

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

LEANDRO DOS SANTOS

**Efeito antiinflamatório da S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) na
aterogênese em camundongos**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular, na área de Fisiologia**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Helena Krieger

2005

UNIDADE	PC
Nº CHAMADA	
	+UNICAMP
	Sa 59e
V	EX
TOMBO BC/	65086
PROC.	6.86-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	14,00
DATA	4/8/05
Nº CPD	

BIB ID - 359928

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Sa597e

Santos, Leandro dos
Efeito antiinflamatório da S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) na aterogênese em camundongos / Leandro dos Santos. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Marta Helena Krieger.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Aterosclerose. 2. Lipoproteínas. 3. Óxido nítrico. 4. Camundongo. 5. Inflamação. I. Marta Helena Krieger. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Antiinflammatory effects of S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) in the atherosclerosis in mice.

Palavras-chave em inglês: atherosclerosis, lipoproteins, nitric oxide, mice, inflammation.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestrado.

Banca examinadora: Marta Helena Krieger, Heraldo Possolo de Souza, Francesco Langone, Heitor Moreno Junior, Dora Maria Grassi-Kassisse.

Data da defesa: 18/05/2005.

Data da Defesa: 18/05/2005

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Marta Helena Krieger (orientadora)

Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

Prof. Dr. Francesco Langone

Prof. Dr. Heitor Moreno Junior

Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse

Aos meus pais Sebastião Ferminio dos Santos e Eliane Maria Oliveira dos Santos

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelo amor incondicional e pelas longas conversas nas difíceis madrugadas.

Aos meus pais por fazerem da minha vitória a sua vitória.

Ao meu amigo Zé Antônio, porque “existem amigos tão chegados quanto irmãos”.

Ao meu irmão Lucas, pelas boas lembranças e eterna amizade.

Ao Sr. Oswaldo e Sras. Cirila e Maria, por me acolherem com tanto carinho em seus lares.

A minha orientadora Professora Marta Helena Krieger, pela paciência, incentivo e acima de tudo credibilidade. Agradeço por transformar trabalho em profissionalismo e amizade.

Ao Professor Francesco Langone, pela conduta profissional e pessoal na qual me espelho.

Ao Professores Miguel Arcanjo Areas e Antônio Carlos Boschero, pelas lições e amizade.

Às Professoras Regina Célia Spadari-Bratfisch e Dora Maria Grassi-Kassisse, por todos os momentos alegres compartilhados (inclusive os momentos de D. Bosco).

A Maria Cândida, por me ensinar a superar obstáculos, acreditar em sentimentos e acima de tudo pelo companheirismo.

Aos meus amigos Alessandro, Edgar, Héder, Michel, Rafael, Danilo, Alex, Robertão e Roberto “Chaperone” pelos momentos alegres e tristes nos quais se mostraram amigos.

As minhas amigas Karina, Fernanda, Emiliane, Mika, Cláudia, Mariane, Adriana e Amarylis porque sempre farão parte da minha vida. Pelos amigos e amigas, obrigado Deus!!!!

Ao Professor Heraldo Possolo de Souza, pela contribuição profissional inestimável.

Ao Professor Paulo Pinto Joazeiro, pela paciência e colaboração.

Ao Adriano, pelo auxílio e pela nova amizade.

Aos professores do Departamento, pelas muitas vezes que foram família.

Aos colegas do Departamento, pelos empréstimos e auxílio, além das festas e risadas.

Aos meus colegas de laboratório, pela colaboração nos trabalhos.

Aos funcionários do Departamento, pelo tratamento respeitoso e amizade.

As secretárias Andréia e Marina, pelos esclarecimentos e risadas.

A todos em Alfenas que me sustentaram em oração.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram com a elaboração deste trabalho e para minha formação pessoal.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

Lista de Abreviações.....	ix
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
1- Introdução.....	1
2- Objetivos.....	14
3- Material e Métodos.....	16
4- Resultados.....	22
5- Discussão.....	40
6- Conclusões.....	47
7- Referências Bibliográficas.....	50

LISTA DE ABREVIACOES

15-LO (15-lipoxygenase) – 15-lipoxigenase

°C – graus centígrados

µm – micrmetros

ApoB (apolipoprotein B) – apolipoproteína B

ApoE (apolipoprotein E) – apolipoproteína E

bpm – batimentos por minuto

CD40L – CD40 ligante

DAB (diaminobenzidine) - diaminobenzidina

eNOS (endothelial nitric oxide synthase) – xido nítrico sintase endotelial

EPM – erro padrão da média

FAD (flavin adenine dinucleotide) – flavina adenina dinucleótido

FC – freqncia cardíaca

FMN (flavin mononucleotide) – flavina monucletido

FRDE – fator relaxante derivado do endotélio

GMPC (cyclic guanosine 3,5-monophosphate) – guanosina monofosfato cíclica

HDL (high-density lipoprotein) – lipoproteína de alta densidade

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) – molécula de adesão intercelular-1

IL (interleukin) – interleucina

INF-γ (interferon-γ) – interferon-γ

iNOS (inducible nitric oxide synthase) – xido nítrico sintase induzida

ip – intraperitnial

ko - knockout

LDL (low density lipoprotein)– lipoproteína de baixa densidade

LDLr^{-/-} - knockout para o receptor de LDL

M-CSF (macrophage-colony-stimulating factor) – fator estimulante da colônia de macrófagos

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)– proteína quimiotática de monócitos

mg/Kg – miligrama por quilograma

MIP-1- α (macrophage-inflammatory protein-1- α) – proteína inflamatória de macrófago-1- α

mmHg – milímetros de mercúrio

mmLDL (minimally oxidized low-density lipoprotein) – lipoproteína de baixa densidade minimamente oxidada

MMP (matrix metalloproteinase) – colagenase intersticial

MPO (myeloperoxidase) – mieloperoxidase

***NO** (nitric oxide) – óxido nítrico

NOS (nitric oxide synthase) – óxido nítrico sintase

nNOS (neuronal nitric oxide synthase) – óxido nítrico sintase neuronal

O₂⁻ - ânion superóxido

oxLDL (oxidized LDL) – lipoproteína de baixa densidade oxidada

PAD – pressão arterial diastólica

PAM – pressão arterial média

PAS – pressão arterial sistólica

PBS (phosphate-buffered saline) – tampão fosfato

ROS (reactive oxygen species) – espécies reativas de oxigênio

RSNOs (S-nitrosothiols) – S-nitrosotióis

SMase (sphingomyelinase) – esfingomielinase

SMCs (smooth muscle cell) – células musculares lisas

SNAC (S-nitroso-N-acetylcysteine) – S-nitroso-N-acetilcisteína

sPLA₂ (secretory phospholipase 2) – fosfolipase secretória 2

SR-A (scavenger receptor class A)– receptor *scavenger* tipo A

TNF- α (tumor necrosis factor alpha) – fator de necrose tumoral- α

VCAM-1 (vascular adhesion molecule) – molécula de adesão vascular-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fotomicrografias de lesões ateroscleróticas na aorta proximal ascendente de camundongos LDLr ^{-/-} (aumento 400x)	24
Figura 2- Fotomicrografias de lesões ateroscleróticas na aorta proximal ascendente de camundongos LDLr ^{-/-} (aumento 1000x)	25
Figura 3- Área de lesão aterosclerótica em aorta proximal ascendente de camundongos HC 15d e HC 60d.....	26
Figura 4- Efeito do tratamento com SNAC na área de lesão aterosclerótica em aorta proximal ascendente de camundongos HC 15d e HC SNAC.....	27
Figura 5- Fotomicrografias da região arco aórtico de camundongos LDLr ^{-/-} e WT mostrando a expressão de CD40L.....	28
Figura 6- Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos LDLr ^{-/-} e WT mostrando a expressão de α -actina.....	29
Figura 7- Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos LDLr ^{-/-} e WT mostrando a expressão de eNOS.....	31
Figura 8- Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos LDLr ^{-/-} e WT mostrando a expressão de nNOS.....	32

Figura 9- Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos LDLr -/- e WT mostrando a expressão de iNOS.....	33
Figura 10. Pressão arterial sistólica de camundongos LDLr -/- e WT.....	36
Figura 11. Pressão arterial diastólica de camundongos LDLr -/- e WT.....	37
Figura 12. Pressão arterial média de camundongos LDLr -/- e WT.....	38
Figura 13. Frequência cardíaca de camundongos LDLr -/- e WT.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Área imunorreativa em artéria aorta de camundongo.....	34
Tabela 2. Pressão Arterial e Frequência Cardíaca em Camundongos LDLr-/- e WT.....	35

RESUMO

Objetivos: Várias vias inflamatórias têm participação no processo aterosclerótico. Diferentes marcadores do processo inflamatório e da disfunção endotelial têm sido utilizados para prever o risco de futuro desenvolvimento ou complicação das doenças cardiovasculares. Atualmente, marcadores como o CD40L tem se mostrado importante no prognóstico de risco clínico. Os efeitos antiinflamatórios do nitrosotiol, doador de NO , S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) foram verificados em camundongos LDLr^{-/-}, com objetivo de testá-lo na prevenção precoce do desenvolvimento da placa aterosclerótica, bem como nas mudanças de pressão arterial e de expressão das NO sintases. **Métodos e Resultados:** Camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta enriquecida com 0,5% de ácido cítrico e 1,25% de colesterol apresentaram aumento na expressão aórtica de CD40L, tanto nas fases iniciais (HC15d) quanto nas fases mais avançadas da aterosclerose (HC60d) e em uma relação inversa com a expressão de α -actina. Camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta comercial (CT) apresentaram aumento na expressão de eNOS e nNOS em relação aos camundongos selvagens (C57BL6). Foi também verificado aumento na expressão das 3 isoformas de NOS nos camundongos alimentados com dieta hipercolesterolêmica em relação ao CT. Pressão arterial aumentada foi determinada em camundongos LDLr^{-/-} em relação aos selvagens. A administração de SNAC (0,51 $\mu\text{mol/Kg/dia}$ i.p. por 15 dias) promoveu uma redução de 49% na área de lesão aterosclerótica, associada a uma diminuição na expressão aórtica das NOS e de CD40L, mas sem alteração no aumento pressórico. **Conclusão:** Concluímos que a deleção gênica do receptor de LDL nos

camundongos produziu alteração nos marcadores propostos para inflamação e disfunção endotelial, mostrando-se responsável pela hipertensão, sendo que ambas foram caracterizadas neste modelo animal. O tratamento com SNAC mostrou-se eficaz na prevenção do estabelecimento do ateroma, por meio de processo antiinflamatório. Entretanto, a administração de SNAC não foi capaz de promover alterações no aumento pressórico verificado nos camundongos LDLr-/-.

ABSTRACT

Background: Several inflammatory pathways have been shown to participate in the atherosclerotic process. Different markers for inflammation and endothelial dysfunction have been found to predict the future risk for developing cardiovascular disease. Newer markers such as CD40 ligand appear to provide important information regarding clinical risk. In hypercholesterolemic LDLr^{-/-} mice, we addressed anti-inflammatory effects of the nitrosothiol [•]NO donor S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) in the early prevention of plaque development as well as changes in blood pressure and [•]NO synthase expression. **Methods and Results:** LDLr^{-/-} mice fed with 0.5 % colic acid and 1.25 % cholesterol-enriched diet showed increased aortic expression of CD40L that was related to initial (HC 15d) and advanced (HC 60d) phases and inversely related with α -actin expression. Expression of eNOS and nNOS was higher in the LDLr^{-/-} than Wild Type (C57BL6) mice, as well as, there was a larger expression of three isoforms of NOS in LDLr^{-/-} mice fed with HC diet. Increase in the blood pressure was present in LDLr^{-/-} in relation to Wild Type mice. SNAC administration (0.51 μ mol/Kg/day i.p. for 15 days) promoted 49% of reduction in atherosclerotic lesion area associated with the prevention of this increased NOS and CD40L expression but without alterations in the increased blood pressure. **Conclusion:** We concluded that the genetic deletion of LDL receptor in mice produced alterations on the markers proposed to the inflammation and endothelial dysfunction, and showed to be responsible for hypertension, both characterized in this animal model. The SNAC treatment showed efficacy in the prevention of atheroma establishment by anti-

inflammatory process. Nevertheless, the SNAC treatment was not capable to promote alterations in the increased blood pressure, which was verified in these ko mice.

I – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A trílogia composta pelo processo inflamatório (Libby *et al*, 2002), disfunção do endotélio (Keaney Jr, 2000) e estresse oxidativo (Harrison, 1997) no ambiente vascular, tem sido considerada como o denominador comum dentre os mecanismos que promovem e sustentam a aterogênese. Particularmente, o estresse oxidativo, o qual exerce um importante papel na fisiopatologia da disfunção endotelial, presente tanto nas fases mais iniciais quanto nas fases mais adiantadas de fibrose do ateroma (Harrison, 1997; Libby *et al*, 2002).

A aterogênese pode ser entendida como uma doença progressiva e degenerativa no ambiente vascular de grandes artérias. Dentre os mecanismos que participam do desenvolvimento desta patologia, destacam-se os seguintes:

- a) Efeito da LDL (lipoproteína de baixa densidade) modificada, particularmente quando oxidada ou nitrosada;
- b) Produção insuficiente de FRDEs (fatores relaxantes derivados do endotélio), especialmente o NO (óxido nítrico);
- c) Redução do acesso e/ou destruição acelerada de FRDE(s);
- d) Produção anormal de radicais livres derivados de oxigênio e defesas antioxidantes (Edwards *et al*, 1998; Eiserich *et al*, 1998; Hoog *et al*, 1993).

Este processo foi dividido em diferentes estágios para efeitos de classificação, os quais foram aprovados pela *American Heart Association* e atualmente adotados como referencial por diversos pesquisadores (Stary *et al*, 1992, 1994).

Segundo Smithies e Maeda (1995) os camundongos naturalmente apresentam níveis de HDL elevados enquanto que níveis de LDL são baixos em relação aos níveis encontrados em humanos, sendo que tais condições exercem um papel protetor contra a aterosclerose. Camundongos também apresentam a ausência da lipoproteína(a), uma lipoproteína pró-aterogênica presente em humanos. Embora existam diferenças no transporte e no metabolismo de lipídios entre camundongos e humanos, alterações em partes específicas das vias tornam as duas espécies similares.

Nas décadas de 60 e 70, foram desenvolvidas dietas capazes de induzir uma hiperlipidemia leve em camundongos (Vesselinovitch e Wissiler, 1968; Vesselinovitch *et al*, 1968). Uma vez alimentadas por vários meses com tais dietas, certas cepas desenvolveram lesões com estrias de gordura na aorta proximal (Roberts, 1976). No início da década de 80, vários pesquisadores caracterizaram as lipoproteínas e demonstraram as diferenças nos níveis destas associadas às diferentes cepas de camundongos (LeBoeuf *et al*, 1983; Lusic *et al*, 1983). Paigen *et al* (1987) desenvolveu um método que permitiu quantificar lesões ateroscleróticas em camundongos. Na década de 90, a engenharia genética permitiu o desenvolvimento de modelos de camundongos transgênicos capazes de desenvolver lesões avançadas em contraste com as discretas lesões observadas em camundongos selvagens alimentados com dietas aterogênicas (Breslow, 1996). Atualmente, há concordância de que camundongos *knockout* para ApoE (apolipoproteína E) ou para o receptor de LDL podem desenvolver lesões que compartilham aspectos

semelhantes às lesões humanas avançadas (Rosenfeld *et al*, 2000; Calara *et al*, 2001; Johnson e Jackson, 2001; Song *et al*, 2001).

1.1 Aterosclerose e seus diferentes estágios

A aterosclerose se constitui de uma patologia com desenvolvimento dinâmico e presença de elementos característicos nas diferentes fases do processo. Há enorme interesse em se determinar marcadores ou fatores indicadores para as diferentes fases, tanto em humanos, como em diferentes modelos de estudo como, por exemplo, os camundongos transgênicos e *knockout* (Lusis, 2000). Contudo, marcadores específicos de uma determinada fase e sua correlação com as alterações estruturais decorrentes da patologia, ainda encontram-se em estudo. Os diferentes estágios são caracterizados por meio de evidências estruturais e da expressão de fatores indicadores ou marcadores nas lesões, segundo Lusis (2000) e Lusis *et al* (2004).

Lesão tipo I (Inicial): Caracterizada pela infiltração de LDL na íntima, através das junções endoteliais. O local de maior ocorrência da lesão é em regiões das artérias expostas a fluxo sanguíneo turbulento, baixos fluxos ou ambos (Barakat e Lieu, 2003), e nas áreas onde o estresse de cisalhamento fluxo-induzido é baixo (Konowles e Maeda, 2000). Sua retenção na parede do vaso envolve interações entre a fração Apo B (apolipoproteína B) da LDL e proteoglicanos da matriz extracelular. Neste ambiente diferente do plasmático a LDL sofre modificação, incluindo oxidação, lipólise, proteólise e agregação. As modificações iniciais são caracterizadas pela formação da mmLDL (lipoproteína de baixa densidade minimamente oxidada). Enzimas envolvidas nesta modificação incluem: 15-LO

(15-lipoxigenase), iNOS (óxido nítrico sintase induzida), MPO (mieloperoxidase) e várias lipases.

Lesão tipo II (Inflamação): As mmLDL têm atividade pró-inflamatória, mas não são suficientemente modificadas a ponto de serem reconhecidas pelos receptores responsáveis pela remoção da oxLDL (LDL oxidada). Contudo, são eficientes no estímulo às células endoteliais em produzir numerosas moléculas pró-inflamatórias, incluindo moléculas de adesão como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), VCAM1 (molécula de adesão vascular), PCAM-1 (molécula de adesão plaqueta-endotelial) e P selectina, as quais exercem efeito quimiotático para monócitos e células T, bem como os fatores de crescimento como o M-CSF (fator estimulante da colônia de macrófagos).

Lesão tipo III (Formação das células espumosas): Agregados de LDLs altamente oxidadas são formados no vaso como resultado da ação das ROS (espécies reativas de oxigênio) e das enzimas como SMase (esfingomielinase), sPLA₂ (fosfolipase secretória 2), outras lipases e MPO (mieloperoxidase). Este agregado é reconhecido pelos receptores *scavenger* dos macrófagos (SR-A – receptor *scavenger* tipo A, CD36 e CD68). A expressão destes receptores são mediados por citocinas como TNF- α (fator de necrose tumoral- α) e IFN- γ (interferon- γ).

Lesão Tipo IV (Formação da placa e fibrose): Caracterizada pelo aumento da massa lipídica extracelular, em sua maioria colesterol e seus ésteres, e pelo acúmulo de SMCs (células musculares lisas). Citocinas e fatores de crescimento secretado pelos macrófagos e células T são importantes para migração e proliferação das SMCs. A interação do CD40 com seu ligante CD40L (CD154) tem um importante papel no desenvolvimento de lesões avançadas. O produto desta interação constitui-

se de citocinas inflamatórias, proteases como MMP-1 (matriz metaloproteinase -1), MMP-3 e MMP-9, responsáveis pela degradação de matriz, além de moléculas de adesão como VCAM-1, E-selectin e ICAM-1.

Lesão Tipo V (Lesões complexas e trombose): Este estágio é caracterizado pelo ateroma com múltiplos núcleos de lipídeos e centros necróticos na íntima. Evidencia-se tecido altamente desorganizado pela apoptose e presença de áreas de calcificação resultando na placa de fibroateroma com áreas calcificadas. Quando há presença de cápsula fibrosa delgada devido à ação de degradação de matriz por várias proteinases, tem sido denominada de placa vulnerável e apresenta aumento de células inflamatórias com freqüente ruptura do endotélio subjacente a lesão. Assim, com freqüência verificam-se vestígios de ruptura da placa e presença de plaquetas e fibrina. Tal ruptura expõe o colágeno e fatores teciduais, formando os trombos que podem ser visualizados na base da membrana da íntima. Vários fatores determinam a desestabilização do ateroma e promovem a trombose, dentre eles, a inflamação e as respostas por ela desencadeada parecem ser as mais relevantes.

1.2 Aterosclerose e hipertensão arterial

Numerosas evidências têm demonstrado a perda de motricidade vascular dependente do endotélio associada à hipertensão arterial (K-Laflamme *et al*, 1998). Esta disfunção pode ocorrer em decorrência da redução de fatores vasodilatadores e/ou aumento de vasoconstritores, ou seja, uma mudança compensatória nos diversos mediadores vasoativos. Tal decréscimo de motricidade vascular contribui para o aumento sustentado da resistência vascular periférica total, bem como das

doenças cardiovasculares. A integridade do endotélio exerce importância tanto nos mecanismos de regulação da motricidade arterial *per se* como nos de controle de pressão arterial promovidos pelo sistema renina-angiotensina (Goto *et al*, 2004). Contudo, tem sido demonstrado que a própria hipertensão, ou mediadores como a angiotensina II, via redução na produção do NO , aumento na produção dos fatores constritores derivados do endotélio e aumento na geração de radicais livres derivados do oxigênio promovem a disfunção endotelial (Vanhoutte, 1996). Há concordância na atual literatura, de que a disfunção endotelial constitui-se de fator agravante e potente na perpetuação do quadro hipertensivo, atuando na precipitação de eventos trombóticos e na promoção da estenose e remodelamento vascular, por meio da estimulação da proliferação de SMCs. O efeito hipertensivo promovido pelos antagonistas da NOS em diversos modelos de estudo (Wang *et al*, 2003; Zatz e Baylis, 1998), bem como a verificação do aumento da pressão arterial em camundongos homozigotos com a deleção do gene da NOS endotelial (Biecker *et al*, 2004) demonstram claramente a participação do NO secretado no endotélio na regulação da pressão arterial.

Uma produção excessiva de ROS está implicada em diversos processos fisiopatológicos cardiovasculares, entre eles a hipertensão (Harrison, 1997). O estresse oxidativo atua diretamente nos processos celulares por meio da ativação das moléculas proinflamatórias como os fatores VCAM-1, ICAM-1 e MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos), as quais participam na indução e na progressão do processo aterosclerótico (Luft *et al*, 1999). Dentre as conseqüências deletérias do aumento da produção de superóxido mediado pela ação da angiotensina II, destaca-se a inativação do óxido nítrico com a formação de peroxinitrito (Harrison, 1997) e

sua conseqüente toxicidade e aumento da disfunção endotelial (Griendling *et al*, 1994; Laursen *et al*, 1997).

Em camundongos, a avaliação da pressão sistólica tem sido utilizada com maior freqüência nos estudos dos parâmetros cardiovasculares. Nestes estudos, métodos não invasivos computadorizados têm sido utilizados, nos quais temos avaliações fotoeletrônicas do fluxo sanguíneo caudal, inflação automática do *cuff* e gravação automática das medidas (Krege *et al*, 1995). Os estudos efetuados em diversas cepas de camundongos mostram que os valores de pressão arterial sistólica encontram-se no intervalo de 103 a 139 mmHg para machos e de 102 à 135 mmHg em fêmeas (Deschepper *et al*, 2004), enquanto que a freqüência cardíaca em ambos os sexos encontra-se no intervalo de 470 à 650 bpm (Rao e Verkman, 2000). São relativamente escassos os estudos da associação aterosclerose e hipertensão nos modelos de camundongos geneticamente modificados e geralmente concentram-se na cepa apoE ou cruzamento derivado destes. Dentre os estudos efetuados, destaca-se o de Chen *et al* (2001), o qual mostrou que a hipertensão em camundongos machos duplo *knockout* para apoE e eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) não promove aumento do potencial aterogênico.

1.3 Estresse oxidativo e LDL na aterosclerose

Há um aumento na produção de radicais livres durante o processo aterogênico, os quais aumentam a oxidação/nitração da LDL, ou seja, ocorre uma peroxidação de seus fosfolipídios. Tal condição potencializa o seu efeito lesivo a vários componentes celulares e promove alterações na reatividade vascular.

Segundo Libby et al (2000) o aumento da oxLDL, verificado por meio de sua imunorreatividade, está associado a maior probabilidade de instalação da placa e eventos isquêmicos agudos. A oxLDL pode exercer uma série de efeitos que contribuem para a formação da placa aterosclerótica, tais como: quimiotaxia de monócitos circulantes para a região subendotelial, formação de células espumosas e lesão direta do endotélio (Mehta *et al*, 1995; Liao *et al*, 1997).

O NO é produzido por enzimas denominadas NOS (óxido nítrico sintases), as quais apresentam-se sob três isoformas bem caracterizadas: a isoforma originalmente identificada no cérebro (NOS neuronal ou nNOS), em macrófagos (NOS induzida ou iNOS) e células endoteliais (eNOS) (Harrison, 1997). As NOS possuem em cada lado da molécula duas porções funcionalmente complementares. Na porção carboxiterminal, existe um domínio redutase (isto é, que recebe elétrons do NADPH) e na porção aminoterminal, existe o domínio oxidase (que abstrai um elétron do substrato L-arginina), o qual possui sítios de ligação para heme, para o co-fator tetraidrobiopterina e para o substrato L-arginina. As duas porções são unidas por um sítio de ligação para cálcio-calmodulina, essencial para o acoplamento funcional da transferência de elétrons dos grupos flavina para o heme (Stuehr *et al*, 2001). A produção de NO ocorre após cinco passos envolvendo transferência de elétrons, dada pela seguinte ordem NADPH – FAD (flavina adenina dinucleotídeo) – FMN (flavina monucleotídeo) – calmodulina – heme/oxigênio – L-arginina/ NO . A transferência de elétrons para o ferro heme induz a sua ativação, com conseqüente ligação ao oxigênio molecular, e este complexo catalisa a oxidação do nitrogênio guanidinoterminal da L-arginina,

resultando na síntese de NO e o subproduto L-citrulina (Govers e Rabelink, 2001; Sase e Michel, 1997).

O \cdot NO sintetizado no ambiente vascular não é somente um potente vasodilatador endógeno, mas também se constitui de agente inibitório na migração e na proliferação de SMCs, na adesão e agregação plaquetária, bem como na oxidação da LDL e na inflamação vascular. Uma série de estudos tem demonstrado que a redução da biodisponibilidade de \cdot NO está presente nos pacientes com hipertensão, aterosclerose e reestenose. Dentre os fatores responsáveis pela redução da bioatividade do \cdot NO tem sido verificado os seguintes: redução da atividade e/ou expressão das NOS, aumento da degradação de \cdot NO pelo O_2^- (ânion superóxido), anormalidades funcionais das NOS devido à deficiência de substrato ou co-fatores, diminuição da difusão do \cdot NO para SMCs ou uma diminuição da sensibilidade muscular lisa ao \cdot NO (Yokoyama, 2004).

1.4 Inflamação e aterosclerose

Atualmente, a aterosclerose tem sido descrita como uma doença autoimune, bem como considerada uma doença inflamatória crônica (Ross, 1999). Neste contexto, é evidente o papel do receptor CD40 e seu ligante CD40L no controle de processos em vários estágios da aterosclerose. A expressão e o papel da interação CD40-CD40L foi inicialmente descrito de maneira restrita à sua participação na ativação de células T e linfócitos B (Armitage *et al*, 1992; Lederman *et al*, 1992, 1996; Graf *et al*, 1992; Hollenbaugh *et al*, 1992; Duric *et al*, 1994; Lipsky *et al*, 1997). Porém, estudos posteriores mostraram esta interação por meio de sua

expressão em uma ampla variedade de células, incluindo células endoteliais, célula muscular lisa e macrófagos (Alderson *et al*, 1993; Armant *et al*, 1995; Reul *et al*, 1997; Cocks *et al*, 1993; Mach *et al*, 1997). Recentemente, foi demonstrado em artérias carótida e aorta de humanos a presença de CD40-CD40L em sítios de inflamação crônica, incluindo lesões ateroscleróticas (Reul *et al*, 1997; Mach *et al*, 1997; Gaweco *et al*, 1999; Afford *et al*, 1999).

Umás séries de estudos mostram o papel do CD40 como molécula sinalizadora dos processos envolvidos na aterosclerose em diferentes estágios, compreendendo fases de: início, evolução e complicações agudas após a ruptura da placa. Tais evidências foram relacionadas ao fato de que ligação entre CD40 e CD40L induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (Karmann *et al*, 1995; Hollenbaugh *et al*, 1995; Yellin *et al*, 1995) e estimula a liberação de quimiocinas, como IL-8 e MIP-1- α (proteína inflamatória de macrófago 1 α) (Kiener *et al*, 1995; Henn *et al*, 1998; Kornbluth *et al*, 1998), sendo que tais moléculas participam de fases iniciais da aterosclerose.

A formação do complexo CD40-CD40L também induz a expressão de citocinas, como IL-1 (interleucina-1), IL-6, IL-12, INF- γ em diferentes células, incluindo células endoteliais, musculares lisas e macrófagos *in vitro* (Mach *et al*, 1997; Kiener *et al*, 1995; Kato *et al*, 1996; Schönbeck *et al*, 1997; McDyer *et al*, 1998). Tais citocinas têm sido descritas em associação a reação inflamatória local durante a fase de evolução da aterosclerose. Em relação às fases de complicações tardias do ateroma, foi demonstrado que o CD40L nativo ou recombinante induz a expressão de certas enzimas, as quais são responsáveis pela degradação da matriz

protéica com conseqüente desestabilização da placa e trombose (Malik *et al*, 1996; Schönbeck *et al*, 1997; Mach *et al*, 1997, 1999; Sukhova *et al*, 1999). Assim, foi descrito que o complexo CD40-CD40L presente em células endoteliais, musculares lisas e macrófagos, encontra-se colocalizado às colagenases intersticiais e em sítios de colagenólise no ateroma humano, demonstrando-se a relevância do papel do CD40 como sinalizador na ruptura da placa. Estudos recentes demonstram que a formação do complexo CD40-CD40L induz a expressão de fatores teciduais pró-coagulantes em monócitos, células endoteliais e células musculares lisas, provavelmente promovendo uma atividade pró-coagulante (Mach *et al*, 1997; Zhou *et al*, 1998; Miller *et al*, 1998; Slupsky *et al*, 1998). Camundongos LDLr-/- (*knockout* para o receptor de LDL) tratados com anti-corpos contra CD40L e sob dieta hipercolesterolêmica por 12 semanas demonstraram grande redução na formação de lesões ateroscleróticas (Mach *et al*, 1998).

1.5 S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC)

Dentre os compostos que apresentam grande potencial como doadores de NO encontram-se os S-nitrosotióis (RSNOs) de baixo peso molecular. Os RSNOs são espécies endógenas e têm sido detectados em fluídos do revestimento das vias aéreas, nas plaquetas e em neutrófilos, atuando assim como carregadores de NO na forma de tíois livres ou em proteínas contendo cisteína em sistemas biológicos (Stamler, 1992).

Os RSNOs constituem-se de fármacos promissores a serem utilizados no tratamento de doenças que envolvem disfunções na disponibilidade de NO

(Eiserich, 1998). A formulação da SNAC foi estudada nos últimos anos pelo laboratório do Professor Doutor Marcelo Ganzarolli de Oliveira do Instituto de Química-IQ, Unicamp. Sua formulação foi desenvolvida com objetivo de prolongar a meia vida do $\cdot\text{NO}$ *in vivo* (Shishido e de Oliveira, 2000), o qual constitui-se da estratégia de síntese em meio aquoso e matriz de polietileno glicol usando-se uma mistura reativa de gases ($\cdot\text{NO}/\text{O}_2$). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que, a SNAC promoveu a prevenção na instalação da placa aterogênica e na hipertrofia ventricular. Verificamos que administração da S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) previne em 55% a formação da placa de aterosclerose em camundongos LDLr-/- sob dieta hipercolesterolêmica por 15 dias (Santos *et al*, 2005). Associada ao desenvolvimento da placa, foi verificada a presença de hipertrofia ventricular esquerda nestes camundongos tratados com dieta hipercolesterolêmica. Sobretudo, verificamos que a SNAC promoveu 100% de eficácia na prevenção da hipertrofia ventricular esquerda (Garcia *et al*, 2005).

II – OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- Caracterizar a área de lesão aterosclerótica na raiz aórtica em estágios precoces e avançados, induzidos por dieta hipercolesterolêmica durante 15 ou 60 dias;
- Analisar a evolução do processo inflamatório, por meio da imunorreatividade para CD40L nas lesões e sua relação com a imunorreatividade para α -actina.
- Verificar a disfunção endotelial por meio da imunorreatividade das NOS induzida e constitutivas nas artérias.
- Verificar a relação da pressão arterial com o tamanho da área de lesão após o período de 15 e 60 dias sob dieta hipercolesterolêmica;
- Verificar se o efeito protetor do tratamento com SNAC na aterogênese está relacionado às respostas inflamatórias e pressóricas.

III - MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados com camundongos selvagens (cepa C57BL6) e camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}), machos com 3 meses de idade, pesando 25 ± 3 g. Os animais foram adquiridos no Laboratório Jackson - EUA e criados no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Estadual de Campinas (Campinas, SP, Brasil) com controle de temperatura e controle de 12 horas no ciclo claro/escuro. O uso dos animais e o protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)-IB - UNICAMP sob processo número 521-1.

Os camundongos foram divididos em 6 grupos experimentais (n=6) assim constituídos:

Grupo 1) camundongos selvagens os quais receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias (**WT**);

Grupo 2) camundongos LDLr^{-/-} que receberam ração comercial (Nuvital®) por 15 dias (**CT 15d**);

Grupo 3) camundongos LDLr^{-/-} que receberam ração comercial por 60 dias (**CT 60d**);

Grupo 4) camundongos LDLr^{-/-} que receberam ração hipercolesterolêmica com 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico (AIN93G) por 15 dias (**HC 15d**);

Grupo 5) camundongos LDLr^{-/-} que receberam ração hipercolesterolêmica com 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico (AIN93G) por 60 dias (**HC 60d**);

Grupo 6) camundongos LDLr^{-/-} que receberam ração hipercolesterolêmica com 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico (AIN93G)) e tratamento com SNAC durante 15 dias, na dose de 0,51 μ mol/Kg ip (intraperitoneal) (**HC SNAC**).

Todos animais foram alimentados com as respectivas dietas e receberam água *ad libitum*.

3.2 Medida de Pressão Arterial e Freqüência Cardíaca

Inicialmente foi desenvolvido um protocolo para adaptação dos camundongos ao sistema Kent Scientific (XBP 1000) de medida de pressão arterial caudal. Após uma série de testes, verificamos que este protocolo deve ser constituído de 6 sessões de treinamento, composta de 15 ciclos de medidas em cada sessão, executadas durante o ciclo claro dos animais. Após tal período, a pressão arterial de cada animal, acordado, adaptado e em jejum de 12 horas, foi aferida no dia do sacrifício, utilizando-se 30 ciclos de medidas. As medidas foram arquivadas em planilhas eletrônicas e para efeito de análise foram consideradas as pressões que se encontravam relacionadas aos valores dentro das faixas consideradas normais de freqüência cardíaca (470 a 650 bpm) e volume caudal (25 a 50 μ L), para este sistema de medidas.

3.3 Área de Lesão na Aorta Proximal Ascendente

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal (ip) utilizando-se Xilazina/Ketamina (Bayer AS e Parke-Davis®, respectivamente) na

concentração de 6 - 40 mg/Kg, respectivamente. Após secção da aorta abdominal, seus corações foram perfundidos através do ventrículo direito com 6 ml de salina seguido de 6 ml de formoldeído 10%. Os corações foram removidos e fixados por 24 horas em formalina 10%, e então embebidos em gelatina (Sigma®) 5%, 10% e 25%. Processamento histológico e coloração dos cortes foram empregados como descrito por Paigen *et al* (1987). Resumidamente, após a aplicação de *Tissue Freezing Medium* (Sigma®) nos blocos de gelatina contendo os corações, este foi cortado transversalmente em criostato (HM 505 E Microm) a uma temperatura de -25°C com uma espessura de 10µm cada corte, 8 cortes por lâmina e 6 lâminas por animal, a partir do início da aorta, totalizando uma área de 480 µm, utilizando-se para a localização desta área a visualização microscópica das válvulas semi-lunares. Os cortes foram então corados com *Oil Red* (Amresco®) e contracorados com *Light Green* (Amresco®) e Hematoxilina de Harris (Sigma®). As lesões foram quantificadas como descrito por Rubin *et al* (1991), utilizando-se do programa Image Pro Plus software (versão 3.0) para análise da imagem. As áreas de lesões foram expressas como a somatória das lesões em 6 cortes de 10µm de espessura, com 80µm de distância entre os cortes, em uma área total de 480µm (medidas expressas em área x 10³ µm²).

3.4 Imunoistoquímica

Após toracotomia os arcos aórticos foram removidos e incluídos em parafina para cortes histológicos de 3µm de espessura, segundo Junqueira *et al* (1979). Os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio 3% para bloquear a atividade da

peroxidase endógena. Foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com leite desnatado 2% diluído em PBS (*phosphate-buffered saline*) 10Mm pH 7,4. As lâminas foram incubadas por 12 horas com anticorpo policlonal produzido em coelho anti-CD40L (Santa Cruz® 1:50), anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti- α -actina (Novocastra® 1:1000), anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti-desmina (Novocastra® 1:100), anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti-vimentina (Novocastra® 1:100) e anticorpos policlonais produzidos em coelho anti-eNOS, anti-iNOS e anti-nNOS (Santa Cruz® 1:100) em câmara úmida. Após a incubação com o anticorpo primário, foi feita a incubação com anticorpo secundário biotilado (kit Dako® LSAB+), durante 1 hora à 37°C. Para evidenciar as áreas imunorreativas os cortes foram incubados com o complexo conjugado com peroxidase (Dako® LSAB+), durante 45 minutos à 37°C e colocadas em solução de cromógeno (50mg de DAB em 50ml de PBS com 3ml de água oxigenada 10%) por 3 minutos. Após contra coloração com Hematoxilina de Harris (Sigma®) por 25 segundos as lâminas foram montadas e analisadas em microscópio óptico em um aumento de 400x.

3.5 Quantificação das áreas imunorreativas

Foram obtidas 8 fotomicrografias, a partir de um mesmo ponto pré-fixado, dos cortes transversais das aortas de cada animal utilizando-se a câmara digital acoplada ao programa Leica IM50 (versão 1.20). Cada fotomicrografia foi analisada pelo programa Bio ColorScanner, por meio do qual foram adquiridas as

porcentagens fracionais referentes as áreas imunorreativas da área total analisada e assim posteriormente expressa.

3.6 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm EPM. Teste *t* de Student não pareado foi utilizado para comparar as médias. Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste Tukey foi utilizada para comparar as médias entre diferentes grupos. Consideramos as diferenças significativas quando o valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas por observador único.

IV - RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Área de lesão na Aorta Proximal Ascendente

Os camundongos CT 15d e CT 60d não apresentaram diferenças em nenhum dos parâmetros analisados, portanto eles serão expressos como CT. Contudo, alguns camundongos CT mostraram coloração positiva em discretas áreas no segmento aórtico avaliado (figura 1A). Os camundongos HC 15d mostraram o desenvolvimento de placa aterosclerótica (figura 1 e 2B), significativamente menores que as desenvolvidas pelos camundongos HC 60d (figura 1D), sendo que nesse estágio mais avançado se encontram visualizadas regiões com núcleos necróticos, composto de debris celulares e depósito de lipídios, bem como uma diminuição da aparência elástica desse tecido (figura 2D). O tratamento produziu nos camundongos HC SNAC uma marcada redução na área de lesão aterosclerótica em relação aos camundongos HC 15d (figura 1 e 2C).

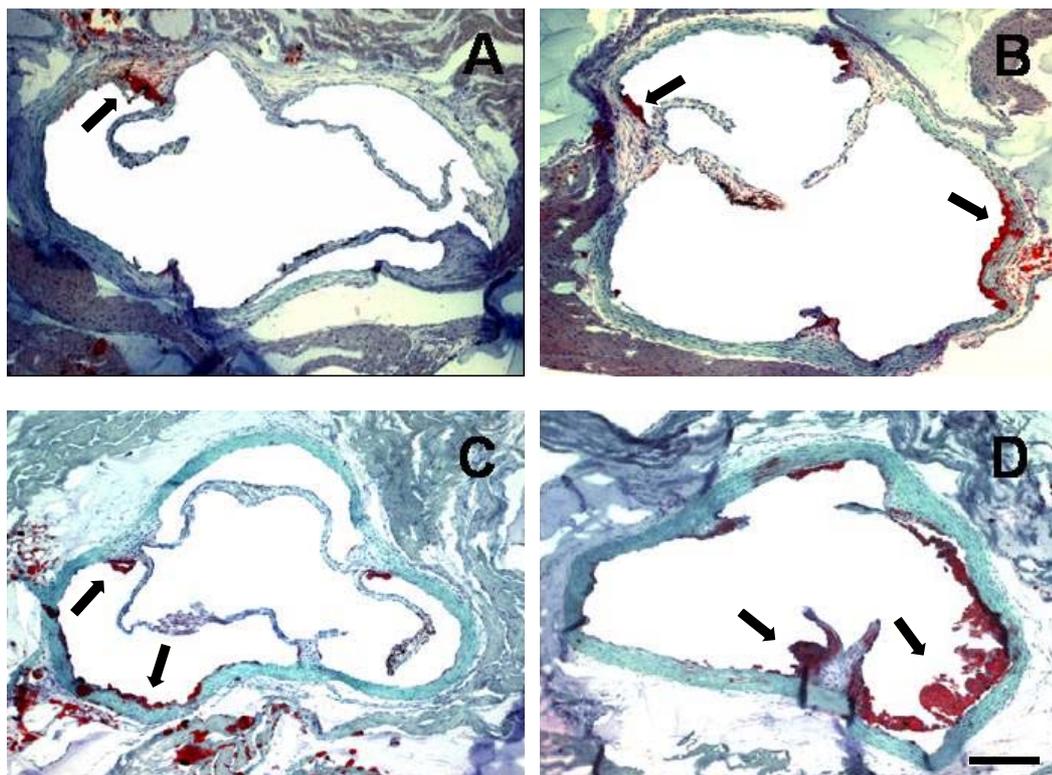


Figura 1. Fotomicrografias de secções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos *LDLr^{-/-}*. Setas indicam lesões ateroscleróticas representativas. Os cortes foram submetidos à coloração com Oil Red e Light Green. O painel A representa o grupo CT, B o grupo HC 15d, C o grupo HC SNAC e D o grupo HC 60d. Barra= 10 μ m.

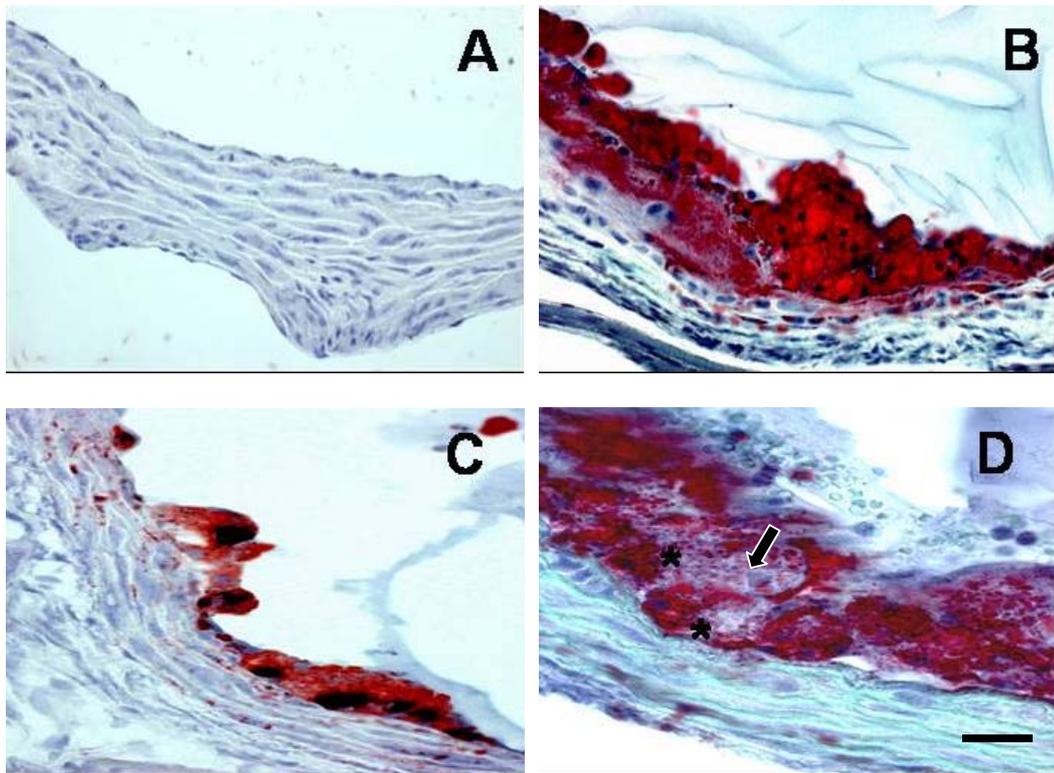


Figura 2. Fotomicrografias de secções transversais da aorta proximal ascendente de camundongos *LDLr*^{-/-}, mostrando lesões ateroscleróticas representativas. Seta indica núcleo necrótico. Os cortes foram submetidos à coloração com Oil Red e Light Green. O painel A representa o grupo CT, B o grupo HC 15d, C o grupo HC SNAC e D o grupo HC 60d.. Barra= 25 μ m.

Os camundongos HC 60d mostraram um acréscimo na área de lesão em aproximadamente 382,2% ($445,78 \pm 42,61 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ vs $92,45 \pm 3,75 \times 10^3 \mu\text{m}^2$), ou seja, 4,8 vezes maior em relação aos camundongos HC 15d (Figura 3).

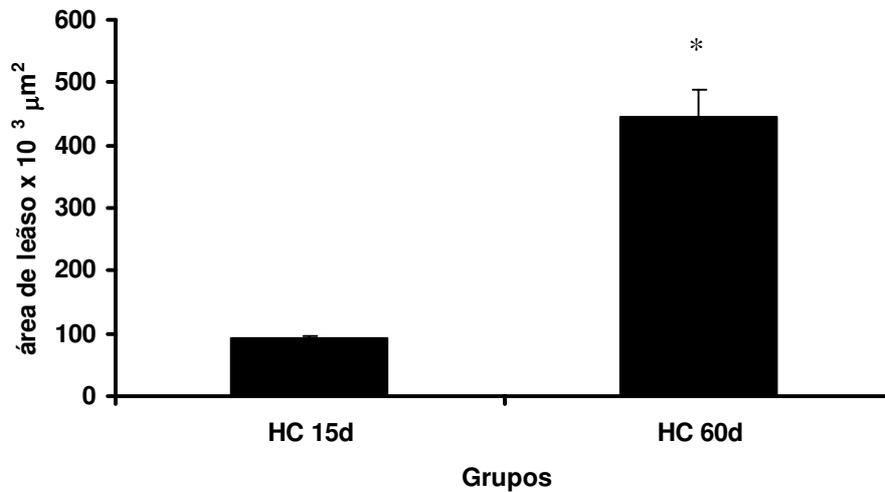


Figura 3. Área total de secção transversal da lesão aterosclerótica em aorta proximal ascendente de camundongos *LDLr^{-/-}*. As barras representam os camundongos HC 15d e camundongos HC 60d. Valores expressos em médias ± EPM, n=6/grupo (*p<0,0001).

O tratamento com SNAC produziu uma significativa redução na área total de lesão em aproximadamente 49% em relação aos camundongos HC 15d ($47,09 \pm 1,58 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ vs $92,45 \pm 3,75 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) (Figura 4).

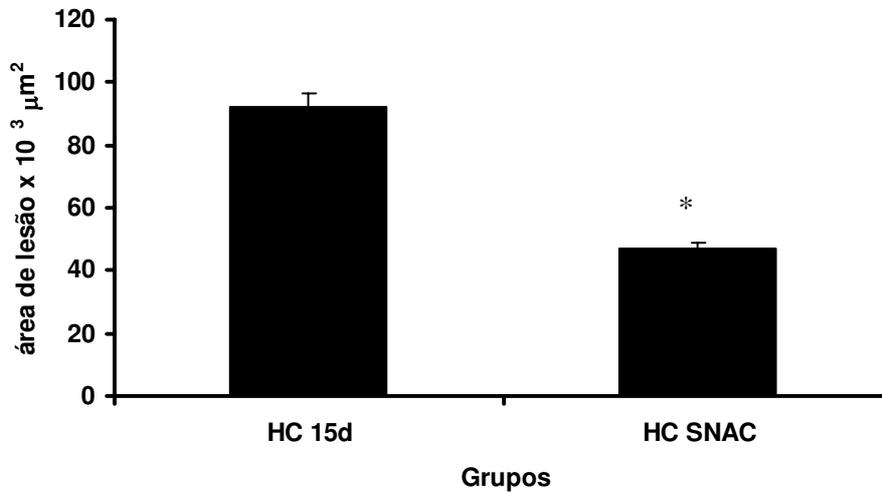


Figura 4. Efeito do tratamento com SNAC na área total de secção transversal da lesão aterosclerótica em aorta proximal ascendente de camundongos LDLr^{-/-}. As barras representam os camundongos HC 15d e camundongos HC SNAC. Valores expressos em médias \pm EPM, n=6/grupo (*p<0,0398).

4.2 Expressão de CD40L

A análise imunoistoquímica para verificação da expressão de CD40L foi feita em cortes histológicos transversais da região do arco aórtico. Foi verificada uma área imunorreativa dispersa na região da túnica média, íntima e adventícia. Houve maior expressão de CD40L nas aortas dos camundongos CT (figura 5B) em relação aos camundongos WT (figura 5A), enquanto que este aumento foi potencializado nos camundongos HC 15d (figura 5C). A análise mostra também, que o aumento verificado nos camundongos HC 15d em relação ao CT foi prevenido pelo tratamento com SNAC no período de quinze dias, o que pode ser visualizado na Figura 5D, sendo que os camundongos HC SNAC mostraram uma expressão semelhante grupo WT. Camundongos HC 60d tiveram um aumento

marcante na expressão de CD40L semelhante aos camundongos HC 15d (figura 5E).

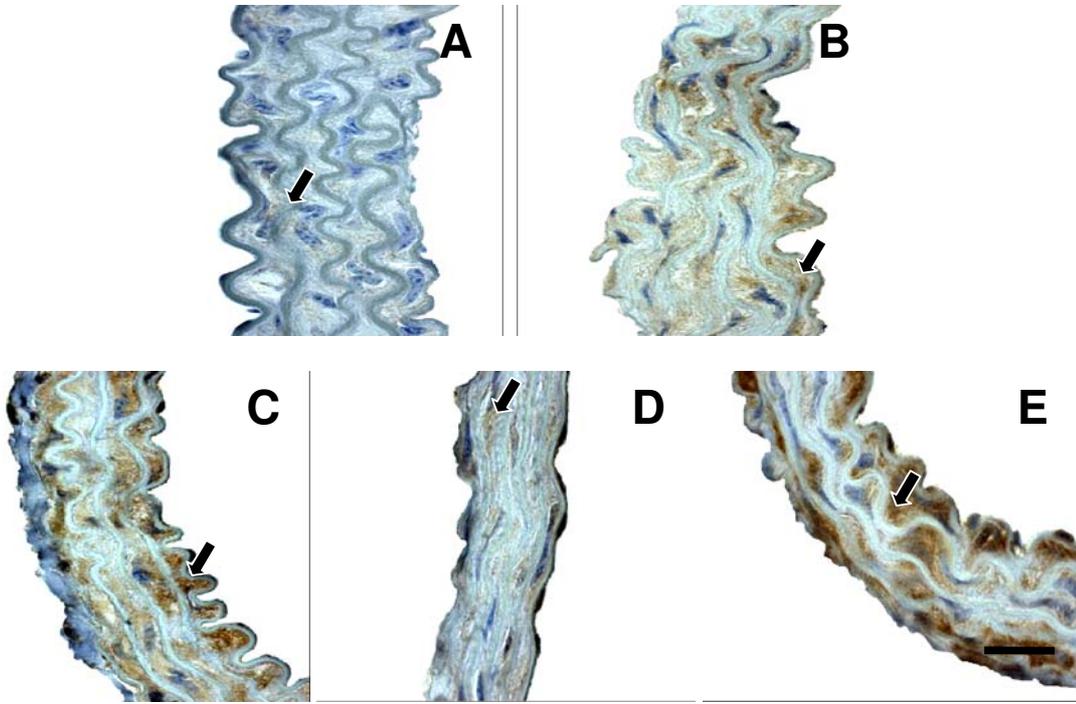


Figura 5. Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos *LDLr*^{-/-} e *WT* mostrando a expressão de CD40L. Os cortes foram submetidos a imunistoquímica para CD40L e contracoloração com Hematoxilina de Harris (HE). Setas indicam áreas imunorreativas. O painel A representa o grupo *WT*, B o grupo *CT*, C o grupo *HC 15d*, D o grupo *HC SNAC* e E o grupo *HC 60d*. Barra= 25 μ m.

4.3 Expressão de α -actina

A análise imunistoquímica para verificação da expressão de α -actina foi feita em cortes histológicos transversais da região do arco aórtico e mostrou uma marcação dispersa nas diferentes túnicas aórticas. Foram também realizados controles com desmina e vimentina em aorta com o objetivo de verificar se a reação para α -actina nas artérias era específica. Como resultado deste controle, nós não

verificamos marcação na incubação com desmina e vimentina. Camundongos CT e HC 15d (figura 6B e 6C) mostraram uma redução na expressão da α -actina em relação aos camundongos WT (figura 6A), sendo que o grupo HC 15d apresentou uma redução na expressão em relação ao grupo CT. O tratamento com SNAC durante quinze dias nos camundongos HC SNAC promoveu maior expressão da α -actina, em relação aos demais grupos (figura 6D), inclusive em relação aos camundongos WT (figura 6A), tido como expressão basal. Sobretudo, camundongos HC 60d apresentaram uma redução da expressão semelhante aos camundongos HC 15d (figura 6E).

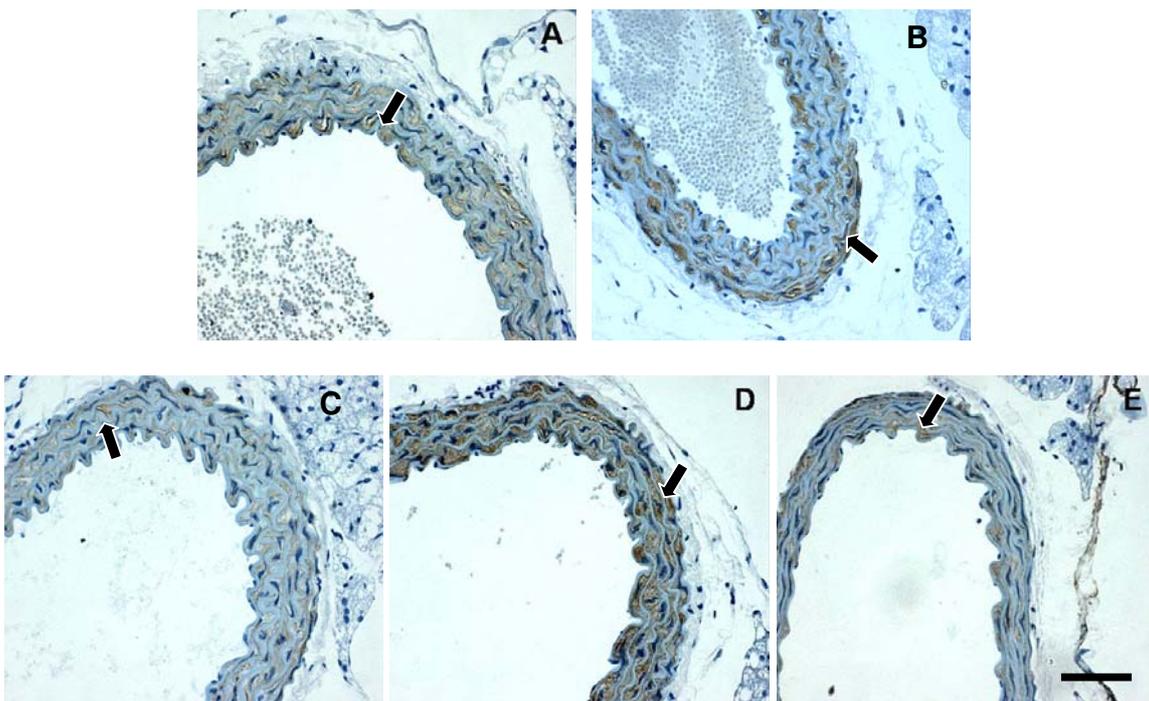


Figura 6. Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos *LDLr*^{-/-} e *WT*, mostrando a expressão de α -actina. Os cortes foram submetidos à imunohistoquímica para α -actina e contracoloração com Hematoxilina de Harris (HE). Setas indicam áreas imunorreativas. O painel A representa o grupo WT, B o grupo CT, C o grupo HC 15d, D o grupo HC SNAC e E o grupo HC 60d. Barra= 10 μ m.

4.4 Expressão de NOS

4.4.1 eNOS

A análise imunohistoquímica para verificação da expressão de eNOS foi feita em cortes histológicos transversais da região do arco aórtico. Foi verificada uma área imunorreativa dispersa na região da túnica média, sendo que nos camundongos HC 15 e 60d, houve expressão na íntima, bem como na túnica média. Houve maior expressão de eNOS nas aortas dos camundongos CT (figura 7B) em relação aos camundongos WT (figura 7A). A análise mostra também, que o aumento verificado nos camundongos HC 15d (figura 7C) em relação ao CT foi prevenido pelo tratamento com SNAC no período de quinze dias, o que pode ser visualizado na Figura 7D, sendo que os camundongos HC SNAC mostraram uma expressão semelhante grupo WT. Camundongos HC 60d mostraram um aumento marcante na expressão de eNOS semelhante ao grupo HC 15d (figura 7E).

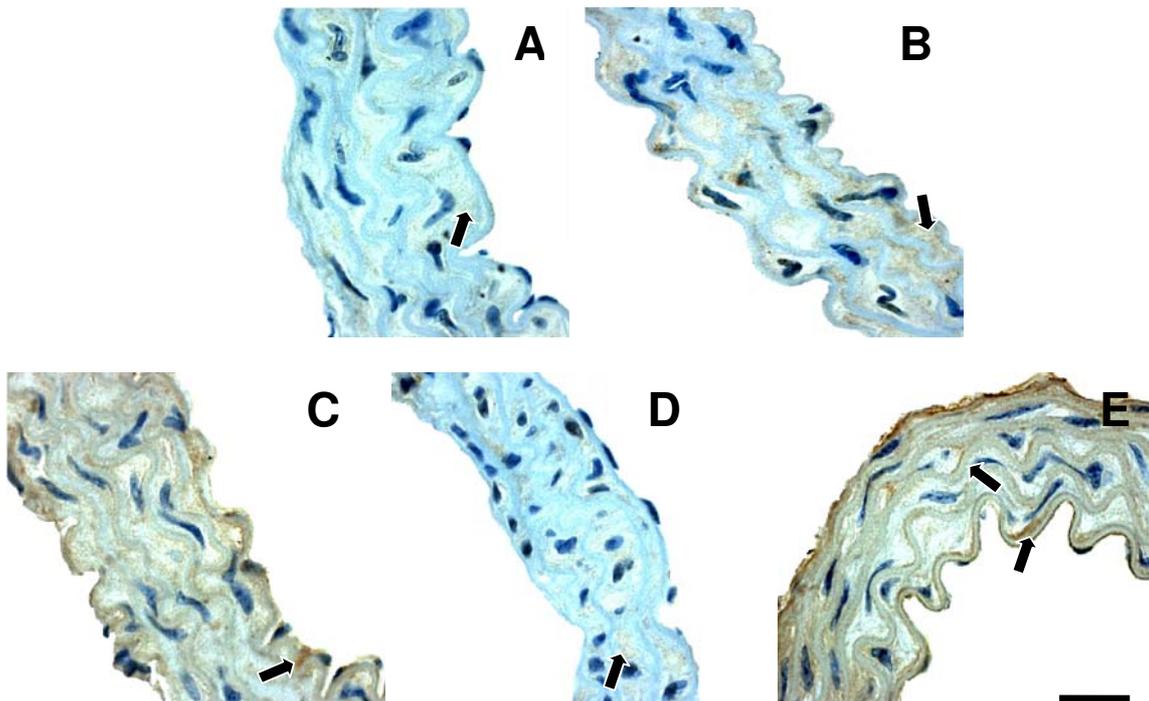


Figura 7. Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos LDLr $-/-$ e WT mostrando a expressão de eNOS. Os cortes foram submetidos à imunistoquímica para eNOS e contracoloração com Hematoxilina de Harris (HE). Setas indicam áreas imunorreativas. O painel A representa o grupo WT, B o grupo CT, C o grupo HC 15d, D o grupo HC SNAC e finalmente E o grupo HC 60d. Barra= 25 μ m.

4.4.2 nNOS

A análise imunistoquímica para verificação da expressão de nNOS foi feita em cortes histológicos transversais da região do arco aórtico. Foi verificada uma área imunorreativa dispersa na região da túnica média. Houve uma discreta expressão de nNOS nas aortas dos camundongos WT (figura 8A), sendo verificado um discreto aumento nos camundongos CT (figura 8B) e HC 15d (figura 8C), não havendo porém, diferenças entre esses grupos. O tratamento com SNAC no período de quinze dias (Figura 8D) impediu o aumento da expressão da nNOS que pode ser melhor verificada em camundongos HC 60d (figura 8E).

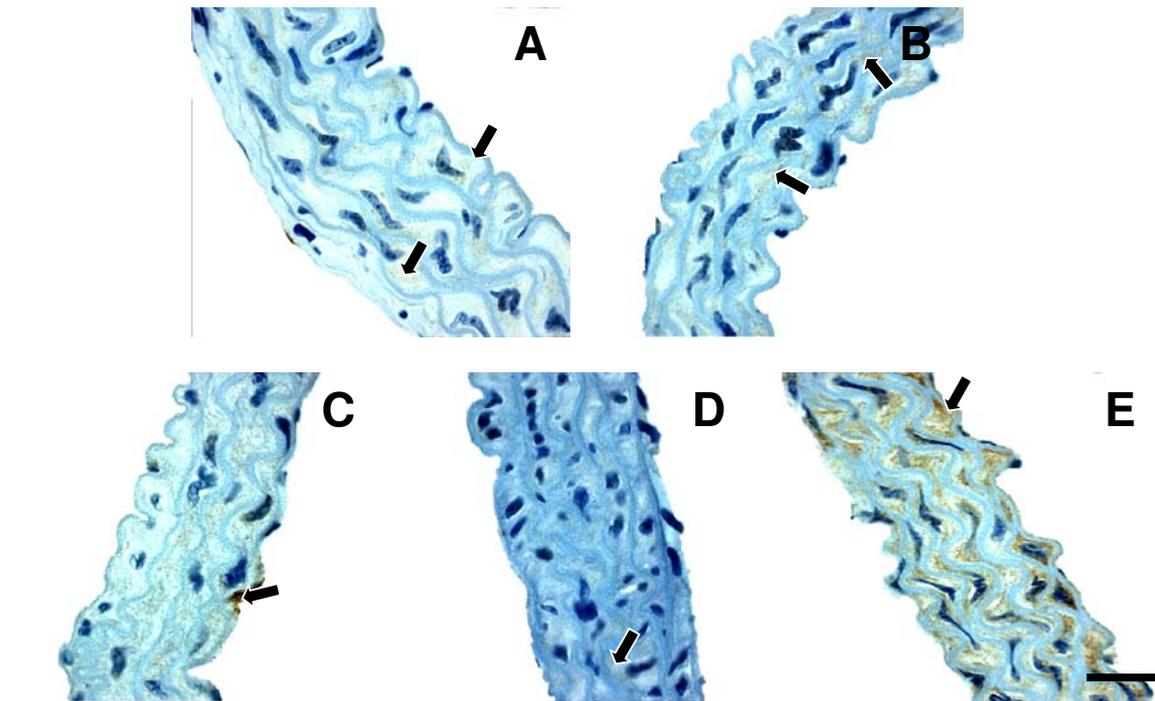


Figura 8. Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos LDLr $-/-$ e WT mostrando a expressão de nNOS. Os cortes foram submetidos à imunohistoquímica para nNOS e contracoloração com Hematoxilina de Harris (HE). Setas indicam áreas imunorreativas. O painel A representa o grupo WT, B o grupo CT, C o grupo HC 15d, D o grupo HC SNAC e finalmente E o grupo HC 60d. Barra= 25 μ m.

4.4.3 iNOS

A análise imunohistoquímica para verificação da expressão de iNOS foi feita em cortes histológicos transversais da região do arco aórtico. Foi verificada uma área imunorreativa dispersa na região da túnica média nos camundongos HC 15 e 60d. Não houve expressão de iNOS nas aortas dos camundongos WT (figura 9A) e CT (figura 9B). O tratamento com SNAC impediu o aumento de expressão da iNOS (figura 9D). A análise mostra que o aumento da expressão nos camundongos HC 15d (figura 9C) e HC 60d (figura 9E) são semelhantes em ambos os grupos.

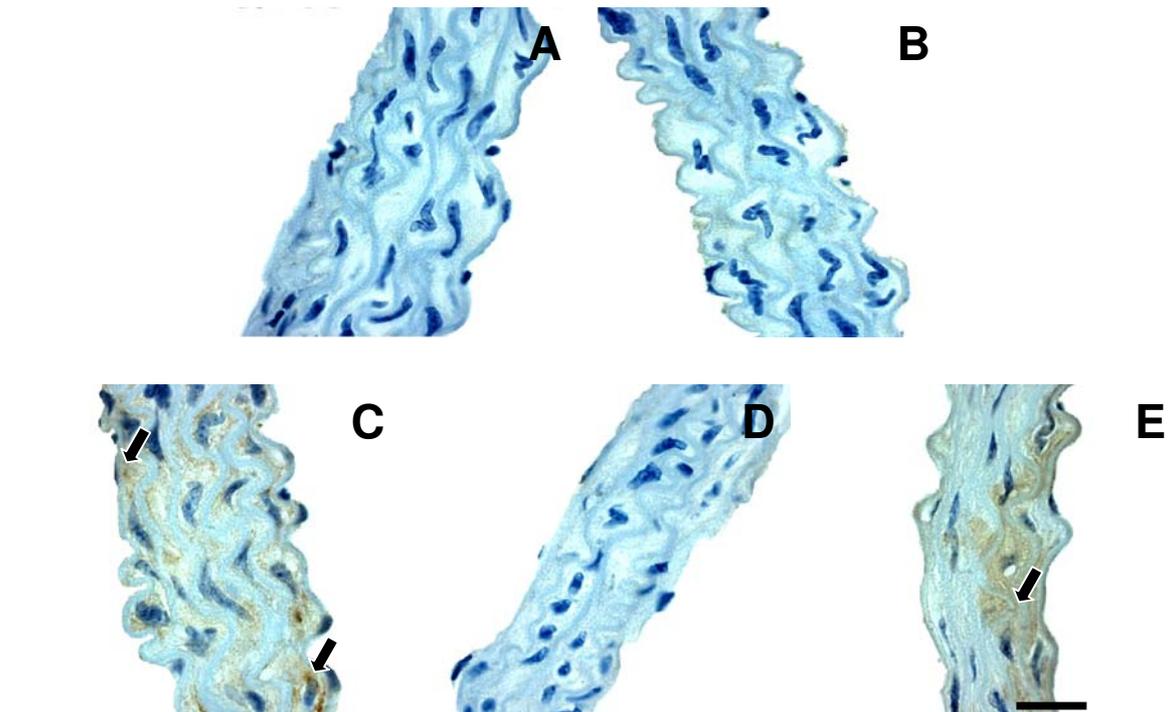


Figura 9. Fotomicrografias da região do arco aórtico de camundongos *LDLr^{-/-}* e *WT* mostrando a expressão de iNOS. Os cortes foram submetidos à imunohistoquímica para iNOS e contracoloração com Hematoxilina de Harris (HE). Setas indicam áreas imunorreativas. O painel A representa o grupo *WT*, B o grupo *CT*, C o grupo *HC 15d*, D o grupo *HC SNAC* e finalmente E o grupo *HC 60d*. Barra= 25 μ m.

4.5 Porcentagem de área imunorreativa

A tabela 1 demonstra os valores da porcentagem de área imunorreativa, em cortes transversais de artéria aorta de camundongos, obtidas em um exemplar de cada grupo experimental.

Tabela 1. Área imunorreativa em artéria aorta de camundongo.

Grupos	CD40L	α -actina	eNOS	nNOS	iNOS
WT	1,9	36,5	6,3	6,7	0
CT	24,0*	23,1*	18,1*	12,0*	0
HC 15d	39,3***	10,3***	43,3***	12,0	19,1***
HC SNAC	9,2**	48,2**	4,2**	6,3**	0**
HC 60d	45,9	10,2	41,1	21,0**	19,3

Valores expressos em médias. *p<0,05 em relação ao WT, **p<0,05 em relação ao HC15d, ***p<0,05 em relação ao CT.

4.6 Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

A tabela 2 mostra os valores de medida de pressões arteriais caudal e frequência cardíaca em camundongos machos conscientes.

Tabela 2. Pressão Arterial e Frequência Cardíaca em Camundongos LDLr^{-/-} e WT.

Grupos	PAS, mmHg	PAD, mmHg	PAM, mmHg	FC, bpm
WT	127,6±2,32	108,3±2,39	115±2,34	579±9,9
CT	140,6±2,72**	124,3±2,43*	130±2,04*	520±8,1**
HC 15d	141,9±1,96*	118,7±1,58**	126±1,67*	516±9,1*
SNAC	144,6±1,78*	120,1±2,00**	128±1,85*	517±11,1*
HC 60d	139,6±1,33**	120,2±1,18*	127±1,24*	512±8,31*

Valores expressos em médias \pm EPM; n=4 nos grupos WT e SNAC, n=6 nos grupos CT 15d, CT 60d e HC 60d e n=7 no grupo HC 15d. PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca. *p<0,001 e **p<0,01 em relação aos WT.

4.6.1 Pressão Arterial Sistólica

A figura 10 mostra os valores de pressão arterial sistólica caudal em camundongos conscientes. Foi verificado que os grupos CT, HC 15d, SNAC, e HC 60d não apresentaram diferenças entre si. Contudo, estes apresentaram uma pressão arterial sistólica significativamente mais elevada em relação aos camundongos WT, ou seja, um aumento de 10,2%, 11,2%, 13,3%, e 9,4% respectivamente nos valores basais de pressão arterial sistólica em relação ao grupo WT. Assim, verificou-se que o aumento dos níveis de pressão arterial sistólica relaciona-se a condição *knockout* e que o tratamento com SNAC no período de quinze dias não previne a hipertensão.

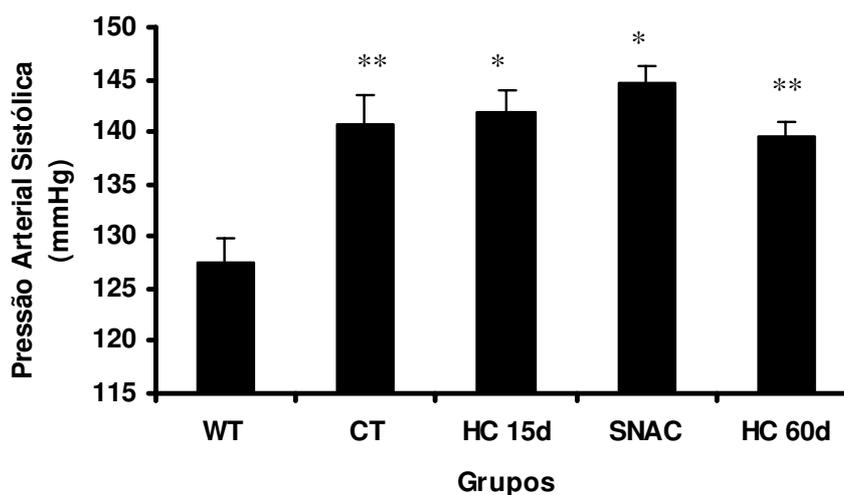


Figura 10. Pressão arterial sistólica de camundongos *LDLr* *-/-* e *WT*. Valores expressos em médias \pm EPM, $n=4$ nos grupos *WT* e *SNAC*, $n=6$ nos grupos *CT* e *HC 60d* e *HC 15d*. * $p<0,001$ e ** $p<0,01$ em relação aos *WT*.

4.6.2 Pressão Arterial Diastólica

A figura 11 mostra os valores de pressão arterial diastólica caudal em camundongos conscientes. Foi verificado que os grupos CT, HC 15d, SNAC, e HC

60d não apresentaram diferenças entre si. Contudo, estes apresentaram uma pressão arterial diastólica significativamente mais elevada em relação aos camundongos WT, ou seja, um aumento de 14,8%, 9,6%, 10,9% e 10,9% respectivamente nos valores basais de pressão arterial diastólica em relação ao grupo WT. Assim, verificou-se que o aumento dos níveis de pressão arterial sistólica relaciona-se a condição *knockout* e que o tratamento com SNAC no período de quinze dias não previne a hipertensão.

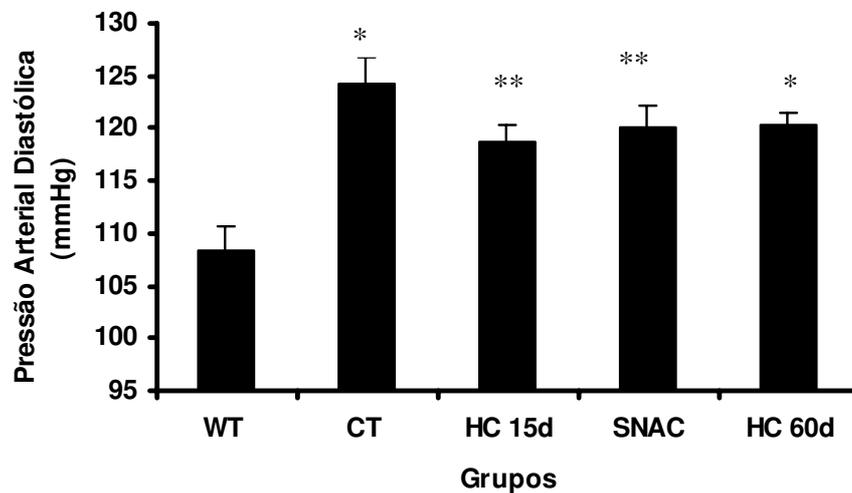


Figura 11. Pressão arterial diastólica de camundongos *LDLr* $-/-$ e WT. Valores expressos em médias \pm EPM, $n=4$ nos grupos WT e SNAC, $n=6$ nos grupos CT e HC 60d e HC 15d. * $p<0,001$ e ** $p<0,01$ em relação aos WT.

4.6.3 Pressão Arterial Média

A figura 12 mostra os valores de pressão arterial média caudal em camundongos conscientes. Foi verificado que os grupos CT, HC 15d, SNAC, e HC 60d não apresentaram diferenças entre si. Contudo, estes apresentaram uma pressão arterial média significativamente mais elevada em relação aos camundongos WT,

ou seja, um aumento de 13,0%, 9,6%, 11,3% e 10,4% respectivamente nos valores basais de pressão arterial média em relação ao grupo WT. Assim, verificou-se que o aumento dos níveis de pressão arterial sistólica relaciona-se a condição *knockout* e que o tratamento com SNAC no período de quinze dias não previne a hipertensão.

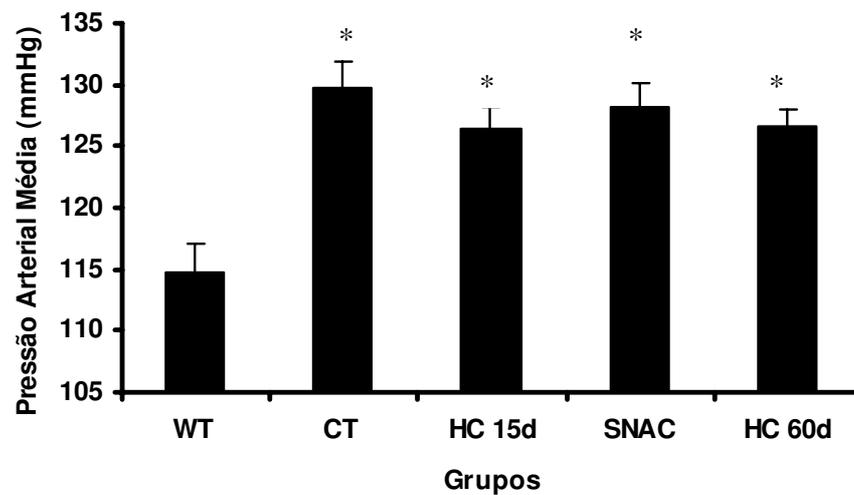


Figura 12. Pressão arterial média de camundongos *LDLr* *-/-* e WT. Valores expressos em médias \pm EPM, $n=4$ nos grupos WT e SNAC, $n=6$ nos grupos CT e HC 60d e HC 15d. * $p<0.001$ em relação aos WT.

4.6.4 Freqüência Cardíaca

A figura 13 ilustra os valores de freqüência cardíaca dos camundongos. Foi verificado que os grupos CT, HC 15d, SNAC e HC 60d não apresentaram diferenças entre si. Contudo, estes apresentaram freqüência cardíaca significativamente menor em relação aos camundongos WT, ou seja, um decréscimo de 10,2%, 10,9%, 10,7% e 11,6% respectivamente em relação aos valores do grupo WT.

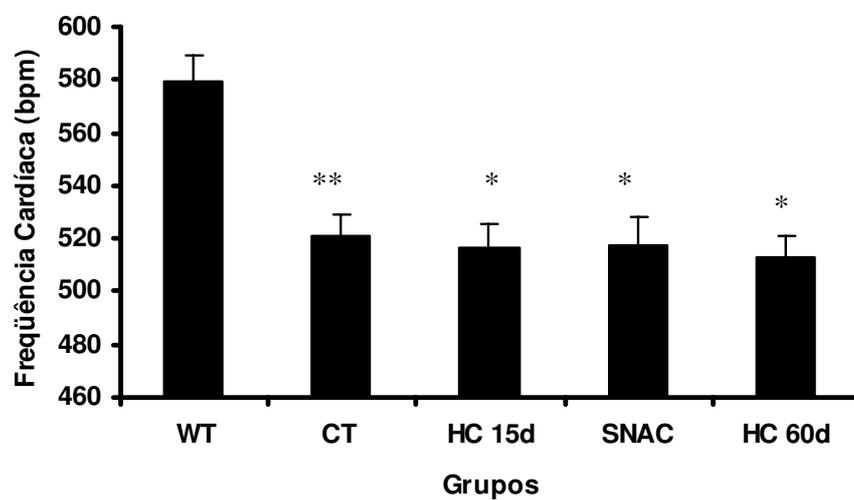


Figura 13. *Frequência cardíaca de camundongos LDLr^{-/-} e WT. Dados mostram médias ± EPM, n=4 nos grupos WT e SNAC, n=6 nos grupos CT, HC 60d e HC 15d. *p<0.001 e **p<0,01 em relação aos WT.*

V – DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O principal resultado deste estudo foi a verificação do efeito antiinflamatório promovido pela SNAC na prevenção parcial da aterogênese em camundongos HC 15d. Contudo, tal tratamento não foi capaz de exercer efeito hipotensor, uma vez que foi demonstrada que a deleção do gene que codifica a expressão do receptor de LDL para produção do *knockout* foi responsável pelo aumento na pressão arterial desta cepa animal. Este resultado havia sido verificado no estudo preliminar descrito por Trieu e Uckun (1998). Aspecto relevante de nosso estudo foi a identificação de um aumento na expressão do marcador inflamatório CD40L e a sua relação com fases mais precoces (HC 15d) e tardias (HC 60d) da aterosclerose, e ainda, as diferenças encontradas nestes diferentes estágios, como por exemplo, uma menor expressão de α -actina em camundongos HC 60d, em inversa relação ao marcador inflamatório CD40L. As avaliações nas expressões das NOS e sua relação com a disfunção endotelial, evidenciou que esta parece estar presente nos camundongos CT, independente da alimentação hipercolesterolêmica, devido a maior expressão de eNOS e nNOS nos camundongos CT em relação aos WT e, sobretudo devido a sua relação com a hipertensão arterial observada nesses camundongos. Adicionalmente, um maior aumento na expressão das três isoformas da NOS foi verificado nos camundongos alimentados com dieta hipercolesterolêmica e também a prevenção deste aumento pelo tratamento com SNAC durante quinze dias.

Os aumentos dos valores pressóricos no modelo *knockout* em relação ao camundongo selvagem podem ser atribuídos à disfunção endotelial que parece

acompanhar esta deleção gênica. Oliveira *et al* (2004) mostraram que ocorre uma diminuição do NADPH mitocondrial nestes modelos animais, a qual promoveu uma condição de estresse oxidativo, devido a uma redução do sistema antioxidante enzimático mitocondrial. Este estudo mostrou que as mitocôndrias dos camundongos ko LDLr^{-/-} produzem mais espécies reativas de oxigênio e com um maior estado oxidado do NADP mitocondrial. Estes camundongos também apresentaram uma síntese de lipídios totais e colesterol significativamente aumentada necessariamente consumindo mais NADPH hepático, bem como uma secreção duas vezes maior de triglicérides e colesterol em relação aos camundongos selvagens. Assim, até o presente momento estas são as únicas evidências que suportam a hipótese de uma disfunção endotelial nestes camundongos *knockout*. Estudos realizados em nosso laboratório por Garcia *et al* (2005), revelaram que camundongos CT apresentaram uma hiporresponsividade β_2 no miocárdio, resultando em um déficit contrátil desses em relação aos camundongos WT. No ambiente vascular, os receptores adrenérgicos α e β desempenham um papel importantíssimo na manutenção do tônus vascular e na homeostase da pressão arterial. Recentes estudos de nosso laboratório demonstraram que a resposta constritora a fenilefrina não está alterada. A resposta ao estímulo de receptores adrenérgicos tipo β_2 presentes no endotélio, produzem a ativação da eNOS e aumento de $\cdot\text{NO}$ no endotélio (Ferro *et al*, 1999). Contudo, ainda não verificamos a resposta β_2 adrenérgica na artéria do nosso modelo. Sendo assim, é possível explicar o aumento dos valores pressórico em nosso modelo devido ao resultado do desequilíbrio redox e da dislipidemia, com conseqüente diminuição da

biodisponibilidade de NO , contribuindo para um aumento nos valores pressóricos deste modelo animal.

Camundongos LDLr^{-/-} alimentados com ração comercial não apresentaram lesões ateroscleróticas significativas. A dieta hipercolesterolêmica durante quinze dias induziu a formação de placa aterosclerótica (camundongos HC 15d), sendo que uma evolução do quadro patológico foi evidenciada por múltiplos núcleos de lipídeos, centros necróticos e um desarranjo tecidual nas artérias de camundongos HC 60d. A interação CD40-CD40L desempenha um papel relevante tanto em fases iniciais quanto em fases mais avançadas da patologia (Schönbeck *et al*, 2000). Lutgens *et al* (2000), demonstrou que camundongos tratados com anticorpo anti CD40L têm aumento relativo de SMCs vasculares e miofibroblastos em relação aos camundongos não tratados com anticorpo anti CD40L. Em fases iniciais a interação CD40-CD40L está associada à expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e liberação de quimiocinas, como IL-8 e proteína inflamatória de macrófago 1 α (MIP-1- α), estando sua presença correlacionada com um aumento de vias pró-inflamatórias. Entre os vários produtos das células-T e macrófagos está também o INF- γ . Hansson *et al* (1989), demonstrou que o INF- γ tem uma ação antiproliferativa e antidiferenciadora em células musculares lisas. Tais evidências podem ser utilizadas para explicar a menor expressão de α -actina em camundongos HC 15 e 60d acompanhado de um aumento na expressão de CD40L tanto em fases iniciais como em fases mais avançadas do processo aterosclerótico. Sobretudo, o tratamento com SNAC no período de 15 dias mostrou marcado aumento na expressão de α -actina, não havendo imunorreatividade para desmina e vimentina,

provando que a marcação observada nas aortas é a expressão específica de α -actina, além de reduzir a expressão de CD40L, aproximando-se a níveis similares aos verificados nos camundongos WT.

Aumento na expressão de eNOS tem sido relatado em vários modelos animais de aterosclerose induzida pela dieta (Minor *et al*, 1990; Channon *et al*, 2000). As NOS constitutivas geralmente têm sido descritas como protetoras contra o desenvolvimento da aterosclerose (Channon *et al*, 2000). Estudos em camundongos apoE^{-/-} e deficientes de eNOS mostram que estes desenvolvem maiores lesões ateroscleróticas em relação aos camundongos apoE^{-/-}, indicando um papel protetor da eNOS na aterosclerose (Kuhlencordt *et al*, 2001; van Haperen *et al*, 2002). Contudo, um paradoxal aumento da extensão das lesões foi descrito nos camundongos que superexpressam eNOS (Ozaki *et al*, 2002). Assim, a maior expressão de eNOS vista em nosso modelo *knockout* em relação ao seu *background* C57BL6, pode ser considerada como uma alteração em resposta à disfunção endotelial promovida pelo estresse oxidativo e dislipidemia consequente da deleção gênica. Camundongos HC 15d e HC 60d mostraram uma expressão marcadamente aumentada em relação aos demais grupos, contudo semelhante entre si. O aumento marcante na expressão da nNOS nos camundongos HC 60d pode ser considerado como um mecanismo emergencial na produção de *NO que esta isoforma pode desempenhar. Este mecanismo compensatório está descrito na aterosclerose de humanos (Wilcox *et al*, 1997).

Ao contrário das isoformas constitutivas, a iNOS é independente da regulação pelo cálcio e é expressa em resposta a estímulos pró-inflamatórios pela ativação de citocinas (Nathan e Xie, 1994). A ativação da iNOS em resposta a

estímulos inflamatórios leva a uma produção bem maior de NO , sendo na ordem de 10^6 a 10^9 vezes quando comparado com a produção de NO pelas isoformas constitutivas (Michel e Feron, 1997). Camundongos HC 15 e 60d expressaram iNOS em resposta a inflamação desencadeada pela dieta hipercolesterolêmica, fornecendo um maior embasamento para defendermos a hipótese de que o tratamento com SNAC pode atuar como um agente antiinflamatório.

Verificamos que o tratamento com SNAC previne alteração na expressão das 3 isoformas de NOS, as quais foram separadamente discutidas. Entretanto, encontra-se bem descrito que os doadores de NO , os quais agem direta e indiretamente com as vias NOS constitutivas e induzidas (Ignarro e Napoli, 2004), têm a capacidade de reduzir a expressão de citocinas inflamatórias, como por exemplo IL-6 (Van Snick, 1990) e de moléculas responsáveis pela quimiotaxia de leucócitos durante respostas inflamatórias *in vivo* (Doherty *et al*, 1988; Oppenheim *et al*, 1991). De Caterina *et al* (1995) verificaram que o NO inibe significativamente a expressão de VCAM-1, E-selectin e IL-6, e em menor significância o IL-8 e ICAM-1 em cultura de células endoteliais humanas. Um dos mecanismos sugeridos para a inibição de VCAM-1 pelo NO seria via inibição do fator de transcrição NF- κ B, sendo que o papel do fator de transcrição NF- κ B na inflamação vascular encontra-se bem documentado. Assim, muitos genes que são regulados pelo NF- κ B nas SMCs vasculares codificam moléculas inflamatórias como VCAM-1, ICAM-1 e MCP-1, as quais participam do processo aterosclerótico (Kunsch e Medford, 1999).

Estudos realizados em nosso laboratório por Santos *et al* (2005) demonstraram o efeito anti-aterogênico e preventivo da SNAC no desequilíbrio redox. Garcia *et al* (2005) demonstraram, também em estudos realizados em nosso

laboratório, que a SNAC tem a capacidade de prevenir 100% da hipertrofia ventricular esquerda. O presente estudo demonstrou que os efeitos da SNAC ocorrem nos processos inflamatórios e que tais efeitos produzem redução na instalação do ateroma, mas não são capazes de modificar as alterações na pressão arterial.

VI. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que:

1) Camundongos *knockout* para o receptor de LDL sob dieta hipercolesterolêmica por um período de 60 dias, desenvolveram lesões ateroscleróticas na aorta proximal ascendente 5 vezes maiores em relação aos camundongos *knockout* para o receptor de LDL sob dieta hipercolesterolêmica por um período de 15 dias. Assim, houve no período estudado, uma evolução da lesão, a qual pode ser verificada pela inclusão de núcleos necróticos, associada a uma diminuição da característica elástica do tecido. A comparação de marcadores das células musculares lisas e da atividade inflamatória, evidenciaram diminuição da expressão de α -actina e aumento da expressão de CD40L, respectivamente na evolução do ateroma.

2) A expressão de CD40L como indicador do processo inflamatório, encontra-se relacionada tanto a estágios mais precoces (camundongos *knockout* para o receptor de LDL sob dieta hipercolesterolêmica por um período de 15 dias) como a estágios mais avançados (camundongos *knockout* para o receptor de LDL sob dieta hipercolesterolêmica por um período de 60 dias), no qual ocorreu maior expressão e uma relação inversa na imunorreatividade para α -actina.

3) Camundongos *knockout* para o receptor de LDL apresentam maior expressão de eNOS em relação aos camundongos selvagens, evidenciando uma disfunção endotelial presente neste modelo. Tal disfunção evidenciada pelo

aumento da imunorreatividade das NOS, parece estar presente tanto no período de 15 como de 60 dias de dieta hipercolesterolêmica.

4) Camundongos *knockout* para o receptor de LDL evidenciaram aumento de cerca de 10% na pressão arterial quando comparados aos respectivos *background*, camundongos selvagens. Contudo, a evolução da aterosclerose não promoveu alterações nos níveis pressóricos.

5) Foi verificado que o efeito protetor na aterogênese promovido pela SNAC está associado aos processos antiinflamatórias e alterações nas vias NO/NOS evidenciadas pela menor expressão de CD40L e de NOS, respectivamente. Contudo, tal efeito não produz alterações nas respostas pressóricas.

VII – REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afford SC, Randhawa S, Eliopoulos AG, Hubscher SG, Yong LS, Adams DH. CD40 activation induces apoptosis in cultured human hepatocytes via induction of cell surface fas ligand expression and amplifies fas-mediated hepatocyte death during allograft rejection. **J Exp Med** 189: 441-46, 1999.
- Alderson MR, Armitage RJ, Tought TW, Strockbinc L, Fanslow W.C, Sprrings MK. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. **J Exp Med** 178: 669-74, 1993.
- Armant M, Rubio M, Delespese G, Sarfati M. Soluble CD23 directly activates monocytes to contribute to the antigen-independent stimulation of resting T cells. **J Ummunol.**155:4868-75, 1995.
- Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbinc L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. **Nature** 357:80-2, 1992.
- Barakat AI, Lieu DK. Differential responsiveness of vascular endothelial cells to different types of fluid mechanical shear stress. **Cell Biochemistry and Biophysics** 38: 323-344, 2003.
- Biecker E, Sägesser H, Reichen J. Vasodilatador mRNA levels are increased in the livers of portal hypertensive NO-synthase 3-deficient mice. **European Journal of Clinical Investigation** 34:283-9, 2004.
- Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. **Science** 272:685-88, 1996.

- Calara F, Silvestre M, Casanada F, Yuan N, Napoli C, Palinski W. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. **J Pathol** 195:257-63, 2001.
- Channon KM, Qian H, George SE. Nitric oxide in atherosclerosis and vascular injury. **Arterioscler Throm Vasc Biol** 20:1873-1881, 2000.
- Chen J, Kuhlencordt PJ, Astern J, Gyurko R, Huang PL. Hypertension does not account for the accelerated atherosclerosis and development of aneurysms in male apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double knockout mice. **Circulation** 104:2391-4, 2001.
- Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE, Aversa G. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. **Int Immunol** 5: 657-63, 1993.
- De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J Clin Invest** 96:60-8, 1995.
- Deschepper CF, Olson JL, Otis M, Gallo-Payet N. Characterization of blood pressure and morphological traits in cardiovascular-related organs in 13 different inbred mouse strains. **J Appl Physiol** 97:369-76, 2004.
- Doherty DE, Downey GP, Worthen GS, Haslett C, Henson PM. (1988). Monocyte retention and migration in pulmonary inflammation. Requirement for neutrophils. **Lab Invest** 59:200-13, 1988.

- Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. **Immunol Today** 15:406-11, 1994.
- Edwards G, Weston AW. Endothelium-derived hyperpolarising factor a critical appraisal. **Prog Drug Res** 50:107-33, 1998.
- Eiserich JP, Patel RP, O'Donnel VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reaction and modification of biomolecules. **Mol Aspects Med** 19:221-357, 1998.
- Ferro A, Queen LR, Priest RM, Xu B, Ritter JM, Poston L, Ward JP. Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. **Br J Pharmacol** 126:1872-80, 1999.
- Garcia JAD, Santos L, Moura AL, Santos KFR, Wanschel ACBA, Shishido SM, Spadari-Bratfisch RC, de Oliveira MG, Laurindo FRM, Krieger MH. Hemodynamically-independent prevention of left ventricular hypertrophy in hypercholesterolemic LDLr^{-/-} mice by S-nitroso-N-acetylcysteine. **Circulation Research** , 2005 (submitted).
- Gaweco AS, Wiesner RH, Yong S, Krom R, Porayko M, Chejfec G, McClatchey KD, Van Thiel DH. CD40L (CD154) expression in human liver allografts during chronic ductopenic rejection. **Live Transpl Surg** 5: 1-7, 1999.
- Goto K, Fujii K, Kansui Y, Iida M. Changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor in hypertension and ageing: response to chronic treatment with renin-angiotensin system inhibitors. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 31:650-5, 2004.

- Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Renal Physiol** 280:193-206, 2001.
- Graf D, Korthauer U, Mages WH, Senger G, Krocck RA. Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. **Eur J Immunol** 22: 3191-94, 1992.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res** 74:1141-8, 1994.
- Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. **J Exp Med** 170:1595-608, 1989.
- Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. **J Clin Invest** 100:2153-7, 1997.
- Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Krocck RA . CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. **Nature** 391: 591-94, 1998.
- Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD, Chalupny NJ, Braesch-Andersen S, Noelle RJ, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. **Embo J** 11: 4313-21, 1992.
- Hoog N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Pathasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. **FEBS Lett** 334:170-4, 1993.

- Ignarro LJ, Napoli C. Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep** 6:281-7, 2004.
- Johnson JL, Jackson CL. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. **Atherosclerosis** 154:399-406, 2001.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius red staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J** 11:447-55, 1979.
- Karmann K, Hughes CC, Scheechnner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. **Proc Natl Acad Sci** 92: 4342-6, 1995.
- Kato T, Hakamada R, Yamanc H, Nariuchi H. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. **J Immunol** 156 : 3932-38, 1996.
- Keaney Jr. JF. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. **Molecular Aspects of Medicine** 21:99-166, 2000.
- Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. **J Exp Med** 155:4917-25, 1995.
- K-Laflamme A, Oster L, Cardinal R, de Champlain J. Role of NO and angiotensin II in the early development of endothelial functions impairment and cardiac hypertrophy in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **Can J Physiol Pharmacol** 76: 665-75, 1998.
- Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 20: 2336-45, 2000.

- Kornbluth RS, Kee K, Richman DD. CD40 ligand (CD154) stimulation of macrophages to produce HIV-1-suppressive beta-chemokines. **Proc Natl Acad Sci** 95:5205-10, 1998.
- Krege JH, Hodgins JB, Hagaman JR, Smithies O. Noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. **Hypertension** 25:1111-5, 1995.
- Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. **Circulation** 104:448-454, 2001.
- Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. **Circ Res** 85:753-66, 1999.
- Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. **Circulation** 95:588-93, 1997.
- LeBoeuf RC, Puppione DL, Schumaker VN, Lusis AJ. Genetic control of lipid transport in mice. I: structural properties and polymorphisms of plasma lipoproteins. **J Biol Chem** 258:5063-70, 1983.
- Lederman S, Cleary AM, Yellin MJ, Frank DM, Karpusas M, Thomas DW, Chess L. The central role of the CD40-ligand and CD40 pathway in T-lymphocyte-mediated differentiation of B lymphocytes. **Curr Opin Hematol** 3:77-86, 1996.
- Liao L, Starzyk RM, Granger DN. Molecular determinants of oxidized low-density lipoprotein-induced leukocyte adhesion and microvascular dysfunction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 17:437-44, 1997.

- Libby P, Aikawa M, Schönbeck U. Cholesterol and atherosclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta** 1529:299-309, 2000.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation** 105:1135-43, 2002.
- Lipsky PE, Attrep JF, Grammer AC, McIlraith MJ, Nishioka Y. Analysis of CD40-CD40 ligand interactions in the regulation of human B cell function. **Ann N Y Acad Sci** 815:372-83, 1997.
- Luft FC, Mervaala E, Muller DN. Hypertension-induced end-organ damage: A new transgenic approach to an old problem. **Hypertension** 33: 212-8, 1999.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. **Nature** 407:233-41, 2000.
- Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 5:189-218, 2004.
- Lusis AJ, Taylor BA, Wangenstein RW, LeBoeuf RC. Genetic control of lipid transport in mice. II: genes controlling structure of high density lipoproteins. **J Biol Chem** 258:5071-78, 1983.
- Lutgens E, Cleutjens KB, Heeneman S, Kotliansky VE, Burkly LC, Daemen MJ. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97:7464-9, 2000.
- McDyer JF, Goletz TJ, Thomas E, June CH, Seder RA. CD40 ligand/CD40 stimulation regulates the production of IFN-gamma from human peripheral blood mononuclear cells in an IL-12- and/or CD28-dependent manner. **J Immunol** 160: 1701-07, 1998.

- Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. **Nature** 394:200-3, 1998.
- Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci** 94:1931-36, 1997.
- Mehta A, Yang B, Khan S, Hendricks JB, Stephen C, Mehta JL. Oxidized low-density lipoproteins facilitate leukocyte adhesion to aortic intima without affecting endothelium-dependent relaxation. Role of P-selectin. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 15:2076-83, 1995.
- Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? **J Clin Invest** 100:2146-52, 1997.
- Miller DL, Yaron R, Yellin MJ. CD40L-CD40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression. **J Leukoc Biol** 63:373-9, 1998.
- Minor RL Jr, Myers PR, Guerra R Jr, Bates JN, Harrison DG. Diet -induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. **J Clin Invest** 86:2109-16, 1990.
- Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell** 78:915-8, 1994.
- Oliveira HCF, Cosso RG, Alberici LC, Maciel EN, Salerno AG, Dorigheo GG, Velho JA, Faria EC, Vercesi AE. Oxidative stress in atherosclerosis-prone

- mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **FASEB J** 19:278-80, 2004.
- Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. **Annu Rev Immunol** 9:617-48, 1991.
- Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N, Hirata K, Yasui H, Sakurai H, Yoshida Y, Masada M, Yokoyama M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. **J Clin Invest** 119:331-340, 2002.
- Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. **Atherosclerosis** 68:231-40, 1987.
- Rao S, Verkman AS. Analysis of organ physiology in transgenic mice. **Am J Physiol Cell Physiol** 279:1-18, 2000.
- Reul RM, Fang JC, Denton MD, Geehan C, Long C, Mitchell RN, Ganz P, Briscoe DM. CD40 and CD40 ligand (CD154) are coexpressed on microvessels in vivo in human cardiac allograft rejection. **Transplantation** 64:1765-74, 1997.
- Roberts A, Thompson JS. Inbred mice and their hybrids as an animal model for atherosclerosis research. **Adv Exp Med Biol** 67:313-27, 1976.
- Romero JC, Reckelhoff JF. State-of-the-art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. **Hypertension** 34:943-9, 1999.
- Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, Kauser K, Rubanyi G, Schwartz SM. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the apoE knockout mouse. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 20:2587-92, 2000.

- Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med** 340:115-26, 1999.
- Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. **Nature** 353:265-7, 1991.
- Santos KFR, Shishido SM, Laurindo FRM, De Oliveira MG, Franchini K G, Spadari-Bratfisch RC, Krieger MH Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric Oxide Biochem**, 2005 (in press).
- Sase K, Michel T. Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Trends Cardiovasc Med** 7:28-37, 1997.
- Schönbeck U, Mach F, Bonnefoy JY, Loppnow H, Flad HD, Libby P. Ligation of CD40 activates interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active interleukin 1beta. **J Biol Chem** 272: 19569-74, 1997.
- Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97:7458-63, 2000.
- Shishido SM, de Oliveira MG. Polyethylene glycol matrix reduces the rates of photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitroso-N-acetylcysteine. **Photochem Photobiol.** 71:273-80, 2000.
- Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, Henn V, Kroczeck RA, Muller-Berghaus G. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. **Thromb Haemost** 80:1008-14, 1998.

- Smithies O, Maeda N. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. **Proc Natl Acad Sci** 92:5266-72, 1995.
- Song L, Leung C, Schindler C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. **J Clin Invest** 108:251-59, 2001.
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proc Natl Acad Sci U S A** 89:444-8, 1992.
- Sтары HC, Chair ABC, Seymour G, Guyton JR, Insull WJ, Rosenfeld ME. A definition of initial , fatty streak, and intermediate lesion of atherosclerosis. **Circulation** 89:2462-78, 1994.
- Sтары HC, Charmaid HB, Bleakler C, Glagov S, Willian IJ, Richardson M. A definition of the intima of human arteries and of it atherosclerosis-prone regions. **Ciculation** 85:391-405, 1992.
- Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. **J Biol Chem** 2001 May 276:14533-6, 2001.
- Timmermans PB, Wong PC Chiu AT. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonist. **Pharmacol Rev** 45:205-51, 1993.
- Тrieu VN, Uckun FM. Male-associated hypertension in LDL-R deficient mice. **Biochem Biophys Res Commun** 247:277-9, 1998.
- van Haperen R, de Waard M, van Deel E, Mees B, Kutryk M, van Aken T, Hamming J, Grosveld F, Duncker DJ, de Crom R. Reduction of blood pressure,

- plasma cholesterol, and atherosclerosis by elevated endothelial nitric oxide. **J Biol Chem** 277:48803-7, 2002.
- Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in hypertension. **J Hypertens Suppl** 14:83-93, 1996.
- Van Snick. Interleukin-6: an overview. **Annu Rev Immunol** 8:253-78, 1990.
- Vesselinovitch D, Wissler RW, Doull J. Experimental production of atherosclerosis in mice. 1: effects of various synthetic diet and radiation on survival time, food consumption and body weight in mice. **J Atheroscler Res** 8:483-95, 1968.
- Vesselinovitch D, Wissler RW. Experimental production of atherosclerosis in mice. 2: effects of atherogenic and high-fat diets on vascular changes in chronically and acutely irradiated mice. **J Atheroscler Res** 8:497-523, 1968.
- Wang YR, Yen CH, Sun YF, Laun YT. Gender-dependent response in blood pressure changes following the inhibition of nitric oxide synthase. **Chin J Physiol** 46:91-4, 2003.
- Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. **Arterioscler Thromb Vasc.** 17:2479-88, 1997.
- Yellin MJ, Brett J, Baum D, Matsushima A, Szabolcs M, Stern D, Chess L. Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. **J Exp Med** 182: 1857-64, 1995.
- Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis. **Current Opinion in Pharmacology** 4:110-5, 2004.

Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on.
Hypertension 32:958-64, 1998.

Zhou L, Stordeur P, de Lavarelle A, Thielemans K, Capel P, Goldman M, Pradier
O. CD40 engagement on endothelial cells promotes tissue factor-dependent
procoagulant activity. **Thromb Haemost** 79:1025-8, 1998.