

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CELULARES E VASCULARES DA
RESINA DE *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith EM CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS LDLr KNOCKOUT**

PAOLA NOGUEIRA COUTINHO

VILA VELHA
ABRIL / 2017

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CELULARES E VASCULARES DA
RESINA DE *Viola oleifera* (Schott) A. C. Smith EM CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS LDLr KNOCKOUT**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

PAOLA NOGUEIRA COUTINHO

VILA VELHA
ABRIL / 2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C871a

Coutinho, Paola Nogueira.

Avaliação dos efeitos celulares e vasculares da resina de *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith em camundongos hipercolesterolêmicos LDLr knockout / Paola Nogueira Coutinho. – 2017.

49 f.: il.

Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira

Co-orientador: Marcio Fronza.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2017.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Aterosclerose 3. Stress oxidativo I. Pereira, Thiago de Melo Costa. II. Fronza, Marcio III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 615

PAOLA NOGUEIRA COUTINHO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CELULARES E VASCULARES DA
RESINA DE *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith EM CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS LDLr KNOCKOUT**

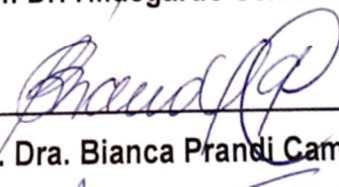
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 27 de abril de 2017,

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Hildegardo Seibert França – IFES



Prof. Dra. Bianca Prandi Campagnaro - UVV



Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira - UVV

Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao prof. Thiago de Melo Costa Pereira, por ser uma grande inspiração para mim desde a graduação. Sou grata por tê-lo como meu orientador, sempre presente e paciente, fazendo com que seus alunos se sintam amparados e preparados para todos os desafios que são encontrados nesta jornada;

Ao prof. Márcio Fronza, que tive a honra de conhecer e ter como meu co-orientador;

Aos professores Breno e Marcela, por toda ajuda e contribuição neste projeto;

Aos colegas Ana Cláudia e Fábio Coco, pela receptividade e ajuda na coleta da resina;

Aos IC's e colegas de laboratório, em especial Placy, Bia e Fran, por toda ajuda, companheirismo e amizade.

A todos os professores e funcionários da Universidade Vila Velha, que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo – FAPES, pela bolsa de estudos e financiamento deste trabalho.

À minha família, em especial ao Wolney, por todo apoio, incentivo e amor.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	01
LISTA DE FIGURAS	01
LISTA DE ABREVIATURAS	02
RESUMO	04
ABSTRACT	05
1. INTRODUÇÃO	06
2. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 MATERIAL VEGETAL	11
3.2 LINHAGEM CELULAR	11
3.3 ANIMAIS	12
3.4 GRUPOS E MODELOS EXPERIMENTAIS	12
3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	13
3.6 PREPARO “ <i>EN FACE</i> ”	13
3.7 DEPOSIÇÃO LIPÍDICA VASCULAR	13
3.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS CITOPLASMÁTICOS DE ROS	14
3.9 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS PROTÉICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA (AOPP)	14
3.10 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ACIDO BARBITÚRICO (TBARS)	15
3.11 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	15
3.12 ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>in vitro</i>	16
3.13 EFEITO ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> da RV frente ao H ₂ O ₂	16
3.14 PRODUÇÃO DE NO <i>in vitro</i> INDUZIDO POR LPS	17
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
4. RESULTADOS	18
4.1 PERFIL BIOQUÍMICO	18
4.2 ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO LIPÍDICA VASCULAR	19
4.3 PRODUÇÃO DE ROS	20
4.4 OXIDAÇÃO PROTEICA, PEROXIDAÇÃO E DEPOSIÇÃO LIPÍDICA NO FÍGADO	21

4.5	EFEITO ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> DA RV CONTRA LESÃO INDUZIDA POR H ₂ O ₂	23
4.6	PRODUÇÃO DE NO <i>in vitro</i> INDUZIDA POR LPS	24
5.	DISCUSSÃO	26
6.	CONCLUSÃO	29
7.	REFERÊNCIAS	30
8.	ANEXOS	39
8.1	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	39
8.2	ARTIGO PUBLICADO	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos	22
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de lipoproteínas plasmáticas	23
Figura 2. Efeitos da RV sobre a deposição lipídica vascular	24
Figura 3. Efeitos na produção de ROS no sangue, após tratamento com RV	25
Figura 4. Deposição lipídica, oxidação proteica e peroxidação lipídica no fígado	26
Figura 5. Efeito da RV sobre a citotoxicidade mediada por peróxido de hidrogênio	27
Figura 6. Produção de óxido nítrico (NO) induzida por lipopolissacarídeo (LPS)	28

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AOPP	Produtos avançados de oxidação proteica
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AT	Aterosclerose
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CML	Células do Músculo Liso
DCF	Diclorofluoresceína
DHE	Dihidroetídeo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPM	Erro Padrão da Média
IEMA	Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
HD	Grupo tratado com Dieta Hipercalórica
HPF	Hidroxifenilfluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster (Inibidor da óxido nítrico sintase)
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
ND	Grupo Controle
NO	Óxido nítrico
•O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
MDA	Malondialdeído
MTT	Método do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Proteína C Reativa
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPM	Rotações por Minuto
RV	Resina de <i>Virola oleifera</i> (Schott) A. C. Smith
SFB	Soro fetal bovino

TBARS	Substâncias reativas ao ácido barbitúrico
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UVV	Universidade Vila Velha
HD-V50	Grupo tratado com Dieta Hipercalórica + 50mg/Kg de resina de <i>Viola oleifera</i> (Schott) A. C. Smith
HD-V 300	Grupo tratado com Dieta Hipercalórica + 300 mg/Kg de resina de <i>Viola oleifera</i> (Schott) A. C. Smith

RESUMO

COUTINHO, PAOLA NOGUEIRA, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, Abril de 2017. **Avaliação dos efeitos celulares e vasculares da resina de *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith em camundongos hipercolesterolêmicos LDLr knockout.** Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira Co-orientador: Márcio Fronza.

Virola oleifera (Schott) A. C. Smith, uma planta nativa da Mata Atlântica, tem sido amplamente utilizada na medicina popular no Brasil como agente anti-inflamatório e dados de estudos realizados pelo nosso grupo, indicaram as propriedades antioxidantes em modelos relacionados ao estresse oxidativo. No entanto, seus efeitos sobre a aterosclerose (AT) ainda não foram investigados. Sendo assim, avaliamos a influência da resina de *Virola oleifera* (RV) na progressão da AT em camundongos LDLr^{-/-}. Para tanto, os animais foram divididos em 4 grupos: 1) O grupo ND recebeu uma dieta padrão, sem tratamento. 2) O grupo HD recebeu uma dieta rica em gordura, sem tratamento. 3) O HD-V50 recebeu uma dieta rica em gordura e foi tratado com RV a 50 mg/Kg, via oral. 4) O HD-V300 recebeu uma dieta rica em gordura e foi tratado com RV a 300 mg/Kg, via oral. Após 4 semanas, recolheu-se sangue para quantificar parâmetros bioquímicos e ROS total e a aorta foi removida para medir a deposição lipídica, pelo método *en face*. O fígado foi coletado para determinar oxidação lipídica e proteica. Para investigar mais detalhadamente as contribuições da RV na estrutura vascular, foram realizados testes *in vitro*, utilizando quatro tipos celulares: macrófagos, fibroblastos, células do músculo liso vascular e células endoteliais. Verificou-se que o tratamento crônico com RV, em ambas as doses, reduziu o acúmulo de lipídeos vasculares (~50%, $p < 0,05$), provavelmente por efeito antioxidante sistêmico e hepático, independente da dislipidemia. Além disso, os resultados dos ensaios *in vitro* demonstraram que a RV desenvolve propriedades antioxidantes no músculo liso vascular e nas células endoteliais, reforçando o papel protetor da RV na progressão da AT. Os macrófagos simultaneamente tratados com LPS resultaram numa redução significativa da produção de NO de forma dose dependente. O tratamento crônico com RV diminuiu a deposição lipídica em camundongos ateroscleróticos, o que pode ser justificado, pelo menos em parte, por mecanismos antioxidantes, reforçando o papel protetor desta resina na deposição lipídica vascular, independente da hipercolesterolemia.

Palavras-chave: Resina; Bicuíba; Ucuuba; Aterosclerose; Estresse oxidativo; Esteatose

ABSTRACT

COUTINHO, PAOLA NOGUEIRA, M.Sc., University Vila Velha – ES, April, 2017. **Evaluation of cellular and vascular effects from *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith resin in hypercholesterolemic LDLr^{-/-} knockout mice.** Advisor: Thiago de Melo Costa Pereira. Co-advisor: Márcio Fronza.

Virola oleifera (Schott) A. C. Smith, a tree of the Atlantic Forest, has been largely used in traditional folk medicine in Brazil as an anti-inflammatory agent and our previous data indicated the antioxidant properties in other oxidative stress-related models. However, its effects on atherosclerosis (AT) are not yet investigated. To evaluate the influence of resin from *Virola oleifera* (RV) on progression of AT in LDLr^{-/-} mice, were divided into 4 groups: 1) The ND group received a normal diet without treatment. 2) The HD group received a high-fat diet without treatment. 3) The HD-V50 received a high-fat diet and was orally treated with RV at 50 mg/Kg. 4) The HD-V300 received a high-fat diet and was orally treated with RV at 300 mg/Kg. After 4 weeks, blood was collected to quantify biochemical parameters and ROS total and the aorta was removed to measure the lipid deposition by *en face* analysis. The liver was also collected to determine total lipids and lipid and protein oxidation. In order to investigate in more detail the contributions of RV in the vascular structure, we carried out the *in vitro* tests using four cellular types: macrophages, fibroblasts, vascular smooth muscle and endothelial cells. We showed that the chronic treatment of RV at both doses reduced vascular lipid accumulation (~50%, p<0.05), probably through systemic and hepatic antioxidant effects, independent of dyslipidemia. Moreover, the *in vitro* assay results demonstrated that RV develops antioxidant properties on the vascular smooth muscle and endothelial cells, reinforcing the protective role of RV in progression of AT. Macrophages simultaneously treated with LPS resulted in a significant reduction of NO production in a concentration-dependent manner. Chronic treatment with RV diminishes lipid deposition in atherosclerotic mice, which may be justified, at least in part, by antioxidant mechanisms, reinforcing the protective role this resin in the setting of vascular lipid deposition, independent of hypercholesterolemia.

Keywords: Resin; Bicuíba; Ucuuba; Atherosclerosis; Oxidative stress; Steatosis

1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose (AT) é um fator de risco importante para doenças cardíacas coronarianas (Hansson et al., 2006), sendo a principal causa de mortalidade e morbidade em países desenvolvidos (Andrés et al., 2012), está relacionada a fatores como sedentarismo, sobrepeso/obesidade, aumento de glicemia e pressão arterial (Sanchez-Quesada et al., 1997; Benítez et al., 2002; Mello et al., 2011). É uma doença inflamatória crônica das artérias de condutância e sua condição subclínica é um importante gatilho para eventos cardiovasculares futuros tais como doenças isquêmicas do coração, insuficiência cardíaca congestiva, doença cerebrovascular e morte súbita (Kreatsoulas et al., 2010; Meyrelles et al., 2011; Prasad et al., 2014; Hansson et al., 2015; Vasquez et al., 2016).

Classicamente, sabe-se que este distúrbio é iniciado por disfunção endotelial seguido por acúmulo de lipídeos no espaço subintimal vascular além de fortemente modulado pela imunidade e pelo estresse oxidativo (Pereira et al., 2010; Vasquez et al., 2012; Leal et al., 2015; Hansson et al., 2015; Hurtubise et al., 2016). Com a progressão da doença, a formação da placa aterosclerótica pode culminar com sua ruptura induzindo processos trombóticos agudos ou levar a estenose da artéria, prejudicando também a perfusão tecidual, comprometendo diversos órgãos-alvo (Kelly; Jones, 2013). Embora já existam algumas alternativas de tratamento para AT, sua eficácia em relação à redução da progressão de lesões ateroscleróticas ainda é um desafio (Orekhov et al., 2015).

A inflamação tem um papel importante na patogênese da AT, uma vez que mantém o quadro de disfunção endotelial (Behrendt; Ganz, 2002). A formação da placa inicia-se com uma agressão ao endotélio vascular, a qual é favorecida por diversos fatores de risco, como elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL e VLDL) (Steffens; Mach, 2004) as quais podem se depositar no espaço subendotelial proporcionalmente à concentração dessas lipoproteínas no plasma (V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS, 2013). Como consequência, tem-se um processo de disfunção endotelial, no qual a permeabilidade da camada íntima vascular às lipoproteínas plasmáticas está aumentada, favorecendo sua retenção. Tais

partículas sofrem oxidação tornando-se altamente imunogênicas (Oliveira et al., 2006).

Sob condições inflamatórias, células endoteliais, macrófagos e células musculares lisas produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), que oxidam partículas de LDL, as quais passam a ser reconhecidas por receptores *scavenger* na superfície de macrófagos (Young; Mceneny, 2001). Conseqüentemente, ocorre a fagocitose e acúmulo de grandes quantidades de lipídeos por essas células, tornando-as células espumosas (Da Luz; Uint, 2003). A formação do ateroma também envolve o recrutamento e proliferação de células musculares lisas (CML) para a túnica íntima arterial. Em resposta ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) produzido por macrófagos ativados e células endoteliais, as CML migram da camada média para a íntima, onde proliferam sob o estímulo de diversos fatores de crescimento (Packard; Libby, 2008). CML produzem matriz extracelular, como colágeno e elastina, formando uma capa fibrosa, o que frequentemente compromete a luz vascular (Tabas, 2010).

Associado a isso, o LDL pode desencadear respostas pró-inflamatórias facilitando a modificação oxidativa de outras partículas de LDL no plasma sanguíneo (Oliveira et al., 2006). Ao mesmo tempo, o aumento de LDL plasmática pode estar associada a doenças cardiovasculares, *diabetes mellitus*, hipercolesterolemia familiar ou doenças coronarianas já estabelecidas (Sánchez-Quesada et al., 2004). Dessa forma, convencionalmente, o LDL se comporta como um indicador das fases iniciais da AT (Navab et al., 2002).

Em seres humanos uma mutação no gene para o receptor de LDL causa hipercolesterolemia, e camundongos sem o gene para LDLr, chamados de LDLr “knockout” (LDLr^{-/-}) exibem um nível plasmático ligeiramente elevado de colesterol quando mantidos com uma dieta de ração padrão, desenvolvendo lentamente o processo aterogênico (Zadelaar et al., 2007). Entretanto, quando tratados com uma dieta rica em gordura, apresentam níveis elevados de colesterol plasmáticos, desenvolvendo rapidamente a aterosclerose. Nas últimas três décadas, os modelos experimentais utilizando camundongos têm sido amplamente empregados em estudos pré-clínicos de AT humana e seu uso abriu novos horizontes para

investigação experimental (Breslow et al., 1993; Pereira et al., 2010; Meyrelles et al., 2011; Vasquez et al., 2012; Santanna et al., 2016). Entre estes, o modelo LDLr^{-/-} afeta o *clearance* do colesterol não HDL (nHDL-C) e sob dieta rica em gordura, estes animais desenvolvem AT extensiva, mimetizando os seres humanos com hipercolesterolemia familiar (Zadelaar et al., 2007; Zhao et al., 2010; Guizoni et al., 2016]. Além disso, tem sido demonstrado recentemente que este modelo é também suscetível à obesidade e à resistência à insulina (Lee et al., 2017), se mostrando dessa forma, um bom modelo experimental.

Ainda, com relação à AT, as ROS atuam contribuindo para o desenvolvimento da placa, incrementando a resposta inflamatória, o que aumenta ainda mais sua produção (Libby et al., 2010). Isso sugere que as estratégias de prevenção cardiovascular devem focar no reestabelecimento do balanço oxidativo entre NO e $\bullet\text{O}_2^-$. Assim que é liberado pelo endotélio, o NO difunde-se para o lado luminal do vaso, onde inibe a adesão e agregação plaquetária, aumentando a fluidez do sangue e prevenindo a trombose. Além disso, o NO também se difunde para a região subendotelial, onde induz o relaxamento do músculo liso vascular via estímulo da produção de GMPc (promovendo assim a vasodilatação) além de inibir o remodelamento e a proliferação de células musculares lisas (Mitchell et al., 2007).

O dano oxidativo causado por ROS se descreve com processos nocivos resultantes de um desequilíbrio entre a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes limitadas. Sendo assim, substâncias naturais que exibam efeitos anti-inflamatórias e antioxidantes têm aplicações específicas na prevenção de lesões relacionadas ao estresse oxidativo (Grassi et al., 2010). Portanto, é notório que o estresse oxidativo tenha sido considerado um mecanismo fundamental tanto no início quanto no desenvolvimento da AT (Grassi et al., 2009).

O papel desempenhado pelo uso de plantas medicinais no cuidado e promoção da saúde de diferentes culturas tem sido contínua e extensivamente investigado. A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2015) estima que aproximadamente 65% da população mundial dependem principalmente de plantas medicinais ou seus derivados para os seus cuidados primários da saúde (Fabricant;

Farnsworth, 2001; Butler, 2008). Devido ao potencial antioxidante da espécie *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith (Konya et al., 2001), o gênero *Virola* já foi objeto de diversos estudos, sendo relatadas propriedades anti-inflamatória (Carvalho et al., 1999; Lima et al., 2011), antiproliferativa (Denny et al., 2007) e anti-ulcerogênica (Hiruma-Lima et al., 2009),

A *Virola oleifera*, vulgarmente denominada "bicuíba" é uma árvore da Mata Atlântica (Colombo; Joly, 2010; Bôa et al., 2015; Pereira et al., 2017). Quando ralada, a casca libera uma resina (RV) que é usada na medicina popular para tratar condições inflamatórias (Bôa et al., 2015; Pereira et al., 2017). Dados recentes do nosso laboratório (Bôa et al., 2015); e de outros (Milaneze et al., 2014) demonstraram que essa resina contém uma mistura de vários compostos fenólicos e flavonóides, exibindo fortes propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, incluindo a renoprotetora (Bôa et al., 2015) e ações gastroprotetoras (Pereira et al., 2017). Embora seja popularmente conhecida em algumas partes do Espírito Santo (Baliano et al., 2015) e amplamente utilizado pela população, um possível efeito anti-aterogênico da RV ainda não foi avaliado.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos celulares e vasculares da resina de *Viola oleifera* (Schott) A. C. Smith *in vitro* e *in vivo*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar se a resina de *Viola oleifera* é capaz de:

- Proteger ou reduzir a formação de placas de ateroma em camundongos LDLr^{-/-}
- Reduzir as espécies reativas de oxigênio plasmáticas, através da técnica de citometria de fluxo;
- Apresentar efeito hepatoprotetor através de análise de deposição lipídica além da avaliação de marcadores de oxidação lipídica (TBARS) e proteica (AOPP);
- Melhorar a viabilidade celular e reduzir a atividade citotóxica *in vitro* da resina através do método do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT);
- Apresentar ação antioxidante e antiinflamatória através de ensaios *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

A resina de *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith (Myristicaceae) foi coletada em Novembro de 2015, no distrito da Fazenda Guandu, em Afonso Cláudio (Espírito Santo – Brasil, S20° 13490' W 041° 06692'), sob orientação do farmacêutico Fábio Dias Côco. A coleta foi realizada com autorização (IEMA 629/09) e de acordo com a legislação brasileira (Resolução 29, 06/12/2007), que afirma que nenhuma permissão especial é necessária para recolher amostras vegetais quando o material testado é praticamente idêntico à da matéria-prima (Declaração Provisória 2.186-16, 23/08/2001). Uma vez que o material utilizado no presente estudo é a resina, estamos em conformidade com a referida lei. Uma exsicata foi preparada e tombada sob o número VIES 19648, no Herbário da Universidade Federal do Espírito Santo. O exsudado fluido foi obtido a partir de incisões no tronco da árvore, a 0,5cm de profundidade, recolhido em plástico asséptico, transferido para um frasco de vidro cor âmbar e mantido a 4°C até a análise. Foi então submetido à secagem em estufa, a 40°C, e logo após, pulverizado, sendo denominado resina seca (Borges et al., 2007).

3.2 LINHAGEM CELULAR

Foram utilizados Fibroblastos (L929, ATCC®-CCL1™) e Macrófagos de camundongo (RAW 264.7, ATCC®-TIB-71™) adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro/Brasil. Célula Endotelial humana (EA.hy926 - ATCC®-CRL-2922™) e células Musculares Lisas de aorta de coelho (VSMC- Instituto do Coração- InCor /LIM-13, Universidade de São Paulo), foram gentilmente cedidas pelo Dr. Valério Barauna (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil). A seguir, as células foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação a -170°C) em solução de congelamento composta por 95% de soro fetal bovino e 5% dimetilsulfóxido (DMSO) até o momento do uso. Para os experimentos as células foram cultivadas em meio Dulbecco's (DMEM, Sigma, ST Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos

penicilina (100 IU/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e mantidas a 37°C com 5% de CO₂ (Pedrosa et al., 2010).

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos hipercolesterolêmicos *knockout* para receptor de LDL, fêmeas (20 – 25 g), com 8 semanas de idade, provenientes do Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha – UVV. Os animais foram alimentados com ração padrão (Probiotério, Moinho Primor, S.A) e, para acelerar a dislipidemia espontânea, ração hipercalórica (Dieta aterogênica: Amido de milho, DL-Metionina, caseína, banha de porco, carbonato de cálcio, celulose, colesterol, premix mineral AJN-76, premix vitamínico AJN-93, sacarose, tert-butilhidroquinona, RHOSTHER LTDA) *ad libitum* e livre acesso à água potável, ambientados em condições padrão de ciclos de 12h claro – 12h escuro e temperatura (23°C ± 3°C). Todos os experimentos realizados estão aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA-UVV, Protocolo nº 374/2016).

3.4 GRUPOS E MODELOS EXPERIMENTAIS

Foram eleitos quatro grupos experimentais: Grupo Controle (ND; n=7), Grupo Dieta Aterogênica (HD; n=9), Grupo Dieta Aterogênica + Virola 50mg/Kg (HD-V50; n=6) e Grupo Dieta Aterogênica + Virola 300mg/Kg (HD-V300; n=6). Os camundongos dos grupos HD-V50 e HD-V300 receberam a resina de virola solubilizada em água através de gavagem durante 4 semanas, 1 vez ao dia. Enquanto isso, os grupos ND e HD receberam água por gavagem em substituição à resina de Virola. Os grupos HD, HD-V50 e HD-V300 receberam ração hipercalórica também por 4 semanas. Ao final do período de tratamento, foram eutanasiados com tiopental sódico (Cristalia, São Paulo, Brasil, 100mg/kg, i.p.) para a coleta do sangue através da punção por agulha no ventrículo direito (dosagens bioquímicas e citometria de fluxo), remoção do fígado (dosagem de biomarcadores de estresse oxidativo e histologia) e da aorta (quantificação de deposição lipídica).

3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

O sangue foi coletado por meio de punção cardíaca, imediatamente transferido para tubos secos e centrifugado a 4000 rpm, 10 minutos. O soro foi separado e mantido a -20°C até a análise. As concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), proteína C reativa (PCR), AST, ALT e Gama-GT foram obtidas em parceria com o laboratório de Análises Clínicas “Tommasi” (AU 400 ou 680, Olympus / Beckman Coulter, Munique, Alemanha). Os níveis de colesterol nHDL-C foram calculados subtraindo HDL do colesterol sérico total.

3.6 PREPARO “EN FACE”

A aorta foi dissecada livremente desde o ponto inicial da aorta ascendente até a bifurcação ilíaca e armazenada em solução de PBS-formol 10%. Em seguida, o corte inicial foi realizado através da curvatura aórtica menor e estendido até a bifurcação ilíaca. O segundo corte foi feito simetricamente ao longo da curvatura maior até o nível da artéria subclávia. Durante todo o processo tomou-se o cuidado para não deslocar lesões ateroscleróticas da superfície intimal. A padronização da dissecação é importante para manter intactas as regiões com lesão conforme descrito previamente por Paigen (1987) e pormenorizado por Daugherty e Rateri (2006). Após o corte, as aortas foram presas em superfície de Etil Vinil Acetato (EVA) com pinos de aço para manter sempre o tecido na sua posição plana e horizontal.

3.7 DEPOSIÇÃO LIPÍDICA VASCULAR

As amostras previamente submetidas à preparação “en face” foram coradas com Oil-Red (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para visualização de acúmulos de lipídeos (coloração vermelha). Todas as amostras foram submersas em solução alcoólica com o Oil-Red a 0,3% por 10 minutos e em seguida lavadas em uma cuba com água até retirar todo o excesso do corante vermelho. A análise da deposição

lipídica foi realizada por meio da intensidade e extensão da coloração vermelha, cujas imagens foram adquiridas usando uma câmera digital de alta resolução Canon T5 18-55 (Canon, USA) e posteriormente digitalizadas para análise morfométrica pelo software “Image J” (domínio público-National Institute of Health, USA). Para tanto, esta análise foi realizada por pesquisador cego para os grupos experimentais.

3.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS CITOPLASMÁTICOS DE ROS

A análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizada por citometria de fluxo como descrito anteriormente (Porto et al., 2015; Almeida et al., 2016). Foram adicionados dihidroetídeo (DHE, 160 mM) e 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCF, 20 mM) à suspensão de células (10^6 células) e incubados a 37 ° C durante 30 min, no escuro, para estimar o superóxido intracelular ($\bullet\text{O}_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente. Os radicais Peroxinitrito/hidroxila foram detectados pela hidroxifenilfluoresceína (HPF). As células foram então lavadas, resuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA). Os dados foram obtidos utilizando-se o software FACSDiva (BD) e os histogramas de sobreposição foram analisados por meio do FCS Express software trial. Para a quantificação da fluorescência do DHE, DCF e HPF, as amostras foram adquiridas em monoplicata, sendo 10,000 eventos para cada medição. As células foram excitadas a 488 nm; A fluorescência do DHE foi detectada utilizando um filtro 585/42 e de DCF ou HPF foi detectada utilizando um filtro 530/30. Os dados estão expressos como a mediana de intensidade de fluorescência.

3.9 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA (AOPP)

As análises do conteúdo de AOPP foram realizadas de acordo com Witko-Sarsat et al. (1996) e Leal et al. (2015). Os AOPP são criados em situações de estresse oxidativo e analisados em comparação às reações de agentes oxidantes clorinados, como as cloraminas. Para tanto, foram utilizados 100 mg do fígado, diluído(1:30) em solução tampão fosfato salino (PBS). 10 μL de KI (1,16 M) são

adicionados em cada poço e logo após, 20 µL de ácido acético são adicionados. A absorbância da reação será imediatamente lida em leitor de microplaca (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 340 nm contra o branco contendo 200µL de PBS, 20µL de ácido acético e 10µL de KI. O conteúdo de AOPP é calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 µM realizadas com equivalentes de cloramina T. Os resultados são expressos em µmol/mg proteína total, previamente quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

3.10 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ACIDO BARBITÚRICO (TBARS)

O nível de peroxidação lipídica, que está relacionado com o estresse oxidativo, foi medido no fígado, como o malondialdeído (MDA) que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), produzindo um complexo róseo. O órgão foi recolhido e armazenado a -80 °C até a análise. Resumidamente, diluiu-se 50 µL de amostra de fígado (1:10) com 200 µL de TBA a 1%. Após diluição, os tubos foram levados em banho-maria, a 100 °C, durante 1 h e 30 min (sob agitação frequente) e resfriados à temperatura ambiente. Finalmente, foram adicionados 200 µL em poços de microplacas e lidos a 540 nm em leitor de microplaca (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Os resultados são expressos como nmol de MDA/mg de proteína total, utilizando o método de Bradford como citado acima.

3.11 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os fígados foram removidos e fixados em solução tamponada de formaldeído a 4% durante 48 h, depois seccionados em corte com espessuras de 8 µM a -25 ° C (Jung CM 1860; Leica, Wetzlar, Alemanha). As secções foram montadas, revestidas com gelatina e coradas com Oil-Red-O (Sigma-Aldrich) para detecção de lipídeos neutros para análises morfométricas. As imagens foram capturadas com uma câmera de vídeo (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico (AX70, Olympus Corporation, Japão) usando objetiva 40x e quantificado usando o software Image J (NIH, EUA). Para cada análise, foram utilizados aleatoriamente 10 campos diferentes por animal para

calcular a percentagem média de área corada. O examinador foi cego para os grupos experimentais.

3.12 ATIVIDADE CITOTÓXICA *in vitro*

Foi utilizado o método colorimétrico MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], proposto por Mosmann (1983), com modificações. Em suma, as células foram cultivadas em placas de 96 poços (7×10^5 células/mL) e após incubação overnight a 37°C (5% CO₂), foram incubadas por mais 24h na presença de diferentes concentrações de RV (7,81 – 1.000 µg/mL). Camptotecina (10 µM) foi usada como controle positivo. Após a incubação, o meio foi removido e 100 µl de MTT foi adicionado em cada poço e incubado por 2 h para que ocorresse a reação com as mitocôndrias das células metabolicamente ativas pela succinato desidrogenase. O excesso de MTT foi aspirado e os cristais de formazana formados foram dissolvidos com 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância da formazana roxo, proporcional ao número de células vivas, foi realizada em leitor de microplaca ELISA (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), a 595 nm. Os experimentos são realizados em triplicata.

3.13 EFEITO ANTIOXIDANTE *in vitro* da RV frente ao H₂O₂

Os efeitos protetores da RV contra a toxicidade induzida por H₂O₂ em células L929, EA926 e VSMC foram avaliados pelo ensaio de H₂O₂ modificado (Annan et al., 2008; Adetutu et al., 2011). Resumidamente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com concentrações crescentes de RV de 10, 50 e 100 µg/mL após a adição de 500 µM de H₂O₂. O grupo controle recebeu apenas 500 µM de H₂O₂. Ácido gálico (5-160 µM) foi utilizado como controle positivo, a fins de comparação, por ser o componente majoritário da resina de *Virola oleifera* (Pereira et al, 2017). Após 24 h de incubação, o grau de proteção celular pela RV contra o dano causado por H₂O₂ foi estimado pelo ensaio de MTT. Os ensaios foram realizados em duplicata e pelo menos dois ensaios independentes foram realizados.

3.14 PRODUÇÃO DE NO *in vitro* INDUZIDO POR LPS

A produção de óxido nítrico (NO) foi medida como seu produto de decomposição de nitrito em sobrenadante de macrófagos estimulados por LPS de acordo com a reação de Griess (Green et al., 1982) com pequenas modificações (Dos Santos Gramma et al., 2016). Resumidamente, as células de macrófagos foram plaqueadas a $5,0 \times 10^5$ células/mL em placa de 24 poços e tratadas com ou sem diferentes concentrações (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) de RV. Após 2 h as células foram estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h. Em seguida, mediu-se o acúmulo de nitrito no meio de cultura, como indicador de produção de NO, utilizando reagente de Griess (sulfanilamida a 1% em H_3PO_4 a 5% e a 0,1% de N-(1-naphthyl)ethylenediamine em água destilada). A absorbância foi medida a 540 nm em leitor de placas ELISA (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) e as taxas inibitórias foram calculadas utilizando uma curva de calibração padrão preparada com nitrito de sódio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados estão expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por análise de variância unidirecional (ANOVA) usando o software Prism (Prism 6.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Quando a ANOVA apresentou diferenças significativas, o teste de Tukey foi utilizado como uma análise post-hoc ajustada para comparações múltiplas e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 PERFIL BIOQUÍMICO

A Figura 1 resume os resultados do perfil lipídico dos quatro grupos estudados. Como esperado, todos os grupos HD exibiram um aumento no colesterol nHDL-C (HD: 770 ± 70 , HD-V50: 986 ± 46 , HD-V300: 942 ± 69 mg/dL, $p < 0,05$) e triglicerídeos (~2 vezes, $p < 0,05$) em comparação com os camundongos ND (131 ± 6 e 72 ± 4 mg/dL, respectivamente), sem modificação no HDL em todos os grupos. Assim, o tratamento com RV não afetou o perfil lipídico exibido pelos camundongos LDLr^{-/-}.

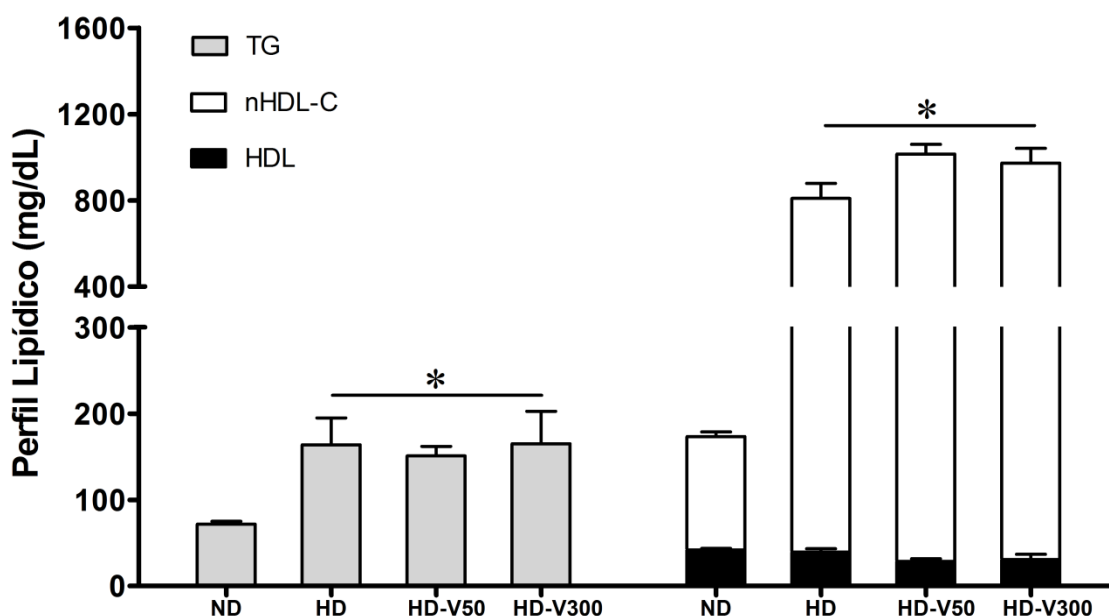


Figura 1. Perfil de lipoproteínas plasmáticas nos quatro grupos experimentais de LDLr^{-/-} mostrando que a RV não possui efeito anti-dislipidêmico. Os gráficos em barras mostram que após 4 semanas de tratamento, todos os grupos HD exibiram aumento de triglicerídeos e colesterol nHDL-C (sem modificar a fração HDL) em comparação com os animais ND. Os valores são apresentados como média \pm EPM para n = 6 a 9 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs. grupo ND.

A Tabela 1 sumariza os resultados de importantes análises bioquímicas. Entre elas, observamos que a glicemia foi aumentada no grupo HD (~15%, $p < 0,05$) em comparação com o grupo ND. Curiosamente, em ambos os grupos tratados com RV se restaurou a glicemia a condições normais. Além disso, a dieta rica em gordura

elevou significativamente ALT e AST no grupo HD em relação ao grupo controle (~ 6 vezes e ~3 vezes, respectivamente, $p < 0,05$) e a RV restaurou aos valores normais.

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos nos quatro grupos experimentais LDLr^{-/-}

Parâmetros	ND	HD	HD-V50	HD-V300	<i>p</i>
Glicose (mg/dL)	215 ± 6	247 ± 15 *	206 ± 5	178 ± 12	0.005
PCR (mg/dL)	0.14 ± 0.01	0.22 ± 0.04	0.11 ± 0.04	0.14 ± 0.04	0.303
ALT (U/L)	66 ± 13	397 ± 123*	170 ± 62	235 ± 78	0.037
AST (U/L)	416 ± 116	1135 ± 231*	634 ± 163	267 ± 55 [#]	0.006
GGT (U/L)	6 ± 2	22 ± 11	7 ± 2	8 ± 3	0.297
Uréia (mg/dL)	59 ± 4	54 ± 4	54 ± 11	50 ± 6	0.254
Creatinina (mg/dL)	0.19 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.31 ± 0.07	0.32 ± 0.10	0.67

Os valores são apresentados como média ± EPM para n = 6 a 9 animais por grupo.

* $p < 0,05$ vs. grupo controle (ND). # $p < 0,05$ vs. grupo HD.

4.2 ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO LIPÍDICA VASCULAR

A Figura 2 (painel superior) resume os resultados de análises típicas de aorta dos quatro grupos de animais. No painel inferior, o gráfico de barras mostra os efeitos ateroprotetores da RV na área de deposição lipídica das aortas de todos os grupos após quantificação. Como esperado, o grupo HD mostrou um aumento na deposição lipídica quando comparado ao grupo ND ($17 \pm 2,5$ vs. $11 \pm 1,1\%$, $p < 0,05$). Por outro lado, nas aortas dos animais tratados com RV, a deposição lipídica foi reduzida significativamente, independente da dose, nos grupos tratados com dieta hipercalórica (HD-V50: $10 \pm 1,0$ e HD-V300: $9,5 \pm 1,1\%$, $p < 0,05$) de forma semelhante ao observado no grupo controle.

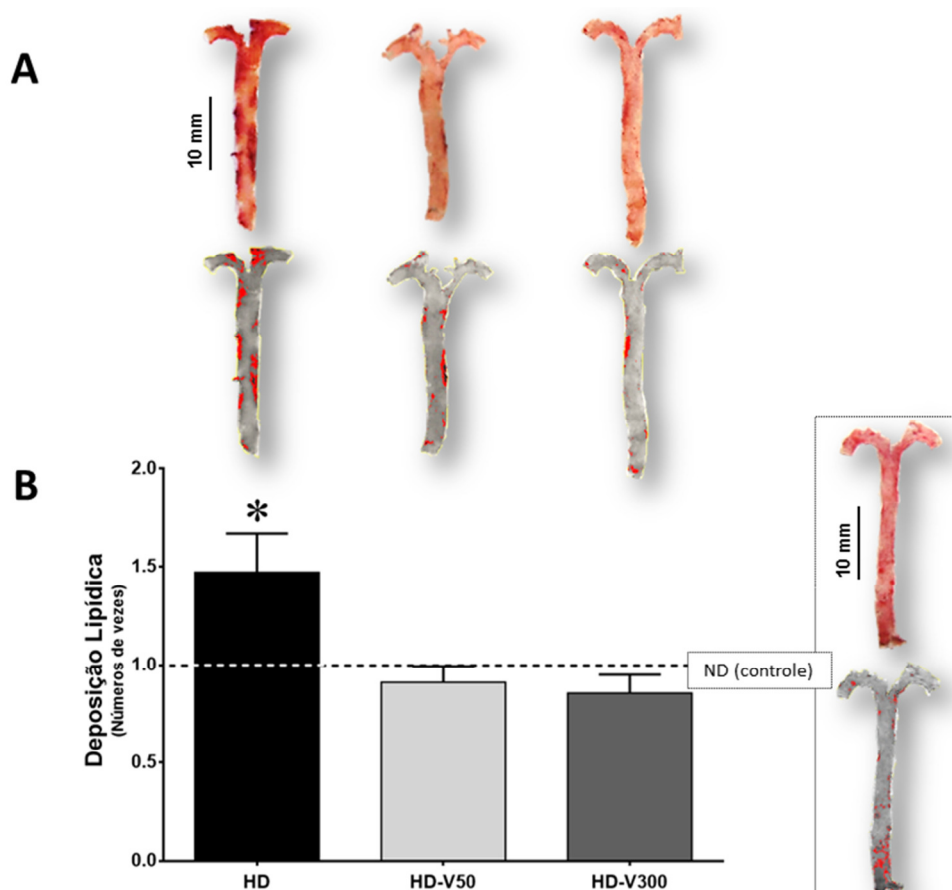


Figura 2. Efeitos da RV sobre a deposição lipídica vascular em $LDLr^{-/-}$, mostrando uma grande área de deposição lipídica no grupo HD (+ 50%) comparado com o grupo ND (controle), bem como a restauração observada no grupos tratados com RV, tanto na dose de 50 quanto na dose de 300 mg/kg, mostrando que, apesar da RV não ter efeito antilipidêmico, exerce proteção cardiovascular. A) Imagens representativas de “*en face*” de aorta corada com Oil-Red-O (parte superior) e densitometria (parte inferior). B) Gráfico de barras representando as áreas de deposição lipídica vasculares. Os valores são apresentados como média \pm EPM para $n = 5-6$ animais por grupo. * $p < 0,05$ vs. grupo ND (ANOVA).

4.3 PRODUÇÃO DE ROS

Estudos prévios mostraram que altos níveis de ROS é um mecanismo chave para o desenvolvimento e progressão de AT (Alexander, 2003; Vasquez et al., 2012; Balarini et al., 2013; Ele e Zuo, 2015), avaliamos os níveis de ROS intracelular em glóbulos brancos em todos os grupos estudados. Conforme ilustrado na Figura 3, observamos que uma dieta rica em gordura aumentou a produção de ROS, e mais especificamente nos níveis de $\bullet O_2^-$ no grupo HD (1,4 vezes, $p < 0,05$) em comparação com o grupo ND. O tratamento com RV preveniu a superprodução de ROS,

especialmente $\bullet\text{O}_2^-$ em ambos os grupos (HD: 1.444 ± 142 (u.a.), HD-V50: 764 ± 79 (u.a.), e HD-V300: 909 ± 54 (u.a.), $p < 0.05$). A dose de RV de 300 mg/Kg também diminuiu a biodisponibilidade de H_2O_2 (351 ± 104 (u.a.), $p < 0,05$) quando comparado ao grupo HD (897 ± 110 (u.a.)).

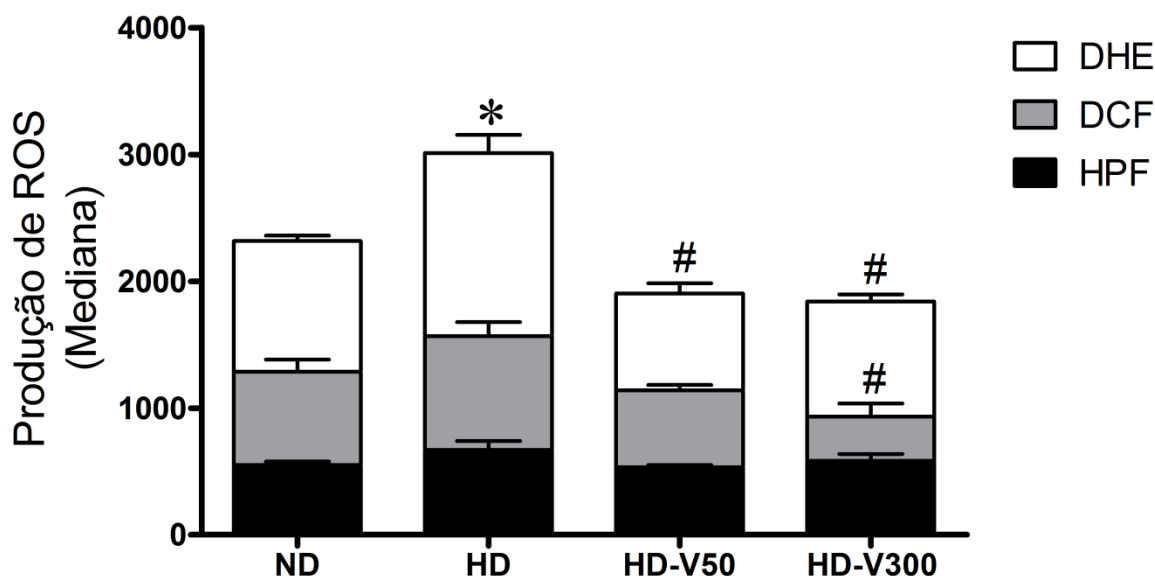


Figura 3. Efeitos na produção de ROS no sangue, após tratamento com RV, mostrando que após 4 semanas de dieta rica em gordura, a produção de ROS aumentou no grupo HD. O tratamento com RV diminuiu a superprodução do ROS, especialmente ânion superóxido, em ambos os grupos. A dose mais elevada de RV também diminuiu a biodisponibilidade do peróxido de hidrogênio. Os gráficos de barras mostram a análise por citometria de fluxo de HPF (produção de peroxinitrito e hidroxila), DCF (produção de peróxido de hidrogênio) e DHE (ânion superóxido). Os valores são expressos como média \pm EPM para $n = 5-7$ por grupo. * $p < 0,05$ vs. ND; # $p < 0,05$ vs. HD. ANOVA, seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

4.4 OXIDAÇÃO PROTEICA, PEROXIDAÇÃO E DEPOSIÇÃO LIPÍDICA NO FÍGADO

Além das avaliações vasculares, investigamos o impacto do tratamento da RV na deposição lipídica em células hepáticas dos animais $\text{LDLr}^{-/-}$ induzidos por dieta. Como observado no perfil lipídico do soro, todos os grupos de dieta rica em gordura apresentaram um aumento no grau de esteatose e nenhuma das doses de RV foi suficiente para atingir os níveis basais (HD: $11,6 \pm 0,4$; HD-V50: $12,5 \pm 0,7$; HD-V300: $12,3 \pm 0,7\%$, $p > 0,05$) em comparação com o grupo controle (ND: $4,4 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$ - Figuras 4A e 4B). No entanto, em relação à atividade antioxidante, a maior

dose de RV (300 mg/Kg) foi capaz de restaurar os valores de oxidação proteica e lipídica aos níveis basais ($p < 0,05$). A dose mais baixa de RV (50 mg/kg) apenas diminuiu as proteínas oxidadas ($\sim 60\%$, $p < 0,05$), mas não o conteúdo lipídico.

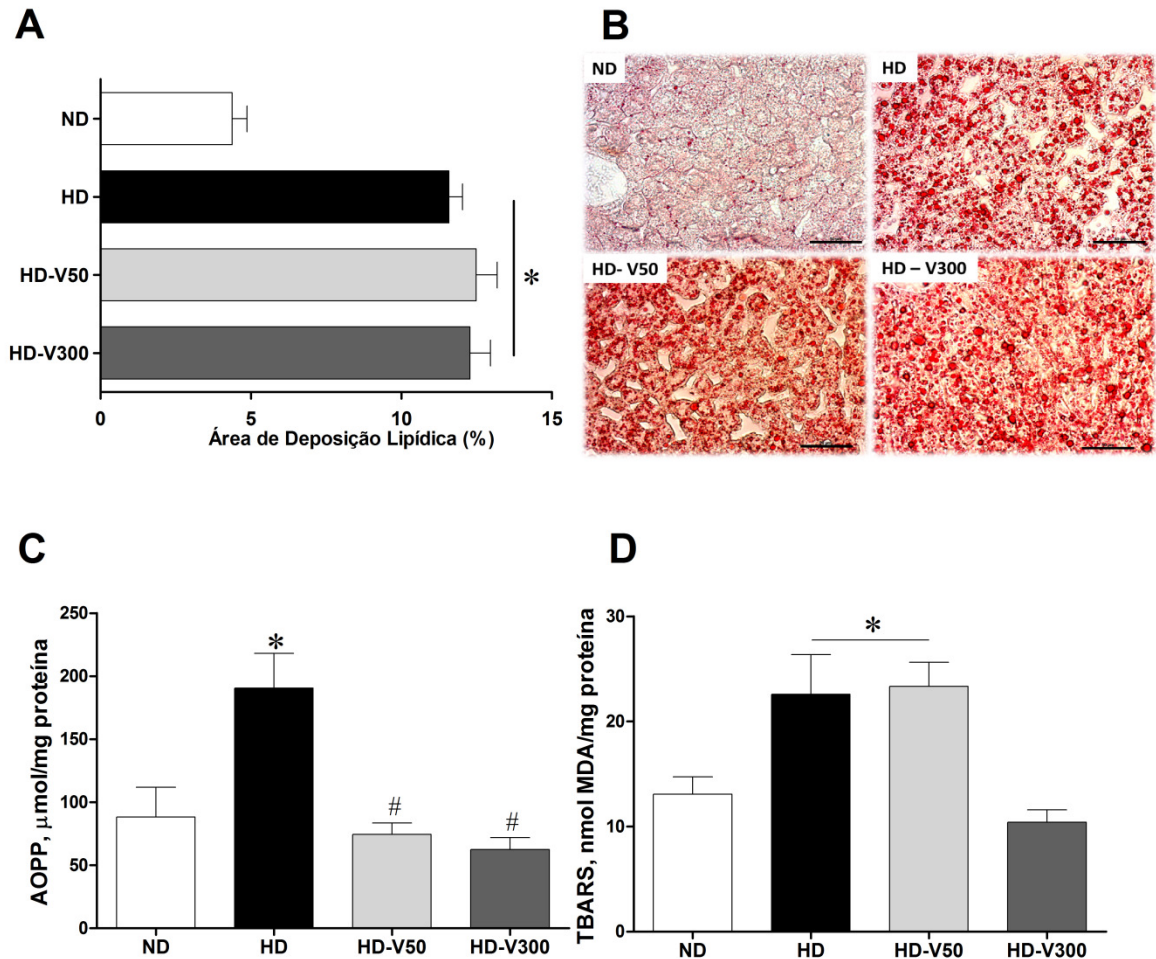


Figura 4. Deposição lipídica, oxidação proteica e peroxidação lipídica no fígado. A) Gráfico de barras mostrando que após 4 semanas de dieta rica em gordura, a RV não reduziu a esteatose hepática em ambas as doses. B) Fotomicrografias representativas que mostram a deposição lipídica (Oil-Red-O positivo) em células hepáticas dos respectivos grupos. C) Gráfico de barras representando os níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) em hepatócitos, com aumento no grupo HD e restauração com RV em ambas as doses. D) Peroxidação lipídica do fígado determinada pela reação do malondialdeído (MDA) com substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Da mesma forma, a dieta rica em gordura aumenta a oxidação lipídica. No entanto, apenas na maior concentração de RV (300 mg/Kg), estes níveis são restaurados para o normal. Média \pm EPM, para $n = 5-7$ por grupo. * $p < 0,05$ vs. grupo ND; # $p < 0,05$ vs. grupo HD. ANOVA seguida por post-hoc de Tukey.

4.5 EFEITO ANTIOXIDANTE *in vitro* DA RV CONTRA LESÃO INDUZIDA POR H₂O₂

A Figura 5 resume o efeito *in vitro* da RV sobre a viabilidade celular em três tipos de células vasculares importantes envolvidas no início e progressão da AT. Curiosamente, a menor dose de RV (10 µg/mL) protegeu o endotélio e as células do músculo liso contra a citotoxicidade mediada pelo peróxido, através do aumento da viabilidade celular (+34% e +21%, respectivamente, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle com H₂O₂ (variação de $0,74 \pm 0,02$ e $0,75 \pm 0,05$ vezes). Por outro lado, as doses intermediárias (V50) e superiores (V100) protegeram as células do endotélio (Figura 5A), mas não as células musculares lisas (Figura 5B), nem os fibroblastos (Figura 5C). Para fins de comparação, o ácido gálico, o principal componente da RV (Bôa et al., 2015; Pereira et al., 2017), foi testado em diferentes concentrações, e observou-se que o melhor efeito protetor contra o dano celular induzido por H₂O₂ foi de 40µM. O ácido gálico foi capaz de aumentar significativamente a viabilidade do endotélio e das células do músculo liso contra a citotoxicidade mediada pelo peróxido (Fig. 5A e 5B).

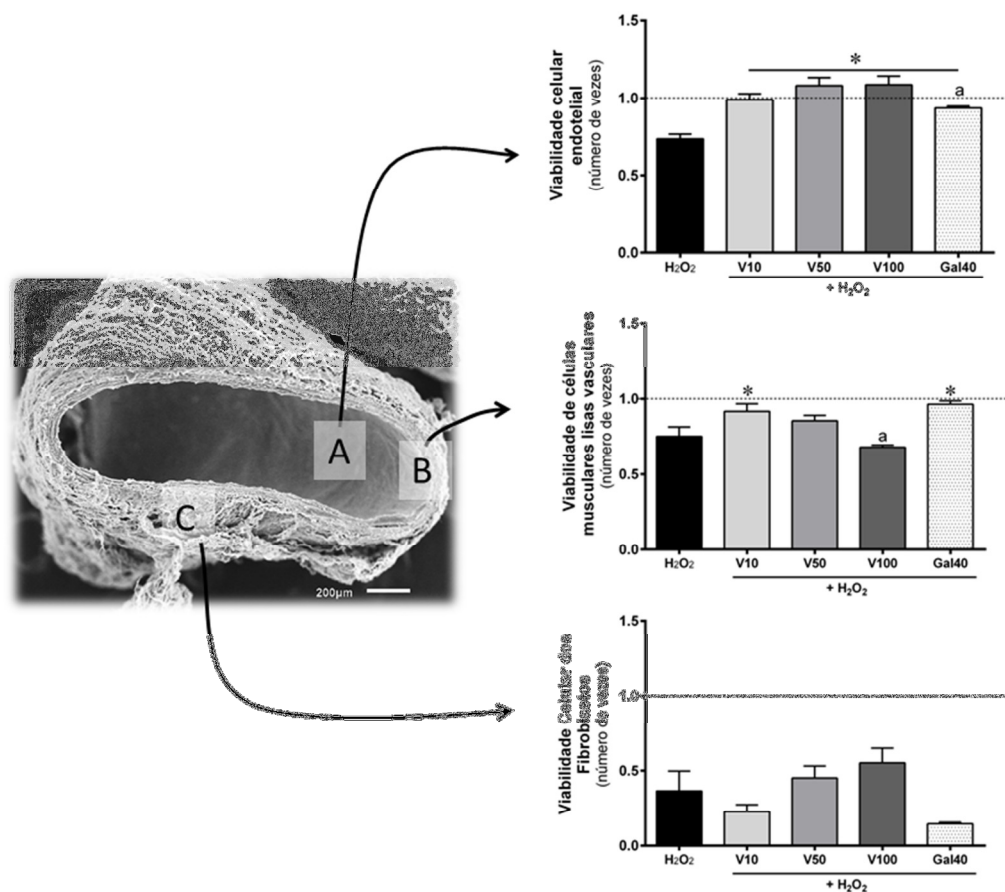


Figura 5. Efeito da RV sobre a citotoxicidade mediada por peróxido de hidrogênio em três camadas de células vasculares. Painel esquerdo: Fotomicrografia da aorta mostrando as três camadas vasculares (endotélio, músculo liso e fibroblastos) gentilmente fornecidas pelo Dr. Elisardo Corral Vasquez e Dr. Breno Valentim Nogueira do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Painel direito: Os gráficos de barras mostram a viabilidade celular expressa em “número de vezes” (“x-fold variation”) em relação ao grupo controle (preto). Entre os três tipos celulares, a dose mais baixa de RV protege principalmente o endotélio e as células do músculo liso contra a citotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio (500 μ M). V10: resina de *Virola* a 10 μ g/mL; V50: a 50 μ g/mL; V100: a 100 μ g/mL; Gal40: ácido gálico a 40 μ M. Os valores são expressos como média \pm EPM para n = 3-5 por grupo. *p<0,05 vs. Grupo ND. ^ap<0,05 vs. grupos V10 e V50 (ANOVA).

4.6 PRODUÇÃO DE NO *in vitro* INDUZIDA POR LPS

A Figura 6 demonstra a capacidade da RV de inibir a produção de NO induzida por LPS em macrófagos (células RAW 264.7). Como esperado, O acúmulo de nitrito nestas células aumentou devido à exposição ao LPS (~ 6 vezes) e foi reduzido pela NO sintase (L-NAME) ou pela inibição da ciclooxigenase (Indometacina) (~2 vezes, p<0,05) . As células expostas simultaneamente ao tratamento com LPS e concentrações crescentes de RV resultaram numa redução significativa da produção de NO de maneira dose dependente (V10: ~6 vezes, p<0,05; V50: ~4 vezes, p<0,05 e V100: ~2 vezes, p<0,05). Neste protocolo, também observamos que o ácido gálico a 40 μ M foi capaz de inibir a produção de NO de forma semelhante ao grupo V100 (~2 vezes). Resultados prévios de ensaio de viabilidade celular (MTT) demonstraram que a RV nessas concentrações, não causa danos às células (viabilidade > 95%).

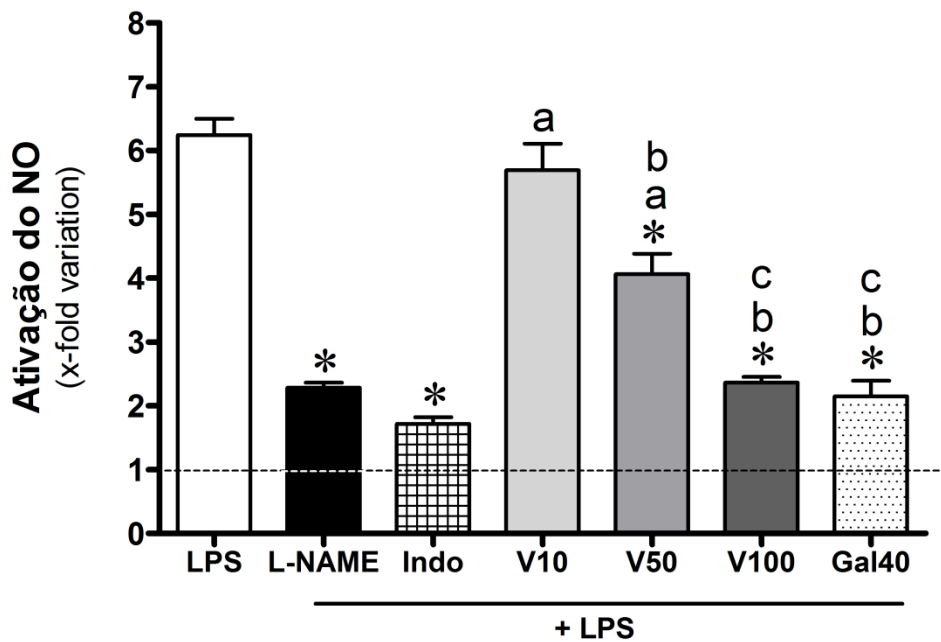


Figura 6. Produção de óxido nítrico (NO) induzida por lipopolissacarídeo (LPS), mostrando que a RV na dose mais alta (V100) inibiu a produção de NO induzida por LPS em macrófagos. L-NAME: inibidor não seletivo de NO sintase (500 μ M); Indo: indometacina, um inibidor não seletivo da ciclooxigenase (10 μ M); Gal40: ácido gálico a 40 μ M. Valores expressos como média \pm EPM para n = 3-5 por grupo. * $p < 0,05$ vs. LPS. ^a $p < 0,05$ vs. L-NAME ou indometacina; ^b $p < 0,05$ vs. V10; ^c $p < 0,05$ vs. V50 (ANOVA).

5. DISCUSSÃO

O objetivo da nossa pesquisa foi investigar os efeitos da resina de *Virola oleifera* sobre a progressão da aterosclerose em camundongos LDLr^{-/-} expostos a uma dieta rica em gordura. Os resultados mostraram que o tratamento oral com a RV, durante 4 semanas, reduziu o acúmulo de lipídeos vasculares, provavelmente através de efeitos antioxidantes sistêmicos e hepáticos, independentemente da dislipidemia. Além disso, os resultados *in vitro* demonstraram que a RV desenvolve propriedades antioxidantes no músculo liso vascular e em células endoteliais, reforçando o papel protetor da RV na progressão da AT.

Está bem estabelecido que o estresse oxidativo apresenta um papel crucial, tanto para a iniciação quanto para a progressão da AT (Vasquez et al., 2012; Leal et al., 2015; Libby et al., 2015; Lee et al., 2017). Paralelamente, estudos anteriores realizados em nosso grupo, demonstraram efeitos benéficos da RV sobre doenças relacionadas ao estresse oxidativo agudo (Bôa et al., 2015; Pereira et al., 2017). Neste estudo, utilizando doses semelhantes, demonstramos pela primeira vez que a RV também pode ser eficaz no combate a doenças vasculares crônicas, como a AT.

Para caracterizar se a mistura de muitas substâncias antioxidantes presentes na RV (ácido ferúlico, quercetina e principalmente ácido gálico) (Bôa et al., 2015; Pereira et al., 2017; Milaneze et al., 2014) contribui para seu efeito ateroprotetor, assim como observado com outros flavonóides (Morrison et al., 2013; Moss e Ramji, 2016), avaliamos seu efeito antioxidante em todos os grupos estudados. Nossos resultados confirmaram um "efeito anti-ROS" da RV através de abordagens diretas (por citometria de fluxo) e indiretas (por TBARS, AOPP e ensaios de citotoxicidade) (Poljsak et al., 2013; Bôa et al., 2015; He e Zuo, 2015). Uma vez que estes marcadores biomoleculares estão envolvidos na progressão da AT, por estresse oxidativo e inflamação (Leal et al., 2015; Santanna et al., 2017), a RV parece ser uma estratégia terapêutica em potencial no combate a esses eventos.

Evidências demonstraram que a hipercolesterolemia aumenta a formação de ROS em tecidos como o fígado, principal órgão do metabolismo lipídico e principal

alvo do estresse oxidativo (Folkmann et al., 2007; Suanarunsawat et al., 2011; Rodrigues et al., 2013; Xu et al., 2015; Li et al., 2015). Surpreendentemente, observou-se que a melhora diante da oxidação proteica e / ou lipídica no tratamento com RV (detectada pela análise de AOPP e TBARS - Figura 4), pode ser independente da esteatose hepática e/ou dislipidemia. Em relação à função hepática, a redução dos níveis séricos de transaminases hepáticas pela RV, demonstra seu potencial efeito hepatoprotetor, justificado, pelo menos em parte, pela estabilização da estrutura da membrana dos hepatócitos por meio de mecanismos antioxidantes (Wat et al., 2016). Nossos dados são corroborados por estudos recentes que utilizam espécies ricas em antioxidantes, como os compostos de silimarina, testados em estudos experimentais (Salamone et al., 2012) e clínicos (Cacciapuoti et al., 2013), o que reforça a importância dos flavonóides na prevenção de doenças relacionadas com a hipercolesterolemia. Assim, a novidade do nosso estudo *in vivo* foi a descoberta de que a RV exibe efeitos antioxidantes a nível sistêmico e hepático, estendendo suas propriedades protetoras não apenas para AT, mas também contra doenças relacionadas à dislipidemia.

É importante enfatizar que, embora esses efeitos protetores vasculares e hepáticos da RV pareçam ser independentes, nossos resultados podem sugerir possíveis ligações entre eles. Em primeiro lugar, a análise bioinformática funcional prévia por Kleemann et al. (2007) revelaram que o fígado exposto a uma dieta rica em gordura pode estimular muitos genes envolvidos em eventos inflamatórios (por exemplo, citocinas e seus receptores, moléculas de adesão e fatores de transcrição inflamatórios), contribuindo para AT. Em segundo lugar, Wielinga et al., (2011) demonstraram que o regime alimentar alternativo diminui efetivamente os fatores de risco vascular (por exemplo, NF- κ B, VCAM-1, E-selectina) fortalecendo esta hipótese (Wielinga et al., 2011). Terceiro, mas não menos importante, estudos experimentais recentes sugerem uma relação estreita entre AOPP, resistência à insulina e / ou AT (Liu et al., 2006; Guo et al., 2009; Mo et al., 2014; Venturini et al., 2015; Klafke et al., 2016). Uma vez que a RV reduziu os níveis de AOPP no fígado e, concomitantemente, ROS no soro (Figura 3) e glicemia (Tabela 1), não podemos descartar essa contribuição como uma nova substância anti-aterogênica. Portanto, nossos dados esclarecem esses achados, demonstrando que a RV, diminuindo o

dano oxidativo do fígado (mesmo sob condições hipercolesterolêmicas), possa de certa forma ajudar a diminuir a progressão da AT, sendo considerada uma estratégia importante para o tratamento de doenças relacionadas à síndrome metabólica.

Para determinar se esses efeitos protetores da RV observados *in vivo* foram também causados por ações diretas sobre as células vasculares, investigamos a ação da RV sobre fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais (Figura 5). Essa estratégia inovadora do nosso estudo foi capaz de demonstrar que a RV (mesmo a baixa dose) protege diferentes células contra a citotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio nas principais camadas vasculares envolvidas no desenvolvimento de AT (endotelial e média). Além disso, investigamos o papel da RV na produção de NO através da síntese de NO indutível (iNOS) em macrófagos. Sabe-se que, embora a biodisponibilidade basal do NO seja ateroprotetora, a superprodução de NO pela iNOS tem efeito citotóxico, sendo visto como uma "espada de dois gumes" que pode também contribuir para a progressão da AT (Colasanti e Suzuki, 2000; Rodrigues et al., 2013). O tratamento de macrófagos com RV (nas doses de 50 e 100 µg/mL) reduziu a superprodução de NO mediada por iNOS em macrófagos, caracterizando outro mecanismo antioxidante exercido pela RV. Mais especificamente, com base na comparação dos efeitos com o ácido gálico (o componente principal dos polifenóis desta resina), podemos inferir que esses papéis citoprotetores foram dependentes do ácido gálico. Assim, nossos dados apoiam estudos recentes que relatam o ácido gálico como protetor vascular em doenças relacionadas à síndrome metabólica (Ou et al., 2013; Badavi et al., 2016).

Algumas limitações devem ser consideradas em nosso estudo. Primeiro, a falta de monitoramento do ciclo estral em camundongos do sexo feminino em nosso protocolo não nos permite especular sobre a influência dos hormônios reprodutivos em nossos achados. Estudos futuros devem ser projetados para investigar todos os compostos bioativos da RV e sua contribuição biológica relativa e para elucidar outros possíveis mecanismos ateroprotetores, como citocinas anti ou pró-inflamatórias e respostas de sinalização.

6. CONCLUSÃO

Foi demonstrado que a administração crônica da RV diminui a deposição lipídica em camundongos dislipidêmicos LDLr^{-/-}, que pode ser justificado, pelo menos em parte, por mecanismos antioxidantes, reforçando seu papel protetor na deposição lipídica vascular, independente de efeito na hipercolesterolemia. Em geral, os nossos dados sugerem que compostos derivados da resina de *Virola oleifera* exercem importante bioatividade, capazes de prevenir/tratar AT. Futuros estudos clínicos são necessários para confirmar a eficácia desta resina em pacientes ateroscleróticos, abrindo novas perspectivas para o tratamento de outras doenças vasculares.

AGRADECIMENTOS

Este estudo contou com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento de Ciência e Tecnologia (CNPq): #445080/2014-0 (TMCP) e #303001/2015-1 (ECV), e da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES): #67597483-Universal (ECV), #239/2016 e 67664563 (BVN). Agradecemos ao farmacêutico Fabio Dias Côco pela resina da Virola e ao Laboratório Tommasi pela análise bioquímica.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores revelaram não haver conflito de interesses.

7. REFERÊNCIAS

Adetutu, A., Morgan, W.A., Corcoran, O., 2011. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a wound-healing plant of Nigeria. *J Ethnopharmacol.* 133, 116-119.

Alexander, R.W., 2003. The Jeremiah Metzger Lecture. Pathogenesis of atherosclerosis: redox as a unifying mechanism. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 114, 273-304.

Annan, K., Houghton, P.J., 2008. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., wound-healing plants of Ghana. *J Ethnopharmacol.* 119, 141-144.

Andrés, V.; Pello, O.M.; Silvestre-Roig, C., 2012. Macrophage proliferation and apoptosis in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, Oct;23(5):429-38.

Aoki, R., 2006. Endothelial dysfunction precedes atherosclerotic lesions and platelet activation in high fat diet-induced prothrombotic state. *trombosis research*, 117, 529-535.

Badavi, M., Bazaz, A., Dianat, M., Sarkaki, A., 2016. Gallic acid improves endothelium-dependent vasodilatory response to histamine in the mesenteric vascular bed of diabetic rats. *J Diabetes.*

Baliano, A.P.; Alves, F.S.; Pereira, A.C.H.; Aquije G.M.; Lenz, D.; Andrade, T.U.; ENDRINGER, D.C., 2015. Centennial Knowledge of Medicinal Plants Held in Communities of Espírito Santo, Brazil. *Ethnobot Res Applic.*

Batey, R.G.; Salmond, S.J.; Bensoussan, A., 2005. Complementary and alternative medicine in the treatment of chronic liver disease. *Curr. Gastroenterol.* 7, 63–70.

Behrendt, D.; Ganz, P., 2002. Endothelial function. from vascular biology to clinical applications. *The american journal of cardiology*, 90, 40-48.

Benítez, S.; Sánchez-Quesada, J.L.; Lucero, L.; Arcelus, R.; Ribas, V.; Jorba, O.; Castellví, A.; Alonso, E.; Blanco-Vaca, F.; Ordóñez-Llanos, J., 2002. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atherosclerosis*, Jan;160(1):223-32.

Bôa, I.S., Porto, M.L., Pereira, A.C., Ramos, J.P., Scherer, R., Oliveira, J.P., Nogueira, B.V., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., Endringer, D.C., Pereira, T.M., 2015. Resin from *Virola oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. PLoS One. 10-12.

Borges, F.C., Santos, L.S., Corrêa, M.J.C., Oliveira, M.N.; Souza Filho, A.P.S., 2007. Allelopathy potential of two neolignans isolated from *Virola surinamensis* (Myristicaceae) leaves. Revista Planta Daninha. 25, 51-59.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72, 248-254.

Breslow, J.L., 1993. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 90, 8314-8318.

Butler, M. S., 2008. Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. Progress in Drug Research. v.65, p 3-44.

Cacciapuoti, F., Scognamiglio, A., Palumbo, R., Forte, R., Cacciapuoti, F., 2013. Silymarin in non alcoholic fatty liver disease. World J Hepatol. 5, 109-113.

Carvalho, J.C.T.; Ferreira, L.P.; Santos, L.S.; Corrêa, M.J.C.; Campos, L.M.O.; Bastos, J.K.; Sarti, S.J., 1999. Anti-inflammatory activity of flavone and some of its derivatives from *Virola michelli* Heckel. Journal of Ethnopharmacology.; 64:173-177.

Colasanti, M., Suzuki, H., 2000. Review: The dual personality of NO. Trends Pharmacol Sci. 7, 249-252.

Colombo, A.F., Joly, C.A., 2010. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. Braz J Biol. 70, 697-708.

Da Luz, P. L.; Unt, L., 2003. Endotélio na aterosclerose: interações celulares e vasomotricidade. IN: Da Luz P. L.; Laurindo F. R. M.; Chagas, A. C. P. Endotélio e doenças cardiovasculares. SÃO PAULO: ATHENEU, CAP. 10, P. 133-160.

Da Luz, P.; Uint Libby P.; Dicarli M.; Weissleder R., 2010. The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets. *J nucl med.* may 1;51 suppl 1:33S-37S.

Daugherty, A.; Rateri, D. A., 2006. Handbook of Mouse Models of Cardiovascular Disease. (5):53-66.

de Almeida, L.S., Barboza, J.R., Freitas, F.P., Porto, M.L., Vasquez, E.C., Meyrelles, S.S., Gava, A.L., Pereira, T.M., 2016. Sildenafil prevents renal dysfunction in contrast media-induced nephropathy in Wistar rats. *Hum Exp Toxicol.*

Denny, C.; Zacharias, M.E.; Kohn, L.K.; Foglio, M.A.; Carvalho, J.E., 2007. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 17(4):598-603.

dos Santos Gramma, L.S., Marques, F.M., Vittorazzi, C., de Andrade, T.A., Frade, M.A., de Andrade, T.U., Endringer, D.C., Scherer, R., Fronza, M., 2016. *Struthanthus vulgaris* ointment prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. *J Ethnopharmacol.* 190, 319-327.

Fabricant, D.S.; Farnsworth, N.R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives.*v.109.p.69-75.

Folkmann, J.K., Loft, S., Møller, P., 2007. Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE^{-/-} and wild-type mice. *Mutagenesis.* 22, 105-110.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 126, 131-138.

Grassi, D.; Desideri, G.; Tiberti, S.; Ferri, C., 2009. Oxidative stress, endothelial dysfunction and prevention of cardiovascular diseases. *Agrofood Industry li-tech.*, 20, 76-79.

Grassi, D.; Desideri, G.; Ferri, C., 2010. Flavonoids: Antioxidants Against Atherosclerosis. *Nutrients.*, 2, 889-902.

Guizoni, D.M., Dorighello, G.G., Oliveira, H.C., Delbin, M.A., Krieger, M.H., Davel, A.P., 2016. Aerobic exercise training protects against endothelial dysfunction by increasing nitric oxide and hydrogen peroxide production in LDL receptor-deficient mice. *J Transl Med.* 14, 213.

Guo, Z.J., Hou, F.F., Liu, S.X., Tian, J.W., Zhang, W.R., Xie, D., Zhou, Z.M., Liu, Z.Q., Zhang, X., 2009. Picrorhiza scrophulariiflora improves accelerated atherosclerosis through inhibition of redox-sensitive inflammation. *Int J Cardiol.* 136, 315-324.

Hansson, G.K.; Robertson, A.K.; Söderberg-Nauclér, C., 2006. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, 1:297-329.

Hansson, G.K., Libby, P., Tabas, I., 2015. Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med.* 278, 483-493.

He, F., Zuo, L., 2015. Redox Roles of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 16, 27770-27780.

Hiruma-Lima, C.A.; Batista, L.M.; Almeida, A.B.A.; Magri, L.P.; Santos, L.C.; Vilegas, W.; Souza-Brito, A.R.M., 2009. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). *Journal of Ethnopharmacology.* 122:406-409.

Hurtubise, J., McLellan, K., Durr, K., Onasanya, O., Nwabuko, D., Ndisang, J.F., 2016. Review: The Different Facets of Dyslipidemia and Hypertension in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 18, 82.

V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. Sociedade brasileira de cardiologia, vol.101, n.4, 2013.

Kelly, D.M.; Jones T.H., 2013. Testosterone: a vascular hormone in health and disease. *J Endocrinol.* May 7;217(3):R47-71.

Klafke, J.Z., Porto, F.G., de Almeida, A.S., Parisi, M.M., Hirsch, G.E., Trevisan, G., Viecili, P.R., 2016. Biomarkers of Subclinical Atherosclerosis and Natural Products as Complementary Alternative Medicine. *Curr Pharm Des.* 22, 372-382.

Kleemann, R., Verschuren, L., van Erk, M.J., Nikolsky, Y., Cnubben, N.H., Verheij, E.R., Smilde, A.K., Hendriks, H.F., Zadelaar, S., Smith, G.J., Kaznacheev, V., Nikolskaya, T., Melnikov, A., Hurt-Camejo, E., van der Greef, J., van Ommen, B., Kooistra, T., 2007. Atherosclerosis and liver inflammation induced by increased dietary cholesterol intake: a combined transcriptomics and metabolomics analysis. *Genome Biol.* 8, R200.

Konya, K.; Vargas, Z.; Antus, S., 2001. Antioxidant properties of 8.O.4'-neolignans. *Phytomedicine.*; 8(6):454-459.

Kreatsoulas, C., Anand, S.S., 2010. The impact of social determinants on cardiovascular disease. *Can J Cardiol.* 8-13.

Leal, M.A., Balarini, C.M., Dias, A.T., Porto, M.L., Gava, A.L., Pereira, T.M., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., 2015. Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of atherosclerosis: the beneficial effects of sildenafil. *Curr Pharm Biotechnol.* 16, 517-530.

Lee, Y.T., Lin, H.Y., Chan, Y.W., Li, K.H., To, O.T., Yan, B.P., Liu, T., Li, G., Wong, W.T., Keung, W., Tse, G., 2017. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids Health Dis.* 16, 12.

Libby, P., Hansson, G.K., 2015. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res.* 116, 307-311.

Lima, G.R.M.; Montenegro, C.A.; Almeida, C.L.F.; Athayde-Filho, P.F.; barbosa-Filho, J.M.; Batista, L.M., 2011. Database survey of anti-inflammatory plants in South America: A review. *International Journal of Molecular Science.* 12:2692-2749.

Liu, S.X., Hou, F.F., Guo, Z.J., Nagai, R., Zhang, W.R., Liu, Z.Q., Zhou, Z.M., Zhou, M., Xie, D., Wang, G.B., Zhang, X., 2006. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26, 1156-1162.

Mello, A.P.; Da Silva, I.T.; Abdalla, D.S.; Damasceno, N.R., 2011. Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis, Apr;*215(2):257-65.

Meyrelles, S.S., Peotta, V.A., Pereira, T.M., Vasquez, E.C., 2011. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids Health Dis.* 10, 211.

Milaneze, B., Keijok, W., Oliveira, J., Peruch, B., Bartochevis, J., Liqui, L., 2014. The green synthesis of gold nanoparticle using extract of *Virola oleifera*. *BMC Proceedings*. 8, 29.

Mitchell, J.A., 2007. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Experimental physiology*, 93, N. 1, 141-147.

Mo, Z.C., Xiao, J., Tang, S.L., Ouyang, X.P., He, P.P., Lv, Y.C., Long, Z.F., Yao, F., Tan, Y.L., Xie, W., Zhang, M., Liu, D., Tian, G.P., Tang, D.P., Zheng, X.L., Zhao, G.J., Tang, C.K., 2014. Advanced oxidation protein products exacerbates lipid accumulation and atherosclerosis through downregulation of ATP-binding cassette transporter A1 and G1 expression in apolipoprotein E knockout mice. *Circ J*. 78, 2760-2770.

Morrison, M., van der Heijden, R., Heeringa, P., Kaijzel, E., Verschuren, L., Blomhoff, R., Kooistra, T., Kleemann, R., 2014. Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts anti-inflammatory effects on diet-induced human-CRP and NFκB in vivo. *Atherosclerosis*. 233, 149-156.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65, 55-63.

Moss, J.W., Ramji, D.P., 2016. Nutraceutical therapies for atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 13, 513-532.

Murrell, G.A.C.; Francis, M.J.O.; Bromley, L., 1990. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochemical Journal* 265, 659–665.

Navab, M.; Hama, S.Y.; Reddy, S.T.; Van Lenten, B.J.; Laks, H.; Fogelman, A.M., 2002. Oxidized lipids as mediators of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*. Aug;13(4):363-72.

Oliveira, J.A.; Sevanian, A.; Rodrigues, R.J.; Apolinário, E.; Abdalla, D.S., 2006. Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. *Clin Biochem*. Jul;39(7):708-14.

Orekhov, A.N., Sobenin, I.A., Revin, V.V., Bobryshev, Y.V., 2015. Development of Antiatherosclerotic Drugs on the basis of Natural Products Using Cell Model Approach. *Oxid Med Cell Longev*. 463797.

Ou, T.T., Lin, M.C., Wu, C.H., Lin, W.L., Wang, C.J., 2013. Gallic acid attenuates oleic acid-induced proliferation of vascular smooth muscle cell through regulation of AMPK-eNOS-FAS signaling. *Curr Med Chem.* 20, 3944-3953.

PACKARD, R.R.S.; LIBBY, P., 2008. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clinical chemistry*, 54, 24-38.

Paigen, B.; Morrow, A.; Holmes, P.A.; Mitchell, D.; Williams, R.A., 1987. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis.* 68:231-240.

Pedrosa, A.M.; Faine, L.A.; Grosso, D.M.; De Las Heras B.; Boscá, L.; Abdalla D.S., 2010. Electronegative LDL induction of apoptosis in macrophages: involvement of Nrf2. *Biochim Biophys Acta.* Apr;1801(4):430-7.

Pereira, A.C., Lenz, D., Nogueira, B.V., Scherer, R., Andrade, T.U., Costa, H.B., Romão, W., Pereira, T.M., Endringer, D.C., 2017. Gastroprotective activity of the resin from *Virola oleifera*. *Pharm Biol.* 55, 472-480.

Pereira, T.M., Nogueira, B.V., Lima, L.C., Porto, M.L., Arruda, J.A., Vasquez, E.C., Meyrelles, S.S., 2010. Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender. *Lipids Health Dis* 9, 87.

Poljsak, B., Šuput, D., Milisav, I., 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 956792.

Porto, M.L., Rodrigues, B.P., Menezes, T.N., Ceschim, S.L., Casarini, D.E., Gava, A.L., Pereira, T.M., Vasquez, E.C., Campagnaro, B.P., Meyrelles, S.S., 2015. Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice. *J Biomed Sci.* 22, 97.

Prasad, D.S., Kabir, Z., Devi, K.R., Dash, A.K., Das, B.C., 2014. Subclinical atherosclerosis and silent myocardial ischaemia in patients with type 2 diabetes: a protocol of a clinico-observational study. *Open Heart.* 1, e000100.

Rodrigues, B.P., Campagnaro, B.P., Balarini, C.M., Pereira, T.M., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., 2013. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 12, 128.

Salamone, F., Galvano, F., Marino Gammazza, G.A., Paternostro, C., Tibullo, D., Bucchieri, F., Mangiameli, A., Parola, M., Bugianesi, E., Li Volti, G., 2012. Silibinin improves hepatic and myocardial injury in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Liver Dis.* 44, 334-342.

Sánchez-Quesada, J.L.; Ortega, H.; Payés-Romero, A.; Serrat-Serrat, J.; González-Sastre, F.; Lasunción, M.A.; Ordóñez-Llanos, J., 1997. LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects. *Atherosclerosis*, Jul 25; 132(2):207-13.

Sánchez-Quesada, J.L.; Benítez, S.; Ordóñez-Llanos, J., 2004. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol.* Jun;15(3):329-35,.

Santanna, A.F., Filete, P.F., Lima, E.M., Porto, M.L., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., Endringer, D.C., Lenz, D., Abdalla, D.S., Pereira, T.M., Andrade, T.U., 2017. Chronic administration of the soluble, nonbacterial fraction of kefir attenuates lipid deposition in LDLr(-/-) mice. *Nutrition.* 35, 100-105.

Steffens, S.; Mach, F., 2004. Inflammation and atherosclerosis. *Herz.*;29:741-748.

Suanarunsawat, T., Ayutthaya, W.D., Songsak, T., Thirawarapan, S., Pongshompoo, S., 2011. Lipid-lowering and antioxidative activities of aqueous extracts of *Ocimum sanctum* L. leaves in rats fed with a high-cholesterol diet. *Oxid Med Cell Longev.* 962025.

SURH, Y.J., 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* 3, 768–778.

TABAS, I., 2010. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature reviews. Immunology*,10, 36-46.

Vasquez, E.C., Peotta, V.A., Gava, A.L., Pereira, T.M., Meyrelles, S.S., 2012. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *J Biomed Sci.* 19-22.

Vasquez, E.C., Gava, A.L., Graceli, J.B., Balarini, C.M., Campagnaro, B.P., Pereira, T.M., Meyrelles, S.S., 2016. Novel Therapeutic Targets for Phosphodiesterase 5 Inhibitors: current state-of-the-art on systemic arterial hypertension and atherosclerosis. *Curr Pharm Biotechnol.* 17, 347-364.

Venturini, D., Simão, A.N., Dichi, I., 2015. Advanced oxidation protein products are more related to metabolic syndrome components than biomarkers of lipid peroxidation. *Nutr Res.* 35, 759-765.

Young, I.S.; Mceneny J., 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans. Ma,y;29(Pt 2):358-62.*

Wielinga, P.Y., Yakala, G.K., Heeringa, P., Kleemann, R., Kooistra, T., 2011. Beneficial effects of alternate dietary regimen on liver inflammation, atherosclerosis and renal activation. *PLoS One.* 6, e18432.

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B., 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49, 1304-1313.

Wat, E., Ng, C.F., Wong, E.C., Koon, C.M., Lau, C.P., Cheung, D.W., Fung, K.P., Lau, C.B., Leung, P.C., 2016. The hepatoprotective effect of the combination use of *Fructus Schisandrae* with statin--A preclinical evaluation. *J Ethnopharmacol.* 178, 104-114.

Xu, X., Lu, L., Dong, Q., Li, X., Zhang, N., Xin, Y., Xuan, S., 2015. Research advances in the relationship between nonalcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 14, 158.

Zadelaar, S., Kleemann, R., Verschuren, L., de Vries-Van der Weij, J., van der Hoorn, J., Princen, H.M., Kooistra, T., 2007. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27, 1706-1721.

Zhao, Y., Pennings, M., Hildebrand, R.B., Ye, D., Calpe-Berdiel, L., Out, R., Kjerrulf M, Hurt-Camejo, E., Groen, A.K., Hoekstra, M., Jessup, W., Chimini, G., Van Berkel, T.J., Van Eck, M., 2010. Enhanced foam cell formation, atherosclerotic lesion development, and inflammation by combined deletion of ABCA1 and SR-BI in Bone marrow-derived cells in LDL receptor knockout mice on western-type diet. *Circ Res.* 107, 20-31.

8. ANEXOS

8.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Vila Velha
Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal (CEUA-UVV)

PARECER DO RELATOR

Parecer Nº. 374-2016

Pesquisador (a) Responsável: Thiago de Melo Costa Pereira
Tipo de Pesquisa: Avaliação dos efeitos celulares e vasculares da resina de *Virola oleifera* A.C. Smith em camundongos hipercolesterolêmicos LDLr Knockout
Instituição onde será desenvolvido: Universidade Vila Velha
Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: “Avaliação dos efeitos celulares e vasculares da resina de *Virola oleifera* A.C. Smith em camundongos hipercolesterolêmicos LDLr Knockout”, tendo como pesquisador(a) responsável Prof. Thiago de Melo Costa Pereira, considero que o projeto se encontra adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esse Comitê.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Vila Velha.

Vila Velha, 29 de abril de 2016.

Prof. Bárbara Loureiro
Relator da CEUA-UVV

Universidade Vila Velha

Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP.: 29102-770
E-mail ceua@uw.br

8.2 ARTIGO PUBLICADO

Journal of Ethnopharmacology 206 (2017) 65–72



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep



Chronic administration of antioxidant resin from *Virola oleifera* attenuates atherogenesis in LDLr^{-/-} mice



Paola Nogueira Coutinho^a, Beatriz Peters Pereira^a, Ana Claudia Hertel Pereira^a, Marcella Leite Porto^b, Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis^c, Afrânio Côgo Destefani^c, Silvana Santos Meyrelles^d, Elisardo Corral Vasquez^{a,d}, Breno Valentim Nogueira^c, Tadeu Uggere de Andrade^a, Denise Coutinho Endringer^{a,b}, Marcio Fronza^a, Thiago Melo Costa Pereira^{a,b,*}

^a Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Vila Velha University (UVV), Vila Velha, ES, Brazil

^b Federal Institute of Education, Science and Technology (FIES), Vila Velha, ES, Brazil

^c Laboratory of Cellular Ultrastructure Carlos Alberto Radice (LUCAR), Department of Morphology, UFES, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

^d Laboratory of Translational Physiology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Resin
Biosilia
Ucuba
Atherosclerosis
Oxidative stress
Steatosis

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith, Myristicaceae has been largely used in traditional folk medicine in Brazil as an anti-inflammatory agent and our previous data indicated the antioxidant properties in other oxidative stress-related models. However, its effects on atherosclerosis (AT) are not yet investigated.

Aims of the study: To evaluate the influence of resin from *Virola oleifera* (RV) on progression of AT in LDLr^{-/-} mice.

Materials and methods: LDLr^{-/-} mice were divided into 4 groups: 1) The ND group received a normal diet without treatment. 2) The HD group received a high-fat diet without treatment. 3) The HD-V50 received a high-fat diet and was orally treated with RV at 50 mg/Kg. 4) The HD-V300 received a high-fat diet and was orally treated with RV at 300 mg/Kg. After 4 weeks, blood was collected to quantify biochemical parameters and ROS total and the aorta was removed to measure the lipid deposition by en face analysis. The liver was also collected to determine total lipids and lipid and protein oxidation. In order to investigate in more detail the contributions of RV in the vascular structure, we carried out the in vitro tests using four cellular types: macrophages, fibroblasts, vascular smooth muscle and endothelial cells.

Results: We showed that the chronic treatment of RV at both doses reduced vascular lipid accumulation (~50%, p < 0.05), probably through systemic and hepatic antioxidant effects, independent of dyslipidemia. Moreover, the in vitro assay results demonstrated that RV develops antioxidant properties on the vascular smooth muscle and endothelial cells, reinforcing the protective role of RV in progression of AT. LPS-stimulated macrophages treated with RV resulted in a significant reduction of NO production in a concentration-dependent manner.

Conclusions: Chronic treatment with RV diminishes lipid deposition in atherosclerotic mice, which may be justified, at least in part, by antioxidant systemic and local mechanisms, reinforcing the protective role this resin in the setting of vascular lipid deposition, independent of hypercholesterolemia.

1. Introduction

Atherosclerosis (AT) is a chronic inflammatory disease of conductance arteries and its subclinical condition is an important trigger of future unfavorable cardiovascular outcomes and eventually also sud-

den death (Kreatsoulas and Anand, 2010; Meyrelles et al., 2011; Prasad et al., 2014; Hansson et al., 2015; Vasquez et al., 2016). Classically, it is known that this disorder is initiated by endothelial dysfunction followed by lipid accumulation into subintimal space of the vessel wall and markedly influenced by immunomodulators and

* Correspondence to: Vila Velha University, Pharmaceutical Sciences Graduate Program, AV. COMISSARIO JOSE DANTAS DE MELO 21, BOA VISTA, 29102-920 Vila Velha, Espírito Santo, Brazil.

Email addresses: paolacoutinho@gmail.com (P.N. Coutinho), bpeters@uvv.br (B.P. Pereira), amhertel@gmail.com (A.C. Hertel Pereira), colla.porto@gmail.com (M.L. Porto), aricialeone@hotmail.com (A.L.E. Monteiro de Assis), afmisco@gmail.com (A. Côgo Destefani), meyrelles.via@ufes.br (S.S. Meyrelles), evvasquez@ufes.br (E.C. Vasquez), brenovalentim@gmail.com (B.V. Nogueira), tadeu.uggere@uvv.br (T.U. de Andrade), denise@uvv.br (D.C. Endringer), marcfonza@gmail.com (M. Fronza), petermelo@gmail.com (T.M. Costa Pereira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.015>

Received 25 March 2017; Received in revised form 25 April 2017; Accepted 10 May 2017

Available online 11 May 2017

0378-8741/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.