



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

EMMILY FERREIRA DE FARIAS CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR EM MODELO MURINO DE
ATEROSCLEROSE TRATADO COM LIFEPRO, UMA FORMULAÇÃO
NUTRACÊUTICA COMPOSTA POR CEPAS DE *Limosilactobacillus fermentum*
E POLIFENÓIS**

JOÃO PESSOA - PB

2024

EMMILY FERREIRA DE FARIAS CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR EM MODELO MURINO DE
ATEROSCLEROSE TRATADO COM LIFEPRO, UMA FORMULAÇÃO
NUTRACÊUTICA COMPOSTA POR CEPAS DE *Limosilactobacillus fermentum*
E POLIFENÓIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico
em Ciências Fisiológicas da Universidade
Federal da Paraíba como requisito para
obtenção do título de mestre em Ciências
Fisiológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Camille de Moura Balarini

JOÃO PESSOA - PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C268a Cardoso, Emmily Ferreira de Farias.

Avaliação da função vascular em modelo murino de aterosclerose tratado com lifepro, uma formulação nutracêutica composta por cepas de *limosilactobacillus fermentum* e polifenóis / Emmily Ferreira de Farias Cardoso. - João Pessoa, 2024.

138 f. : il.

Orientação: Camille de Moura Balarini.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CB.

1. Aterosclerose. 2. Probióticos. 3. Função vascular. 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 Dissertação de Mestrado do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Associada Universidade Federal da Paraíba, realizada em 28 de agosto de 2024.

Na data de vinte e oito de agosto do ano de dois mil e vinte e quatro às 13h30 (horário local), foi realizada, por meio da Plataforma Virtual Google Meet, a defesa pública da Dissertação de Mestrado do(a) discente **Emmily Ferreira de Farias Cardoso**. O trabalho tem como título “Avaliação da função vascular em modelo murino de aterosclerose tratado com Lifepro, uma formulação nutracêutica composta por cepas de *Limosilactobacillus fermentum* e polifenóis”. A banca examinadora foi constituída pelo(a) orientador(a) Prof.^ª Dr.^ª Camille de Moura Balarini, na qualidade de presidente da banca, pelo 1º examinador (examinador externo) Prof.^ª Dr.^ª Alice Valença Araujo (UFPE) e pelo 2º 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 dissertação à Biblioteca Central da UFPB e à secretaria deste programa, contendo obrigatoriamente a ficha catalográfica fornecida pela Biblioteca Central da UFPB.

Documento assinado digitalmente
gov.br CAMILLE DE MOURA BALARINI
Data: 03/09/2024 15:54:30-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^ª Dr.^ª Camille de Moura Balarini

Documento assinado digitalmente
gov.br ALICE VALENÇA ARAUJO
Data: 29/08/2024 11:34:44-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^ª Dr.^ª Alice Valença Araujo

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSE LUIZ DE BRITO ALVES
Data: 03/09/2024 10:30:01-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves

Centro de Biotecnologia– Universidade Federal da Paraíba- Campus Universitário
CEP: 58051-900 – João Pessoa/PB
Fone: (83) 3216 7173

*Dedico este trabalho a todos que amem a
ciência ao ponto de fazer pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela salvação em Cristo Jesus e pois sem Ele eu não existiria e nem me apaixonaria pela Fisiologia. Foi o Senhor quem me permitiu estudar a obra de Sua Criação.

Agradeço a mim mesma pela perseverança. Tive todos os motivos para desistir desse mestrado, mas continuei em busca daquilo que eu almejava. Aprendi a ser como uma palmeira, mesmo diante de tantas provações enraizada no que é importante.

Agradeço a meu marido Moás Cardoso, pelo apoio, palavras de afirmação, suporte emocional, amor, deslumbramento e por não me permitir fraquejar. Você é meu companheiro de jornada!

Agradeço a meus pais Adriana e Evandro, por terem me dado a vida e por terem investido em minha educação desde cedo. Se aprendi a ler aos três anos com certeza é mérito de vocês! Quero ser professora pois me inspiro na minha mãe. Não desisto pois me inspiro no meu pai.

Agradeço a meu irmãozinho (não tão novo mais) Arthur. Obrigada por se inspirar em mim, irmão! Quero te ver indo muito longe! O estudo não tem preço, estude!

Agradeço a melhor orientadora que Deus poderia me dar: Prof. Dra Camille Balarini. Eu me inspiro muito na senhora, em sua didática, sua paciência, sua ética, seu amor pela ciência e pela Fisiologia. Obrigada por não desistir de mim!

Agradeço a quem teve paciência e me ensinou tudo que eu sei sobre experimentação laboratorial: Clênia Oliveira. Obrigada por ficar comigo até eu ter coragem de manipular os camundongos. Você foi luz em meu caminho! Obrigada por tudo!

Agradeço a minha melhor amiga acadêmica: Clara Ruiz. Obrigada por amar a Fisiologia comigo! Estamos juntas desde a monitoria até agora e se Deus permitir até o concurso! Louvo a Deus por sua amizade, amiga! Satoru Gojo.

Agradeço aos técnicos do laboratório Sara e Mateus, muito obrigada por me ajudarem no que eu precisava, seja no biotério ou nas soluções químicas.

Agradeço a Giovanna Gatinho e Giovanna Siebra por toda ajuda nos experimentos, foi muito bom estar com vocês discutindo e fazendo ciência.

Agradeço aos professores e técnicos do Laboratório de Fisiologia do CCS, minha segunda casa.

Agradeço aos técnicos e professores (Bruno Gazzola, profa Joelma, Júnior, prof Luiz), que se dispuseram a me ajudar nos experimentos/burocracia.

Agradeço ao Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - UFPB, onde me aprofundei na Fisiologia e a todos os professores que cursei disciplinas.

Agradeço as minhas tias Alsivânia e Alice por orarem por mim e sempre me impulsionarem a estudar cada vez mais!

Agradeço aos colegas de laboratório e disciplinas por levarem descontração a um ambiente certas vezes difícil.

Agradeço a meus amigos não acadêmicos por me darem forças, pelas palavras de afirmação, risadas, jogos e karaokê.

Agradeço a agência de fomento FAPESQ/PB pelo apoio financeiro para a construção desse mestrado.

Agradeço a CNPQ e CAPES pelo financiamento.

Agradeço a BioClin por sempre responder meus emails e enviar kits para leitura bioquímica.

Agradeço ao Prof. Dr José Luiz e aos membros do seu laboratório e Prof. Evandro Leite pelo projeto no qual pude executar no mestrado, como também à Jéssica que produziu o nutracêutico.

Agradeço a UFPB por ser o local dos melhores anos acadêmicos da minha vida!

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para essa pesquisa. Sou muito grata!

“Quantas são as tuas obras, Senhor! Fizeste
todas elas com sabedoria! [...]”

Salmos 104:24

“Tudo o que fizerem, façam de todo o coração,
como para o Senhor, e não para os homens.”

Colossenses 3:23

RESUMO

A aterosclerose compreende uma das principais doenças cardiovasculares. A hipercolesterolemia tem sido o principal fator aterogênico em humanos, sendo reforçada pela alimentação desbalanceada. Os probióticos em associação com compostos fenólicos têm se mostrado eficazes na redução de lipidemia em animais. A Universidade Federal da Paraíba desenvolveu uma nova formulação nutracêutica por meio de junção do probiótico *Limosilactobacillus fermentum* (cepas 139,263,296) e os compostos fenólicos quercetina e resveratrol (LifePro). A presente pesquisa visou investigar os efeitos vasculares do nutracêutico em camundongos ateroscleróticos nocaute para a apolipoproteína E (apoE^{-/-}) submetidos a dieta aterogênica. Foram analisados três grupos: animais controle sem modificação genética (*wild type*, WT); animais apoE^{-/-} que receberam veículo e animais apoE^{-/-} que receberam o nutracêutico durante oito semanas. Ao final, os animais foram eutanasiados a fim de avaliar padrões bioquímicos, inflamatórios, deposição lipídica e reatividade vascular na artéria aorta. A administração do nutracêutico possuiu efeito hipocolesteremiante, reduzindo o colesterol de animais apoE^{-/-} tratados (579±46 mg/dL##*) quando comparado com animais apoE^{-/-} veículo (978±68 mg/dL**), mas não em relação ao grupo controle saudável (73±6 mg/dL). Houve também efeito hipoglicemiante no grupo tratado (249±16 mg/dL#) em relação ao grupo apoE^{-/-} salina (300±12 mg/dL*). Os triglicerídeos também foram reduzidos nos animais tratados (145±18 mg/dL#* vs. apoE^{-/-} salina 211±16 mg/dL**). O perfil lipoproteico demonstrou-se alterado no grupo apoE^{-/-} veículo (HDL: 17±2 mg/dL** vs. WT 41±2 mg/dL e LDL: 159±21** mg/dL vs. WT: 5±0,7 mg/dL), o HDL e LDL não sofreu alteração com o tratamento. Por outro lado, o VLDL foi reduzido no grupo tratado (503±62 mg/dL#*) comparando com o grupo salina (776±46 mg/dL####), diferindo ambos dos animais saudáveis (28±3 mg/dL). O tratamento não influenciou no consumo de ração e peso. O estresse oxidativo foi maior no grupo apoE^{-/-} salina (30±1** mmol/mL vs. WT 13±1 mmol/mL) e o LifePro reduziu as concentrações de MDA (14±2#### mmol/mL). Em relação a reatividade vascular, o grupo apoE^{-/-} veículo apresentou aumento na vasoconstrição frente a fenilefrina (Rmáx: 88±7%***) em relação ao grupo controle saudável (Rmáx: 70±3%) e prejuízo no relaxamento dependente de endotélio (apoE^{-/-} veículo Rmáx: 48±6%** vs. WT Rmáx: 89±5%) destacando portanto a disfunção endotelial neste grupo. O nutracêutico melhorou a disfunção endotelial reduzindo o comportamento vasoconstritor (apoE^{-/-} tratado Rmáx: 50±3%***##) e aumentando o relaxamento frente a acetilcolina (apoE^{-/-} tratado Rmáx: 107±12%###). Houve, com o tratamento, o restabelecimento do NO no relaxamento, bem como redução do impacto do estresse oxidativo no banho de órgãos. Acerca do perfil inflamatório, as citocinas TNF (18±1** pg/mL vs. 7±1 pg/mL) e MCP-1 (145±12** pg/mL vs. 77±8 pg/mL) foram maiores no grupo apoE^{-/-} salina comparando com WT, já IL-6 e IL-10 não mostraram alteração entre os grupos. O tratamento não modificou os níveis de citocinas. A deposição lipídica no arco aórtico é acentuada nos apoE^{-/-} salina (45±2%**), enquanto que o tratamento (27±2%####) reduziu a porcentagem da placa em 1,2 vezes. Assim, sugerimos que o tratamento demonstrou-se eficaz em modelo murino de aterosclerose.

Palavras-chave: Probióticos. Aterosclerose. Função vascular. Inflamação.

ABSTRACT

Atherosclerosis is one of the leading cardiovascular diseases. Hypercholesterolemia has been identified as the main atherogenic factor in humans, exacerbated by an unbalanced diet. Probiotics in combination with phenolic compounds have proven effective in reducing lipidemia in animals. The Federal University of Paraíba developed a new nutraceutical formulation by combining the probiotic *Limosilactobacillus fermentum* (strains 139, 263, 296) and the phenolic compounds quercetin and resveratrol (LifePro). This research aimed to investigate the vascular effects of the nutraceutical in apolipoprotein E knockout atherosclerotic mice (apoE^{-/-}) subjected to an atherogenic diet. Three groups were analyzed: control animals without genetic modification (wild type, WT); apoE^{-/-} animals that received a vehicle, and apoE^{-/-} animals that received the nutraceutical for eight weeks. At the end, the animals were euthanized to assess biochemical and inflammatory patterns, lipid deposition, and vascular reactivity in the aorta artery. The administration of the nutraceutical had a hypocholesterolemic effect, reducing cholesterol in treated apoE^{-/-} animals (579±46 mg/dL##) compared to vehicle-treated apoE^{-/-} animals (978±68 mg/dL**), but not in relation to the healthy control group (73±6 mg/dL). There was also a hypoglycemic effect in the treated group (249±16 mg/dL#) compared to the saline apoE^{-/-} group (300±12 mg/dL). Triglycerides were also reduced in treated animals (145±18 mg/dL#* vs. apoE^{-/-} saline 211±16 mg/dL**). The lipoprotein profile showed alterations in the apoE^{-/-} vehicle group (HDL: 17±2 mg/dL** vs. WT 41±2 mg/dL and LDL: 159±21** mg/dL vs. WT: 5±0.7 mg/dL), while HDL and LDL levels were not altered by the treatment. On the other hand, VLDL was reduced in the treated group (503±62 mg/dL#*) compared to the saline group (776±46 mg/dL##), both differing from healthy animals (28±3 mg/dL). The treatment did not influence food intake or weight. Oxidative stress was higher in the apoE^{-/-} saline group (30±1 mmol/mL vs. WT 13±1 mmol/mL), and LifePro reduced MDA concentrations (14±2#### mmol/mL). Regarding vascular reactivity, the apoE^{-/-} vehicle group showed increased vasoconstriction in response to phenylephrine (Rmax: 88±7%) compared to the healthy control group (Rmax: 70±3%) and impaired endothelium-dependent relaxation (apoE^{-/-} vehicle Rmax: 48±6% vs. WT Rmax: 89±5%), highlighting endothelial dysfunction in this group. The nutraceutical improved endothelial dysfunction by reducing vasoconstrictive behavior (apoE^{-/-} treated Rmax: 50±3%##) and increasing relaxation in response to acetylcholine (apoE^{-/-} treated Rmax: 107±12%##). The treatment restored NO-mediated relaxation and reduced the impact of oxidative stress in organ baths. Concerning the inflammatory profile, TNF (18±1 pg/mL vs. 7±1 pg/mL) and MCP-1 (145±12** pg/mL vs. 77±8 pg/mL) cytokines were higher in the apoE^{-/-} saline group compared to WT, while IL-6 and IL-10 levels did not show alterations between groups. The treatment did not modify cytokine levels. Lipid deposition in the aortic arch was accentuated in apoE^{-/-} saline animals (45±2%), while treatment (27±2%##) reduced plaque percentage by 1.2 times. Thus, we suggest that the treatment proved effective in a murine model of atherosclerosis.

Keywords: Probiotics. Atherosclerosis. Vascular function. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dados do GBD 2019.....	21
Figura 2: Taxa de hospitalização decorrente da aterosclerose	22
Figura 3: Principais substâncias vasoativas liberadas pelo endotélio.....	23
Figura 4: Funcionamento da NO sintase	24
Figura 5: Vasoconstrição desencadeada pela fenilefrina.....	26
Figura 6: Relaxamento vascular dependente de endotélio.....	27
Figura 7: Influência do padrão de fluxo no desenvolvimento da aterosclerose.....	29
Figura 8: Início da aterogênese.....	31
Figura 9: Ciclo vicioso da inflamação na aterosclerose.....	33
Figura 10: Formação da capa fibrosa.....	34
Figura 11: Ruptura da placa de ateroma.....	35
Figura 12: Classificação de lesões ateroscleróticas segundo a AHA.....	36
Figura 13: Lipoproteínas plasmáticas e suas composições.....	37
Figura 14: Produção, transporte das lipoproteínas e apolipoproteína E.....	38
Figura 15: Disbiose e sua relação com doenças cardiovasculares.....	45
Figura 16: Ação dos compostos fenólicos e probióticos na aterosclerose.....	57
Figura 17: Comparação entre as composições das rações.....	64
Figura 18: Delineamento experimental	66
Figura 19: Retirada da aorta com o coração e posterior dissecação.....	70
Figura 20: Anéis de aorta nas hastes e na cuba	70
Figura 21: Banho de órgãos automático.....	70
Figura 22: Viabilidade vascular por meio da adição de KCl.....	71
Figura 23: Teste do endotélio a partir da adição de fenilefrina e acetilcolina.....	71
Figura 24: Cortes histológicos da artéria aorta corados com Oil Red	86
Figura 25: Resumo gráfico dos efeitos do nutracêutico.....	107

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Resposta cumulativa às doses de fenilefrina em todos os grupos.....	77
Gráfico 2: Resposta cumulativa às doses de acetilcolina em todos os grupos.....	78
Gráfico 3: Resposta cumulativa às doses de NPS em todos os grupos.....	79
Gráfico 4: Curvas de relaxamento com acetilcolina mediante inibição do L-NAME.....	80
Gráfico 5: Área abaixo da curva (dAUC) de todos os grupos - L-NAME.....	80
Gráfico 6: Ativação basal NO/ cGMP.....	81
Gráfico 7: Curvas de relaxamento com acetilcolina mediante inibição da Apocinina.....	82
Gráfico 8: Área abaixo da curva (dAUC) de todos os grupos - Apocinina.....	82
Gráfico 9: Valores de MDA no plasma.....	83
Gráfico 10: Análise de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	84
Gráfico 11: Quantificação de placa aterosclerótica na artéria aorta.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil lipídico, glicêmico, peso corporal e consumo de ração do grupos controle, apoE ^{-/-} salina e apoE ^{-/-} tratado.....	75
---	----

LISTA DE ABREVIações

ACH: acetilcolina

AGCC: ácidos graxos de cadeia curta

AKT: proteína kinase B

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

ANOVA: Análise de variância

ApoE: Apolipoproteína E

APOE: Gene para apolipoproteína E

apoE^{-/-} : Camundongo deficiente em apolipoproteína E

ATP: adenosina trifosfato

BH4: 5,6,7,8-tetra-hidrobipterina

CD40: cluster de diferenciação 40

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

C57: camundongo controle saudável

cGMP: Guanosina monofosfato cíclico

DAF: diaminofluoresceína

DCV: Doenças cardiovasculares

DE: disfunção endotelial

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

ECA: Enzima conversor de angiotensina

EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRF: Fator relaxante derivado do endotélio

EPM: Erro padrão da média

EROS: Espécies reativas de oxigênio

FAD: dinucleotídeo de flavina e adenina

FEN: fenilefrina

FMN: mononucleotídeo de flavina

GBD: Global burden disease

GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HIF-1 α : Fator induzível por hipóxia

ICAM: molécula de adesão intercelular

IDL: Lipoproteína de densidade intermediária

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

IP3: inositol trifosfato

IL-1: Interleucina 1

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IL-18: Interleucina 18

i.p.: intraperitoneal

IFN γ : Interferon gama

KCl: Cloreto de potássio

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LPS: Lipopolissacarídeo

LDLr $^{-/-}$: camundongos knockout para o receptor de lipoproteína de densidade baixa

LDLR: receptor de LDL

LOX 1: Receptor 1 de lipoproteína de baixa densidade oxidada

L-NAME: N(ω)-nitro-L-arginina metil-ester

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

M1: macrófagos com fenótipo inflamatório

M2: macrófagos com fenótipo anti-inflamatórios

MCP-1: Proteína quimioatraente de monócitos-1

MI: microbiota intestinal

MLCK: Kinase de cadeia leve de miosina

MMP: Metaloproteinase

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF-kB: fator de transcrição nuclear kappaB

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NOX: NADPH oxidase

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal

OCT: Optimal Cutting Temperature

PA: Pressão arterial

PAMPs: Padrões moleculares associado a patógeno

pEC50: -logEC50

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGI2: prostaciclina 2

PKG: Proteína Kinase G

PRRs: Receptores de reconhecimento padrão

QM: Quilomícrons

R_{máx}: Resposta máxima

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SASP: Fenótipo secretor associado à senescência

SOD: superóxido dismutase

SUS: Sistema Único de Saúde

TLR4: Receptor do tipo toll 4

TMAO: N-óxido de trimetilamina

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

LDLox: LDL oxidado

VCAM: Molécula de adesão vascular celular 1

VLDL: Lipoproteínas de muito baixa densidade

VSMCs: Células musculares lisa

WT: Wild type

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES E ATHEROSCLEROSE.....	19
1.2 IMPLICAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DA ATHEROSCLEROSE E FUNÇÃO VASCULAR.....	22
1.3 ATHEROSCLEROSE E APOLIPOPROTEÍNA E.....	37
1.3.1 Modelo de Atherosclerosis: Camundongos apoE^{-/-}.....	40
1.4 MICROBIOTA E ATHEROSCLEROSE.....	41
1.4.1 Probióticos e L. Fermentum.....	45
1.4.1.2 Probióticos e função endotelial.....	49
1.4.2 Compostos fenólicos: quercetina e resveratrol.....	51
1.4.3 Nutracêutico LifePro: L. fermentum com quercetina e resveratrol.....	56
2 JUSTIFICATIVA.....	59
3 OBJETIVOS.....	61
3.1 GERAL.....	61
3.2 ESPECÍFICOS.....	61
4 METODOLOGIA.....	63
4.1 LOCAL E ANIMAIS.....	63
4.2 COMISSÃO DE ÉTICA.....	64
4.3 SUBSTÂNCIA TESTE.....	65
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	65
4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	67
4.5.1 Perfil bioquímico.....	67
4.5.2 Perfil inflamatório.....	67
4.5.3 Estresse oxidativo - Teste TBARS.....	68
4.5.4 Reatividade Vascular.....	69
4.5.5 Avaliação de viabilidade vascular e teste do endotélio.....	71
4.5.6 Construção das curvas concentração-resposta.....	72
4.5.7 Uso de inibidores.....	72
4.6 AVALIAÇÃO DE DEPOSIÇÃO DE PLACA ATHEROSCLERÓTICA - OIL RED.....	73
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	73
5. RESULTADOS.....	75
5.1 PERFIL LIPÍDICO, GLICÊMICO E PESO CORPORAL.....	75
5.2 REATIVIDADE VASCULAR.....	76
5.2.1 Resposta à Fenilefrina e Acetilcolina.....	76
5.2.3. Resposta vascular ao Nitroprussiato de Sódio.....	78
5.3.2 Papel do NO no relaxamento vascular dependente de endotélio.....	79
5.2.3 Ativação basal NO/cGMP.....	81
5.2.4 Papel do estresse oxidativo no relaxamento vascular.....	81
5.3 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO VIA PEROXIDAÇÃO – TESTE TBARS.....	82
5.4 ANÁLISE DE CITOCINAS PRÓ E ANTI INFLAMATÓRIAS NO PLASMA.....	83
5.5. DEPOSIÇÃO DE PLACA ATHEROSCLERÓTICA - OIL RED.....	85

6 DISCUSSÃO.....	88
7 CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS.....	110

REVISÃO DE LITERATURA

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES E ATEROSCLEROSE

As doenças cardiovasculares (DCV) têm se tornado um problema de saúde pública ao passo que permanece como a principal causa de morte em todo o mundo. Por serem de caráter sistêmico, envolvem diversos órgãos do corpo, comprometendo seu adequado funcionamento e manutenção da homeostase (Azevedo; Pinheiro; Joaquim, 2017). A mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) tem aumentado ao longo dos anos. No Brasil, por exemplo, em 1990, cerca de 270 mil pessoas morreram em decorrência dessas enfermidades, número que subiu para 400 mil óbitos anuais em 2019 (Gomes et al., 2019). No entanto, ao padronizar a prevalência por idade, observa-se uma redução nesse período. Sem essa correção, o aumento na prevalência de DCV no Brasil se deve, em grande parte, ao envelhecimento da população nos últimos 30 anos (Oliveira et al., 2022). Além disso, estima-se cerca de 18,6 milhões de óbitos no mundo em 2019 devido a DCV como hipertensão arterial, cardiomiopatias isquêmicas e acidente vascular cerebral. No Reino Unido, cerca de 163 mil pessoas morreram devido a complicações das DCV nesse mesmo ano (Cheema et al., 2022). Dezesete milhões de indivíduos sofrem com o acometimento de doenças cardiovasculares (Alargasamy; Jaeschke; Hui, 2022 ; Ribeiro;Cotta; Ribeiro, 2012).

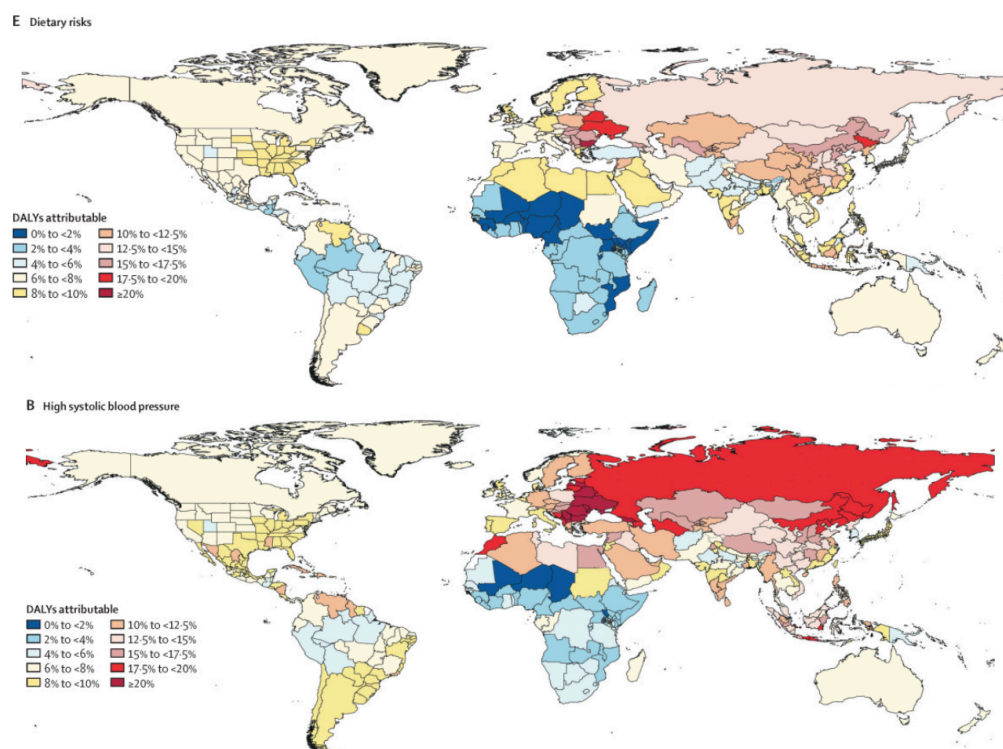
Dentro do contexto das DCV, a aterosclerose constitui-se como uma condição inflamatória que atinge os vasos de médio e grande porte e que pode levar a aneurismas, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca e acidentes vasculares isquêmicos (Talepoor; Doroudchi, 2022). Devido ao fato de ser uma complicação e causa por trás de grande parte das doenças cardiovasculares, é difícil presumir sua incidência isolada (Luca et al., 2023), podemos utilizar portanto os achados acerca da doença arterial coronariana que ocorre devido ao acúmulo de estrias gordurosas nas artérias coronárias que circundam e nutrem o coração, gerando isquemia e infarto agudo do miocárdio (IAM). No Brasil, o número de pessoas com esse tipo de doença aumentou de 1,48 milhão em 1990 para 4 milhões em 2019. As internações no Sistema Único de Saúde de pacientes com IAM também cresceram em 54% nesse mesmo ano (Oliveira et al., 2022). A

aterosclerose e seus desfechos rendem ao sistema brasileiro um custo de 986 milhões de reais por ano, incluindo hospitalizações (Bahia et al., 2018).

A doença aterosclerótica está intimamente associada ao estilo de vida, tendo como fatores de riscos obesidade, sedentarismo, tabagismo, diabetes, dieta hiperlipídica e hipertensão (Hajar, 2017). Em geral, por se tratar de uma doença com poucos e tardios sintomas, a descoberta e intervenção costumam ser feitos em estágios avançados, o que prejudica o prognóstico (Kotlyarov, 2022).

A figura 1 ilustra um estudo desenvolvido em 2019 reunindo informações da World Health Organization - Global Burden Disease (GBD) (Murray et al., 2020), nela tem-se o percentil distributivo do aumento de pressão sistólica e riscos dietéticos no mundo nesse ano. O ano de vida ajustado por incapacidade ou (Disability-Adjusted Life Years - DALY) permite averiguar e estimar os anos perdidos devido a fatores de risco, servindo como parâmetro para inferir a porcentagem de mortes atribuíveis a uma determinada variável. Percebe-se portanto que no contexto da América do Sul, especificamente o Brasil há um espectro de valores devido a dimensão geográfica, cultural e econômica dos estados brasileiros. Em relação aos riscos dietéticos boa parte do Nordeste, Sudeste e Sul apresentam DALY entre 6-8% e os demais estados 4-6% com exceção de alguns na região Norte. Sobre esse parâmetro a pesquisa não conseguiu inferir acerca de influência socioeconômica, podendo dar uma impressão falsa positiva, visto que muitas vezes o risco dietético é reduzido, pois o acesso da população a alimentos é restrito. Já quanto ao aumento da pressão sistólica, o padrão brasileiro permanece o mesmo, porém é notável que essa variável impacta mais no DALY do que os riscos dietéticos, pois grande parte do país possui entre 8-10% de mortes atribuíveis. É necessário inferir também que o aumento da PA sistólica é totalmente influenciado pelos riscos dietéticos e comportamentais.

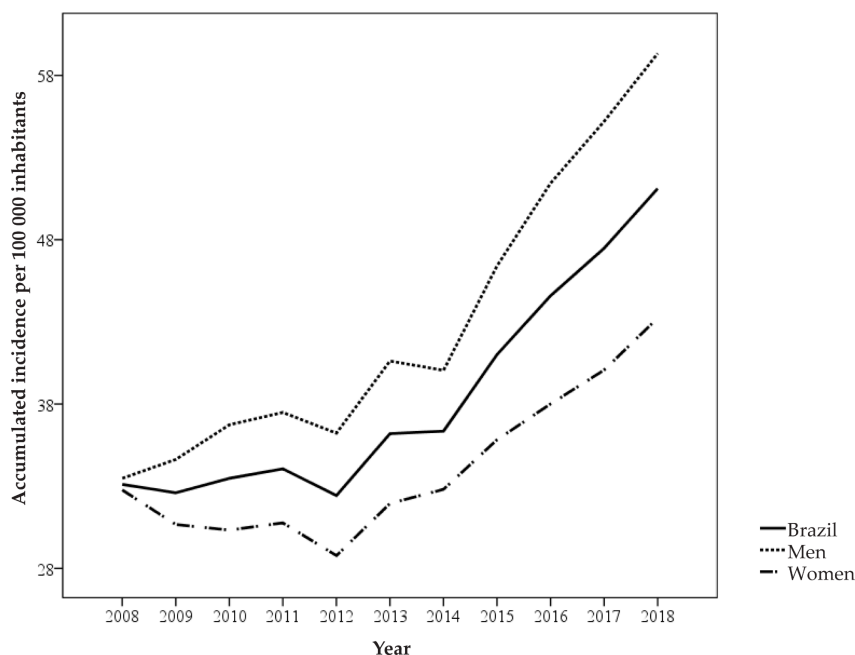
Figura 1: Dados do GBD 2019 acerca dos riscos dietéticos e aumento da pressão sistólica no mundo



Fonte: Murray et al. (2020)

Para observar mais de perto o cenário brasileiro, destacamos um estudo realizado em 2022 que por sua vez, com o objetivo de pesquisar acerca das internações devido a complicações em relação a aterosclerose nos hospitais públicos brasileiros demonstrou que, entre 2008 e 2018, as hospitalizações cresceram principalmente entre homens a partir de 2012 (Figura 2), em todas as regiões brasileiras, com uma piora nas regiões Sudeste, Nordeste e Sul. A faixa etária mais acometida foi a partir dos 50 anos em ambos os sexos. Uma possível explicação para tal fato reside no envelhecimento da população brasileira, fenômeno fisiológico que contribui para o aparecimento de doenças crônicas, como a aterosclerose, aumento da renda familiar nesse período, somado a hábitos pouco saudáveis e baixo alcance de políticas públicas de promoção à saúde e prevenção de agravos, tornando assim a população leiga concernente a sua própria saúde e hábitos alimentares (Silva et al., 2022).

Figura 2: Taxa de hospitalização decorrente da aterosclerose em hospitais vinculados ao Sistema Único de Saúde brasileiro



Fonte: Silva et al. (2022)

1.2 IMPLICAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DA ATEROSCLEROSE E FUNÇÃO VASCULAR

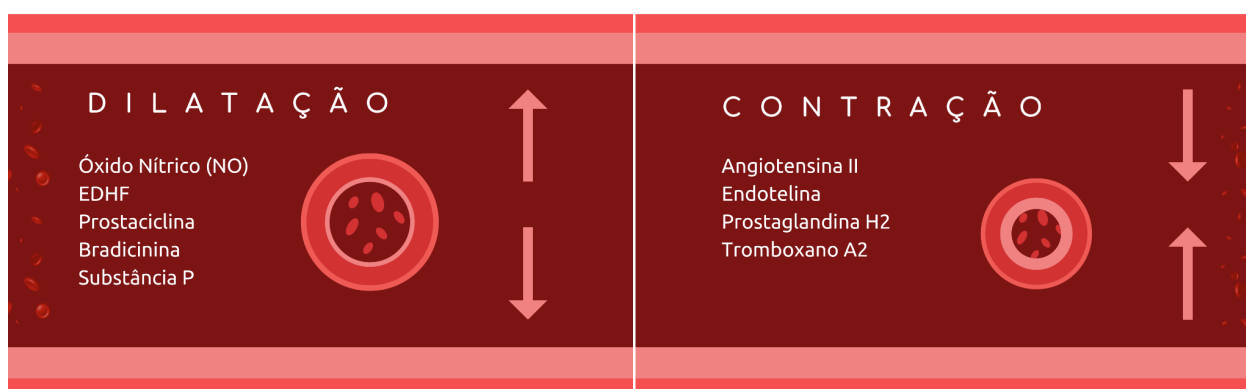
A aterosclerose é uma doença progressiva que se caracteriza pelo acúmulo de lipídios e elementos fibróticos em artérias grandes (Lusis, 2000). A condição inflamatória da aterosclerose se dá devido a este acúmulo na camada íntima das artérias, principalmente em locais de fluxo turbulento fisiologicamente (Kotlyarov, 2022) como artérias bifurcadas ou com curvas, a exemplo das coronárias, carótidas, aorta, renais (Ross, 1999).

Fisiologicamente, o vaso sanguíneo é composto por camadas. A camada íntima é composta por um revestimento interno de células endoteliais, um tecido simples pavimentoso, além de colágeno e proteoglicanos, em seguida a túnica média é constituída de células musculares lisas, e a camada adventícia é a última, rica em tecido conjuntivo (Aires, 2017; Kotlyarov, 2022).

O endotélio está localizado em um ponto estratégico que o possibilita atuar como sensor e protetor do vaso. As alterações no sangue tanto no quesito de composição, quanto de pressão e estresse de fluxo é percebido pelas células endoteliais que, por sua vez, liberam substâncias vasoativas. A homeostase vascular envolve o equilíbrio entre as substâncias vasoconstritoras e

vasodilatadoras secretadas pelo endotélio (Lusis, 2000) (Figura 3) . Na região das caveolas, o endotélio possui um sistema renina angiotensina próprio, que atua modulando a pressão arterial localmente. A angiotensina II quando clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) pode se ligar no receptor AT1 presente no vaso e desencadeando a cascata de vasoconstrição, porém a ligação no receptor AT2 gera vasodilatação pela produção de óxido nítrico (NO) local (Alexander et al., 2020). Outra molécula vasoconstritora é a endotelina que possui três tipos de receptores endoteliais e possui um ciclo de ativação recíproca com a angiotensina II, no qual a presença de uma estimula a ativação de outra e vice versa, sendo ambas as mais potentes moléculas de proliferação celular. Outras substâncias podem gerar direta ou indiretamente a vasoconstrição, como tromboxano A2, serotonina numa lesão endotelial, prostaglandina H2, trombina, dentre outros (Mackenzie, 2011).

Figura 3: Principais substâncias vasoativas liberadas pelo endotélio



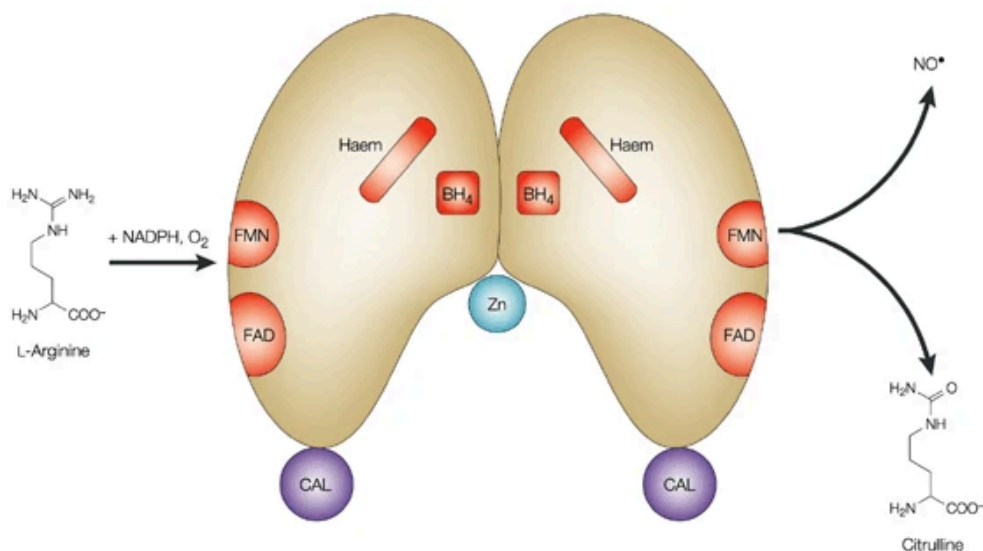
Fonte: Adaptado de Luz (2003)

Em relação aos vasodilatadores, os principais incluem óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI2) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Li; Sun; Carmeliet, 2019). O NO é um gás que possui potente ação vasodilatadora do endotélio, com meia vida *in vivo* em torno de 5 segundos. Sua história na ciência é bem interessante. No ano de 1980 foi evidenciado que o endotélio libera fatores que medeiam o relaxamento vascular, até então sem representante de classe (Furchgott; Zawadzki, 1980). Porém, em 1987 foi percebido que o NO era o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (Palmer; Ferrige; Moncada, 1987). E a sua descoberta como um mediador químico vascular foi feita em 1998 por Ferid Murad, Robert Furchgott e Louis Ignarro que ganharam o prêmio Nobel de

Medicina por isso (Kang, 2014). Hoje é bem evidenciado o papel do NO para a função vascular e alteração em seu metabolismo é um dos pilares das doenças vasculares (Ardestani et al., 2020).

A síntese do óxido nítrico ocorre a partir da enzima NO sintase que converte o aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO. Essa enzima é presente em três isoformas no corpo, a neuronal (nNOS), induzível (iNOS), localizada em macrófagos e endotelial (eNOS) (Cyr et al., 2020). Todas as isoformas requerem, na porção redutora, a participação do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) como doador de elétrons e dos carreadores dinucleotídeo e mononucleotídeo de flavina e adenina, FAD e FMN, respectivamente. Existem cofatores que auxiliam nesse processo, como a calmodulina, aumentando esse fluxo de elétrons para o grupamento heme. Na região oxigenase, a presença do tetrahidrobiopterina (BH₄) possibilita o uso dos elétrons doados pelo NADPH. A oxidação desses elétrons permite a conversão da L-arginina em L-citrulina e NO em duas etapas. (Forstermann; Sessa, 2011; Cyr et al., 2020). A produção de NO pode levar a síntese de EROS, principalmente se a NO sintase sofrer alguma interferência do próprio estresse oxidativo ou estímulos inflamatórios. (Figura 4).

Figura 4: Funcionamento da NO sintase



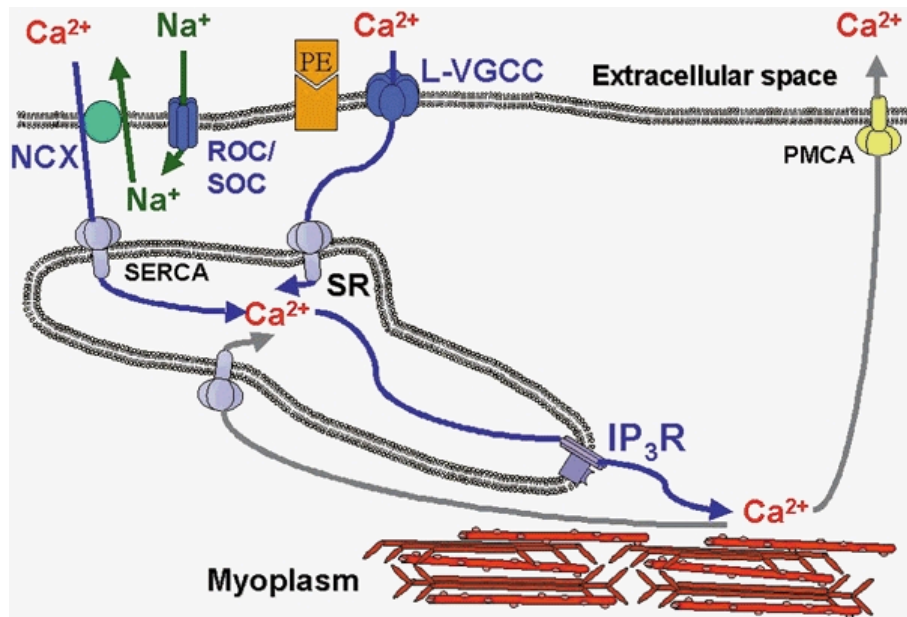
Fonte: Vallance e Leiper (2002)

A vasodilatação em si se dá pela ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO, gerando guanosina monofosfato cíclico (GMPc) no músculo liso da túnica média, que em última instância, através da proteína cinase G, reduz os níveis citoplasmáticos de cálcio culminando na vasodilatação. Além desse efeito, o NO endotelial possui diversas ações, como inibição de adesão plaquetária e recrutamento leucocitário ao inibir a proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), o NO também controla a proliferação celular do músculo liso e estimula a angiogênese (Cyr et al., 2020).

Como falado anteriormente, o óxido nítrico era conhecido como EDRF, porém percebeu-se a existência de outras moléculas que exercem função semelhante. Outra possibilidade de relaxamento vascular se dá pela hiperpolarização das células musculares lisas, sendo EDHF, a principal molécula responsável. O maior efluxo do íon potássio e a consequente redução da voltagem de membrana permite a menor probabilidade de abertura de canais de cálcio voltagem dependentes, além disso há a redução da taxa de renovação do inositol trifosfato (IP3), cuja função é liberar cálcio do sarcoplasma (Kang, 2014). Essas ações somadas reduzem a ligação da actina a miosina e subsequentemente a vasodilatação. O EDHF possui seu papel vasodilatador bem estabelecido de maneira geral em vasos de resistência e de pequeno calibre, e nas artérias coronárias e renais, foi demonstrado que essa molécula é o principal fator vasorrelaxante (Tomioka et al., 1999; Fortes et al, 1992; Carvalho et al., 2003). A prostaciclina, por sua vez promove vasodilatação a partir da ativação da adenilato ciclase que cliva adenosina trifosfato (ATP) no segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPc), possuindo ação adicional e semelhante ao NO (Alexander et al., 2020; Kukovetz, 1979).

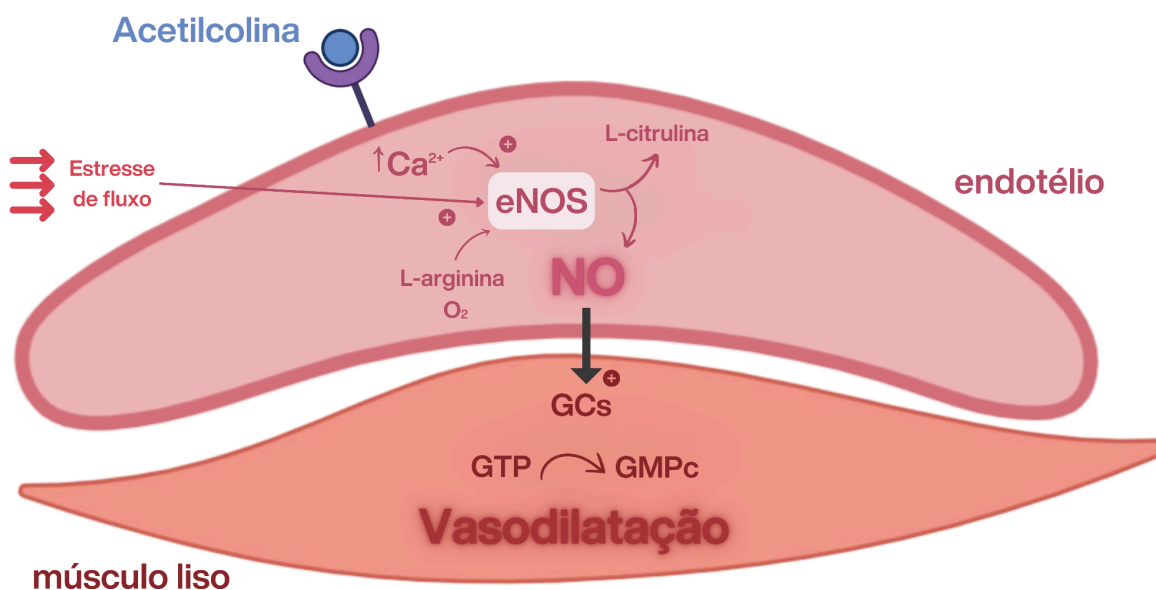
Agentes farmacológicos e endógenos podem agir promovendo vasodilatação ou vasoconstrição, dois exemplos clássicos são a fenilefrina e acetilcolina. A fenilefrina é um agonista α_1 adrenérgico que, ao se ligar ao receptor desencadeia a via de sinalização do inositol trifosfato (IP3) que por sua vez no retículo sarcoplasmático da célula promove a saída de cálcio. Esse íon é importante para a contração muscular, pois estimula a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) que fosforila a miosina fornecendo energia para a ligação na actina e então formando as pontes cruzadas, vasocontraindo (Lee et al., 2001). (Figura 5).

Figura 5: Vasoconstrição desencadeada pela fenilefrina



Fonte: Lee et al. (2001)

Sendo um agonista muscarínico, a ação da acetilcolina é dependente do endotélio devido a presença do receptor M3 acoplado à proteína G, que desencadeia uma cascata de sinalização culminando na maior liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, e isso, por sua vez estimula a ação da enzima NO sintase que converte L-arginina em NO, que se difunde livremente para o músculo liso ativando a enzima guanilato ciclase solúvel e convertendo guanosina trifosfato (GTP) em GMPc. O GMPc ativa a proteína kinase dependente de GMPc (PKG) que dentre outras funções, reduz a liberação de cálcio citoplasmático no músculo e portanto o acoplamento actina-miosina, causando a vasodilatação (Meyrelles et al., 2011) (Figura 6).

Figura 6: Relaxamento vascular dependente de endotélio

Fonte: Adaptado de Meyrelles et al. (2011)

A disfunção endotelial (DE) ocorre quando há o desequilíbrio entre a liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras mediadas pelo endotélio. A DE não está ligada a um tipo específico de doença, mas engloba um conjunto de fenótipos que ao final culmina na perda da função fisiológica do endotélio (Li; Sun; Carmeliet, 2019). Esse estado é caracterizado pela redução da disponibilidade de NO, resultando num menor percentil de relaxamento do vaso, por outro lado, moléculas vasoativas, como a endotelina e angiotensina II podem ser mais secretadas gerando uma maior vasoconstrição. Moléculas de adesão, substâncias pró inflamatórias e trombóticas também têm suas concentrações aumentadas na DE (Alexander et al., 2020). Alguns fatores podem contribuir para essa condição, como por exemplo maior estresse oxidativo que interfere diretamente na sinalização do NO reduzindo sua produção e estimulando a interação de endotelina com seu receptor (Forstermann; Sessa, 2011). Nesse caso das espécies reativas de oxigênio há um ciclo reverso de estimulação, pois ao passo que as EROS geram a disfunção endotelial, o endotélio nessa condição produz mais EROS (Nappi et al., 2022). Observa-se também a redução da permeabilidade vascular com alteração morfológica das células endoteliais devido ao fluxo turbulento em determinadas áreas vasculares ou elevação crônica da

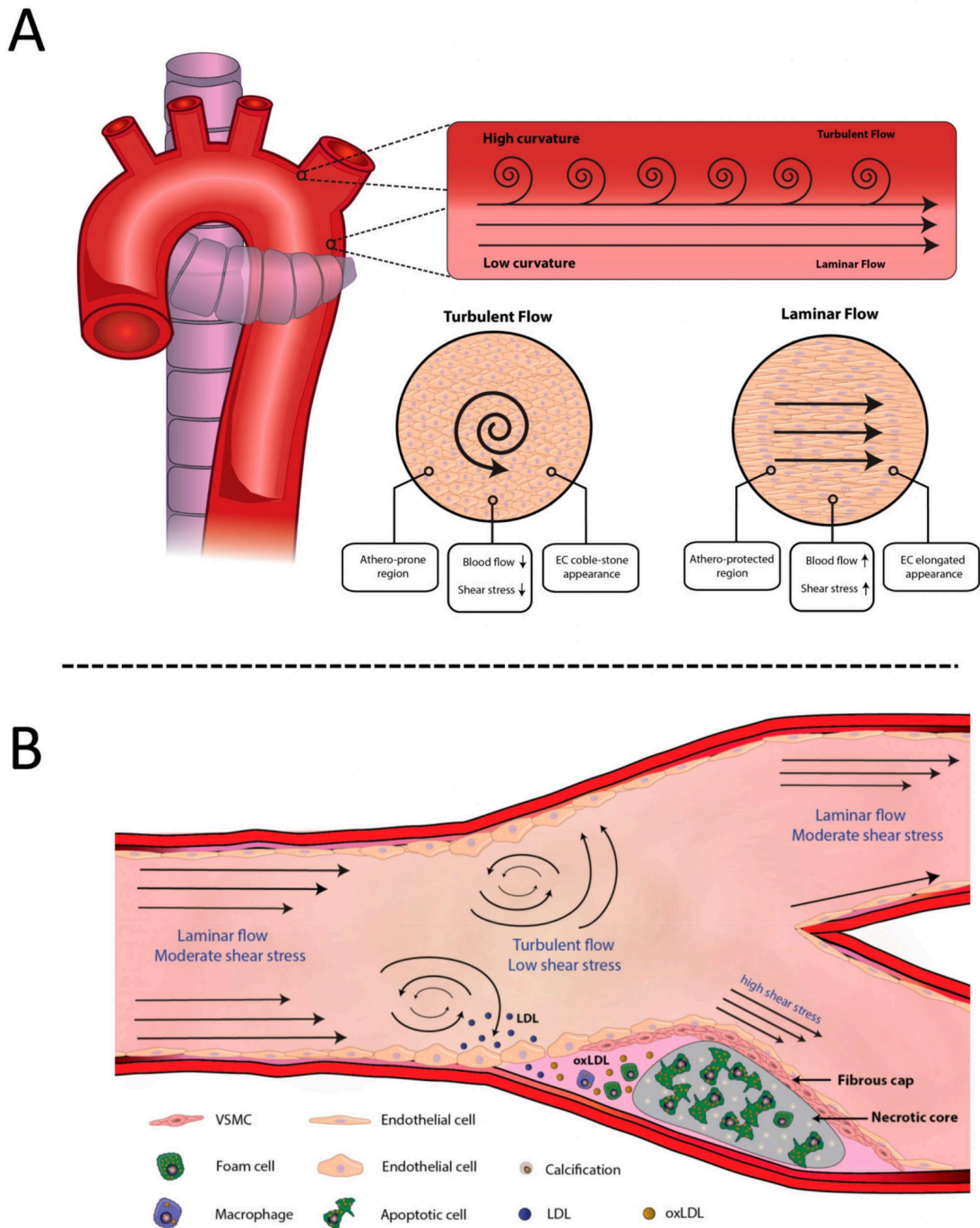
pressão arterial. Substâncias potencialmente inflamatórias em concentrações elevadas como LDL podem ser um fator gerador da disfunção (Lusis, 2000).

Sendo assim, esse fenótipo fisiopatológico do endotélio e suas repercussões a nível de motricidade é visto em doenças vasculares e evidências sugerem que a disfunção endotelial é o marco da aterosclerose (Luz; Uint, 2003; Ardestani et al., 2020; Mudau et al., 2012). Isso é comprovado através de experimentos *in vivo*, no qual coelhos que tiveram o endotélio retirado, em comparação com aqueles em que o endotélio estava íntegro, possuíam maior formação de placa de ateroma na aorta abdominal, ambos em condições de dieta hiperlipídica durante 8 semanas, ratificando a importância protetiva da camada endotelial (Luz et al., 1996).

Somado a isso, o início do desenvolvimento de aterosclerose pode se dar por fatores genéticos, como elevação do aminoácido homocisteína, que se relaciona a doença vascular oclusiva, dentre outros. Os fatores ambientais também contribuem para a aterogênese, tais como dieta hiperlipídica, sedentarismo, fumo, agentes infecciosos. Esses fatores podem afetar os níveis plasmáticos lipoproteicos, causando redução do HDL (*high density lipoprotein*) e aumento do LDL (*low density lipoprotein*), como também aumento de pressão arterial que direta ou indiretamente afetam a camada endotelial (Gowdak, 2020).

Dessa maneira, as artérias de grande calibre localizadas onde o fluxo é turbulento, como coronárias, carótidas, aorta e renais possuem hemodinâmica mais favorável ao desenvolvimento da aterosclerose que aquelas que onde o fluxo é laminar. Neste último, a força que o fluxo exerce favorece o formato pavimentoso das células endoteliais direcionado paralelamente ao fluxo. Porém, o fluxo turbilhonar gera força de cisalhamento constante no endotélio. Nessa situação de estresse de fluxo, as células endoteliais assumem uma forma poligonal, favorecendo o aumento em sua permeabilidade, principalmente em relação a macromoléculas como o LDL (Kotlyarov et al., 2022; Jebari-Benslaiman et al., 2022) (Figura 7).

Figura 7: Influência do padrão de fluxo no desenvolvimento da aterosclerose



Fonte: Jebari-Benslaiman et al. (2022)

Sendo assim, o evento inicial da aterogênese é o acúmulo de LDL na matriz subendotelial. Sua retenção dentro de camada íntima do vaso se dá devido a elementos da matriz que interagem com a ApoB, apolipoproteína que carrega o LDL pelo plasma (Lusis, 2000). Somado a isso, o LDL já internalizado no espaço

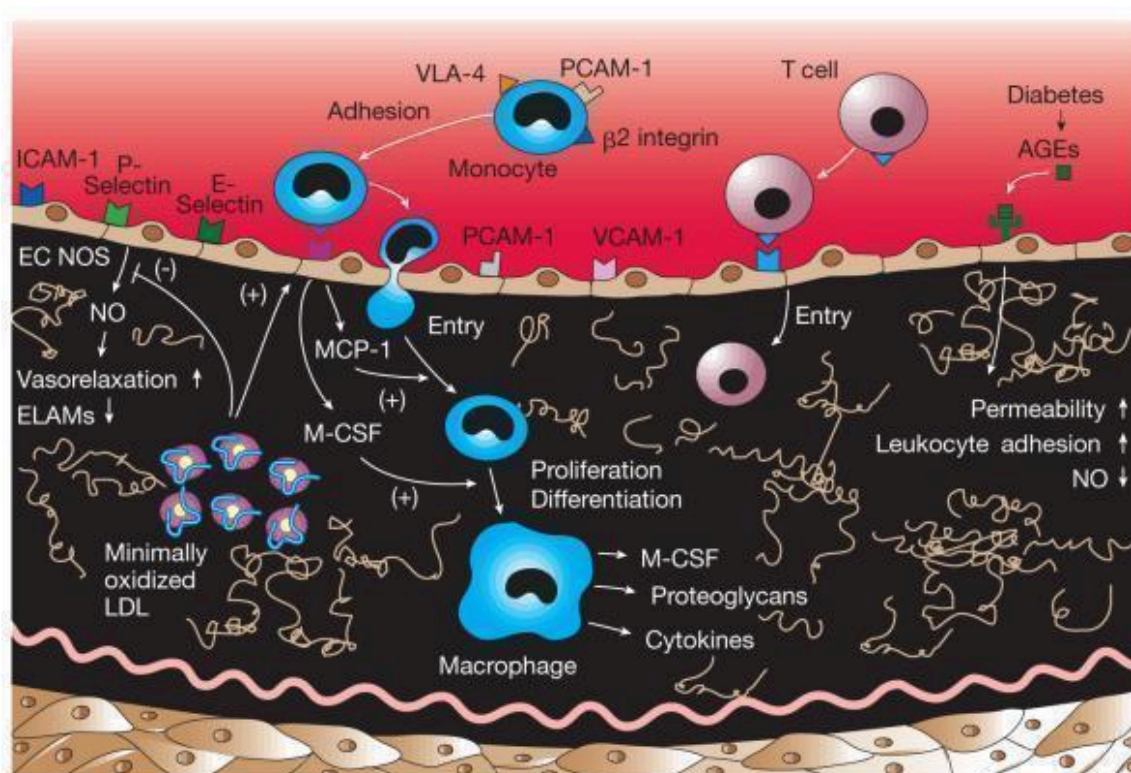
subendotelial sofre oxidação pela interação com espécies reativas de oxigênio (EROS), como radical hidroxila e ânion superóxido e catalisado indiretamente por enzimas como mieloperoxidase, esfingomielinase, lipoxigenase e fosfolipase secretora. O resultado dessa interação é uma molécula de LDL oxidada, que estimula as reações imunológicas ao recrutar células, caracterizando assim o evento gatilho para o processo inflamatório aterogênico (Lusis, 2000; Chen et al., 2022). Existe uma explicação do porquê o LDL inicia o processo de oxidação na matriz subendotelial e não no plasma: devido ao fato de que neste último o LDL transporta alguns antioxidantes como carotenóides, alfa tocoferol, ascorbato, dentre outros. Após a entrada nas camadas vasculares a partícula aprisionada e sem antioxidantes inicia a interação com as EROS (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Considerando a oxidação do LDL, pode-se ainda subdividir em faixas oxidativas: LDL minimamente oxidado e LDL altamente oxidado, no qual os lipídios que passam por esse processo tornam-se moléculas capazes de desencadear uma cascata inflamatória. O LDL altamente oxidado não é mais reconhecido pelos receptores LDL (LDLR), porém se tornam reconhecíveis pelos receptores *scavengers* presentes nos macrófagos (Moore; Freeman, 2006).

Para que haja a diapedese é necessário a captura dos monócitos, rolamento sobre as células endoteliais e por fim a entrada na matriz subendotelial. O LDL minimamente oxidado desempenha um papel iniciador da cascata inflamatória ao estimular as células endoteliais a produzirem e secretar fatores de adesão e crescimento para proporcionar a diapedese das células imunológicas, os principais são M-CSF - *macrophage colony-stimulating factor* e MCP-1 - *monocyte chemotactic protein-1*. Esta última é produzida pelas células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e monócitos da camada íntima vascular e quanto mais lesão tecidual ou estímulo inflamatório, incluindo lipídios oxidados, maior a sua síntese, promovendo transmigração de monócitos (Lusis, 2000; Feinstein et al., 2022).

O recrutamento de monócitos é basicamente mediado pela P-selectina e E-selectina e, para rolar sobre as células endoteliais, é necessária a interação entre a célula imunológica e as células endoteliais. Nesse contexto as ICAM e VCAM permitem a passagem até o local de entrada e a medida que rolam, quimiocinas (CXCL1, CXCL2, CXCL4 e CCL5) são liberadas para permitir maior adesão (Jebari-Benslaiman et al., 2022; Lusis, 2000). A internalização de

monócitos é favorecida devido a alteração morfológica do endotélio disfuncional, ocorrendo maior parte das vezes de forma paracelular, embora alguns experimentos *in vitro* demonstrem a participação de aproximadamente 30% de entrada transcelular de monócitos. Por fim, as células imunológicas adentram a matriz subendotelial e os monócitos agora são chamados de macrófagos (Carman; Springer, 2004) (Figura 8).

Figura 8: Início da aterogênese - oxidação do LDL e diapedese de células imunológicas



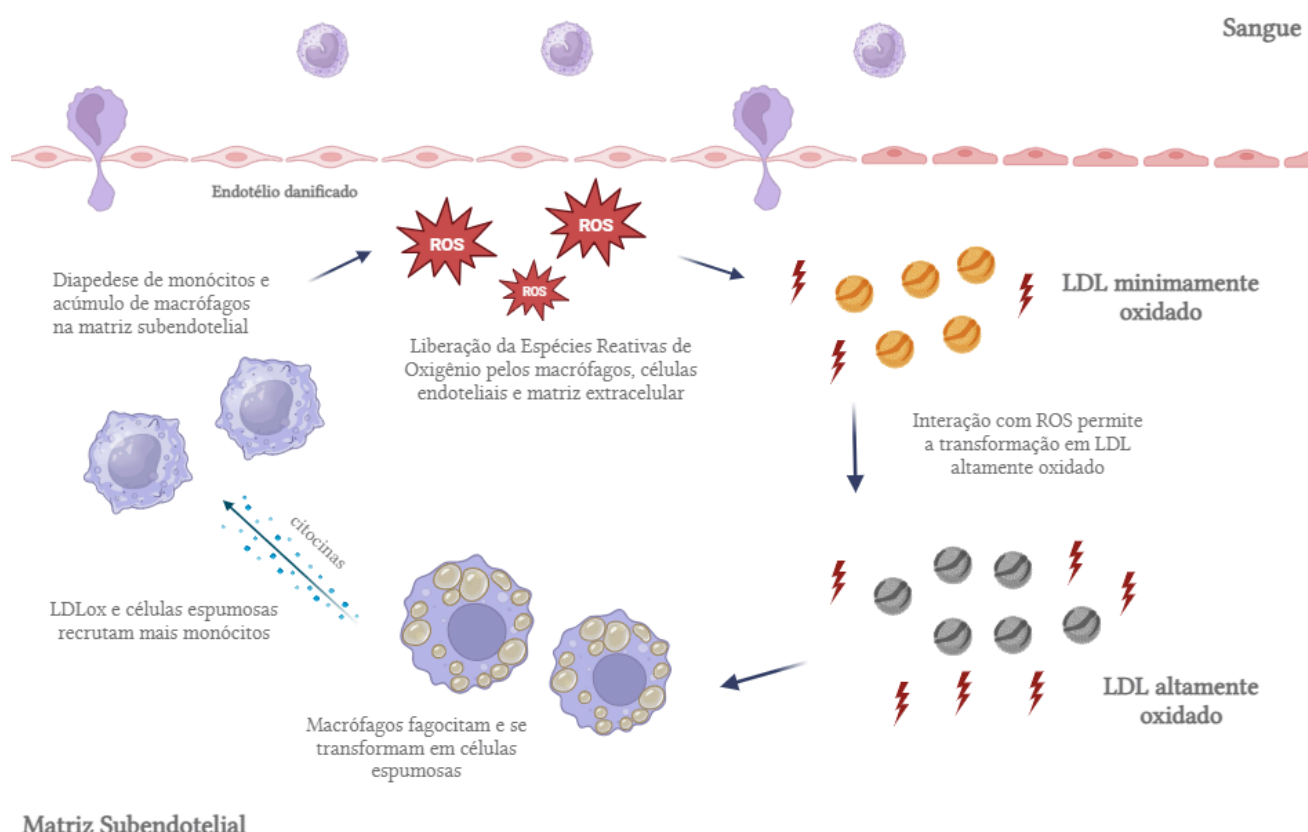
Fonte: Lusis (2000)

Existem duas subdivisões fenotípicas dos macrófagos que podem coexistir na matriz subendotelial: M1, que produz citocinas e quimiocinas inflamatórias, bem como EROS e NO (este último atua na função de microbicida e redução da proliferação celular) e M2, que por sua vez atua na proliferação celular e cura, possuindo características anti-inflamatórias. Embora ambos possam estar presentes nesse processo, os estímulos inflamatórios presentes na matriz subendotelial, como LDLox e EROS, tendem a estimular a diferenciação em macrófagos do tipo M1, visando a criação de uma linha de frente para debelar o estímulo inflamatório, porém essa ativação pode causar dano ao indivíduo, como a

formação de células espumosas vistas a seguir (Italiani; Boraschi, 2014; Jebari-Benslaiman et al., 2022).

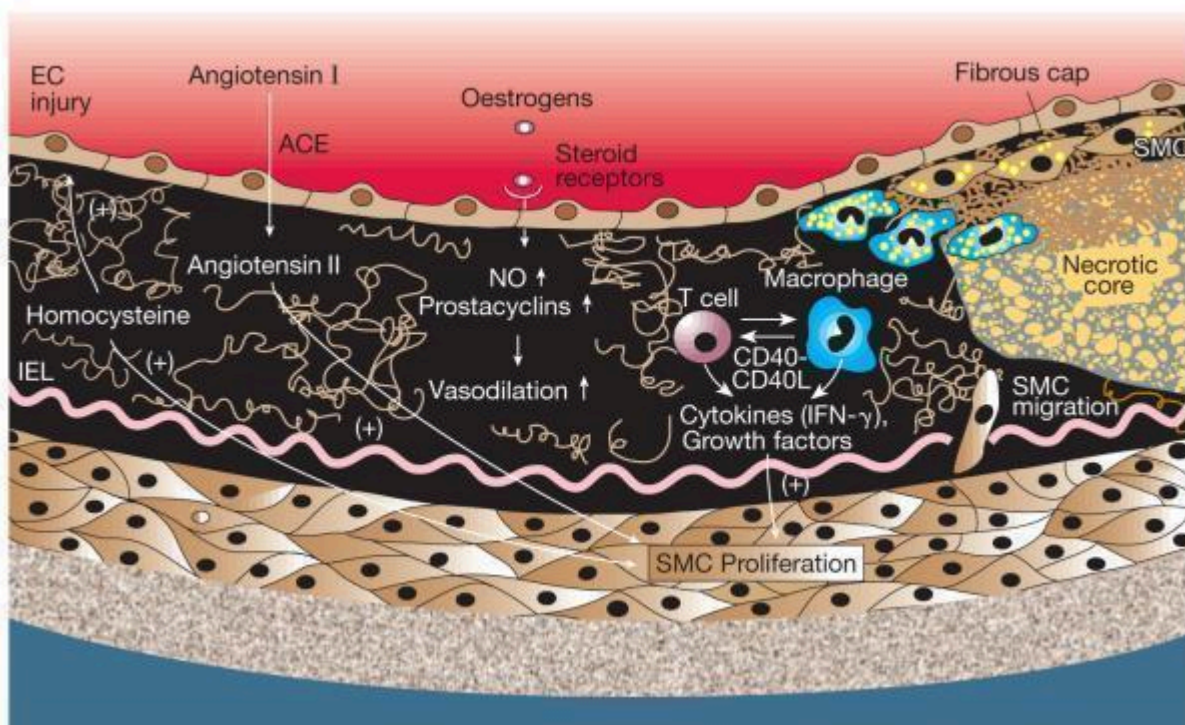
A liberação de EROS pelos macrófagos, células endoteliais e matriz extracelular permite a mudança de LDL minimamente oxidado para LDL altamente oxidado. Este último é alvo da ligação de receptores *scavengers* presentes nos macrófagos que é mais expresso na presença de citocinas como TNF α (fator de necrose tumoral alfa) e IFN γ (interferon gama). A fagocitose ocorre e o LDLox é degradado nos lisossomos e o colesterol esterificado no retículo endoplasmático. As gotículas lipídicas não degradadas ficam armazenadas no citoplasma da célula. Em humanos, o macrófago também secreta a apolipoproteína E e transfere colesterol livre para HDL, o que auxilia na remoção do excesso de colesterol. Porém, deve-se lembrar que o microambiente subendotelial é inflamatório e há um prejuízo no sistema de remoção, ocorrendo a agregação desses lipídios. Dessa forma, a digestão lipídica após a fagocitose não é efetiva e os macrófagos se tornam células espumosas que se acumulam na camada íntima e entram em apoptose e necrose. Há a retenção dos resíduos ricos em lipídios e outros detritos que se agrupam no centro necrótico da lesão (Gutierrez, 2022; Lusis, 2000).

Ocorre nesse momento um ciclo vicioso de inflamação, pois a formação de células espumosas e a própria molécula de LDLox são fatores gatilho para maior recrutamento de monócitos que, por sua vez liberam EROS, transformando LDL minimamente oxidado em altamente oxidado, seguindo a fagocitose, transformação em células espumosas e o ciclo permanece (Figura 9).

Figura 9: Ciclo vicioso da inflamação na aterosclerose

Fonte: A autora com Biorender.com sob a licença Creative Commons (2023)

É necessário ainda destacar que as células musculares lisas da camada íntima também internalizam o LDLox, contribuindo também para a quantidade de células espumosas e centro necrótico (Allahverdian et al., 2014). Ademais, os macrófagos secretam fatores de crescimento, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e citocinas (IL-1) que recrutam as células musculares lisas da camada média. Seu papel nesse contexto é formar a capa fibrosa ao redor da lesão que é composta de células espumosas, lipídios e detritos, e agora também células musculares lisas secretando matriz extracelular (Chen et al., 2022). A capa fibrosa atua como uma barreira entre o lúmen do vaso e o centro necrótico, dando estabilidade e impedindo que fatores pró coagulantes entrem em contato com o sangue e desencadeando trombose, por exemplo (Jebari-Benslaiman et al., 2022) (Figura 10).

Figura 10: Formação da capa fibrosa

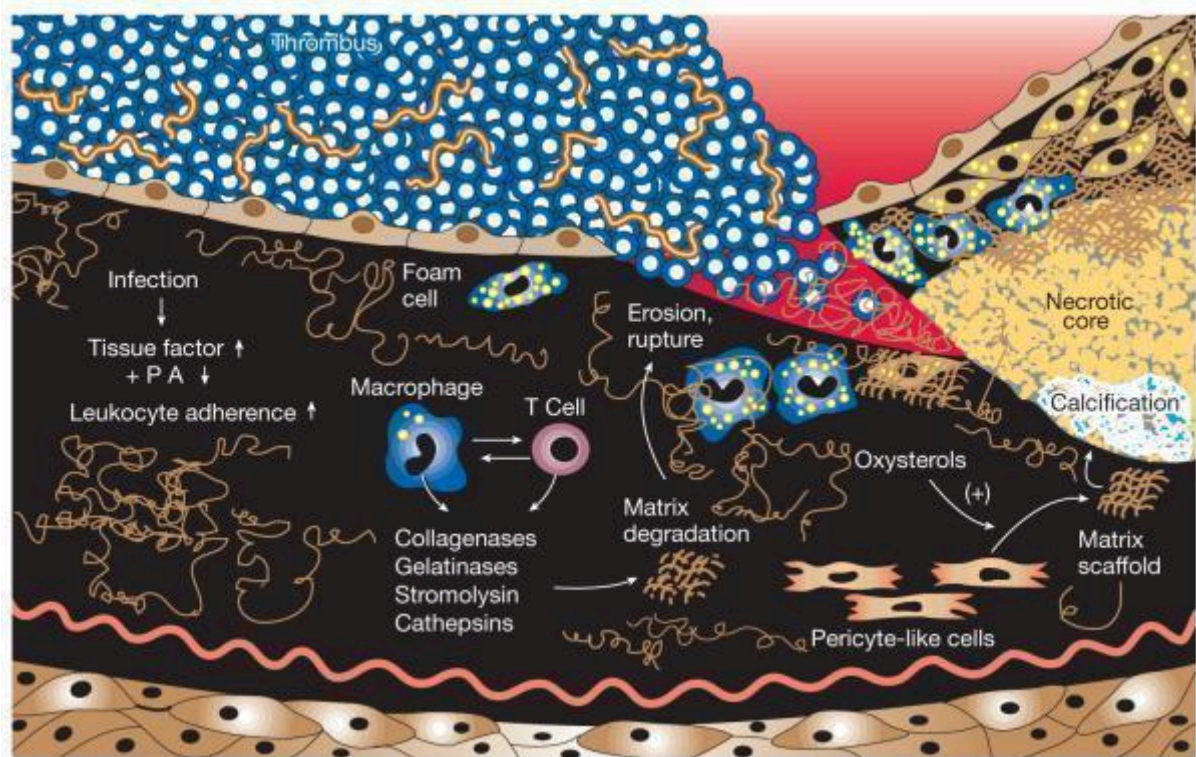
Fonte: Lusis (2000)

Esse ciclo inflamatório favorece a chegada de plaquetas que, quando ativadas, liberam seus grânulos contendo citocinas e fatores de crescimento que, junto com a trombina, também permitem o recrutamento de células do músculo liso. A ativação plaquetária também favorece a vasoconstrição devido a via de sinalização do ácido araquidônico, que resulta em prostaglandinas e tromboxano. (Ross, 1999; Chen et al., 2022). A calcificação da placa também ocorre nesse processo. As células musculares lisas, bem como pericitos podem sintetizar matriz mineralizada e diferenciar-se em osteoblastos, mediante estímulos de citocinas como $\text{TNF}\alpha$ (Shi et al., 2020). Primeiro há a síntese de ortofosfato de cálcio, que é transformado em fosfato de cálcio amorfo e em cristais. O processo de calcificação demonstra o avanço da patologia, porém não está bem fundamentado ainda como isso se relaciona com a estabilidade da placa (Jebari-Benslaiman et al., 2022; Shi et al., 2020).

A gravidade da aterosclerose e a ocorrência de eventos agudos reside na ruptura da placa de ateroma. A formação da capa fibrosa ao redor do núcleo lipídico é um processo demorado e que compromete de maneira crônica o lúmen vascular (Watson et al., 2018). Na vigência de fatores de risco cardiovascular e inflamação, a capa fibrosa vai afinando-se, associada à ativação de

metaloproteinases de matriz que comprometem sua estrutura, sendo assim definida como placa vulnerável. As citocinas IL-1 e TNF α , bem como CD40 estimulam a produção de metaloproteinases, principalmente nos chamados “tampa” e “ombro” da placa, ou seja na parte próxima ao sangue e nas laterais. Assim, quanto maior a inflamação no centro necrótico mais fina a capa fibrosa fica, sendo submetida a possível ruptura (Sarén; Welgus; Kovanen, 1996). Quando há ruptura, o conteúdo do núcleo é exposto e há ativação de cascatas de coagulação. Esses componentes pró trombóticos entram em contato com o fator VII, o que favorece a deposição de fibrina e sua rede envolvendo as plaquetas, gerando portanto um trombo. Este trombo pode se destacar do vaso e atuar como êmbolo e ocluir vasos causando isquemia, que pode ser fatal ou de grande gravidade a depender do órgão afetado, causando por exemplo acidente vascular cerebral ou infarto agudo do miocárdio, além disso o próprio trombo pode atuar reduzindo o raio vascular comprometendo a circulação (Badimon; Padró; Vilahur, 2012 ; Mohanta et al., 2022) (Figura 11).

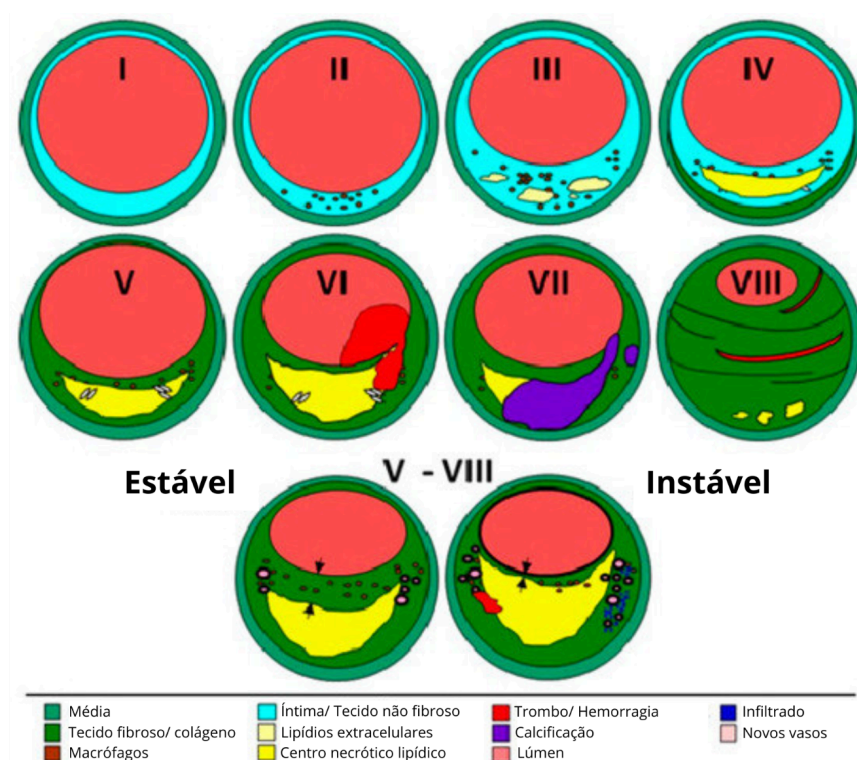
Figura 11: Ruptura da placa de ateroma



Fonte: Lusus (2000)

Sendo assim, a progressão da aterosclerose é lenta e gradual com esses processos supracitados em constante desenvolvimento, de modo que seu início ocorre na idade jovem e com o aumento dos fatores de risco a doença se instala. A *American Heart Association* padronizou uma classificação acerca das lesões ateroscleróticas a partir da característica morfológica (Figura 12). A lesão inicial I até V se dá pelo acúmulo de lipídios com centro necrótico sem calcificação, ocorrendo desde a primeira década de vida até a terceira, com lenta progressão e sem sintomas aparentes. Na fase VI há a possibilidade de formação de trombo, hemorragia e instabilidade da placa e nas fases seguintes VII e VIII ocorre a calcificação da placa, redução do raio do vaso e consequente comprometimento cardiovascular (Virmani et al., 2000). Porém, caso haja a ação de hipolipemiantes e adoção de medidas saudáveis com redução dos fatores risco cardiovascular e inflamação, a placa tende a ficar estável possibilitando circulação suficiente para a homeostase (Jebari-Benslaiman et al., 2022).

Figura 12: Classificação de lesões ateroscleróticas segundo a AHA



Fonte: Adaptado de Pelisek et al. (2019)

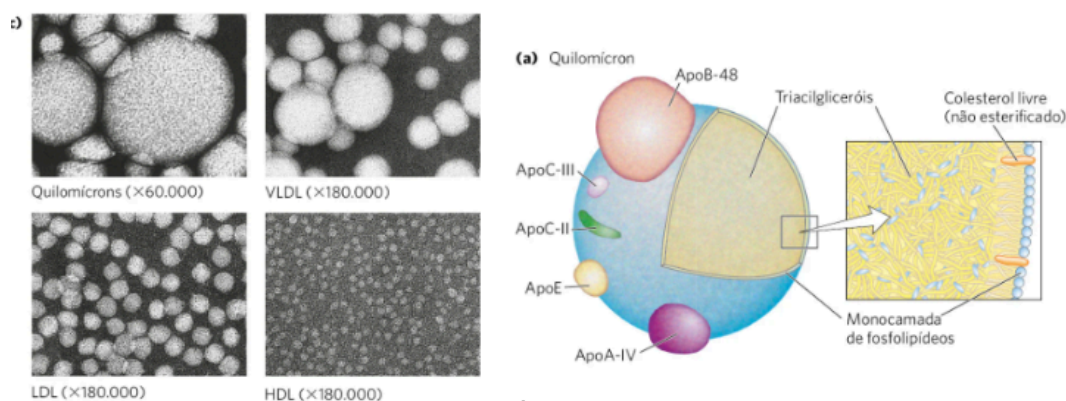
1.3 ATEROSCLEROSE E APOLIPOPROTEÍNA E

O metabolismo lipídico possui uma via endógena, no qual o principal órgão responsável é o fígado, seguido do intestino e a via exógena, no qual adquire-se os lipídios a partir da alimentação. Após a ingestão, os triglicerídeos sofrem discreta ação da lipase lingual e gástrica, são emulsificados por meio dos ácidos biliares e processados pela lipase pancreática, permitindo assim a sua absorção nos enterócitos. Em seguida, os ácidos graxos livres, juntamente com o colesterol não esterificado, são remontados em quilomícrons no retículo endoplasmático e exportados pelo sistema linfático que devolve as moléculas para a circulação na veia subclávia esquerda (Borén et al., 2022).

Os quilomícrons oriundos do metabolismo exógeno são um tipo de lipoproteínas, macromoléculas que possibilitam a circulação das gorduras pelo sangue devido a sua característica anfipática, onde as cabeças polares permitem a circulação em meio ao ambiente aquoso e as caudas ou o interior da macromolécula, apolar, permite abrigar lipídios em uma camada única, diferente da organização da membrana plasmática (Nelson; Cox, 2014). Ao total existem cinco tipos de lipoproteínas, diferenciando-se de acordo com a constituição e densidade (Figura 13).

Figura 13: Lipoproteínas plasmáticas e suas composições

Lipoproteína	Densidade (g/mL)	Composição (% da massa)				
		Proteínas	Fosfolípidos	Colesterol livre	Ésteres de colesterol	Triacilgliceróis
Quilomícron	< 1,006	2	9	1	3	85
VLDL	0,95-1,006	10	18	7	12	50
LDL	1,006-1,063	23	20	8	37	10
HDL	1,063-1,210	55	24	2	15	4



Fonte: Adaptado de Nelson; Cox (2014)

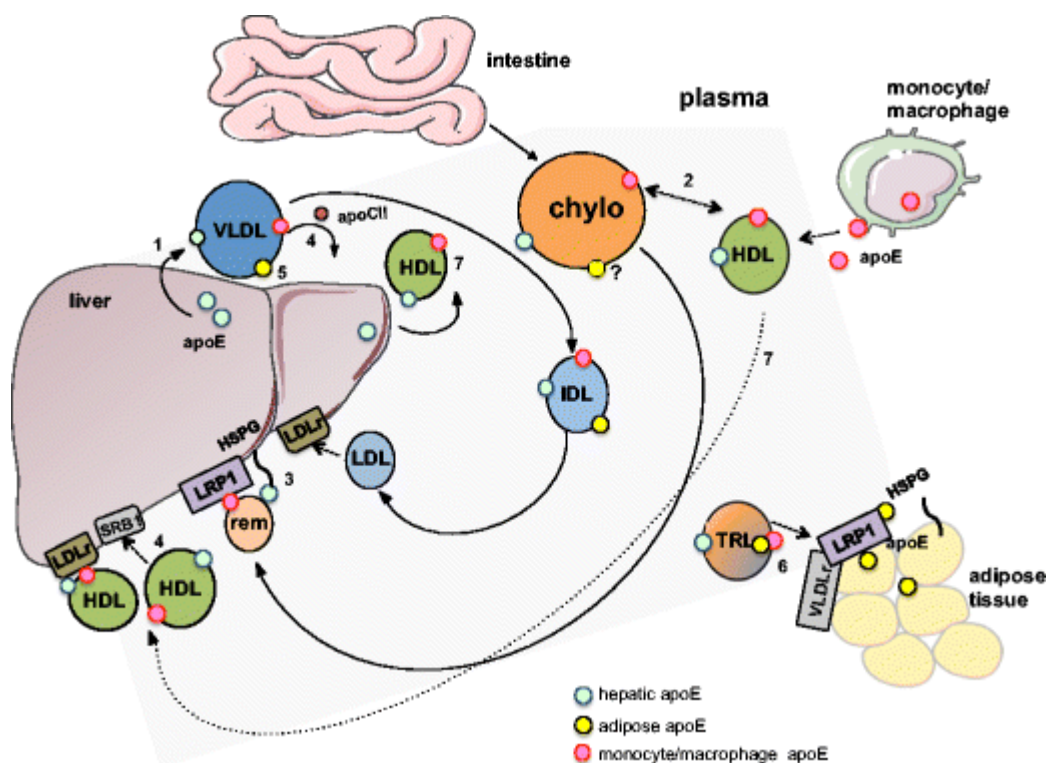
Dentro da circulação, os triglicerídeos contidos nos quilomícrons são clivados pela lipase lipoproteica possibilitando a absorção de ácido graxo e glicerol pelas células musculares e tecido adiposo. Os quilomícrons remanescentes que não participaram desse processo retornam para o fígado e são metabolizados em VLDL (*very low density protein*), outra lipoproteína, menor em tamanho comparado ao quilomícron, porém com uma quantidade considerável de triglicerídeos produzidos endogenamente em sua composição, seguido de colesterol e proteínas. Dentro da circulação novamente o VLDL tem seus lipídios removidos pela absorção e transforma-se na IDL (*intermediate density lipoprotein*) e em seguida LDL (*low density protein*), este último possui maior quantidade de colesterol comparado aos quilomícrons e transporta o colesterol para tecidos como glândula mamária, tecido adiposo, glândulas adrenais, etc. A LDL ainda fornece colesterol para os macrófagos que após a fagocitose e digestão ineficaz transformam-se em células espumosas. Após isso, a LDL retorna para o fígado onde é metabolizada (Borén *et al.*, 2022). Dentro do mundo das lipoproteínas plasmáticas, ainda existe a HDL (*high density lipoprotein*). É popularmente conhecido como o “colesterol bom”, embora não seja uma molécula própria de colesterol, mas possui essa substância em sua composição. A HDL apresenta um menor volume e sua constituição é composta em maior parte por proteínas e em menor parte por triglicerídeos e colesterol, mas ainda sendo uma molécula capaz de carrear lipídios pelo corpo (Jomard; Osto, 2020). A principal função da HDL é o transporte reverso de colesterol, garantindo a sua capacidade antiaterogênica devido a remoção de colesterol dos macrófagos e tecidos, carregando-o para o fígado para posterior depuração (Lusis, 2000). Devido às suas características, a HDL possui menor probabilidade de causar danos aos vasos sanguíneos, diferentemente da LDL que, caso a concentração de triglicerídeos e colesterol seja alta, pode comprometer a circulação principalmente em vasos onde o fluxo é turbulento (Pendse *et al.*, 2008), conforme os mecanismos de aterogênese já descritos.

Na composição das lipoproteínas têm-se também as apolipoproteínas, que recobrem-nas e possuem a função de mediar a ligação entre as lipoproteínas e os seus receptores presentes nos tecidos. Desde as partículas de quilomícron até HDL as apolipoproteínas estão presentes, sendo divididas por seus tipos A, B 48,

B 100, C, E (dentre outros) e por sua presença em cada macromolécula (Alargasamy; Jaeschke; Hui, 2022). Uma proteína importante no desenvolvimento da aterosclerose é a apolipoproteína E (apoE), codificada pelo gene APOE. É uma proteína com 34 kDa e primariamente sintetizada pelo fígado, porém outros tecidos como cérebro, células imunes como os macrófagos, adipócitos, músculo liso vascular, rins e adrenais também produzem (Kockx; Traini; Kritharides, 2018). Estudos feitos com humanos constataram a relação entre o polimorfismo dessa proteína e o desenvolvimento de doenças coronarianas e vasculares, como a aterosclerose (Alargasamy; Jaeschke; Hui, 2022).

Diversos são as funções da apoE no metabolismo lipídico, as principais incluem: se ligar ao receptor de LDL relacionado a proteína 1 (LRP1), ao próprio receptor da LDL, bem como os proteoglicanos de sulfato de heparano presente nos tecidos, principalmente na superfície dos hepatócitos, mediando a captação de moléculas como HDL e LDL para serem metabolizados (Davidson; Pulipati, 2021). Ademais, a apoE produzida pelo fígado também se liga ao VLDL regulando sua produção. Além de estar no próprio hepatócito, a apoE carrega as partículas de quilomícron produzidas no intestino e as direciona ao fígado para o metabolismo supracitado. Essa apolipoproteína presente na superfície das lipoproteínas inibe o processo de lipólise ao deslocar a apoCII no tecido adiposo, a apoE medeia a captação de lipoproteínas ricas em triglicerídeos remanescentes como VLDL e LDL. Outro papel importante da apoE, inclusive aquelas sintetizadas pelos macrófagos, é realizar o transporte reverso de colesterol dos tecidos periféricos, de modo que o excesso de colesterol é transportado via HDL para ser excretado pelo fígado, como ocorre por exemplo na matriz subendotelial dos vasos sanguíneos (Bellosta et al., 1995; Van Dijk; Hofker; Havekes, 1999) (Figura 14). Essa apolipoproteína possui efeitos anti-aterogênicos devido às suas características anti-inflamatórias, antilipemiantes e antiproliferativas, regulando o acúmulo de triglicerídeos, a diferenciação do tecido adiposo e sua expansão, bem como mantendo a integridade neuronal a partir da regulação lipídica no cérebro (Kockx; Traini; Kritharides, 2018).

Figura 14: Produção, transporte das lipoproteínas e importância da apolipoproteína E



Fonte: Kockx; Traini; Kritharides (2018)

1.3.1 Modelo de Aterosclerose: Camundongos apoE^{-/-}

Os camundongos possuem perfil de transporte lipídico diferente de humanos, visto que transportam o colesterol principalmente na forma de HDL, possuindo uma razão HDL/LDL alta comparada com humanos, cuja principal forma de transporte de colesterol é por meio do LDL. Esse perfil pode conferir um papel ateroprotetor nos murinos, dificultando então a possibilidade de se criar um modelo animal para simular a doença aterosclerótica dos seres humanos (Pendse et al., 2009).

Porém, na década de 90, com o avanço do estudo da genética foi possível criar camundongos homozigotos *knockout* ou deficientes para a apolipoproteína E, nos quais o gene APOE é inativado usando direcionamento genético. Esses animais são denominados apoE^{-/-} e constituíram o primeiro modelo murino capaz

de se estudar a aterosclerose (Piedrahita et al., 1992; Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992).

Embora a deficiência genética da apolipoproteína E seja extremamente rara em seres humanos, o camundongo apoE^{-/-} mimetiza os padrões histopatológicos, bioquímicos e inflamatórios da aterosclerose humana. Devido ao fato dos animais nocaute não possuírem a apoE, ficam suscetíveis ao acúmulo de partículas de LDL e VLDL no plasma (Van Dijk; Hofker; Havekes, 1999). O colesterol plasmático desses animais nocaute pode aumentar em torno de 5 vezes comparado com animais sem a alteração genética e 20 vezes com o consumo de dieta hiperlipídica durante 8 semanas, sendo o aumento do colesterol um fator gerador da aterosclerose, como visto na fisiopatologia acima. Esse modelo foi o primeiro a ser desenvolvido que apresentou hiperlipidemia sem a necessidade de indução por dietas hiperlipídicas, embora seu uso sirva para acelerar o processo de formação de placa nos vasos (Pendse et al., 2009; Piedrahita et al., 1992; Zhang et al., 1992).

Ademais, em consonância ao que foi exposto, constatou-se a formação de placa aterosclerótica em nas aortas de camundongos apoE^{-/-} sendo o mecanismo patológico bastante semelhante ao encontrado em humanos, com a formação de células espumosas sendo observadas em aortas de camundongos com 2 meses de vida, centro necrótico e capa fibrosa (Ishibashi et al., 1993).

Sendo assim, conclui-se que animais nocautes para a apolipoproteína E são modelos animais consolidados para estudo da aterosclerose, cuja fisiopatologia é similar a achados clínicos em seres humanos, podendo ser usados nos estudos de fatores ambientais e genéticos determinantes da aterosclerose, bem como tratamentos diversos para essa doença em específico, como tem sido visto na literatura científica (Plump et al., 1992; Balarini, 2010; Leite, 2019; Hassan et al., 2020; Jiang et al., 2020; Palaniyaini et al., 2019; Wang et al., 2021; Liang et al., 2021).

1.4 MICROBIOTA E ATHEROSCLEROSE

O corpo humano abriga quantidades impressionantes de microrganismos, sendo em torno de 100 trilhões de habitantes incluindo fungos, bactérias e arqueias (Eckburg, 2005). Essa população, principalmente a microbiota intestinal

(MI), participa de diversos processos regulatórios da homeostase como armazenamento energético, digestão e absorção de nutrientes, maturação de células imunes, proteção contra patógenos, dentre outros (Jebari-Benslaiman et al., 2022). A microbiota intestinal é composta geralmente por seis filos de microrganismos, a saber, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*. Os principais representantes dessa variedade incluem *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae* e *Bifidobacterium* (Hou et al., 2022). Salienta-se o termo “intestinal” pois há diferenças na ocupação e distribuição desses microrganismos em todo o trato. Por exemplo, no esôfago e estômago a quantidade de bactérias gira em torno de 10^1 enquanto que no intestino aumenta para 10^{12} . Isso ocorre devido às modificações fisiológicas nesses órgãos, pois o ambiente ácido estomacal permite a sobrevivência de apenas alguns filos específicos, como *Helicobacter*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* e *Rothia*. O intestino, mais especificamente o cólon ascendente, por ser predominantemente anaeróbico é um ambiente ótimo em nutrição para o desenvolvimento de mais espécies (Jandhyala, 2015).

Além disso, o sistema imunológico enfrenta um verdadeiro desafio ao manter as bactérias residentes numa relação simbiótica e ao mesmo tempo proteger o organismo contra agentes patogênicos. No intestino grosso, por exemplo, o muco desempenha um papel importante na sua dupla camada em isolar as bactérias e fornecer nutrição com as glicoproteínas. No delgado, os próprios organismos induzem a produção de moléculas para proteção contra cepas patogênicas. As estruturas bacterianas como LPS, flagelos, DNA e RNA dos micróbios específicos ativam os receptores de reconhecimento de padrões (PRR) e essa comunicação resulta na ativação das vias de sinalização, produzindo, por exemplo IgA e proteínas antimicrobianas, principalmente nas células de Paneth (Jonsson; Bäckhed, 2016). Outra função protetiva da microbiota intestinal pode ser percebida a partir dos estudos com murinos livres de germes, onde a rede microvascular intestinal é reduzida, prejudicando a absorção de nutrientes essenciais à homeostase, bem como proporcionando menor área de superfície e tamanho dos enterócitos, prejudicando a barreira intestinal. Os microrganismos da MI obtêm nutrientes para sobrevivência em grande parte dos carboidratos e oligossacarídeos da dieta, que após fermentação transformam-se em ácidos

graxos de cadeia curta (AGCC), como butirato, propionato e acetato, estes são importantes para o organismo pois servem como fonte energética, manutenção da estrutura intestinal e modulação imune (Mann; Lam; Uhlig, 2024; Yoshida et al., 2020).

O desequilíbrio quantitativo e funcional dessa microbiota é conhecido como disbiose, a qual pode estar relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (Shen et al., 2021). O desbalanço entre os principais filos, com o aumento dos *Firmicutes* e redução dos *Bacteroidetes* é visto em DCV. A disbiose pode ser gerada a partir de fatores ambientais, como por exemplo dieta rica em gordura e uso excessivo de antibióticos que afetam a população de microrganismos residentes (Robles Alonso; Guarner, 2013).

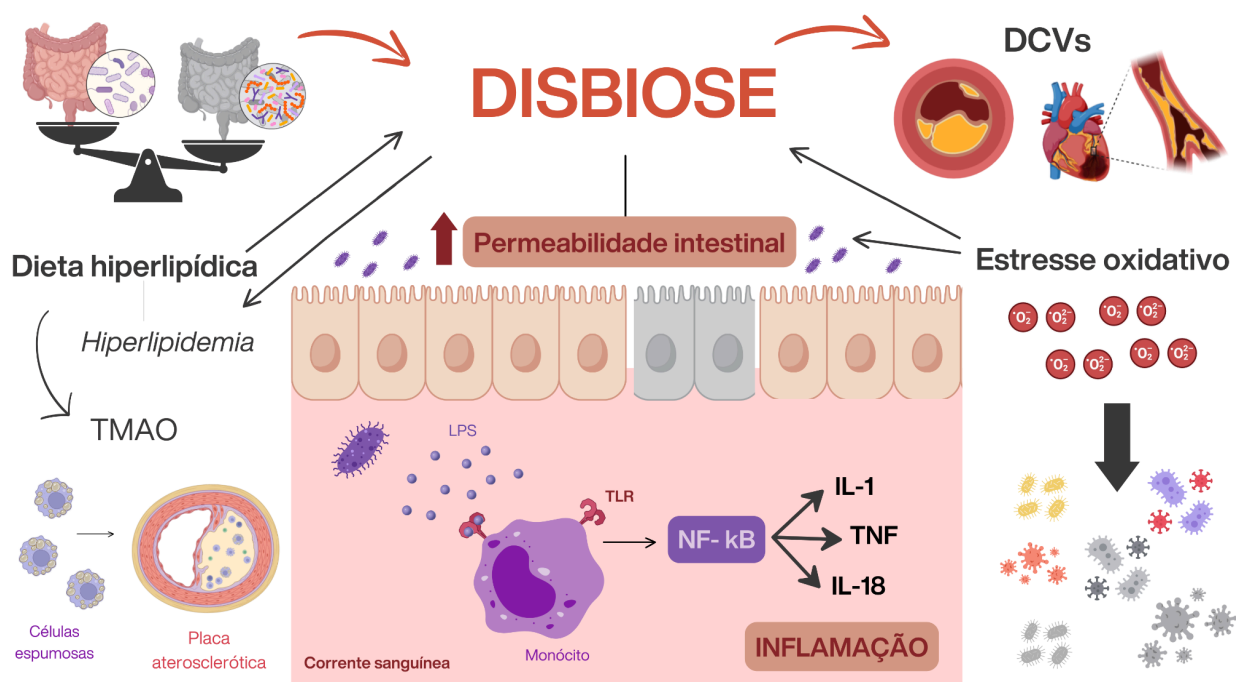
A dieta com alto teor lipídico é um dos fatores de risco para a aterosclerose e interfere na MI pois afeta a permeabilidade da membrana intestinal que permite a migração de lipopolissacarídeos (LPS), molécula presente na parede celular bacteriana, e seu reconhecimento por receptores do tipo Toll, mais especificamente TLR4, presentes nos macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, desencadeando dessa forma uma cascata de eventos inflamatórios, como a ativação do fator nuclear NF kappa B (NF-κB). Este por sua vez ativa genes que codificam citocinas inflamatórias como TNF, IL-1 e IL-18 (Shi et al., 2022). Além disso, aumenta a produção e impacto das espécies reativas de oxigênio, que por sua vez, reduzem a secreção de muco na parede intestinal, além de realizar peroxidação lipídica gerando o subproduto malondialdeído (MDA) no enterócito, gerando alteração funcional e, novamente, permitindo a progressão de uma cascata inflamatória. O estresse oxidativo gerado pela dieta desbalanceada pode afetar diretamente a população da MI, eliminando bactérias residentes a partir de internalização do peróxido de hidrogênio (Al Samarraie; Pichette; Rousseau, 2023). A disbiose relacionada à aterosclerose e obesidade pode levar a uma redução na produção de ácidos graxos de cadeia curta, a exemplo do butirato, que é a principal fonte energética para os enterócitos, gerando uma alteração na permeabilidade intestinal e facilitando a translocação de bactérias para a corrente sanguínea e induzindo inflamação (Birchenough et al., 2018). Um estudo interessante com camundongos apoE^{-/-} tratados com 1% de butirato durante 10 semanas resultou em menor deposição de placa aterosclerótica, redução de citocina inflamatórias e menor estresse oxidativo (Aguilar et al., 2016).

Em contrapartida, algumas moléculas metabolizadas pela microbiota podem contribuir para esse processo inflamatório, como o N-óxido de trimetilamina (TMAO). A metabolização do TMAO inicia com a presença de colina, fosfatidilcolina e carnitina, nutrientes não essenciais obtidos da dieta por meio de alimentos como ovo, carne vermelha e laticínios com altas quantidades de gordura ou produção endógena derivado de aminoácidos. A microbiota intestinal então modifica esses substratos em trimetilamina, que por sua vez é absorvido e através da corrente sanguínea direciona-se ao fígado onde é convertido em TMAO pela enzima flavina monooxigenase. O TMAO é uma metabólito inflamatório que contribui para a aterosclerose, visto que aumenta a formação de células espumosas e reduz a recaptação reversa de colesterol, promovendo maior acúmulo na túnica íntima do vaso (He; Chen, 2017). A inibição da formação desse composto por meio de inibidores microbianos foi capaz de reduzir lesões ateroscleróticas, demonstrando a importância do TMAO nas DCV (Wang et al., 2015).

Um estudo com camundongos demonstrou que o consumo de dieta ocidental rica em gordura promovia alterações na MI, gerando a disbiose e, subsequentemente aterosclerose. A troca por uma dieta equilibrada restaurou a população de microrganismos e reverteu em grande parte alterações relacionadas a aterosclerose (Li et al., 2015). Outra pesquisa realizada em 2015 comprovou a ocorrência de disbiose intestinal com a presença de microrganismos oportunistas, como *Enterobacter*, *Megasphaera*, *Oscillibacter* e *Desulfovibrio* em pacientes com AVC e aterosclerose em grandes artérias (Yin et al., 2015). Um estudo com ratos demonstrou que a disbiose está associada a extensão do infarto agudo do miocárdio e que probióticos reverteram esse quadro (Gagné et al., 2022). De maneira interessante, já foi descrito a presença de DNA microrganismos patogênicos em placas ateroscleróticas, principalmente *C. pneumoniae* (Jonsson; Bäckhed, 2016). Relacionado a isso, animais apoE^{-/-} sem germe com dieta reduzida em colesterol desenvolveram mais placa aterosclerótica quando comparado com animais com MI (Stepankova et al., 2010). Outro estudo com murinos livres de germes demonstrou maiores concentrações de colesterol e LDL quando comparados com animais com MI íntegra, destacando o papel dos microrganismos no metabolismo lipídico (Li et al., 2015). Dessa forma, percebe-se que há uma relação mútua entre disbiose e dieta hiperlipídica, ambas

isoladas e em conjunto contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose, visto que podem afetar o metabolismo lipídico, alterar a permeabilidade intestinal, promover inflamação com maior estímulo de macrófagos e aumentar o estresse oxidativo, todos esses eventos pilares das DCV (Hou et al., 2022; Shen et al., 2021) (Figura 15).

Figura 15: Disbiose e sua relação com doenças cardiovasculares



Fonte: A autora com Biorender.com e Canva sob a licença Creative Commons (2024). A disbiose é caracterizada pelo desbalanço da microbiota em termos de população e funcionalidade. Esse processo aumenta a permeabilidade intestinal que pode facilitar a translocação de moléculas bacterianas (LPS) para a corrente sanguínea e desencadear uma cascata inflamatória a partir do reconhecimento do receptor TLR4, culminando na produção de citocinas inflamatórias. A dieta hiperlipídica aumenta a disbiose e há uma relação mútua, pois o metabolismo lipídico também é afetado pela disbiose. Substâncias potencialmente inflamatórias como o TMAO podem gerar a transformação de macrófagos em células espumosas, afetando o metabolismo de LDL/HDL. O estresse oxidativo também aumenta a permeabilidade intestinal e induz disbiose ao reduzir a população bacteriana. Dentro desse contexto, os pilares das doenças cardiovasculares são potencializados pela disbiose, favorecendo o acometimento.

1.4.1 Probióticos e *L. Fermentum*

Probióticos são conhecidos como microrganismos vivos que causam benefícios ao hospedeiro (Hill et al., 2014). O termo foi cunhado em 1974, mas

atualmente muitas questões tem se levantado acerca do impacto e da relevância desses agentes na prevenção e tratamento de doenças. Os probióticos podem ser encontrados de diversas formas na indústria alimentícia e farmacêutica, como kefir, iogurte, barras nutricionais, fórmulas infantis e até cosméticos e comprimidos liofilizados. (Babadi et al., 2019). Foi demonstrado em alguns estudos a eficácia na suplementação de probiótico em determinadas doenças, como gastroenterite aguda (Szajewska et al., 2013), síndrome do intestino irritável (Ford et al., 2018), infecção respiratória aguda (Huang et al., 2022), obesidade (Vallianou et al., 2020), diabetes (Li et al., 2023) e doenças cardiovasculares (Dixon et al., 2020).

Elenca-se duas formas nas quais os probióticos podem atuar no organismo: um mecanismo direto, onde necessita-se de um contato ou proximidade com às células do hospedeiro e/ou indireto, a partir de secreção molecular. As ações dos microrganismos geralmente são específicas para cada cepa e/ou gênero, sendo os principais utilizados na indústria terapêutica *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Suez et al., 2019). Em razão dos probióticos serem microrganismos, quando administrados em concentrações adequadas promovem a melhora da função intestinal como um todo ao aumentar a variedade da microbiota, além de proteger a parede intestinal ao estimular a secreção de mucina, impedindo portanto a agressão causada pelo ácido clorídrico (Zheng et al., 2020). Alguns gêneros como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* podem exibir a enzima β galactosidase que pode melhorar a intolerância a lactose. A absorção de nutrientes como cálcio, ferro, zinco e a produção de vitaminas podem ser potencializadas com o consumo regular desses microrganismos (Ghanbari et al., 2024). Ademais, os probióticos possuem efeitos antioxidantes, impedindo o acúmulo de radicais livres que são danosos para as células. Há o aumento de vias regulatórias antioxidantes e a redução na estimulação de vias de sinalização que geram espécies reativas de oxigênio (Nascimento et al., 2022; Yadav et al., 2019). Esses microrganismos inibem a competição entre patógenos e atuam na imunomodulação, mantendo a homeostase no hospedeiro. Há um maior estímulo de resposta imune inata a partir da ativação de macrófagos, células dendríticas e a célula *Natural Killer* (NK). A imunoglobulina IgA é mais sintetizada na presença de probióticos, sendo responsável pela proteção contra patógenos na MI (Suez et al., 2019).

Estudos realizados com suplementação de probióticos demonstraram redução de marcadores inflamatórios como TNF, IL-6 e IL-1 em modelos murinos

(Nascimento et al., 2022; Hassan et al., 2020). O metabolismo lipídico também é modulado a partir do consumo de probióticos com aumento da excreção de colesterol e redução da síntese no fígado (Reis et al., 2016). Os probióticos também tem efeito produtor de AGCC no cólon, como visto em estudos com animais (Yoshida et al., 2020; Aguilar et al., 2014).

Sendo assim, em virtude das razões supracitadas, os probióticos podem atuar de maneira positiva na prevenção e tratamento da aterosclerose. Além dos efeitos indiretos no sistema cardiovascular, os probióticos agem na microbiota intestinal. Como já citado, é sabido que o desbalanço da microbiota pode gerar e agravar doenças cardiovasculares, explicando então o potencial benefício dos probióticos (Silva et al., 2020).

Dentre os mais variados tipos de probióticos a *Limosilactobacillus fermentum* tem se destacado no papel de melhora das funções cardiovasculares e metabólicas nas doenças crônicas (Araújo et al., 2022). Diversos estudos têm utilizado essa espécie para se estudar seus efeitos anti ateroscleróticos em modelos murinos (Hassan et al., 2020; Jiang et al., 2020; Palaniyaini et al., 2019; Wang et al., 2021; Liang et al., 2021; Liu et al., 2020).

A *L. fermentum* é uma bactéria anaeróbia Gram positiva do filo *Firmicutes* e gênero *Lactobacillus*, possuindo forma de bastão ou cocos e encontrada usualmente em produtos lácteos, esterco, vagina humana, fezes e vegetais. Este gênero passou por uma mudança taxonômica em 2020, em que algumas espécies tiveram seus nomes alterados, por exemplo, *Lactobacillus fermentum* passou a ser chamado de *Limosilactobacillus*, e *Lactobacillus rhamnosus* é agora *Lactocaseibacillus rhamnosus*. O objetivo era reorganizar tantas espécies diferentes, mais precisamente 261, deste gênero (Zheng et al., 2020). O gênero *Lactobacillus* é abundante na MI, dentre as estirpes encontradas incluem-se: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus ultunensis*, *Ligilactobacillus ruminis*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactobacillus kalixensis*, *Lactocaseibacillus casei*, *Limosilactobacillus gastris*, *Limosilactobacillus antri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Ligilactobacillus salivarius*, *Limosilactobacillus fermentum*. Em relação a função fermentativa pode-se dividir em três grupos: as homofermentativas que convertem carboidratos em ácido láctico como produto principal, incluindo *L. acidophilus* e *salivarius*; as heterofermentativas facultativas que produzem, além do ácido láctico, o etanol, CO₂ e ácido acético, porém em

determinadas condições, *L. casei* e *L. plantarum* são dois exemplos. E, por fim, as heterofermentativas obrigatórias que sempre produzem esses subprodutos citados acima, nessa classe incluem-se a *L. reuteri* e a *Limosilactobacillus fermentum* (Dempsey; Corr, 2022).

Limosilactobacillus fermentum é conhecida como reguladora de microbiota e peristaltismo intestinal, podendo ter efeitos hipolipemiantes. A explicação para esse fenômeno se baseia na oxidação do colesterol convertendo-o em esterol fecal, não podendo retornar a circulação e assim, reduzindo os níveis de colesterol no sangue. Além disso, essas bactérias podem inibir enzimas importantes para a síntese do colesterol e reduzir sua absorção intestinal. Esses eventos somados podem acarretar em redução de deposição de placa aterosclerótica, como já foi demonstrado em estudos com murinos (Chen et al., 2016; Liu et al., 2020). Acerca do metabolismo de glicose, a *L. fermentum* possui efeitos hipoglicemiantes em modelo murino, principalmente por manter os níveis do hormônio GLP-1 que estimula a liberação de insulina, estimula a glicólise e reduz a gliconeogênese, além de produzir AGCC, que também regula a homeostase da glicose (Lacerda et al., 2022). Essa bactéria pode atuar reduzindo patógenos na MI por ser produtora de ácido lático, bem como acetato e propionato, reduzindo o pH do meio (Rastogi; Singh, 2022). Outro agente com papel semelhante é o NO, cuja produção é estimulada em macrófagos por *Lactobacillus*, sendo importante para o imunometabolismo e eficácia dessa célula (Palmieri et al., 2020).

Essa bactéria possui diversas cepas com diferentes funções e destacam-se nessa pesquisa as cepas 139, 263, 296, que demonstraram papel positivo no âmbito cardiometabólico. Todas podem ser isoladas de frutas brasileiras: a 139 da manga; a 263 do abacaxi e a 296 do morango (Nascimento et al., 2022). Devido a estabilidade das cepas na manipulação e substrato nacional, são fortes candidatas a opções terapêuticas em tratamentos com doenças crônicas (Araújo et al., 2022). Por meio de estudos *in vivo*, *L. fermentum* 296 teve comprovado seu papel na redução de hiperlipidemia, resistência à insulina, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, bem como aumento da biodiversidade intestinal do hospedeiro. Essa cepa demonstrou estabilidade ao ser submetida a digestão simulada *in vitro*, garantindo assim a sobrevivência ao ser ingerida (Ferreira et al., 2022). A literatura demonstra que a administração de duas ou mais cepas é mais eficaz do que apenas uma (Yoo et al., 2013). A avaliação de segurança dessas

três cepas também foi realizada em ratos machos e fêmeas com dose baixa 8 log UFC/mL ou alta 10 log UFC/mL durante 90 dias. O resultado desse estudo de toxicidade subcrônico revelou não haver alterações comportamentais, macroscópicas nos órgãos, hematológicas e de marcadores hepáticos e renais. Acerca do nível sérico de citocinas, o probiótico com as três cepas de *L. fermentum* reduziu TNF em machos e fêmeas e IL-1 β em machos, tornando-o apto para estudos terapêuticos (Cruz Neto et al., 2023). Um estudo realizado com as três cepas supracitadas demonstrou redução da pressão sanguínea, aumento de ácidos graxos de cadeia curta, redução de dos níveis séricos de colesterol, aumento de vias antioxidantes no fígado, cólon, coração e rim em ratos com dieta *high fat* (Freire et al., 2021a). Em adição, outra pesquisa com as mesmas cepas observou efeitos anti-inflamatórios por meio da redução plasmática de citocinas pró inflamatórias como IL-1, TNF α e aumento das antiinflamatórias, como IL-6 e IL-10 (Freire et al., 2021b). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo feito em 2022 com estas cepas, destacando a melhora da composição da microbiota intestinal após o tratamento (Ferreira et al., 2022). A relação *Firmicutes/Bacteroidetes* é um preditor de doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose (Magne et al., 2020). Um recente estudo com administração dessas três estirpes em ratos durante 13 semanas resultou em redução dessa proporção a partir da análise da microbiota após o tratamento (Santos et al., 2024). Todos esses dados corroboram para a hipótese de que as cepas 139, 263, 296 da bactéria *Limosilactobacillus fermentum* pode apresentar potencial benefício do contexto da aterosclerose.

1.4.1.2 Probióticos e função endotelial

O endotélio é o ponto chave de aterosclerose, pois o fenômeno chamado de disfunção endotelial pode ocasionar diversas complicações hemodinâmicas, como menor resposta ao relaxamento dependente do endotélio e maior força contrátil no acoplamento fármaco-dinâmico aos ligantes alfa agonistas (Kotlyarov et al., 2022). O NO nesse cenário tem sua biodisponibilidade reduzida e o desacoplamento da NO sintase estimula a produção de EROS que, por sua vez, aumentam o estresse oxidativo celular potencializando ainda mais a disfunção endotelial (Mudau et al., 2012).

Sendo assim, ao se considerar o uso de probióticos para tratamento e/ou prevenção da aterosclerose, se faz necessário investigar a ação dos probióticos nesse contexto. Já foi demonstrado que os probióticos do gênero *Lactobacillus* promovem maior biodisponibilidade de NO, o que em um contexto de disfunção endotelial como observado na aterosclerose promove melhor vasomotricidade, principalmente em relação ao relaxamento vascular e redução da inflamação (Robles-Vera et al., 2018; Vasquez et al., 2019). Um estudo que realizou a suplementação de *Limosilactobacillus fermentum* durante noventa dias em ratos observou que o estresse oxidativo foi reduzido após o tratamento, por meio da maior atividade de enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase (Yadav et al., 2018). A administração de *Lactobacillus rhamnosus* GG 7 log UFC/ mL em camundongos apoE^{-/-} durante 12 semanas melhorou a injúria vascular, sendo observada a partir da microscopia de varredura. Os autores sugerem que esse resultado pode ser devido a inibição do estresse oxidativo a partir da maior produção de corpos cetônicos pelo probiótico (Zhai et al., 2022). A suplementação com *Weizmannia coagulans* JA845 em ratos alimentados com dieta gordurosa aumentou a biodisponibilidade de NO, reduziu os níveis de EROS e MDA e potencializou a maquinaria antioxidante com aumento de superóxido dismutase (SOD) e glutathione reduzida. Além disso, fatores de adesão endotelial foram menos expressos após o tratamento sugerindo menor risco de formação de placa, pois reduz a diapedese (Liyng et al., 2023).

A aplicação fisiológica do aumento de NO pode ser visto no experimento de reatividade vascular. Yap et al (2016) trataram ratos espontaneamente hipertensos com *Lactobacillus casei* C1 11 log UFC/mL durante 8 semanas. Após avaliar a reatividade de artéria aorta no banho de órgãos foi percebido que o tratamento reduziu a contração exarcebada produzida pela disfunção endotelial, como também melhorou o relaxamento vascular à acetilcolina que depende da liberação de NO pelo endotélio, salientando a restauração de disponibilidade desse composto no vaso. O mesmo resultado anterior acerca da maquinaria antioxidante foi visto nesse estudo. A administração de *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 em camundongos obesos alimentados com dieta *high fat* durante 12 semanas melhorou o relaxamento vascular à acetilcolina, ou seja, dependente de endotélio. As EROS que estavam aumentadas no grupo doente sem tratamento apresentaram-se reduzidas ao final das 12 semanas, bem como a expressão de

enzima oxidante NADPH, já as enzimas antioxidantes aumentaram (Toral et al., 2014). A administração de um combinado de várias bactérias (VSL#3) durante 7 semanas em ratos com hipertensão portal também resultou na maior atividade antioxidante, sendo avaliada por meio da fluorescência com o marcador DAF que se liga a EROS emitindo um fluoróforo (Rashid et al., 2014). Um estudo com modelo de envelhecimento com D-galactose que estimula a produção de EROS demonstrou que o tratamento com *Lactobacillus plantarum* NJAU-01 em camundongos aumentou enzimas antioxidantes (catalase, SOD, glutathione peroxidase) e capacidade antioxidante total e reduziu os níveis do produto de peroxidação lipídica, MDA, no soro, coração e fígado (Ge et al., 2021).

Os estudos envolvendo diretamente aterosclerose, função vascular e endotelial por meio da reatividade vascular e o tratamento com probióticos são escassos na literatura científica atual. São necessários mais estudos em modelos ateroscleróticos para comprovar o que já tem sido visto em outros modelos de doenças cardiovasculares.

1.4.2 Compostos fenólicos: quercetina e resveratrol

Os compostos fenólicos são substâncias fitoquímicas derivadas de plantas e se dividem em flavonóides, estilbenos, ácidos fenólicos e lignanas. As ações desses compostos têm sido relatadas como melhoradoras da função cardiovascular com redução de pressão arterial, glicemia e colesterol sérico. A ação antioxidante é bem estabelecida podendo, portanto, ser aliados contra doenças crônicas como diabetes, hipertensão, aterosclerose, dentre outras (Pharm; Faça; Lee, 2019).

A quercetina é um flavonoide encontrado em vegetais e possui ação anti-inflamatória, antioxidante, anti hipertensiva, anti hiperlipidêmica, anti-aterosclerótica, dentre outras (Zhang et al., 2016). Flavonoide é uma classe de compostos fenólicos que tem sua estrutura química bem estabelecida, contendo polifenóis hidroxilados com anéis aromáticos ligados por um pirano e grupo hidroxila ligado. Esse grupo hidroxila em determinadas posições pode conferir ação antibacteriana, modulando infecção (Al-Khayri et al., 2022). A ação antioxidante é central na quercetina, reduzindo as espécies reativas de oxigênio ao inibir a NO sintase ou modulando canais iônicos. Ocorre também redução de oxidação no LDL por peroxinitrito e aumento da disponibilidade de enzimas

antioxidantes, como catalase e SOD. O MDA, marcador de peroxidação lipídica também sofre redução por meio de quercetina (Ulusoy; Sanlier, 2020). O LDLox se liga ao receptor semelhante a lectina LOX-1 que regula a captação do LDL pelos macrófagos ativando a cascata inflamatória anteriormente descrita. Um estudo em células RAW sugeriu que a quercetina inibe o LOX-1. Com a redução da cascata e LDLox, as moléculas de adesão VCAMs e ICAMs são menos sintetizadas (Al-Khayri et al., 2022). Esse composto também modula a atividade inflamatória devido a sua estrutura química relacionado a posição hidroxila no anel aromático central. O efeito anti-inflamatório inclui redução da ciclooxygenase, proteína C reativa, IL-6, TNF α , IL-1, MCP-1 e a via do NF-kB, como também aumento de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Choy et al., 2019). Sendo assim, visto que esses marcadores associados ao aumento do estresse oxidativo, inflamação e hiperlipidemia são a base para as doenças crônicas, inclusive cardiovasculares, a quercetina atua de maneira efetiva na melhora desses quadros (Costa et al., 2022).

No contexto da aterosclerose, diversos estudos tem sido realizados, comprovando a eficácia deste composto. A quercetina atua como um senolítico, principalmente relacionado aos macrófagos, através da inibição da sinalização inflamatória p38 MAPK/ p16 (Luo; Xiang; Xiao, 2023). Na aterosclerose, algumas células como os macrófagos podem desenvolver o fenótipo secretor associado à senescência (SASP), e ao assumir essa característica há maior liberação de citocinas inflamatórias. Além disso, a redução de macrófagos senescentes comprovou levar a menor desenvolvimento de placa de ateroma (Seo et al., 2015).

Esses dados corroboram com outro estudo realizado *in vitro* que induziu um ambiente inflamatório com LPS e avaliou a ação da quercetina na inflamação endotelial do eixo monócito-macrófagos e células endoteliais. Percebeu-se que esse composto reduziu a adesão de monócitos e consequentemente a chegada de macrófagos, como também os níveis de citocinas inflamatórias, como TNF, IL-6, IL-8 e moléculas de adesão como VCAM-1 (Vissenaekens et al., 2022). Ademais, a quercetina reduz estresse oxidativo e formação de espécies reativas de oxigênio que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose, ao inibir as enzimas mieloperoxidase e NADPH oxidase, como demonstrado em um estudo feito com camundongos apoE^{-/-} (Liu et al., 2023). Isso restabeleceu a função endotelial ao aumentar níveis de óxido nítrico, contribuindo assim para a melhora na reatividade

vascular (Li; Tian; Lu, 2023). O mesmo ocorreu em uma pesquisa com dano endotelial na insuficiência renal, onde a administração de quercetina em ratos por 28 dias foi capaz de aumentar a disponibilidade de NO, a expressão da NO sintase endotelial (Chen et al., 2022). Um estudo com injúria carótida em camundongos demonstrou que a suplementação de quercetina e resveratrol aumentaram a biodisponibilidade de NO e reduziram a migração de monócitos mediada por MCP-1 (Khandelwal et al., 2012).

Diversos estudos em modelo animal alimentado com dieta gordurosa tem demonstrado efeito anti-aterosclerótico da quercetina, reduzindo a placa de ateroma e melhorando o funcionamento vascular (Dagher et al., 2021; Li et al., 2019; Chen et al., 2022). O efeito hipocolesterolêmico também é visto no tratamento com quercetina, principalmente em relação ao LDL e colesterol total (Tabrizi et al., 2019). Sabendo que o metabolismo lipídico pode ser influenciado pelos AGCC sintetizados pela MI, um estudo com camundongos apoE^{-/-} relatou a maior produção desses compostos após o tratamento, destacando a relação entre quercetina e microbiota (Wu et al., 2019).

Acerca da função endotelial, estudos de reatividade vascular tem mostrado efeito vasodilatador da quercetina em leitos arteriais. Uma pesquisa com ratos espontaneamente hipertensos mostrou maior vasodilatação induzida pela acetilcolina após o tratamento com quercetina durante 13 semanas, resultando também no decréscimo da pressão e maior expressão de NO sintase endotelial (Sánchez et al., 2006). A mesma resposta vasorelaxante aórtica após tratamento com quercetina foi vista em animais com hipertensão devido a estenose renal (Choi et al., 2016). É sugerido que o efeito vasodilatador seja devido a ação específica da quercetina na eNOS, fosforilando-a e aumentando a sua expressão e atividade, culminando num aumento de NO (Dagher et al., 2021). Em relação à vasoconstrição acentuada devido à disfunção endotelial, há controvérsias sobre o efeito de quercetina. Percebe-se que estudos voltados para modelos ateroscleróticos, quercetina e reatividade vascular são escassos até então.

O resveratrol, por outro lado, é um composto fenólico não flavonoide encontrado em diversas plantas, incluindo uvas, e também em fungos. Sua estrutura química envolve dois anéis aromáticos ligado por um grupo metileno. Sua função é conhecida por ter efeitos anticancerígeno, cardio e neuroprotetor, bem como antidiabético (Zhang et al., 2021). Estudo feito com ratos obesos demonstrou

a redução de resistência à insulina mediada pelo resveratrol, além da redução de marcadores inflamatórios (Amaral et al., 2018). Somado a isso, o resveratrol inibiu a conversão do fenótipo M1 de macrófagos na matriz subendotelial, sendo esse resultado positivo no âmbito da aterosclerose, tendo em vista que macrófagos M1 possuem características inflamatórias, induzindo essa doença (Guo et al., 2023). Ademais, esse composto age nas vias intracelulares estimulando, por exemplo, a via da sirtuína 1 (uma histona desacetilase envolvida na ativação de células imunológicas e reparo do DNA) (Yang et al., 2021), inibindo o TLR4 e NF- κ B (um fator de transcrição nuclear envolvido diretamente na aterosclerose ao estimular genes pró inflamatórios e proliferação de macrófagos M1) (Xu et al., 2020). Além desses efeitos, o resveratrol reduz a expressão de moléculas de adesão como ICAMs e VCAMs, minimizando a adesão monocitária na matriz subendotelial. Ele inibe a ativação e proliferação de linfócitos T CD4+, frequentemente vistos no desenvolvimento da placa de ateroma. A produção de citocinas é regulada pelo resveratrol, moléculas como MCP-1, TNF, IL-1 e IL-6 são reduzidas principalmente pela inibição do receptor TLR4 e da via NF- κ B descritos anteriormente (Zhang et al., 2021).

Por ser um composto fenólico, a ação antioxidante também é vista no tratamento com resveratrol. A inibição de NOX 4, maior acetilação da SOD e modulação positiva na via de sirtuína 1 e 3 são as principais ações moleculares. As enzimas catalase e glutathione peroxidase também são mais expressas devido a ação do resveratrol (Zhang et al., 2021). Os efeitos antiateroscleróticos desse composto também envolvem regulação lipídica. Um estudo com indivíduos com dislipidemia tratados com resveratrol durante 8 semanas relatou redução do colesterol total e triglicerídeos (Simental; Guerrero, 2019). O mesmo foi relatado em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica, reduzindo também os níveis de LDL (Chen et al., 2015). Já em modelo murino, o tratamento com resveratrol em camundongos apoE^{-/-} reduziu colesterol total e LDL na décima semana e aumentou os níveis de HDL na vigésima semana. Os efeitos moleculares incluem principalmente maior excreção de sais biliares (Zhou et al., 2020). A redução de deposição de placa aterosclerótica é vista após tratamento com resveratrol. Um estudo com camundongos APOE*3-Leiden.CETP tratados com resveratrol, atorvastatina e ambos demonstrou que a porcentagem de lesão aórtica foi reduzida ao final do experimento de maneira semelhante entre os

compostos isolados e em conjunto, demonstrado a efetividade do resveratrol em reverter lesões tanto quanto medicamentos já popularizados no mercado farmacêutico como a atorvastatina (Berbée et al., 2013). O mesmo perfil ateroprotetor em relação a deposição de placa foi visto em um estudo com camundongos apoE^{-/-} tratados durante 20 semanas com resveratrol (Zhou et al., 2020).

Em relação à função endotelial, esse composto aumenta a biodisponibilidade de NO, contribuindo para maior vasodilatação (Parsamanesh et al., 2021). A expressão de NO sintase foi aumentada em células endoteliais na veia umbilical humana (Wallerath et al., 2002). Em ratos, o resveratrol melhorou o relaxamento vascular dependente de endotélio estimulando a produção de NO e reduzindo o estresse oxidativo (Gordish; Beierwaltes, 2014). Um estudo analisando a reatividade vascular da artéria da cauda de ratos demonstrou que a incubação com resveratrol em seu isômero trans relaxou o vaso tanto na presença quanto ausência do endotélio (VanAntwerp et al., 2020). O resveratrol também reduz a vasoconstrição exacerbada regulando negativamente a expressão de receptores de endotelina do tipo B. Tendo em vista que a vasoconstrição é elevada na aterosclerose, esse é um achado interessante da ação do composto (Huang et al., 2018). Semelhantemente a quercetina, o resveratrol aumenta NO a partir da regulação na NO sintase pela via de Akt e redução de EROS (Guo; Zhou; Xie, 2022).

Um estudo bibliométrico demonstrou que as principais vias de atuação do resveratrol no tratamento da aterosclerose envolvem, além das citadas anteriormente, a inibição da via do fator induzível por hipóxia (HIF-1 α). Durante o desenvolvimento da placa de ateroma, algumas áreas na matriz subendotelial ficam em estado hipóxico, ativando então o HIF-1 α que age em fatores transcricionais de angiogênese e, na tentativa de promover um ambiente mais rico em oxigênio, acaba desencadeando efeitos inflamatórios. Ocorre, por exemplo, inibição de proteínas transportadoras que removem o excesso de colesterol do vaso, aprisionando então essa molécula no endotélio e estimulando a síntese de EROS (Guo et al., 2023). A ação aterogênica do HIF-1 α depende do ambiente e tipo celular justamente por atuar em diversas vias endógenas, porém é certo afirmar que essa molécula pode desencadear um meio inflamatório, através de maior liberação de IL-1 β , instabilidade de placa e reprogramação metabólica em

macrófagos, deixando-os com metabolismo semelhante àquele encontrado na placa de ateroma (Folco et al., 2011). O resveratrol pode atuar inibindo essa via do HIF-1 α , sendo então um forte candidato na terapêutica da aterosclerose (Thomas; Leleu; Masson, 2022).

1.4.3 Nutracêutico LifePro: *L. fermentum* com quercetina e resveratrol

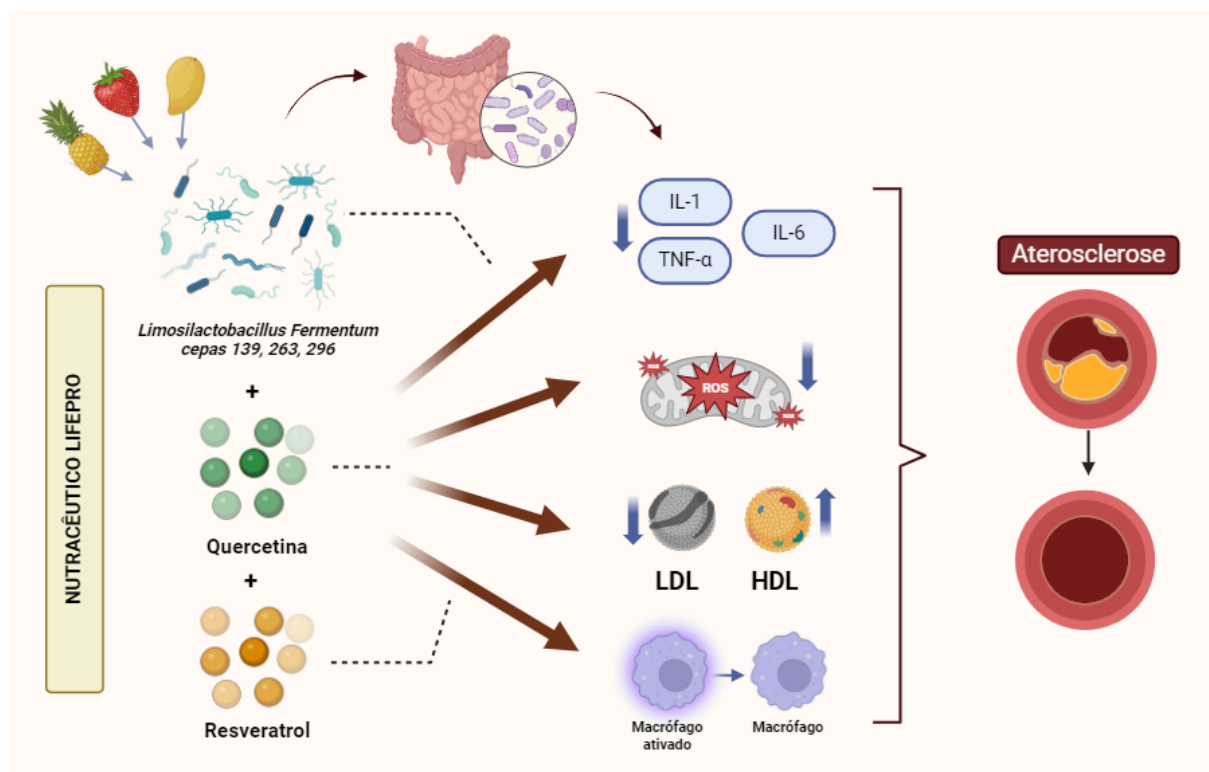
O termo nutracêutico foi cunhado pela primeira vez em 1989 sendo a combinação de duas palavras: nutrientes e farmacêutico, isto é um alimento ou parte dele oferecido em forma farmacêutica que pode servir como prevenção ou tratamento de doenças (DeFelice, 1995). Atualmente, os nutracêuticos tem sido estudados como recurso terapêutico para diversos processos patológicos, como transtorno bipolar (Bozzatello et al., 2024; Fusar-Poli et al., 2019), doença hepática (Maurotti et al., 2023), diabetes (Dama et al., 2024) e doenças cardiovasculares (Sosnowska; Penson; Banach, 2017).

A união entre os compostos fenólicos e probióticos têm sido eficaz para a melhora da função cardiovascular. Houveram estudos anteriores com as cepas 139, 263, 196 de *L. fermentum* demonstrando sua segurança *in vivo*, efeito antioxidante, hipolipemiante e anti-inflamatório em ratos (Freire et al., 2021; Cruz et al., 2023). Um estudo demonstrou que a formulação nutracêutica contendo estas cepas além de quercetina e resveratrol, trouxe benefícios notáveis na capacidade antioxidante durante a fermentação colônica, porque os compostos fenólicos interagem com o probiótico permitindo e potencializando sua ação, além de terem suas próprias ações nos tecidos (Sampaio et al., 2022). O mecanismo pelo qual isso acontece deve-se ao fato de os polifenóis estarem geralmente ligados a um açúcar, como glicose, galactose, ribose, e as bactérias da MI participam desse processo tornando os compostos ativos após a remoção dessa cadeia lateral, permitindo sua chegada na circulação sistêmica pela veia porta, exercendo seus efeitos (Jandhyala, 2015). Além disso, a partir de experimentos *in vitro*, essa formulação se manteve estável durante a digestão simulada, fazendo com que sua biodisponibilidade *in vivo* seja suficiente para produzir os efeitos esperados (Albuquerque et al., 2018; Sampaio et al., 2022).

As cepas de *Limosilactobacillus fermentum* podem ser extraídas de frutas brasileiras, como manga, abacaxi e morango (Freire et al., 2021). A ação do

probiótico ocorre mediante a correção da disbiose intestinal, reduzindo portanto a inflamação. Há também efeitos diretos como redução das espécies reativas de oxigênio, correção da dislipidemia e redução da ativação de macrófagos e seu fenótipo inflamatório (Liyng et al., 2023). A quercetina (Costa et al., 2022) e resveratrol (Zhou et al., 2020) realizam seus efeitos diretos supracitados, de modo que nossa hipótese é que a ação conjunta dos três por meio do uso do nutraceutico resultaria em melhora do quadro fisiopatológico da aterosclerose, podendo ser um produto aliado no tratamento desta doença (Figura 16).

Figura 16: Provável ação dos compostos fenólicos e probióticos no contexto da aterosclerose



Fonte: A autora com Biorender.com sob a licença Creative Commons (2023)

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares, em especial a aterosclerose, apresentam alta incidência e morbimortalidade em todo mundo e principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, considerando a exposição aos fatores de risco e baixo conhecimento populacional acerca das questões desencadeantes.

Sabendo que a microbiota tem impacto na aterosclerose, uma vez que a disbiose proporciona um ambiente inflamatório e predispõe a internalização de LDL na camada íntima do vaso, produtos que modulam e restauram essa população de microorganismos podem ser aliados no tratamento. Sendo assim, os probióticos ou microrganismos vivos que causam benefício ao hospedeiro, são ferramentas chave nesse processo. Por exemplo, a bactéria *Limosilactobacillus fermentum* tem demonstrado efeitos positivos ao melhorar a disbiose, função hemodinâmica, acúmulo de colesterol e marcadores inflamatórios. Pode-se ainda destacar algumas cepas específicas, como a 139, 263 e 296 que possuem o benefício de serem extraídas de frutas cultivadas no Brasil, e demonstraram os efeitos citados anteriormente em roedores.

Já os compostos fenólicos, como quercetina e resveratrol, também podem auxiliar nesse processo ao interagir e trabalhar de maneira conjunta com os probióticos. Essas substâncias são derivadas de plantas e tem demonstrado ações anti-inflamatórias, antioxidantes e hipocolesterolemiantes, fatores que num contexto aterosclerótico tendem a melhorar o quadro fisiopatológico.

Deste modo, a compreensão baseada em evidência científica que este trabalho propõe é que a junção de probióticos e compostos fenólicos podem ser uma opção interessante para o tratamento da aterosclerose, tendo em vista a ação específica e conjunta de ambos. Sendo assim, recentemente foi desenvolvido na Universidade Federal da Paraíba um composto nutracêutico cuja formulação envolve a junção do probiótico *Limosilactobacillus fermentum* (cepas 139, 263 e 296) com quercetina e resveratrol (Brasil, 2022), denominado LifePro. Como a formulação probiótica foi anteriormente testada em ratos demonstrando segurança toxicológica e efeitos promissores no âmbito metabólico, oxidativo e inflamatório, nossa hipótese portanto, é que o composto, ao ser administrado em um modelo de aterosclerose em camundongos, seja capaz de melhorar o perfil lipídico sérico, a função vascular dos animais, marcadores inflamatórios e estresse oxidativo.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar os efeitos da formulação nutracêutica composta por cepas de *Limosilactobacillus fermentum* (cepas 139, 263 e 296) com quercetina e resveratrol (LifePro) em modelo de aterosclerose.

3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar em camundongos apoE^{-/-} com dieta aterogênica o efeito da formulação nutracêutica sobre os seguintes parâmetros:

- Perfil bioquímico plasmático (colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e glicose);
- Concentração plasmática das seguintes citocinas: IL-10, IL-6, TNF α e MCP-1;
- Função vascular.
- Estresse oxidativo.
- Deposição de placa aterosclerótica.

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL E ANIMAIS

Nesta pesquisa foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) hipercolesterolêmicos nocautes para a apolipoproteína E (linhagem apoE^{-/-}), machos, com 8 semanas de idade e seus respectivos controles *wild type* (WT, C57BL/6), pesando ao redor de 20g. Os animais foram provenientes do Biotério do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial - LACONCHA da UFPB.

Foram utilizados animais isogênicos, provenientes de cruzamentos *inbred*, mantidos em estante com circulação e exaustão de ar em gaiolas com no máximo 5 animais, sob controle de temperatura ($21\pm1^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12 horas) e tiveram livre acesso à água (garrafas de polietileno com bicos de aço inoxidável colocadas na parte superior da gaiola), bem como dieta livre. Os animais apoE^{-/-} receberam ração aterogênica *Western Type* (Rhoister, São Paulo, Brasil), contendo 41% de calorias em forma de lipídios e 1,5% de colesterol e os animais WT receberam ração padrão para roedores. A comparação de composição entre as duas rações está ilustrada na figura 17.

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.

Figura 17: Comparação entre as composições das rações oferecidas aos animais

Elementos:	Ração Rhoster (qtde)	Ração Padrão (qtde)
Umidade (Máx)	34,2 g/kg	125 g/kg
Proteína Bruta (Mín)	205,1 g/kg	220 g/kg
Extrato Etéreo (Máx)	200,6 g/kg	50 g/kg
Fibra Bruta (Máx)	16,8 g/kg	70 g/kg
Matéria Mineral (Máx)	32 g/kg	90 g/kg
Cálcio (Mín/Máx)	6,9 g/kg	10-14 g/kg
Fósforo (Mín)	5,0 g/kg	6,0 g/kg

Fonte: Elaboração própria (2022)

4.2 COMISSÃO DE ÉTICA

O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal da Paraíba para avaliação e aprovação sob o número 8809070223.

4.3 SUBSTÂNCIA TESTE

A substância testada foi uma formulação nutracêutica preparada com cepas de *Limosilactobacillus fermentum*, especificamente as cepas 139, 263, 196 (aproximadamente 9 log CFU/mL), e polifenóis, a saber, quercetina (500mg/mL) e resveratrol (300mg/mL), sendo o veículo utilizado solução salina. A formulação foi produzida sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Alves de Brito e Prof. Dr. Evandro Leite de Souza do Departamento de Nutrição, CCS/UFPB.

Brevemente, cada cepa foi isolada de subprodutos de plantas do solo brasileiro: 139 da *Mangifera indica* L. (manga), 263 do *Ananas comosus* L. (abacaxi) e 296 do *Fragaria vesca* L. (morango). A identificação das cepas foi realizada por meio do sequenciamento gênico parcial 16S rRNA, identificando espécies de *Limosilactobacillus fermentum* em alta frequência nos subprodutos (Garcia et al., 2016). Após a preparação do inóculo, as suspensões de cada cepa foram adicionadas a fruto-oligossacarídeos (FOS), conhecido como crioprotetor e agente estabilizante de probióticos (Romano et al., 2016), obtido da Galena Ltd, bem como a quercetina (500mg/mL) e resveratrol (300mg/mL), ambos adquiridos em farmácia de manipulação. A concentração dos antioxidantes baseou-se em achados na literatura científica acerca da eficácia e segurança dos compostos para uso clínico (Fogacci et al., 2018; Serban et al., 2016). As soluções prontas foram transferidas para um refrigerador -80°C por 24 horas e em seguida liofilizadas. O pó foi então transferido para um frasco estéril para o uso *in vivo* nos animais. A contagem viável das cepas após o congelamento gira em torno de 9 log UFC/mg, e após 90 dias em temperatura refrigerada 6 log UFC/mL. Considerando que a literatura afirma que a dosagem de probiótico capaz de exercer benefício varia entre 6-8 log UFC/mL, essa quantidade é própria para a administração terapêutica (Hill et al., 2014). A produção e eficácia do nutracêutico após digestão simulada e refrigeração foram descritos por Sampaio e colaboradores (2020).

Considerando que em estudos anteriores com camundongos (Wiciński et al., 2018; Espírito-Santo et al., 2023) a quantidade mínima de quercetina e resveratrol em uma dose foi 21,3 e 20 mg, respectivamente, padronizamos a dose de 68 mg de nutracêutico por camundongo, a qual possui 3×10^9 UFC/g das cepas, 21,3 mg de quercetina e 20 mg de resveratrol para efeito de modulação cardiovascular. Os 68 mg foram diariamente diluídos em 300 microlitros de água destilada para ser fornecido aos camundongos via gavagem.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

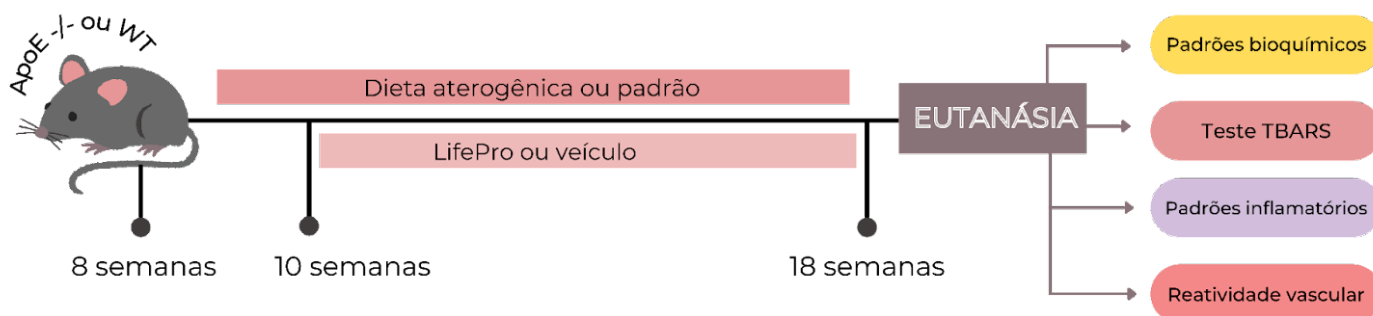
Os animais utilizados na presente pesquisa foram divididos em três grupos experimentais (figura 18):

Grupo 1: camundongos controle (WT) com dieta padrão que receberam veículo;

Grupo 2: camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ com dieta aterogênica que receberam veículo;

Grupo 3: camundongos $\text{apoE}^{-/-}$ com dieta aterogênica que receberam tratamento com LifePro.

Figura 18 - Delineamento experimental



Fonte: Elaboração própria (2022)

A partir de 8 semanas de vida os animais receberam ração padrão (WT) ou aterogênica ($\text{apoE}^{-/-}$) durante 10 semanas, sem restrição. Uma vez por semana o consumo de ração e peso corporal foi medido para acompanhamento.

Durante as últimas 8 semanas os animais receberam veículo (grupos 1 e 2) ou nutracêutico (grupo 3), diariamente via gavagem. O nutracêutico foi diluído de forma que o volume a ser administrado não ultrapassasse 300 microlitros/dia. O volume de veículo administrado (salina) foi ajustado para ser equivalente ao de nutracêutico.

Ao final do período experimental os animais foram eutanasiados com uma sobredose da mistura dos fármacos: ketamina (anestésico dissociativo - bloqueador de receptor glutamatérgico) e xilazina (sedativo - agonista de receptor adrenérgico alfa 2), por via intraperitoneal. A dose recomendada para anestesia geral é de 75mg/kg para ketamina e 10mg/kg para xilazina (Flecknell, 2016). Assim, para realizar a eutanásia como recomendado pela Resolução Normativa No 37/2018 CONCEA/MCTI (BRASIL, 2018) para roedores como os camundongos, a sobredosagem deve ser feita, ficando dessa forma a administração conjunta de ketamina (dose 225 mg/kg) e xilazina (dose 30mg/kg). Uma vez constatada a ausência de reflexos, foi realizada toracotomia para coleta de sangue e tecidos (Kockx; Traini; Kritharides, 2018).

4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.5.1 Perfil bioquímico

As concentrações de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, glicose foram dosadas no plasma dos animais. Após a eutanásia, o sangue foi coletado de caixa torácica após a retirada dos pulmões com uma ponteira contendo heparina e centrifugado por 10 minutos a uma rotação de 5000 rpm. O plasma foi armazenado a -20°C até o momento do uso. Para a medida das concentrações dos parâmetros supracitados foram utilizados kits comerciais colorimétricos (Bioclin®, Quibasa, Brasil), de acordo com as orientações do fabricante na bula e conforme previamente padronizado (Carvalho, 2021). As leituras foram feitas em espectrofotômetro manual (Drawell - DU 8200) e posteriormente tabuladas e calculadas as concentrações a partir da solução padrão contida no kit.

4.5.2 Perfil inflamatório

As citocinas IL-10, IL-6 e TNF- α e MCP-1 foram mensuradas por meio do método ensaio imunoenzimático (ELISA). Existem diversos tipos de ELISA, e nessa pesquisa foi utilizado o ELISA sanduíche. Nesse método, o anticorpo para um antígeno específico, chamado de anticorpo de captura, é impregnado no poço da placa de 96 poços. Após isso, a amostra com o antígeno, neste caso plasma dos animais, é adicionada a placa e se liga a esse anticorpo. Em seguida, é adicionado outro anticorpo específico para o antígeno, chamado anticorpo de detecção e por fim é adicionada a enzima, que converte um substrato incolor (cromógeno) em colorido, indicando a presença de ligação antígeno-anticorpo. A intensidade da reação (cor mais fraca ou mais forte) é proporcional à quantidade de antígeno presente (Goldsby; Kindt; Osborne, 2000).

As citocinas IL-10, IL-6, TNF- α , MCP-1 presentes no plasma dos animais foram quantificadas por ELISA sanduíche de acordo com o protocolo especificado no kit do fabricante (BD Science). Para tal, as placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-IL-10, anti- IL-6, 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 (*Phosphate Buffered Saline*) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e os sítios inespecíficos foram preenchidos com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de soro fetal bovino)

por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBS-T e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas quanto as diferentes concentrações de citocinas IL-10, IL-6, TNF- α e MCP-1 para a realização das curvas de calibração. As placas foram novamente incubadas por 18 horas (*overnight*) a 4°C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas para retirar os antígenos que não se ligaram a anticorpo, além disso o anticorpo de detecção referente a cada citocina foi adicionado e em seguida incubado por uma hora.

Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e o complexo enzimático avidina-peroxidase (*avidin-HRP*) foi adicionado. As placas foram incubadas por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição de solução substrato cromógeno contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com a solução de parada (ácido fosfórico 1M) e a leitura realizada em leitor de placa (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

4.5.3 Estresse oxidativo - Teste TBARS

Para a análise do estresse oxidativo, foi realizado o teste TBARS, que analisa a quantidade de malondialdeído na amostra. Essa substância é formada por meio de peroxidação lipídica quando ocorre a liberação de espécies reativas de oxigênio (Remigante et al., 2022). Sendo assim, a quantidade de malondialdeído presente no plasma permite a mensuração indireta de estresse oxidativo no organismo. A reação com a substância é feita com o ácido tiobarbitúrico, e a posterior absorbância lida por meio do espectrofotômetro (Neto et al., 2008).

O protocolo foi realizado conforme previamente padronizado (Carvalho, 2021). Inicialmente as amostras e o branco foram mantidos a 37°C por 1 hora. Após isso, foram adicionados 400 microlitros de ácido perclórico (concentração 7%) e homogeneizadas em vórtex. Após, os tubos foram colocados na centrífuga em 14.000 rpm a 4°C durante 20 minutos.

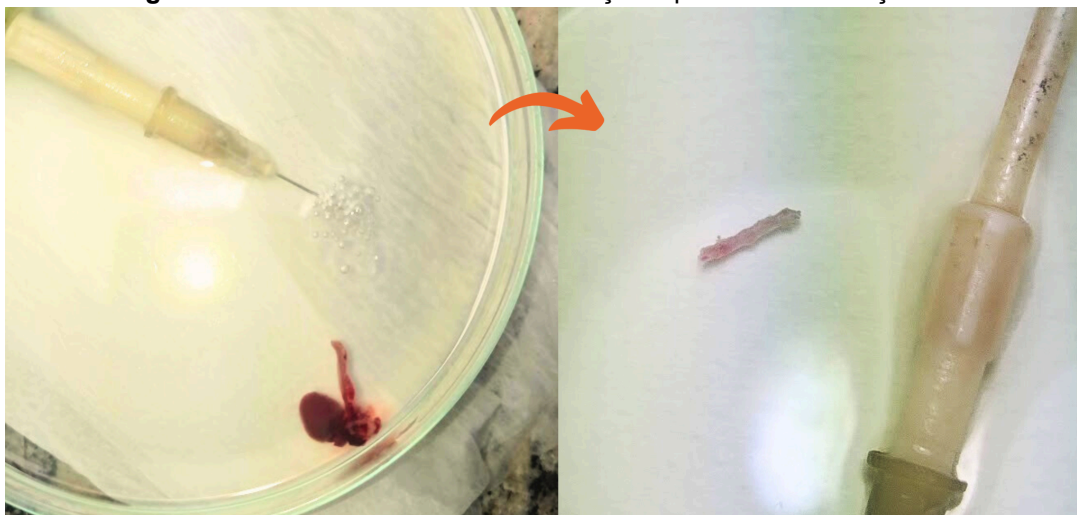
Após a centrifugação, foram coletados 450 microlitros do sobrenadante e transferidos para outros microtubos identificados e então adicionados 400 microlitros do ácido tiobarbitúrico (na concentração 6%) e homogeneizados em vórtex por 10 segundos aproximadamente. Em seguida, os microtubos foram incubados na

temperatura de 100°C durante 1 hora e em seguida realizada a leitura no espectrofotômetro manual no comprimento de onda de 530 nm (Drawell - DU 8200).

4.5.4 Reatividade Vascular

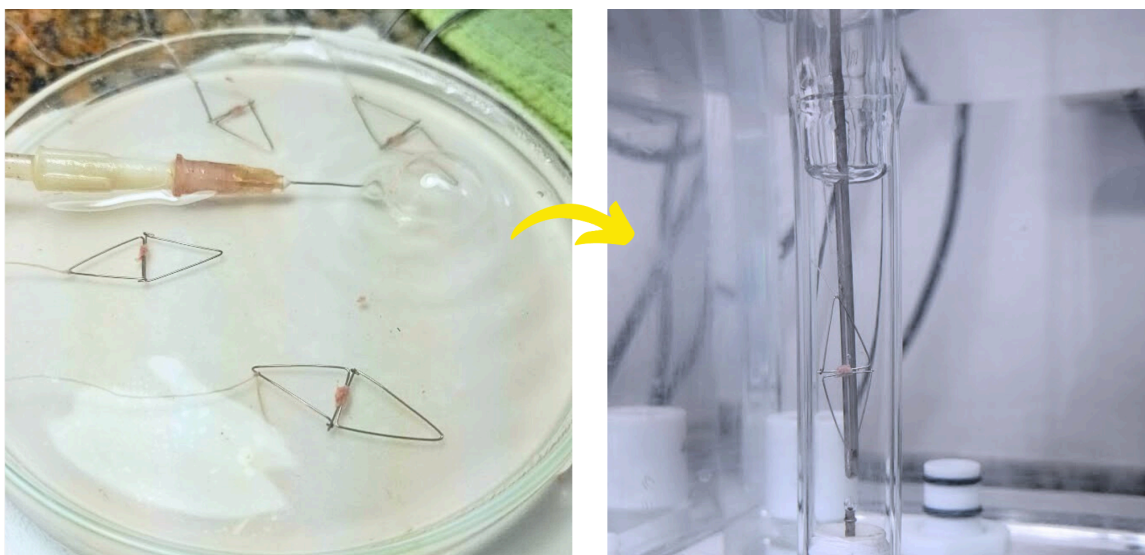
Os camundongos foram eutanasiados por meio da administração de anestésico em doses letais. Após isso foi feita uma toracotomia para obtenção da artéria aorta, que foi transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritiva, a saber solução de Krebs (em mM: 115 NaCl; 4,7 KCl; 1,2 MgSO₄; 1,2 KH₂PO₄; 25 NaHCO₃; 11,1 glucose; 2,5 CaCl₂), gaseificado com 95% de O₂ e 5% de CO₂, pH de 7,4 e 37°C, e então o vaso foi dissecado para retirar o máximo possível de tecido adiposo perivascular e após isso foi seccionado em anéis com comprimento de aproximadamente 3mm (Figura 19). Em seguida foram inseridas hastes de aço inoxidável em formato de triângulo atravessando o lúmen do vaso. Estas contendo os anéis aórticos foram colocadas em cubas contendo 10 ml da solução de Krebs e mistura carbogênica, mantidos à 37°C no banho-maria (Figura 20). As hastes foram fixadas na extremidade inferior e, na extremidade superior, conectadas a um transdutor de força (76-00xx series, Panlab,S.L. Harvard Apparatus Spain) (Figura 21). O transdutor estava conectado a um computador utilizando o sistema de aquisição de dados Lab Chart - PowerLab (software versão 4.2, ADInstruments, Massachusetts, EUA). Os anéis foram submetidos a uma tensão basal de 0,5 gramas e deixados estabilizando durante 60 minutos. A solução nutritiva foi trocada a cada 15 minutos durante esse período.

Figura 19: Retirada da aorta com o coração e posterior dissecação



Fonte: A autora (2023)

Figura 20: Anéis de aorta nas hastes e na cuba



Fonte: A autora (2023)

Figura 21: Banho de órgãos utilizado no experimento

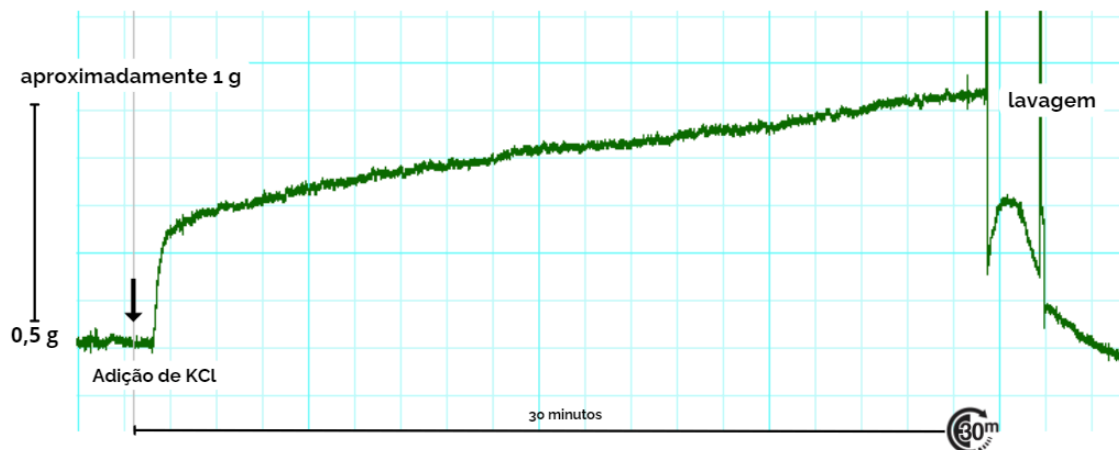


Fonte: A autora (2024)

4.5.5 Avaliação de viabilidade vascular e teste do endotélio

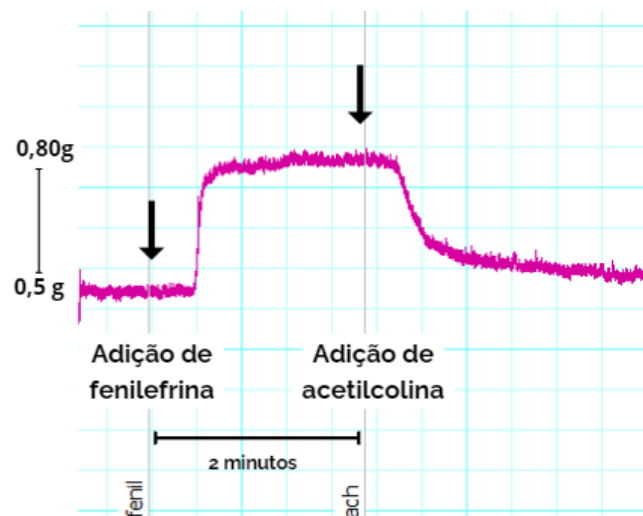
A viabilidade dos vasos foi verificada pela avaliação do desenvolvimento de força em resposta à adição de KCl (125 mM), após a formação do platô, devendo a contração ser superior a pelo menos o dobro do valor basal (Figura 22). A viabilidade foi confirmada através da contração dos anéis com fenilefrina (10 μ M), devendo ser maior que 50% da contração máxima induzida pelo KCl. Posteriormente, para avaliação da integridade do endotélio, foi adicionada acetilcolina (10 μ M) e a vasodilatação gerada deveria ser superior a 50% da contração máxima de fenilefrina para que fosse constatada a presença de endotélio funcional (Balarini, 2013) (Figura 23).

Figura 22: Viabilidade vascular por meio da adição de KCl



Fonte: Retirado de experimento real. Adaptado de LabChart Reader (2023)

Figura 23: Teste do endotélio a partir da adição de fenilefrina e acetilcolina



Fonte: Retirado de experimento real. Adaptado de LabChart Reader (2023)

4.5.6 Construção das curvas concentração-resposta

Após a constatação da presença ou ausência de endotélio, houve um segundo período de estabilização de 30 minutos e então se iniciou a construção das curvas concentração-resposta cumulativas. Foram realizadas curvas de contração com fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-5} M) e curvas de relaxamento com acetilcolina (10^{-10} a 3×10^{-5} M) em anéis com endotélio intacto ou com nitroprussiato de sódio, um doador de NO (10^{-12} a 3×10^{-5} M) em anéis sem endotélio funcional. Nas curvas de relaxamento, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M).

4.5.7 Uso de inibidores

Para entender como o nutracêutico atua na função vascular, foram incubadas algumas drogas, a saber, N(ω)-nitro-L-arginina metil-ester (L-NAME), um inibidor da enzima NO sintase e apocinina, inibidora da NADPH oxidase.

Com o uso do L-NAME foram elaborados dois tipos de protocolo, o primeiro visando avaliar a cascata de produção de NO independente da ativação por ACh, ou seja de forma basal/endógena. Para isso foi feita pré contração com fenilefrina (10 μ M), aguardou-se o platô e administrou-se 10 μ L do L-NAME (concentração de 100 μ M) por 20 minutos, após isso a tensão do vaso aumentou e o resultado foi calculado a partir do delta de contração após a inibição.

O segundo protocolo com L-NAME objetivou avaliar a participação do NO no relaxamento pela acetilcolina. Para isso incubou-se 10 μ L do L-NAME (concentração de 100 μ M) durante 20 minutos. Em seguida foi realizada pré contração com fenilefrina (10 μ M) e construiu-se uma curva de relaxamento com acetilcolina (10^{-10} a 3×10^{-5} M).

Por fim, o uso da apocinina permite avaliar o papel do estresse oxidativo no relaxamento vascular dependente de endotélio, tendo em vista que essa droga inibe a NADPH oxidase, enzima geradora de EROS. Os anéis foram inicialmente incubados com apocinina no volume de 30 μ L (concentração de 300 μ M), em seguida, foi realizada pré contração com fenilefrina (10 μ M), aguardou-se o platô e após isso foi construída uma curva de acetilcolina (10^{-10} a 3×10^{-5} M).

4.6 AVALIAÇÃO DE DEPOSIÇÃO DE PLACA ATEROSCLERÓTICA - OIL RED

Após a retirada da aorta para o banho de órgãos e a sua disposição nas cubas, o arco aórtico outrora imergido na solução nutritiva foi limpo, retirando-se o tecido adiposo perivascular e colocado em um recipiente contendo formaldeído a 10% para a fixação do tecido até o momento do processamento histológico. A aorta foi acondicionada no meio *Optimal Cutting Temperature* (OCT) para proceder o corte. O corte histológico foi feito por meio do congelamento e inclusão no micrótomo criostato com 7-10 μm de espessura (CM1850, Leica, Nussloch, Alemanha). Os cortes iniciaram a partir da raiz da aorta, e foram aderidos a 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 nos cortes após a coloração com Oil-Red-O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Esse corante é específico para lipídios deixando a área aterosclerótica da aorta corada em vermelho (Chen; Qin; Simons, 2022). Após retirada do OCT com Krebs e isopropanol 60%, as lâminas foram mantidas em contato com a solução de corante por 20 minutos. Após isso, para retirar o excesso do corante, lavou-se as lâminas com isopropanol 60% e água destilada. A lesão aterosclerótica foi quantificada utilizando-se um microscópio (AmScope T720), acoplado a uma câmera digital (MC 500, RoHS) e a análise das imagens foi realizada com o sistema de análise MicroCapture (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.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise dos dados após os experimentos foi feita por meio do programa GraphPad Prism 6.0®. Foi realizado o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e caso houvesse distribuição normal, análise de variância para comparação dos grupos, seguido de o post-hoc de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como diferença estatisticamente significativa.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 PERFIL LIPÍDICO, GLICÊMICO E PESO CORPORAL

A tabela 1 mostra os resultados referentes ao perfil lipídico, glicêmico, peso corporal e consumo de ração dos três grupos.

Tabela 1: Perfil lipídico, glicêmico, peso corporal e consumo de ração dos grupos controle, apoE^{-/-} salina e apoE^{-/-} tratado

Parâmetro	Grupo controle C57 (8-14 animais)	apoE ^{-/-} salina (10-14 animais)	apoE ^{-/-} Life (7-12 animais)
Perfil Bioquímico			
Colesterol total (mg/dL)	73,2±6,5	978,1±68***	579,5±46*** ##
Triglicerídeo (mg/dL)	84,1±6,4	211±16,2***	145,9±18,8***##
Glicose (mg/dL)	212,7±12,6	300±12,5***	249±16,2#
HDL (mg/dL)	41,8±2,2	17,1±2,2***	15,86±3,1**
LDL (mg/dL)	5,9±0,7	159,6±21,7***	132,4±14,3**
VLDL (mg/dL)	28±3,7	776,6±46,8**	503±62###**
Peso e Ingestão			
Peso inicial (g)	21,8±0,4	19,8±0,5	20±0,6
Peso final (g)	28±0,3	28,8±0,5	27,9±0,7
Ganho de peso (%)	32,09±3,9	44±6,7	47,6±5
Consumo de ração (g)	260±6,4	182,5±6,2**	205,2±6,2**

Valores representados como média ± erro padrão da média (EPM)

* p<0,05 vs. C57

** p<0,01 vs. C57

*** p<0,001 vs. C57

p < 0,05 vs. apoE^{-/-} salina

p<0,001 vs. apoE^{-/-} salina

O perfil lipídico dos animais difere de maneira expressiva, de modo que os camundongos apoE^{-/-} que receberam dieta aterogênica e veículo apresentaram uma concentração plasmática de colesterol total cerca de 13 vezes a mais quando comparado com os animais controle. O tratamento com o nutracêutico em camundongos apoE^{-/-} submetidos a dieta aterogênica possibilitou a redução deste

parâmetro em aproximadamente 1,7 vezes. A concentração de triglicerídeos também aumentou nos animais apoE^{-/-} veículo, cerca de 2,4 vezes, reduzindo aproximadamente 1,5 após o tratamento.

Ao observar a glicemia há uma diferença significativa entre os animais controle e apoE^{-/-} veículo e de modo que a concentração plasmática de glicose aumentou em 1,3 vezes nesses. O nutracêutico reduziu significativamente a glicemia nos animais apoE^{-/-} tratados, de forma que não há diferença entre estes e os animais controle. O colesterol na forma de HDL é maior nos animais saudáveis, enquanto que os animais apoE^{-/-} salina exibem baixa concentração de HDL no sangue. O tratamento, por sua vez, não alterou significativamente esse parâmetro. Por outro lado, o padrão é invertido quando trata-se do LDL pois os animais C57 exibem menores concentrações dele, já o grupo apoE^{-/-} salina aumentou em 30 vezes a concentração plasmática e o tratamento com LifePro não reduziu significativamente esse colesterol. Acerca da lipoproteína VLDL, algo interessante é notado, os animais apoE^{-/-} salina exibem maior concentração quando comparados aos controles saudáveis e o tratamento reduziu o VLDL em 1,5 vezes.

Além disso, o consumo de ração é maior nos animais controle C57 que receberam dieta padrão. O ganho de peso relacionando o peso inicial e final foi igual nos três grupos. A administração do nutracêutico não interferiu no consumo e ganho de peso dos camundongos.

5.2 REATIVIDADE VASCULAR

5.2.1 Resposta a Fenilefrina e Acetilcolina

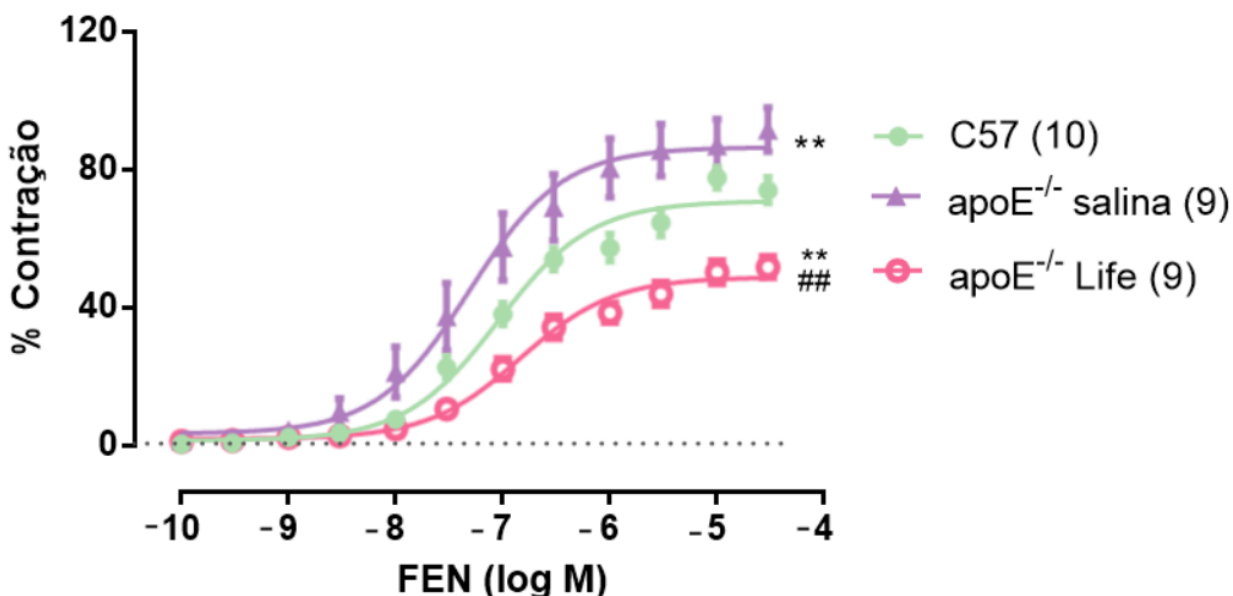
Foi avaliada a função vascular por meio da contração desencadeada por doses cumulativas de fenilefrina (FEN) e relaxamento por doses de acetilcolina (ACH). Os resultados de ambos estão expressos dos gráficos 1 e 2. Avalia-se a partir desses dados a resposta máxima à FEN ou ACH (R_{máx}), bem como o logaritmo negativo da concentração de FEN ou ACH necessária para atingir 50% da R_{máx}, o pEC₅₀, o qual é usado para estimar a sensibilidade do vaso frente a uma droga vasoativa.

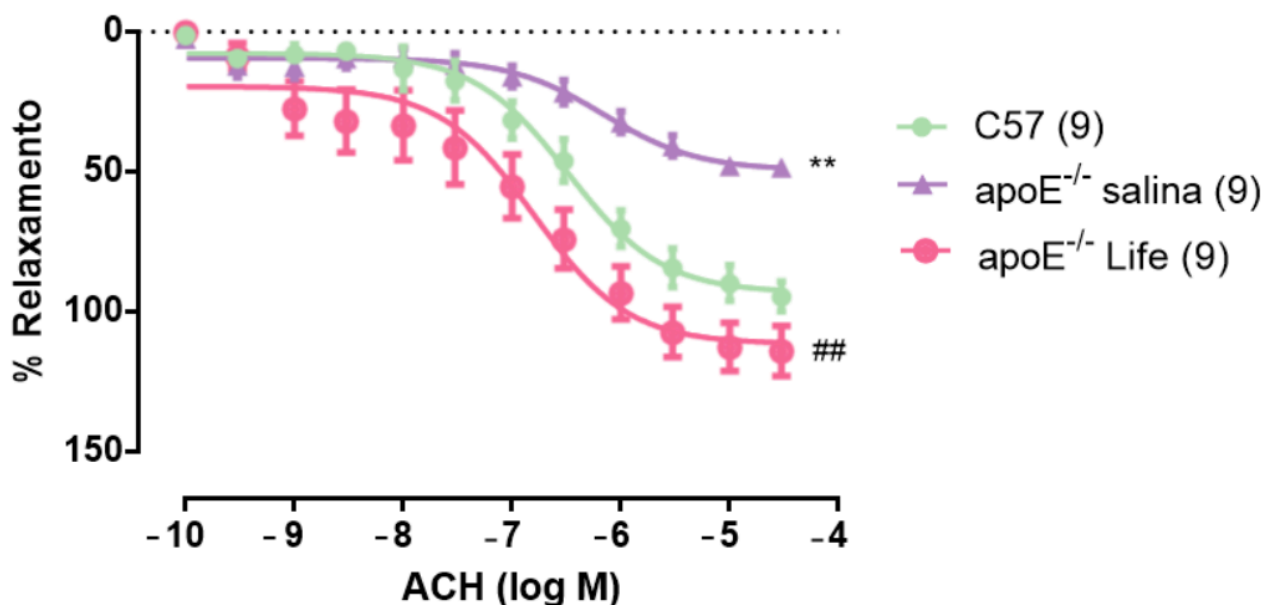
Percebe-se que os animais apoE^{-/-} possuem maior resposta máxima à FEN (R_{máx}: 88,2±7%^{***}) na última dose quando comparados aos animais controle (R_{máx} C57: 70,3±3%). Em relação a sensibilidade à FEN não houve diferença

significativa entre esses dois grupos (pEC_{50} C57: $7,0 \pm 0,08$; pEC_{50} apoE^{-/-} $7,2 \pm 0,19$). Já nos camundongos apoE^{-/-} tratados com o nutracêutico, observa-se contração máxima reduzida ($R_{máx}$: $50,7 \pm 3\%^{***}$) quando comparado ao grupo apoE^{-/-} veículo, diferindo-se ainda estatisticamente dos camundongos controle veículo C57BL/6. A sensibilidade do vaso nesse grupo (pEC_{50} $6,7 \pm 0,08\#$) apresentou diferença estatística em relação ao grupo apoE^{-/-} veículo, mas não em relação aos demais.

Quando se analisa a porcentagem de relaxamento entre os animais C57 controle ($R_{máx}$: $89,8 \pm 5\%$; pEC_{50} : $6,4 \pm 0,09$) e apoE^{-/-} veículo percebe-se que os animais nocaute veículo relaxam menos, porém sem diferença em relação a sensibilidade ($R_{máx}$: $48,5 \pm 3\%^{**}$; pEC_{50} : $6,4 \pm 0,18$). Ao observar então o relaxamento nos animais apoE^{-/-} que receberam o tratamento com LifePro, a melhora da reatividade vascular no quesito de dilatação do vaso é notada, de modo que estes animais relaxam cerca 2 vezes a mais do que os animais nocaute que receberam veículo. ($R_{máx}$: $107 \pm 12\%^{##}$; pEC_{50} : $6,7 \pm 0,22$). Não há diferença entre esse grupo e o controle saudável C57. Em relação à sensibilidade do vaso, avaliado pelo EC50 não foi observado diferença significativa entre grupos.

Gráficos 1 e 2: Resposta cumulativa às doses de FEN e ACH em todos os grupos





Valores representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM)

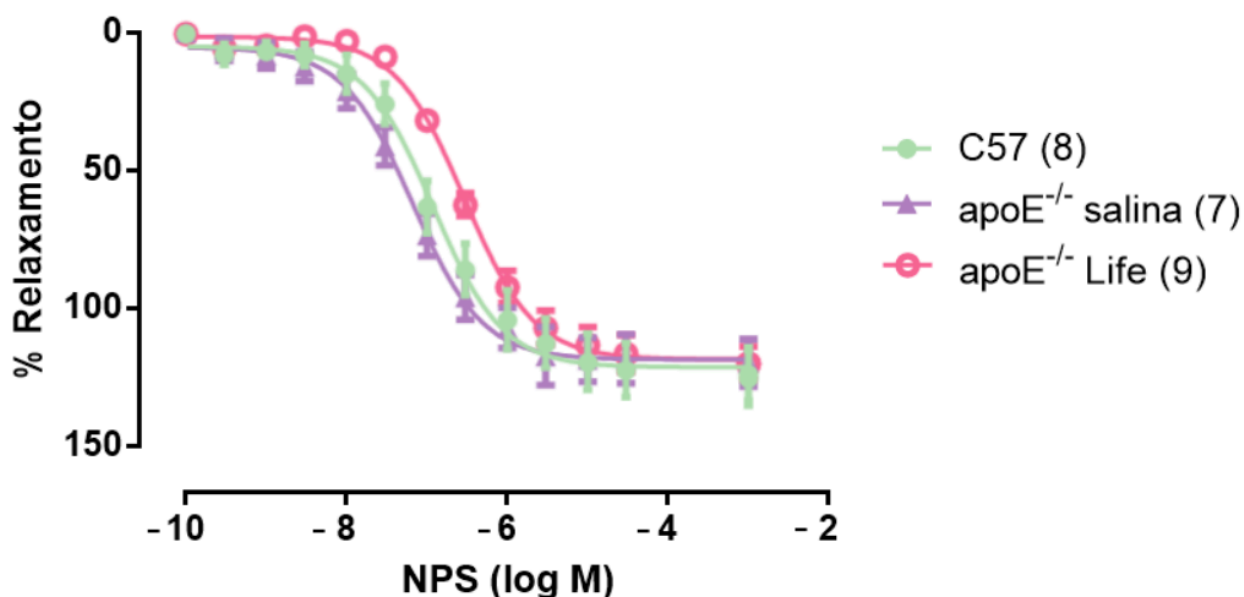
** $p < 0,01$ vs. C57

$p < 0,05$ vs. apoE^{-/-} salina

$p < 0,001$ vs. apoE^{-/-} salina

5.2.3. Resposta vascular ao Nitroprussiato de Sódio

Para investigar a resposta do músculo liso ao NO no relaxamento, foram construídas curvas de relaxamento em vasos sem endotélio com doses cumulativas de nitroprussiato de sódio (NPS). O resultado está exposto no gráfico 3. Não há diferença entre as respostas máximas dos grupos C57 veículo (R_{máx}: 125 $\pm$ 10%), apoE^{-/-} salina (R_{máx}: 119,1 $\pm$ 8,4%) e apoE^{-/-} Life (R_{máx} 120 $\pm$ 6%). A sensibilidade é menor no grupo apoE^{-/-} tratado (pEC₅₀: 6,5 $\pm$ 0,04##) quando comparado com os dois outros grupos. Em relação ao grupo apoE^{-/-} salina (pEC₅₀: 7,2 $\pm$ 0,18#) e C57 veículo (pEC₅₀: 6,9 $\pm$ 0,13) não há diferença entre ambos.

Gráfico 3: Resposta cumulativa às doses de NPS em todos os grupos

Valores representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM)

$p < 0,01$ vs. apoE^{-/-} salina

* $p < 0,05$ vs. C57

5.3.2 Papel do NO no relaxamento vascular dependente de endotélio

Sendo o NO o principal vasodilatador presente em vasos de condutância, buscou-se investigar o seu papel no tratamento com LifePro na aterosclerose. Para isso, os anéis aórticos foram incubados com L-NAME, um inibidor não seletivo da NO sintase e realizada contração com FEN e em seguida construída uma curva de relaxamento frente à ACH. Os resultados estão expostos no gráfico 4 (A,B,C).

Percebe-se portanto, a partir da redução drástica do relaxamento nos anéis incubados com o inibidor de NO sintase que o NO é, de fato, uma molécula importante no relaxamento em vasos como a artéria aorta, sendo isso identificado em todos os grupos. Porém, a amplitude da importância difere em relação aos grupos, como pode-se verificar na diferença da área abaixo da curva com e sem inibidor. O aumento da diferença da área abaixo da curva demonstra a importância do NO no relaxamento, pois significa que houve intensa supressão da vasodilatação quando retirou-se o NO do meio. Esse padrão é observado em todos os grupos mas

a magnitude do deslocamento entre as curvas foi diferente. A participação do NO no relaxamento vascular está reduzido no grupo apoE^{-/-} salina sendo percebido através da redução da diferença da área ($94,77 \pm 16,19^*$ vs. C57 veículo $173 \pm 16,84$). A administração de LifePro nos animais apoE^{-/-} resultou na retomada do papel do NO no relaxamento em resposta à ACH ($168 \pm 8,5^\#$ vs. apoE^{-/-} veículo).

Gráfico 4: Curvas de relaxamento com acetilcolina mediante inibição do L-NAME

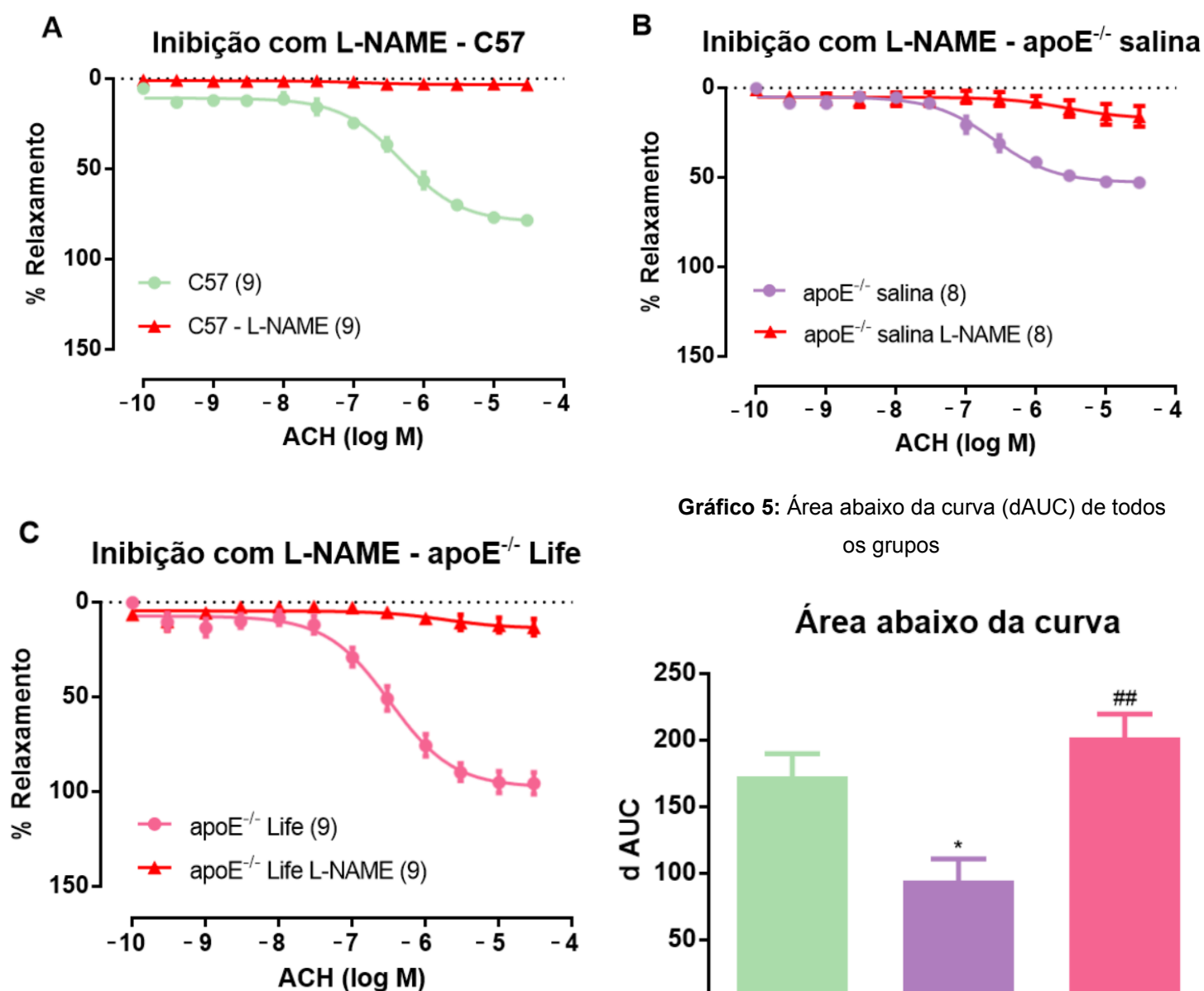
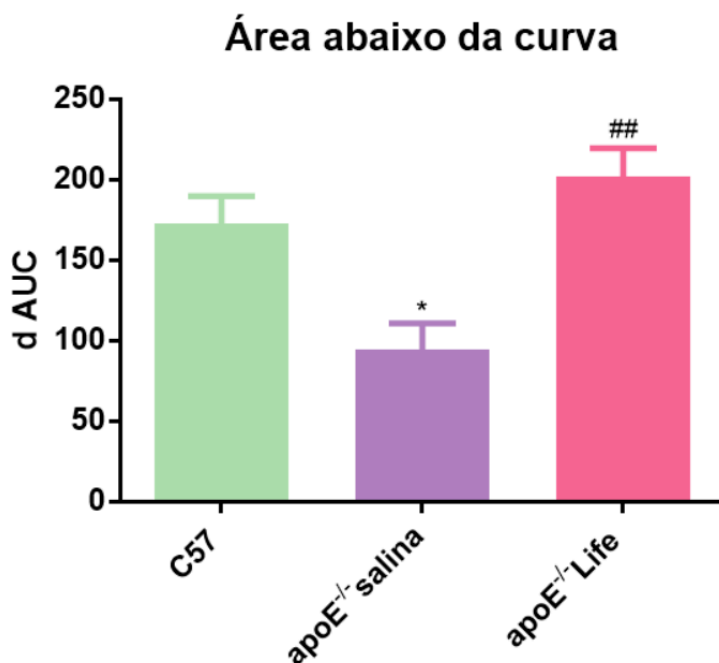


Gráfico 5: Área abaixo da curva (dAUC) de todos os grupos



Valores representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM)

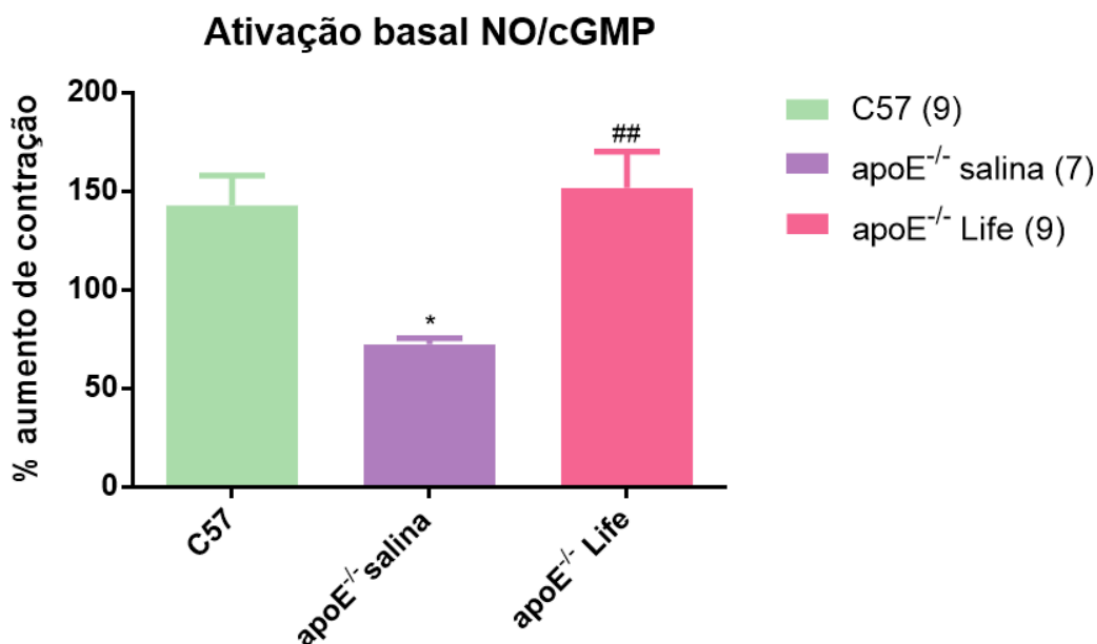
* p<0,05 vs. C57

p<0,01 vs. apoE^{-/-} salina

5.2.3 Ativação basal NO/cGMP

Corroborando com o resultado anterior, ainda para investigar a mecânica do tratamento com LifePro no banho de órgãos, decidimos averiguar a biodisponibilidade do NO no vaso através de outro protocolo com L-NAME. Inicialmente foi realizada uma contração com FEN e em seguida incubou-se no o L-NAME aguardando a inibição por 20 minutos. A porcentagem de contração após esse tempo corresponde a ativação basal do NO sem o estímulo gerado pela ACH. Os resultados podem ser vistos no gráfico 6. O grupo apoE^{-/-} salina apresenta uma redução da biodisponibilidade do NO ($72,59 \pm 3\%^*$) quando comparamos com o grupo C57 veículo ($143 \pm 15\%$). Por outro lado, o tratamento com o nutracêutico aumentou a ativação basal do NO ($164,3 \pm 26,28\%\#\#$).

Gráfico 6: Ativação basal NO/ cGMP



Valores representados como média ± erro padrão da média (EPM)

* p<0,05 vs. C57

p<0,01 vs. apoE^{-/-} salina

5.2.4 Papel do estresse oxidativo (ânion superóxido) no relaxamento vascular

Para investigar o quanto o estresse oxidativo, mais especificamente o ânion superóxido impacta no relaxamento frente a acetilcolina, ou seja, na função endotelial, incubamos os anéis com apocinina, que reduz o estresse oxidativo ao inibir a NADPH oxidase, responsável pela produção de ânion superóxido. Os

resultados podem ser vistos no gráfico 7 (A,B,C). O relaxamento é melhorado após a incubação com apocinina, porém a magnitude do impacto é diferente de acordo com o grupo. A partir da análise da área abaixo da curva (gráfico 8) percebemos que o grupo apoE^{-/-} salina apresenta notável discrepância entre a curva com e sem inibidor, isso implica na maior diferença da AUC comparando com o grupo controle saudável (245,3±28** vs. C57 veículo 90,94±24,16). No entanto, essa diferença foi reduzida no grupo tratado (103±25## vs. apoE^{-/-} salina) sugerindo redução do estresse oxidativo.

Gráfico 7: Curvas de relaxamento com acetilcolina mediante inibição da Apocinina

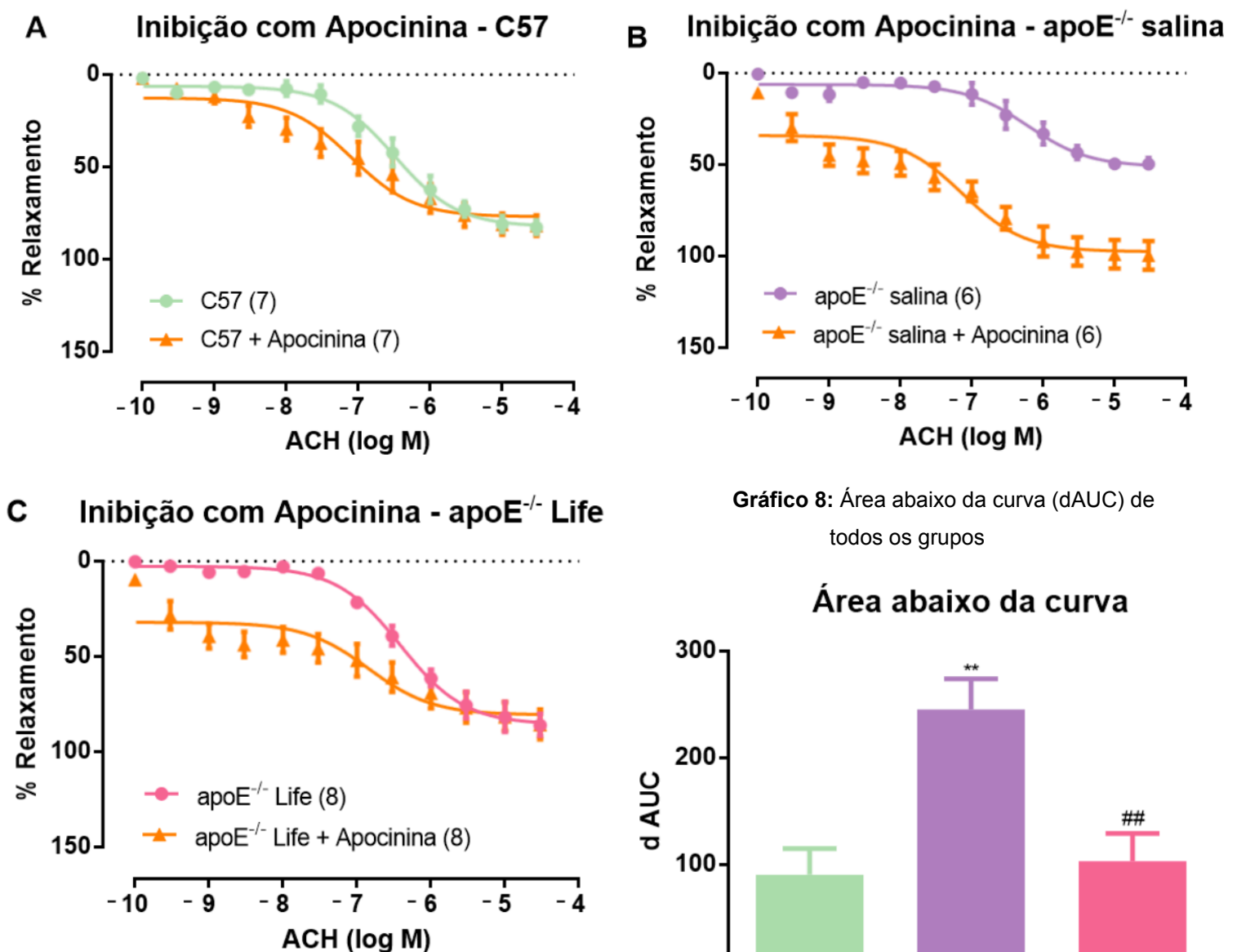
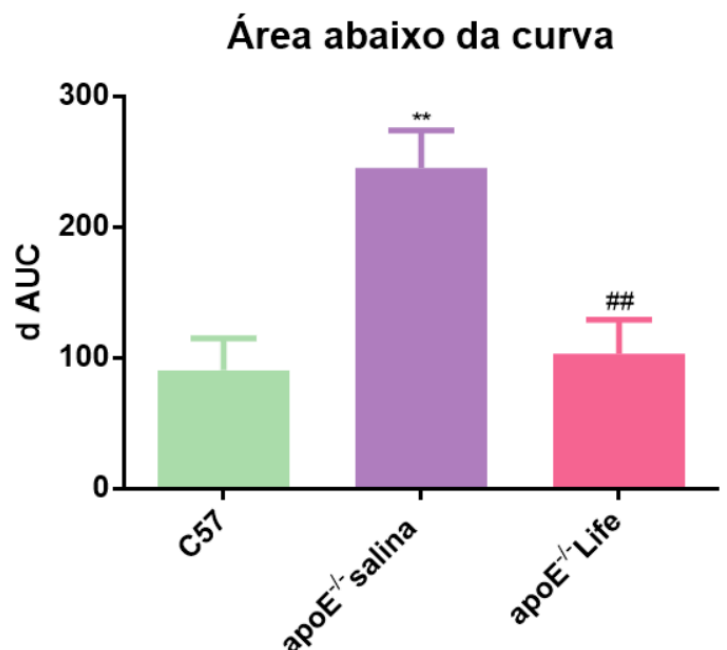


Gráfico 8: Área abaixo da curva (dAUC) de todos os grupos

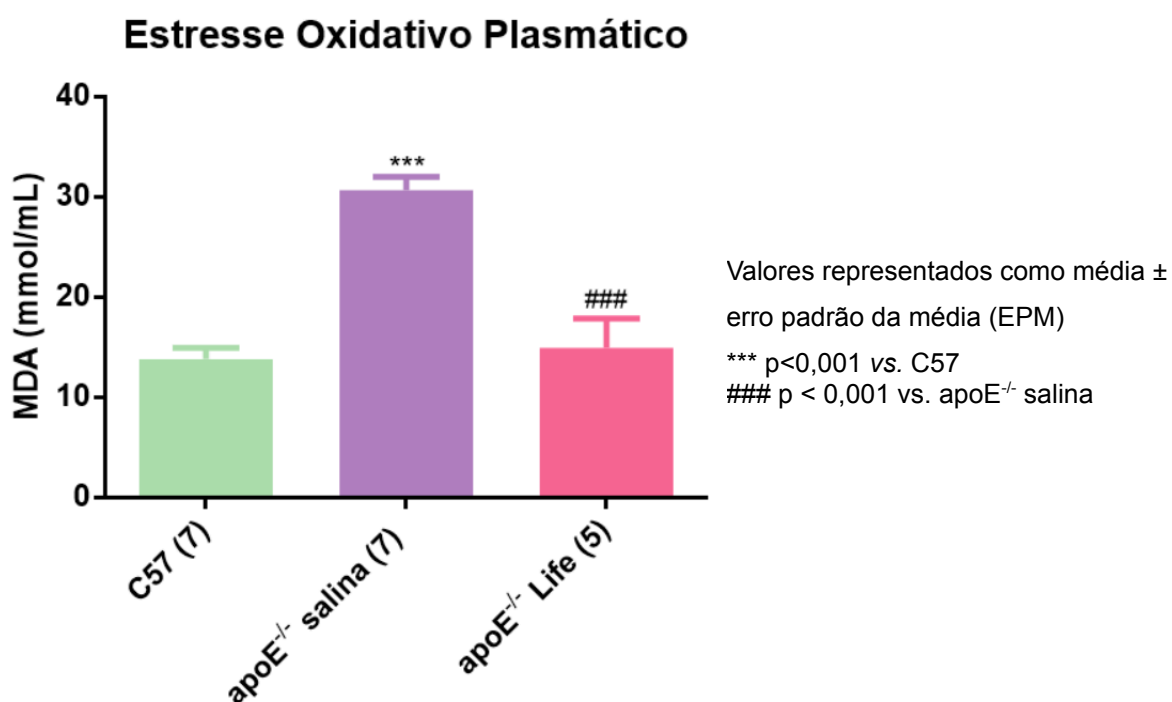


Valores representados como média ± erro padrão da média (EPM): ** p<0,01 vs. C57; ## p < 0,01 vs. apoE^{-/-} salina

5.3 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO VIA PEROXIDAÇÃO – TESTE TBARS

O protocolo utilizado foi o TBARS que mensura o malondialdeído, produto da peroxidação lipídica, ocasionada pelo estresse oxidativo. Os resultados estão expressos no gráfico 9. O grupo apoE^{-/-} apresenta altas concentrações (em mmol/mL) de MDA no plasma ($30,67 \pm 1,3^{***}$), quando comparamos com o grupo C57 veículo que apresenta aproximadamente menos de metade das concentrações de MDA ($13,86 \pm 1$). Por outro lado, o tratamento com LifePro em animais apoE^{-/-} ($14,85 \pm 2,9^{###}$) reduziu aproximadamente em 2 vezes o estresse oxidativo.

Gráfico 9: Valores de MDA no plasma

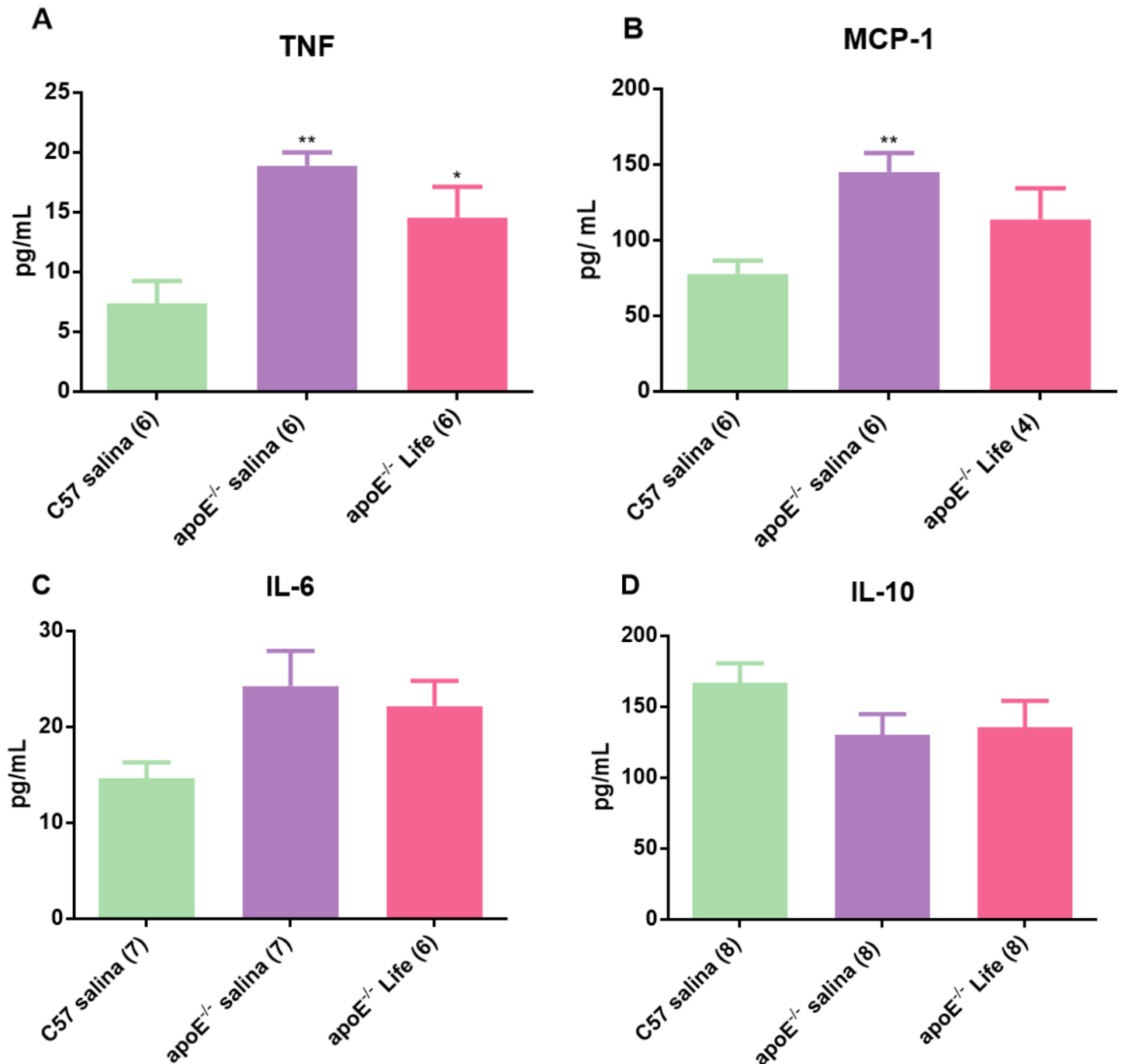


5.4 ANÁLISE DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS NO PLASMA

A fim de averiguar o perfil inflamatório na aterosclerose e o papel do tratamento nesse contexto, mediu-se citocinas inflamatórias (TNF, MCP-1 e IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) no plasma, utilizando kits de Elisa da BD Science. Os resultados estão expostos no gráfico 10 (A,B,C,D) em pg/mL. Percebe-se que os animais apoE^{-/-} salina apresentam aumento de TNF ($18,91 \pm 1,1^{**}$ vs. $7,3 \pm 1,8$) e MCP-1 ($145,2 \pm 12,6^{**}$ vs. $77,9 \pm 8$) no plasma quando comparado ao C57 veículo. O tratamento com LifePro não alterou o perfil plasmático dessas citocinas (TNF:

14,57±2; MCP-1: 114±20). Por outro lado, a citocina IL-6 não apresentou diferença entre os grupos C57 veículo (14,6±1,6), apoE^{-/-} salina (24,2±3) e apoE^{-/-} tratado (22,1±2), o mesmo ocorreu com a IL-10 (C57 veículo: 167±13; apoE^{-/-} salina: 130±14; apoE^{-/-} tratado 135±18).

Gráfico 10: Análise de citocinas pró e anti-inflamatórias



Valores representados como média ± erro padrão da média (EPM)

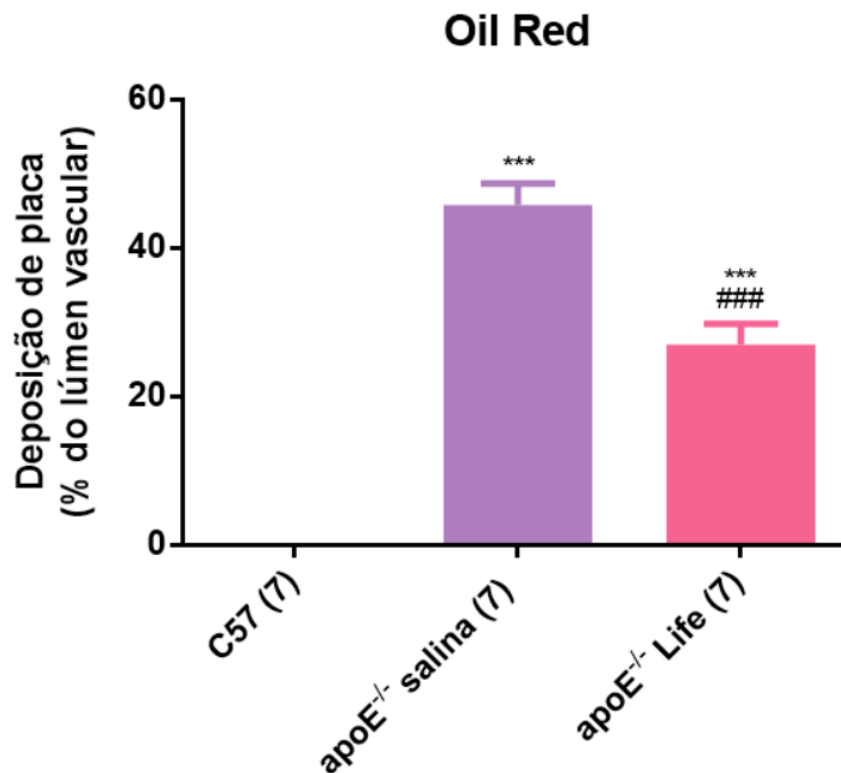
*p<0,05 vs. C57

**p<0,01 vs. C57

5.5. DEPOSIÇÃO DE PLACA ATEROSCLERÓTICA - OIL RED

Tendo em vista a melhora funcional do vaso através da reatividade vascular, investigamos a deposição de placa aterosclerótica na saída da artéria aorta, corando os cortes com Oil Red, substância específica para corar lipídios. Pode-se ver imagens correspondentes na figura 24, bem como a quantificação da deposição no gráfico 11. O grupo apoE^{-/-} salina apresenta intenso acúmulo de placa ateromatosa, comprometendo cerca de 45% do lúmen vascular ($45,8 \pm 2,9\%^{**}$), enquanto que o grupo controle saudável não apresenta placa. O tratamento com LifePro no grupo apoE^{-/-} reduziu em 1,6 vezes a deposição ($27 \pm 2,7\%^{***\#\#}$).

Gráfico 11: Quantificação de placa aterosclerótica na artéria aorta



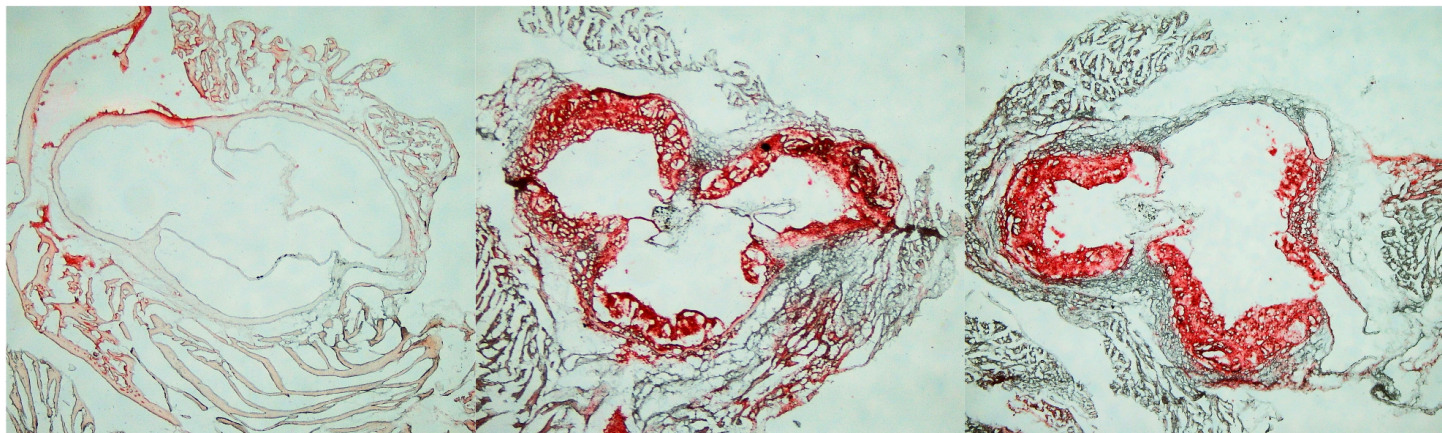
Valores representados como média ± erro padrão da média (EPM)

*** p < 0,001 vs. C57

p < 0,001 vs. apoE^{-/-} salina

Figura 24: Cortes histológicos da artéria aorta corados com Oil Red

C57

apoE^{-/-} salinaapoE^{-/-} Life

Em vermelho: placa aterosclerótica corada com Oil Red. Aproximadamente 10-15 cortes por animal. Aumento de 40x.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que a administração do nutracêutico por gavagem diária durante 8 semanas nos animais apoE^{-/-} culminou em uma melhora do perfil lipídico, da glicemia, da reatividade vascular, menor produção de MDA (um marcador de estresse oxidativo) e redução da deposição de placa aterosclerótica, porém sem alterações no perfil inflamatório. Demonstramos pela primeira vez a ação dos três componentes do nutracêutico quando administrados em conjunto em um modelo de aterosclerose experimental.

A escolha de utilizar os animais nocaute para apolipoproteína E nesse estudo se deu devido ao interesse em estudar a ação do nutracêutico em um modelo de aterosclerose em camundongos, pois estudos anteriores demonstraram efeitos hipocolesterolemiantes em ratos submetidos a dieta *high fat* tratados com essa mesma formulação probiótica (Freire et al., 2021a), bem como redução da placa aterosclerótica em camundongos apoE^{-/-} tratados com quercetina (Cao et al., 2019) e resveratrol (Zhou et al., 2020). Os animais apoE^{-/-}, devido a ausência da apolipoproteína E, possuem aumento de colesterol plasmático que, por sua vez, é um fator gatilho para a aterogênese. Somado a isso, foi fornecida uma dieta hiperlipídica com o intuito de acelerar a formação da placa de ateroma e disfunção endotelial nesses animais apoE^{-/-}. Sabe-se que nesses animais a placa pode ser desenvolvida apenas pela deleção da apoE que gera o acúmulo do colesterol plasmático (Maeda, 2011), porém isso demanda tempo. Esperar o processo natural de desenvolvimento da placa impossibilitaria o manejo eficaz e rápido desse modelo em laboratório. É visto, portanto, em estudos antes e após o surgimento do modelo apoE^{-/-} da década de 80 que a utilização de dieta rica em colesterol, de fato, possibilita a formação de placa em pouco tempo (Roberts; Thompson, 1976; Paigen et al., 1985), viabilizando os estudos com propostas de tratamento.

A introdução da dieta foi feita com 8 semanas de vida dos animais e durou 10 semanas ao todo, isso corrobora com pesquisas semelhantes, onde se percebe que a exposição em torno de 10-12 semanas a uma dieta aterogênica é capaz de aumentar colesterol plasmático, perfil inflamatório, formar placa ateromatosa e prejudicar a contração e relaxamento de artérias (Balarini, 2013; Leite, 2019; Fan, Chen, Zhang, 2019; Chan et al., 2016).

Por outro lado, o grupo C57BL/6, foi escolhido por não ter alteração genética que comprometa o metabolismo lipídico, vascular e inflamatório, sendo comumente utilizado como controle saudável. E nesse caso, os animais apoE^{-/-} foram desenvolvidos geneticamente a partir dos C57, sendo estes portanto o background genético dos animais nocaute (Plump et al., 1992; Piedrahita et al., 1992). O desenho experimental portanto foi elaborado para três grupos, o controle saudável C57BL/6, controle apoE^{-/-} que recebeu veículo e apoE^{-/-} que recebeu o tratamento. Nesse caso, o grupo controle saudável recebeu dieta padrão para roedores. Ademais, nos animais não tratados com o nutracêutico (C57BL/6 e apoE^{-/-}) as gavagens foram realizadas com salina 0,9% com o objetivo de permitir que todos os animais passassem pela mesma situação de estresse, nesse caso, a gavagem, eliminando portanto qualquer viés relacionado ao tratamento.

A apolipoproteína E faz parte dos quilomícrons remanescentes, VLDL, LDL e HDL e a ausência dessa apolipoproteína somada a uma dieta hiperlipídica culmina no aumento plasmático do colesterol. Conforme esperado, isso foi encontrado em nossos resultados com os animais apoE^{-/-} veículo. Nesses animais houve aumento de aproximadamente 13 vezes quando comparados com o grupo controle saudável. Esse dado corrobora outros estudos semelhantes que utilizaram esse mesmo modelo animal com o uso de dieta aterogênica (Balarini, 2013; Leite, 2019; Cavalcanti, 2024; Berenji Ardestani et al., 2020; Plump et al., 1992; Cao et al., 2020).

O tratamento com o nutracêutico em camundongos apoE^{-/-} resultou em redução significativa do colesterol plasmático em 1,7 vezes. Esses achados corroboram com estudos prévios em diferentes modelos realizados com este probiótico (Ferreira, 2022) e compostos fenólicos utilizados nesta pesquisa (Cui et al., 2017; Simental-Mendía; Guerrero-Romero, 2019).

A explicação por trás do efeito hipocolesterolemizante do LifePro pode residir no fato das bactérias do gênero *Lactobacillus* presentes na formulação nutracêutica se ligarem ao colesterol no intestino facilitando a sua excreção (Freire, 2021a). Esse gênero possui ativa a hidrolase de sais biliares, ou seja, promove a desconjugação dos sais biliares no ciclo entero-hepático tornando-os menos solúveis e difíceis de serem absorvidos pelos enterócitos, sendo assim, seu destino final é ser excretado pelas fezes. Devido ao fato do colesterol ser o

principal componente que forma os sais biliares, sua concentração plasmática é reduzida por causa de seu uso na formação de novos ácidos biliares para emulsificação de lipídios (Kumar et al., 2012).

Já foi descrito que a disbiose pode contriuir para a aterosclerose, uma vez que a desregulação e ausência de certos grupos bacterianos potencialmente inflamatórios pode gerar compostos relacionados à aterogênese como o N-óxido de trimetilamina (TMAO) (He; Chen, 2017; Wang et al., 2015). O tratamento com nutracêutico, por sua vez, teve o intuito de favorecer o aumento da quantidade de bactérias da espécie *Limosilactobacillus fermentum*. Estudo prévio com esse gênero demonstrou que a administração dessas cepas por gavagem é capaz de aumentar a sua população na microbiota intestinal de murinos (Sampaio, 2022). O *Limosilactobacillus fermentum* é um dos principais componentes do ambiente microbiano saudável que tem função anti-inflamatória e anti-aterogênica, produzindo a partir de substratos da dieta os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como os ácidos acético, propiônico e butírico. Essas moléculas regulam a síntese hepática de colesterol, a integridade da membrana do enterócito, servem como fonte de energia para as células epiteliais intestinais e estão relacionadas a supressão da aterosclerose. Já foi descrito que a redução de seus níveis, como é visto na disbiose, pode ser um fator que favorece dislipidemia e por consequência a aterosclerose (Luqman et al., 2024). Um estudo utilizando animais apoE^{-/-} suplementados com ácido butírico (um tipo de AGCC) resultou no retardo da migração de macrófagos e melhor estabilidade da placa aterosclerótica (Aguilar et al., 2014). Sendo assim, a relação do aumento populacional da *L. fermentum* e sua produção de AGCC (sendo estes reguladores lipídicos), pode ser um fator importante na resposta hipocolesterolêmica observada.

A quercetina e o resveratrol, por sua vez, também contribuem para a redução do colesterol plasmático. Um estudo feito com ratos Wistar suplementados com quercetina demonstrou que a enzima 7 alfa hidroxilase hepática estava aumentada. Sua função é converter o colesterol em 7-alfa-hidroxicolesterol para compor os ácidos biliares e ser excretado, reduzindo portanto sua concentração plasmática, além de aumentar o efluxo de colesterol pela maior estimulação da via do transportador de cassete de ligação G1, o que também foi notado em estudo com camundongos apoE^{-/-} (Jia et al., 2019; Zhang et al., 2023; Zhang. et al., 2016). O resveratrol, em consonância, reduz o colesterol

plasmático devido a *downregulation* da enzima HMG-CoA redutase (Shao et al., 2016), a qual é responsável por participar da síntese do colesterol e alvo terapêutico dos fármacos estatinas, como a sinvastatina. Um estudo com camundongos apoE^{-/-} demonstrou menor acúmulo intestinal de ácidos graxos e monoglicerídeos (Deng et al., 2020). Além disso, assim como a quercetina, aumenta os níveis da 7 alfa hidroxilase e os receptores de LDL no fígado (Yashiro et al., 2012) aumentando a excreção e captação do colesterol hepático, respectivamente (Santana et al., 2022).

Em resumo, com base em nossos achados e na literatura sugerimos que os efeitos do LifePro na redução dos níveis de colesterol plasmático poderiam ser explicados pelo aumento dos AGCC na microbiota intestinal, maior expressão de enzimas e receptores envolvidos no metabolismo lipídico e excreção do colesterol como 7 alfa hidroxilase e receptor de LDL ambos no fígado. Além disso, reduz a ação da HMG-CoA redutase, que sintetiza o colesterol no fígado.

O tratamento com nutracêutico reduziu os níveis de triglicerídeos plasmáticos. Esse resultado condiz com a maioria da literatura científica acerca dos probióticos, quercetina e resveratrol, no qual afirmam que esses compostos atuam separadamente reduzindo o perfil sérico de triglicerídeos em diversos modelos experimentais, incluindo apoE^{-/-} (Derakhshanian et al., 2020; Kuipers et al., 2018; Kábelová et al., 2022). Uma pesquisa feita com as mesmas cepas que utilizamos nessa pesquisa demonstrou redução dos níveis séricos de triglicerídeos em ratos com dieta *high fat* (Freire et al., 2021). Uma revisão de meta análise também corrobora com esse dado, ao mostrar que mais da maioria dos estudos elencados apresentaram redução de TG em diversos modelos experimentais após a administração de cepas probióticas (Gadelha; Bezerra, 2019). No modelo apoE^{-/-} o tratamento durante 6 semanas com *L. fermentum* TY-S11 reduziu eficazmente os triglicerídeos (Deng et al., 2024), enquanto que o tratamento com *L. rhamnosus* GR-1 durante 10 semanas não alterou esse parâmetro (Fang et al., 2019), destacando que a característica da cepa é importante para o efeito redutor. A sugestão de mecanismo reside no fato de bactérias *Lactobacillus* específicas com capacidade hidrolisante podem inibir a lipase lipoproteica, impedindo a hidrólise de triglicerídeos e sua absorção (Momin et al., 2023). Em relação aos compostos fenólicos, um estudo que administrou quercetina com diferentes doses em camundongos obesos sugere a redução de triglicerídeos a partir de melhor

depuração dos ácidos graxos pelo tecido adiposo branco (Kuipers et al., 2018). Outro estudo com esse mesmo composto em ratos observou melhora significativa em relação aos TG, mas não no colesterol e lipoproteínas plasmáticas (Kábelová et al., 2022). O mesmo foi observado no tratamento de camundongos apoE^{-/-} durante 12 semanas (Li et al., 2019). Acerca do resveratrol, uma revisão de meta análise em 2020 identificou alguns estudos que não demonstraram redução de triglicerídeos após o tratamento em humanos com síndrome metabólica (Akbari et al., 2020). Em camundongos apoE^{-/-} o resveratrol durante 20 semanas reduziu os níveis de triglicerídeos de maneira semelhante a sinvastatina (Zhou et al., 2020). A sugestão é que a melhora se dá devido ao aumento da síntese e efluxo dos sais biliares, estímulo de lipólise e supressão da diferenciação de adipócitos (Gal et al., 2021).

Ainda no contexto lipídico, os animais apoE^{-/-} desenvolveram um perfil característico da aterosclerose, ou seja aumento dos níveis de LDL e redução de HDL, enquanto que os animais controles saudáveis exibem um padrão natural dos murinos com altos níveis de HDL e LDL baixo, sendo um fator protetivo contra aterosclerose (Pendse et al., 2009). Outros estudos com esse modelo mostraram resultados semelhantes (Cavalcanti, 2024; Huang et al., 2014; Chen et al., 2013; Yi et al., 2020). O tratamento com LifePro não mostrou alteração nesse perfil. Há diferentes achados na literatura sobre esse resultado: enquanto o tratamento com *L. acidophilus* durante 16 semanas em camundongos apoE^{-/-} alterou os níveis de LDL, VLDL e IDL, mas não HDL (Huang et al., 2014), a mesma cepa durante 12 semanas no mesmo modelo não provocou alteração (Chen et al., 2013). Estudos que mostram alteração do perfil lipídico com cepas probióticas são mais comum em outros modelos patológicos. Por exemplo, o tratamento durante 4 semanas com as mesmas cepas usadas nessa pesquisa em ratos saudáveis alimentados com dieta *high fat* melhorou os níveis de HDL e reduziu LDL (Freire et al., 2021). O mesmo pode-se observar no tratamento durante 8 semanas com *L. fermentum* CQPC04 em camundongos C57BL/6J submetidos a dieta *high fat*, porém sem mudanças no HDL (Yi et al., 2020). Em contrapartida, a administração de *L. plantarum* ATCC 14917 (10⁹ UFC/mg) em camundongos apoE^{-/-} por 12 semanas não modificou nenhum parâmetro lipídico, incluindo colesterol total (Hassan et al., 2020). Um recente estudo investigou a absorção de colesterol de 60 cepas *in vitro*.

Apenas 3 exibiram resposta acima de 40% (*L. fermentum* TY-S11, *L. fermentum* C4 e R48). O tratamento *in vivo* (12 semanas) de animais apoE^{-/-} com essas três cepas, apenas uma (*L. fermentum* TY-S11) modificou as lipoproteínas plasmáticas, exceto HDL (Deng et al., 2024).

Sobre os demais componentes dessa formulação nutracêutica, a literatura apresenta diferentes resultados do tratamento com quercetina no perfil lipídico de camundongos apoE^{-/-}. Dois estudos com a dose de 4mg/dia durante 12 e 8 semanas mostraram alteração dos níveis de LDL, porém não HDL (Luo; Tian; Lu, 2020; Li et al., 2019). Uma revisão sistemática sobre os efeitos da quercetina no sistema cardiovascular trouxe 30 estudos com roedores e desses, apenas 2 utilizaram o modelo apoE^{-/-}: um demonstrando não haver alteração no perfil lipoproteico e o outro foi citado acima (Luo; Tian; Lu, 2020). Nos demais modelos, observa-se uma predominância de modificação nos parâmetros, mas existem estudos que não revelam mudança (Espírito-Santo et al., 2023). Em relação ao resveratrol, o estudo de Zhou et al. (2020) em camundongos apoE^{-/-} tratados com 5mg/dia demonstrou melhora do perfil lipoproteico apenas a partir da 20^a semana e não da 10^a. Por outro lado, uma meta análise em pacientes com síndrome metabólica demonstrou que o tratamento com resveratrol modificou o colesterol sérico, mas não as frações de lipoproteínas (Akbari et al., 2020).

Sendo assim, resume-se que nossos achados com ausência de alteração no perfil lipoproteico está em concordância com o que se observa na literatura neste modelo, pois parece que os efeitos dos três componentes do LifePro tem relação com a duração do tratamento, modelo animal e no caso dos probióticos, características específicas das cepas.

O dado do VLDL é interessante pois possivelmente explica de onde originou-se a redução do colesterol total, tendo em vista a não modificação do HDL e LDL. Além disso, corrobora com os dados dos triglicerídeos, pois esse lipídio colabora em grande parte na formação do VLDL (Choi; Ginsberg, 2011), ou seja, a redução dos triglicerídeos com o tratamento corroborou com a atenuação de formação do VLDL e isso contribuiu com a menor quantidade de colesterol total dos animais apoE^{-/-} tratado. O mesmo foi encontrado num estudo com administração de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 em camundongos apoE^{-/-} durante 16 semanas. O colesterol total apresentou redução, bem como VLDL, mas não observou-se alteração no HDL. Não foi mensurado triglicerídeos (Huang et al.,

2014). Em relação ao resveratrol, é encontrado dado semelhante, onde tanto na 10^a quanto na 20^a semana de tratamento em camundongos apoE^{-/-} observa-se uma redução do colesterol total, VLDL, mas não do LDL, e do HDL apenas na 20^a semana (Zhou et al., 2020). Já a quercetina é conhecida por reduzir os níveis de triglicerídeos aumentando a formação do VLDL e em seguida realizando lipofagia, o que acaba atenuando ambos os níveis. De todo modo, as demais lipoproteínas foram melhoradas após o tratamento durante 8 semanas em ratos (Zhu et al., 2018).

Acerca dos níveis de glicose, pode-se inferir a partir dos resultados que o nutracêutico possui ação anti hiperglicemiante reduzindo a glicemia em 1,25 vezes nos animais tratados quando comparada com animais apoE^{-/-} veículo (sem diferença estatística entre o grupo tratado e o grupo controle saudável). Esse resultado corrobora com estudos semelhantes realizados em murinos (Wang et al., 2020). Por exemplo, a pesquisa de Freire (2021a) com essa mesma formulação probiótica em ratos Wistar com e sem o consumo de dieta *high fat* demonstrou que houve uma redução em 1,36 vezes da glicemia nos ratos tratados por 4 semanas. Outro estudo com *L. rhamnosus* GR-1 durante 12 semanas em animais apoE^{-/-} reduziu glicose plasmática em 1,23 vezes (Fang et al., 2019). O efeito anti hiperglicemiante pode ser explicado pela melhora da ação da insulina causada por bactérias probióticas, uma vez que a produção de AGCC pode estimular a liberação de insulina pelas células beta pancreáticas (Zhang, Mei et al., 2024), como também o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e peptídeo yy, os quais possuem efeitos anti obesogênicos e antidiabéticos (Sicard et al., 2017). A administração de quercetina durante 20 semanas em camundongos suplementados com dieta *high fat* melhorou a glicemia em jejum provavelmente pela redução inflamatória, bem como da acumulação de gordura (Su et al., 2022). Acerca do resveratrol, o tratamento durante 26 semanas com resveratrol em camundongos C57 alimentados com dieta *high fat* reduziu a glicemia de jejum, provavelmente pela ativação da via de sirtuína 1 (Wang et al., 2014).

O aumento sérico da glicose pode interferir na aterogênese, pois os carboidratos podem ser catabolizados na via glicolítica que ocorre no citosol e gera ATP e piruvato. Este pode ser convertido a acetil-CoA que por sua vez é fonte primária para a síntese dos lipídios. Sendo assim, há uma relação direta entre aumento da glicemia e aumento dos lipídios (Nelson; Cox, 2014). É importante

salientar que a coleta de amostra para as avaliações bioquímicas não foi feita com os animais em jejum e que os camundongos possuem glicose plasmática maior do que os humanos, sendo assim deve-se ajustar os valores comprobatórios para esses modelos. É sugerido que níveis plasmáticos de glicose sem jejum maiores que 250 mg/dL são aceitáveis para considerar um camundongo diabético (King, 2012), embora perceba-se que a indução de diabetes por outras estratégias como a injeção por estreptozotocina, que destrói as células beta pancreáticas, eleve esse nível para 600 mg/dL em jejum (Abuduyimiti et al., 2024). Dessa forma, a partir dos resultados do nosso estudo nota-se que os camundongos apoE^{-/-} veículo possuem hiperglicemia provavelmente associada a alteração no metabolismo lipídico decorrente do consumo hiperlipídico e o tratamento com nutracêutico reduziu a glicemia consideravelmente. Esses dados sugerem a necessidade de uma melhor investigação da ação nutracêutica dentro do metabolismo glicêmico, inclusive utilizando de um modelo exclusivo de diabetes.

Pode-se ainda fazer a correlação entre os níveis glicêmicos e o peso corporal dos animais, pois um dos modelos murinos para diabetes tipo II é justamente o uso de dietas hiperlipídicas e/ou hipercalóricas, nas quais a maior fonte energética metabólica advém da beta oxidação lipídica. Isso promove resistência à insulina e aumento glicêmico devido a baixa compensação pelas ilhotas pancreáticas (Kennard et al., 2021). Nossos resultados demonstram que o consumo de ração foi maior nos animais C57, em comparação com os grupos apoE^{-/-} salina e tratado. De maneira interessante, o ganho de peso se manteve em todos os animais. Ou seja, embora os animais apoE^{-/-} tenham consumido menos ração que o grupo controle saudável, o ganho de peso entre eles foi semelhante. E o tratamento com LifePro não alterou o padrão de consumo nem ganho de peso dos animais. Os mecanismos homeostáticos de consumo e saciedade são diversos e complexos. Do ponto de vista bioquímico, a ingestão de gordura e seu uso metabólico produz mais energia em termos de ATP do que carboidratos (Hargreaves; Spriet, 2020). Sendo assim, a regulação neuro-hormonal para promover a saciedade pode ter sido ativada nos animais apoE^{-/-} devido à maior ingestão calórica contida na dieta hiperlipídica, reduzindo assim o consumo nos animais expostos a esse tipo de dieta (Cai et al., 2023). Há divergência na literatura científica: enquanto estudos realizados com dietas *high fat* e dietas comuns atestam que existe uma maior ingestão calórica e quantitativa de gordura

levando a obesidade (Guerra-Cantera et al., 2023), outros corroboram com os nossos resultados mostrando a redução do consumo dietético devido a demanda metabólica num contexto de ingestão lipídica (Díaz-Urbina et al., 2017; Hurley et al., 2016), variando inclusive de acordo com a porcentagem de gordura na dieta (Cai et al., 2023).

Em relação à reatividade vascular, a literatura aponta que os animais apoE^{-/-} possuem marcante disfunção endotelial, sendo caracterizada pelo desequilíbrio entre agentes vasoconstritores e vasodilatadores, ocorrendo antes mesmo da formação de placa aterosclerótica e se agravando com a idade e deposição de placa em locais específicos (Kotlyarov et al., 2022). Consonante com estudos semelhantes, nossa pesquisa sugere que animais apoE^{-/-} possuem maior resposta vasoconstritora quando expostos à fenilefrina, em comparação com camundongos controle saudáveis (Marques et al., 2019; Leite, 2019; Matsumoto et al., 2006; Pereira et al., 2011). Por outro lado, outras pesquisas não demonstraram diferença entre a contração nesses grupos, sugerindo capacidade vascular preservada no início da aterosclerose, correlacionando a magnitude da alteração da reatividade com o nível de lesão presente no vaso (Buonfiglio et al., 2023; Crauwels, 2003; Berenji Ardestani et al., 2020).

O padrão vasoconstritor aumentado em animais hipercolesterolêmicos pode se dar devido a menor produção basal de NO, um potente vasodilatador. De fato, nossos resultados mostram a redução da produção de NO basal em animais apoE^{-/-} quando comparado com animais controle saudáveis, conforme previamente avaliado (Leite, 2019; Balarini, 2013; Cavalcanti, 2024). Fransen (2007) realizou reatividade vascular em segmentos de aorta torácica de camundongos apoE^{-/-} e C57BL/6, e o desfecho aponta que a modulação vasomotora dependente de endotélio nos animais é em grande parte determinada pelo óxido nítrico, em detrimento da prostaciclina ou EDHF, e o processo de aterogênese reduz a produção endógena de NO. Ademais, um estudo mostrou que os animais apoE^{-/-} apresentam maior expressão do vasoconstritor endotelina, corroborando para o aumento dessa resposta (Loke et al., 2010). Outro fator que deve-se levar em consideração é o estresse oxidativo exacerbado, de modo que as EROS comprometem a estrutura endotelial desencadeando inflamação e oxidação do LDL, possuindo relação direta com a disfunção endotelial (Batty; Bennett; Yu, 2022). A pesquisa de Matsumoto et al. (2006) comprova tal fato pois, após

tratamento com apocinina, os vasos de animais apoE^{-/-} apresentaram redução na resposta vasoconstritora, independente de alteração na expressão da NO sintase, sugerindo envolvimento de vias inflamatórias como as do ácido araquidônico que podem estar relacionados com fatores constritores do endotélio. Além disso, a síntese e liberação do EDHF pode sofrer modificação por meio das EROS, que estão em níveis aumentados na aterosclerose e por sua vez potencializam a vasoconstrição (Özkan; Uma, 2005; Peng et al., 2020).

Em relação ao relaxamento vascular, buscamos primeiramente observar o relaxamento dependente de endotélio em resposta à acetilcolina. Observamos que animais apoE^{-/-} possuem menor relaxamento vascular quando comparados com os controles saudáveis. O prejuízo no relaxamento à ACH está relacionado à menor participação do NO nessa resposta. Outros trabalhos envolvendo disfunção endotelial e hipercolesterolemia encontraram resultados semelhantes (Balarini, 2013; Leite, 2019; Buonfiglio et al., 2023; Berenji Ardestani et al., 2020; d'Uscio et al., 2001; Li et al., 2019; Seto et al., 2013; Marques et al., 2019; Ihm et al., 2021). A presença da disfunção endotelial está relacionada à redução da atividade da NO sintase endotelial, reduzindo a biodisponibilidade dessa molécula (d'Uscio et al., 2001; Meyrelles et al., 2011). Tendo em vista que o NO é o principal agente vasodilatador nos vasos de condutância, como a aorta, é esperado que haja prejuízo no relaxamento devido a alteração no metabolismo do NO nos animais com um perfil inflamatório e lipídico acentuado. Por exemplo, o LDL oxidado, por ser uma partícula inflamatória, afeta as células endoteliais diretamente e por meio da via da quinase associada ao Rho, reduzindo a expressão da NO sintase endotelial (Higashi, 2023).

Além da redução da biodisponibilidade do NO, em artérias condutoras com placas ateromatosas, as células musculares lisas podem exibir uma menor responsividade a esse agente vasodilatador a partir da redução da produção de GMPc (d'Uscio et al., 2001), embora não tenhamos observado diferença significativa na resposta ao NPS entre os animais apoE^{-/-} e seus controles. De fato, em artérias pulmonares de camundongos apoE *knockout* demonstrou-se maior sensibilidade das células musculares lisas ao NO, sugerindo então um mecanismo compensatório para sua baixa disponibilidade. Nesse mesmo estudo, as artérias mesentéricas dos animais apoE^{-/-} apresentaram menor relaxamento frente a acetilcolina, provavelmente devido ao alto estresse oxidativo (Berenji Ardestani et

al., 2020). O papel do NO também foi evidenciado na pesquisa de Liu (2023), que suplementou os animais apoE^{-/-} com nitrato orgânico, que funciona como substrato para a produção de NO, e observou melhora da função vascular e atenuação da aterosclerose.

Observamos maior estresse oxidativo nos animais apoE^{-/-} quando comparados aos respectivos controles. Essas observações foram confirmadas em dois protocolos diferentes: a construção de curvas de relaxamento à ACH incubadas previamente com apocinina e a quantificação de TBARS. As EROS também participam da disfunção endotelial tendo em vista que a conversão de L-arginina em NO pode liberar ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Também o próprio NO pode se juntar ao ânion superóxido molecular e formar o ONOO⁻ (peroxinitrito). O acúmulo de EROS em condições homeostáticas é minimizado devido à presença da maquinaria antioxidante celular, com as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, dentre outras (Félétou; Vanhoutte, 2006). Porém, em um contexto hipercolesterolêmico no qual os lipídios adentram a matriz subendotelial, a enzima NO sintase sofre desacoplamento, formando preferencialmente EROS ao invés do NO (Batty; Bennett; Yu, 2022). Em adição, estudos comprovam que na aterosclerose há menor expressão das enzimas antioxidantes, como a SOD, e maior expressão de NADPH oxidase, enzima oxidante que transfere elétrons para a formação do ânion superóxido (Yaghoubi et al., 2000; Sorescu et al., 2002). A administração de glutathione peroxidase, reduziu a área de lesão aterosclerótica e acúmulo de lipídios em animais apoE^{-/-} (Rosenblat et al., 2007). Isso corrobora com a pesquisa de Buonfiglio et al. (2023) que utilizou anéis aórticos de camundongos hipercolesterolêmicos, demonstrando que o relaxamento dependente de endotélio estava prejudicado e havia maior expressão de subtipos da NADPH oxidase, como NOX 1, 2 e 4, sugerindo a participação do estresse oxidativo no prejuízo da vasodilatação.

Em nosso estudo, o tratamento com nutracêutico reduziu consideravelmente a resposta vasoconstritora e melhorou o relaxamento vascular dependente de endotélio em animais apoE^{-/-}, provavelmente devido a redução do estresse oxidativo e consequentemente melhora da biodisponibilidade de NO. Esses efeitos podem ser decorrentes da ação independente e conjunta da quercetina, resveratrol e probióticos, destacando o gênero *Lactobacillus*, conforme

demonstram estudos anteriores (Li; Tian; Lu, 2023; Li et al., 2019; Zhai et al., 2022; Mahdavi-Roshan et al., 2022). Um estudo feito com Kefir, que contém diversas bactérias incluindo *Limosilactobacillus*, demonstrou a restauração da membrana endotelial da aorta torácica de ratos espontaneamente hipertensos, melhorando a disfunção endotelial nesse modelo, além de aumentar a disponibilidade de NO (Friques, 2015). O *L. fermentum* CECT5716 após ser administrado por duas semanas demonstrou reduzir a expressão da NOX2 e preveniu o desacoplamento da eNOS, minimizando os danos causados pelo estresse oxidativo, causando também melhor relaxamento frente a acetilcolina (Toral et al., 2018). Um interessante estudo propôs a melhora da função vascular de pacientes com doença arterial coronariana a partir da suplementação durante seis semanas de um *shot* contendo *Lactobacillus plantarum* 299v. Seus resultados demonstram que a disponibilidade de NO aumentou, como também o relaxamento mediado pela acetilcolina (Malik et al., 2018). Em relação aos compostos fenólicos tem-se que o consumo de vinho contendo alto teor de resveratrol na água de animais apoE^{-/-} resultou numa melhor liberação de NO, redução de EROS, e estímulo de vias angiogênicas (Lefèvre et al., 2007). Foi demonstrado que o resveratrol melhora o relaxamento vascular dependente de endotélio e aumenta a transcrição da eNOS (Li et al., 2019). A administração de polifenóis em camundongos apoE^{-/-} melhorou o relaxamento frente a acetilcolina, de maneira semelhante à losartana (Ihm et al., 2021). A pesquisa de Kukongviriyapan et al. (2012) está em consonância com esse achado, pois demonstrou que a administração de quercetina antes e depois da indução inflamatória com LPS aumentou o relaxamento tanto dependente quanto independente de endotélio em veia jugular de camundongos.

Dessa maneira, sugerimos que o nutracêutico LifePro melhora a função endotelial de camundongos apoE^{-/-} a partir da melhora da disponibilidade de NO associada à redução e impacto das espécies reativas de oxigênio.

Para comprovar a maior biodisponibilidade de NO na artéria aorta, incubamos no banho de órgãos o L-NAME, inibidor não seletivo da NO sintase. Percebeu-se que o relaxamento induzido pela acetilcolina tem como molécula relevante o NO, visto que na presença de L-NAME quase não houve relaxamento em resposta à ACH. A avaliação da magnitude do papel do NO na resposta vasodilatadora de cada grupo revelou que em animais apoE^{-/-} a participação do NO estava reduzida. Além disso, há nesses animais menor produção basal de NO (isto

é, sem o estímulo gerado pela ACH), destacando portanto a existência de disfunção endotelial. O trabalho de Seto et al. (2013) demonstrou a redução acentuada do relaxamento com acetilcolina em camundongos apoE^{-/-}, sugerindo a baixa atividade da enzima NO sintase e para ratificar o fato, o relaxamento foi inibido ao incubar L-NAME, mostrando assim a importância do NO para o relaxamento vascular nesse modelo.

O tratamento com o nutracêutico aumentou a produção basal do NO, bem como restaurou o papel relevante desse vasodilatador na resposta à ACH. Os mecanismos sugeridos para explicar esse resultado incluem a participação das cepas probióticas, quercetina e resveratrol em aumentar a disponibilidade de NO no meio. As cepas probióticas do gênero *Lactobacillus* produzem NO, e isso acontece principalmente pela via da nitrato redutase, no qual converte nitrato em nitrito e, por fim em NO, utilizando as enzimas nitrato e nitrito redutase, respectivamente. Essa via é mais presente nas cepas probióticas do que a via da NOS propriamente dita, como demonstrado por estudos anteriores (Maitreya et al., 2021; Gou; Liu; Qu, 2019), embora tenha sido detectado a participação ativa da NO sintase em *Lactobacillus plantarum* (Yarullina et al., 2006). Um estudo utilizando ratos tratados com *Lactobacillus rhamnosus* e/ou nitrato demonstrou maiores concentrações de NO no intestino delgado dos animais após a suplementação, demonstrando também que algumas espécies bacterianas como *E. coli* e *S. aureus* podem consumir o NO produzido pelo *Lactobacillus* (Sobko et al., 2006). Acerca dos compostos fenólicos, a quercetina é capaz de fosforilar a NO sintase e a ativa por meio da quinase dependente de AMP (Espírito-Santo et al., 2023). Um estudo com ratos diabéticos demonstrou que o tratamento com quercetina aumentou a quantidade de NO no jejuno (Martins-Perles et al., 2020). Em ratos hipertensos, a quercetina aumentou a atividade da eNOS, mas não alterou sua expressão (Sanchez et al., 2006). Isso corrobora com um estudo que incubou quercetina no banho de órgãos para observar o relaxamento dependente de endotélio em aortas torácicas de ratos, o resultado foi que o composto promoveu maior relaxamento a partir da produção rápida de NO (Abdullaev et al., 2018). O resveratrol regula os níveis de NO por três mecanismos principais: aumentando a atividade e expressão da NO sintase e impedindo seu desacoplamento. Os alvos moleculares diretos do resveratrol envolvem a sirtuína 1 que mediante a desacetilação em fatores de transcrição aumentam a expressão da eNOS e

reduzem seu desacoplamento, este último se deve a maior produção do BH4, importante no funcionamento do complexo enzimático (Xia; Förstermann; Li, 2014). O resveratrol também se liga a receptores de estrogênio regulando negativamente às caveolinas que tem por papel inibir a eNOS. Os alvos indiretos incluem a fosforilação de NOS e a produção de enzimas antioxidantes pela via Nrf2. A soma dessas ações aumenta a biodisponibilidade de NO pois sua produção será maior que a degradação por meio das EROS (DiNatale; Crowe-White, 2022). Um estudo em camundongos apoE^{-/-} demonstrou que o tratamento com resveratrol reverteu o desacoplamento da eNOS (Xia et al., 2010).

Acerca do relaxamento não dependente do endotélio, ou seja induzido pelo NPS, percebe-se que não há diferença entre os grupos, como demonstrado por estudos semelhantes (Buonfiglio et al., 2023, Seto et al., 2013; Dinh et al., 2017). A sensibilidade dos animais apoE^{-/-} veículo não difere do grupo controle saudável, porém o grupo apoE^{-/-} tratado apresenta menor sensibilidade comparado aos demais. O fato do grupo apoE^{-/-} salina exibir um perfil de relaxamento semelhante aos animais saudáveis pode ser explicado provavelmente por um mecanismo compensatório devido a distinta disfunção endotelial. Um estudo com camundongos apoE^{-/-} demonstrou maior ativação das vias COX-2/PGI₂ e EDHF de maneira precoce, antes mesmo do desenvolvimento da placa e progredindo a medida do acúmulo lipídico (Csányi et al., 2012). O mesmo foi visto numa pesquisa com artéria oftálmica de camundongos eNOS^{-/-}, destacando o papel do EDHF nessa compensação (Manicam et al., 2017).

Avaliamos o estresse oxidativo de duas formas: a partir da análise do MDA, produto da peroxidação lipídica, como também na incubação com o antioxidante apocinina no banho de órgãos e posterior curva de relaxamento à ACH. Acerca desse último, a literatura confirma que a apocinina atua como inibidor da NADPH oxidase, provavelmente impedindo a sua ativação e reduzindo a produção de EROS, e consequentemente aumentando a disponibilidade de NO (Mohammad; Babiker; Al-Bader, 2023). O que podemos perceber é que no grupo apoE^{-/-} salina a apocinina promoveu maior relaxamento vascular dependente de endotélio, sugerindo que esse grupo possui alto estresse oxidativo, o que poderia explicar o seu baixo desempenho na vasodilatação. Isso é confirmado a partir da comparação do delta das áreas abaixo da curva (isto é, comparação dos deslocamentos de cada curva). Os efeitos pró-vasorrelaxantes da apocinina

podem ser explicados a partir de estudos anteriores com reatividade aórtica. Já foi descrito que a inibição com L-NAME reduziu os efeitos da apocinina, ratificando o envolvimento endotelial para que seus efeitos sejam observados (Han et al., 2010). Além disso, outro mecanismo em potencial envolve a participação de canais de potássio dependentes de voltagem e canais de cálcio, tanto os dependentes de voltagem quanto os ativados por ligantes, reduzindo o influxo de cálcio e promovendo dilatação (Rizzetti et al., 2013). Embora alguns estudos relatem não haver relação entre a inibição da NADPH oxidase e o relaxamento, percebe-se que o modelo utilizado eram ratos saudáveis e hipertensos neonatais (Senejoux et al., 2012; Schluter et al., 2008). Por outro lado, estudos com camundongos apoE^{-/-} demonstraram efeitos semelhantes de incubação com apocinina reforçando a participação do estresse oxidativo no comprometimento do relaxamento nesse modelo (Balarini et al., 2013; Kong et al., 2015; Buday et al., 2010).

Em consonância com esse resultado, percebe-se o aumento do estresse oxidativo no modelo de aterosclerose a partir das maiores concentrações de MDA. O malondialdeído é objeto de investigação em diversos estudos com camundongos apoE^{-/-} que trouxeram resultados semelhantes (Hassan et al., 2020; Guo et al., 2020; Torikai et al., 2023). É uma medida do estresse oxidativo, que envolve a peroxidação de membrana lipídica, ocorrendo na presença de EROS resulta na formação do MDA e perda de funcionalidade local (Morales; Munné-Bosch, 2019). O tratamento com nutracêutico promoveu melhora no estresse oxidativo nos dois protocolos realizados nessa pesquisa, destacando o efeito antioxidante do nutracêutico. Os probióticos demonstraram efeitos antioxidantes em diversos modelos animais de doenças (Hoffmann; Kleniewska; Pawliczak, 2019; Ge et al., 2021; Akhgarjand et al., 2024). O gênero *Lactobacillus* parece ter uma propriedade antioxidante maior que os demais (Cechi et al., 2015). O mecanismo por trás desse efeito ainda não está esclarecido, mas pode-se citar o fato de algumas cepas, como por exemplo *L. fermentum* E-3 e E-18 expressarem a enzima antioxidante SOD (Kullisaar et al., 2002). Ela faz parte da família dismutases, no qual seu papel é dismutar o oxigênio estabilizando-o e impedindo a formação de peróxido de hidrogênio. A administração de *L. fermentum* MTCC: 5898 em ratos com dieta *high fat* promoveu maior expressão da SOD, catalase e glutathione peroxidase (Yadav et al., 2018). O mesmo foi visto no tratamento com *L. plantarum* ATCC 14917 (9 log UFC/mL - 12 semanas) em animais apoE^{-/-}.

aumentando a expressão da SOD 1 e 2 (Hassan et al., 2024). As bactérias probióticas podem sintetizar metabólitos com atividades antioxidante, como butirato e folato. O mesmo ocorre com a produção de exopolissacarídeos que atuam na eliminação de radicais livres, como o DPPH, superóxido e peróxido de hidrogênio (Feng; Wang, 2020). Um mecanismo não enzimático envolvido no efeitos dos probióticos é a quelação de íons metálicos, isso é importante pois os íons ferro e cobre interagem com moléculas gerando EROS (Lee et al., 2005). Algumas cepas probióticas atuam ativando a via Nrf2 que aumentam a transcrição de enzimas antioxidantes (Zhao et al., 2019). Relacionado especificamente à aterosclerose, probióticos podem reduzir a oxidação do LDL em camundongos apoE^{-/-}, fator gatilho para o desenvolvimento da placa na matriz subendotelial (Fang et al., 2019; Hassan et al., 2020.) Já os compostos fenólicos somam esses efeitos vistos anteriormente. A quercetina por exemplo, elimina radicais livres, quela íons metálicos e reduz a oxidação do LDL (Zhang et al., 2023). Um estudo também demonstrou o seu papel em inibir a NADPH oxidase e mieloperoxidase em camundongos apoE^{-/-} (Li; Tian; Lu., 2023). O mesmo resultado foi encontrado no tratamento com resveratrol nesse modelo, agora com as subunidade NOX 1 e 2, envolvendo a desacetilação dessa enzima (Xia et al., 2021).

Corroborando com esses resultados decidimos averiguar se o tratamento com LifePro afeta o perfil inflamatório dos animais apoE^{-/-}. A aterosclerose não é só uma doença meramente lipídica, o sistema imune inato e adaptativo está envolvido na patogênese, principalmente pelo desbalanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias secretadas por células imunológicas, como macrófagos, linfócitos e células NK (Kleemann; Zadelaar; Kooistra, 2008). O grupo apoE^{-/-} salina apresenta altos níveis de TNF e MCP-1 o que está de acordo com estudos anteriores, visto que essas citocinas medeiam o processo de formação da placa, presente em quase todos os estágios, isso foi visto a partir de pesquisas que identificaram a presença dessas moléculas na placa de ateroma (Tung et al., 2020; Hassan et al., 2020; Li et al., 2019; Zhou et al., 2020). Um estudo com camundongos apoE^{-/-} deficiente em TNF destacou a melhora em 50% no tamanho da lesão aterosclerótica (Brånén et al., 2004). Consoante a isso, a super exposição e desenvolvimento de MCP-1 em camundongos apoE^{-/-} gerou maior número de macrófagos e maior lesão aórtica (Aiello et al., 1999). Por outro lado, em relação as citocinas IL-6 (pró inflamatória) e IL-10 (anti-inflamatória) nossos resultados

demonstram não haver diferença entre os grupos, o que, de maneira geral não é encontrado na literatura científica. A IL-6 é uma citocina de caráter variável quanto a seu papel na aterosclerose (Kleemann; Zadelaar; Kooistra, 2008). Estudo aponta que a ausência de IL-6 melhora a deposição de gordura na aorta de animais apoE^{-/-} (Ridker; Rane, 2021) enquanto que outro destaca que a presença da IL-6 reflete melhora no acúmulo lipídico aórtico (Madan et al., 2008). Porém, de maneira global os estudos confirmam haver diferença entre camundongos saudáveis e animais *knockout* para apoE (Li et al., 2016; Fang et al., 2019; Chan et al., 2016). O mesmo pode ser observado acerca da IL-10. Por ser anti inflamatória, os estudos trazem redução do nível sérico nos animais apoE^{-/-} (Li et al., 2019; Pinderski Oslund et al., 1999). Uma pesquisa propôs administrar IL-10 por utilizando mRNA em macrófagos de camundongos apoE^{-/-}, e os resultados sugerem que houve menor deposição lipídica nos vasos e redução da inflamação (Bu et al., 2021). O tratamento com LifePro não alterou os níveis dessas citocinas. Na verdade, a maioria dos artigos com quercetina, resveratrol e probióticos em camundongos apoE^{-/-} apontam para a melhora do perfil inflamatório. Um estudo com *Lactobacillus rhamnosus* em camundongos apoE^{-/-} mostrou que o tratamento com a dose 7 log UFC/mL por 12 semanas não alterou os valores de citocinas inflamatórias, como TNF, MCP-1 e IL-6, porém o aumento da dose (8 log UFC/mL) reduziu estatisticamente essas moléculas (Fang et al., 2019). O mesmo foi visto no tratamento com *Lactobacillus acidophilus* durante 12 semanas em camundongos apoE^{-/-}. A maior dose em comparação com a menor (8 versus 7 log UFC/mL) promoveu aumento da IL-10 e redução do TNF (Chen et al., 2013). Embora administração das cepas utilizadas nessa pesquisa tenham demonstrado redução inflamatória em ratos saudáveis (90 dias - 9 log UFC/mL) (Cruz et al., 2023) e alimentados com dieta *high fat* (4 semanas - 9 log UFC/mL) (Freire et al., 2021), deve-se levar em consideração que o modelo apoE^{-/-} para aterosclerose possui alteração inflamatória marcante (pelo menos da TNF e MCP-1, como demonstrado nessa pesquisa), possuindo então duas variáveis importantes para produzir o efeito esperado: dose e tempo de tratamento. A dose está de acordo com o que foi visto dos estudos citados anteriormente, porém a duração do tratamento parece não ter sido suficiente para desencadear o resultado esperado. O mesmo padrão é visto com a maioria dos estudos com quercetina e resveratrol. Esses compostos em camundongos apoE^{-/-} demonstram redução em IL-1, TNF, IL-6, IL-18 e aumento

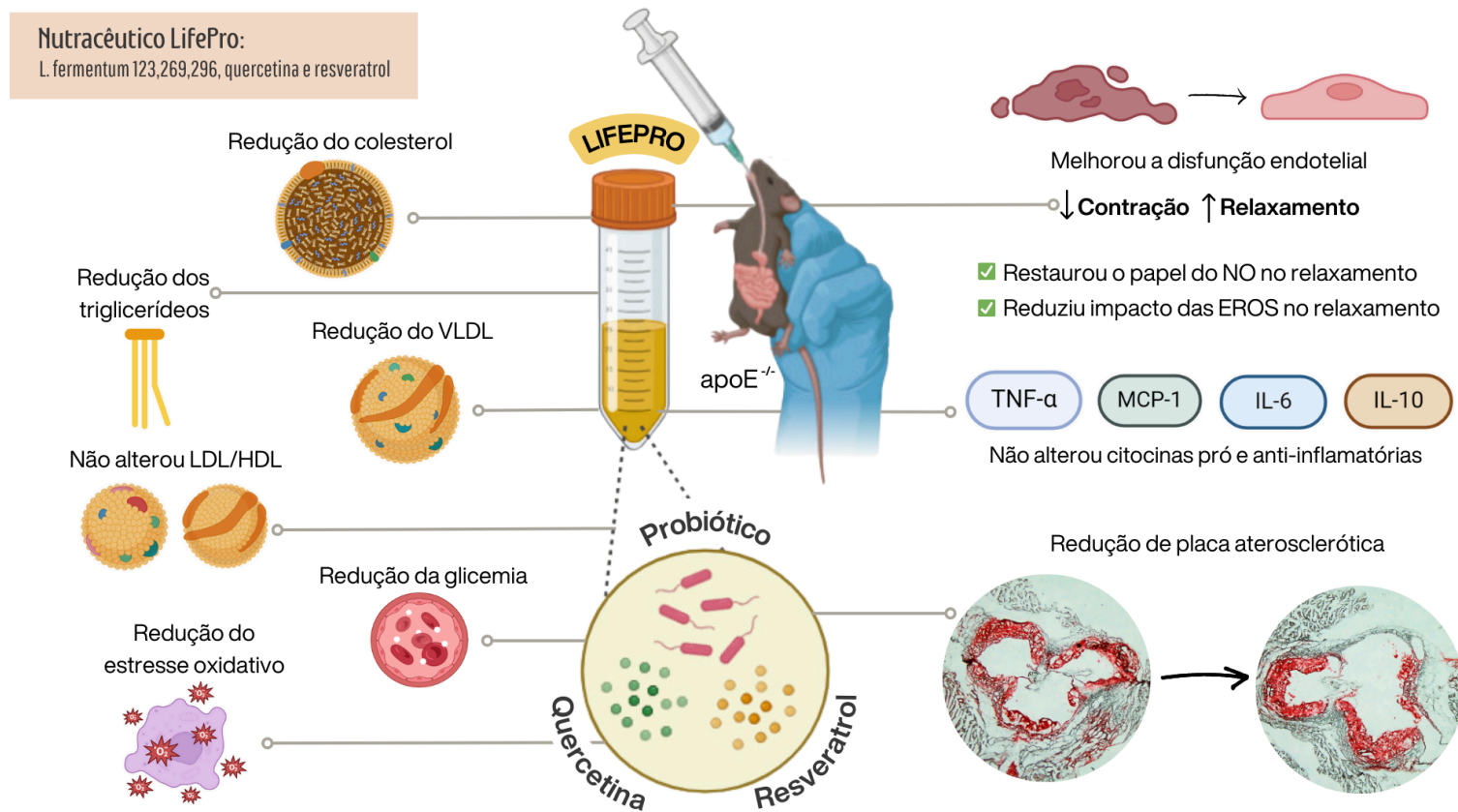
da IL-10 tanto na aorta, quanto no plasma. O tempo elencado pelos autores para que esse efeito possa ter ocorrido foi de 12-20 semanas de tratamento (Li et al., 2019; Zhou et al., 2020; Cao et al., 2019; Wuguang et al., 2022). Embora dois artigos tenham trazido redução apenas da IL-6 na aorta e plasma após 8 semanas de tratamentos com resveratrol e quercetina na dose de 20mg/kg, respectivamente (Jiang Y et al., 2020; Chang et al., 2015).

A deposição de placa aterosclerótica é um sinal morfológico característico do processo patológico, é o que de fato mostra histologicamente que a aterosclerose se desenvolveu (Torikai et al., 2023). Percebe-se visualmente a partir da coloração com Oil Red, um corante lipossolúvel utilizado em ensaios para marcar lipídios, triglicerídeos e lipoproteínas (Du et al., 2023). No contexto da aterosclerose, pode-se utilizar esse método para averiguar a formação da placa de ateroma (Chen; Qin; Simons, 2022). Na nossa pesquisa, percebeu-se que os animais apoE^{-/-} apresentam extensa marcação lipídica na região da válvula aórtica em comparação com os animais controle saudáveis. Esse local de corte foi escolhido devido a maior probabilidade de desenvolvimento de placa, tendo em vista o fluxo turbilhonar e tensão de cisalhamento existente na entrada da aorta (Jebari-Benslaiman et al., 2022). A partir disso, corroborando com estudos anteriores comprova-se que o modelo murino utilizado de fato desenvolveu aterosclerose devido a observação clara da placa, somado a outros fatores descritos acima, como perfil lipídico e estresse oxidativo (Balarini et al., 2013; Cavalcanti, 2024; Leite, 2019; Chen; Qin; Simons, 2022; Fang et al., 2019). O tratamento com nutracêutico possibilitou a redução da deposição aterosclerótica em 1,6 vezes. É visto em estudos com animais apoE^{-/-} tratados com probióticos, quercetina e resveratrol que esse achado é comum, porém a explicação para ele difere de acordo com o estudo. Por exemplo, o tratamento em camundongos ateroscleróticos com Kefir durante 12 semanas promoveu a redução da placa aterosclerótica, redução de citocinas inflamatórias, mas não alterou o perfil lipídico. Os autores explicam então que o efeito ateroprotetor não envolve a modulação lipídica (Tung et al., 2020). O mesmo ocorreu com o tratamento com *L. plantarum* ATCC 14917 (9 log UFC/mL) durante 12 semanas, porém os pesquisadores inserem o papel do estresse oxidativo como redutor de placa, principalmente devido a diminuição do LDLox (Hassan et al., 2020). O papel do estresse oxidativo na redução da placa também foi visto na intervenção com quercetina em animais

apoE^{-/-} durante 8 semanas, devido a inibição da NADPH oxidase (Xiao et al., 2017). A pesquisa de Li et al. (2019) investigou o papel do resveratrol na disfunção endotelial durante 8 semanas em camundongos apoE^{-/-}, os resultados mostram a redução de placa no grupo tratado ocorrendo, segundo os autores, em virtude da maior expressão da eNOS e redução do LDLox. Não foi avaliado perfil lipídico. De maneira interessante, embora a administração de *L fermentum* TY-S11 durante 4 semanas tenha reduzido o colesterol em camundongos apoE^{-/-}, a deposição de placa não foi alterada (Deng et al., 2024). Por outro lado, o tratamento com *Bif. animalis* F1-7 durante 16 semanas em apoE^{-/-} reduziu o perfil lipídico, citocinas inflamatórias e placa ateromatosa (Liang et al., 2021). Fazendo agora uma comparação com os componentes do nutracêutico e medicamentos hipolipemiantes disponíveis no mercado, como sinvastatina e artovastatina, estudos mostram que o efeito anti aterogênico é semelhante. Por exemplo, a administração com quercetina e atorvastatina durante 12 semanas em camundongos apoE^{-/-} reduziu placa ateromatosa, perfil lipídico e inflamação de forma equivalente (Li et al., 2019). O mesmo foi evidenciado na pesquisa de Zhou et al. (2020) a partir do tratamento com resveratrol e sinvastatina em animais apoE^{-/-} por 20 semanas, com a adição da potente melhora inflamatória. A intervenção com *B. animalis* (8 log UFC/mL) e artovastatina em camundongos apoE^{-/-} por 16 semanas reduziu placa de maneira significativa e triglicerídeos séricos. Em relação aos outros componentes do perfil lipídico, a artovastatina teve melhor desempenho, embora o probiótico tenha reduzido consideravelmente (Liang et al., 2024). Sendo assim, em nosso trabalho podemos sugerir que a redução da placa aterosclerótica em animais apoE^{-/-} tenha se dado devido a melhora do perfil lipídico e redução do estresse oxidativo, visto que o cenário inflamatório não foi alterado. A divergência dos estudos utilizando probióticos pode se dar principalmente em virtude da cepa bacteriana e tempo de tratamento.

A figura 25 resume de forma ilustrativa nossos achados e os mecanismos propostos para explicá-los.

Figura 25: Resumo gráfico dos efeitos do nutracêutico



Fonte: A autora com Biorender.com sob a licença Creative Commons (2024)

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados evidenciados neste estudo chegamos à conclusão que os animais *knockout* para apolipoproteína E possuem acentuada disfunção endotelial, com maior resposta vasoconstritora e prejuízo no relaxamento dependente de endotélio, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperglicemia, alto estresse oxidativo e deposição de placa aterosclerótica acentuada quando comparamos com animais controle saudável. Acerca do perfil inflamatório, as citocinas TNF e MCP-1 apresentaram-se altas, enquanto que IL-6 e IL-10 não foram alteradas.

Por outro lado, o tratamento com LifePro em animais apoE^{-/-} foi capaz de reduzir níveis de colesterol, glicemia, estresse oxidativo, triglicerídeos, VLDL, mas sem alteração no HDL e LDL. A deposição de placa no arco aórtico também apresentou redução. Em relação as citocinas, o tratamento não interferiu nos valores séricos. A disfunção endotelial foi corrigida a partir da redução na vasoconstrição e relaxamento dependente do endotélio restabelecido. O papel do NO foi reestabelecido, bem como redução do impacto do estresse oxidativo na reatividade vascular. Podemos sugerir, com base no que a literatura aponta, que cada componente do nutracêutico, a saber, cepas de *Limosilactobacillus fermentum*, quercetina e resveratrol possui papel importante nesses resultados e talvez até possam potencializar a ação dos demais componentes.

Sugerimos ainda, portanto, que o nutracêutico em questão seja um aliado, promovendo melhora vascular e hipocolesterolêmica em modelo animal de aterosclerose. Novos estudos precisam ser realizados inclusive avaliando a relação do efeito do nutracêutico com outros medicamentos hipolipemiantes disponíveis na indústria em camundongos ateroscleróticos.

REFERÊNCIAS

ABDULLAEV, S. *et al.* Quercetin increases nitric-oxide- dependent dilation in rat thoracic aorta.. **Journal of Hypertension**, vol. 36, Supplement 1, p. e47, Jun 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000539089.07476.90>. Acesso em: 2 Jul 2024.

ABUDUYIMITI, Tuerdiguli *et al.* Diabetes accelerates steatohepatitis in mice: liver pathology and single-cell gene expression signatures. **The American Journal of Pathology**, Fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2024.01.007>. Acesso em: 18 Fev. 2024.

AGUILAR, E. C. *et al.* Butyrate impairs atherogenesis by reducing plaque inflammation and vulnerability and decreasing NFκB activation. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, vol. 24, no. 6, p. 606-613, June 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.01.002>. Acesso em: 17 Fev. 2024.

AIELLO, Robert J. *et al.* Monocyte Chemoattractant Protein-1 Accelerates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, vol. 19, no. 6, p. 1518-1525, Jun 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.atv.19.6.1518>. Acesso em: 4 Ago. 2024.

AIRES, M.M. **Fisiologia**. Ed. Guanabara Koogan. 4ª edição, Rio de Janeiro, 2017

AKHGARJAND, Camellia *et al.* The effects of probiotic supplements on oxidative stress and inflammation in subjects with mild and moderate Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Inflammopharmacology**, 6 Fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10787-023-01427-2>. Acesso em: 3 Jul 2024.

AKBARI, Maryam *et al.* The effects of resveratrol on lipid profiles and liver enzymes in patients with metabolic syndrome and related disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Lipids in Health and Disease**, vol. 19, no. 1, 17 Fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12944-020-1198-x>. Acesso em: 4 Mar. 2024.

ALLAHVERDIAN, Sima *et al.* Contribution of Intimal Smooth Muscle Cells to Cholesterol Accumulation and Macrophage-Like Cells in Human Atherosclerosis. **Circulation**, vol. 129, no. 15, p. 1551-1559, 15 Abr. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/circulationaha.113.005015>. Acesso em: 17 Fev. 2024.

ALARGASAMY, J.; JAESCHKE, A.; HUI, DY. Apolipoprotein E in Cardiometabolic and Neurological Health and Diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, n.17, p. 9892, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23179892>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/17/9892/html>. Acesso em: 14 set. 2022.

ALEXANDER, Yvonne *et al.* Endothelial Function in Cardiovascular Precision Medicine: A Consensus Paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular

Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thrombosis. **Cardiovascular Research**, 13 Abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa085>. Acesso em: 1 Mar. 2024.

ALBUQUERQUE, TMR *et al.* In Vitro Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. v. 10, p. 704-716, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-017-9318-2>. Acesso em: 20 set. 2022.

AL-KHAYRI, Jameel M. *et al.* Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. **Molecules**, vol. 27, no. 9, p. 2901, 2 Ma 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27092901>. Acesso em: 27 Jun 2024.

AMARAL, LA *et al.* EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE RESVERATROL NA SAÚDE HUMANA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.19, n.3, 2018.

ARAÚJO, Georgianna *et al.* Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* Fruit-Derived Strains Alleviate Cardiometabolic Disorders and Gut Microbiota Impairment in Male Rats Fed a High-Fat Diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 2, p. 349-359, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09889-y>. Acesso em: 8 Nov. 2022.

ARDESTANI, Simin *et al.* Endothelial dysfunction in small arteries and early signs of atherosclerosis in ApoE knockout rats. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, 17 Set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72338-3>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

ARDESHIRLARIJANI, Edris *et al.* Effect of probiotics supplementation on glucose and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 2, p. 827-837, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00302-2>. Acesso em: 7 Nov. 2022.

AZEVEDO, BRM.; PINHEIRO, DN.; JOAQUIM, MJM. Doenças cardiovasculares: fatores de risco e cognição. **Rev. SBPH**. Rio de Janeiro , v. 20, n. 2, p. 25-44, 2017. Disponível em http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-08582017000200003&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 14 set. 2022.

BABADI, M. *et al.* Os Efeitos da Suplementação Probiótica em Perfis Genéticos e Metabólicos em Pacientes com Diabetes Mellitus Gestacional: um Randomizado, Ensaio duplo-cego, controlado por placebo. **Probióticos Proteínas Antimicrobianas**. v.11, p. 1227-1235, 2019.

BADIMON, Lina; PADRÓ, Teresa; VILAHUR, Gemma. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. **European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care**, vol. 1, no. 1, p. 60-74, Abr. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2048872612441582>. Acesso em: 1 Mar. 2024.

BAHIA, Luciana R. *et al.* Estimated costs of hospitalization due to coronary artery disease attributable to familial hypercholesterolemia in the Brazilian public health system. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, 7 Mai 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000030>. Acesso em: 27 Fev. 2024.

BALARINI, Camille de Moura. Avaliação dos efeitos vasculares do sildenafil na aterosclerose experimental. 2013. 87f. Tese. (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2010.

BARQUERA, Simon *et al.* Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. **Archives of Medical Research**, v. 46, n. 5, p. 328-338, jul. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.06.006>. Acesso em: 21 dez. 2023.

BATTY, Matthew; BENNETT, Martin R.; YU, Emma. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Cells**, vol. 11, no. 23, p. 3843, 30 Nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11233843>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

BELLOSTA, S. *et al.* Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 5, p. 2170-2179, 1 nov. 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci118271>. Acesso em: 1 jan. 2024.

BERBÉE, Jimmy F. P. *et al.* Resveratrol protects against atherosclerosis, but does not add to the antiatherogenic effect of atorvastatin, in APOE*3-Leiden.CETP mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 24, no. 8, p. 1423-1430, Ago. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.11.009>. Acesso em: 30 Jun 2024.

BIRCHENOUGH, George *et al.* Dietary destabilisation of the balance between the microbiota and the colonic mucus barrier. **Gut Microbes**, vol. 10, no. 2, p. 246-250, 25 Set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1513765>. Acesso em: 2 Mar. 2024.

BORÉN, Jan *et al.* Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins in health and dyslipidaemia. **Nature Reviews Cardiology**, 22 Mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00676-y>. Acesso em: 1 Mar. 2024.

BOZZATELLO, Paola *et al.* Nutraceuticals in Psychiatric Disorders: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 25, no. 9, p. 4824, 28 Abr. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25094824>. Acesso em: 21 Jun 2024.

BRÂNÉN, Lena *et al.* Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, vol. 24, no. 11, p. 2137-2142, Nov. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000143933.20616.1b>. Acesso em: 4 Ago. 2024.

BU, Te *et al.* Exosome-mediated delivery of inflammation-responsive *IL-10* mRNA for controlled atherosclerosis treatment. **Theranostics**, vol. 11, no. 20, p. 9988-10000, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/thno.64229>. Acesso em: 4 Ago. 2024.

BUDAY, Anna *et al.* Elevated systemic TGF- β impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE $^{-/-}$ mice. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, vol. 299, no. 2, p. H386—H395, Aug. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01042.2009>. Acesso em: 3 Jul 2024.

BUONFIGLIO, Francesco *et al.* Studies on the Effects of Hypercholesterolemia on Mouse Ophthalmic Artery Reactivity. **Diseases**, vol. 11, no. 4, p. 124, 22 Set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diseases11040124>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

BRASIL, Jéssica Maria Alves. **Efeitos do simbiótico Lifepro® sobre a microbiota e produção de metabólitos durante a fermentação fecal de pacientes com hipertensão arterial**. 2022. Dissertação de Mestrado - Mestrado em Ciências da Nutrição — Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2022.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA. **Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15.02.2018**. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, 15 Fev. 2018. Disponível em: http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf. Acesso em: 13 Mar. 2023

CAI, Lingli *et al.* Opposite effects of low-carbohydrate high-fat diet on metabolism in humans and mice. **Lipids in Health and Disease**, vol. 22, no. 1, 10 Nov. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12944-023-01956-3>. Acesso em: 21 Fev. 2024.

CAO, Hui *et al.* Quercetin has a protective effect on atherosclerosis via enhancement of autophagy in ApoE $^{-/-}$ mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 5 Ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7851>. Acesso em: 11 Fev. 2024.

CAO, Xiupeng *et al.* Effects of high-fat diet and Apoe deficiency on retinal structure and function in mice. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, 2 Nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75576-7>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

CARMAN, Christopher V.; SPRINGER, Timothy A. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. **Journal of Cell Biology**, v. 167, n. 2, p. 377-388, 25 out. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.200404129>. Acesso em: 25 dez. 2023.

CARVALHO, Lucas Rannier Ribeiro Antonino. **Efeitos do consumo de nitrato inorgânico (NaNO₃) sobre a longevidade e envelhecimento de ratos Wistar**.

2021. 137 p. Tese de Doutorado - Doutorado em Ciências Fisiológicas — Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

CARVALHO, Maria Helena C. et al. Funções Normais do Endotélio - Uma visão geral. In: LUZ, Protásio Lemos da; LAURINDO, Francisco RM; CHAGAS, Antônio CP (org). **Endotélio: Doenças Cardiovasculares**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

CASTELLI, W. P.; ABBOTT, R. D.; MCNAMARA, P. M. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. **Circulation**, vol. 67, no. 4, p. 730-734, Abr. 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.cir.67.4.730>. Acesso em: 21 Fev. 2024.

CAVALCANTE, RGS et al. The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. **Nutr Metab Cardiovasc Dis** v. 29, p.1408–1417, 2019. DOI: <https://doi-org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.numecd.2019.08.003>. Acesso em: 14 set. 2022.

CAVALCANTI, Clênia de Oliveira. **Avaliação de atividade anti-inflamatória do nitrito de sódio (NaNO₂) e do 2-nitrato-1,3dibutoxiopropano (NDBP) na aterosclerose experimental**. 2024. 91 f. Tese. (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, 2024

CECCHI, T. et al. Optimisation of the Measurement of the Antioxidant Activity of Probiotics and Pathogens: a Crucial Step Towards Evidence-Based Assessment of Health Claims and Production of Effective Functional Foods. **Food Analytical Methods**, vol. 8, no. 2, p. 312-320, 23 Mai 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9886-7>. Acesso em: 3 Jul 2024.

CYR, Anthony R. et al. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. **Critical Care Clinics**, vol. 36, no. 2, p. 307-321, Apr. 2020. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>. Acesso em: 1 Mar. 2024.

CHAN, Yee Kwan et al. Probiotic mixture VSL#3 reduce high fat diet induced vascular inflammation and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. **AMB Express**, vol. 6, no. 1, 30 Ago. 2016. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0229-5>. Accessed: 11 Fev. 2024.

CHANG Gen-Ruei et al. Resveratrol protects against diet-induced atherosclerosis by reducing low-density lipoprotein cholesterol and inhibiting inflammation in apolipoprotein E-deficient mice. **Iran J Basic Med Sci**. vol. 18, n. 8, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4764106/>. Acesso em: 05 Jul. 2024.

CHEEMA, Katherine M. et al. Long-term trends in the epidemiology of cardiovascular diseases in the UK: Insights from the British Heart Foundation Statistical Compendium. **Cardiovascular Research**, 14 Abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac053>. Acesso em: 27 Fev. 2024.

CHEN, J. *et al.* Interleukin 6-regulated macrophage polarization controls atherosclerosis-associated vascular intimal hyperplasia. **Front Immunol.**, v. 13, p. 952164, 2022. DOI: [10.3389/fimmu.2022.952164](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.952164). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9363591/>. Acesso em: 15 set. 2022.

CHEN, Pei-Yu; QIN, Lingfeng; SIMONS, Michael. Imaging and Analysis of Oil Red O-Stained Whole Aorta Lesions in an Aneurysm Hyperlipidemia Mouse Model. **Journal of Visualized Experiments**, no. 183, 2 Mai 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/61277>. Acesso em: 4 Jul 2024.

CHEN, Kun *et al.* Regulation of the Lactobacillus Strains on HMGC_oA Reductase Gene Transcription in Human HepG2 Cells via Nuclear Factor- κ B. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 402-407, 28 fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4014/jmb.1507.07086>. Acesso em: 30 dez. 2023.

CHEN, Lihua *et al.* Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 attenuates the atherosclerotic progression through modulation of oxidative stress and inflammatory process. **International Immunopharmacology**, vol. 17, no. 1, p. 108-115, Set. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.05.018>. Acesso em: 19 Jun 2024.

CHEN, Shihui *et al.* Resveratrol improves insulin resistance, glucose and lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. **Digestive and Liver Disease**, vol. 47, no. 3, p. 226-232, Mar. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.11.015>. Acesso em: 30 Jun 2024.

CHOI, Seok *et al.* Direct vascular actions of quercetin in aorta from renal hypertensive rats. **Kidney Research and Clinical Practice**, vol. 35, no. 1, p. 15-21, Mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.krcp.2015.12.003>. Acesso em: 27 Jun 2024.

CHOI, Sung Hee; GINSBERG, Henry N. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, vol. 22, no. 9, p. 353-363, Set. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.04.007>. Acesso em: 7 Ago. 2024.

CHOY, Ker Woon *et al.* Flavonoids as Natural Anti-Inflammatory Agents Targeting Nuclear Factor-Kappa B (NF κ B) Signaling in Cardiovascular Diseases: A Mini Review. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 10, 31 Out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01295>. Acesso em: 27 Jun 2024.

CRAUWELS, H. Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI. **Cardiovascular Research**, vol. 59, no. 1, p. 189-199, 1 Jul 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00353-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00353-5). Acesso em: 24 Fev. 2024.

CSÁNYI, Gábor *et al.* Functional alterations in endothelial NO, PGI₂ and EDHF pathways in aorta in ApoE/LDLR^{-/-} mice. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, vol. 98, no. 3-4, p. 107-115, Ago. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.02.002>. Acesso em: 2 Ago. 2024.

COSTA, PCT *et al.* Evidence for Quercetin as a Dietary Supplement for the Treatment of Cardio-Metabolic Diseases in Pregnancy: A Review in Rodent Models. **Foods**, v. 11, n.18, p. 2772, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11182772>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/18/2772/htm#B19-foods-11-02772>. Acesso em: 19 set. 2022.

CUI, Yingjie *et al.* Quercetin improves macrophage reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-fat diet. **Lipids in Health and Disease**, vol. 16, no. 1, 14 Jan. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0393-2>. Acesso em: 3 Mar. 2024.

DAGHER, Olina *et al.* Therapeutic Potential of Quercetin to Alleviate Endothelial Dysfunction in Age-Related Cardiovascular Diseases. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, vol. 8, 30 Mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.658400>. Acesso em: 27 Jun 2024.

DAMA, Aida *et al.* Targeting Metabolic Diseases: The Role of Nutraceuticals in Modulating Oxidative Stress and Inflammation. **Nutrients**, vol. 16, no. 4, p. 507, 10 Fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu16040507>. Acesso em: 21 Jun 2024.

DAVIDSON, MH.; PULIPATI, VP. Visão geral dos metabolismo lipídico. MSD Manual, 2021. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/dist%C3%BArbios-end%C3%B3crinos-e-metab%C3%B3licos/dist%C3%BArbios-lip%C3%ADicos/vis%C3%A3o-geral-dos-metabolismo-lip%C3%ADico>. Acesso em 15 set. 2022.

DEFELICE, Stephen L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 6, no. 2, p. 59-61, Fev. 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0924-2244\(00\)88944-x](https://doi.org/10.1016/s0924-2244(00)88944-x). Acesso em: 21 Jun 2024.

DEMPSEY, Elaine; CORR, Sinéad C. Lactobacillus spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. **Frontiers in Immunology**, vol. 13, 6 Abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840245>. Acesso em: 25 Jun 2024.

DENG, Qian *et al.* Therapeutic Potential of Quercetin as an Antiatherosclerotic Agent in Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2020, p. 1-12, 4 Jun 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/5926381>. Acesso em: 5 Jul 2024.

DENG, Yadan *et al.* Limosilactobacillus fermentum TY-S11 ameliorates hypercholesterolemia via promoting cholesterol excretion and regulating gut microbiota in high-cholesterol diet-fed apolipoprotein E-deficient mice. **Heliyon**, p. e32059, Mai 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32059>. Acesso em: 19 Jun 2024.

DERAKHSHANIAN, Hoda *et al.* Quercetina Melhora o Perfil Lipídico e Apolipoproteico em Ratos Tratados com Glicocorticóides em Altas Doses. **Arquivos**

Brasileiros de Cardiologia, vol. 115, no. 1, p. 102-108, Jul 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.36660/abc.20180397>. Acesso em: 4 Mar. 2024.

DÍAZ-URBINA, Daniel *et al.* Efectos de una dieta con alto contenido de grasas sobre patrones conductuales alimentarios. **Acta Colombiana de Psicología**, p. 95-115, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.14718/acp.2018.21.1.5>. Acesso em: 21 Fev. 2024.

DINATALE, J. C.; CROWE-WHITE, K. M. Effects of resveratrol supplementation on nitric oxide-mediated vascular outcomes in hypertension: A systematic review. **Nitric Oxide**, vol. 129, p. 74-81, Dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2022.10.005>. Acesso em: 2 Jul 2024.

DINH, Quynh N. *et al.* Advanced atherosclerosis is associated with inflammation, vascular dysfunction and oxidative stress, but not hypertension. **Pharmacological Research**, vol. 116, p. 70-76, Fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.12.032>. Acesso em: 2 Jul 2024.

DIXON, Asher *et al.* Efficacy of Probiotics in Patients of Cardiovascular Disease Risk: a Systematic Review and Meta-analysis. **Current Hypertension Reports**, vol. 22, no. 9, 29 Ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11906-020-01080-y>. Acesso em: 25 Jun 2024.

D'USCIO, Livius V. *et al.* Mechanism of Endothelial Dysfunction in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, vol. 21, no. 6, p. 1017-1022, June 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.atv.21.6.1017>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

DU, Junbao *et al.* An Optimized Method for Oil Red O Staining with the Salicylic Acid Ethanol Solution. **Adipocyte**, 13 Fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21623945.2023.2179334>. Acesso em: 4 Jul 2024.

ECKBURG, P. B. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 10 jun. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1110591>. Acesso em: 29 dez. 2023.

ESPÍRITO-SANTO, Djane A. *et al.* Cardioprotective effect of the quercetin on cardiovascular remodeling and atherosclerosis in rodents fed a high-fat diet: A systematic review. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 384, p. 110700, Out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110700>. Acesso em: 8 Jun 2024.

FANG Y, CHEN HQ, ZHANG X, *et al.* Probiotic administration of lactobacillus rhamnosus GR-1 attenuates atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice fed with a high-fat diet. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**. v. 23, n.8, p.3533-3541, 2019. doi:10.26355/eurrev_201904_17722

FEINSTEIN, M. *et al.* Monocyte subsets, T cell activation profiles, and stroke in men and women: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and Cardiovascular Health Study. **Atherosclerosis**, v. 351, p. 18-25, 2022. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2022.05.007>. Disponível em: [https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(22\)00243-X/fulltext#sectitle0090](https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(22)00243-X/fulltext#sectitle0090). Acesso em: 15 set. 2022.

FÉLÉTOU, Michel; VANHOUTTE, Paul M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, vol. 291, no. 3, p. H985—H1002, Set. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00292.2006>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

FENG, Tao; WANG, Jing. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. **Gut Microbes**, vol. 12, no. 1, p. 1801944, 14 Ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1801944>. Acesso em: 3 Jul 2024.

FERREIRA, Georgianna de Araújo Henriques *et al.* Potentially Probiotic Limosilactobacillus fermentum Fruit-Derived Strains Alleviate Cardiometabolic Disorders and Gut Microbiota Impairment in Male Rats Fed a High-Fat Diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 2, p. 349-359, 23 jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09889-y>. Acesso em: 30 dez. 2023.

FLECKNELL, Paul. Anaesthesia of Common Laboratory Species. *In*: FLECKNELL, Paul. **Laboratory Animal Anaesthesia**. [S. l.]: Elsevier, 2016. p. 193-256. ISBN 9780128000366. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800036-6.00005-3>. Acesso em: 14 Mar. 2023.

FOGACCI, Federica *et al.* Effect of resveratrol on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled, clinical trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1605-1618, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1422480>. Acesso em: 7 Nov. 2022.

FOLCO, Eduardo J. *et al.* Hypoxia But Not Inflammation Augments Glucose Uptake in Human Macrophages. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 6, p. 603-614, ago. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.03.044>. Acesso em: 31 dez. 2023.

FORD, Alexander C. *et al.* Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, synbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, vol. 48, no. 10, p. 1044-1060, 8 Out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/apt.15001>. Acesso em: 25 Jun 2024.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, vol. 33, no. 7, p. 829-837, 1 Set. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>. Acesso em: 2 Mar. 2024.

FRANSEN, Paul *et al.* Endothelial function in aorta segments of apolipoprotein E-deficient mice before development of atherosclerotic lesions. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, vol. 455, no. 5, p. 811-818, 27 Set. 2007.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0337-9>. Acesso em: 22 Fev. 2024.

FRIQUES, Andreia G. F. *et al.* Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Translational Medicine**, vol. 13, no. 1, Dec. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0759-7>. Acesso em: 22 Fev. 2024.

FREIRE, Micaelle Oliveira de Luna *et al.* Effects of a Mixed *Limosilactobacillus fermentum* Formulation with Claimed Probiotic Properties on Cardiometabolic Variables, Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Male Rats Fed a High-Fat Diet. **Foods**, v. 10, n. 9, p. 2202, 17 set. 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10092202>. Acesso em: 30 dez. 2023.

FREIRE, Micaelle Oliveira de Luna *et al.* *Limosilactobacillus fermentum* Strains with Claimed Probiotic Properties Exert Anti-oxidant and Anti-inflammatory Properties and Prevent Cardiometabolic Disorder in Female Rats Fed a High-Fat Diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 24 nov. 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09878-1>. Acesso em: 30 dez. 2023.

FORTES, ZB *et al.* Effect of indomethacin on the microvessel reactivity of two-kidney, one-clip hypertensive rats. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**. vol. 316, p. 75-89, 1992.

FURCHGOTT, Robert F.; ZAWADZKI, John V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, vol. 288, no. 5789, p. 373-376, Nov. 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/288373a0>. Acesso em: 1 Mar. 2024.

FUSAR-POLI, Laura *et al.* The effect of adjunctive nutraceuticals in bipolar disorder: A systematic review of randomized placebo-controlled trials. **Journal of Affective Disorders**, vol. 252, p. 334-349, Jun 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.04.039>. Acesso em: 21 Jun 2024.

GADELHA, Carlos Jorge Maciel Uchoa; BEZERRA, Alane Nogueira. Efeitos dos probióticos no perfil lipídico: revisão sistemática. **Jornal Vascular Brasileiro**, vol. 18, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1677-5449.180124>. Acesso em: 4 Mar. 2024.

GAGNÉ, Marc-André *et al.* Dysbiotic microbiota contributes to the extent of acute myocardial infarction in rats. **Scientific Reports**, vol. 12, no. 1, 3 Out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20826-z>. Acesso em: 6 Ago. 2024.

GAL, Roland *et al.* The Effect of Resveratrol on the Cardiovascular System from Molecular Mechanisms to Clinical Results. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 22, no. 18, p. 10152, 21 Set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms221810152>. Acesso em: 8 Jun 2024.

GARCIA, Estefânia F. *et al.* Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains. **Frontiers in Microbiology**, vol. 7, 30 Ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>. Acesso em: 8 Jun 2024.

GAZIANO, Thomas A. *et al.* Growing Epidemic of Coronary Heart Disease in Low- and Middle-Income Countries. **Current Problems in Cardiology**, v. 35, n. 2, p. 72-115, fev. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2009.10.002>. Acesso em: 26 dez. 2023.

GE, Qingfeng *et al.* Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* NJAU-01 in an animal model of aging. **BMC Microbiology**, vol. 21, no. 1, 15 Jun 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02248-5>. Acesso em: 3 Jul 2024.

GEDIK, Oğuzhan; KARAHAN, Aynur Gül. Physicochemical properties and survival assessment of potential probiotics in a novel dairy drink during storage. **Food Science & Nutrition**, 26 Oct. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.3697>. Acesso em: 8 Jun. 2024.

GIBSON, Glenn R. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, vol. 14, no. 8, p. 491-502, 14 Jun 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>. Acesso em: 8 Jun 2024.

GHANBARI, Fahimeh *et al.* The potential preventive effect of probiotics, prebiotics, and synbiotics on cardiovascular risk factors through modulation of gut microbiota: A review. **Food Science & Nutrition**, 29 Mai 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.4142>. Acesso em: 25 Jun 2024.

GHOSH, Sutirtha *et al.* Effect of aluminium on lipid profile and atherogenic index in prepubertal and young adult female rats: A pilot study. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, vol. 67, p. 92-99, 1 Jul 2023. Disponível em: https://doi.org/10.25259/ijpp_338_2022. Acesso em: 21 Fev. 2024.

GORDISH, Kevin L.; BEIERWALTES, William H. Resveratrol induces acute endothelium-dependent renal vasodilation mediated through nitric oxide and reactive oxygen species scavenging. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, vol. 306, no. 5, p. F542—F550, 1 Mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00437.2013>. Acesso em: 30 Jun 2024.

GUERRA-CANTERA, Santiago *et al.* The metabolic effects of resumption of a high fat diet after weight loss are sex dependent in mice. **Scientific Reports**, vol. 13, no. 1, 14 Ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40514-w>. Acesso em: 21 Fev. 2024.

GUO, Leilei *et al.* Selenium nanoparticles alleviate hyperlipidemia and vascular injury in ApoE-deficient mice by regulating cholesterol metabolism and reducing oxidative stress. **Metallomics**, vol. 12, no. 2, p. 204-217, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c9mt00215d>. Acesso em: 3 Jul 2024.

GUO, Shitian; ZHOU, Yu; XIE, Xiaojie. Resveratrol inhibiting TGF/ERK signaling pathway can improve atherosclerosis: backgrounds, mechanisms and effects. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 155, p. 113775, Nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113775>. Acesso em: 30 Jun 2024.

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

GOMES, Crizian Saar et al. Fatores associados às doenças cardiovasculares na população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia [online]**. n.24, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1980-549720210013.supl.2>

GOU, Mengxing; LIU, Xuejun; QU, Hongye. The role of nitric oxide in the mechanism of lactic acid bacteria substituting for nitrite. **CyTA - Journal of Food**, vol. 17, no. 1, p. 593-602, 1 Jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1621949>. Acesso em: 2 Jul 2024.

GOWDAK, Luis Henrique Wolff. Atherosclerosis, Inflammation, and Genetics - And you Thought it Was Just LDL-cholesterol. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia [online]**, v. 114, n. 2, p. 273-274. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.36660/abc.20200038>

GREGORY, Jill C. *et al.* Transmission of Atherosclerosis Susceptibility with Gut Microbial Transplantation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 9, p. 5647-5660, 30 dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.618249>. Acesso em: 29 dez. 2023.

GUO, Lin *et al.* Therapeutic Role and Potential Mechanism of Resveratrol in Atherosclerosis: TLR4/NF- κ B/HIF-1 α . **Mediators of Inflammation**, v. 2023, p. 1-13, 31 maio 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2023/1097706>. Acesso em: 31 dez. 2023.

GUTIERREZ, Paulo Sampaio. Células Espumosas na Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia [online]**. v. 119, n. 4, pp. 542-543, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.36660/abc.20220659>

HAJAR, Rachel. Risk factors for coronary artery disease: Historical perspectives. **Heart Views**, v. 18, n. 3, p. 109, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.4103/heartviews.heartviews_106_17. Acesso em: 7 Nov. 2022.

HAN, Wei-qing *et al.* Contributory role of endothelium and voltage-gated potassium channels in apocynin-induced vasorelaxations. **Journal of Hypertension**, vol. 28, no. 10, p. 2102-2110, Out. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/hjh.0b013e32833d0197>. Acesso em: 3 Jul 2024.

HARGREAVES, Mark; SPRIET, Lawrence L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. **Nature Metabolism**, vol. 2, no. 9, p. 817-828, 3 Ago. 2020. Disponível: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0251-4>. Acesso: 21 Fev. 2024.

HASSAN, Adil *et al.* Anti-atherosclerotic effects of *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 in ApoE^{-/-} mice through modulation of proinflammatory cytokines and oxidative stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 14, p. 6337-6350, 29 May 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10693-x>. Acesso em: 28 Mar. 2023.

HIGASHI, Yukihiro. Endothelial Function in Dyslipidemia: Roles of LDL-Cholesterol, HDL-Cholesterol and Triglycerides. **Cells**, vol. 12, no. 9, p. 1293, 1 Mai 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells12091293>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

HE, Zouyan; CHEN, Zhen-Yu. What Are Missing Parts in the Research Story of Trimethylamine-N-oxide (TMAO)? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 26, p. 5227-5228, 26 jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02744>. Acesso em: 29 dez. 2023.

HILL, Colin *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, vol. 11, no. 8, p. 506-514, 10 Jun 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>. Acesso em: 12 Ago. 2024.

HOFFMANN, Arkadiusz; KLENIEWSKA, Paulina; PAWLICZAK, Rafał. Antioxidative activity of probiotics. **Archives of Medical Science**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.89894>. Acesso em: 3 Jul 2024.

HOU, K *et al.* Microbiota na saúde e nas doenças. **Sig Transduct Target Ther.** v. 7, n. 135, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>. Acesso em: 01 Mar. 2024.

HUANG, Bingqiao *et al.* Resveratrol down-regulates endothelin type B receptors in vascular smooth muscle cells via Sirt1/ERK1/2/NF-κB signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**, vol. 840, p. 44-49, Dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.09.022>. Acesso em: 30 Jun 2024.

HUANG, Ying *et al.* *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Prevents Atherosclerosis via Inhibition of Intestinal Cholesterol Absorption in Apolipoprotein E-Knockout Mice. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 80, no. 24, p. 7496-7504, 26 Set. 2014. Available from: <https://doi.org/10.1128/aem.02926-14>. Acesso em: 19 Jun 2024.

HUANG, Jinli *et al.* Effect of Probiotics on Respiratory Tract Allergic Disease and Gut Microbiota. **Frontiers in Nutrition**, vol. 9, 22 Fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.821900>. Acesso em: 25 Jun 2024.

HURLEY, Matthew M. *et al.* Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide Regulates Hunger- and Palatability-Induced Binge Eating. **Frontiers in Neuroscience**, vol. 10, 22 Ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00383>. Acesso em: 21 Fev. 2024.

IHM, Sang-Hyun *et al.* A Standardized *Lindera obtusiloba* Extract Improves Endothelial Dysfunction and Attenuates Plaque Development in Hyperlipidemic ApoE-Knockout Mice. **Plants**, vol. 10, no. 11, p. 2493, 18 Nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants10112493>. Acesso em: 2 Jul 2024.

ISHIBASHI, S. *et al.* Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 2, p. 883-893, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci116663>. Acesso em: 27 Nov. 2022.

ITALIANI, Paola; BORASCHI, Diana. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 17 out. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>. Acesso em: 26 dez. 2023.

JANDHYALA, Sai Manasa. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, vol. 21, no. 29, p. 8787, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>. Acesso em: 21 Jun 2024.

JEBARI-BENSLAIMAN, Shifa *et al.* Pathophysiology of Atherosclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3346, 20 mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23063346>. Acesso em: 25 dez. 2023.

JENSEN, TL *et al.* Fasting of mice: a review. **Laboratory Animals**, vol. 47, no. 4, p. 225-240, 11 Set. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0023677213501659>. Accessed: 18 Fev. 2024.

JIA, Qingling *et al.* Quercetin protects against atherosclerosis by regulating the expression of PCSK9, CD36, PPAR γ , LXR α and ABCA1. **International Journal of Molecular Medicine**, 3 Jul 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4263>. Acesso em: 5 Jul 2024.

JIANG, Tianyi *et al.* Lactobacillus Mucosae Strain Promoted by a High-Fiber Diet in Genetic Obese Child Alleviates Lipid Metabolism and Modifies Gut Microbiota in ApoE-/- Mice on a Western Diet. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1225, 12 Ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081225>. Acesso em: 28 Mar. 2023.

JIANG, Yue-Hua *et al.* Quercetin Attenuates Atherosclerosis via Modulating Oxidized LDL-Induced Endothelial Cellular Senescence. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 11, 28 Apr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00512>. Acesso em: 5 Jul 2024.

JOMARD, Anne; OSTO, Elena. High Density Lipoproteins: Metabolism, Function, and Therapeutic Potential. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, vol. 7, 31 Mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00039>. Acesso em: 1 Mar. 2024.

KÁBELOVÁ, Adéla *et al.* Quercetin supplementation alters adipose tissue and hepatic transcriptomes and ameliorates adiposity, dyslipidemia, and glucose

intolerance in adult male rats. **Frontiers in Nutrition**, vol. 9, 29 Set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.952065>. Acesso em: 4 Mar. 2024.

KHANDELWAL, Alok R. et al. Resveratrol and Quercetin Interact to Inhibit Neointimal Hyperplasia in Mice with a Carotid Injury. **The Journal of Nutrition**, vol. 142, no. 8, p. 1487-1494, 20 June 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/jn.112.162628>. Acesso em: 27 Jun 2024.

KANG, Kyu-Tae. Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. **Toxicological Research**, vol. 30, no. 3, p. 141-148, 30 Set. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5487/tr.2014.30.3.141>. Acesso em: 1 Mar. 2024.

KENNARD, Matilda R. *et al.* The use of mice in diabetes research: The impact of experimental protocols. **Diabetic Medicine**, vol. 38, no. 12, 13 Out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/dme.14705>. Accessed: 18 Fev. 2024.

KING, Aileen JF. The use of animal models in diabetes research. **British Journal of Pharmacology**, vol. 166, no. 3, p. 877-894, 8 May 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>. Acesso em: 18 Fev. 2024.

KIM, Hyungtae et al. Prevalence and incidence of atherosclerotic cardiovascular disease and its risk factors in Korea: a nationwide population-based study. **BMC Public Health**, vol. 19, no. 1, 14 Ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7439-0>. Acesso em: 10 Jul. 2023.

KIM, S. J. *et al.* Combination of *Limosilactobacillus fermentum* MG4231 and MG4244 attenuates lipid accumulation in high-fat diet-fed obese mice. **Beneficial Microbes**, p. 1-14, 4 Ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/bm2020.0205>. Acesso em: 19 Fev. 2024.

KLEEMANN, R.; ZADELAAR, S.; KOOISTRA, T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. **Cardiovascular Research**, vol. 79, no. 3, p. 360-376, 2 Mai 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn120>. Acesso em: 4 Ago. 2024.

KOCKX, Maaïke; TRAINI, Mathew; KRITHARIDES, Leonard. Cell-specific production, secretion, and function of apolipoprotein E. **Journal of Molecular Medicine**, v. 96, n. 5, p. 361-371, 7 mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1632-y>. Acesso em: 28 dez. 2023.

KONG, Billy W. C. *et al.* 17 β -estradiol potentiates endothelium-dependent nitric oxide- and hyperpolarization-mediated relaxations in blood vessels of male but not female apolipoprotein-E deficient mice. **Vascular Pharmacology**, vol. 71, p. 166-173, Ago. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.02.009>. Acesso em: 3 Jul 2024.

KOTLYAROV, Stanilasv. Immune Function of Endothelial Cells: Evolutionary Aspects, Molecular Biology and Role in Atherogenesis. **Int. J. Mol. Sci**, v. 23, n.17,

p. 9770, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23179770>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/17/9770/htm>. Acesso em: 14 set. 2022.

KUIPERS, Eline *et al.* Quercetin Lowers Plasma Triglycerides Accompanied by White Adipose Tissue Browning in Diet-Induced Obese Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 19, no. 6, p. 1786, 16 Jun 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19061786>. Acesso em: 4 Mar. 2024.

KUKONGVIRIYAPAN, Upa *et al.* Preventive and therapeutic effects of quercetin on lipopolysaccharide-induced oxidative stress and vascular dysfunction in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, vol. 90, no. 10, p. 1345-1353, Oct. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/y2012-101>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

KUKOVETZ, W R *et al.* Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. **Journal of cyclic nucleotide research**. vol. 5,6, p.469-76, 1979.

KULLISAAR, Tiiu *et al.* Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 72, no. 3, p. 215-224, Fev. 2002. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00674-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00674-2). Acesso em: 3 Jul 2024.

KUMAR, Manoj *et al.* Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases. **Experimental Diabetes Research**, vol. 2012, p. 1-14, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/902917>. Accessed: 17 Fev. 2024.

LACERDA, Diego Cabral *et al.* Potential role of *Limosilactobacillus fermentum* as a probiotic with anti-diabetic properties: A review. **World Journal of Diabetes**, vol. 13, no. 9, p. 717-728, 15 Set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4239/wjd.v13.i9.717>. Acesso em: 25 Jun 2024.

LEE, Cheng-Han *et al.* The mechanism of phenylephrine-mediated $[Ca^{2+}]_i$ oscillations underlying tonic contraction in the rabbit inferior vena cava. **The Journal of Physiology**, vol. 534, no. 3, p. 641-650, Ago. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00641.x>. Acesso em: 22 Fev. 2024.

LEE, Jeongmin *et al.* Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to Reactive Oxygen Species (ROS): Role for a Metal Ion Chelating Effect. **Journal of Food Science**, vol. 70, no. 8, p. m388—m391, Out. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11524.x>. Acesso em: 3 Jul 2024.

LEFÈVRE, Jonas *et al.* Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide. **The FASEB Journal**, vol. 21, no. 14, p. 3845-3852, 19 Jul 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.06-7491com>. Acesso em: 22 Fev. 2024.

LEITE, Ericka Garcia. **Avaliação dos efeitos induzidos pelo 2- nitrato- 1,3-dibutoxipropano (NDBP) na função vascular em modelo de aterosclerose**. 2019. 92 p. Dissertação de Mestrado - Mestrado em Ciências Fisiológicas - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

LI, Xuri; SUN, Xiaodong; CARMELIET, Peter. Hallmarks of Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease. **Cell Metabolism**, vol. 30, no. 3, p. 414-433, Sept. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.011>. Acesso em: 1 Mar. 2024.

LI, Shan-shan *et al.* Effect of Quercetin on Atherosclerosis Based on Expressions of ABCA1, LXR- α and PCSK9 in ApoE-/- Mice. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, vol. 26, no. 2, p. 114-121, 30 May 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11655-019-2942-9>. Acesso em: 4 Jul 2024.

LI, Jia-Xin; TIAN, Rong; LU, Naihao. Quercetin Attenuates Vascular Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Mice by Inhibiting Myeloperoxidase and NADPH Oxidase Function. **Chemical Research in Toxicology**, 31 jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00334>. Acesso em: 31 dez. 2023.

LIANG, Xi *et al.* Krill Oil Combined with Bifidobacterium animalis subsp. lactis F1-7 Alleviates the Atherosclerosis of ApoE-/- Mice. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 2374, 6 Oct. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10102374>. Acesso em: 28 Mar. 2023.

LIANG, Xi *et al.* Bifidobacterium animalis subsp. lactis F1-7 Alleviates Lipid Accumulation in Atherosclerotic Mice via Modulating Bile Acid Metabolites to Downregulate Intestinal FXR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 29 Jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c05709>. Acesso em: 4 Jul 2024.

LIU, Li-qun *et al.* Quercetin Attenuates Atherosclerosis via Modulating Apelin Signaling Pathway Based on Plasma Metabolomics. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, 1 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11655-023-3645-9>. Acesso em: 31 dez. 2023.

LIU, Peining *et al.* Effects of Lactobacillus on hyperlipidemia in high-fat diet-induced mouse model. **Archives of Medical Science**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5114/aoms.2020.98927>. Acesso em: 30 dez. 2023.

LIU, Yang *et al.* Long-term dietary nitrate supplementation slows the progression of established atherosclerosis in ApoE-/- mice fed a high fat diet. **European Journal of Nutrition**, 28 Fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00394-023-03127-7>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

LIYNG Ma *et al.* Weizmannia coagulans JA845 improves atherosclerosis induced by vitamin D3 and high-fat diet in rats through modulating lipid metabolism, oxidative stress, and endothelial vascular injury, **Journal of Applied Microbiology**, vol.4, n. 8, Ago 2023,. Disponível em: [lxad165, https://doi.org/10.1093/jambio/lxad165](https://doi.org/10.1093/jambio/lxad165)

LOKE, Wai Mun *et al.* Specific Dietary Polyphenols Attenuate Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice by Alleviating Inflammation and Endothelial Dysfunction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, vol. 30, no. 4, p. 749-757, Apr. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/atvbaha.109.199687>. Acesso em: 5 Jul 2024.

LUCA, Alina Costina *et al.* Atherosclerosis from Newborn to Adult—Epidemiology, Pathological Aspects, and Risk Factors. **Life**, vol. 13, no. 10, p. 2056, 14 Out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/life13102056>. Acesso em: 27 Fev. 2024.

LUO, Gang; XIANG, Lu; XIAO, Lin. Quercetin alleviates atherosclerosis by suppressing oxidized LDL-induced senescence in plaque macrophage via inhibiting the p38MAPK/p16 pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, p. 109314, mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109314>. Acesso em: 31 dez. 2023.

LUQMAN, Ameer *et al.* Role of the intestinal microbiome and its therapeutic intervention in cardiovascular disorder. **Frontiers in Immunology**, vol. 15, 26 Jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1321395>. Acesso em: 17 Fev. 2024.

LUSIS, Aldons J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 233-241, Set. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35025203>. Acesso em: 9 Jan. 2024.

LUZ Protásio Lemos da et al. **Endotélio e aterosclerose**. Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo. v.6, n.2, 1996.

LUZ Protásio Lemos da; UINT Luciana. Endotélio na Aterosclerose: Interações Celulares e Vasomotricidade. In: LUZ, Protásio Lemos da; LAURINDO, Francisco RM; CHAGAS, Antônio CP (org). **Endotélio: Doenças Cardiovasculares**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

MAHDAVI-ROSHAN, Marjan *et al.* The Effects of Probiotics on Inflammation, Endothelial Dysfunction, and Atherosclerosis Progression: A Mechanistic Overview. **Heart, Lung and Circulation**, vol. 31, no. 5, p. e45-e71, Mai 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2021.09.006>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

MAEDA, Nobuyo. Development of Apolipoprotein E–Deficient Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, vol. 31, no. 9, p. 1957-1962, Set. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/atvbaha.110.220574>. Acesso em: 11 Fev. 2024.

MACKENZIE, Andrew. Endothelium-derived vasoactive agents, AT1 receptors and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, vol. 131, no. 2, p. 187-203, Ago. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.11.001>. Acesso em: 3 Mar. 2024.

MADAN, Monika *et al.* Atheroprotective role of interleukin-6 in diet- and/or pathogen-associated atherosclerosis using an ApoE heterozygote murine model. **Atherosclerosis**, vol. 197, no. 2, p. 504-514, Abr. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.02.023>. Acesso em: 4 Ago. 2024.

MAGNE, Fabien et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? **Nutrients**, vol. 12, no. 5, p. 1474, 19 Mai 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12051474>. Acesso em: 25 Jun 2024.

MAITREYA, Anuja *et al.* Nitric oxide–secreting probiotics as sustainable bio-cleaners for reverse osmosis membrane systems. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 29, no. 4, p. 4911-4929, 19 Nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17289-6>. Acesso em: 2 Jul 2024.

MALIK, Mobin *et al.* Lactobacillus plantarum 299v Supplementation Improves Vascular Endothelial Function and Reduces Inflammatory Biomarkers in Men With Stable Coronary Artery Disease. **Circulation Research**, vol. 123, no. 9, p. 1091-1102, 12 Out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/circresaha.118.313565>. Acesso em: 24 Fev. 2024

MANICAM, Caroline *et al.* Compensatory Vasodilator Mechanisms in the Ophthalmic Artery of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Knockout Mice. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, 2 Ago. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07768-7>. Acesso em: 2 Ago. 2024.

MARQUES, Vinícius Bermond *et al.* Chronic iron overload intensifies atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice: Role of oxidative stress and endothelial dysfunction. **Life Sciences**, vol. 233, p. 116702, Set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116702>. Accessed: 22 Fev. 2024.

MARTINS-PERLES, Juliana Vanessa Colombo *et al.* Quercetin increases bioavailability of nitric oxide in the jejunum of euglycemic and diabetic rats and induces neuronal plasticity in the myenteric plexus. **Autonomic Neuroscience**, vol. 227, p. 102675, Set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2020.102675>. Acesso em: 2 Jul 2024.

MARTIROSYAN, Danik M. *et al.* **Lipids in Health and Disease**, vol. 6, no. 1, p. 1, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1476-511x-6-1>. Acesso em: 21 Fev. 2024.

MATSUMOTO, Takayuki *et al.* Apocynin normalizes hyperreactivity to phenylephrine in mesenteric arteries from cholesterol-fed mice by improving endothelium-derived hyperpolarizing factor response. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 41, no. 8, p. 1289-1303, Out. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.07.012>. Acesso em: 21 Fev. 2024.

MAUROTTI, Samantha *et al.* A Nutraceutical with Citrus bergamia and Cynara cardunculus Improves Endothelial Function in Adults With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrition**, p. 112294, Nov. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2023.112294>. Acesso em: 21 Jun 2024.

MEYRELLES, Silvana S. *et al.* Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids in Health and Disease**, vol. 10, no. 1, p. 211, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1476-511x-10-211>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

MOHAMMAD, Ali; BABIKER, Fawzi; AL-BADER, Maie. Effects of Apocynin, a NADPH Oxidase Inhibitor, in the Protection of the Heart from Ischemia/Reperfusion Injury. **Pharmaceuticals**, vol. 16, no. 4, p. 492, 27 Mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph16040492>. Acesso em: 3 Jul 2024.

MOHANTA, SK *et al.* The dawn has come for new therapeutics to treat atherosclerosis: Targeting neuroimmune cardiovascular interfaces in artery brain circuits. **Clin Transl Med**, v. 12, n. 9, 2022. DOI: 10.1002/ctm2.1040. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9437971/>. Acesso em: 15 set. 2022.

MOMIN, Elina S. *et al.* The Effects of Probiotics on Cholesterol Levels in Patients With Metabolic Syndrome: A Systematic Review. **Cureus**, 14 Abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.7759/cureus.37567>. Acesso em: 20 Ago. 2024.

MORALES, Melanie; MUNNÉ-BOSCH, Sergi. Malondialdehyde: Facts and Artifacts. **Plant Physiology**, vol. 180, no. 3, p. 1246-1250, 28 Jun 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.19.00405>. Acesso em: 3 Jul 2024.

MONTEIRO, Álefe Brito. **O álcool cinâmico reduz a excitotoxicidade, o estresse oxidativo e a neuroinflamação em camundongos submetidos a modelos de crises epilépticas induzidas por pentilenotetrazol**. 2021. 164 p. Tese de Doutorado - Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

MOORE, Kathryn J.; FREEMAN, Mason W. Scavenger Receptors in Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 8, p. 1702-1711, ago. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000229218.97976.43>. Acesso em: 25 dez. 2023.

MUDAU, M. *et al.* **Disfunção endotelial: O preditor precoce da aterosclerose**. **Cardiovascular. J. Afr.**, v. 23, p. 222–231, 2012.

MURRAY, Christopher J. L. *et al.* Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, vol. 396, no. 10258, p. 1223-1249, Out. 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30752-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30752-2). Acesso em: 27 Fev. 2024.

NASCIMENTO, LCP *et al.* Limosilactobacillus fermentum, Current Evidence on the Antioxidant Properties and Opportunities to be Exploited as a Probiotic Microorganism. **Probiotics & Antimicro. Prot.** v. 14, p. 960–979, 2022. DOI: <https://doi-org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12602-022-09943-3>. Disponível em: <https://link-springer-com.ez15.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s12602-022-09943-3#citeas>. Acesso em: 14 set. 2022.

NAPPI, Francesco *et al.* Endothelium-Derived Relaxing Factors and Endothelial Function: A Systematic Review. **Biomedicines**, vol. 10, no. 11, p. 2884, 10 Nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112884>. Acesso: 1 Mar. 2024.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014

NETO, JMFA et al. Níveis Comparativos de Estresse Oxidativo em Camundongos em Duas Situações do Limite Orgânico: Overreaching Induzido por Treinamento de Natação e Câncer. *Rev Bras Med Esporte*. v.14, n. 6, 2008.

OLIVEIRA, Gláucia Maria Moraes de *et al.* Estatística Cardiovascular – Brasil 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, vol. 118, no. 1, p. 115-373, Jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.36660/abc.20211012>. Acesso em: 27 Fev. 2024.

OPPI, Sara; LÜSCHER, Thomas F.; STEIN, Sokrates. Mouse Models for Atherosclerosis Research—Which Is My Line? **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, vol. 6, 12 Apr. 2019. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00046>. Acesso em: 11 Fev. 2024.

ÖZKAN, Melike Hacer; UMA, Serdar. Inhibition of acetylcholine-induced EDHF response by elevated glucose in rat mesenteric artery. **Life Sciences**, vol. 78, no. 1, p. 14-21, Nov. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.02.036>. Acesso em: 22 Fev. 2024.

PAIGEN, B. *et al.* Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. **Atherosclerosis**, vol. 57, no. 1, p. 65-73, Oct. 1985. Disponível em [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(85\)90138-8](https://doi.org/10.1016/0021-9150(85)90138-8). Acesso em: 11 Fev. 2024.

PALANIYANI, Sasikumar Arunachalam *et al.* Probiotic Characterization of Cholesterol-Lowering *Lactobacillus fermentum* MJM60397. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 3, p. 1161-1172, 20 Aug. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09585-y>. Acesso em: 28 Mar. 2023.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, vol. 327, no. 6122, p. 524-526, Jun 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/327524a0>. Acesso em: 1 Mar. 2024.

PALMIERI, Erika M. *et al.* Nitric Oxide in Macrophage Immunometabolism: Hiding in Plain Sight. **Metabolites**, vol. 10, no. 11, p. 429, 26 Out. 2020. Disponível em <https://doi.org/10.3390/metabo10110429>. Acesso em: 25 Jun. 2024.

PARSAMANESH, Negin *et al.* Resveratrol and endothelial function: A literature review. **Pharmacological Research**, vol. 170, p. 105725, Ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105725>. Acesso em: 30 Jun 2024.

PELISEK, Jaroslav *et al.* Biobanco: Objetivos, Requisitos e Desafios Futuros – Experiências do Biobanco Vascular de Munique. **Revista de Medicina Clínica**, v. 2, pág. 251, 16 fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm8020251>. Acesso em: 23 dez. 2023.

PENDSE, Avani A. *et al.* Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond: Fig. 1. **Journal of Lipid Research**, v. 50, Supplement, p. S178—S182, 5 dez. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1194/jlr.r800070-jlr200>. Acesso em: 28 dez. 2023.

PENG, Rou *et al.* Dietary nitrate attenuated endothelial dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice fed a high-fat diet: A critical role for NADPH oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 689, p. 108453, Ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108453>. Acesso em: 22 Fev. 2024.

PEREIRA, Raquel B. *et al.* Oral *P. gingivalis* infection alters the vascular reactivity in healthy and spontaneously atherosclerotic mice. **Lipids in Health and Disease**, vol. 10, no. 1, p. 80, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1476-511x-10-80>. Acesso em: 22 Fev. 2024.

PHARM, NM; FAÇA, VV; LEE, AH. Alimentos ricos em polifenóis e risco de diabetes gestacional: uma revisão sistemática e meta-análise. **EUR. J. Clin. Nutr.**, v.73 , p. 647-656, 2019.

PIEDRAHITA, J. A. *et al.* Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 10, p. 4471-4475, 15 maio 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4471>. Acesso em: 28 dez. 2023.

PINDERSKI OSLUND, Laura J. *et al.* Interleukin-10 Blocks Atherosclerotic Events In Vitro and In Vivo. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, vol. 19, no. 12, p. 2847-2853, Dez. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.atv.19.12.2847>. Acesso em: 4 Ago. 2024.

PLUMP, Andrew S. *et al.* Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, n. 2, p. 343-353, out. 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90362-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90362-g). Acesso em: 28 dez. 2023.

RASHID, Sherzad K. *et al.* Probiotics (VSL#3) Prevent Endothelial Dysfunction in Rats with Portal Hypertension: Role of the Angiotensin System. **PLoS ONE**, vol. 9, no. 5, p. e97458, 15 Mai 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097458>. Acesso em: 26 Jun 2024.

RASTOGI, Sonakshi; SINGH, Aditi. Gut microbiome and human health: Exploring how the probiotic genus *Lactobacillus* modulate immune responses. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 13, 24 Out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1042189>. Acesso em: 25 Jun 2024.

RAYNER, Mike; ALLENDER, Steven; SCARBOROUGH, Peter. Cardiovascular disease in Europe. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 16, n. 2_suppl, p. S43—S47, ago. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.hjr.0000359235.59808.ba>. Acesso em: 26 dez. 2023.

REIS, S. A. *et al.* Mechanisms responsible for the hypocholesterolaemic effect of regular consumption of probiotics. **Nutrition Research Reviews**, vol. 30, no. 1, p. 36-49, 20 Dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0954422416000226>. Acesso em: 25 Jun 2024.

REMIGANTE, Alessia *et al.* Açai (*Euterpe oleracea*) Extract Protects Human Erythrocytes from Age-Related Oxidative Stress. **Cells**, v. 11, n. 15, p. 2391, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11152391>. Acesso em: 24 Nov. 2022.

RIDKER, Paul M.; RANE, Manas. Interleukin-6 Signaling and Anti-Interleukin-6 Therapeutics in Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, vol. 128, no. 11, p. 1728-1746, 28 May 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/circresaha.121.319077>. Acesso em: 4 Ago. 2024.

RIBEIRO, AG.; COTTA, RMM.; RIBEIRO, SMR. A promoção da saúde e a prevenção integrada dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 17, n. 1, p. 7-17. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232012000100002>. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232012000100002>. Acesso em: 14 set. 2022.

RIZZETTI, Danize A. *et al.* Apocynin Prevents Vascular Effects Caused by Chronic Exposure to Low Concentrations of Mercury. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 2, p. e55806, 4 Feb. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055806>. Acesso em: 3 Jul 2024.

ROBERTS, A.; THOMPSON, J. S. Inbred Mice and their Hybrids as an Animal Model for Atherosclerosis Research. *In*: ROBERTS, A.; THOMPSON, J. S. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Boston, MA: Springer US, 1976. p. 313-327. ISBN 9781475793093. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4618-7_18. Acesso em: 11 Fev. 2024.

ROBINSON, Jennifer G. *et al.* Atherosclerosis profile and incidence of cardiovascular events: a population-based survey. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 9, n. 1, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2261-9-46>. Acesso em: 7 Nov. 2022.

ROBLES ALONSO, Virginia; GUARNER, Francisco. Linking the gut microbiota to human health. **British Journal of Nutrition**, vol. 109, S2, p. S21—S26, 29 Jan. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0007114512005235>. Acesso em: 2 Mar. 2024.

ROBLES-VERA, Iñaki *et al.* The Probiotic *Lactobacillus fermentum* Prevents Dysbiosis and Vascular Oxidative Stress in Rats with Hypertension Induced by Chronic Nitric Oxide Blockade. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 19, p. 1800298, 7 ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800298>. Acesso em: 30 dez. 2023.

ROMANO, Nelson *et al.* Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Food Research International**, vol. 90, p. 251-258, Dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.003>. Acesso em: 8 Jun 2024.

ROSS, Russel. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. **N Engl J Med**. v. 340, p.115-126, 1999. DOI: 10.1056/NEJM199901143400207

ROSENBLAT, Mira *et al.* Anti-oxidant and anti-atherogenic properties of liposomal glutathione: Studies in vitro, and in the atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**, vol. 195, no. 2, p. e61-e68, Dec. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.05.012>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

SANTANA, Tamires Miranda *et al.* Effect of resveratrol supplementation on biomarkers associated with atherosclerosis in humans. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, vol. 46, p. 101491, Fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2021.101491>. Acesso em: 17 Fev. 2024.

SAMPAIO, KB *et al.* Desenvolvimento e avaliação in vitro de novas formulações nutraceuticas compostas por *Limosilactobacillus fermentum*, quercetina e/ou resveratrol. **Química de Alimentos**. v. 342, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128264>. Acesso em: 14. set 2022.

SAMPAIO, KB *et al.* Nutraceutical formulations combining *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin, and or resveratrol with beneficial impacts on the abundance of intestinal bacterial populations, metabolite production, and antioxidant capacity during colonic fermentation. **Food Research International**. v. 161, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111800>. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez15.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0963996922008584#b0050>. Acesso em: 19 Set. 2022.

SÁNCHEZ, Manuel *et al.* Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, vol. 24, no. 1, p. 75-84, Jan. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000198029.22472.d9>. Acesso em: 27 Jun 2024.

SANTOS, Lucas Alves *et al.* A Mix of Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* Strains Alters the Gut Microbiota in a Dose- and Sex-Dependent Manner in Wistar Rats. **Microorganisms**, vol. 12, no. 4, p. 659, 26 Mar. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040659>. Acesso em: 25 Jun 2024.

SARÉN, P.; WELGUS, H. G.; KOVANEN, P. T. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. **The Journal of Immunology**, vol. 157, no. 9, p. 4159-4165, 1 Nov. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.157.9.4159>. Acesso em: 06 Jan. 2024.

SCHLUTER, T. *et al.* Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition. **Cardiovascular Research**, vol. 80, no. 2, p. 271-279, 16 Jul 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn185>. Acesso em: 3 Jul 2024.

SENEJOUX, François *et al.* New insights into the mechanisms of the vasorelaxant effects of apocynin in rat thoracic aorta. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, vol. 27, no. 3, p. 262-270, 11 Jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2011.01025.x>. Acesso em: 3 Jul 2024.

SEO, Min-Jung *et al.* The inhibitory effects of quercetin on obesity and obesity-induced inflammation by regulation of MAPK signaling. **The Journal of**

Nutritional Biochemistry, v. 26, n. 11, p. 1308-1316, nov. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.06.005>. Acesso em: 31 dez. 2023.

SERBAN, Maria-Corina *et al.* Effects of Quercetin on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Journal of the American Heart Association**, vol. 5, no. 7, 6 Jul 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/jaha.115.002713>. Acesso em: 8 Jun 2024.

SETO, Sai Wang *et al.* Impaired Acetylcholine-Induced Endothelium-Dependent Aortic Relaxation by Caveolin-1 in Angiotensin II-Infused Apolipoprotein-E (ApoE^{-/-}) Knockout Mice. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 3, p. e58481, 4 Mar. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058481>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

SICARD, Jean-Félix *et al.* Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 7, 5 Set. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00387>. Acesso em: 18 Fev. 2024.

SIMENTAL-MENDÍA, Luis E.; GUERRERO-ROMERO, Fernando. Effect of resveratrol supplementation on lipid profile in subjects with dyslipidemia: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. **Nutrition**, vol. 58, p. 7-10, Fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.06.015>. Acesso em: 3 Mar. 2024.

SZAJEWSKA, H. *et al.* Meta-analysis: Lactobacillus GG for treating acute gastroenteritis in children - updated analysis of randomised controlled trials. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, vol. 38, no. 5, p. 467-476, 10 Jul 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/apt.12403>. Acesso em: 25 Jun 2024.

SHAO, Dongyan *et al.* Cholesterol-Lowering Effects and Mechanisms in View of Bile Acid Pathway of Resveratrol and Resveratrol Glucuronides. **Journal of Food Science**, vol. 81, no. 11, p. H2841—H2848, 13 Out. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13528>. Acesso em: 17 Fev. 2024.

SHEN, Xinyi *et al.* Gut Microbiota and Atherosclerosis—Focusing on the Plaque Stability. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, vol. 8, 3 Ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.668532>. Acesso em: 2 Mar. 2024.

SHI, Xuan *et al.* Calcification in Atherosclerotic Plaque Vulnerability: Friend or Foe? **Frontiers in Physiology**, v. 11, 5 fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00056>. Acesso em: 26 dez. 2023.

SIMONI-BERRA, Marco A. *et al.* Effect of probiotics on glucose levels and weight gain in mice exposed to low doses of malathion. **Gaceta de México**, vol. 159, no. 1, 15 Mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.24875/gmm.m22000735>. Accessed: 19 Fev. 2024.

SILVA, Emerson de Jesus *et al.* Atherosclerosis Complications in the Brazilian Population: An Ecological Time Series Study. **International Journal of**

Cardiovascular Sciences, v. 35, n. 2, p. 243-252, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.36660/ijcs.20210117>. Acesso em: 21 dez. 2023.

SILVA, LFR *et al.* Effects of probiotic therapy on cardio-metabolic parameters and autonomic modulation in hypertensive women: a randomized, triple-blind, placebo-controlled trial. **Food Funct.**, v. 11, p. 7152-7163, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0FO01661F>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/FO/D0FO01661F>. Acesso em: 14 set. 2022.

SOBKO, Tanja *et al.* Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 41, no. 6, p. 985-991, Set. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.06.020>. Acesso em: 2 Jul 2024.

SORESCU, Dan *et al.* Superoxide Production and Expression of Nox Family Proteins in Human Atherosclerosis. **Circulation**, vol. 105, no. 12, p. 1429-1435, 26 Mar. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000012917.74432.66>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

SOSNOWSKA, Bozena; PENSON, Peter; BANACH, Maciej. The role of nutraceuticals in the prevention of cardiovascular disease. **Cardiovascular Diagnosis and Therapy**, vol. 67, no. 1, p. S21—S31, Abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21037/cdt.2017.03.20>. Acesso em: 5 Ago. 2024.

STEPANKOVA, Renata *et al.* Absence of Microbiota (Germ-Free Conditions) Accelerates the Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice Fed Standard Low Cholesterol Diet. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, vol. 17, no. 8, p. 796-804, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.5551/jat.3285>. Acesso em: 21 Jun 2024.

SU, Lijie *et al.* Quercetin improves high-fat diet-induced obesity by modulating gut microbiota and metabolites in C57BL/6J mice. **Phytotherapy Research**, 29 Jul 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.7575>. Acesso em: 2 Ago. 2024.

SUEZ, Jotham *et al.* The pros, cons, and many unknowns of probiotics. **Nature Medicine**, vol. 25, no. 5, p. 716-729, Mai 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x>. Acesso em: 25 Jun 2024.

TABRIZI, Reza *et al.* The effects of quercetin supplementation on lipid profiles and inflammatory markers among patients with metabolic syndrome and related disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 60, no. 11, p. 1855-1868, 24 Abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1604491>. Acesso em: 27 Jun 2024.

TALEPOOR, AG.; DOROUDCHI, M. Immunosenescence in atherosclerosis: A role for chronic viral infections. **Front Immunol**, v.13, p. 945016, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.945016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9428721/>. Acesso em: 14 set. 2022.

THOMAS, Charles; LELEU, Damien; MASSON, David. Cholesterol and HIF-1 α : Dangerous Liaisons in Atherosclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 21 mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.868958>. Acesso em: 31 dez. 2023.

TOMIOKA, Hiroshi *et al.* Relaxation in Different-Sized Rat Blood Vessels Mediated by Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: Importance of Processes Mediating Precontractions. **Journal of Vascular Research**, vol. 36, no. 4, p. 311-320, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000025659>. Acesso em: 1 Mar. 2024.

TORAL, Marta *et al.* Lactobacillus fermentum Improves Tacrolimus-Induced Hypertension by Restoring Vascular Redox State and Improving eNOS Coupling. **Molecular Nutrition & Food Research**, vol. 62, no. 14, p. 1800033, 28 Jun 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800033>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

TORIKAI, Hideyuki *et al.* Atherogenesis in Apoe $-/-$ and Ldlr $-/-$ Mice with a Genetically Resistant Background. **Cells**, vol. 12, no. 9, p. 1255, 26 Abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells12091255>. Acesso em: 3 Jul 2024.

TSILIMIGRAS, DIAMANTIS I. *et al.* Rosuvastatin Attenuates Progression of Atherosclerosis and Reduces Serum IL6 and CCL2 Levels in Apolipoprotein-E-deficient Mice. **In Vivo**, vol. 37, no. 3, p. 994-1002, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.21873/invivo.13173>. Acesso em: 14 Mai 2023.

TUNG, Min-Che *et al.* Kefir peptides alleviate high-fat diet-induced atherosclerosis by attenuating macrophage accumulation and oxidative stress in ApoE knockout mice. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, 29 Mai 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65782-8>. Acesso em: 4 Jul 2024.

ULUSOY, HG; SANLIER, N. A minireview de quercetina: De seu metabolismo para possíveis mecanismos de suas atividades biológicas. **Crítico. Rev. Food Sci. Nutr.** v.60, p. 3290-3303, 2020.

VALLIANOU, Natalia *et al.* Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, Postbiotics, and Obesity: Current Evidence, Controversies, and Perspectives. **Current Obesity Reports**, vol. 9, no. 3, p. 179-192, 29 May 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13679-020-00379-w>. Acesso em: 25 Jun 2024.

VANANTWERP, Ian R. *et al.* Effects of trans- versus cis-resveratrol on adrenergic contractions of the rat tail artery and role of endothelium. **Physiological Reports**, vol. 8, no. 24, 24 Dez. 2020. Disponível em <https://doi.org/10.14814/phy2.14666>. Acesso em: 30 Jun 2024.

VAN DIJK, Ko Willems; HOFKER, Marten H.; HAVEKES, Louis M. Dissection of the complex role of apolipoprotein E in lipoprotein metabolism and atherosclerosis using mouse models. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 1, n. 2, p. 101-107, set. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11883-999-0005-y>. Acesso em: 28 dez. 2023.

VASQUEZ, Elisardo C. *et al.* Probiotics as Beneficial Dietary Supplements to Prevent and Treat Cardiovascular Diseases: Uncovering Their Impact on Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2019, p. 1-11, 7 Mai 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/3086270>. Acesso em: 20 Jul. 2024.

VIRMANI, Renu *et al.* Lessons From Sudden Coronary Death. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 5, p. 1262-1275, maio 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.5.1262>. Acesso em: 23 dez. 2023.

VISSENAEKENS, Hanne *et al.* Quercetin Mitigates Endothelial Activation in a Novel Intestinal-Endothelial-Monocyte/Macrophage Coculture Setup. **Inflammation**, 30 mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01645-w>. Acesso em: 31 dez. 2023.

WALLERATH, Thomas *et al.* Resveratrol, a Polyphenolic Phytoalexin Present in Red Wine, Enhances Expression and Activity of Endothelial Nitric Oxide Synthase. **Circulation**, vol. 106, no. 13, p. 1652-1658, 24 Set. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000029925.18593.5c>. Acesso em: 30 Jun 2024.

WANG, Bin *et al.* Regulatory effects of resveratrol on glucose metabolism and T-lymphocyte subsets in the development of high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice. **Food Funct.**, vol. 5, no. 7, p. 1452-1463, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3fo60714c>. Acesso em: 2 Ago. 2024.

WANG, Jianbing *et al.* Helianthus Annuus L. Alleviates High-Fat Diet Induced Atherosclerosis by Regulating Intestinal Microbiota, Inhibiting Inflammation and Restraining Oxidative Stress. **The American Journal of Chinese Medicine**, p. 1-19, 11 Sept. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1142/s0192415x21500798>. Acesso em: 28 Mar. 2023.

WANG, Yanming *et al.* Composite probiotics alleviate type 2 diabetes by regulating intestinal microbiota and inducing GLP-1 secretion in db/db mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 125, p. 109914, Mai 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109914>. Acesso em: 19 Fev. 2024.

WANG, Zeneng *et al.* Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. **Cell**, v. 163, n. 7, p. 1585-1595, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.055>. Acesso em: 29 dez. 2023.

WATSON, Michael G. *et al.* A two-phase model of early fibrous cap formation in atherosclerosis. **Journal of Theoretical Biology**, vol. 456, p. 123-136, Nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.08.010>. Acesso em: 1 Mar. 2024.

WICIŃSKI, Michał *et al.* Beneficial Effects of Resveratrol Administration—Focus on Potential Biochemical Mechanisms in Cardiovascular Conditions. **Nutrients**, vol. 10, no. 11, p. 1813, 21 Nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10111813>. Acesso em: 9 Jun 2024.

WU, Dong-Ning et al. Microbiome and metabonomics study of quercetin for the treatment of atherosclerosis. **Cardiovascular Diagnosis and Therapy**, vol. 9, no. 6, p. 545-560, Dez. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21037/cdt.2019.12.04>. Acesso em: 27 Jun 2024.

WUGUANG Ji et al. Resveratrol protects against atherosclerosis by downregulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in atherosclerosis model mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, vol. 23, n. 6, Jun 2022. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2022.11341>. Acesso em: 05 Jul. 2024

XIA, Ning; FÖRSTERMANN, Ulrich; LI, Huige. Resveratrol and Endothelial Nitric Oxide. **Molecules**, vol. 19, no. 10, p. 16102-16121, 9 Out. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules191016102>. Acesso em: 2 Jul 2024.

XIA, Ning *et al.* Resveratrol Reverses Endothelial Nitric-Oxide Synthase Uncoupling in Apolipoprotein E Knockout Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 335, no. 1, p. 149-154, 7 July 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.110.168724>. Acesso em: 2 Jul 2024.

XIA, Ning *et al.* Regulation of NADPH Oxidase-Mediated Superoxide Production by Acetylation and Deacetylation. **Frontiers in Physiology**, vol. 12, 12 Ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.693702>. Acesso em: 4 Jul 2024.

XU, Xiaolei *et al.* Resveratrol Exerts Anti-Osteoarthritic Effect by Inhibiting TLR4/NF- κ B Signaling Pathway via the TLR4/Akt/FoxO1 Axis in IL-1 β -Stimulated SW1353 Cells. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 2079-2090, maio 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/dddt.s244059>. Acesso em: 31 dez. 2023.

YADAV, Radha *et al.* Consumption of Probiotic Lactobacillus fermentum MTCC: 5898-Fermented Milk Attenuates Dyslipidemia, Oxidative Stress, and Inflammation in Male Rats Fed on Cholesterol-Enriched Diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 2, p. 509-518, 13 maio 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9429-4>. Acesso em: 30 dez. 2023.

YAP, Wei Boon et al. Lactobacillus casei strain C1 attenuates vascular changes in spontaneously hypertensive rats. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, vol. 20, no. 6, p. 621, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4196/kjpp.2016.20.6.621>. Acesso em: 26 Jun 2024.

YARULLINA, D. R. *et al.* Alternative pathways of nitric oxide formation in Lactobacilli: Evidence for nitric oxide synthase activity by EPR. **Microbiology**, vol. 75, no. 6, p. 634-638, Dez. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/s0026261706060026>. Acesso em: 2 Jul 2024.

YASHIRO, Takuya *et al.* Resveratrol increases the expression and activity of the low density lipoprotein receptor in hepatocytes by the proteolytic activation of the sterol regulatory element-binding proteins. **Atherosclerosis**, vol. 220, no. 2, p. 369-374,

Fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.006>. Acesso em: 17 Fev. 2024.

YI, Ruokun *et al.* Effects of *Lactobacillus fermentum* CQPC04 on Lipid Reduction in C57BL/6J Mice. **Frontiers in Microbiology**, vol. 11, 3 Set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573586>. Acesso em: 19 Jun 2024.

YIN, Jia *et al.* Dysbiosis of Gut Microbiota With Reduced Trimethylamine-N-Oxide Level in Patients With Large-Artery Atherosclerotic Stroke or Transient Ischemic Attack. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 11, 29 out. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/jaha.115.002699>. Acesso em: 29 dez. 2023.

YOO, Sae-Rom *et al.* Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-induced obesity. **Obesity**, v. 21, n. 12, p. 2571-2578, 2013.

YOSHIDA, Naofumi *et al.* A possible beneficial effect of *Bacteroides* on faecal lipopolysaccharide activity and cardiovascular diseases. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, 3 Ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69983-z>. Acesso em: 2 Mar. 2024.

ZHAI, Taiyu *et al.* Probiotics Bring New Hope for Atherosclerosis Prevention and Treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2022, p. 1-13, 24 Set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/3900835>. Acesso em: 24 Fev. 2024.

ZHANG, Li-Xue *et al.* Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 143, p. 112164, Nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112164>. Acesso em: 30 Jun 2024.

ZHANG, Mei *et al.* Comparison of the efficacy of fish oil and probiotic supplementation on glucose and lipid metabolism in patients with type 2 diabetes: a systematic review and network meta-analysis. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, vol. 16, no. 1, 22 Jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13098-024-01266-3>. Acesso em: 18 Fev. 2024.

ZHANG, Min *et al.* Quercetin regulates hepatic cholesterol metabolism by promoting cholesterol-to-bile acid conversion and cholesterol efflux in rats. **Nutrition Research**, vol. 36, no. 3, p. 271-279, Mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.11.019>. Acesso em: 17 Fev. 2024.

ZHANG, S. *et al.* Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. **Science**, v. 258, n. 5081, p. 468-471, 16 out. 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1411543>. Acesso em: 29 dez. 2023.

ZHANG, Weiwei *et al.* Research progress of quercetin in cardiovascular disease. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, vol. 10, 16 Nov. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1203713>. Acesso em: 17 Fev. 2024.

ZHENG, Jinshui *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>. Acesso em: 8 Nov. 2022.

ZHOU, Liyu *et al.* Resveratrol ameliorates atherosclerosis induced by high-fat diet and LPS in ApoE^{-/-} mice and inhibits the activation of CD4⁺ T cells. **Nutrition & Metabolism**, vol. 17, no. 1, 27 Mai 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12986-020-00461-z>. Acesso em: 19 Jun 2024.

ZHU, Xinhong *et al.* Quercetin ameliorates HFD-induced NAFLD by promoting hepatic VLDL assembly and lipophagy via the IRE1a/XBP1s pathway. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 114, p. 52-60, Abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.019>. Acesso em: 4 Ago. 2024.