, 2016.

KLESCHYOV, A. L. The NO-heme signaling hypothesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.112, p. 544-552, 2017.

KLEMENSKA, E.; BERĘSEWICZ, A. Bioactivation of organic nitrates and the mechanism of nitrate tolerance. **Cardiol J**, v.16, n.1, p.11-19, 2009.

KLEEMANN, R.; ZADELAAR, S.; KOOISTRA, T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. **Cardiovasc Res.**, v.79, n.3, p.360-76, 2008. doi: 10.1093/cvr/cvn120.

KIRII, H.; NIWA, T.; YAMADA, Y.; WADA, H.; SAITO, K.; IWAKURA, Y.; ASANO, M.; MORIWAKI, H.; SEISHIMA, M. Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.23, p. 656-660, 2003.

KOLACZKOWSKA, E; KUBES, P. Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation. **Nat Rev Immunol**, v.13, n.3, p.159-175, 2013.

KOLOVOU, G.; ANAGNOSTOPOULOU, K.; MIKHAILIDIS, D.P.; COKKINOS, D.V. Apolipoprotein E knockout models. **Current Pharmaceutical Design**, v.14, n.4, p.338–351, 2008.

KONG, P.; CUI, Z. Y.; HUANG, X. F.; ZHANG, D. D.; GUO, R. J.; HAN, M. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. **Signal Transduct Target Ther**, v.7, n.1, p.131, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00955-7>.

KNORR, M.; HAUSDING, M.; KROLLER-SCHUHMACHER, S.; *et al.* Nitroglycerin-Induced Endothelial Dysfunction and Tolerance Involve Adverse Phosphorylation and S-Glutathionylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. **Arterioscler. Trombo. Vasco. Biol.**, v.31, p.2223–2231, 2011.

KUBES, P; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Nac. Acad. science USA**, v.88, p .4651-4655, 1991.

KUNSCH, C; MEDFORD, M. R. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. **Circ Res.**, v.85, p.753-766, 1999.

LAMB, F. S; CHOI, H.; MILLER, M. R.; STARK, R. J. TNF α and Reactive Oxygen Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells in Hypertension and Atherosclerosis. **American Journal of Hypertension**, v. 33, n. 10, p. 902–913, 2020. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpaa089>

LARSEN, F. J.; EKBLOM, B.; SAHLIN, K.; LUNDBERG, J. O; WEITZBERG, E. Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. **N. Engl. J. Med.**, v.355, p.2792 -2793, 2006.

LEITE, ERICKA GARCIA. **Avaliação dos efeitos induzido pelo 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP) na função vascular em modelo de aterosclerose.** Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019, 89f.

LEY, K. Role of the adaptive immune system in atherosclerosis. **Biochem Soc Trans.**, v.48, p.2273–81, 2020.

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

LIBBY, P. History of Discovery: Inflammation in Atherosclerosis. **Arterioscler. Pulso. Vasc. Biol.**, v.32, p.2045–2051, 2012.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v.420, p.868-874, 2002.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. **J Am Coll Cardiol** ., v.54, n. 23, p.2129 - 2138, 2009.

LIBBY, P.; BURING, J. E.; BADIMON, L. *et al.* Atherosclerosis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 5, n.56, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>

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

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v.45, p.89-118, 2005.

LIN, J.; KAKKAR, V.; LU, X. Impact of MCP -1 in Atherosclerosis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 28, p. 4580-4588, 2014. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140522115801>

LIU, Y.; CROFT, K. D.; MORI, T. A. *et al.* A suplementação dietética de nitrato a longo prazo retarda a progressão da aterosclerose estabelecida em camundongos ApoE ^{-/-} alimentados com uma dieta rica em gordura. **Eur J Nutr**, v.62, p.1845-1857, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00394-023-03127-7>

LIU, M.; CHEN, X.; MA, J. *et al.* β -Elemene attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice *via* restoring NO levels and alleviating oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.95, p.1789-1798, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.092>

LUNDBERG, J. O; WEITZBERG, E; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v.7, p.156-167, 2008.

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

MALLAT, Z.; TALEB, S.; AIT-OUFELLA, H.; TEDGUI, A. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. **J Lipid Res.**, v. 50 Suppl(Suppl):S364-9, 2009. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800092-JLR200>.

MARSCH, E. *et al.* The effect of prolonged dietary nitrate supplementation on atherosclerosis development. **Atherosclerosis**, v.245, p.212-221, 2016.

MEIR, K.S.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.24, n.6, p.1006-1014, 2004.

MERHI-SOUSSI, F.; KWAK, B.R.; MAGNE, D.; CHADJICHRISTOS, C.; BERTI, M.; PELLI, G.; ET AL. Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice, **Cardiovasc Res.**, v. 66, p. 583-593, 2005.

MEYRELLES, S.S.; PEOTTA, V.A.; PEREIRA, T.M.C.; *et al.* Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids in Health and Disease**, v.10, n.1, p.211, 2011.

MONTENEGRO, M. F.; AMARAL, J. H.; PINHEIRO, L. C.; SAKAMOTO, E. K.; FERREIRA, G. C.; REIS, R. I.; MARCAL, D. M.; PEREIRA, R. P.; TANUS-SANTOS, J. E. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 51, p. 144-152, 2011.

MONTENEGRO, M. F.; SUNDQVIST, M. L.; NIHLÉN, C.; *et al.* Profound differences between humans and rodents in the ability to concentrate salivary nitrate: Implications for translational research. **Redox Biol.**, v.10, p.206-210, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.011>.

MOGHADASIAN, M. H.; FROHLICH, J. J.; MCMANUS, B. M. Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. **Lab Invest**, v.81, n.9, p.1173 - 1183, 2001.

MÜNZEL, T.; DAIBER, A.; GORI, T. More answers to the still unresolved question of nitrate tolerance. **Eur Heart J.**, v. 34, n.34, p.2666-73, 2013.

MULLER, S.; KÖNIG, I.; MEYER, W.; KOJDA, G. Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by eccentric isosorbide mononitrate. **J Am Coll Cardiol.**, v. 44 , 624-631, 2004.

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

NGUYEN, M. T.; FERNANDO, S.; SCHWARZ, N.; TAN, J. T; BURSIL, C. A; PSALTIS, P. J. Inflamação como alvo terapêutico na aterosclerose. **J.Clin.Med**, v.8, p.1109, 2019. <https://doi.org/10.3390/jcm8081109>.

OHASHI, R.; UM, H.; YAO, Q. H.; CHEN, C. Y. Mecanismos celulares e moleculares da aterosclerose com modelos de camundongos. **Tendências Cardiovasc Med.**, v.14, p.187-190, 2004.

OLIVEIRA, G. M. M.; BRANT, L. C. C.; POLANCZYK, C. A.; *et al.* Estatística Cardiovascular – Brasil 2021. **Arq Bras Cardiol.**, 118(1), p.115-373, 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Estatísticas mundiais de saúde 2018**: monitoramento da saúde para os ODS, metas de desenvolvimento sustentável. Organização Mundial da Saúde, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **O ônus econômico global das doenças não transmissíveis** - Reduzindo o impacto econômico das doenças não transmissíveis em países de renda baixa e média. Genebra: Fórum Econômico Mundial, 2011.

OSMAR, S. A.; WEBB, A. J.; LUNDBERG, J. O; WEITZBERG, E. Therapeutic effects of inorganic nitrate and nitrite in cardiovascular and metabolic diseases (Review). **J I.tern. Med.**, v. 279, p.315–336, 2016.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 477-487, 2008.

OHTA, H. *et al.* Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 180, n. 1, p. 11-17, maio 2005. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.016>.

OHARA, Y.; PETERSON, T.E.; HARRISON, D.G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. **The Journal of Clinical Investigation**. v.91, n.6, p.2546-2551, 1993.

OHTAKE, Kazuo *et al.* Dietary nitrite reverses features of postmenopausal metabolic syndrome induced by high-fat diet and ovariectomy in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 312, n. 4, p. E300-E308, 1 abr. 2017. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00360.2016>.

OWSIANY, K. M. *et al.* Dichotomous Roles of Smooth Muscle Cell–Derived MCP1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) in Development of Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.42, p.942-956, 2022. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.317882>

PAPAC-MILICEVIC, N.; BUSCH, C. J.; BINDER, C. J. Malondialdehyde Epitopes as Targets of Immunity and the Implications for Atherosclerosis. **Adv Immunol.**, v.131, p.1-59, 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2016.02.001>.

PAPADOPOULOU, C.; CORRIGALL, V.; TAYLOR, P. R.; POSTON, R. N. The role of the chemokines MCP-1, GRO- α , IL-8 and their receptors in the adhesion of monocytic cells to human atherosclerotic plaques. **Cytokine**, v.43, n.2, p.181-6, 2008.

PINDERSKI, L. J.; FISCHBEIN, M. P.; SUBBANAGOUNDER, G.; *et al.* Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient Mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes. **Circulation research**, v.90, n.10, p.1064–71, 2002.

PLUTA, R.M.; OLDFIELD, E.H.; BAKHTIAN, K.D.; FATHI, A.R.; SMITH, R.K.; DEVROOM, H.L.; NAHAVANDI, M.; WOO, S.; FIGG, W.D.; LONER, R.R. Segurança e viabilidade da infusão intravenosa de nitrito de sódio a longo prazo em voluntários saudáveis. **PLoS One**, v.6, p. e14504, 2011.

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**, v.173, n.14, p.2290-302, 2016.

RAMMS, B.; GORDTS, P. L. S. M. Dietary nitrate struggles in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.245, p.71-73, 2016.

REN, X.; DING, Y., LU, N. Nitrite attenuated peroxynitrite and hypochlorite generation in activated neutrophils. **European Journal of Pharmacology**. v. 775, p.50-56, 2016.

RIDKER, P. M.; LIBBY, P.; MACFADYEN, J. G.; *et al.* Modulation of the interleukin-6 signalling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: analyses from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). **Eur Heart J**. v.39, p.3499-3507, 2018. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy310>

RIDKER, P. M.; MACFADYEN, J. G.; THUREN, T.; LIBBY, P. Residual inflammatory risk associated with interleukin-18 and interleukin-6 after successful interleukin-1 β inhibition with canakinumab: further rationale for the development of targeted anti-cytokine therapies for the treatment of atherothrombosis. **Eur Heart J**, v.41, p.2153-2163, 2020. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz542>

RIDKER, P. M.; DEVALARAJA, M.; BAERES, F. M. M.; *et al.* IL-6 inhibition with ziltivekimab in patients at high atherosclerotic risk (RESCUE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. **Lancet**, v.397, p.2060-2069, 2021.

RIDKER, P. M.; RANE, M. Interleukin-6 signaling and anti-interleukin-6 therapeutics in cardiovascular disease. **Circ Res**, p.128, p.1728-1746, 2021. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319077>

RIDKER, P. M. Residual inflammatory risk: addressing the obverse side of the atherosclerosis prevention coin. **Eur Heart J**, v.37, p.1720-1722, 2016.

RODRIGUES, B. P.; CAMPAGNARO, B. P.; BALARINI, C. M.; PEREIRA, T. M. C.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. **Lipids Health Dis**. v.12, 128-133, 2013.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990. **Nature**, v.362, p.801-809, 1993.

ROSS, R. Atherosclerosis an inflammatory disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p.115 - 126, 1999.

ROSSMAN, M. J.; GIOSCIA-RYAN, R. A.; SANTOS-PARKER, J. R.; *et al.* Inorganic Nitrite Supplementation Improves Endothelial Function With Aging: Translational Evidence for Suppression of Mitochondria-Derived Oxidative Stress. **Hypertension**, v.77, n.4, p.1212-1222, 2021.

ROTH, L.; VAN DER DONCKT, C.; EMINI VESELI, B.; *et al* Nitric oxide donor molsidomine favors features of atherosclerotic plaque stability and reduces myocardial infarction in mice. **Vascul Pharmacol.**,118-119:106561,2019.

RUSSO, G.; LEOPOLD, J. A.; LOSCALZO, J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Vascul Pharmacol**, v.38, p.259 - 269, 2002.

SANTOS, A. F. **Novas Perspectivas da Glicerina – Síntese de Novos Nitratos com Propriedades Farmacológicas e Melhoradores de Cetano**. 2009. 116 f.Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2009.

STANNARD, A. K.; RIDDELL, D. R.; BRADLEY, N. J.; HASSALL, D. G.; GRAHAM, A.; OWEN, J. S. Apolipoprotein E and regulation of cytokine-induced cell adhesion molecule expression in endothelial cells. **Atherosclerosis**, v.139, n.1, p.57-64, 1998.

SKALEN, K. *et al.* Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. **Nature**, v. 417, p. 750-754, 2002.

SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Quím. Nova**, v.34, n.2, 2011.

SANTOS, M. G. *et al.* Fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose na infância e adolescência **Arq. Bras. Cardiol.**, v.90, n.4, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2008000400012>

SHARIKABAD, M. N.; ØSTBYE, K. M.; LYBERG, T.; BRØRS, O. Effect of extracellular Mg²⁺ on ROS and Ca²⁺ accumulation during reoxygenation of rat cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 280, n.1, H344-H353, 2013.

SCHACHNIK, N. C. C. **Uso da citometria de fluxo para análise de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com nefropatia crônica de enxerto**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2008. 129 p. Dissertação de Mestrado.

SINGH, M.; ARYA, A.; KUMAR, R.; BHARGAVA, K.; SETHY, N. K. Dietary nitrite attenuates oxidative stress and activates antioxidant genes in rat heart during hypobaric hypoxia. **Nitric. Oxide**, v. 26, n.1, p.61-73, 2012.

SOEHNLEIN, O.; LIBBY, P. Targeting inflammation in atherosclerosis - from experimental insights to the clinic. **Nat Rev Drug Discov**, v.20, n.8, p.589-610, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00198-1>.

STANIMIROVIC, J.; OBRADOVIC, M.; JOVANOVIC, A.; *et al.* A high fat diet induces sex-specific differences in hepatic lipid metabolism and nitrite/nitrate in rats. **Nitric Oxide**, v.54, p.51-59, 2016.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. **Anal Biochem**, v. 524, p.13–30, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>.

SIQUEIRA *et al.* Impacto econômico das doenças cardiovasculares. **Arq Bras Cardiol.**, v.109, n.1, p.39-46, 2017.

SINDLER, A. L.; FLEENOR, B. S.; CALVERT, J. W.; *et al.* Nitrite supplementation reverses vascular endothelial dysfunction and large elastic artery stiffness with aging. **Aging Cell.**, v.10, n.3, p.429-37, 2011.

SHI, X.; GAO, J.; LV, Q.; CAI, H.; WANG, F.; YE, R.; LIU, X. Calcification in Atherosclerotic Plaque Vulnerability: Friend or Foe? **Front. Physiol.**, v.11,n.56, 2020.

STAMM, P.; OELZE, M.; STEVEN, S.; *et al.* Direct comparison of inorganic nitrite and nitrate on vascular dysfunction and oxidative damage in experimental arterial hypertension. **Nitric Oxide**.113-114, p.57-69, 2021.

STOKES, K. Y.; CLANTON, E. C.; RUSSELL, J. M.; ROSS, C. R.; GRANGER, D. N. NAD(P)H oxidase-derived superoxide mediates hypercholesterolemia-induced leukocyte– endothelial cell adhesion. **Circ. Res.**, v. 88, p.499–505; 2001.

STOKES, K. Y; DUGAS, T.R; TANG, Y; GARG, H; GUIDRY, E; BRYAN, N. S. Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 296, H1281-8, 2009.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best practice & research Clinical anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 85-405, 2004.

SWERDLOW, D. I.; HOLMES, M. V.; KUCHENBAECKER, K. B.; *et al.* The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis. **Lancet**, v.379, p.1214–1224, 2012. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60110-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60110-X)

TABAS, I.; WILLIAMS, K. J.; BOREN, J. Subendothelial lipoprotein retention as an initiation process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. **Circulation**, v. 116, p.1832-1844, 2007.

TAKAHASHI, M. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. **Nihon Rinsho.**, v.69, n.1, p.30-3, 2011.

TAMER, L.; SUCU, N.; POLAT, G.; ERCAN, B.; AYTACOGLU, B.; YÜCEBILGIÇ, G.; UNLÜ, A.; DIKMENGİL, M.; ATIK, U. Decreased serum total antioxidant status and erythrocyte-reduced glutathione levels are associated with increased serum malondialdehyde in atherosclerotic patients. **Arch Med Res.**, v. 33, n.3, p.:257-60, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(01\)00381-2](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(01)00381-2).

TRIPATHI, P. *et al.* The role of nitric oxide in inflammatory reactions, **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, n.3, p.443–452, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00329.x>

TSIOUFIS, P.; THEOFILIS, P.; TSIOUFIS, K.; TOUSOULIS, D. The Impact of Cytokines in Coronary Atherosclerotic Plaque: Current Therapeutic Approaches. **Int J Mol Sci.**, v. 23, n.24, p.15937, 2022.

TOUSOULIS, D.; OIKONOMOU, E.; EVANGELOS K. *et al.* Inflammatory cytokines in atherosclerosis: current therapeutic approaches. **European Heart Journal**, v. 37, n. 22, p. 1723-1732, 2016.

TOUYZ, R. M. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v.1, p. 98-105, 2000.

UNDERHILL, D. M. Macrophage recognition of zymosan particles. **J Endotoxin Res.**, v. 9, p:176-180, 2003.

VIRMANI, R.; BURKE, A.P.; FARB, A.; KOLODIE, F.D. Pathology of the vulnerable plaque. **J Am Coll Cardiol**, v.47(8 Suppl), p.C13–18, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.10.065>

WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. Novel Aspects of Dietary Nitrate and Human Health. **Annu Rev Nutr**, v.33, p.129-159, 2013.

WITZTUM, J. L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low protein in atherosclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.88, p.1785-1792, 1991.

WITZTUM, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**. v.344, p.793-5, 1994.

WILKINS, R. W; HAYNES, F. W; WEISS, S. The role of the venous system in circulatory collapse induced by sodium nitrite. **J Clin Invest** , v.16, p.85-91,1937.

XIANGDONG, L.; YUANWU, L.; HUA, Z.; LIMING, R.; QIUYAN, L.; NING, L. Animal models for the atherosclerosis research: a review. **Protein & Cell**. v2, n.3, p.189-201, 2011.

YANG, T. *et al.* Inorganic nitrite attenuates NADPH oxidase-derived superoxide generation in activated macrophages via a nitric oxide-dependent mechanism. **Free Radic Biol Med.**, v. 83, p. 159-66, 2015.

YOSHIOKA, T.; OKADA, T.; MAEDA, Y. *et al.* Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein-deficient mice. **Gene Ther.**, v.11 , 1772–1779, 2004.

ZERNECKE, A.; WEBER, C. Chemokines in Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.34, n. 4, p.742-750, 2014. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301655>

ZHAO, R.; XIAO, H.; JIN, T.; XU, F.; LI, Y.; LI, H.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y. Naringenin promotes cell autophagy to improve high-fat-diet-induced atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.54, n.4, e9764, 2021.

ZHANG, H. *et al.* Quantitative analysis of fibrosis formation on the microcapsule surface with the use of picro-sirius red staining, polarized light microscopy, and digital image analysis. **J Biomed Mater Res A.**, v.76, n.1, p. 120-5, 2006.

ZHOU, Q.; LIAO, J. K. Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy. **Curr Pharm Des.**, v.15, n.5, p.467-78, 2009. <https://doi.org/10.2174/138161209787315684>.

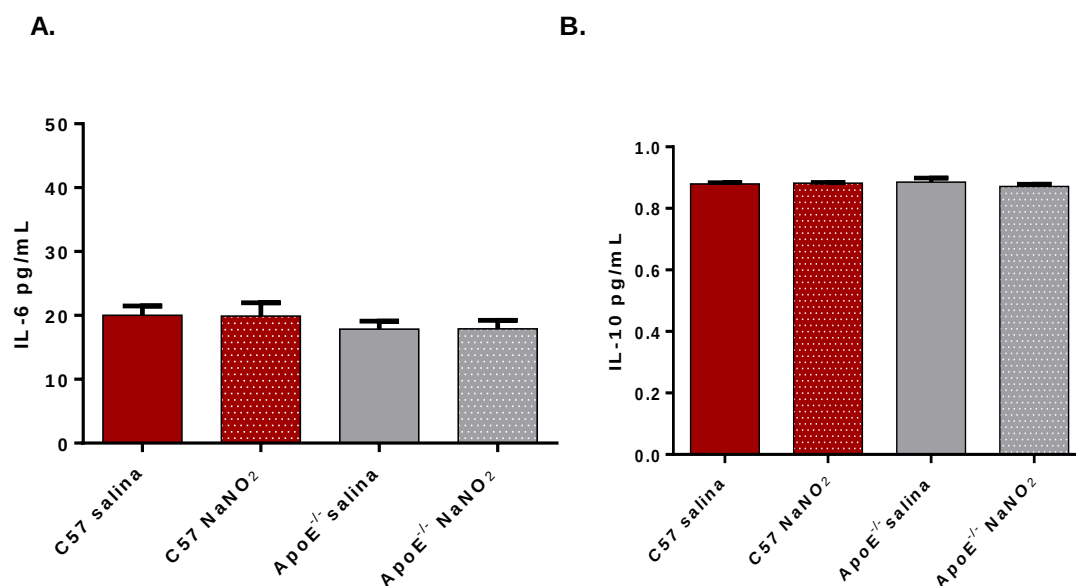
ZOLLBRECHT, C. *et al.* Nitrite-mediated reduction of macrophage NADPH oxidase activity is dependent on xanthine oxidoreductase-derived nitric oxide but independent of S-nitrosation. **Redox Biology**, v.10, p.119-127, 2016.

ZUNIGA, M. C.; WHITE, S. L. P.; ZHOU, W. Design and utilization of macrophage and vascular smooth muscle cell co-culture systems in atherosclerotic cardiovascular disease investigation. **Vascular Medicine**, v.19, n.5, p.394-406, 2014.

ZHU, Y; XIAN, X; WANG, Z; BI, Y; CHEN, Q; HAN, X; *et al.* Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. **Biomolecules**, v.8, n. 3, 2018.

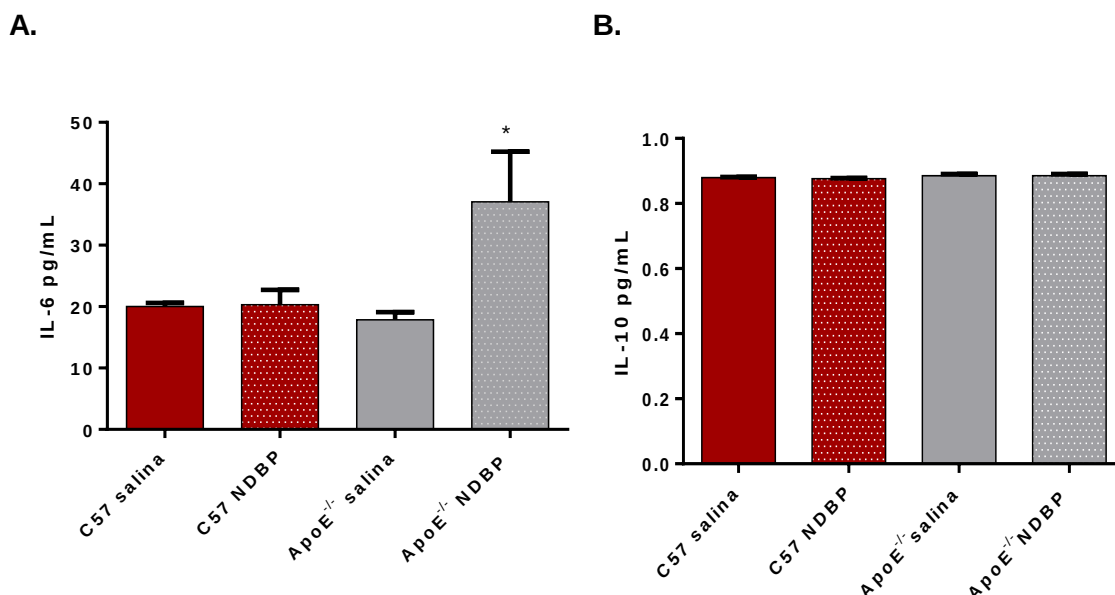
APÊNDICES

APÊNDICE 1: Efeito do tratamento crônico com NaNO_2 nos níveis plasmáticos de IL-6 e IL-10



Quantificação dos níveis plasmáticos das citocinas em camundongos C57/Bl e ApoE^{-/-} fêmeas (n=6) tratados com NaNO_2 ou salina durante 21 dias consecutivos via gavagem. A. IL-6; B. IL-10. Os dados numéricos foram expressos em média $\pm$ EPM. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Foi feito ANOVA One-way seguido pelo pós teste de Tukey. $p < 0,05$.

Efeito do tratamento crônico com NDBP nos níveis plasmáticos de IL-6 e IL-10



Quantificação dos níveis plasmáticos das citocinas em camundongos C57/Bl e ApoE^{-/-} fêmeas (n=6) tratados com NDBP ou salina durante 21 dias consecutivos via gavagem. A. IL-6; B. IL-10. Os dados numéricos foram expressos em média $\pm$ EPM. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Foi feito ANOVA One-way seguido pelo pós teste de Tukey. $p < 0,05$. * $p < 0,05$ vs ApoE^{-/-} salina.

APÊNDICE 2: Efeito do tratamento agudo com NaNO₂ e NDBP nos níveis plasmáticos de IL-6, TNF- α , IL-10 e MCP-1

C57BL/6							
	SALINA	CRE	NaNO ₂	NDBP	ZIM	NaNO ₂ +ZIM	NDBP+ZIM
IL-6	14,3 $\pm$ 8,2	26,5 $\pm$ 7,8	69,6 $\pm$ 23,6	28,6 $\pm$ 15,4	456 $\pm$ 86#	440 $\pm$ 74#	362 $\pm$ 8,5#
TNF-α	22,8 $\pm$ 7,7	43,9 $\pm$ 2,4	48,8 $\pm$ 6,3	60,8 $\pm$ 7,7	409 $\pm$ 48#	308 $\pm$ 21#	650 $\pm$ 72#*
IL-10	31,0 $\pm$ 5,0	51,1 $\pm$ 0,06	42,4 $\pm$ 3,5	53,6 $\pm$ 3,1	149 $\pm$ 29#	132 $\pm$ 21#	212 $\pm$ 23#
MCP-1	47,50 $\pm$ 26,7	205 $\pm$ 47,6	270 $\pm$ 54,5	1060 $\pm$ 162	2327 $\pm$ 415#	1854 $\pm$ 367#	2453 $\pm$ 97#

Valores representados como média $\pm$ EPM de 5 a 10 animais por grupo. Anova *One Way*. # p < 0,0001 vs Salina, * p < 0,0001 vs ZIM.

ApoE^{-/-}							
	SALINA	CRE	NaNO ₂	NDBP	ZIM	NaNO ₂ +ZIM	NDBP+ZIM
IL-6	14,7 $\pm$ 10,4	60 $\pm$ 31,2	72,7 $\pm$ 42,6	272 $\pm$ 47,4#	432 $\pm$ 33,2#	341 $\pm$ 109#	393 $\pm$ 6,7#
TNF-A	19,4 $\pm$ 1,6	37,9 $\pm$ 9,2	36,8 $\pm$ 9,0	75,2 $\pm$ 7,0	446 $\pm$ 68,9#	77,1 $\pm$ 26,1*	545 $\pm$ 103#
IL-10	37,6 $\pm$ 7,8	59,2 $\pm$ 11,4	38,0 $\pm$ 4,5	71,4 $\pm$ 3,9	151 $\pm$ 16,8#	46,8 $\pm$ 5,5*	216 $\pm$ 12#*
MCP-1	50,2 $\pm$ 31,6	151 $\pm$ 11,2	57,7 $\pm$ 22,4	1223 $\pm$ 230#	1733 $\pm$ 300#	522 $\pm$ 213*	2936 $\pm$ 170#*

Valores representados como média $\pm$ EPM de 5 a 10 animais por grupo. Anova *One Way*. # p < 0,0001 vs Salina, * p < 0,0001 vs ZIM.

